



Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia

Biorremediación de suelos contaminados por
hidrocarburos: caracterización microbiológica,
química y ecotoxicológica

Marc Viñas Canals

Barcelona, 2005



Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Microbiologia

Biorremediación de suelos contaminados por
hidrocarburos: caracterización microbiológica,
química y ecotoxicológica

Tesis dirigida por la Dra.
Anna María Solanas Cánovas

Vº Bº de la directora de la Tesis

Memoria presentada por

Marc Viñas Canals

para optar al título de Doctor en Biología por
la Universitat de Barcelona

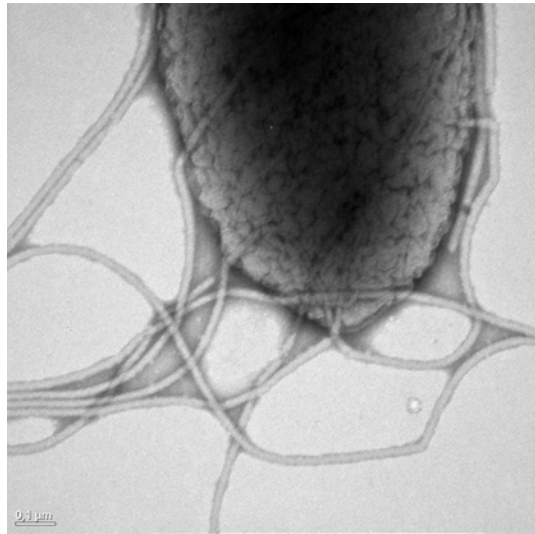
Dra. Anna María Solanas Cánovas

Barcelona, abril de 2005

Programa de doctorado:

Microbiología Ambiental y Biotecnología, bienio 1998-2000

Als meus pares Maria i Ram3n
A la Laia i l'Emma
i a la meva companya S3nia



«Llegará una 3poca en la que una investigaci3n diligente y prolongada sacar3 a la luz cosas que hoy est3n ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, ser3a insuficiente para investigar una materia tan vasta [...]. Por lo tanto este conocimiento s3lo se podr3 desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una 3poca en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoramos cosas que para ellos son tan claras... Muchos son los descubrimientos reservados para las 3pocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo ser3a una cosa muy limitada si no ofreciera a cada 3poca algo que investigar... La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.»

S3neca. Cuestiones naturales, libro 7, siglo I

AGRADECIMIENTOS

La realización de una Tesis doctoral es una experiencia vital intensa, en la que se comparten momentos y vivencias con un gran número de personas, que directa o indirectamente participan del trabajo realizado. Por lo tanto antes de nada quisiera mostrar mi agradecimiento de una manera general a todas las personas que han intervenido.

En primer lugar a la Dra Anna María Solanas, directora de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de realizarla, y por encima de todo, por haberme mostrado en todo momento una gran confianza en su dirección, y unas enormes “dosis” de humanidad en los momentos más penosos tanto del trabajo como de la vida. También me gustaría resaltar su exigencia y rigor durante la fase experimental y la redacción del trabajo.

También quisiera agradecer de forma especial, a la Dra. M^a José Prieto, por su incuestionable ayuda y tenacidad en muchísimos momentos de esta Tesis. Me gustaría destacar, en especial, sus excelentes análisis de microscopía electrónica y de AFM que han sido de gran utilidad en esta Tesis. También quisiera agradecer su comprensión y sensibilidad en otros aspectos no científicos, pero también de gran importancia para las personas.

A la Dra. Magda Grifoll, que me transmitió una gran dosis de formación, experiencia y rigor en mis primeros años en el laboratorio y que fue codirectora, conjuntamente con la Dra. Anna M^a Solanas, del Master en Biología experimental..

A todos los que forman parte del laboratorio: en especial al Dr Jordi Sabaté, por transmitir toda su experiencia, espíritu científico y creatividad, que me han hecho disfrutar de la ciencia desde el primer día; a Quim, gran compañero y amigo, dispuesto a escuchar y a ayudar en todo momento; a Nuria y Miriam, por mostrar siempre un gran interés e ilusión por aprender y ayudar también en multitud de ocasiones; a Jorge, Zaira, Dani y Lida, por compartir muchas horas de laboratorio y siempre con buenos ánimos; a Ricard Martínez por su inestimable ayuda en los momentos experimentales más pesados.

Al Dr. Jorge Lalucat y Dra. Caterina Guasp, por iniciarme en el mundo de las técnicas moleculares y en especial del DGGE en la Universitat de les Illes Balears,.

Los análisis de GC-MS y de GC-IRMS fueron realizados por los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona. Quisiera agradecer a Pilar Teixidó y Asunció Marín su tiempo dedicado, así como también la ayuda que han mostrado en aspectos técnicos de cromatografía.

Al Dr. Miquel Borràs y Joaquim de la Puente, por su gran aportación y ayuda en los estudios de toxicidad aguda y genotoxicidad, realizados con *Eisenia foetida* y *Xenopus laevis* . en la unidad de Toxicología ambiental del Parc Científic de la U.B.

A la Dra. M^a Angels Manresa y Dra. Arelis Abalos y a Escar por su gran apoyo y permitir el estudio del biotensioactivo M_{AT10} en esta Tesis.

Respecto a los compañeros del Departamento, he tenido la suerte de conocer a una gente estupenda, con una gran ilusión por aprender, ayudar y vivir. Muchos compañeros ya han terminado o están a punto de terminar sus Tesis, pero su recuerdo en el Departamento sigue bien presente y es aún un referente: Albert, Silvia, Juan Luís, Melanie, Quim, Marta, Xavi Pujol, Nuria, Xavi Vilanova, Idoia, Gonzalo, Pili, Santi, Gloria, süssana, Oscar, Cristian; para todos vosotros mi más sincero agradecimiento. Nunca olvidaré la primera y única excursión que hicimos muchos compañeros del laboratorio al Taga.... También agradezco a los Dres. Toni Navarrete, Jordi Urmeneta, Xavi Abad y Crsitina Madrid por su actitud siempre generosa y de gran ayuda durante muchos momentos de esta Tesis. Tampoco me olvido, ni mucho menos, de los compañeros y amigos con los que comparto trabajo y muchas alegrías actualmente en el Departamento: Quim, Marta, Xavi Bonjoch, Cristina, Xavi del Campo, Oscar, Sonia R., Laura, Cristian, Rosa, Jorge, Nacho, Néstor, Palqui, Malu, Eli, Silvia, Pili, Pere, Cristian, Andrei, Mari y Lluís y con los que me he sentido respaldado en todo momento dentro y fuera del trabajo.

También, han habido personas de fuera del departamento cuya ayuda ha sido sumamente importante. Mi familia me ha respaldado en todo momento, respetando mis propias decisiones e ilusión por la investigación. Muy especialmente agradezco el fabuloso apoyo que Sonia me ha brindado en todo momento, incluso en situaciones poco favorables a ello, demostrándome día a día su gran coraje y corazón. También tengo presente y, agradezco sinceramente, el caluroso apoyo que he recibido de muchos amigos a lo largo de este viaje tan largo: Ignasi, Dolors, Xavi V, Mari, Marcos, Carles, Montse, Anna, Néstor, Irma, Imma, Boris, David, Toni, Manel, Yolanda, Franc, Carmen, Lluisa, Ignasi H., Joao, Enric. Finalmente quisiera agradecer muy sinceramente el interés que siempre me mostraron por la Tesis personas que, lamentablemente y dolorosamente, ya no están con nosotros. Para todos ellos, mi más sincera gratitud y mis mejores recuerdos.

ÍNDICE

Prólogo.....	3
Antecedentes.....	3
Planteamiento del trabajo.....	6
 Capítulo I :	
 Caracterización catabólica de consorcios microbianos para su utilización en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos	
 I Introducción.....	11
1.1 Composición del crudo de petróleo.....	11
1.1.1 Composición general.....	11
1.1.2 Composición por familias de hidrocarburos.....	12
1.1.2.1 Parafinas volátiles.....	12
1.1.2.2 Parafinas no volátiles.....	13
1.1.2.3 Naftenos (cicloalcanos).....	13
1.1.2.4 Oleofinas (alquenos).....	14
1.1.2.5 Hidrocarburos aromáticos.....	14
1.1.2.6 Resinas y asfaltenos.....	15
1.1.3 Composición del crudo según el origen.....	16
1.2 Refinado del crudo de petróleo.....	17
1.3 Antecedentes en el estudio de la degradación de crudos de petróleo.....	19
1.3.1 Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas.....	19
1.3.2 Biodegradación de crudo de petróleo por cultivos mixtos.....	19
1.3.2.1 Consorcios definidos.....	20
1.3.2.2 Consorcios no definidos.....	20
1.3.3 Utilización de tensioactivos en estudios de biodegradación.....	21
II Objetivos.....	23
III Materiales y métodos.....	24
3.1 Diseño experimental.....	24

3.2	Reactivos y disolventes.....	24
3.3	Medios de cultivo.....	24
3.4	Crudo de petróleo Casablanca.....	25
3.5	Consortios microbianos degradadores de hidrocarburos.....	26
3.5.1	Consortio microbiano TD.....	26
3.5.1.1	Obtención de un consorcio degradador de gasoil.....	26
3.5.1.2	Capacidad degradadora del consorcio TD.....	27
3.5.2	Consortio microbiano F1AA.....	29
3.5.3	Consortio microbiano AM.....	30
3.6	Ensayos de biodegradación de los consorcios AM, TD y F1AA frente al crudo de petróleo Casablanca.....	32
3.6.1	Condiciones de incubación.....	32
3.6.2	Obtención y preparación de los inóculos.....	32
3.6.2.1	Tipos de inóculos utilizados.....	32
3.6.2.2	Cuantificación de la población microbiana heterótrofa y degradadora.....	33
3.6.3	Análisis químico.....	33
3.6.3.1	Tratamiento del material de vidrio para el análisis químico.....	33
3.6.3.2	Extracto orgánico total (EOT).....	34
3.6.3.3	Fraccionamiento en columna.....	34
3.6.3.4	Análisis de las fracciones por GC-MS.....	35
3.6.3.5	Determinación de la aromaticidad de la fracción poliaromática.....	37
3.7	Evaluación de la adición de ramnolípidos M _{AT10} en la biodegradación de crudo de petróleo Casablanca por el consorcio AM.....	38
3.7.1	Características del biotensioactivo M _{AT10}	38
3.7.1.1	Cepa productora.....	38
3.7.1.2	Composición química de M _{AT10}	39
3.7.1.3	Propiedades fisicoquímicas de M _{AT10}	40
3.7.2	Ensayos de biodegradación.....	41
3.7.2.1	Ensayos realizados y condiciones de incubación.....	41
3.7.2.2	Análisis químico del proceso de biodegradación.....	42
3.7.2.2.1	Extracción orgánica total y obtención de los TPH.....	42
3.7.2.2.2	Análisis de la fracción saturada por GC-FID.....	42
3.7.2.2.3	Análisis de la fracción aromática por GC-MS-SIM.....	43

IV	Resultados	44
4.1	Población microbiana de los consorcios microbianos F1AA, TD y AM.....	44
4.2	Biodegradación del crudo Casablanca por los consorcios microbianos.....	45
4.2.1	Caracterización cromatográfica del crudo Casablanca.....	45
4.2.2	Eficiencia de extracción.....	47
4.2.3	Biodegradación del extracto orgánico total.....	48
4.2.4	Biodegradación de la fracción saturada, monoaromática y poliaromática.....	48
4.2.5	Biodegradación de compuestos diana.....	50
4.2.5.1	Biodegradación de los <i>n</i> -alcanos e isoprenoides.....	50
4.2.5.2	Biodegradación de compuestos aromáticos.....	50
4.2.6	Aromaticidad de la fracción poliaromática (F3).....	53
4.3	Efecto de los ramnolípidos M _{AT10} en la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio AM.....	54
4.3.1	Biodegradación de los TPH e isoprenoides.....	55
4.3.2	Biodegradación de los HAPs diana.....	57
V	Discusión	59
5.1	Consortio F1AA.....	60
5.2	Consortio TD.....	61
5.3	Consortio AM.....	62
5.4	Efecto de la presencia de los ramnolípidos M _{AT10} en la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio AM.....	63
6	Conclusiones	65

Capítulo II:

Caracterización de la diversidad microbiana de un consorcio degradador de HAPs

1	Introducción	69
1.1	Los hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	69
1.1.1	Estructura de los HAPs.....	69
1.1.2	Origen y distribución de los HAPs en el medio ambiente.....	70
1.1.3	Biodegradación de HAPs.....	72
1.1.4	Microorganismos degradadores de HAPs.....	74
1.1.5	Utilización de inóculos exógenos en experiencias de biorremediación.....	74

1.1.6	Estudio de la diversidad de comunidades microbianas.....	77
1.1.6.1	Metodologías dependientes de cultivo.....	78
1.1.6.2	Metodologías independientes de cultivo.....	79
1.1.6.2.1	PLFA.....	79
1.1.6.2.2	ARDRA.....	80
1.1.6.2.3	DGGE y TGGE.....	81
1.1.6.2.4	SSCP.....	82
1.1.6.2.5	T-RFLP.....	82
1.1.6.2.6	FISH.....	83
1.1.6.2.7	Limitaciones de las técnicas independientes de cultivo.....	84
II	Objetivos.....	87
III	Materiales y métodos.....	88
3.1	Diseño experimental.....	88
3.2	Medios de cultivo, reactivos y disolventes.....	88
3.3	Consortio microbiano AM.....	90
3.4	Seguimiento de la población heterótrofa y degradadora de HAPs.....	90
3.5	Análisis por microscopia del consorcio AM.....	90
3.5.1	Microscopia óptica.....	91
3.5.2	Microscopia electrónica de transmisión.....	91
3.5.2.1	Estudio ultraestructural de cortes celulares.....	91
3.5.2.2	Tinción negativa.....	91
3.5.3	Microscopia electrónica de barrido.....	92
3.5.4	Microscopia de fuerzas atómicas (AFM).....	92
3.6	Aislamiento de microorganismos cultivables.....	93
3.6.1	Aislamiento de heterótrofos.....	93
3.6.2	Aislamiento de degradadores de HAPs.....	93
3.6.2.1	Agar mineral esprayado con hidrocarburo.....	93
3.6.2.2	Agar mineral con hidrocarburo en fase vapor.....	93
3.6.2.3	Agar fenantreno.....	94
3.7	Capacidad biodegradadora de HAPs de las cepas aisladas.....	94
3.7.1	Ensayos realizados y condiciones de incubación.....	94
3.7.2	Análisis químico del proceso de biodegradación.....	94
3.8	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	95
3.8.1	Método por congelación rápida y choque térmico.....	95

3.8.2	Método por calor: extractos celulares hervidos.....	97
3.9	Análisis electroforético del DNA.....	97
3.10	Amplificación de genes 16S rRNA y 18S rRNA mediante PCR.....	98
3.11	Análisis de DGGE.....	100
3.11.1	Preparación de geles desnaturalizantes.....	101
3.11.2	Tinción y visualización de geles de DGGE.....	104
3.11.3	Escisión y análisis de bandas de DGGE.....	104
3.12	Obtención de librerías de clones de genes 16S y 18S rRNA.....	105
3.12.1	Ligación de productos de PCR.....	105
3.12.2	Obtención de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	105
3.12.3	Transformación de células competentes.....	106
3.12.4	Detección de clones recombinantes.....	106
3.12.4.1	Amplificación del inserto.....	106
3.12.4.2	Digestión enzimática de clones recombinantes.....	107
3.13	Secuenciación.....	107
3.14	Análisis de las secuencias de DNA.....	108
3.14.1	Secuencias estudiadas.....	109
IV	Resultados	110
4.1	Estudio de microscopia del consorcio AM.....	110
4.2	Evolución de la población heterótrofa y degradadora de HAPs.....	113
4.3	Aislamiento y clasificación taxonómica de las cepas aisladas.....	115
4.3.1	Aislamiento de cepas heterótrofas.....	115
4.3.2	Aislamiento de cepas degradadoras de HAPs.....	115
4.3.3	Secuencias de genes 16S rRNA y 18S rRNA de las cepas aisladas.....	117
4.4	Caracterización de la capacidad degradadora de HAPs de las cepas aisladas.....	118
4.5	Estudio del consorcio AM por DGGE.....	119
4.5.1	Perfil de DGGE del periodo de incubación del consorcio AM.....	120
4.5.2	Caracterización por DGGE del consorcio AM a los 15 días de incubación.....	121
4.6	Librerías de clones de genes 16SrRNA y 18S rRNA.....	123
4.6.1	Librería de genes 16S rRNA.....	123
4.6.2	Librería de genes 18S rRNA.....	125
V	Discusión	126
5.1	Cepas aisladas del consorcio AM.....	126

5.2	Estudio por DGGE del consorcio AM.....	128
5.3	Estudio del consorcio AM por librerías de clones.....	129
5.4	Complementariedad de las técnicas dependientes e independientes de cultivo.....	130
VI	Conclusiones.....	137

Capítulo III:

Diseño y evaluación de ensayos de biotratabilidad para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

I	Introducción.....	141
1.1	El suelo.....	141
1.1.1	Estructura y componentes del suelo.....	141
1.1.2	Las poblaciones microbianas.....	142
1.1.3	Destino ambiental de los contaminantes orgánicos en un suelo.....	143
1.2	Legislación ambiental de suelos contaminados.....	144
1.2.1	Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005).....	144
1.2.2	Ley de Residuos (10/1998).....	145
1.2.2.1	Real Decreto de 14 de enero de 2005 (9/2005).....	146
1.3	Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación de suelos contaminados.....	150
1.4	Factores que condicionan la biorremediación de un suelo.....	151
1.5	Fases necesarias para la aplicación de la tecnología de la biorremediación.....	156
1.6	Los ensayos de tratabilidad en la biorremediación de suelos contaminados.....	156
II	Objetivos.....	159
III	Material y métodos.....	160
3.1	Reactivos y disolventes.....	160
3.2	Muestras de suelo.....	160
3.2.1	Suelo A.....	160
3.2.2	Suelo B.....	161
3.3	Protocolo del ensayo de tratabilidad.....	162
3.3.1	Análisis fisicoquímico del suelo.....	164
3.3.1.1	Textura del suelo.....	164
3.3.1.2	Humedad y la capacidad de campo.....	165
3.3.1.3	Carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total.....	165

3.3.1.4	Concentración de nutrientes inorgánicos.....	166
3.3.1.4.1	Nitratos, nitritos y fosfatos.....	166
3.3.1.4.2	Amonio.....	166
3.3.1.5	pH.....	167
3.3.1.6	Conductividad eléctrica.....	167
3.3.2	Estudio de la población microbiana.....	167
3.3.2.1	Determinación de la población microbiana heterótrofa y degradadora de alcanos.....	167
3.3.2.2	Ensayos de respirometría.....	167
3.3.3	Ensayos de toxicidad.....	169
3.3.4	Ensayos rápidos de biodegradabilidad en suelo resuspendido en agua (slurries).....	170
3.3.4.1	Tratamientos.....	170
3.3.4.2	Análisis químico.....	170
3.3.5	Ensayos con microcosmos.....	171
3.3.6	Análisis químico de hidrocarburos.....	173
3.3.6.1	Extracto orgánico total (EOT).....	173
3.3.6.2	Hidrocarburos totales del petróleo (TPH).....	174
IV	Resultados y discusión.....	175
4.1	Fase I del estudio de tratabilidad.....	175
4.1.1	Poblaciones microbianas y respirometría.....	175
4.1.2	Estudio de la toxicidad aguda.....	177
4.1.3	Ensayos rápidos de biodegradabilidad.....	178
4.2	Fase II del estudio de tratabilidad.....	180
4.2.1	Microcosmos del suelo A.....	181
4.2.2	Microcosmos del suelo B.....	185
V	Conclusiones.....	188

Capítulo IV:

Biorremediación de un suelo contaminado por creosota: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica

I	Introducción.....	193
1.1	La creosota.....	193

1.2	Biorremediación de suelos contaminados por HAPs.....	196
1.2.1	Marco teórico.....	196
1.2.2	Estudio de las poblaciones microbianas en procesos de biorremediación de suelos contaminados.....	198
1.2.3	Estudios de ecotoxicidad en la biorremediación de suelos contaminados	199
1.2.3.1	Importancia de los estudios ecotoxicológicos.....	199
1.2.3.2	Ensayos de ecotoxicidad.....	201
1.2.3.2.1	Ensayos de toxicidad aguda	201
1.2.3.2.1.1	Microtox® (<i>Vibrio fischeri</i>).....	201
1.2.3.2.1.2	Lumbrídeos (<i>Eisenia foetida</i>)	202
1.2.3.2.1.3	Plantas superiores.....	202
1.2.3.2.2	Ensayos de genotoxicidad.....	203
1.2.3.2.2.1	Ensayo FETAX.....	203
1.2.3.2.2.2	Comet test.....	203
1.2.3.2.2.3	Mutagénesis en bacterias.....	204
II	Objetivos.....	206
III	Materiales y métodos.....	207
3.1	Diseño experimental.....	207
3.2	Suelo.....	207
3.3	Análisis fisicoquímico y microbiológico del suelo.....	208
3.3.1	Análisis fisicoquímico.....	208
3.3.2	Análisis microbiológico.....	209
3.2.1	Heterotrofos totales y degradadores de HAPs	209
3.3.2.2	Ensayos respirométricos.....	209
3.4	Microcosmos.....	210
3.4.1	Optimización de la humedad del suelo.....	210
3.4.2	Tratamientos.....	210
3.4.3	Seguimiento de los nutrientes inorgánicos.....	213
3.4.4	Análisis químico de hidrocarburos y compuestos polares.....	213
3.4.4.1	Extracto orgánico total (EOT).....	213
3.4.4.2	Hidrocarburos totales del petróleo (TPH).....	214
3.4.4.3	HAPs diana.....	214
3.4.4.4	Compuestos polares.....	214
3.4.4.4.1	Análisis por HPLC.....	215

3.4.4.4.2	Análisis por GC-MS.....	215
3.4.4.5	Fraccionamiento isotópico de HAPs.....	216
3.4.5	Seguimiento de las poblaciones microbianas.....	217
3.4.5.1	Población heterótrofa total y degradadora de HAPs.....	217
3.4.5.2	DGGE	218
3.4.5.2.1	Extracción de DNA genómico del suelo.....	218
3.4.5.2.2	PCR.....	219
3.4.5.2.3	Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante (DGGE).....	219
3.4.5.2.4	Análisis de geles de DGGE.....	220
3.4.5.2.5	Secuenciación y análisis filogenético de las bandas de DGGE.....	221
3.4.5.3	Efecto del bioaumentación en la diversidad microbiana del suelo.....	223
3.4.6	Evaluación de la ecotoxicidad durante el proceso de biorremediación.....	223
3.4.6.1	Microtox [®]	224
3.4.6.2	Test de toxicidad aguda y capacidad reproductora en <i>Eisenia foetida</i>	224
3.4.6.3	Ensayo de toxicidad aguda y teratogénesis en embriones de <i>Xenopus laevis</i> (FETAX).....	225
3.4.6.3.1	Obtención del lixiviado.....	225
3.4.6.3.2	Obtención y preparación de embriones.....	226
3.4.6.3.3	Diseño experimental.....	226
3.4.6.4	Genotoxicidad potencial.....	226
3.4.6.4.1	Fundamento de la técnica de AFM.....	227
3.4.6.4.2	DNA utilizado.....	228
3.4.6.4.3	Preparación de muestras de TPH.....	229
3.4.6.4.4	Condiciones de AFM.....	229
IV	Resultados	230
4.1	Fase I del estudio de tratabilidad.....	230
4.1.1	Características fisicoquímicas del suelo.....	230
4.1.2	Caracterización de la matriz contaminante del suelo.....	231
4.1.3	Caracterización microbiológica del suelo y ensayos de respirometría.....	233
4.2	Fase II del estudio de tratabilidad (microcosmos).....	236

4.2.1	Optimización de la humedad del suelo.....	236
4.2.2	Biodegradación de TPH y HAPs.....	237
4.2.3	Fraccionamiento isotópico en la biodegradación de HAPs.....	245
4.2.4	Análisis de la fracción polar.....	247
4.2.5	Evolución del COT y nutrientes inorgánicos	249
4.2.6	Evolución de las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de HAPs.....	251
4.2.7	Análisis de las poblaciones microbianas por DGGE	254
4.2.7.1	Análisis de componentes principales (ACP).....	258
4.2.7.2	Análisis filogenético y dinámica de las bandas de DGGE.....	260
4.2.7.3	Análisis por DGGE del efecto del bioaumento en la población microbiana del suelo.....	270
4.2.8	Estudio ecotoxicológico del proceso de biorremediación.....	273
4.2.8.1	Toxicidad aguda.....	273
4.2.8.1.1	Microtox de lixiviados.....	273
4.2.8.1.2	Ensayo de letalidad y reproducción de <i>Eisenia foetida</i>	274
4.2.8.2	Genotoxicidad potencial.....	275
4.2.8.2.1	Ensayo FETAX.....	275
4.2.8.2.2	Estudio por AFM.....	276
V	Discusión	279
5.1	Características iniciales del suelo.....	279
5.2	Efecto de los diferentes tratamientos en la degradación de HAPs.....	279
5.3	Respuesta de las poblaciones microbianas a la biorremediación.....	285
5.4	Ensayo de bioaumento.....	289
5.5	Efecto de los procesos de biorremediación en la ecotoxicidad del suelo.....	290
5.6	Aplicación futura de los resultados del estudio.....	295
VI	Conclusiones	296
	Bibliografía	301

Abreviaturas.

¹³ C	Isótopo estable (13) del carbono.
16S rRNA	RNA ribosómico 16S.
A _b	Absorbancia a la longitud de onda b.
ACP	Análisis de componentes principales.
AFM	Microscopía de fuerzas atómicas.
ARDRA	Análisis de restricción de rDNA.
ASTM	American Society for Testing and Materials.
BHB	Caldo Bushnell-Hass.
BHBLB	Caldo Bushnell-Hass y Luria Bertani.
BMTM	Medio mineral basal.
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno.
C:N:P	Proporción molar de carbono, nitrógeno y fósforo.
CC	Capacidad de campo.
CFB	Grupo filogenético <i>Cytophaga-Flexibater-Bacteroides</i> .
CMC	Concentración crítica micelar.
COT	Carbono orgánico total.
CP1	Primer componente principal.
CP2	Segundo componente principal.
DGGE	Electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
EOT	Extracto orgánico total.
EPA	Agencia de protección ambiental de USA.
FETAX	Ensayo de teratogénesis en embriones de <i>Xenopus laevis</i> .
Fig.	Figura.
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia.
g	gramo.
GC	Cromatografía de gases.
GC-FID	GC con detector de ionización en llama.
GC-IRMS	GC con detector de espectrometría de masas de proporción isotópica
GC-MS	GC con detector de espectrometría de masas.
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
l	litro.
LB	Caldo Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido.
M	molar.
mg	miligramo.
mM	milimolar.
N	Normalidad.
ng	nanogramo
NGR	Nivel genérico de referencia.
nm	nanómetro.
NMP	Número más probable.
O/N	Incubación de toda una noche.
p/p	Proporción peso/peso.
p/v	Proporción peso/volumen.
PLFA	Análisis de los ácidos grasos de fosfolípidos.
RDP	Ribosomal Data Project.
RNA	Ácido ribonucleico.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
SSCP	Polimorfismo de conformación de DNA de cadena simple.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
TGGE	Electroforesis en geles con gradiente térmico.
TMAFM	AFM en <i>tapping mode</i> .

TPH	Hidrocarburos totales del petróleo.
T-RFLP	Polimorfismo del fragmento terminal de restricción.
TSA	Agar triptona y soja.
UCM	Mezla compleja no resuelta de un cromatograma.
UV	Radiación ultravioleta
v/v	Proporción volumen/volumen.
µg	microgramo.

1 PRÓLOGO

1.1 ANTECEDENTES

Desde el año 1976 nuestro grupo de investigación ha trabajado principalmente en el campo de los procesos de biodegradación microbiana aeróbica de hidrocarburos del petróleo a escala de laboratorio.

En las primeras fases de estudio, se aislaron cepas marinas degradadoras de crudo de petróleo, entre las que cabe destacar la cepa *Pseudomonas* sp. F21, capaz de degradar tanto la fracción saturada como los compuestos aromáticos de un crudo de petróleo ligero (Solanas, 1981). A continuación se iniciaron estudios para analizar en mayor profundidad la biodegradación microbiana de diferentes crudos de petróleo utilizando la cepa *Pseudomonas* sp. F21 (Solanas *et al.*, 1984; Bayona *et al.*, 1986; Grimalt *et al.*, 1991). Los estudios de biodegradación se combinaron con estudios de genotoxicidad ambiental de matrices contaminantes enriquecidas en hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Grifoll *et al.*, 1990 y 1992a; Casellas, 1995), en los que quedó reflejado la importancia de los HAPs en la genotoxicidad en diferentes ambientes y matrices ambientales.

Sobre la base de los conocimientos adquiridos en la biodegradación de las distintas fracciones químicas del petróleo, y de la genotoxicidad de los HAPs y sus metabolitos resultantes de la biodegradación microbiana detectados en una gran variedad de ambientes y matrices contaminantes, se inició una nueva línea de investigación basada en el estudio del metabolismo bacteriano de HAPs específicos. Se eligió como molécula modelo de estudio, el fluoreno, debido a que se trata de un componente importante del crudo de petróleo y sus derivados (Wise, 1988), y conjuntamente con la 9-fluorenona, ya se había detectado en los diferentes estudios de genotoxicidad ambiental realizados por el grupo con diferentes matrices ambientales (Fernández *et al.*, 1992; Grifoll *et al.*, 1992a; Casellas *et al.*, 1995). A partir de entonces, se aislaron diferentes cepas degradadoras de fluoreno entre las que cabe destacar *Arthrobacter* sp. F0 , que utilizaba como única fuente de carbono y energía el fluoreno (Grifoll *et al.*, 1992b) y a partir de la cual fueron descritas 2 vías metabólicas productivas y una no productiva que acumulaba como metabolito final la 9-fluorenona, la cual a concentraciones elevadas era tóxica para la misma cepa bacteriana (Casellas *et al.*, 1997). Con el objetivo de diseñar un consorcio microbiano para evitar la

acumulación de 9-fluorenona en el medio, se aisló una cepa degradadora de 9-fluorenona, *Pseudomonas mendocina* MC2, que a su vez no era capaz de transformar el fluoreno. La presencia de *Pseudomonas mendocina* MC2 en un co-cultivo con *Arthrobacter* sp. F101 en presencia de fluoreno, permitió reproducir en el laboratorio un consorcio definido que mostró un proceso de colaboración metabólica entre las dos cepas en la degradación total del fluoreno, sin la acumulación de 9-fluorenona como metabolito de oxidación intermedia. Precisamente en el presente trabajo, lo que en aquel momento se pudo considerar únicamente como un posible modelo de lo que podía ocurrir en el medio ambiente, se ha confirmado.

Años más tarde, la investigación se dirigió hacia la biodegradación de HAPs alquilados, los cuales se caracterizan por ser más recalcitrantes a la biodegradación (Solanas *et al.*, 1984; Bayona *et al.*, 1986) y presentar una mayor genotoxicidad que sus representantes no sustituidos (LaVoie *et al.*, 1979) mayor. Para ello se consiguió aislar y caracterizar las cepas *Sphingomonas paucimobilis* JS5 (Sabaté *et al.*, 1999) y *Sphingomonas* sp. JS1 (Sabaté *et al.*, 2003), que utilizaban como única fuente de carbono y energía el 2-metilfenantreno y el 3,6-dimetilfenantreno respectivamente. Se propuso la vía metabólica del 2-metilfenantreno, caracterizada por una dioxigenación inicial seguido de una *meta*-ruptura del anillo no alquilado y seguir posteriormente la vía común del fenantreno. Debido a la dificultad a la biodegradación descrita para los HAPs sustituidos (alquilados y halogenados), a su elevada mutagenicidad (LaVoie *et al.*, 1979) y a su abundancia en crudos de petróleo y derivados, se estudió el proceso de fotooxidación (radiación UV) en los HAP parentales y sustituidos (Sabaté *et al.*, 2001) como un posible tratamiento primario de destrucción no biológica de estos contaminantes, que se podría acoplar *a posteriori* con un tratamiento secundario de tipo biológico.

En el año 1998 se inició una nueva línea de investigación de tipo aplicado, en colaboración con la empresa Tank Recovery Ibérica de Santander, en el campo de la biorremediación, una tecnología que aprovecha la actividad metabólica de los microorganismos para descontaminar distintas matrices ambientales. Cabe destacar que hasta la actualidad los suelos contaminados por hidrocarburos constituyen los mejores candidatos para aplicar la tecnología de la biorremediación. La biorremediación puede utilizar dos estrategias distintas: la bioestimulación, basada en la activación de las poblaciones microbianas autóctonas, y el bioaumentación, basado en la inoculación de cepas o

consorcios microbianos de laboratorio. Los trabajos iniciales se centraron en aguas industriales contaminadas por hidrocarburos de la empresa CLH, donde se estudiaron distintos procesos de bioestimulación de la microbiota autóctona, y en la optimización de las condiciones de biodegradación. Asimismo, se obtuvieron consorcios microbianos no definidos, que se adaptaron a distintas familias de hidrocarburos como el crudo ligero, el crudo pesado degradado, el gasoil y la gasolina, que también fueron utilizados en ensayos de inoculación de aguas o suelos (bioaumento). En el grupo de investigación también se disponía de consorcios microbianos no definidos, degradadores de HAPs, obtenidos por el Dr. J. Sabaté para el aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de HAPs (Sabaté, 1998).

A partir del año 1999, se amplía el campo de investigación a la biorremediación de los suelos contaminados por hidrocarburos, con un nuevo convenio entre la UB y la empresa Tank Recovery Iberica, mientras que en el año 2001 se inicia un nuevo proyecto financiado de la CICYT titulado “Biorrecuperación de suelos contaminados: aplicación de un protocolo de ensayos de tratabilidad y realización de una prueba a escala piloto (REN 2001-3425)”. Es en el marco de estos dos últimos proyectos donde se ubica el trabajo aquí presentado.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Como se ha mencionado en el apartado anterior, el trabajo aquí presentado representó una nueva línea de trabajo del grupo de investigación: la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. La estructura de la presente memoria sigue un planteamiento de tipo secuencial y cronológico. La memoria de la tesis se estructura en cuatro capítulos, y cada uno de los cuales lleva incluidos una introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y discusión.

En el primer capítulo, dentro del objetivo general de estudiar la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, y al disponer de distintos consorcios microbianos, se planteó caracterizar catabólicamente estos consorcios para su posible inoculación (bioaumentación) en suelos contaminados por distintos productos petrolíferos. Para ello, se caracterizaron catabólicamente tres consorcios microbianos adaptados a diferentes familias de hidrocarburos: gasoil, fracción saturada de crudo de petróleo pesado y una mezcla de 5 HAPs respectivamente. Se utilizó un crudo de petróleo ligero como representante de una matriz compleja de hidrocarburos, que incluye todas las familias de hidrocarburos de interés. Se caracterizó el tipo de biodegradación llevada a cabo en las diferentes fracciones químicas del crudo, por cada uno de los tres consorcios, simulando o no, condiciones de bioaumentación.

En el segundo capítulo se caracterizó la diversidad microbiana del consorcio AM degradador de HAPs, como representante de uno de los tres consorcios estudiados que mostraba mayor interés. Se utilizaron técnicas moleculares independientes de cultivo combinadas con técnicas clásicas de cultivo. El objetivo principal fue determinar el mayor número posible de componentes microbianos presentes en un consorcio adaptado, tanto para mejorar el conocimiento de consorcios microbianos degradadores de HAPs, como por la necesidad de conocer de forma más profunda su composición en una eventual aplicación del consorcio en situaciones reales de bioaumentación. Asimismo, teniendo en cuenta que se trataba de un consorcio microbiano obtenido por la técnica clásica de enriquecimiento con una fuerte presión selectiva desde hace más de 7 años se pensó que podía tratarse de un buen modelo para evaluar las contribuciones relativas de las distintas técnicas tanto dependientes de cultivo como moleculares en el conocimiento de la estructura de una comunidad microbiana compleja. Se eligió el consorcio AM por el hecho de que degradaba

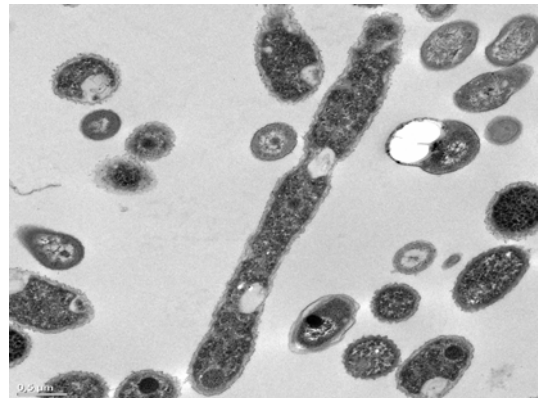
HAPs de 3 y 4 anillos, una de las familias de hidrocarburos con mayor interés ecotoxicológico, y en la que nuestro grupo de investigación tiene mayor experiencia en el estudio de sus vías metabólicas, así como también en estudios ecotoxicológicos.

En el tercer capítulo se describe el diseño de un protocolo de ensayos de biotratabilidad para suelos contaminados. Estos ensayos constituyen una serie de experimentos a realizar en el laboratorio antes de la implantación de una tecnología de biorremediación. Estos ensayos deben generar información a nivel de si es factible o no aplicar con éxito esta tecnología, y en segundo lugar, deben permitir verificar las condiciones óptimas de trabajo en relación a distintos parámetros, como la necesidad o no de añadir nutrientes, o la necesidad o no de inocular microorganismos alóctonos. Para evaluar la eficiencia de los ensayos de tratabilidad diseñados se describe su aplicación a dos suelos contaminados por distintos productos petrolíferos. En este capítulo y en el posterior se evalúa la inoculación de los tres consorcios estudiados en los capítulos I y II.

En el capítulo IV, a partir de un suelo contaminado con creosota, producto enriquecido en HAPs de 3 y 4 anillos bencénicos, se aplicó el protocolo de ensayos de tratabilidad diseñado y se llevó a cabo un estudio exhaustivo y multidisciplinar de los procesos microbiológicos, químicos y ecotoxicológicos que se suceden durante los diferentes tratamientos de biorremediación de un suelo contaminado por HAPs.

Capítulo I:

Caracterización catabólica de consorcios microbianos para su utilización en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos



«Hay pues tres clases de sistemas vivos: organismos, partes de organismos y comunidades de organismos; todos ellos totalidades integradas cuyas propiedades esenciales surgen de las interacciones e interdependencia de sus partes»

Fritjof Capra, 1996. "La trama de la vida"

1 INTRODUCCIÓN

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993). Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación (Alexander, 1999). El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación.

1.1 COMPOSICIÓN DEL CRUDO DE PETRÓLEO

1.1.1 Composición general

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960). Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos (un 50-98% de la composición), por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales (Casellas *et al.*, 1995). Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. (Fernández *et al.*, 1992). La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N y metales como el níquel y el vanadio (Clark y Brown 1977; Howe-Grant, 1996). Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones (tabla 1.1): *i*) fracción saturada (*n*-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), *ii*) fracción aromática (monoaromáticos, diaromáticos y hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), *iii*) fracción de resinas y *iv*) fracción de asfaltenos que son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (Speight, 1991).

Tabla 1.1 Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.

Fracción	Composición
Saturados	<i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

1.1.2 Composición por familias de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias: parafinas volátiles (alcanos no ramificados y ramificados, hasta C₁₀), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C₁₀-C₄₀), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). En un grupo aparte residirían los componentes de las resinas y los asfaltenos

1.1.2.1 Parafinas volátiles (*n*-alcanos e isoprenoides volátiles):

Representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son *n*-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C₁-C₁₀ (de 1 a 10 átomos de carbono). Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principalmente C₁-C₅. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los homólogos de mayor peso molecular disminuyen su presencia en el crudo con el incremento de peso molecular. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C₁₀ (2,6 dimetil octano) (Howe-Grant, 1996).

1.1.2.2 Parafinas no volátiles (*n*-alcanos e isoprenoides)

Se definen como aquellos *n*-alcanos e isoprenoides entre C₁₁-C₄₀. Los componentes entre C₁₁-C₁₅ son de volatilidad intermedia. Los *n*-alcanos oscilan entre C₁₁-C₄₀, aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el 15-20% de crudos no degradados. Los isoprenoides varían de C₁₂-C₂₂ y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. En la tabla 1.2 pueden verse los isoprenoides presentes en un crudo con interés en el campo de la geoquímica y la biorremediación.

Tabla 1.2. Isoprenoides componentes del crudo de petróleo de interés geoquímico.

Isoprenoide	Átomos de C	Nomenclatura
Pristano	19	2,6,10,14-tetrametilpentadecano
Fitano	20	2,6,10,14-tetrametilhexadecano
Farnesano	15	2,6,10-trimetildodecano
Norpristano	18	2,6,10-trimetilpentaecano
I21	21	2,6,10,14-tetrametilheptadecano

El pristano y fitano se han utilizado como marcadores internos del grado de biodegradación de un crudo, pero actualmente no deberían utilizarse, ya que se han descrito tanto su biodegradación como sus vías catabólicas (Watkinson y Morgan, 1990). Actualmente se utilizan los hopanos tales como el 17 α (H)21 β (H)-hopano (Prince *et al.*, 1994).

1.1.2.3 Naftenos (cicloalcanos)

Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden al 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos, antes mencionados

1.1.2.4 Oleofinas (alquenos)

Los alquenos están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de *cracking*, existiendo hasta un 30% en gasolinas y un 1% en fueles.

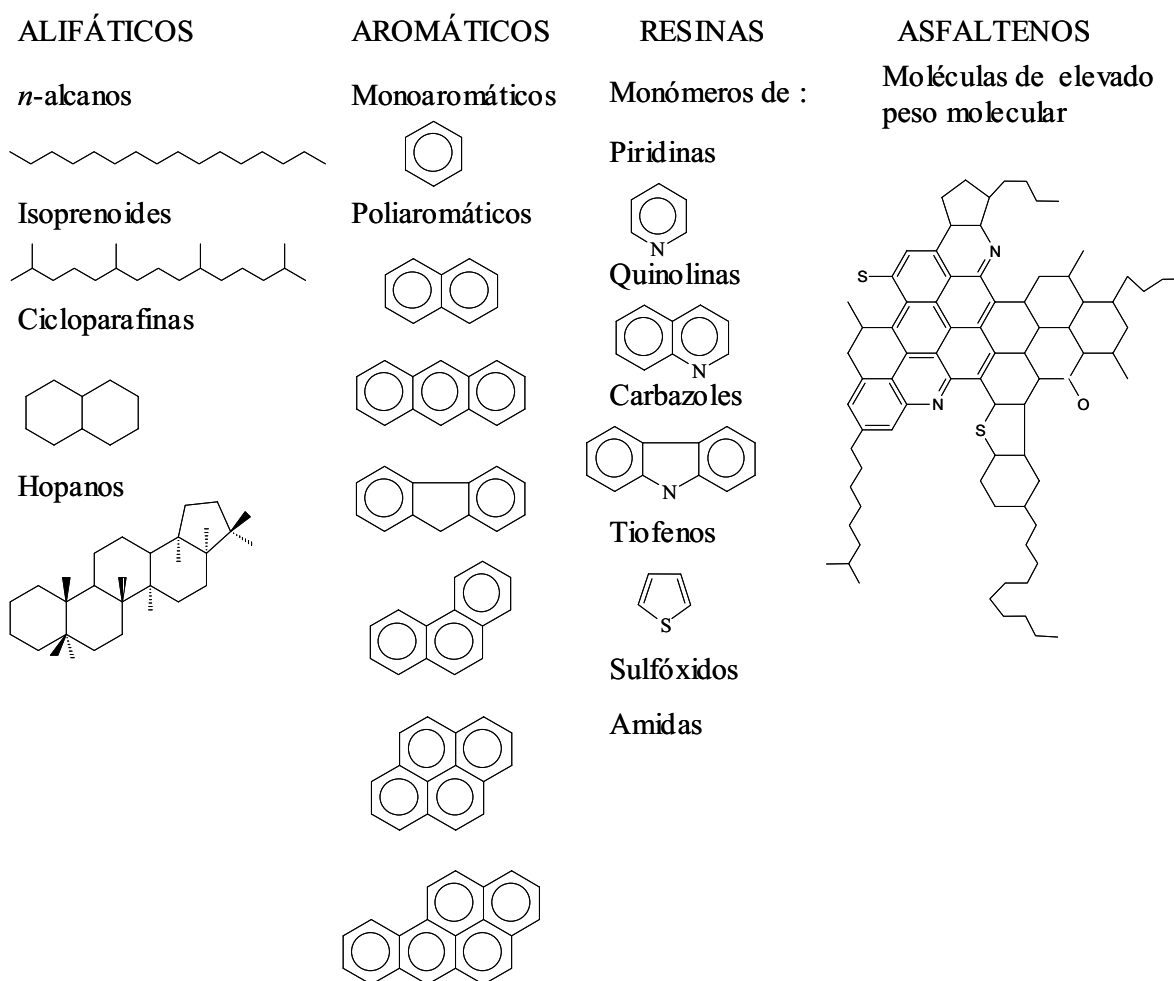


Fig. 1.1 Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo.

1.1.2.5 Hidrocarburos aromáticos

El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos

bencénicos en su estructura (véase apartado 1.1 del capítulo II para más detalles). Así encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).

1.1.2.5.1 Hidrocarburos monoaromáticos:

Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad.

1.1.2.5.2 Hidrocarburos polimaromáticos

Entre los hidrocarburos diaromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos). Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (fig. 1.1).

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos (fig. 1.1).

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos) (fig. 1.1).

También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles).

1.1.2.6 Resinas y asfaltenos

Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Constituyen entre un 10% en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60% en crudos muy degradados. Es la

fracción que presenta una mayor recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados. (Howe-Grant, 1996).

1.1.3 Composición del crudo según el origen

La composición de un crudo varía según su localización (Müller, 1987). Habitualmente, todos los crudos de petróleo (no degradados) contienen alcanos (de cadena lineal y ramificada, de C_1 a C_{40} aproximadamente, cicloalcanos o naftenos e hidrocarburos aromáticos. Las fracciones de punto de ebullición menor, están formadas por alcanos en todos los casos, mientras que la composición de las fracciones superiores varía según la fuente del petróleo. Se denomina crudo parafínico o ligero cuando el crudo contiene una elevada proporción de parafinas (n -alcanos y alcanos ramificados), y asfáltico o pesado si predominan naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga (C_{30} - C_{45}) y HAPs (Howe-Grant, 1996). Según el origen, tenemos crudos parafínicos o asfálticos (tabla 1.3)

Tabla 1.3 Pozo de origen y características de los crudos de petróleo.

Pozo de origen	Tipo de crudo
Pennsylvania	Parafínico
Iran	Parafínico
Irak	Parafínico
Rumanía	Parafínico
Méjico	Parafínico
Baku	Asfáltico
Venezuela	Asfáltico
Texas	Intermedio
Oklahoma	Intermedio

1.2 REFINADO DEL CRUDO DE PETRÓLEO:

Para comprender la naturaleza química de los diferentes derivados del petróleo que potencialmente pueden ser contaminantes en el medio ambiente, hay que entender el proceso de refinado del crudo utilizado para la obtención de estos productos petrolíferos. El refinado pasa por un proceso de destilación, con la finalidad de eliminar el color y olor, así como también, los compuestos del azufre. Se destila a temperaturas crecientes obteniendo 4 fracciones principales: gasolina, queroseno, destilados medios (querosenos, gasoil, aceites lubricantes) y un residuo. Este residuo se destila al vacío obteniéndose otros aceites lubricantes (más pesados), ceras y parafinas y betumes asfálticos (alquitranes) (tabla 1.4)

Tabla 1.4. Fracciones que se pueden obtener durante el refinado por destilación de un crudo de petróleo.

Fracción	T ^a ebullición (°C)	Composición aproximada	Usos
Gasolina ligera	20-100	C ₅ H ₁₂ -C ₇ H ₁₆	Disolvente
Bencina	70-90	C ₆ -C ₇	Limpieza en seco
Ligroína	80-120	C ₆ -C ₈	Disolvente
Gasolina	20-180	C ₆ -C ₁₁	Carburante de motores
Queroseno, Jet fuel	200-300	C ₁₂ -C ₁₆	Alumbrado y carburante
Gasoil. Diesel	200-350	C ₁₃ -C ₁₈	Carburante de motores
Aceite lubricante	200-350	C ₁₆ -C ₂₀	Lubricantes
Grasas, vaselinas	250-400	C ₁₈ -C ₂₂	Farmacéutica
Cera de parafina	245-540	C ₂₀ -C ₄₅	Velas
Betum asfáltico (35% peso)	> 540	C ₃₀ -C ₄₅	Alquitrán asfáltico coque de petróleo

Durante el proceso de refinado, se eliminan componentes de la fracción asfáltica (altamente recalcitrante) lo que implica que los refinados intermedios (gasoil, fueles, querosenos y también las gasolinas) sean productos relativamente más biodegradables que los coques o alquitranes residuales.

Así pues, la composición química de la gasolina es diferente a la del gasoil debido a que se han obtenido como productos de destilación del petróleo a partir de diferentes

intervalos de temperatura (tabla 1.4). La obtención de gasolina es menos directa que la de los fueles y gasóleos, ya que en una primera fase se obtiene por destilación del crudo entre 20-180°C. Esto implica una composición de *n*-alcanos más ligera (C₆-C₁₁) que los fueles y gasóleos (C₁₀-C₂₅). En la gasolina encontramos como componentes más abundantes: *n*-butano, isopentano, pentano, mono y dimetilpentanos, hexano, BTEX, mono y dimetil hexanos, trimetilbencenos, metiletilbencenos, y en menor cantidad los naftalenos, sus mono y dimetilados y heptano (de menor índice de octanaje).

Los fueles ligeros y el gasoil forman parte de la fracción intermedia de destilación en el proceso de refinado, lo que implica un rango de puntos de ebullición entre 185-345°C, encontrando compuestos de 10 a 25 átomos de carbono, siendo los más abundantes los C₁₅-C₁₇. (fig. 1.2). Su composición es de un 30% en parafinas (*n*-alcanos e isoprenoides), 45% de naftenos (cicloalcanos) y un 25% de aromáticos. En concreto a nivel de compuestos aromáticos encontramos alquilbencenos, y más abundantemente, el naftaleno y sus alquilados. También se ha encontrado, en cantidades menores, el fenantreno y el fluoreno. No contienen pireno ni fluoranteno (compuestos de 4 anillos aromáticos), cuyos puntos de ebullición son más elevados que el intervalo utilizado en la destilación de fracciones intermedias.

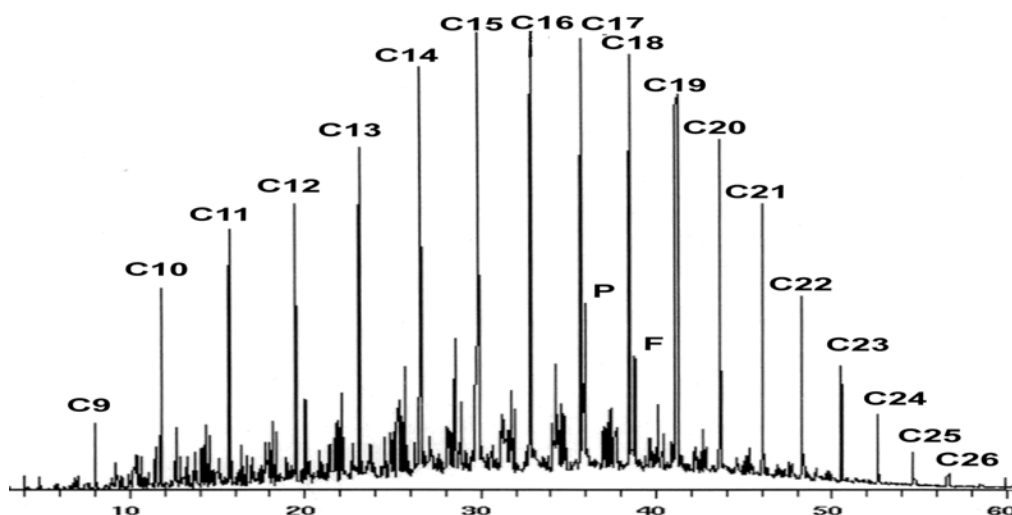


Fig. 1.2. Perfil cromatográfico de GC-MS, del gasoil utilizado. P, pristano; F, fitano.

1.3 ANTECEDENTES EN EL ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE CRUDOS DE PETRÓLEO

1.3.1 Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas

La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo y derivados, implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa del crudo. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas (Bayona *et al.*, 1986; Palittapongarnpim *et al.*, 1998; Solanas *et al.*, 1984). En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo. No obstante en algunos casos, estas cepas tienen la capacidad de oxidar selectivamente las cadenas alquílicas de ciertos HAPs alquilados, compuestos abundantes en el crudo (Davis y Raymond, 1961). Resultados anteriores conseguidos en nuestro grupo de investigación utilizando la cepa *Pseudomonas* sp. F21, aislada en medio mineral con un crudo ligero de Arabia corrobora la anterior afirmación; la cepa F21, la cual degrada todos los *n*-alcanos y los alcanos ramificados de bajo peso molecular (isoprenoides ligeros), también es capaz de degradar selectivamente las formas metiladas del naftaleno, fenantreno, pireno y criseno (Bayona *et al.*, 1986; Solanas *et al.*, 1984). Sin embargo, la cepa F21 es incapaz de utilizar los HAPs no sustituidos (parentales), y por lo tanto la disminución de los alquil-HAPs se debe probablemente a la oxidación de las cadenas alquílicas, tal y como ya se ha descrito en otros degradadores de alcanos (Davis y Raymond, 1961). Recientemente, se han descrito algunas cepas con la capacidad de degradar tanto HAPs de elevado peso molecular como alcanos (Churchill *et al.*, 1999), pero ésta, no parece que sea una norma general. De hecho los degradadores de alcanos citados habitualmente en la bibliografía generalmente no son capaces de romper el anillo aromático de los HAPs, mientras que los degradadores de HAPs generalmente no crecen con alcanos (Foght *et al.*, 1990)

1.3.2 Biodegradación de crudo de petróleo por cultivos mixtos

La alternativa a la utilización de cepas individuales es la obtención y utilización de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos. Los

consorcios definidos se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí. (Komukai-Nakamura *et al.*, 1996; Casellas *et al.*, 1998; Foght *et al.*, 1998; Foght *et al.*, 1999). Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación (Venkateswaran *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1997; Budzinski *et al.*, 1998) y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas.

1.3.2.1 Consorcios definidos

Los consorcios definidos están bien caracterizados y son repetitivos pero tienen ciertas desventajas. En primer lugar, se necesitaría un gran número de cepas distintas para conseguir una degradación extensa del crudo de petróleo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado de una cepa bacteriana (Leahy *et al.* 1990). De hecho, tal y como se ha descrito anteriormente, muchos degradadores de alcanos no utilizan HAPs parentales, y entre los degradadores de HAPs, se ha descrito que, o bien degradan hidrocarburos monoaromáticos, o bien degradan HAPs de 2 a 3 anillos o de 3 a 4 anillos (Gibson y Subramanian, 1984; Van Hamme *et al.*, 2003). Existe poca información acerca de cepas que crezcan en los HAPs alquilados de 3 o más anillos aromáticos (Gilewicz *et al.*, 1997; Sabaté *et al.*, 1999), muy abundantes en los crudos de petróleo. Además, habitualmente no se describe una degradación significativa de la parte no resuelta por cromatografía (UCM), constituida por componentes aún no identificados. Otra desventaja que podemos encontrar en los consorcios definidos es la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas *et al.*, 1998; Kazunga y Aitken, 2000; Kazunga *et al.*, 2001). De hecho, se ha descrito que durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (Grifoll *et al.*, 1995).

1.3.2.2 Consorcios no definidos

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido

episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión, la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales (*dead-end products*) que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll *et al.*, 1995).

1.3.3 Utilización de tensioactivos en estudios de biodegradación

Aunque una parte significativa de los hidrocarburos presentes en el medio ambiente es biodegradable, las tasas de biodegradación de los hidrocarburos en el medio ambiente están limitadas por su hidrofobicidad y baja solubilidad en agua (Alexander, 1999). En consecuencia, para mejorar el proceso de biodegradación, se han desarrollado estrategias con el objetivo de incrementar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos mediante la adición de tensioactivos y por lo tanto aumentar la biodisponibilidad de los mismos (Van Hamme *et al.*, 2003). Los tensioactivos incrementan la dispersión/solubilización acuosa de los compuestos de baja solubilidad en varios ordenes de magnitud, disminuyen la tensión superficial del medio acuoso y además cambian la afinidad célula-hidrocarburo, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular (Zhang y Miller, 1994; Kanga *et al.*, 1997; Barkay *et al.*, 1999). No obstante, la biodegradación de ciertos compuestos con relativa baja solubilidad puede estar inhibida por el uso de tensioactivos como resultado de: i) toxicidad a concentraciones elevadas de tensioactivo o hidrocarburos solubilizados; ii) biodegradación del tensioactivo y no de la matriz contaminante; iii) interferencias con el proceso de transporte de hidrocarburos a nivel de la membrana celular y iv) reducción de la biodisponibilidad por exceso de micelización del contaminante (Efroymson y Alexander, 1991; Rouse *et al.*, 1994; Mulligan *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta el uso potencial de los tensioactivos en las tecnologías de biorremediación (Ron y Rosenberg, 2001), la utilización de los biotensioactivos parece tener más potencial que los tensioactivos de síntesis (químicos), debido a la mayor diversidad estructural, biodegradabilidad y biocompatibilidad de los biotensioactivos (Desai *et al.*, 1997). Los biotensioactivos más estudiados han sido los emulsanos de

Acinetobacter sp. (Foght *et al.*, 1989; Barkay *et al.*, 1999) y el grupo de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Van Dyke *et al.*, 1993; Zhang y Miller 1994).

La mayor parte de estudios sobre la influencia de los biotensioactivos en la degradación microbiana de hidrocarburos se han llevado a cabo con compuestos individuales como el octadecano. (Zhang y Miller, 1992), fenantreno (Barkay *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997) o fluoranteno (Willumsen *et al.*, 1998). Estudios realizados con mezclas complejas, como es el caso del crudo de petróleo, son escasos (Foght *et al.* 1989), aunque la influencia de los biotensioactivos en la biodegradación de mezclas complejas supone una situación más cercana a la realidad.

2 OBJETIVOS

- I. Puesta a punto de un sistema de análisis químico para la cuantificación de la biodegradación de un crudo de petróleo.
- II. Estudiar la capacidad degradadora de distintos consorcios microbianos (F1AA, AM y TD) frente a un crudo de petróleo.
- III. Evaluar la posible pérdida de la capacidad degradadora de los consorcios F1AA, TD y AM después de su crecimiento en medio rico LB, para su uso potencial como inóculos en biorremediación.
- IV. Estudiar el efecto del biotensioactivo M_{AT10} producido por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en la degradación de crudo de petróleo por el consorcio AM.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluaron las capacidades biodegradativas, de tres consorcios microbianos resultantes de enriquecimientos en distintas fuentes de carbono y energía (gasoil, crudo de petróleo pesado degradado y mezcla sintética de 5 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)). Se intentó confirmar si las distintas fuentes de carbono y energía utilizadas implicaban comportamientos metabólicamente distintos y selectivos frente a un crudo de petróleo problema (crudo Casablanca), como ejemplo de una matriz contaminante compleja. También se evaluó si la obtención de biomasa (necesaria para su aplicación ambiental) mediante la amplificación de la población en medio rico Luria Bertani (LB), cambiaba el comportamiento metabólico frente al crudo Casablanca.

3.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los hidrocarburos (líquidos y sólidos) se obtuvieron de las casas comerciales Fluka, Aldrich o Sigma. Los disolventes, principalmente utilizados para procesos de extracción, fueron de calidad para análisis de residuos orgánicos de la casa comercial Baker. Todos los compuestos utilizados fueron de la mayor pureza disponible comercialmente. El agua utilizada fue bidesionizada calidad Milli-Q.

3.3 MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios y soluciones se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera extra de presión durante 15 minutos; o por filtración por membranas de 0,22µm de diámetro de poro. La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detallan a continuación (composición especificada por 1000ml de agua desionizada o bidesionizada).

Caldo Bushnell-Hass (BHB): MgSO₄, 0,2g; KH₂PO₄, 1g; CaCl₂, 0,02g; (NH₄)₂HPO₄, 1g; KNO₃, 1g; FeCl₃, 0,05g.

Medio mineral basal (BMTM): Se prepara la solución A y solución B. La solución A y B se encuentran concentradas x10 (Hareland *et al.*, 1975)

Solución A: $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 42,5g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10g; NH_4Cl , 20g.

Solución B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,12g; $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$, 0,03g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,03g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,01g; y ácido nitrilotriacético, 1,23g.

LB suplementado con glucosa; bactopectona, 10g; extracto de levadura, 5g; NaCl, 2,5g; Glucosa, 2g; agar para bacteriología, 15 g.

3.4 CRUDO DE PETRÓLEO CASABLANCA

El crudo de petróleo se esterilizó a 120 °C durante 30 minutos en viales de cromatografía herméticos, y se suministró a una concentración de 0,5% v/v (0,4% p/v) en erlenmeyers con muescas internas, y con medio mineral BMTM. Tal y como se muestra en la tabla 1.5, la composición del crudo Casablanca resultante del fraccionamiento y cuantificación gravimétrica de las fracciones (apartado 3.6.3.3), fue consistente con la composición descrita por Albaigés *et al.*, (1986) con una elevada proporción (51%) de fracción saturada (F1) respecto al resto de fracciones (monoaromática, poliaromática y polar).

Tabla 1.5. : Características del crudo Casablanca.

Fracción	Composición ^a (%)
Saturada (F1)	57
Monoaromáticos (F2)	11
Poliaromáticos (F3)	15
Polar (crudo-(F1+F2+F3))	17
<i>n</i> -C ₁₇ /pristano ^b	0.76 ^b

^a Datos obtenidos a partir de determinación gravimétrica ^b Proporción de heptadecano respecto el pristano, cuantificado por áreas de los picos resueltos por GC-MS.

3.5 CONSORCIOS MICROBIANOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

3.5.1 Consorcio microbiano TD

3.5.1.1 Obtención de un consorcio degradador de gasoil.

El inóculo original se obtuvo de un suelo contaminado por gasoil de la refinería de Repsol ubicada en la Poble de Mafumet (Tarragona), en Julio de 1997. Se tomaron muestras de suelo (arenoso/limoso) subyacente a las cañerías de entrada y salida del depósito, las cuales generaban un “goteo” frecuente de gasoil.

Este suelo se caracterizaba por estar expuesto a contaminación crónica por hidrocarburos, y en consecuencia, se podían encontrar con una mayor probabilidad poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos debido al factor de aclimatación (Alexander, 1999).

A su llegada al laboratorio, se cuantificó la población heterótrofa y la población degradadora de hidrocarburos mediante la técnica del número más probable (NMP), con el fin de verificar que se trataba de una muestra enriquecida en población degradadora de hidrocarburos, apta como inóculo inicial para iniciar el enriquecimiento en diesel (British Petroleum, Barcelona). Para ello, se resuspendió 1g de suelo en 50 ml de BHB en agitación toda la noche a 200 rpm con el fin de que los microorganismos se separaran de las partículas de suelo. Pasado este tiempo se dejó reposar durante una hora y se desecharon las partículas de suelo. A partir de la suspensión se enumeraron las poblaciones heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos. Para los heterótrofos totales se utilizó LB y para los degradadores de hidrocarburos se utilizó BHB con un 1% de queroseno como única fuente de carbono. El queroseno consiste en una mezcla de 35% de alifáticos, 50% de cicloalifáticos, y 15% de aromáticos, y por lo tanto permite el crecimiento de degradadores de cualquiera de estos compuestos (Mills *et al.*, 1978; Randall y Hemmingsen, 1994). El suelo contenía 1.2×10^6 NMP g^{-1} de suelo, de población heterótrofa y 7×10^5 NMP g^{-1} de suelo, de degradadores de hidrocarburos (un 58% de la población total heterotrofa).

Paralelamente se inició el enriquecimiento inoculando 500 μ l de la resuspensión (utilizada para el NMP) en 50ml de BHB estéril conteniendo 0,1% v/v de gasoil previamente esterilizado por filtración en teflón (PTFE) de 0,22 μ m de diámetro de poro. El enriquecimiento se subcultivó cada 15 días, transfiriendo 500 μ l del cultivo envejecido en 50 ml de BHB con 0,1% v/v de gasoil como medio fresco. La incubación se realizó a 200 rpm y 25 °C en oscuridad. El consorcio se ha subcultivado quincenalmente durante 3 años manteniendo su actividad degradadora.

3.5.1.2 Comprobación de la capacidad degradadora del consorcio TD en gasoil.

Después de 15 subcultivos del proceso de enriquecimiento (con un factor de dilución 1:100 en cada subcultivo) se procedió a cuantificar la capacidad degradadora de gasoil por el consorcio. Esta misma comprobación se ha realizado anualmente. Al consorcio se lo denominó consorcio TD.

Los experimentos realizados se hicieron por duplicado en Erlenmeyers de 100 ml de capacidad nominal, conteniendo 20 ml de BHB y gasoil (0,1% v/v). Se inocularon 200 μ l de consorcio TD de 15 días de incubación. La incubación se realizó a 25°C y 200 rpm en oscuridad durante 10 días. Se incluyeron controles abióticos no inoculados para determinar las pérdidas abióticas de gasoil durante los 15 días de incubación.



Fig. 1.3. Aspecto del consorcio TD (coloración amarillo-marronosa) tras 15 días de incubación en comparación con un control abiótico (MM).

El cultivo, presentaba turbidez y coloración amarillenta-verdosa a los 2 días de incubación y se oscurecía a lo largo de la incubación de 10 días. (fig. 1.3).

Transcurridos 10 días de incubación se hizo una extracción seriada (5 veces) líquido-líquido de los cultivos, con 5 ml de pentano por serie en un embudo de decantación de 50 ml de capacidad nominal. Los extractos se filtraron por Na₂SO₄ anhidro y se llevaron a 25 ml finales en un matraz aforado. A continuación se separó una alícuota de 1 ml; el resto (24 ml) se concentró en un rotavapor (Büchi, Suíza) hasta 1 ml final.

Todas las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con un cromatógrafo de gases HP5890 serie II y un espectrómetro de masas modelo HP5989. Las condiciones fueron: temperatura de la fuente, 250°C; temperatura inicial 35°C durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 4°C/minuto hasta 300°C finales mantenidos durante 1 minuto. La temperatura del inyector fue de 280°C y la del detector de 280°C; el flujo fue de 10 psi y el splitless de 0,48 minutos. Se utilizó una columna HP-5. El volumen de inyección fue de 1 µl.

Se cuantificaron los 50 picos resueltos más abundantes, así como las áreas totales del cromatograma incluyendo la zona no resuelta (UCM). Se determinaron las pérdidas por biodegradación, volatilización, extracción y concentración. La biodegradación se determinó comparando las áreas de muestras inoculadas, con controles no inoculados a los 15 días de incubación.

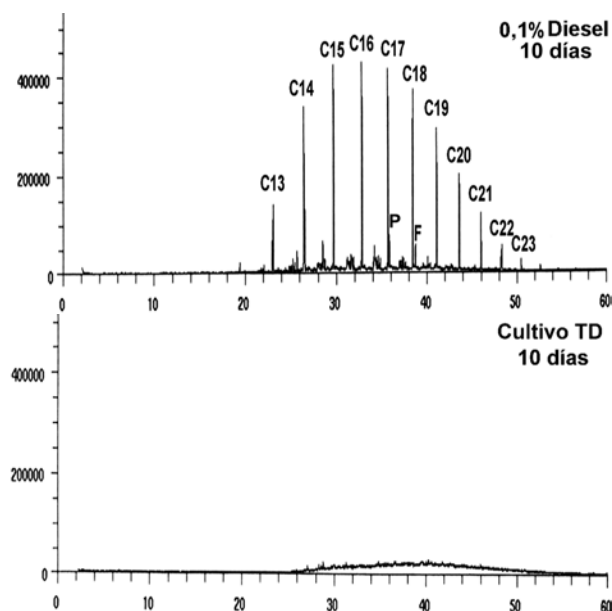


Fig. 1.4. Análisis por GC-MS de la biodegradación de gasoil causada por el conorcio TD a los 10 días de incubación, con 0,1% (v/v) de gasoil como única fuente de carbono y energía.

Tal y como puede observarse en la figura 1.2., el gasoil utilizado contiene una secuencia típica de *n*-alcanos desde C₉ (9 carbonos) hasta C₂₆, e isoprenoides como el pristano y el fitano. El consorcio TD degradó el 92 % del gasoil (cuantificado por GC-MS a partir del área de los 50 picos resueltos más abundantes), una vez restado el efecto de la volatilización (70%) en los alcanos más ligeros (C₉-C₁₃). Cabe resaltar, que todos los *n*-alcanos resueltos y los isoprenoides fueron degradados más allá del límite de detección (0,5 µg ml⁻¹) (fig. 1.4).

Una utilización tan significativa de los componentes del gasoil ya se ha descrito anteriormente (Eriksson *et al.*, 1998), la cual es debido a la propia composición del gasoil, rica en *n*-alcanos de cadena media (C₉-C₂₆) y pobre en fracciones más recalcitrantes como la polar, resinas y asfaltenos.

3.5.2 Consorcio microbiano F1AA.

Se trata de un consorcio previamente obtenido en nuestro grupo de investigación. El consorcio F1AA fue obtenido a partir de cultivos de enriquecimiento en medio mineral BMTM conteniendo un 0,5% (v/v) de fracción saturada (F1) de crudo de petróleo Cantel Aptiano-Albiano como única fuente de carbono y energía, y procede de un inóculo de suelo arenoso contaminado con petróleo. Concretamente el consorcio contiene 12,5 ml de medio mineral BMTM y 62,5 µl de fracción saturada de crudo Cantel Aptiano-Albiano en Erlemeyers de 50 ml de capacidad nominal y la incubación se realiza a 25°C y 200 rpm de agitación en oscuridad. La fracción saturada se obtiene tal y como se describe en el apartado 3.6.3.3. El consorcio ha sido subcultivado, con un factor de dilución 1:25 (500 µl por subcultivo), mensualmente durante 2 años.

El crudo Cantel Aptiano-Albiano es de origen cubano del Campo de Varadero. Una característica general de los crudos procedentes de Varadero es que están muy degradados, no encontrándose *n*-alcanos ni isoprenoides en su fracción saturada. Esta fracción muestra un perfil de esteranos y hopanos característico, además de una abundante zona no resuelta al analizarlo por GC-MS (Campos *et al.*, 1988). El consorcio F1AA consigue degradar un 39% de la fracción saturada tras 60 días de incubación (fig. 1.5) a 200 rpm, 25°C y en la oscuridad. Esta degradación es principalmente debida a la reducción de la zona no resuelta, ya que los perfiles de los esteranos y hopanos se mantienen (fig. 1.5).

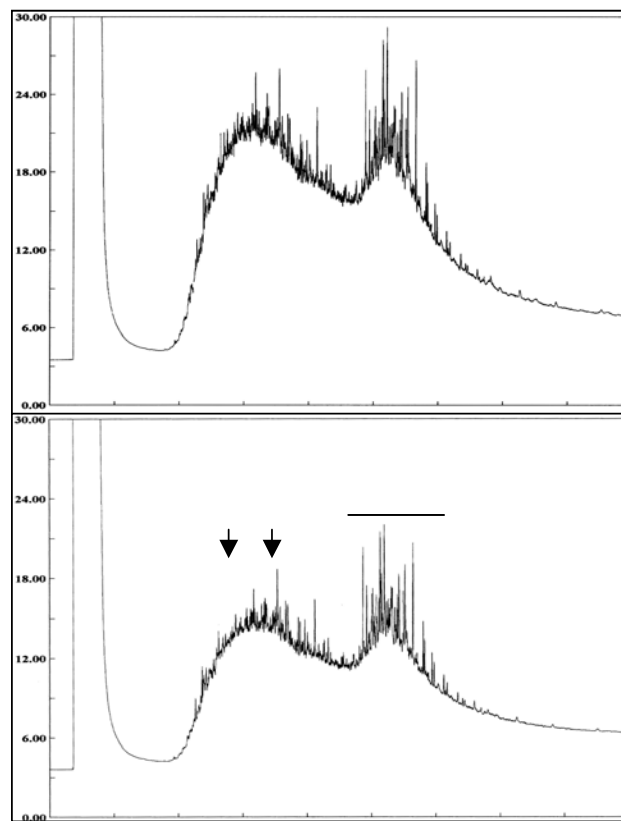


Fig. 1.5. Perfil cromatográfico (GC-FID) de la fracción saturada del crudo de petróleo Cantel Aptiano-Albiano después de 30 días de incubación en control abiótico no inoculado (A) y en cultivos del consorcio F1AA (B). La barra indica la posición de los hopanos.

3.5.3 Consorcio microbiano AM

El consorcio fue obtenido a partir de suelo arenoso de una refinería contaminado recurrentemente con crudo de petróleo, con un 35% de población degradadora de hidrocarburos (Sabaté, 1998) y un proceso posterior de enriquecimiento en medio mineral BHB conteniendo una mezcla sintética de cinco HAPs (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) a una concentración final de 0,1% (v/v) y una concentración individual de 0,02% (v/v). El consorcio ha sido subcultivado durante 7 años cada quince días en medio fresco (BHB y la mezcla de los cinco HAPs) e incubado a 25 °C y agitación horizontal a 200 rpm en la oscuridad. Tanto la obtención del consorcio como la determinación de su actividad degradadora frente a los cinco HAPs fue estudiada

anteriormente en nuestro grupo (Sabaté, 1998). Durante la incubación se confirmó la transformación de los HAPs parentales apareciendo en el medio coloración amarilla-anaranjada a los primeros 6 días que se oscurece a lo largo de la incubación (fig. 1.6).

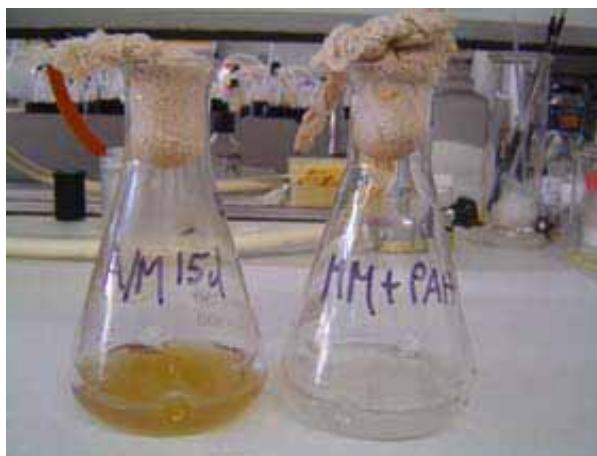


Fig. 1.6. Aspecto del consorcio AM (coloración amarillo-marronosa) tras 15 días de incubación en comparación con un control abiótico.

La degradación de los HAPs fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (fig. 1.7, Sabaté, 1998).

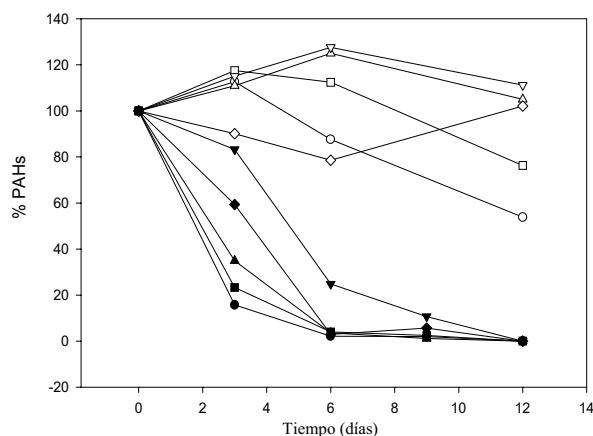


Fig. 1.7. Degradación de una mezcla sintética de cinco HAPs por el consorcio AM. Los símbolos en blanco y en negro son controles y cultivos respectivamente. Las concentraciones resultantes después de la incubación (%) de fluoreno (●), fenantreno (■), antraceno (▲), fluoranteno (▼) y pireno (◆) fueron determinadas mediante análisis de HPLC de los extractos orgánicos por el Dr. J. Sabaté (1998).

El consorcio AM causa la completa desaparición de cuatro de los HAPs de la mezcla (fenantreno, fluoreno, pireno y antraceno) en 6 días de incubación mientras que un 90 % del fluoranteno es degradado en 9 días de incubación (fig. 1.7).

3.6 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE LOS CONSORCIOS AM, TD Y F1AA FRENTE AL CRUDO DE PETRÓLEO CASABLANCA

3.6.1 Condiciones de incubación

Los experimentos de biodegradación fueron llevados a cabo por duplicado en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad nominal, conteniendo 50 ml de medio mineral BMTM y un 0,5% (v/v) de crudo Casablanca esterilizado (200 mg de crudo) como única fuente de carbono y energía. La incubación fue de 10 y 20 días en agitación a 200 rpm y en oscuridad, incluyéndose los respectivos controles no inoculados para cuantificar las posibles pérdidas abióticas durante la incubación.

3.6.2 Obtención y preparación de los inóculos

3.6.2.1 Tipos de inóculos utilizados

Se utilizaron 2 tipos de inóculo (fig. 1.8) procedentes de los consorcios F1AA, TD y AM

a) **Inóculo directo:** obtenido a partir de los consorcios originales en la mitad de su periodo de incubación (7 días para AM y TD y 15 días para F1AA). Se inoculó 1 ml resultante de 2 lavados en tampón fosfato.

b) **Inóculo crecido en LB:** procedente de la amplificación de la biomasa original del consorcio mediante subcultivo en LB. Para ello se inocularon 500 µl del consorcio respectivo a estudiar, en Erlenmeyers conteniendo 50 ml de LB a 25°C y 200 rpm. Cuando se alcanzaban 0,75 unidades de absorbancia a 600_{nm} se centrifugaban las células a 12000 rpm durante 10 minutos y se lavaban las células 2 veces en tampón fosfato. Estas células fueron utilizadas para inocular los cultivos en medio mineral con crudo Casablanca.

3.6.2.2 Cuantificación de la población microbiana heterótrofa y degradadora presente en los inóculos

La cuantificación de la población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos (alifáticos y HAPs) presente en los consorcios microbianos antes de su inoculación en el crudo Casablanca, se realizó por la técnica del número más probable (NMP) miniaturizado en placas de microtitulación, con 8 réplicas por dilución (Wrenn y Venosa, 1996). Los heterótrofos totales fueron determinados mediante crecimiento en caldo Luria Bertani (LB), los degradadores de alifáticos fueron determinados por crecimiento en medio mineral BMTM (no se utilizó el BHB debido a los problemas de turbidez y resuspensión de los precipitados de hierro que contiene) conteniendo 1 g l^{-1} de *n*-hexadecano, mientras que los degradadores de HAPs fueron determinados por crecimiento en BMTM conteniendo una mezcla de fenantreno ($0,5\text{ g l}^{-1}$), fluoreno, antraceno y dibenzotiofeno (cada uno de ellos a la concentración final de $0,05\text{ g l}^{-1}$). Las placas de microtitulación se incubaron 10 días para los heterótrofos y 3-4 semanas para los degradadores de hidrocarburos a 25°C en oscuridad.

3.6.3 Análisis químico

Tal y como se muestra en el esquema general del protocolo de análisis químico de la figura 1.8, a partir de las incubaciones de los distintos consorcios e inóculos preincubados en LB, se evaluó la biodegradación del crudo de petróleo a distintos niveles: extracto orgánico total (EOT), fracción saturada (F1), fracción monoaromática (F2), fracción poliaromática (F3), hidrocarburos totales del petróleo (TPH), *n*-alcanos, isoprenoides y aromaticidad de la F3.

3.6.3.1 Tratamiento del material de vidrio para el análisis químico

Las columnas de fraccionamiento, embudos de decantación, Erlenmeyers, matraces de rotavapor y viales de centelleo se limpiaron en un baño de ultrasonidos, conteniendo detergente de pH alcalino, durante 10 minutos, y posteriormente, se pasaron por agua corriente y agua desionizada. Finalmente se aplicó acetona calidad pestipur (SDS) para limpiar cualquier residuo orgánico que existiera y facilitar el secado. Los viales de

cromatografía de 1,5ml y 4ml, y las pipetas pasteur se muflaron toda la noche a 360-400°C para eliminar posibles impurezas orgánicas.

3.6.3.2 Extracto orgánico total (EOT)

Se extrajo el crudo de petróleo restante, a los 10 y a los 20 días de incubación, de los cultivos y controles abióticos, mediante 5 extracciones seriadas líquido-líquido en diclorometano (Cl_2CH_2). Se utilizó antraceno- d_{10} como estándar interno *surrogate* a una concentración final de $0,1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ (1000 μl de una solución stock de 5mg ml^{-1} en acetona). Los extractos se secaron al pasar por una columna de sulfato sódico anhidro, y el sulfato sódico se limpió con diclorometano limpio. Finalmente los extractos fueron concentrados en un rotavapor (Büchi) hasta un volumen final de 50 ml. En este instante se utilizó 1ml de la muestra para cuantificar, por GC-MS, el área del antraceno- d_{10} ($m\dot{z}$ 188) utilizado como estándar *surrogate*, y de esta forma calcular la eficiencia de extracción, la cual se utilizó posteriormente para corregir los datos cuantitativos de los cultivos. El extracto restante se evaporó por rotavapor hasta 5 ml finales y se llevó a peso constante mediante una corriente moderada de nitrógeno gas. Se determinó la concentración de EOT por gravimetría, se corrigió el valor según la eficiencia de extracción, y se determinó la biodegradación comparando la gravimetría del cultivo y la del control abiótico incubado en las mismas condiciones (10 o 20 días).

3.6.3.3 Fraccionamiento en columna

Los extractos secos (3.6.3.2), fueron fraccionados según Aceves et al., (1988). Cada extracto se resuspendió en un *vortex* con 1ml de hexano y se cargó en una columna de vidrio de fraccionamiento (30 cm de longitud x 1 cm de diámetro interno). La columna de fraccionamiento, previamente se preparaba con 8 gramos de alúmina (70-230 mesh, Merck) en la parte superior, desactivada previamente en un 5% (p/p) de agua bidesionizada (Milli-Q) y 8 gramos de sílica (70-230 mesh, Merck), en la parte inferior, también desactivada en un 5% de agua bidesionizada (Milli-Q). Tanto la sílica como la alúmina se activaron previamente a 120°C y 360 °C respectivamente durante 8 horas.

Las fracciones F1 (saturada), F2 (monoaromáticos) y F3 (poliaromáticos) se eluyeron con las siguientes proporciones de disolventes (tabla 1.6):

Tabla 1.6. Proporciones de disolventes necesarias para la obtención de las fracciones F1, F2 y F3.

Fracción cromatográfica (F)	Solvente
F1(Saturados: alcanos, isoprenoides)	20 ml Hexano
F2 (Monoaromáticos)	20 ml Hexano:Diclorometano (9:1) ¹
F3 (Poliaromáticos)	40 ml Hexano:Diclorometano (8:2)

¹ Proporciones vol/vol

Cada una de las fracciones se concentró en rotavapor, se llevó a peso constante en corriente de nitrógeno, en un vial previamente pesado y se analizó por gravimetría y GC-MS. A partir de la gravimetría se determinó el porcentaje relativo de cada fracción respecto al extracto orgánico final (tabla 1.5). También se calculó el porcentaje de biodegradación de cada fracción individual y del conjunto de las tres (TPH=F1+F2+F3) respecto a los controles abióticos no inoculados, y además se corrigieron los valores respecto a la eficiencia relativa de extracción. (fig. 1.8)

3.6.3.4 Análisis de las fracciones por GC-MS

Todas las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con un cromatógrafo de gases HP5890 serie II y un espectrómetro de masas modelo HP5989A. Los componentes fueron separados en una columna capilar modelo HP-5 (25 m longitud x 0,32 mm diámetro interno) con 0,25 µm de espesor de la fase. El Helio fue el gas portador a un flujo de presión constante de 10 psi. T^a de la fuente, 250°C; T^a inicial 35°C durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 4°C/minuto hasta 310°C finales mantenidos durante 10 minutos. La T^a del inyector y del detector fue de 280°C. La inyección fue en modo de *splitless* manteniendo la válvula del *split* cerrada durante 30 segundos. Se utilizó 1 µl de muestra por análisis. Se adquirieron los datos en modo de impacto electrónico (70eV), con una rango iónico de rastreo de 50 a 650 m/z. Se añadió una concentración conocida de naftaleno-*d*₈ como estándar interno, para controlar la sensibilidad del GC-MS.

Se cuantificó la biodegradación de los *n*-alcanos, pristano y fitano a partir de las áreas del cromatograma de la corriente total (TIC) de la fracción saturada (F1). Los datos se compararon entre cultivos y controles abióticos no inoculados y se corrigieron según el estándar *surrogate* (antraceno- d_{10}) y el estándar interno (naftaleno- d_8).

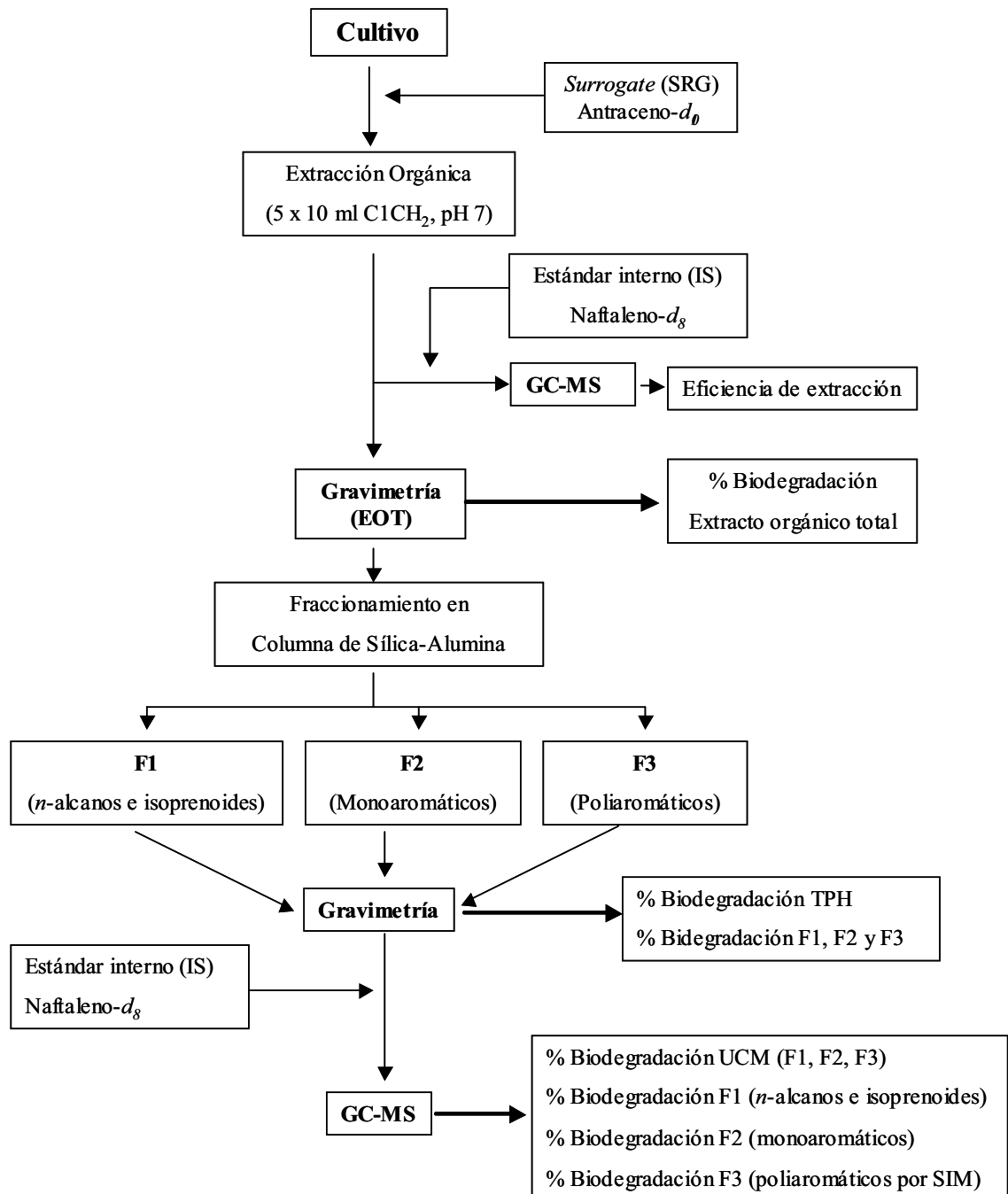


Fig. 1.8. Esquema del protocolo de análisis químico, para cuantificar la biodegradación de las distintas fracciones presentes en el crudo de petróleo Casablanca.

Se estudió la fracción poliaromática (F3) por GC-MS funcionando en la modalidad de monitoreo de iones seleccionados (SIM). Para ello se diseñaron 2 ventanas: de 0 a 27.6 minutos y de 27.6 minutos a 70 minutos y los componentes diana a analizar fueron: naftaleno, fenantreno, alquilderivados del fenantreno (C1-C4- fenantreno), fluoreno, alquilderivados del fluoreno (C1-C3 fluoreno), fluoranteno, pireno y criseno.

A partir de las áreas resultantes de los cromatogramas de la reconstrucción de iones se cuantificó la biodegradación de los HAPs respecto a los controles abióticos. (ver tabla 1.7, donde se indican los iones m/z utilizados para la identificación y localización de los HAPs diana). Se reconstruyeron los cromatogramas de iones para cuantificar la degradación de cada HAP analizado, a partir de las áreas resultantes.

Tabla 1.7. Iones moleculares (m/z) utilizados para el estudio de los HAPs diana de la fracción poliaromática.

HAP diana	Ion (m/z)
Naftaleno	128
C1-C4 Naftaleno	142, 156, 170, 184
Fluoreno (F1)	166
C1-C3 Fluoreno	180, 194, 208
Dibenzotiofeno	198
C1-C3 Dibenzotiofeno	212, 226, 240
Fenantreno/Antraceno	178
C1-C4 Fenantreno/Antraceno	192, 206, 220, 234
Fluoranteno / Pireno	192
C1-Pireno	206
Criseno	228

3.6.3.5 Determinación de la aromaticidad de la fracción poliaromática.

El índice de aromaticidad es un valor que indica la proporción de carbonos aromáticos (los que forman parte de la estructura del benceno) que existen en relación al total de carbonos existentes en una muestra. En este caso se calculó la aromaticidad de las fracciones poliaromáticas (F3) para detectar los comportamientos de los distintos consorcios estudiados al degradar la fracción aromática. Un incremento en la aromaticidad respecto a un control abiótico indicaría que se han degradado mayormente los carbonos de

las cadenas alquílicas, mientras que una disminución de la aromaticidad indicaría que se han abierto los anillos aromáticos en el proceso de biodegradación y no solamente se han utilizado los carbonos de las cadenas alquílicas (Sugiura *et al.* 1997).

Se determinó la aromaticidad de la fracción poliaromática por resonancia magnética nuclear (^{13}C -RMN) en un espectrómetro Unity 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) operando a 300 MHz. La variación de intensidad de la muestra se cuantificó con relación al estándar interno tetrametilsilano disuelto en el CDCl_3 , también utilizado para resuspender los extractos secos de F3. La cantidad de carbono aromático se obtuvo a partir de la integración de la intensidad de los picos entre 100 y 170 ppm, mientras que el carbono alifático (cadenas alquílicas) se determinó a partir de la integración de la intensidad de los picos entre 8 y 58 ppm. El índice de aromaticidad (IA) se definió, tal y como describe Sugiura *et al.* (1997), según la ecuación:

$$\text{IA} = \frac{\text{carbonos aromáticos}}{\text{carbonos aromáticos} + \text{carbonos alifáticos}}$$

3.7 EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE RAMNOLÍPIDOS M_{AT10} PRODUCIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* AT10 EN LA BIODEGRADACIÓN DE CRUDO DE PETRÓLEO CASABLANCA POR EL CONSORCIO AM.

Se ha estudiado el efecto del biotensioactivo M_{AT10} producido por *Pseudomonas aeruginosa* sobre el comportamiento catabólico del consorcio AM frente al crudo Casablanca. Se ha elegido el consorcio AM por tener un interés ambiental adicional ya que está adaptado a catabolizar HAPs, los cuales pertenecen a una de las familias de contaminantes de mayor interés ambiental.

3.7.1 Características del biotensioactivo M_{AT10}

3.7.1.1 Cepa productora

La cepa bacteriana AT10 (CECT 11769), fue aislada a partir de muestras de suelo contaminado procedentes de una refinería de aceite vegetal (ERASOL) de Santiago de Cuba, Cuba (Abalos *et al.* 2001). La cepa productora de M_{AT10} fue identificada como *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en base a una identificación taxonómica a partir de

pruebas bioquímicas y morfológicas. El análisis de la secuencia del gen que codifica para el rRNA 16S (número de acceso de EMBL, AJ549293), indica un 98.18% de similitud respecto *Pseudomonas aeruginosa* AL₉₈, una cepa degradadora de goma natural (Linos *et al.*, 2000) y un 99.18% de similitud respecto a *Pseudomonas aeruginosa* 42A2.

La producción de los ramnolípidos M_{AT10}, se produce durante el crecimiento de la cepa AT10 a 30°C y en agitación horizontal a 200 rpm, en medio mineral con 20 g l⁻¹ de ácidos grasos del aceite de soja, como única fuente de carbono y energía, compuesto principalmente por un 21% de C18:1 y un 43.4% de C18:2. (Abalos *et al.*, 2001).

3.7.1.2 Composición química de M_{AT10}

Los biotensioactivos, en términos generales, se acumulan en el medio de cultivo en forma de una familia de distintos componentes. En el caso de los ramnolípidos se diferencian básicamente tanto por el número de moléculas de ramosa cómo por la longitud y composición de las cadenas alquílicas (Dèziel *et al.*, 1999). Además el comportamiento de un biotensioactivo en particular varía según la composición de la mezcla. En consecuencia, es importante estudiar la composición de la mezcla a lo largo del tiempo de incubación. Tal y como describió la Dra A. Abalos (2001) y como puede observarse en la figura 1.9, la composición de ramnolípidos del biotensioactivo M_{AT10} varía en función del tiempo de incubación.

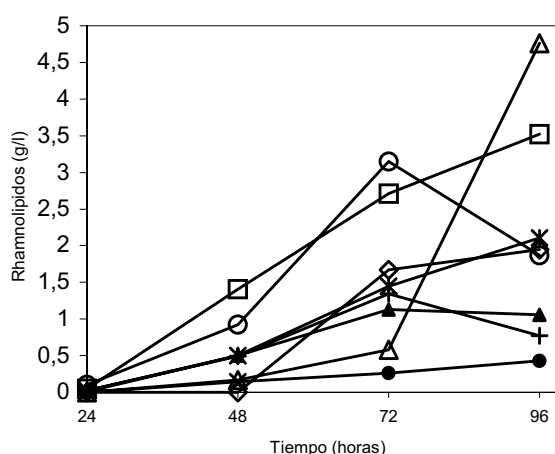


Fig. 1.9. Acumulación de ramnolípidos homólogos en un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en medio mineral con ácidos grasos libres de aceite de soja, a 30°C y 200 rpm. Rha-C₁₀-C₁₀ (△); Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (□); Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} (○); Rha-C_{8:2} (*); Rha-C₁₀-C₁₂ (●); Rha-C₁₀-C_{12:1} (▲); Rha-C_{12:2} (+); Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (◊). (Abalos *et al.* 2001).

En concreto para este estudio se ha utilizado la mezcla de ramnolípidos presente a las 96 horas de incubación. La composición de M_{AT10} fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), y se caracterizaba por ser una mezcla de ocho moléculas de ramnolípidos diferentes en la siguiente proporción (% p/p): Rha-C₁₀-C₁₀ (28.90); Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (21.37); Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (12.81); Rha-C_{8:2} (11.83); Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} (11.35); Rha-C₁₀-C_{12:1} (6.43); Rha-C_{12:2} (4.67); Rha-C₁₀-C₁₂ (2.61) (Abalos *et al.*, 2001).

3.7.1.3 Propiedades fisicoquímicas de M_{AT10}

El producto MAT10 es amarillento y de consistencia semisólida, muy soluble en soluciones alcalinas, metanol, triclorometano, acetato de etilo y éter, y es poco soluble en agua e insoluble en hexano. La concentración crítica micelar (CMC), es decir, la concentración a partir de la cual se alcanza la mínima tensión superficial, es de 150 mg l⁻¹. La pC₂₀, que es la concentración requerida para reducir 20mM cm⁻¹ la tensión superficial de toda la fase, es de 2,63 mg l⁻¹.



Fig. 1.10. Imagen de microscopía óptica de la emulsión múltiple crudo/agua/crudo observada en todas las proporciones testadas que provocaban emulsión: 20:60:20 (ramnolípido:crudo:agua); 20:20:60; 10:80:10; 10:70:20; 10:40:50; 5:15:80; 5:45:50. (Abalos *et al.*, 2001).

El balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB) de M_{AT10} , calculado a partir de la contribución relativa de las regiones hidrófilas y lipófilas de la estructura de la molécula, según la fórmula empírica de Adamson y Gast (1997), es de 10,07. La escala de HLB se define entre los valores 0 y 20, y los valores altos (entre 10 y 20) son característicos de tensioactivos hidrofílicos que actúan como agentes solubilizantes crudo/agua, mientras que

los tensioactivos hidrofóbicos (con menor HLB) actúan como emulsionantes de agua/crudo (Florence y Atwood, 1998). En realidad M_{AT10} forma emulsiones múltiples crudo/agua/crudo (y no la esperada crudo/agua), como se puede observar en la figura 1.10, lo que podría explicarse por su compleja composición. Según Clayton *et al.* (1992) los tensioactivos con valores de HLB entre 9 y 11, son los que generalmente provocan una mejor dispersión de gotas de crudo en fase acuosa. Por lo tanto se escogió el biotensioactivo M_{AT10} , para llevar a cabo estudios de biodegradación, ya que presenta unas características fisicoquímicas favorables a la emulsión del crudo de petróleo.

3.7.2 Ensayos de biodegradación

3.7.2.1 Ensayos realizados y condiciones de incubación

Se ha analizado, en ensayos por duplicado, la influencia de la adición de los ramnolípidos M_{AT10} en la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio AM. Para ello se utilizaron los ramnolípidos M_{AT10} , a una concentración final de 500 mg L^{-1} en Erlenmeyers de 50 ml de capacidad nominal conteniendo 50 ml de medio mineral BMTM (apartado 3.3), con un 0,5% (v/v) de crudo de petróleo Casablanca. Se estudiaron 2 tipos de cultivos:

- i) Cultivos del consorcio AM con crudo de petróleo sin ramnolípidos (tratamiento AM);
- ii) Consorcio AM con crudo de petróleo y ramnolípidos M_{AT10} (tratamiento AMRL).

Para cada cultivo y réplica se utilizó 1 ml de consorcio AM de 7 días de incubación (creciendo en la mezcla de 5 HAPs (ver apartado 3.5.3)), que equivalía a $1.9 \times 10^8 \text{ NMP ml}^{-1}$. Igualmente se verificó la asepsia del extracto M_{AT10} utilizado. Asimismo, se incubaron controles abióticos, no inoculados, conteniendo crudo de petróleo con o sin M_{AT10} , para determinar las pérdidas de crudo de tipo abiótico durante la incubación. La incubación fue de 20 días a 25°C y 200 rpm de agitación horizontal y resguardada de la luz. Se estudiaron los cultivos de 10 y 20 días de incubación.

3.7.2.2 Análisis químico del proceso de biodegradación

3.7.2.2.1 Extracción orgánica total y obtención de los TPH

Se hizo una extracción líquido-líquido con diclorometano y α -androstano como estándar *surrogate* tal y como se ha citado anteriormente (apartado 3.6.3.2). A partir del extracto orgánico total (EOT) se obtuvieron los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) mediante fraccionamiento en columna de alúmina siguiendo el protocolo EPA 3611b modificado. Para ello se utilizaron columnas de vidrio (30 cm longitud x 1 cm de diámetro interno) conteniendo 10 g de alúmina (70-230 mesh de Merck) desactivada con un 5% de agua bidesionizada (Milli-Q). La alúmina se empaquetó en la columna con diclorometano y la fracción TPH se obtuvo a partir de una elución del EOT con 100 ml de diclorometano a través de la columna. Finalmente se concentró el extracto TPH mediante rotavapor (Büchi) hasta 1-2 ml de volumen final y se evaporó el extracto resultante con corriente de N₂ en viales previamente tarados.

El extracto seco de TPH se resuspendió a un volumen final de 1 ml con diclorometano, y se analizaron los alcanos lineares e isoprenoides por GC-FID, y los HAPs y HAPs alquilados por GC-MS en modalidad de seguimiento de iones seleccionados (GC-MS-SIM).

3.7.2.2.2 Análisis de la fracción saturada por GC-FID

Se determinó la biodegradación de los compuestos saturados (alcanos lineares y alcanos ramificados) a partir de la fracción TPH por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Para ello, se utilizó un cromatógrafo modelo Trace 2000 (Termostequest) equipado con una columna capilar DB5 (J&W) de 30 metros de longitud por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase. El detector y el inyector se programaron a una temperatura constante de 320°C y 290°C respectivamente. El programa térmico se describe a continuación: temperatura inicial de 40°C durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 4°C minuto^{-1} hasta una temperatura final de 310°C mantenida durante 10 minutos. El gas portador fue helio de máxima pureza con un flujo constante de 1.1 ml minuto^{-1} y el volumen de inyección fue de 1 μ l en modalidad *splitless* durante 30 segundos.

3.7.2.2.3 Análisis de la fracción aromática por GC-MS-SIM

Se determinó la biodegradación de HAPs parentales y HAPs alquilados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en modalidad de seguimiento de iones seleccionados (GC-MS-SIM) como se ha descrito anteriormente (apartado 3.6.3.4). Los compuestos analizados fueron: naftaleno, fenantreno y sus derivados alquilados C1-C4; fluoreno, dibenzotiofeno y sus alquilderivados C1-C3; y fluoranteno, pireno y criseno. Para calcular la biodegradación de cada analito, se obtuvieron sus respectivos cromatogramas de ión y entonces, se compararon las áreas de los analitos en los cultivos respecto a los controles abióticos.

4 RESULTADOS

Para los experimentos de biodegradación de crudo Casablanca se utilizaron tanto inóculos procedentes directamente de los consorcios F1AA, TD y AM, como de inóculos procedentes de una preincubación de los mismos consorcios en medio rico (LB), hasta llegar a una turbidez del cultivo de absorbancia 0,75 a 600nm. Estos inóculos los llamaremos a partir de ahora F1AA O/N, TD O/N y AM O/N. El objetivo de utilizar inóculos procedentes tanto de consorcios directos como preincubados en medio rico, fue determinar si el subcultivo en medio rico, el cual sería necesario en experiencias reales de biorremediación, modificaba la capacidad de biodegradación de los consorcios utilizados.

4.1 POBLACIÓN MICROBIANA DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS F1AA, TD Y AM

La población heterótrofa y degradadora de HAPs de los tres consorcios estudiados (AM, F1AA y TD), en el momento de la inoculación de los experimentos de biodegradación de crudo Casablanca se muestran en la tabla 1.8. Esta composición, así como las propiedades catabólicas frente a la fuente de carbono y energía, utilizada para la obtención de cada consorcio, se ha verificado anualmente, lo que pone de manifiesto que los consorcios son estables.

Como puede verse en la tabla 1.8, el consorcio F1AA presentaba una población degradadora de HAPs muy baja (4 ordenes de magnitud menos que en los consorcios AM y TD). Además, el consorcio TD contenía la mayor población heterótrofa y degradadora de hidrocarburos, mientras que el consorcio F1AA fue el que presentó una población menor. Los tres consorcios poseen una población heterótrofa abundante del orden de 10^8 - 10^9 NMP ml^{-1} , justo en el momento de la inoculación de los experimentos de biodegradación con crudo Casablanca..

Debido a que los consorcios O/N, incrementaron su población entre 250 y 1000 veces, se diluyeron los inóculos para inocular 10^8 microorganismos (NMP) finales en cada experimento de biodegradación

Tabla 1.8. Composición de la población microbiana de los consorcios utilizados como inóculo inicial en los experimentos de biodegradación con crudo de petróleo Casablanca.

	Heterótrofos ^a	Degradadores de hidrocarburos ^a	
		<i>n</i> -Hexadecano	HAPs
F1AA ^c	$9.3 \cdot 10^8 \pm 0.17^b$	$1.4 \cdot 10^6 \pm 0.17$	$4.2 \cdot 10^3 \pm 0.19$
TD ^c	$2.9 \cdot 10^9 \pm 0.19$	$1.8 \cdot 10^9 \pm 0.18$	$5.1 \cdot 10^7 \pm 0.18$
AM ^c	$6.8 \cdot 10^8 \pm 0.17$	$7.8 \cdot 10^7 \pm 0.17$	$1.8 \cdot 10^7 \pm 0.18$

^a NMP ml⁻¹; ^b Desviación estándar (n=8) de log₁₀ (NMP). ^c Los inóculos pre-crecidos en LB hasta DO_{600nm}=0,75 (F1AA O/N, TD O/N y A/M O/N) alcanzaron una población total heterótrofa (calculada por NMP) equivalente a 8 generaciones en el consorcio AM y 9-10 generaciones tanto en el consorcio F1AA como el TD.

4.2 BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO CASABLANCA POR LOS CONSORCIOS MICROBIANOS

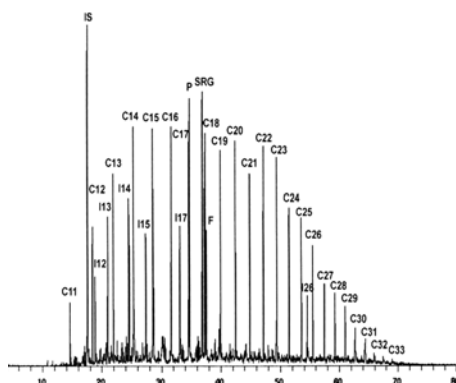
4.2.1 Caracterización cromatográfica del crudo Casablanca

El estudio de la composición mediante fraccionamiento y posterior análisis por GC-MS (fig 1.11) confirmó que el crudo de petróleo Casablanca se trata de un crudo ligero parafínico, tal y como ya se presentaba en la tabla 1.5.

Como puede observarse en la figura 1.11. el pristano es ligeramente más abundante que el fitano (proporción hecha a partir de las áreas cromatográficas), determinando un índice pristano/fitano de 1,76, y un índice Pristano/C₁₇ de 1,3 y fitano/C₁₈ de 0,8. Estos índices son habitualmente utilizados para controlar el estado de biodegradación que presentan los crudos de petróleo.

Además, tal y como se muestra en la figura 1.11, la fracción saturada es rica en *n*-alcanos en el rango C₁₀-C₃₅ e isoprenoides como el pristano, fitano y los isoprenoides, I12, I13, I14, I15, I17, identificados por GC-MS (tabla 1.9).

A)



B)

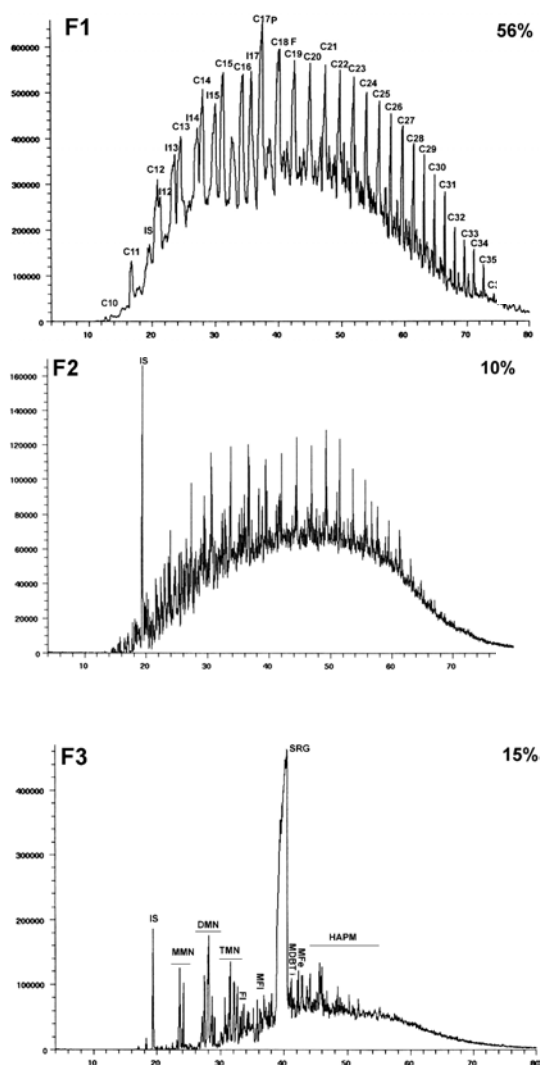


Fig. 1.11. A) Extracto total no fraccionado del crudo Casablanca analizado por GC-MS. B) Fracción saturada, aromática y poliaromática (F1, F2 y F3 respectivamente) del crudo Casablanca analizados por GC-MS. En Cx, la x corresponde al n° de carbonos de un *n*-alcano; I_x corresponde a un isoprenoide, P y F corresponden al pristano y fitano respectivamente; IS corresponde al estándar interno Naftaleno-*d*₈, y SRG corresponde al estándar *surrogate* antraceno-*d*₁₀.

Tabla 1.9. Identificación de isoprenoides del crudo Casablanca por espectrometría de masas mediante la librería de fragmentación.

Isoprenoide	Producto propuesto	Probabilidad (%)
I ₁₂	2,6-Dimetil-undecano	90
I ₁₃	2,3,7-Trimetil-octano	90
I ₁₄	2,6,11-Trimetil-dodecano	80
I ₁₅	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano	86
I ₁₇	6-Metil-tridecano	80

4.2.2 Eficiencia de extracción

Se utilizó la eficiencia de extracción relativa para corregir todos los resultados cuantitativos (gravimétricos y de GC-MS). Esta eficiencia se calculó a partir del estándar interno *surrogate*, antraceno- d_{10} , tal y como se indica en el apartado 3.6.3.2.

Como puede observarse en la tabla 1.10, la eficiencia de extracción de los distintos tratamientos siempre fue menor que la de los controles, donde la eficiencia absoluta de extracción fue del 80-85%. Este hecho podría deberse fundamentalmente a la formación de emulsiones de difícil separación en la extracción líquido-líquido de los cultivos bióticos, fenómeno que no ocurre en los controles abióticos donde no se forma ninguna emulsión durante la extracción. Aunque el uso de estándares *surrogates* o estándares internos intrínsecos (como son los hopanos) es frecuente en estudios de química ambiental, no lo es en estudios experimentales de biodegradación, y por lo tanto, la omisión de estos estándares puede repercutir en una sobrevaloración de los resultados obtenidos de biodegradación.

Como puede observarse en la tabla 1.10, existió una amplia gama de eficiencias de extracción, lo que coincidió con la presencia de distintos tipos de emulsiones presentes en los cultivos. Cabe mencionar que el experimento con el consorcio TD a los 20 días, fue el que tuvo mayores pérdidas durante la extracción con una eficiencia de extracción de un 54,7% respecto el control abiótico, debido a una pérdida accidental durante el proceso de extracción.

Tabla 1.10. Eficiencia de extracción (%) de los cultivos de los distintos consorcios crecidos con crudo Casablanca 0.5%, respecto a los controles no inoculados.

Inóculo	Eficiencia de extracción	Eficiencia de extracción
	(10 días)	(20 días)
AM	86.1	95.5
AMO/N ¹	94.5	98.5
TD	102.1	54.7
TDO/N ¹	87.5	92.8
F1AA	85.5	88.7
F1AAO/N ¹	63.1	90.8

¹ Inóculos crecidos en LB toda la noche (16h); $A_{600nm}=0,75$.

4.2.3 Biodegradación del extracto orgánico total

Como se puede observar en la tabla 1.11. los cultivos incubados durante 20 días presentaron un mayor grado de biodegradación que los incubados 10 días. Según el análisis de los datos gravimétricos del extracto orgánico total, los cultivos procedentes de inóculos directos de los consorcios TD y AM causaron un 22% y un 23% de biodegradación del crudo Casablanca en 20 días de incubación, mientras que el inóculo F1AA degradó hasta un 30% (tabla 1.11). De igual rango o incluso superior (a los 20 días de incubación) fue la biodegradación causada por los inóculos procedentes de subcultivos de los consorcios en medio rico LB, indicando que el subcultivo de los consorcios estudiados en medio rico líquido, durante un número limitado de generaciones (8-10), no modificaba su potencial biodegradador frente a un crudo de petróleo.

4.2.4 Biodegradación de la fracción saturada, monoaromática y poliaromática

El análisis de las fracciones resultantes del EOT verificaron los resultados ya observados por GC-MS del EOT. Tal y como se muestra en la tabla 1.11, el consorcio F1AA degradó un porcentaje elevado (60%) de la fracción saturada F1 del crudo Casablanca. Este consorcio también degradó significativamente la fracción monoaromática F2 (42%), pero no fue capaz de degradar la fracción poliaromática F3 (0%) mediante el inóculo directo, y muy ligeramente (7%) mediante el inóculo subcultivado en LB. Respecto al consorcio TD, el análisis gravimétrico de las fracciones, mostró una

degradación inferior de la F1 que el consorcio F1AA, aunque aún considerable (48%), una degradación leve de la F2 (14%), y en cambio si que degradó la fracción F3 (11%). Respecto al consorcio AM, fue capaz de degradar moderadamente la fracción saturada (F1) (34%) aunque fuera obtenido por enriquecimientos secuenciales en una mezcla sintética de 5 HAPs no alquilados (apartado 3.5.3). El consorcio AM, fue el que degradó en mayor extensión las fracciones aromáticas, con un 27% la F2 y un 19% la F3. En la figura 1.13 se muestran los perfiles cromatográficos (GC-MS-SIM) de la fracción aromática del crudo Casablanca y los cultivos inoculados con el consorcio AM.

Tabla 1.11. Porcentajes de biodegradación (%), del crudo de petróleo Casablanca por los consorcios microbianos a los 10 y 20 días de incubación.

	F1AA				TD				AM			
	D		LB		D		LB		D		LB	
	10d	20d	10d	20d	10d	20d	10d	20d	10d	20d	10d	20d
Total ^b	26	30	14	35	20	22	15	37	15	23	22	27
F1 ^b	53	60	25	57	49	48	25	54	28	34	29	44
F2 ^b	29	42	12	28	13	14	12	23	15	27	18	19
F3 ^b	0	0 ^c	6	7	6	11	5	12	7	19	3	18
TPH ^{bf}	38	46	21	44	37	37	16	42	22	30	23	36
<i>n</i> -alcanos ^d	100 ^g	100	100	100	100	100	100	100	90	98	88	98
Pr + F ^{d,e}	100	100	100	100	100	100	10	97	8	9	7	9

^aD inóculo directo; inóculo LB obtenido a partir de subcultivos de los consorcios en medio LB. ^bDatos obtenidos por comparación de datos gravimétricos de los cultivos con los controles abióticos respectivos. ^cEl porcentaje de biodegradación estuvo por debajo del límite de detección (0,5 µg ml⁻¹). ^dDatos obtenidos por comparación de datos cromatográficos de los cultivos con los controles respectivos. ^ePr: pristano, F: fitano. ^fLos TPH gravimétricos se obtuvieron a partir de F1+F2+F3. ^g100% Biodegradación significa que los compuestos en particular están en una concentración por debajo del límite de detección (0,5 µg ml⁻¹)

La degradación de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH), resultante de la agrupación de las tres fracciones (F1+F2+F3), fue mayor que la del EOT (tabla 1.11), lo cual se puede explicar debido a la baja biodegradabilidad de las resinas y asfaltenos, así como a la posible acumulación de metabolitos de oxidación parcial que son extraíbles en las condiciones del estudio (condiciones neutras). En realidad, la cantidad total de compuestos polares [EOT-(F1+F3+F3)] en los cultivos del consorcio F1AA incrementó un 60% respecto a los controles, y de forma similar ocurrió en el consorcio TD, mientras que el consorcio AM redujo los polares un 17%. Como puede verse en la tabla 1.11, la

degradación de los TPH fue similar, a los 20 días de incubación, tanto en los cultivos directos como en los cultivos inoculados con inóculos procedentes de subcultivos en LB.

4.2.5 Biodegradación de compuestos diana

La degradación de compuestos diana no siempre tuvo una buena relación con los datos gravimétricos, lo que sería explicable debido a que muchos compuestos no se resuelven por GC-MS.

4.2.5.1 Biodegradación de los *n*-alcanos e isoprenoides

El estudio por GC-MS del extracto orgánico total (fig. 1.12) mostró que tanto el consorcio TD como el F1AA eliminaron completamente los *n*-alcanos y los alcanos ramificados (tabla 1.11), componentes que representaban la mayoría de los compuestos resueltos por GC-MS del extracto orgánico total. Sin embargo, el consorcio AM que también fue capaz de degradar casi la totalidad de los *n*-alcanos (98%) (tabla 1.11), degradó en mucho menor grado los alcanos ramificados (7-9% de biodegradación de pristano y fitano) (fig. 1.12 y tabla 1.11). Es importante resaltar que la degradación de los *n*-alcanos ya fue completa a los 10 días de incubación en todos los cultivos F1AA y TD, mientras que en el cultivo AM, la degradación fue superior a los 20 días, aunque a los 10 días la degradación de los *n*-alcanos ya fue casi completa (90%). Asimismo, también hay que resaltar que el cultivo inoculado con el consorcio TD subcultivado en LB, mostró un 10% de biodegradación de pristano y fitano a los 10 días (97% a los 20 días), mientras que el cultivo directo mostraba un 100% de degradación a los 10 días, indicando la existencia de un retraso respecto al inóculo directo (tabla 1.11).

4.2.5.2 Biodegradación de compuestos aromáticos

Los tres consorcios causaron una degradación considerable de los HAPs de 2, 3 e incluso de 4 anillos, tal y como puede observarse en la tabla 1.12, con los datos obtenidos a partir de cromatogramas de iones seleccionados para los HAPs diana. El naftaleno, fluoreno y fenantreno fueron degradados más allá del límite de detección ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) por

los tres consorcios, mientras que la degradación de los derivados alquilados, por regla general, disminuyó con el incremento en el número de grupos alquilo.

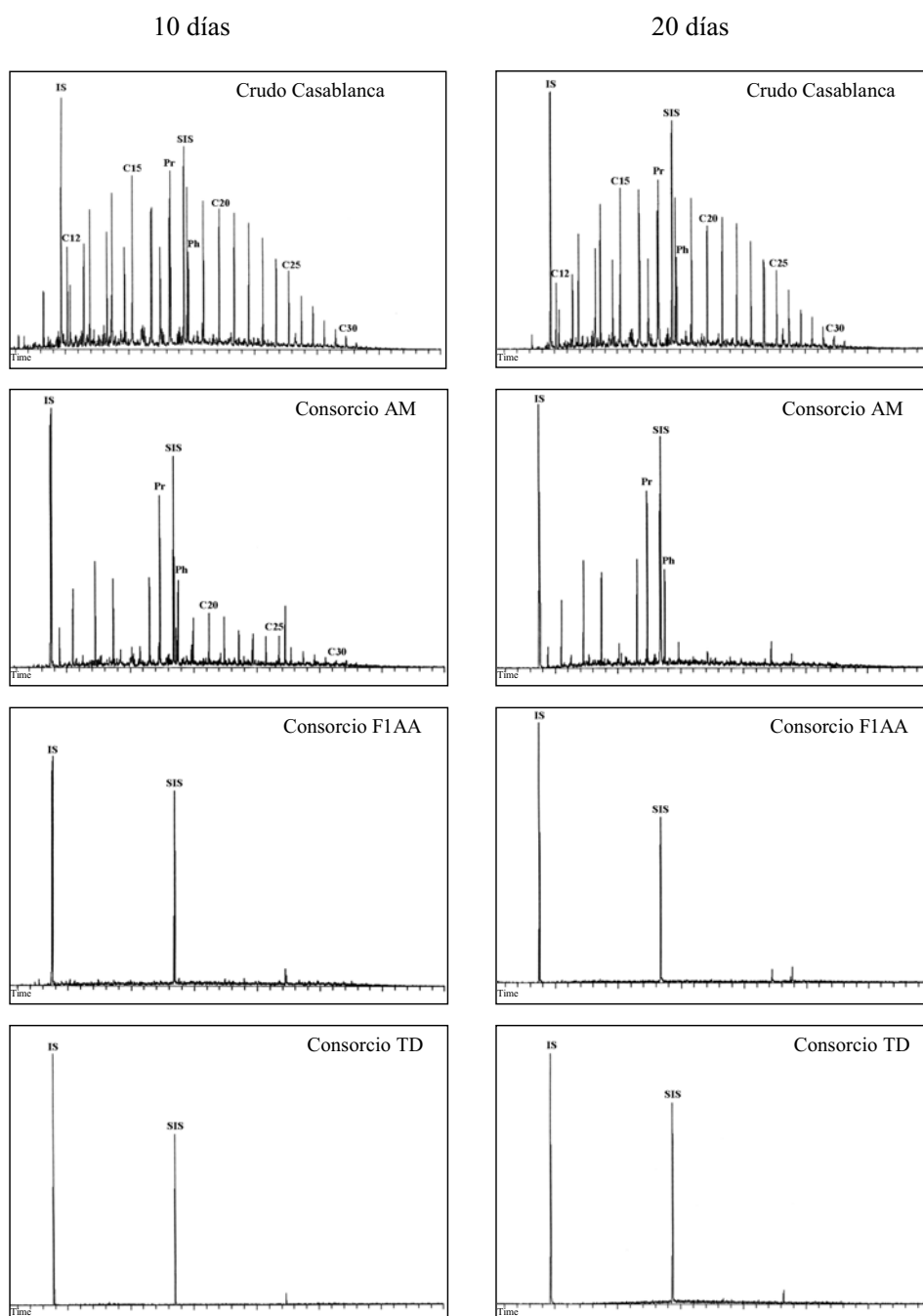


Fig. 1.12. Cromatograma de la corriente iónica total (GC-MS) de los EOT a los 10 y 20 días de incubación de los controles abióticos y los cultivos en medio mineral y crudo de petróleo Casablanca. C12-C30, representan los *n*-alcanos que contienen entre 12 y 30 átomos de carbono; Pr, pristano; Ph, fitano; IS, estándar interno; SIS estándar interno *surrogate*.

Los consorcios TD y AM fueron los que mostraron una mayor biodegradación de los HAPs diana. Sin embargo, los resultados obtenidos de degradación de HAPs diana, por el consorcio F1AA fueron inesperados ya que este consorcio no había sido capaz de reducir gravimétricamente la fracción poliaromática (tabla 1.11).

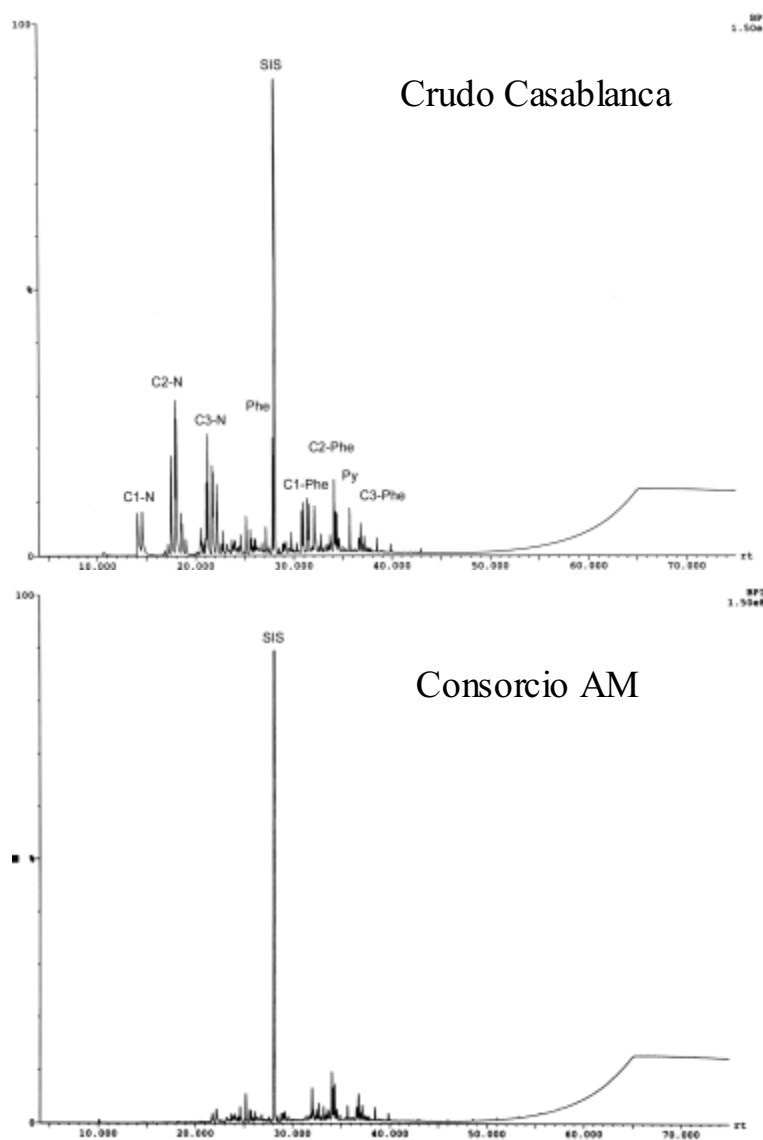


Fig. 1.13. Perfil cromatográfico de la fracción aromática (F3), tras 20 días de incubación, del crudo Casablanca por GC-MS operando en modo SIM. N, naftaleno; Phe, fenantreno; Py, pireno; SIS, estándar interno *surrogate* (antraceno-d10); C1-C3 representan el número de átomos de carbono presentes en los grupos alquílicos de los HAPs alquilados.

Tabla 1.12. Porcentajes de biodegradación de los HAPs diana por los consorcios microbianos F1AA, TD y AM.

Compuesto	F1AA	TD	AM
Naftaleno (Naft)	100	100	100
C1-Naftaleno ^a	100	100	100
C2-Naftaleno	100	100	100
C3-Naftaleno	62	80	87
C4-Naftaleno	59	68	11
Fluoreno (Fl)	100	100	100
C1-Fluoreno	97	100	87
C2-Fluoreno	36	100	18
C3-Fluoreno	0	94	9
Dibenzotiofeno (DBT)	ND	ND	ND
C1-Dibenzotiofeno	86	94	75
C2-Dibenzotiofeno	5	96	40
C3-Dibenzotiofeno	2	87	29
Fenantreno (Fe)	97	100	100
C1-Fenantreno	54	100	96
C2-Fenantreno	54	100	48
C3-Fenantreno	0	85	20
C4-Fenantreno	0	45	35

^a C1-C4 indican el número de átomos de carbono de los grupos alquilo en los HAPs alquilados. Los compuestos Naft, C1-Naft, C2-Naft, C3-Naft, C4-Naft, Fl, C1-Fl, C2-Fl, C3-Fl, C1-Fl, C1-DBT, C2-DBT, C3-DBT, Fe, C1-Fe, C2-Fe, C3-Fe y C4-Fe fueron caracterizados con la señal de ion m/z 128, 142, 156, 170, 184, 166, 180, 194, 208, 198, 212, 226, 178, 192, 206, 220 y 234, respectivamente. El DBT se caracterizó mediante las señales a m/z 139+152. Se calculó el porcentaje de biodegradación comparando las áreas de los cromatogramas de iones reconstruidos de los compuestos diana de la F3, entre los cultivos y los controles abióticos. Se utilizó el naftaleno- d_8 como estándar interno y el antraceno- d_{10} como estándar interno *surrogate*.

4.2.6 Aromaticidad de la fracción poliaromática (F3)

Con el fin de determinar si la biodegradación de la fracción aromática fue por rotura de anillos aromáticos y/o por oxidaciones parciales de las cadenas alquílicas de los HAPs, se decidió analizar la aromaticidad (el índice de aromaticidad se define como la proporción de carbonos aromáticos respecto al total) de la fracción aromática resultante

(F3) antes y después de la degradación, mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (^{13}C NMR), la cual es capaz de diferenciar y cuantificar los carbonos aromáticos (que forman parte del anillo bencénico) respecto de los no aromáticos. Ésta técnica ya se ha utilizado para el estudio de fracciones de crudos con diferente composición molecular. (Clutter *et al.*, 1972) y recientemente, Sugiura *et al.* (1997) también la utilizaron para analizar la biodegradación existente en un crudo de petróleo Arabia.

Tabla 1.13. Índice de aromaticidad de la fracción aromática (F3).

	Índice de aromaticidad
Control 20d	0.225
F1AA 20d	0.253
TD 20d	0.201
AM 20d	0.159

La dispersión de los datos entre réplicas era menor al 1%.

La aromaticidad de la fracción aromática (F3) de los controles abióticos fue de 0.225 y incrementó ligeramente hasta 0.253 con la biodegradación causada por el consorcio F1AA (tabla 1.13). En cambio, la biodegradación causada por los consorcios TD y AM disminuyó la aromaticidad de la fracción aromática con valores de 0.201 y 0.159 respectivamente. Estos resultados permiten afirmar que el consorcio F1AA transforma la fracción aromática oxidando cadenas alquílicas (oxidando más carbonos de cadenas alquílicas que de carbonos aromáticos) mientras que los consorcios TD y AM son más capaces de romper anillos aromáticos de la F3 del crudo Casablanca.

4.3 EFECTO DE LOS RAMNOLÍPIDOS M_{AT10} EN LA BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO CASABLANCA POR EL CONSORCIO AM

El consorcio AM mostró un gran potencial catabólico en la degradación del crudo Casablanca tanto en la fracción saturada (F1) (tabla 1.11) como en la aromática (F3) (tabla 1.11 y 1.12), y además fue el más eficiente en la degradación de la fracción F3, con la mayor disminución del índice de aromaticidad (tabla 1.15).

4.3.1 Biodegradación de los TPH e isoprenoides

La biodegradación de los TPH del crudo Casablanca por el consorcio AM fue del 33% y del 62% a los 10 y 20 días de incubación (tabla 1.14).

Tabla 1.14. Biodegradación (%) de los isoprenoides diana por el consorcio microbiano AM sin biotensioactivo (AM) y con el biotensioactivo (AMRLs).

Molécula	AM	AMRL	AM	AMRL
	10 días	10 días	20 días	20 días
Farnesano	19,8	82,2	49,5	85,7
IP16 ^a	20,9	70,1	28,9	82,3
norpristano	13,1	54,3	14,4	88,9
Pristano	1,4	0	5,1	58,1
Fitano	0,9	9,1	0	39
Isoprenoides ^b	10,2	37,1	16,2	70
TPH ^c	32,9	60,6	61,9	71

^a 2,6,10-trimetiltridecano. ^b La biodegradación de todos los isoprenoides se calculó comparando la suma de las áreas en los cultivos y en los controles. ^c La biodegradación de los TPH se calculó comparando la suma de todos los picos resueltos por GC-FID en los cultivos y en los controles.

La mayor parte del porcentaje de biodegradación se correspondió a la biodegradación de los *n*-alcanos (figura 1.16). Los cultivos con ramnolípidos alcanzaron una mayor biodegradación de los TPH (61% y 71% a los 10 y 20 días de incubación respectivamente), y además se consiguió una mayor biodegradación de los isoprenoides (alcanos ramificados). La degradación de los isoprenoides a los 20 días de incubación fue de un 16% en ausencia de ramnolípidos, mientras que en presencia de los ramnolípidos M_{AT10}, los isoprenoides fueron degradados un 70%, indicando una efectividad en la solubilización de estos complejos compuestos hidrofóbicos por parte del biotensioactivo.

Además, todos los isoprenoides analizados (farnesano, norpristano, pristano, fitano y 2,6,10-trimetiltridecano) fueron degradados con mayor efectividad en presencia del biotensioactivo después de 20 días de incubación.

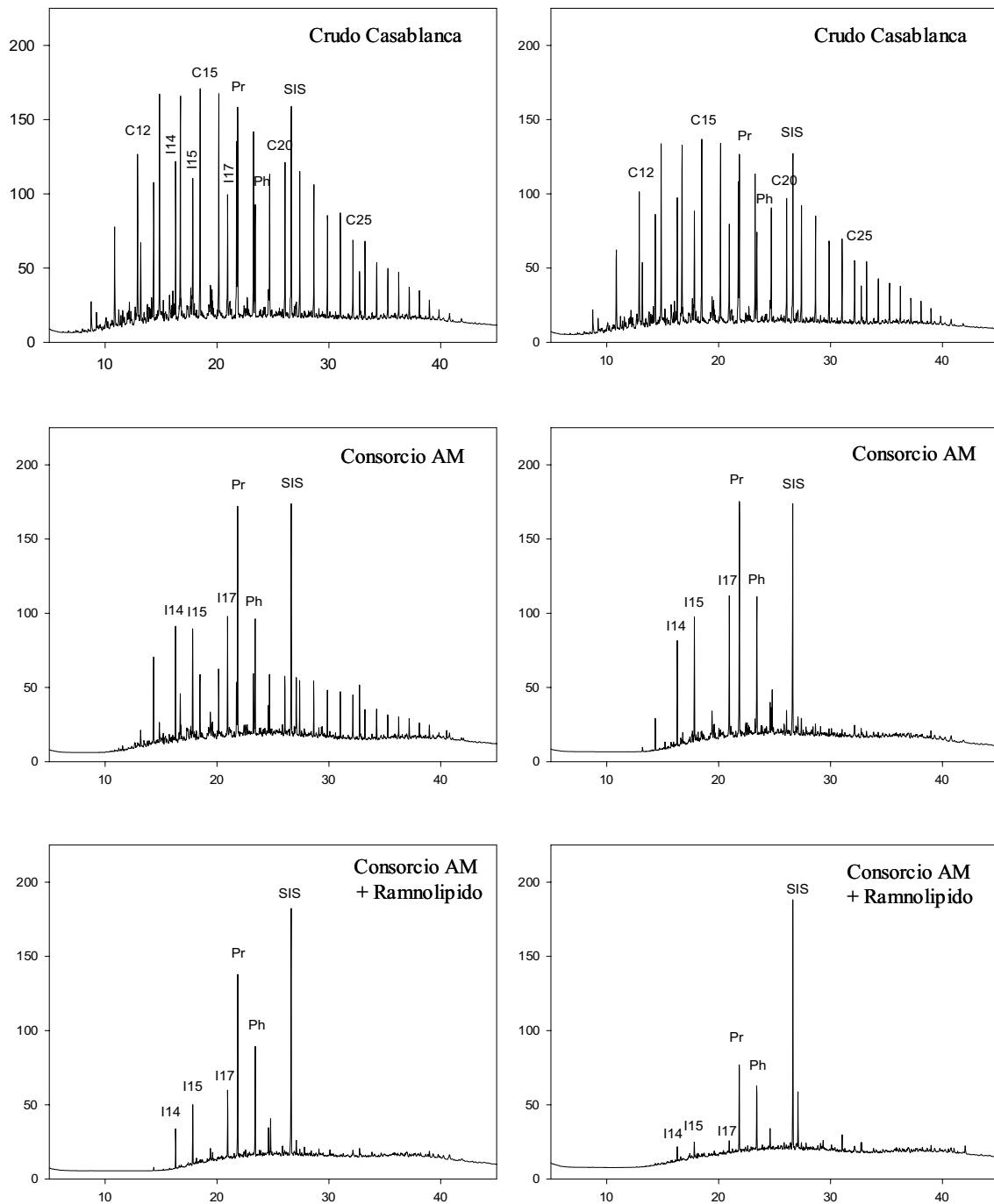


Fig. 1.16. Perfiles cromatográficos (GC-FID) de los extractos de TPH de crudo Casablanca a los 10 días (columna izquierda) y 20 días (columna derecha) de incubación. C₁₂-C₂₅ son *n*-alcanos conteniendo de 12 a 25 átomos de carbono; Pr, pristano; Ph, fitano; I15-I18, isoprenoides conteniendo 15-18 átomos de carbono, SIS, estándar interno *surrogate*.

4.3.2 Biodegradación de los HAPs diana

Los resultados de biodegradación obtenidos a partir de la comparación de las áreas de cultivos y controles abióticos obtenidos a partir de cromatogramas de iones seleccionados generados por GC-MS-SIM se muestran en la tabla 1.15.

Tabla 1.15. Porcentaje (%) de biodegradación de HAPs diana por el consorcio AM con (AM) o sin el biotensioactivo (AMRLs).

Compuesto	AM	AMRLs	AM	AMRLs
	10 días	10 días	20 días	20 días
Naftaleno (Naft)	11,5	100	100	100
C1-Naftaleno ^a	13,8	100	100	100
C2-Naftaleno	11,1	89,5	100	100
C3-Naftaleno	0	66,8	87	95,5
C4-Naftaleno	0	0	11	17
Fluoreno (Fl)	0,2	100	100	100
C1-Fluoreno	0	75,8	87	89
C2-Fluoreno	0	0	18	14,6
C3-Fluoreno	0	0	9	44,3
Fenantreno (Fe)	36,1	100	100	100
C1-Fenantreno	0	100	96	100
C2-Fenantreno	0	28,8	48	56,4
C3-Fenantreno	0,3	4,8	20	38,9
Dibenzotiofeno (DBT)		ND	ND	ND
C1-Dibenzotiofeno	0,5	86,9	75	81
C2-Dibenzotiofeno	0,9	18,7	40	47,8
C3-Dibenzotiofeno	8,5	8,8	29	34,6
Pireno (Pi)	ND	ND	ND	ND
C1-Pireno	0	8,3	0	35,3

^a C1-C4 indican el número de átomos de carbono de los grupos alquilo en los HAPs alquilados. Los compuestos Naft, C1-Naft, C2-Naft, C3-Naft, C4-Naft, Fl, C1-Fl, C2-Fl, C3-Fl, C1-Fl, C1-DBT, C2-DBT, C3-DBT, Fe, C1-Fe, C2-Fe, C3-Fe, C4-Fe y C1-Pi fueron caracterizados con la señal de ión m/z 128, 142, 156, 170, 184, 166, 180, 194, 208, 198, 212, 226, 178, 192, 206, 220, 234 y 226, respectivamente. El DBT se caracterizó mediante las señales a m/z 139+152. Se calculó el porcentaje de biodegradación comparando las áreas de los cromatogramas de iones reconstruidos de los compuestos diana de la F3, entre los cultivos y los

controles abióticos. Se utilizó el naftaleno- d_8 como estándar interno y el antraceno- d_{10} como estándar interno *surrogate*.

Se puede observar que a los 10 días de incubación, la adición de los ramnolípidos incrementó la biodegradación de todos los compuestos seleccionados. El consorcio AM presentó una degradación preferencial de los HAPs parentales en detrimento de sus alquil-derivados. A los 10 días de incubación el consorcio AM sólo degradó un 11-13,7% del naftaleno y del metil y dimetil-naftaleno, y no degradó los tri- y tetrametil-derivados. En cambio, en presencia de los ramnolípidos, el consorcio AM mostró una degradación total del naftaleno, y sus metil y dimetilderivados, un 89% de degradación de los trimetilnaftalenos y una desaparición del 67% de los tetrametilnaftalenos. Por lo tanto existió una aceleración del proceso de degradación de los HAPs parentales y HAPs alquilados (tabla 1.15)

5 DISCUSIÓN

Los tres consorcios microbianos estudiados muestran una considerable eficiencia de biodegradación en aquellas familias de hidrocarburos que han sido utilizadas como fuente de carbono y energía en sus respectivos procesos de enriquecimiento. El espectro de biodegradación de distintas fracciones del crudo de petróleo es consistente con el origen de cada uno de ellos. El consorcio F1AA fue el más eficiente en degradar la fracción saturada; el consorcio TD degradó una parte importante de la fracción saturada así como la fracción poliaromática. Por último, el consorcio AM fue el más eficiente en la degradación de la fracción poliaromática, aunque también fue capaz de utilizar la fracción saturada.

La amplificación entre 200 y 1000 veces la población de los consorcios mediante el subcultivo de los consorcios en medio rico (LB), no cambió significativamente su capacidad degradativa bajo las condiciones del estudio. Por lo tanto, estos resultados permiten la utilización de estos cultivos mixtos (amplificados) como posibles inóculos en experiencias de biorremediación reales, donde son necesarias grandes cantidades de inóculo (bioaumento).

Es difícil comparar los datos gravimétricos con aquellos que se han descrito por otros autores. En realidad, la biodegradación de crudos de petróleo ha sido extensamente estudiada, pero existe una gran variabilidad en las concentraciones de crudo utilizadas, los tiempos de incubación, y las metodologías para cuantificar la degradación. Además, se han utilizado un gran número de disolventes, protocolos de fraccionamiento y técnicas analíticas. Por ejemplo, los estándares internos intrínsecos o los de tipo *surrogate*, solamente se utilizan de forma ocasional, y de acuerdo con los resultados aquí mostrados, en estos casos (ausencia de estándar interno) los resultados podrían sobreestimar la biodegradación por no tener en cuenta pérdidas durante el proceso analítico y/o experimental. También, teniendo en cuenta que la degradación no se puede evaluar con un simple parámetro, es necesario complementar los estudios gravimétricos con métodos analíticos que identifiquen y cuantifiquen los componentes mayoritarios y minoritarios del crudo de petróleo.

5.1 CONSORCIO F1AA

El consorcio F1AA mostró la degradación más extensa del extracto orgánico total (30-35%) y de los TPHs (44-46%). El 60% de biodegradación de la fracción saturada se basa principalmente en la degradación completa de los *n*-alcanos, incluyendo compuestos de elevado peso molecular de 20-33 carbonos, y la desaparición de los alcanos ramificados (isoprenoides). En un estudio similar, Sugiura *et al.* (1997) describieron una degradación del 19-34% de los extractos orgánicos totales de distintos crudos de petróleo por un consorcio no definido (SM8), obtenido mediante enriquecimiento en crudo de petróleo envejecido de forma artificial. No obstante, la fracción alifática tan solo fue degradada un 40-53%, y el pristano y el fitano fueron degradados entre un 75% y un 100% dependiendo del tipo de crudo de petróleo. Por otro lado, Palittapongarnpim *et al.* (1998) describieron para tres cepas bacterianas aisladas, entre un 26% y un 63% la biodegradación de los TPHs de crudo de petróleo Tapis, y un 39-87% de degradación para dos cepas de *Candida tropicalis*. No obstante, en este último caso, los cromatogramas de GC del extracto total del crudo Tapis biodegradado por la cepa microbiana más eficiente (*Candida tropicalis* MU15Y) aún mostraban la persistencia de algunos picos mayoritarios. En otro estudio llevado a cabo por Chhatre *et al.* (1996) fue descrita un 70% de degradación de los principales picos resueltos por GC de crudo Bombay, por un consorcio definido formado por cuatro cepas degradadoras de crudo de petróleo seleccionadas por su capacidad de degradar tanto compuestos saturados como aromáticos. Este consorcio también degradó más del 50% de la fracción saturada y aromática. Sin embargo, estos datos se obtuvieron suministrando concentraciones de estas fracciones al cultivo y por lo tanto no son comparables con la degradación de un crudo completo.

La gran biodegradación de la fracción monoaromática (F2) que se ha descrito para el consorcio F1AA puede deberse a la degradación de cadenas alquílicas de los compuestos mayoritarios de esta fracción (los alquilbencenos). De hecho, Davis y Raymond (1961) ya demostraron que la desaparición de los alquilbencenos por degradadores de alcanos principalmente era debida a degradaciones parciales causadas por las oxidaciones de las cadenas laterales lineales.

A nivel de la fracción poliaromática, el consorcio F1AA no causó una disminución gravimétrica, aunque si degradó algunos HAPs diana como el naftaleno, el fluoreno, y el fenantreno. Este hecho es explicable debido a que los HAPs no alquilados que se han analizado en el crudo de petróleo están en muy bajas concentraciones, y por lo tanto su degradación por parte de la pequeña población degradadora de HAPs, presente en el consorcio F1AA (tabla 1.8), no afecta de forma significativa a la gravimetría de la compleja fracción poliaromática (F3). Asimismo, el incremento que se observa en la aromaticidad de la F3 sugiere que la degradación de los HAPs alquilados se produce básicamente por procesos de cooxidación, produciendo HAPs parcialmente oxidados. Este mismo mecanismo también ha sido descrito por Sugiura *et al.* (1997) para la degradación de la fracción aromática de un crudo de petróleo.

De acuerdo con los resultados descritos, el consorcio F1AA tiene el potencial para la degradación de aceites minerales pesados enriquecidos en fracción saturada de elevado peso molecular.

5.2 CONSORCIO TD

El consorcio TD también degradó de forma significativa el crudo de petróleo Casablanca. Degradó en menor medida el EOT, los TPHs, la fracción saturada (F2) y los monoaromáticos (F2) que el consorcio F1AA, aunque también degradó la totalidad de los alcanos ramificados. Asimismo, este consorcio causó una degradación de más del 10% de la fracción poliaromática (F3) y degradó la totalidad de los HAPs parentales diana analizados (naftaleno, fluoreno, fenantreno) y sus alquilderivados tipo C₁-C₂, degradando más de un 50% los alquilderivados tipo C₃-C₄ (excepto el tetrametilfenantreno). Es importante resaltar que la degradación observada en los HAPs diana es superior a la descrita en otros estudios (Budzinski *et al.*, 1998; Sugiura *et al.* 1997). Por ejemplo, Budzinski *et al.* (1998) cuantificaron un 30-70% de biodegradación del metil y dimetildibenzotiofeno, y un 20-95% de degradación del metil y dimetilfenantreno. Existen otros estudios donde se citan degradaciones superiores de la F3 (Chhatre *et al.*, 1996), pero en ellos se utilizaron técnicas analíticas diferentes y no se da información acerca de analitos específicos (sólo dan información de la fracción y no de los analitos diana) lo que hace difícil la comparación de resultados.

Los buenos resultados obtenidos, tanto por inoculación directa del consorcio TD como por inoculación de subcultivos del consorcio TD crecidos en medio rico, indican que el consorcio TD tiene potencial para su utilización en situaciones reales de bioaumentación en enclaves contaminados con crudo de petróleo y derivados “ligeros” como son los gasóleos.

5.3 CONSORCIO AM

El consorcio AM degradó la fracción saturada de forma moderada y en menor grado que F1AA y TD, no siendo capaz de degradar los alcanos ramificados (10%). No obstante, existen degradadores de *n*-alcanos en este consorcio, tal y como se muestra en la tabla 1.8. Sin embargo, no se puede concluir con los datos disponibles en este estudio si los degradadores de alcanos son los responsables de la degradación de esta familia de hidrocarburos, o en realidad son los degradadores de HAPs que degradan de forma inespecífica los alcanos. Existen estudios que sostienen que la degradación de hidrocarburos aromáticos y la degradación de *n*-alcanos son propiedades exclusivas (Foght *et al.*, 1990), mientras que otros estudios realizados con cepas de *Pseudomonas* y *Mycobacterium* describen la posibilidad de crecimiento tanto con *n*-alcanos como con HAPs (Churchill *et al.*, 1999). A nivel de la fracción aromática, el consorcio AM no presentó una degradación superior que la que mostró el consorcio TD. Esto podría deberse tanto a la complejidad de la fracción aromática (el consorcio AM es capaz de crecer en una mezcla sintética de 5 HAPs no sustituidos) como que la concentración de los HAPs parentales es inferior a la de sus derivados alquilados y otras familias de compuestos, en el crudo de petróleo Casablanca. Aun así, el consorcio AM fue el que mostró una mayor disminución del índice de aromaticidad de la fracción aromática, lo que indica que su actividad catabólica supone la rotura de anillos aromáticos y no solamente la oxidación de las cadenas alquílicas como realiza el consorcio F1AA.

El consorcio AM también mantuvo la capacidad catabólica en los inóculos procedentes de subcultivos en medio rico, y por lo tanto, puede ser adecuado para experiencias de bioaumentación en enclaves contaminados con HAPs, como los suelos contaminados con creosota (capítulo IV).

5.4 EFECTO DE LA PRESENCIA DE LOS RAMNOLIPIDOS M_{AT10} EN LA BIODEGRADACIÓN DEL CRUDO CASABLANCA POR EL CONSORCIO AM

Mientras que los *n*-alcanos representan la familia mayoritaria de compuestos biodegradables de la fracción saturada de un crudo de petróleo, el grupo de los isoprenoides es mucho más recalcitrante. Esto ha sido atribuido a la estructura química ramificada (Britton, 1984) o a un efecto de diauxia por la acción de los propios *n*-alcanos presentes (Morgan y Watkinson 1994). No obstante, una característica muy importante de los isoprenoides es su baja solubilidad en agua, lo cual limita su biodisponibilidad para los microorganismos degradadores. Los resultados obtenidos con el consorcio AM con la presencia y ausencia de los ramnolípidos M_{AT10} indica que la baja degradabilidad de los isoprenoides mostrada por el consorcio AM en ausencia de M_{AT10} fue básicamente debida a la baja disponibilidad de los isoprenoides.

La presencia de grupos alquilo en los HAPs le confiere mayor resistencia a la metabolización microbiana disminuyendo la biodegradación con el incremento del número de sustituyentes y el número de átomos de carbono de la cadena alquílica (Solanas *et al.*, 1984; Sugiura *et al.*, 1997). La presencia de los ramnolípidos M_{AT10} también incrementó la biodegradación de los naftalenos alquilados. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las solubilidades acuosas de los HAPs sustituidos disminuyen cuanto mayor es el número de sustituciones metil (Verschueren, 1997), es razonable pensar que la adición de los ramnolípidos mejoró la solubilización de estos compuestos, facilitando su biodegradación. De hecho, Kanga *et al.* (1997) describió un biotensioactivo de la familia de los glicolípidos que presentaba un mayor potencial de solubilización de los naftalenos altamente ramificados que los tensioactivos sintéticos, debido a que el biotensioactivo formaba un gran volumen micelar que le permitía acomodar mejor estos HAPs ramificados de mayor peso molecular.

El incremento de la biodegradación de HAPs alquilados por el consorcio AM en presencia del ramnolípido M_{AT10} , es de gran interés desde el punto de vista ambiental. Mientras los HAPs parentales (no alquilados) tienen efectos de toxicidad aguda y tienen propiedades mutagénicas, teratogénicas o carcinogénicas (International Association of Research Chemists, 1983), sus alquilderivados incluso pueden tener consecuencias más

graves para la salud pública. Los HAPs alquilados pertenecen al grupo principal de compuestos mutagénicos, conjuntamente con los HAPs de bajo peso molecular y relacionados (Griest *et al.*, 1979). Asimismo se ha descrito que los derivados metilados del fluoreno, fenantreno y antraceno, a diferencia de los parentales, son mutagénicos en el test de Ames para *Salmonella typhimurium* TA 100 (LaVoie *et al.*, 1979).

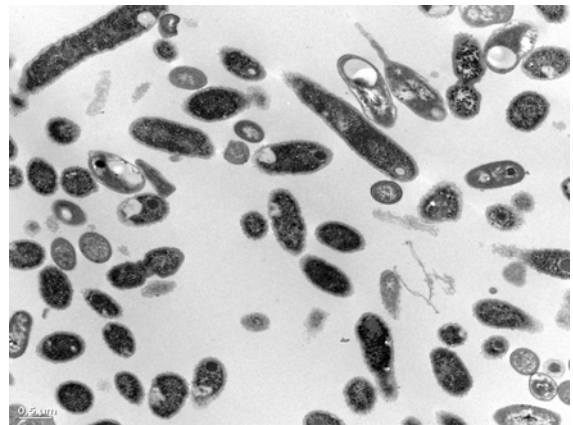
Los resultados obtenidos reflejan la aplicabilidad del biotensioactivo M_{AT10} en la biorremediación de un crudo de petróleo y derivados, implicando una aceleración de las tasas de biodegradación y una mayor biodegradación de los componentes más hidrofóbicos.

6 CONCLUSIONES

1. La amplificación de los consorcios F1AA, AM y TD en medio rico, para su utilización en experiencias reales de bioaumentación, no disminuye su potencial degradador frente al crudo de petróleo Casablanca
2. El consorcio F1AA es el más eficiente en la degradación de la fracción saturada, y el menos eficiente frente a la fracción aromática total, siendo apropiada su utilización en casos de matrices contaminadas con aceites minerales.
3. El consorcio TD presenta el mayor espectro catabólico degradando eficientemente tanto la fracción saturada como la aromática, siendo apropiada su utilización en matrices contaminadas con crudos de petróleo ligeros, fuel ligero y gasóleo.
4. El consorcio AM es el más eficiente en la degradación de la fracción aromática y además es capaz de degradar de forma significativa la fracción saturada, aunque no es capaz de transformar los alcanos ramificados. Sería apropiada su utilización en matrices contaminadas ricas en HAPs como la creosota y el fuel de pirólisis.
5. Los ramnolípidos M_{AT10}, producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 mejoran la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio AM, incrementando tanto la tasa de biodegradación como la degradación de los isoprenoides de la fracción saturada y los HAPs alquilados de la fracción aromática.

Capítulo II:

Caracterización de la diversidad microbiana de un consorcio degradador de HAPs



«La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino 'Es extraño ...»

Isaac Asimov. "Guía básica de la ciencia"

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

1.1.1 Estructura de los HAPs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se definen por ser estructuras formadas por 2 o más moléculas de benceno fusionadas. Se conocen unos 100 HAPs diferentes ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La estructura atómica del anillo bencénico les confiere una gran estabilidad termodinámica debido a la elevada energía de resonancia negativa que proporciona contener seis orbitales moleculares π por solapamiento cíclico. Todos los compuestos con sistemas electrónicos π -cíclicos son catalogados como aromáticos.

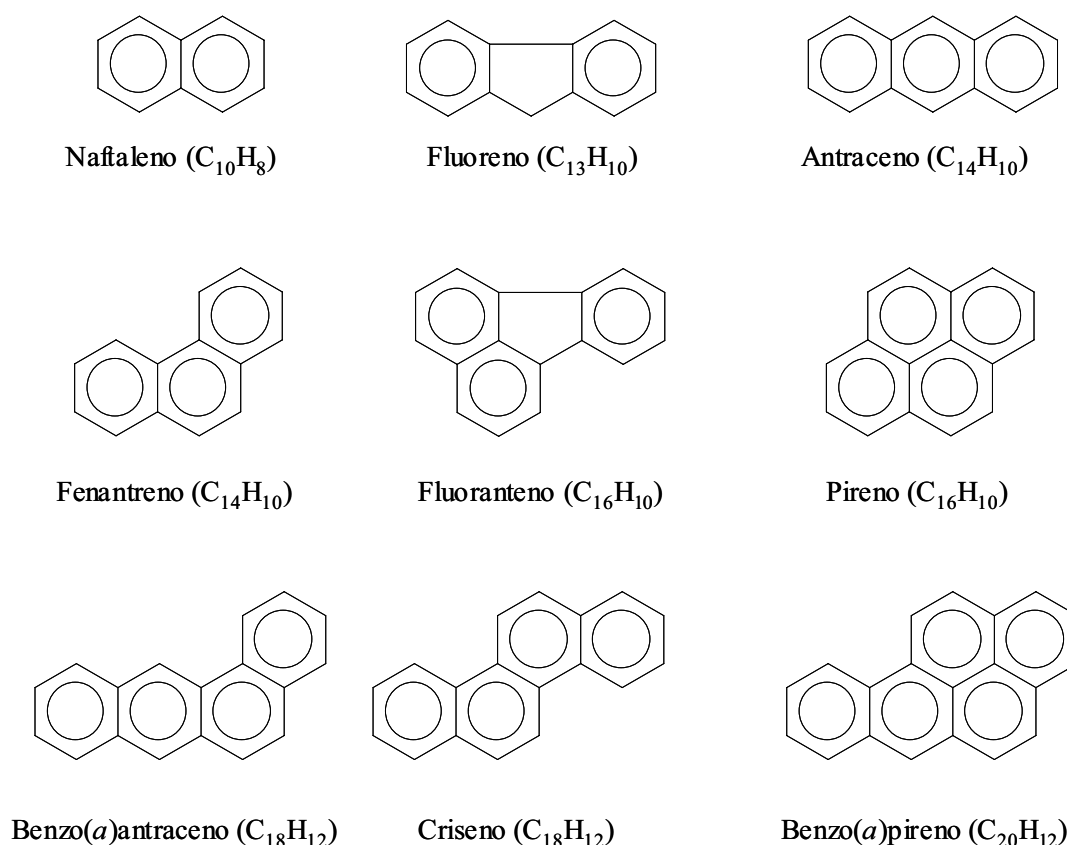


Fig.2.1 Estructura química de hidrocarburos aromáticos policíclicos representativos.

1.1.2 Origen y distribución de los HAPs en el medio ambiente

El anillo bencénico es una de las estructuras más ampliamente distribuida en la naturaleza. Se encuentra formando parte de compuestos mono y policíclicos, así como de otras sustancias más complejas como la lignina (Dagley, 1981). Los HAPs se forman por la exposición de moléculas orgánicas a elevadas temperaturas (pirólisis), así como también por exposiciones a menor temperatura (100-150°C) y a elevadas presiones durante millones de años en sedimentos, durante la formación del petróleo (origen petrogénico). Las mezclas de HAPs de origen petrogénico se distinguen de las pirolíticas por ser más ricas en HAPs alquilados debido a la diferente temperatura de formación (Blumer, 1976).

Tabla 2.1. Propiedades físicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios de la EPA.

Compuesto	PM ^a	Punto Fusión (°C)	Punto Ebull. (°C)	Solubilidad agua (mg l ⁻¹) ^b	log k _{ow} ^c	log k _{oc} ^d
Naftaleno	128	80	218	30,0	3,37	3,1
Acenaftileno	152	92	265	16,1	4,07	ND ^e
Acenafteno	154	96	279	3,47	4,33	3,8
Fluoreno	166	116	298	1,8	4,18	3,9
Fenantreno	178	101	340	1,29	4,46	4,1
Antraceno	178	218	342	0,073	4,45	4,3
Fluoranteno	202	110	375	0,260	5,33	4,3
Pireno	202	150	404	0,135	5,32	4,8
Benz(a)antraeno	228	159	435	0,014	5,61	4,8
Criseno	228	256	448	0,0006	5,86	4,9
Benzo(b)fluoranteno	252	168	ND	0,0012	6,57	6,2
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0,00055	6,84	5,6
Benzo(a)pireno	252	179	495	0,0038	6,04	5,3
Dibenzo(a,h)antraceno	278	267	524	0,0005	6,75	6,3
Benzo(g,h,i)perileno	276	278	ND	0,00026	7,23	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	162	ND	0,062	7,66	6,2

^a PM: Peso molecular. ^b20°C. ^c k_{ow}: equivale a la proporción del número de moléculas que existirían en la fase octanol respecto a la fase agua si utilizáramos una mezcla octanol:agua 1:1 como solvente. ^d k_{oc} es la proporción de moléculas de HAP que se encontrarían en la materia orgánica del suelo respecto a las que encontraríamos en la fase agua, en un suelo saturado de agua. ^eND: No determinado. Datos de la tabla según (Kästner, 2000).

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAPs en el medio ambiente van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAP (tabla 2.1). Son de gran importancia la hidrofobicidad, que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos y la volatilidad de los HAPs de menor peso molecular. Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAPs muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica (Clements *et al.*, 1994). De hecho los compuestos aromáticos heterocíclicos, los cuales contienen átomos de nitrógeno, azufre u oxígeno, también pueden considerarse HAPs, en sentido amplio, debido a que también muestran características similares (Sims y Overcash, 1983).

Tabla 2.2. Fuentes de HAPs.

Naturales:

Fuegos forestales
 Producción por seres vivos
 Filtraciones naturales de petróleo
 Erupciones volcánicas

Antropogénicas :

Combustión de madera y combustibles fósiles
 Emisiones de vehículos, aviones y embarcaciones
 Industria del petróleo
 Prospecciones y extracción
 Accidentes de transporte
 Almacenamiento
 Refinado
 Aguas de deslastre
 Residuos
 Creosota
 Utilización de petróleo y derivados
 Procesos industriales
 Aguas residuales urbanas e industriales
 Aguas de escorrentía urbanas y de carreteras
 Humo de tabaco
 Incineración de residuos

Los HAPs existentes en el medio ambiente (atmósfera, suelo y ecosistemas acuáticos) pueden proceder tanto de la naturaleza como de la actividad humana (tabla 2.2). Básicamente las fuentes de HAPs se resumen en tres: el petróleo o origen petrogénico, la combustión o origen pirolítico (a partir de combustibles fósiles, madera, erupciones, etc.) y

la síntesis por seres vivos, cuya aportación es minoritaria (Borneff *et al.*, 1968; Sues, 1976; National Academy of Sciences, 1983).

La agencia de protección ambiental americana ha incluido los HAPs entre sus contaminantes prioritarios (Keith y Telliard, 1979). Esto fundamentalmente se debe a la peligrosidad intrínseca de los HAPs, debido a la toxicidad aguda y a la toxicidad de tipo teratogénico, mutagénico y carcinogénico que presentan. (LaVoie y Rice, 1988; Wislocki y Lu, 1988; Cerniglia *et al.*, 1989). Asimismo también se bioacumulan y su biodegradación en general es mucho más lenta, especialmente los de elevado peso molecular que la de otros hidrocarburos (Kanaly y Harayama, 2000).

1.1.3 Biodegradación de HAPs

Los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de los HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural (Prince, 1993; Sutherland *et al.*, 1995). Por lo tanto es necesario un buen conocimiento y control de este proceso natural para aplicarlo a tecnologías de biorremediación (Whise, 2000)

En la figura 2.2 se muestran las primeras reacciones de transformación aeróbica de los HAPs, siendo característico de los hongos y los mamíferos la introducción de un sólo átomo de oxígeno mediante una monooxigenasa que contiene el citocromo P-450, y la transformación a *trans*-dihidrodiol. En este proceso de transformación se generan metabolitos más solubles, para su posterior eliminación (proceso de detoxificación) (Cerniglia, 1984; Cerniglia *et al.*, 1985; Sutherland *et al.*, 1995).

Los hongos lignolíticos pueden degradar e incluso mineralizar los HAPs mediante el conjunto de enzimas implicados en la utilización de polímeros vegetales como la lignina. (Bumpus *et al.*, 1985; Bumpus, 1989; Cerniglia *et al.*, 1992; Hammel *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1992).

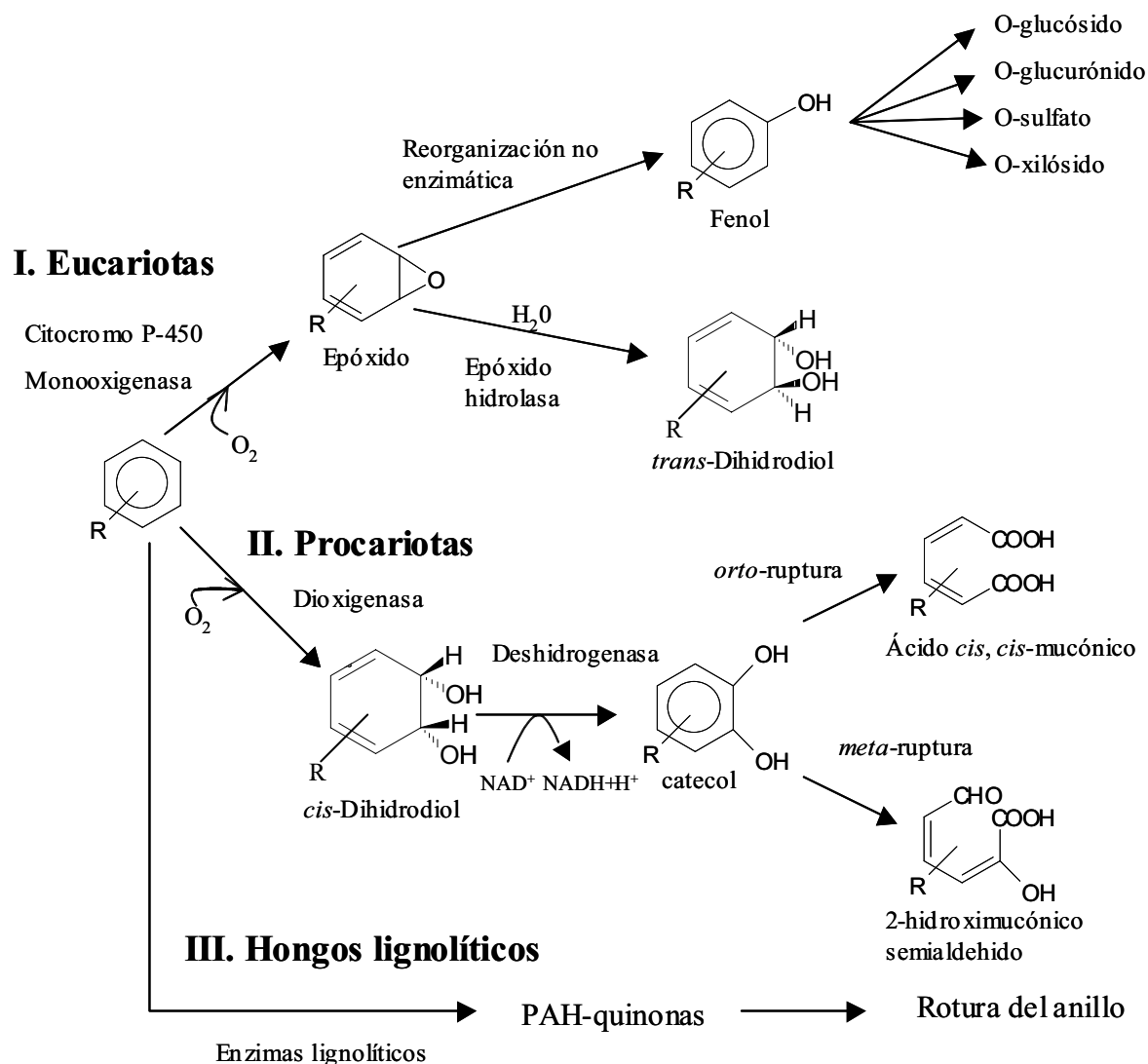


Fig. 2.2. Reacciones iniciales del metabolismo aeróbico de los HAPs.

Las bacterias inician la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno catalizado por una dioxigenasa (fig. 2.2). A partir de esta reacción se forma un *cis*-dihidrodol, a diferencia de los hongos y mamíferos que generan un *trans*-dihidrodol, y el anillo pierde la aromaticidad. A continuación una deshidrogenasa NAD^+ dependiente, reconstituye el anillo aromático formando un catecol (diol). Los dioles son moléculas a partir de las cuales se produce la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estereoselectivas. La ruptura se puede dar entre los dos grupos hidroxilos, denominándose *orto*-ruptura, o adyacente a estos grupos, denominándose *meta*-ruptura.

1.1.4 Microorganismos degradadores de HAPs

La capacidad de degradación de compuestos que contienen anillos aromáticos está ampliamente distribuida en la naturaleza, y de hecho, se han aislado numerosas especies de bacterias y hongos degradadores de compuestos aromáticos conteniendo entre 2 y 5 anillos (Gibson y Subramanian, 1984; Cerniglia *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1995; Kanaly y Harayama 2000).

Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs que incluyen: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas*, según “The Biodegradative strain database” (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>), una base de datos, publicada por la Universidad de Michigan, que reúne cepas degradadoras de moléculas orgánicas.

Asimismo también se han descrito una gran variedad de géneros de hongos degradadores de HAPs como: *Agrocybe*, *Aspergillus*, *Candida*, *Crinipellis*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella*, *Bjerkandera*, *Fusarium*, *Kuehneromyces*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Mortierella*, *Mucor*, *Naematoloma*, *Laetiporus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Penicillium*, *Ramaria*, *Rhizoctonia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Syncephalastrum*, *Trametes* y *Trichoderma* (Cerniglia, 1997; “The Biodegradative strain database” (<http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html>)).

1.1.5 Utilización de inóculos exógenos en experiencias de biorremediación.

Ha habido éxitos y fracasos en la utilización de inóculos microbianos exógenos especializados en la descontaminación de diferentes enclaves contaminados (Alexander, 1999). En casos de emplazamientos contaminados por hidrocarburos con exposiciones largas o recurrentemente contaminados, la población autóctona habitualmente responde eficientemente a estrategias de bioestimulación incrementando su población y consiguiendo una biodegradación significativa de los contaminantes (Alexander, 1999). De

hecho, se han descrito resultados favorables en procesos de biostimulación en suelos contaminados con distintas familias de hidrocarburos; con aceites minerales pesados (Sabaté *et al.*, 2004), en suelos contaminados por HAPs (Samanta y Singh y Rakesh, 2002; Atagana, 2004), en enclaves contaminados con crudo de petróleo (Macnaughton *et al.*, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003; Kaplan y Kitts, 2004), bifeniles policlorados (PCBs) (Nogales *et al.*, 2001) y herbicidas (Singh *et al.*, 2003).

En las situaciones en que la población indígena degradadora de hidrocarburos es inexistente o muy baja, debido a la toxicidad intrínseca de la matriz contaminante o por ser un enclave contaminado muy recientemente, el uso de inóculos exógenos puede ser beneficioso (Vogel, 1996; Alexander, 1999). En realidad se han descrito numerosas situaciones en las que el bioaumentación ha funcionado, en suelos, lodos y aguas subterráneas contaminadas (tabla 2.3). Sin embargo, es necesario en cada caso particular estudiar la necesidad o no de aplicar inóculos exógenos, así como sus condiciones óptimas de aplicación (Vogel, 1996).

Como puede observarse en la tabla 2.3, un gran número de inóculos exógenos utilizados en procesos de bioaumentación se corresponden a cultivos puros de cepas microbianas individuales, en cambio se utilizan consorcios no definidos en pocas ocasiones, aunque en realidad posean un mayor potencial catabólico. Su escasa utilización, reside en que es muy difícil conocer todos los componentes microbianos que existen en un consorcio no definido, cuya obtención es en base a procesos de enriquecimiento secuencial de muestras ambientales reales. Por lo tanto se hace necesario conocer la composición microbiana de los consorcios para adecuarse a la legislación ambiental así como también para comprender mejor el funcionamiento del mismo.

Tabla 2.3. Estudios de biorremediación de aguas y suelos contaminados con éxito en la utilización de inóculos exógenos.

Inóculo	Contaminante (matriz)	Referencia
<i>Arthrobacter</i> sp.	Isopropil-N-fenilcarbamato (suelo)	(Clark y Wright, 1970)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Paration (suelo)	(Barles <i>et al.</i> , 1979)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Paration (suelo)	(Barles <i>et al.</i> , 1979)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (suelo)	(Kilbane <i>et al.</i> , 1983)
<i>Pseudomonas cepacia</i> BRI6001	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Comeau <i>et al.</i> , 1993)
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Daane y Häggblom, 1999)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Pentaclorofenol (suelo)	(Crawford y Mohn, 1985)
Lodos anaérobicos activados	Pentaclorofenol (suelo)	(Mikesell y Boyd, 1988)
Suelo activado	Pentaclorofenol (suelo)	(Barbeau <i>et al.</i> , 1997)
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	Pentaclorofenol (suelo)	(Beaudet <i>et al.</i> , 1998)
<i>Alcaligenes eutrophus</i> TCP	2,4,6-Triclorofenol (suelo)	(Andreoni <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ralstonia basilensis</i> RK1	2,6-Diclorofenol (suelo)	(Steinle <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	Atrazina (suelo)	(Shapir y Mandelbaum, 1997)
Consortio	Atrazina (suelo)	(Alvey y Crowley, 1996)
Consortio	Atrazina (suelo)	(Grigg <i>et al.</i> , 1997)
Consortio	Atrazina (suelo)	(Newcombe y Crowley 1999)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14a	Atrazina (suelo)	(Struthers <i>et al.</i> , 1998)
<i>Escherichia coli</i> (pAtzA)	Atrazina (suelo)	(Strong <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505	HAPs (suelo)	(Straube <i>et al.</i> , 1999)
<i>Arthrobacter</i> sp. RP17	HAPs (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
Consortio	HAPs (lodos)	(Cardinal y Stenstrom, 1991)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HAPs (suelo)	(Lamar <i>et al.</i> , 1994)
<i>Arthrobacter</i> sp B1B	Bifenil policlorado (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Ralstonia eutrophus</i> H850	Bifenil policlorado (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. P51	1,2,4-triclorobenceno (suelo)	(Tchelet <i>et al.</i> , 1999)
Consortio	Crudo de petróleo (lodos)	(Mishra <i>et al.</i> , 2001)
Consortio	fuel (aguas subterráneas)	(Von Wedel <i>et al.</i> , 1988)
<i>Comamonas testosteroni</i> I2	3-cloroanilina (lodos)	(Boon <i>et al.</i> , 2000)
<i>Comamonas testosteroni</i> BR60	3-clorobenzoato (suelo)	(Gentry <i>et al.</i> , 2001)
Cepa bacteriana PM1	Metil-tert-butileter (MTBE) (aguas subterráneas)	(Hristova <i>et al.</i> , 2001)
<i>Burkholderia cepacia</i> PR1301	1,1,1-Tricloretoano (aguas subterráneas)	(Bourquin <i>et al.</i> , 1997)

1.1.6 Estudio de la diversidad de comunidades microbianas

Durante el último siglo, y especialmente en los últimos 20 años se ha incrementado muy significativamente las metodologías para estudiar la diversidad microbiana existente en la Biosfera. En realidad, estudios elaborados por Torsvik *et al.*, (1990 y 2003) sugieren que existen unos 4000 equivalentes genómicos distintos por gramo de suelo, lo que indica que quizás existan 1000 o incluso más especies microbianas diferentes por gramo de suelo. Esta gran diversidad encontrada por Torsvik (1990) también estaría en concordancia con un estudio de Truper (1992) donde se estima que podrían existir un total de $3 \cdot 10^4$ especies bacterianas diferentes en la Biosfera.

Otro punto a tener en cuenta es que tan sólo entre un 0.001 y un 1% de los microorganismos viables son realmente cultivables (Torsvik *et al.*, 2003). En la tabla 2.4 pueden verse resultados de diferentes estudios en los que se determina la fracción de microorganismos cultivables respecto a la enumeración total realizada mediante microscopia de epifluorescencia. Es por este motivo, que los estudios clásicos de diversidad microbiana basados únicamente en el aislamiento de microorganismos representan tan sólo una parte minoritaria de la diversidad real existente (Amann *et al.*, 1995)

Tabla 2.4. Proporción de organismos cultivables (%) en distintos ambientes.

Habitat	Cultivables (%)	Referencias
Ecosistema marino	0.001-0.1	(Kogure <i>et al.</i> , 1980; Ferguson <i>et al.</i> , 1984)
Ecosistema aguas continentales	0.25	(Jones, 1977)
Lago mesotrófico	0.1-1	(Staley y Konopka, 1985)
Estuarios	0.1-3	(Ferguson <i>et al.</i> , 1984)
Lodos activados	1-15	(Wagner <i>et al.</i> , 1993; Wagner <i>et al.</i> , 1994)
Sedimentos	0.25	(Jones, 1977)
Suelo	0.3	(Torsvik <i>et al.</i> , 1990)

1.1.6.1 Metodologías dependientes de cultivo

Son técnicas que requieren el cultivo de los microorganismos para la caracterización de la diversidad de una comunidad microbiana. Entre ellas encontramos las técnicas clásicas de cultivo en placa en medios sintéticos de laboratorio y el número más probable. Más recientemente se ha utilizado el BiologTM, una técnica que se utiliza para el estudio de las comunidades microbianas en base a un perfil fisiológico, y que consiste en inocular muestras ambientales en cada uno de los 96 pocillos que contiene una placa BiologTM cuyo contenido se basa en distintos medios y sustratos (Garland y Mills 1991; Wünsche *et al.*, 1995; El Fantroussi *et al.*, 1999). La comparación entre perfiles fisiológicos de una comunidad o de diferentes muestras ambientales se calcula estadísticamente.

Tabla 2.5. Ventajas y limitaciones de los métodos dependientes de cultivo.

Método	Ventajas	Limitaciones
Aislamiento en placa	Cultivos puros útiles para estudios posteriores	Solamente una pequeña proporción de la comunidad detectable. Los aislados no necesariamente reflejan la función metabólica
Número más probable (NMP)	Función metabólica de interés detectada	Ausencia de aislados para posteriores estudios. El medio selectivo puede limitar proporción detectada de la comunidad
Biolog TM	Amplia actividad metabólica detectada. Rápido y sencillo.	Resultados sensibles al tamaño del inóculo y efectos de incubación. No se obtienen aislados para posteriores estudios. El medio selectivo puede limitar la proporción detectada de la comunidad.

El principal inconveniente es que solamente se aísla una pequeña proporción de los componentes existentes en la comunidad microbiana, ya que los medios sintéticos de laboratorio y el soporte (sólido o líquido) limitan la proporción de microorganismos aislados (Torsvik *et al.*, 2003) (tabla 2.5).

Las técnicas cultivo-dependientes tienen una serie de ventajas e inconvenientes para el estudio de la diversidad microbiana (tabla 2.5). Las ventajas más importante consisten en la obtención de cultivos puros, útiles para estudios posteriores, y de información acerca de actividades metabólicas de interés.

1.1.6.2 Metodologías independientes de cultivo

En los últimos años se han desarrollado una serie de metodologías, con el objetivo de representar la mayor proporción posible de la diversidad microbiana existente en una muestra ambiental (Amann *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998). Estas metodologías no necesitan pasos previos de cultivo de la muestra ambiental y se basan en el estudio directo de la muestra a diferentes niveles. Existen métodos que analizan los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana de la comunidad microbiana (PLFA), estudios por microscopia (epifluorescencia), y mayoritariamente, métodos que analizan ácidos nucleicos existentes en la comunidad: PCR y clonaje, PCR acoplada a electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante químico o térmico (DGGE o TGGE respectivamente) o a polimorfismos de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP), y técnicas de hibridación in situ (FISH).

1.1.6.2.1 Análisis de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (PLFA)

Los fosfolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares de todas las células vivas. Mantienen una proporción relativamente constante con la biomasa microbiana viva (Lechevalier, 1989). Los microorganismos viables mantienen su membrana celular intacta, la cual contiene ácidos grasos como componentes de sus fosfolípidos.

La técnica de PLFA se basa en la extracción química de los lípidos presentes en una muestra ambiental, y su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis de PLFA es bastante útil para detectar cambios rápidos en la estructura de las comunidades microbianas, pero no para asignar afiliaciones filogenéticas en una mezcla ambiental. Se pueden clasificar cepas puras aisladas, crecidas en condiciones estandarizadas ya que existen bases de datos en estas condiciones, pero no para diferentes muestras ambientales, donde lo más frecuente es su estudio mediante análisis estadístico multivariante (Zelles, 1999). Generalmente para análisis de comunidades microbianas se utiliza la técnica de PLFA conjuntamente con otras técnicas de análisis de ácidos nucleicos como por ejemplo el DGGE (Macnaughton *et al.*, 1999; Clegg *et al.*, 2003; Ritz *et al.*, 2004).

1.1.6.2.2 Análisis de restricción de genes rRNA (ARDRA)

En una primera aproximación, para el estudio de la diversidad microbiana de cultivos mixtos o de comunidades microbianas existentes en el medio ambiente, se clonaban al azar fragmentos de DNA genómico ambiental y posteriormente se secuenciaban únicamente los clones que contenían genes rRNA (Pace *et al.*, 1986). Esta estrategia laboriosa se substituyó por la utilización de la PCR para amplificar selectivamente genes que codificaran para el RNA ribosómico (genes rRNA) a partir del DNA total de una comunidad microbiana. En la PCR se pueden emplear diferentes cebadores para amplificar los genes rRNA de todos los organismos (arqueobacterias, eubacterias y eucariotas) presentes en una muestra ambiental. Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, pueden ser clonados y analizados, o bien por restricción, o bien con el uso de sondas específicas, y finalmente, los clones pueden ser secuenciados (Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz y Pace 1996). Otra modalidad de ARDRA radica en el análisis directo de restricción, evitando el clonaje de los fragmentos de DNA amplificados, y así, obtener información sobre el perfil (ribotipado) de la comunidad (Massol-Deyà *et al.*, 1995). La aplicación del ARDRA a partir de productos de PCR de genes rRNA de DNA genómico de muestras ambientales produce demasiadas bandas electroforéticas, pero si que es factible para el estudio de poblaciones específicas (utilizando cebadores específicos), y para comparar la diversidad de cepas aisladas y genes clonados (Torsvik *et al.*, 1998).

En los últimos años se está utilizando la PCR para la amplificación de genes rRNA para estudiar grupos específicos de organismos. A modo de ejemplo, se han analizado bacterias como las metilótrofas de la subclase α - y γ -Proteobacteria (Henckel *et al.*, 1999), α - y β -Proteobacteria (Gomes *et al.*, 2001), bacterias oxidadoras de amonio (Kowalchuk *et al.*, 1998), especies del género *Acidobacterium* (Barns *et al.*, 1999), arqueobacterias (Ovreas *et al.*, 1997), y hongos (Smit *et al.*, 1999).

Los productos de PCR de genes rRNA también pueden analizarse mediante técnicas como la electroforesis en geles de gradiente desnaturizante químico (DGGE), térmico (TGGE), el estudio de polimorfismos de conformación de cadenas simples de DNA (SSCP) y por variaciones de la longitud del fragmento de restricción terminal (T-RFLP) que se describen a continuación.

1.1.6.2.3 Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizantes (DGGE, TGGE)

Las electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante químico (DGGE) y térmico (TGGE), son técnicas a partir de las cuales los fragmentos de DNA de igual longitud pero con secuencia distinta se pueden resolver electroforéticamente (Fischer y Lerman, 1979). En los últimos 10 años el DGGE y el TGGE se han utilizado para el análisis de genes que codifican para el 16S rRNA y 18S rRNA de muestras ambientales. Estas técnicas permiten la separación de una mezcla heterogénea de genes amplificados por PCR en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de formamida y urea en concentraciones crecientes en el sentido de la migración electroforética (DGGE), o un gradiente térmico con temperaturas del gel crecientes en el sentido de la migración electroforética (TGGE) (Muyzer *et al.*, 1993). Se pueden estudiar moléculas de DNA de hasta 700 pares de bases de longitud, con la característica de llevar acoplada una cola artificial muy rica en GC (añadida a uno de los 2 cebadores en posición 5') en uno de los extremos, para evitar la desnaturalización completa del DNA (Muyzer *et al.*, 1993). Las bandas individuales representan aquellos DNAs que han frenado su migración por el gel al desnaturalizarse por completo (excepto la cola de GC).

Para conseguir una visión completa de la composición y diversidad de la comunidad microbiana, se pueden recortar las bandas aisladas, reamplificarlas y secuenciarlas. También se puede estudiar el gel completo con el uso de sondas específicas, para identificar bandas de interés (Muyzer *et al.*, 1993), o realizar un estudio estadístico de la estructura de la comunidad según la posición e intensidad de las bandas (Fromin *et al.*, 2002). El DGGE y el TGGE son relativamente rápidos de preparar y se pueden analizar bastantes muestras simultáneamente. Por lo tanto, son métodos particularmente útiles para examinar series temporales y dinámicas de las poblaciones microbianas. Una vez se ha establecido la relación de un cierto organismo con una banda en particular, se puede hacer un buen seguimiento de las fluctuaciones existentes en una población microbiana .

DGGE y el TGGE también tienen limitaciones intrínsecas a las técnicas moleculares, como la no correcta optimización del gradiente. Incluso en condiciones de gradiente optimizado, pueden aparecer bandas únicas que representen a varios organismos diferentes. Asimismo, existen microorganismos que generan más de una banda en el DGGE y TGGE y más de 2 en SSCP, debido a la existencia de copias diferentes de genes

de rRNA en un mismo organismo (Head *et al.*, 1998). Además los organismos procariotas poseen distintas cantidades de operones rRNA. Por ejemplo *Bacillus subtilis* posee 10 operones de genes rRNA mientras que *Thermus thermophilus* posee 2 (Amann *et al.*, 1995), lo que condiciona los resultados cuantitativos. Por lo tanto, las fluctuaciones poblacionales deben analizarse de forma semi-cuantitativa (cantidades relativas dentro de una misma muestra).

1.1.6.2.4 Análisis de polimorfismos de conformación del DNA de cadena simple (SSCP)

Otra técnica electroforética análoga al DGGE y al TGGE es el análisis de los polimorfismos de conformación a de fragmentos de DNA de cadena simple a lo largo de un gel de poliacrilamida (SSCP). En esta técnica, los fragmentos de cadena simple de DNA, procedentes de la amplificación de genes rRNA por PCR, y posterior desnaturalización, son analizados en un gel de poliacrilamida. Los fragmentos de DNA son de igual tamaño pero diferente secuencia y se separan debido a su diferente conformación estructural durante la migración en una electroforésis en gel de poliacrilamida (Lee *et al.*, 1996). En este caso se visualizan dos bandas por cada organismo diferente y no una banda como en el DGGE y el TGGE. Las desventajas del SSCP básicamente son las mismas que las encontradas en el DGGE y el TGGE y además los perfiles electroforéticos son mucho más complejos (más bandas) y de difícil interpretación.

1.1.6.2.5 Polimorfismo de longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP)

Es una técnica molecular desarrollada recientemente para el análisis rápido y sensible de la diversidad de comunidades microbianas. En ella se utilizan los productos de PCR de genes rRNA, en los que se ha marcado con un agente químico fluorescente uno de los 2 cebadores. Posteriormente, el producto de PCR es digerido mediante enzimas de restricción generándose una serie de fragmentos, uno de los dos fragmentos terminales está marcado fluorescentemente, pudiendo ser detectado y cuantificado en un secuenciador automático de DNA (Liu *et al.*, 1997).

Esta técnica tiene como ventaja su rapidez y sensibilidad, al poder detectar y cuantificar fragmentos con tan sólo una base de diferencia, y además es repetitiva al utilizar un secuenciador automático de DNA. Como inconvenientes encontramos los que están asociados a las técnicas moleculares (extracción de DNA, limitaciones de la PCR) y

además necesita de una librería de clones simultánea para poder asignar los fragmentos terminales a ciertos clones y de esta forma poder secuenciar los clones enteros para tener más fiabilidad en su asignación a un grupo filogenético determinado.

1.1.6.2.6 Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH)

La hibridación in situ con oligonucleótidos marcados fluorescentemente se desarrolló a finales de la década de los 80 (DeLonge *et al.*, 1989). Esta técnica se ha utilizado con éxito para analizar muchas comunidades microbianas en diferentes ambientes (Amann *et al.*, 1995). Metodológicamente la técnica implica una fijación de las muestras que incrementa la permeabilidad y mantiene la integridad morfológica. Las células se fijan en un portaobjetos y se hibrida las moléculas de rRNA de las células sondas específicas marcada con agentes químicos fluorescentes. Finalmente las células se visualizan en un microscopio de epifluorescencia pudiéndose comparar cuantitativamente la población total analizada con DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) con la población específica que hibrida con la sonda utilizada (Hicks *et al.*, 1992).

Entre las limitaciones más importantes de esta técnica encontramos la necesidad de optimizar las condiciones de hibridación (variando la temperatura o concentraciones de formamida en la solución de hibridación) para evitar la aparición de falsos positivos. Otras limitaciones importantes son que es muy difícil asegurar que la permeabilidad celular para la sonda sea total y que se necesita normalizar la señal de fluorescencia emitida para cuantificar correctamente los resultados.

1.1.6.2.7 Limitaciones más importantes de las técnicas moleculares para el estudio de la diversidad de comunidades microbianas.

Aunque el conocimiento de la diversidad microbiana ha mejorado muy significativamente sobre la base de la utilización reciente de técnicas no dependientes de cultivo, todavía existen importantes limitaciones intrínsecas de estas metodologías que es conveniente tener en cuenta (tabla 2.6).

Fundamentalmente se encuentran limitaciones en la extracción de ácidos nucleicos de muestras ambientales, en alteraciones y artefactos asociados a la amplificación

enzimática de los ácidos nucleicos, en el clonaje de productos de PCR y en la sensibilidad y accesibilidad de las zonas diana en las técnicas de hibridación celular (tabla 2.6)

1.1.6.2.7.1 Extracción de ácidos nucleicos

La principal limitación reside en la extractabilidad de los ácidos nucleicos procedentes de muestras ambientales. Se conoce bien que las esporas son más difíciles de lisar que las células vegetativas, de igual manera que las células gram-positivas son más difíciles de lisar que las gram-negativas. Sin embargo, los numerosos estudios publicados acerca de las metodologías de extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras naturales, no abordan el problema de la eficiencia de extracción (Fuhrman *et al.*, 1988; Holben *et al.*, 1988; Tsai y Olson, 1991; Bruce *et al.*, 1992). En realidad una técnica en particular puede dar resultados diferentes con distintos tipos de muestra (agua, sedimento y suelo) y se debería determinar la extractabilidad de ácidos nucleicos en cada caso. Existen estudios que demuestran que para tener una extracción más eficiente (con un 96% de lisis celular y lisado de endosporas bacterianas) se debe recurrir a tratamientos físicos y químicos simultáneos, como son la congelación y descongelación conjuntamente con el uso de detergentes y enzimas líticos, o la rotura celular por agitación violenta con microesferas de cristal (*bead-beating*) conjuntamente con un tampón de lisis celular con detergentes (Moré *et al.*, 1994). Sin embargo, también se ha detectado que las células más pequeñas (0,3-1,2 μm) son más resistentes a la lisis, lo que es un problema añadido debido a que las células quiescentes generalmente están en este rango de tamaños, y por lo tanto la extracción de sus ácidos nucleicos podría no ser del todo eficiente (Amman *et al.*, 1995).

1.1.6.2.7.2 PCR

Existen varias limitaciones intrínsecas al proceso de PCR que pueden condicionar la interpretación final de los resultados de diversidad de una comunidad microbiana.

- 1) A elevadas condiciones de astringencia se puede producir la amplificación selectiva de ciertas moléculas aunque se utilicen cebadores universales para genes de rRNA.
- 2) El número de copias de los genes rRNA en diferentes microorganismos puede oscilar de 1 a 14 (Young y Cole, 1993; Cole y Girons, 1994) lo que

condiciona la interpretación cuantitativa de librerías de clones y procesos electroforéticos como el DGGE, TGGE, SSCP y T-RFLP.

- 3) Se puede producir una amplificación preferente de las secuencias más abundantes y pobres en %G+C debido a fenómenos de inhibición competitiva de las secuencias menos frecuentes (Ward *et al.*, 1990) y a una mala separación de las cadenas de DNA de las secuencias ricas en % G+C durante el paso de desnaturalización (Reysenbach *et al.*, 1992).
- 4) También se ha observado que la utilización de cebadores que tienen una alta eficiencia de amplificación pueden homogeneizar las proporciones iniciales (diferentes) del DNA molde (Suzuki y Giovannoni, 1996).
- 5) La fidelidad de la Taq polimerasa es diferente según el tipo de proveedor y se ha observado que la tasa de error (por incorporación errónea de nucleótidos) oscila en un rango de 0,0002-1,3 %, y por lo tanto si no se analiza la estructura secundaria del gen resultante existe el peligro que se pueda inferir la existencia de un nuevo taxón que sea resultado de la baja fidelidad de la polimerasa (Head *et al.*, 1998).
- 6) Se pueden generar secuencias quiméricas debido a fusiones entre fragmentos con distintas secuencias durante el proceso de amplificación (Liesack *et al.*, 1991). En realidad, se ha observado que hasta un 30% de los productos de PCR podrían ser quiméricos durante la coamplificación de moldes similares (Wang y Wang, 1996). Es por este motivo que existen programas informáticos *online* como el *Check Chimera* ubicado en el portal de “*Ribosomal Data Project*” (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) (Maidak *et al.*, 2000) para la identificación de posibles quimeras, aunque a veces es difícil decidir si realmente una secuencia es quimérica o no, sobretodo si las 2 secuencias a partir de las cuales puede estar formada la putativa quimera tienen una similitud superior al 85% (Kopczynski *et al.*, 1994).

Tabla 2.6. Ventajas y limitaciones de los métodos independientes de cultivo.

	Ventajas	Inconvenientes
Fosfolípidos de ácidos grasos (PLFA)	Cambios en el perfil de lípidos pueden indicar cambios en la estructura de la comunidad	No se obtienen aislamientos para estudios posteriores
FISH (hibridación <i>in situ</i> por microscopia de fluorescencia)	Visualización espacial de microorganismos específicos de interés. No hay alteraciones debidas al medio de cultivo.	No se detectan necesariamente microorganismos activos. Técnica laboriosa. No se obtienen aislados para estudios posteriores.
Marcaje de microorganismos activos (epifluorescencia, DAPI)	Enumeración de organismos vivos. No existe alteración debido al medio de cultivo.	No diferencia microorganismos con actividad catabólica de interés. No se obtienen aislados para estudios posteriores.
PCR y electroforesis (DGGE, TGGE, T-RFLP)	Se puede identificar microorganismos por secuenciación de bandas resueltas. No hay alteración del medio de cultivo.	Extracción diferencial de DNA y RNA en diferentes microorganismos. No da información de la actividad. No se obtienen aislados para estudios posteriores.
PCR y clonaje (ARDRA)	Identificación de microorganismos por secuenciación de clones recombinantes. No hay alteración del medio de cultivo.	Extracción diferencial de DNA y RNA en diferentes microorganismos. No da información de la actividad. No se obtienen aislados para estudios posteriores. Técnica laboriosa
Sondas de genes de interés metabólico	Detección de genes con funciones de interés. La detección de mRNA puede revelar información acerca de la expresión.	Limitado a genes conocidos. La actividad no se puede inferir únicamente a partir de la presencia de los genes.
Expresión de promotores (“ <i>reporter-gene</i> ”)	Expresión génica detectada. Se puede hacer un seguimiento del tratamiento en la función celular.	Se necesita conocer la naturaleza del promotor. Aplicable cuando se conoce el genoma completo. Solamente se estudian cepas con el gen reportero.

2 OBJETIVOS

Los consorcios microbianos obtenidos en el laboratorio a partir de procesos de enriquecimiento secuenciales de muestras naturales son sistemas cerrados con unas condiciones ambientales selectivas, controladas y repetitivas. En estos cultivos mixtos los microorganismos con una tasa de crecimiento mayor en las condiciones selectivas en las que se cultiva el enriquecimiento, pueden llegar a ser dominantes, reduciendo así la diversidad del sistema (Torsvik *et al.*, 2003). La presión selectiva es muy fuerte y esto implica, tal y como se ha descrito anteriormente (Greene *et al.*, 2000), que los enriquecimientos con condiciones idénticas (fuente de carbono y energía y medio mineral) producen el desarrollo de comunidades microbianas similares, independientemente del origen del inóculo. Por lo tanto un cultivo de enriquecimiento representa un modelo sencillo, con condiciones más homogéneas que una muestra ambiental, y puede proporcionar una mayor información acerca de la complementariedad de diferentes metodologías necesarias para examinar la composición de una comunidad microbiana, que una muestra ambiental, que presenta una mayor complejidad. En este sentido los objetivos planteados en este capítulo han sido:

- I. Caracterizar taxonómicamente los componentes microbianos de un consorcio (AM) especializado en la degradación de HAPs, mediante la combinación de métodos dependientes de cultivo (aislamiento en placa) e independientes de cultivo (microscopia, librería de genes 16S rRNA de la comunidad microbiana y DGGE).
- II. Determinar la contribución relativa de cada método a la diversidad microbiana encontrada.
- III. Estudiar la capacidad biodegradadora de HAPs de los microorganismos aislados.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estudiaron los componentes del consorcio microbiano AM, degradador de HAPs, mediante la utilización de técnicas dependientes de cultivo (número más probable, y aislamiento en diferentes medios) y técnicas independientes de cultivo (librería 16S rRNA y 18S rRNA y DGGE de 16S rRNA). Se realizó el estudio comparativo a los 15 días de incubación del consorcio, en el momento de su subcultivo. Se compararon las secuencias obtenidas de los genes que codifican para el 16S rRNA y 18S rRNA en los distintos enfoques utilizados, para detectar el mayor número de representantes microbianos del consorcio AM y analizar el aporte de cada método en la diversidad final. Además, el consorcio AM fue estudiado a lo largo de los 15 días de incubación mediante DGGE y NMP. A partir de las cepas microbianas aisladas se estudiaron sus capacidades biodegradadoras frente a la mezcla de 5 HAPs utilizados para la obtención del consorcio.

3.2 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los HAPs y reactivos utilizados para la extracción de ácidos nucleicos se han obtenido de las casas comerciales Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania) y Fluka Chemie AG, BioRad y Merck. Los disolventes fueron de la casa Baker. El medio mineral Bushnell Hass Broth (BHB) se obtuvo de Difco. El agar Sabouraud, extracto de levadura, triptona, caldo de triptona (TSB) y agar purificado se obtuvieron de Scharlab Chemie. La agarosa se obtuvo de Pronadisa, y la acrilamida y bisacrilamida de Biorad. Los reactivos y disolventes utilizados fueron de la máxima pureza disponible.

Todos los medios y soluciones se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera extra de presión durante 15 minutos; o por filtración por membranas de 0,22µm de diámetro de poro. La composición de los medios de cultivo utilizados en este capítulo se detallan a continuación (composición especificada por 1000 ml de agua desionizada o bidesionizada).

1:10 LB BHB agar: 0,5 g de peptona, 1 g NaCl, 0,25 g glucosa, 3,27 g BHB (ver composición del BHB en el apartado 3.3, capítulo I) y 15 agar

Agar mineral BHB: 15 g de agar purificado y 3,27 g de BHB

Agar fenantreno: 15 g de agar purificado, 3,27 g de BHB, 10g de fenantreno (1% p/v). Se partía de un *stock* de 1g ml⁻¹ fenantreno en acetona, a partir del cual se añadía el volumen pertinente en el agar autoclavado y moderadamente enfriado justo antes del plaqueo.

Tampón de extracción de ácidos nucleicos: 100mM Tris HCl pH 8; 100mM EDTA(Titriplex®III) (Merck); 100mM Tampón fosfato sódico pH 8; 10µl Proteínasa K (Merck) (*stock* de 10 mg ml⁻¹ agua bidesionizada estéril); 18µl Lisozima (Merck) (*stock* 100 mg ml⁻¹ agua bidesionizada estéril).

Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB): 10% (p/v) de CTAB (Sigma-Aldrich) en 0,7M de NaCl. Se solubiliza calentando a 65°C.

TE: 10mM de tampón Tris a pH 8 y 1 mM de EDTA (Titriplex®III) (Merck), pH 8,0

TBE 10X: Tris base (Pharmacia), 0,9M; ácido bórico (Sigma), 0,9% (p/v); EDTA (Titriplex®III) (Merck) 0,02 M, pH 8,0.

TAE 50X: Tris base, 242 g; 57,1 ml ácido acético glacial (Panreac), 100 ml EDTA 0,5 M (Titriplex®III) (Merck), pH 8,0. TAE 1X: 40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1mM EDTA, pH 7,4.

TNE 10X: 12,1 g Tris Base, 3,7g EDTA(Titriplex®III) (Merck), 58,4g NaCl, ajustar a pH 7,4 con HCl 6N. TNE 1X: Tris 10mM, Na Cl 0,1M, EDTA 1mM, pH 7,4

Tampón de carga 5x para geles de agarosa: Azul de bromofenol (Bio Rad) 0,25%; xilencianol (Bio Rad) 0,25%; Glicerol (Panreac) 60%.

Tampón de carga 5x para geles de DGGE (GLB 5X): 20 ml de GLB 5X contienen: 2,5 g Ficoll (Sigma), 0,5 ml Tris-HCl 1M, pH 8; 0,2 ml EDTA (Titriplex®III) (Merck), 5M; 0,5 ml SDS (Sigma) 20% (p/v); 0,25 ml Azul de bromofenol (Bio

Rad) 8% (p/v); 0,25 ml de xilencianol (BioRad) 8% (p/v). Agua bidesionizada estéril necesaria hasta el volumen final de 20 ml.

3.3 CONSORCIO MICROBIANO AM

El consorcio microbiano AM es un consorcio no definido, degradador de HAPs, obtenido por el Dr. J. Sabaté (1998) a partir de muestras de suelo arenoso contaminadas con crudo de petróleo, donde mediante cultivos líquidos de enriquecimiento en medio mineral (BHB) con una mezcla de cinco HAPs (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) como única fuente de carbono y energía, subcultivado cada 15 días, se ha seleccionado una población microbiana que mantiene la capacidad degradadora de los 5 HAPs (ver apartado 3.5.3, capítulo I). Además tal y como se menciona en los apartados 4.2 y 4.3 del capítulo I, este consorcio es capaz de degradar diferentes familias de hidrocarburos de un crudo de petróleo pertenecientes a la fracción saturada y la aromática (Viñas *et al.*, 2002; Abalos *et al.*, 2004). Este hecho, y teniendo en cuenta que el consorcio AM degrada eficientemente HAPs de 3 y 4 anillos aromáticos, le confiere a este una gran potencialidad para su aplicación en situaciones reales de biorremediación (bioaumentación).

3.4 SEGUIMIENTO DE LA POBLACIÓN HETERÓTROFA Y DEGRADADORA DE HAPS

La enumeración de la población microbiana se realizó a los 0, 3, 6, 10 y 15 días de incubación del consorcio, el cual se subcultiva cada 15 días, utilizando la técnica del número más probable (NMP) en placas de microtitulación (Wrenn y Venosa, 1996) tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.6.2.2 del capítulo I.

3.5 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DEL CONSORCIO AM.

Se analizó el consorcio AM mediante diversas técnicas de microscopía, para confirmar la presencia de estructuras o morfologías que complementaran la información acerca de los componentes del consorcio. Se llevaron a cabo técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de rastreo (SEM) y microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM), y microscopía de fuerzas atómicas (AFM) fueron realizados en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona y en colaboración con la Dra. M. J. Prieto.

3.5.1 Microscopía óptica

Para visualizar muestras del consorcio AM se prepararon las mismas llevando a cabo tanto tinciones gram, como con tinciones con azul de metileno, a lo largo de todo el periodo de incubación del consorcio.

3.5.2 Microscopía electrónica de transmisión

3.5.2.1 Estudio ultraestructural de cortes celulares

Las células fueron fijadas con paraformaldehído (2%) y glutaraldehído (2,5%) en tampón fosfato (0,1M, pH 7,4) a 4°C. Se realizó una postfijación con tetraóxido de osmio (1%) y FeCNK (0,8%) en tampón fosfato durante 2 horas a 4°C. Tras varios lavados en agua desionizada, la muestra se englobó en agar (2,5%) mediante el método de la burbuja. Posteriormente la muestra se deshidrató en un gradiente creciente de acetona, hasta alcanzar acetona al 100%. Finalmente, la muestra se infiltró con resina Spurr y se polimerizó durante 48h a 60°C (Spurr, 1969).

Los cortes ultrafinos de 80-90 nm fueron obtenidos con una cuchilla de diamante (Diatome) en un ultramicrotomo Ultracut FC4E (Reichert-Jung), se recogieron en rejillas de cobre y fueron contrastados con acetato de uranilo acuoso (2%) y citrato de plomo según Reynolds (1963). La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-600AB a 75 kV de aceleración.

3.5.2.2 Tinción negativa

Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1M (pH 7,4), y a continuación, se lavaron en el mismo tampón y se realizó la tinción negativa. Para ello, se depositó la muestra encima de una rejilla de cobre que contenía una membrana de formvar, y tras la eliminación del exceso de muestra, se dejó secar la muestra. Finalmente,

se tiñó la preparación con ácido fosfotúngstico (1%, pH 7,39) durante un minuto. La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-600AB a 75 kV de aceleración.

3.5.3 Microscopia electrónica de barrido

Las células fueron fijadas de la misma manera que en el apartado anterior. Una vez fijada la muestra, se depositó una gota de la suspensión fijada (ya lavada en agua) encima de un cubreobjetos circular de vidrio, pretratado con poli-l-lisina, para que la muestra quedase adherida al cristal. La gota se dejó encima del cubreobjetos durante 20 minutos y a continuación, se deshidrató con alcohol y se secó mediante el método del punto crítico. Posteriormente las muestras fueron recubiertas con una fina capa de oro mediante un sistema de pulverización catódico (Jeol JFC-1100). La observación se realizó en un microscopio Hitachi S-2300.

3.5.4 Microscopia de fuerzas atómicas (AFM)

Se centrifugaron 10 ml del consorcio AM a 12.000g y se fijaron las células resuspendiéndolas en 10 ml de tampón BMTM (ver composición en apartado 3.3 del capítulo I) que contenía un 2% de glutaraldehído (p/v). Se incubó el conjunto durante 16 horas a 4°C y a continuación se centrifugaron nuevamente las células a 8000g y se resuspendieron con 10 ml de BMTM sin glutaraldehído. Posteriormente se depositaron 20 µl de la resuspensión en una superficie de mica verde recién exfoliada (Ashville-Schoonmaker Mica Co.) y se secó en un desecador a temperatura ambiente. Una vez seca la preparación, no se lavó la mica con agua bidesionizada, y se observó la preparación directamente en un equipo de AFM Nanoscope III Multimode (Digital Instrumentals Inc.) funcionando en “tapping mode” (TMAFM). El fundamento de la técnica de AFM, así como las condiciones de trabajo en “tapping mode” se describen en los apartados 3.4.6.4.1 y 3.4.6.4.2 del capítulo IV.

3.6 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES

3.6.1 Aislamiento de heterótrofos

Para aislar los microorganismos heterótrofos existentes a los 15 días de incubación del consorcio, se sembraron diluciones seriadas en agar 1:10 LB, el cual se caracteriza por ser un agar mineral (BHB) y con la fuente de carbono y energía (LB) empobrecida al estar diluida 10 veces. Para aislar hongos se utilizó el agar Sabouraud y también el agar 1:10 LB BHB.

3.6.2 Aislamiento de degradadores de HAPs

Se utilizaron diferentes medios de cultivo para aislar las cepas degradadoras de HAPs. Todas las cepas puras aisladas a partir de los distintos métodos citados a continuación, con morfología y/o crecimiento distinto, se estudiaron a nivel de la secuencia del gen que codifica para el 16S rRNA (bacterias) y del 18S rRNA (hongos).

3.6.2.1 Agar mineral esprayado con hidrocarburo.

Para el aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos no volátiles como el antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno, se sembró el consorcio por estría en escocés sobre medio mineral sólido (agar BHB), y posteriormente se esprayó encima, en placas separadas, cada uno de los 5 HAPs disueltos en soluciones de acetona saturada de HAP. La acetona, rápidamente se evaporaba, y quedaba una capa blanquecina opaca perteneciente a los cristales de los HAPs. En estas placas se pueden observar dos efectos: un cambio de color y/o la aparición de zonas no opacas (halos) alrededor de la colonia. El primer caso indica microorganismos capaces de producir una transformación del HAP, mientras que en el segundo, indica una presuntiva degradación aunque también podría significar la producción de algún tipo de emulsionante (Kiyohara *et al.*, 1982).

3.6.2.2 Agar mineral con hidrocarburo en fase vapor

En el caso particular del fluoreno, se añadió en fase de vapor añadiéndose cristales de fluoreno en las tapas de placas de petri invertidas conteniendo agar mineral BHB.

3.6.2.3 Agar fenantreno

Se sembraron por extensión y en estría, las diluciones máximas que daban positivo en las placas de NMP de degradadores de HAPs. Para ello se utilizó el agar fenantreno al 0,1% (p/v).

3.7 CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE HAPs DE LAS CEPAS CULTIVABLES

3.7.1 Ensayos realizados y condiciones de incubación

Para estudiar las capacidades biodegradadoras de las cepas bacterianas y fúngicas aisladas, se llevó a cabo un ensayo de biodegradación con la mezcla de 5 HAPs (fenantreno, antraceno, fluoreno, fluoranteno y pireno) propia del consorcio AM. Para ello, cada una de las diferentes cepas aisladas en BHB LB 1:10, se incubó, por duplicado, en Erlenmeyers de 100 ml de capacidad nominal conteniendo 20 ml de medio mineral BHB y la mezcla de los 5 HAPs (cada HAP a una concentración de 0,02% (p/v)) suplementada con extracto de levadura ($0,5 \text{ g l}^{-1}$). Se inocularon 100 μl de resuspensión de las cepas en BHB, a una turbidez equivalente de 0,9 unidades de absorbancia a 600 nm. Se utilizaron controles abióticos sin inóculo, y controles positivos con el consorcio AM. Los cultivos se incubaron en agitación horizontal a 200 rpm, a 25°C y en oscuridad durante 15 días.

3.7.2 Análisis químico del proceso de biodegradación

La cuantificación de la biodegradación existente en la mezcla de fenantreno, antraceno, fluoreno, fluoranteno y pireno fue llevada a cabo a los 15 días de incubación mediante cromatografía de gases a con detector de ionización de llama (GC-FID). Para ello se hizo una extracción líquido-líquido neutra, y seriada (5 series) con 10 ml de diclorometano utilizándose el ortoterfenil (Sigma) como estándar interno surrogate a una concentración final de $250 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los extractos se secaron en embudos conteniendo Na_2SO_4 anhidro y posteriormente se combinaron y se concentraron en un rotavapor (Büchi) y corriente de N_2 hasta un volumen final de 1 ml.

Antes de analizar el extracto orgánico por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID), se hizo un lavado (*clean-up*) del extracto en columnas de alúmina según la metodología descrita en el apartado 3.7.2.2 del capítulo I.

Una vez obtenido el extracto limpio, se separaron los HAPs por GC-FID en un cromatógrafo Trace 2000 (Thermoquest) con una columna capilar DB-5 (J&W), con una longitud de 25 metros y 0,32 mm de diámetro interno y un espesor de fase de 0,25 μm . El detector y el inyector se programaron a una temperatura constante de 310°C y 280°C respectivamente. El programa térmico se describe a continuación: Temperatura inicial de 50°C durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 4°C minuto^{-1} hasta una temperatura final de 310°C mantenida durante 10 minutos. El gas portador fue helio de máxima pureza con un flujo constante de 1.1 ml min^{-1} y el volumen de inyección fue de 1 μl en modalidad *splitless* durante 30 segundos. Se determinaron las concentraciones finales de HAPs a partir de curvas de calibración previamente calculadas para cada uno de los 5 HAPs a analizar mediante el software integrado Crom-Card 32 (Thermoquest). Los porcentajes de biodegradación se calcularon con relación a los controles abióticos para corregir las posibles pérdidas abióticas tales como la evaporación.

3.8 AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.8.1 Método por congelación rápida y choque térmico

Los ácidos nucleicos totales se aislaron a partir de cultivos de 15 días de incubación del consorcio AM y de cultivos de 16 horas en LB de las cepas microbianas objeto de estudio. Para ello se utilizó el método de lisis con dodecil sulfato sódico (SDS), liozima, proteinasa K, y tratamiento con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y tres ciclos de congelación rápida en en nitrógeno líquido y descongelación por choque térmico a 65°C (Wilson, 1987).

Se centrifugaron 50 ml de cultivo (del consorcio AM) o 10 ml de cultivo en LB O/N de las cepas puras a estudiar, a 12000g. durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante con cuidado de no resuspender el *pellet*. Se limpió, dos veces el *pellet* con 1,5 ml de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 8, y se centrifugó la resuspensión en las condiciones anteriores, pero en una centrifuga de sobremesa. Una vez limpiado el *pellet* se

resuspendió con 1,2 ml de tampón de extracción. Se incubó la resuspensión con el tampón de extracción durante 1 hora a 37°C y a 200 rpm de agitación horizontal. A continuación se repartió en 2 Eppendorfs (600 µl por Eppendorf) y se añadió a cada uno de ellos 150 µl SDS 10%, 225 µl NaCl 5M, 75 µl CTAB 10% y se agitó el conjunto por inversión. A continuación, se incubó la mezcla en un baño a 65°C durante 15 minutos. En total se realizaron 3 ciclos de congelación rápida en nitrógeno líquido (congelado inmediato en 30 segundos) y choque térmico a 65 °C durante 15 minutos. Para ello se ataron los Eppendorfs con hilo de nylon para recuperarlos del nitrógeno líquido una vez estuvieran congelados. Finalmente se homogenizaba el contenido pasándolo 3-4 veces por una jeringuilla clínica de 2 ml con aguja incorporada.

Para la limpiar de proteínas el extracto lisado resultante, se repartió el contenido en 2 Eppendorfs y se añadió 1 volumen de cloroformo por Eppendorf, a continuación se mezcló por inversión 3-4 veces y se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos, recuperándose el sobrenadante en un Eppendorf estéril. Posteriormente se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción volumétrica 25:24:1, se mezcló 3-4 veces por inversión y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos, recuperándose el sobrenadante. Posteriormente se añadió, al sobrenadante anterior, 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción volumétrica 24:1, y se mezcló 3-4 veces por inversión, se centrifugó a 12000 g. durante 5 minutos, y se recuperó nuevamente el sobrenadante. Finalmente se precipitaron los ácidos nucleicos totales (DNA + RNA) añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol y 0,3 volúmenes acetato amónico 10M a pH 7, mezclando 3-4 veces por inversión y centrifugando la mezcla a 12000g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante por pipeta y se resuspendió el *pellet* con 500 µl de etanol al 70% (v/v), con un ligero pulso de agitación (de 0,5 segundos) y una centrifugación posterior a 12000g durante 15 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante con cuidado de no resuspender el *pellet* y se secaron las trazas de etanol por centrifugación en condiciones de vacío en una Speed-Vac (Millipore) durante 10 minutos, o por convección cerca de la llama. El DNA total se resuspendió en 50 µl de agua bidesionizada estéril y se comprobó su pureza y cantidad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) a 90 V y TBE 0,5X. durante 70 minutos, utilizando como marcador “Low DNA Mass Ladder” (Gibco). Generalmente se utilizó 1 µl del extracto final como DNA molde para las PCR de los genes que codifican para el 16S rRNA y 18S rRNA.

3.8.2 Método por calor: extractos celulares hervidos

Para la obtención de DNA molde a partir de las cepas microbianas aisladas, en primer lugar se utilizó una estrategia basada en la lisis por calor de extractos celulares. Para ello se obtuvo un cultivo de toda la noche en 5 ml LB, procedente de la resuspensión de los cultivos puros aislados en placa, se centrifugó a 12.000g. durante 5 minutos y se resuspendió el *pellet* con 500 μ l de TE. Posteriormente, se mezclaron 10 μ l de la resuspensión del *pellet* con 40 μ l de agua bidesionizada estéril que se hirvieron durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó el extracto a 12000g. durante 5 minutos y se utilizaron 1-2 μ l del sobrenadante como DNA molde para la PCR. Para los casos en que la amplificación por PCR del gen que codifica para el 16S rRNA o 18S rRNA no tuviera éxito, se utilizó el método de Wilson.

3.9 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL DNA

Las muestras de DNA se analizaron en geles de agarosa LE (Pronadisa, España) a concentraciones entre 0,7% y 1,3% (p/v) en tampón TBE 0,5X, y agarosa Nusieve a una concentración del 3% (p/v). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales (Genotek), utilizando una fuente de alimentación Power-Pac 300 (Bio Rad). Antes de aplicar las muestras, se les añadió tampón de carga a 1X final. La separación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo a 90-100V en tampón TBE 0,5X.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron durante 15 minutos en una disolución de bromuro de etidio (Sigma) a una concentración final de 0,75 μ g ml⁻¹ en agua bidestilada. Los fragmentos de DNA se observaron mediante transiluminación de los geles con luz ultravioleta en un ImageMaster® (Pharmacia Biotech).

Para la estimación del tamaño de los fragmentos de DNA separados por electroforesis, se utilizó de forma habitual el DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción *Hind*III (Promega), que genera fragmentos cuyos tamaños oscilan entre 23 y 0,5 kilobases. Para el análisis de fragmentos de DNA de menor tamaño se utilizó como marcador el DNA del fago ϕ X174 digerido con la enzima de restricción *Hae*III (Promega). Los tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos de esta forma oscilan entre

1,35 y 0, 072 kilobases. Para cuantificar el DNA existente se utilizó el marcador “low DNA mass ladder” (Gibco)

3.10 AMPLIFICACIÓN DE GENES 16S rRNA Y 18S rRNA MEDIANTE PCR

Todas las PCRs fueron llevadas a cabo en 50 µl de volumen de reacción conteniendo 1,25 unidades de AmpliTaq Gold polimerasa (Perkin-Elmer, Alemania), 10 mM Tris HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, cada deoxinucleosido trifosfato a una concentración de 200 µM, 0,5 µM de cada cebador y 1 µl de DNA molde. (aproximadamente 800 ng de DNA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Para construir una librería de clones recombinantes con insertos que contenían casi la totalidad del gen que codifica para el 16S rRNA de la comunidad microbiana, así como también para amplificar el mismo gen en las cepas cultivadas, se utilizaron los cebadores F27 y R1488 (Edwards *et al.*, 1989; Lane, 1991) (tabla 2.2) utilizándose el programa I de PCR (tabla 2.3).

Con la finalidad de obtener una región amplificada del gen que codifica para el 16S rRNA que fuera de interés para su análisis posterior mediante electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE), se amplificó una región que comprendía tres regiones hipervariables (V3-V5) del gen que codifica para el 16S rRNA, utilizándose los primers F341-GC y R907 (tabla 2.7) (Dejonghe *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 1989; Yu y Morrison, 2004). Para ello se utilizó el programa II de PCR (tabla 2.8)

Para amplificar una región variable del gen que codifica para el 18S rRNA se utilizaron los cebadores EF4 y EF5 (van Elsas *et al.*, 2000), a partir de muestras de DNA total del consorcio AM y a partir del DNA extraído de cepas fúngicas cultivadas. El producto de PCR resultante se utilizó para construir una librería de clones recombinantes con rDNA que codifica para el gen del 18S rRNA. En este caso se utilizó el programa III de PCR (tabla 2.8).

Tabla 2.7. Características de los cebadores utilizados. Las posiciones ambiguas son: M=A,C; R=A,G;

Cebador	Posición en E.coli	Secuencia 5'--3'	Nº bases	Tª hibrid	Progr. PCR
16F341-GC ^a	341-357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	17	55	I/II/IV/V
16R907	907-926	CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT	20	55	I/II/IV/V
16F27	8-27	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	20	55	I/IV
16R1488	1511-1488	CGG TTA CCT TGT TAC GAC TTC ACC	24	55	I/IV
16F357	338-357	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	20	55	I/IV
16F945	927-945	GGG CCC GCA CAA GCG GTG G	19	55	I/IV
16R518	518-537	CGT ATT ACC GCG GCT GCT GG	20	55	I/IV
EF4		GGA AGG GRT GTA TTT ATT AG	20	48	III/IV
EF5		GTA AAA GTC CTG GTT CCC	18	48	III/IV
SP6		ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA	20	50	I
T7		TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20	50	I

^aGC: secuencia de 40 bases rica en GC unida al extremo 5' del cebador. Secuencia: 5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G -3' .

Tabla 2.8. Condiciones de los programas de PCR utilizados.

Programa	<i>Touch Down</i> ^a	Desnat. inicial ^b	Tª desnat. ^c	Tª hibrid ^c	Tª polim ^c	Nº Ciclos	Tª ext ^c	Tª final
I. Librería y cepas bacterianas	no	95°C	94°C	55°/50°C ^d	72°C	30	72°C	4°C
		9 min.	1 min	1 min	1.5 min		10 min	
II. DGGE	si	95°C	94°C	55°C	72°C	20	72°C	4°C
		9 min.	1 min	1 min	1.5 min		10 min	
III. 18S rDNA	no	95°C	94°C	48°C	72°C	40	72°C	4°C
		9 min.	1 min	2 min	2 min		10 min	
IV. Secuenciación Big Dye 2.0	no	-	96°C	48/55°C	60°C	25	-	4°C
			30 s.	15 s	4 min			
V. Secuenciación Big Dye 3.1	no	96°C	96°C	55°C	60	25	-	4°C
		1 min	10 s.	5 s	4 min			

^a El método de *Touch down* PCR consistió en la disminución de 1°C/ciclo de la Tª de hibridación durante los 10 primeros ciclos de PCR , empezando con una Tª de hibridación inicial de 65°C y terminando en 55°C como temperatura óptima, a partir de la cual se sometía la reacción a 20 ciclos extras de PCR a 55 °C de Tª de hibridación. ^b La Tª de activación era necesaria para activar el proenzima Taq Gold polimerasa (inactivo) en enzima activo. ^c Tª desnat., Tª de desnaturalización ; Tª hibrid, Tª de hibridación; Tª polim., Tª de polimerización; Tª ext., Tª extensión. ^d Temperatura de hibridación de 50°C con los cebadores SP6 y T7 y 55°C con los cebadores F27 y R1488.

3.11 ANÁLISIS DE DGGE

El DGGE es una técnica electroforética en geles de poliacrilamida que permite separar moléculas diferentes de DNA, de hasta 700 pb, según su secuencia y no solamente según el tamaño molecular, pudiéndose separar moléculas con tan sólo una base de diferencia en condiciones de gradiente de concentración optimizado de formamida-urea (Muyzer *et al.*, 1993). La separación de las moléculas de DNA se consigue porque durante su migración por el gel de poliacrilamida, el DNA, se encuentra con concentraciones crecientes de los agentes desnaturizantes formamida y urea, lo que genera diferentes horquillas de desnaturización, según la secuencia de las moléculas de DNA, traducándose en una reducción de la velocidad de migración y una separación en diferentes bandas de migración electroforética. Una vez las moléculas quedan separadas en el gel, es posible recortarlas y estudiar su secuencia, con el fin de asociar la banda a un determinado grupo filogenético.

Se analizaron por DGGE productos de PCR de PCR de 628 pb de longitud (588pb + 40 pb de la cola de GC), procedentes del DNA total del consorcio AM y de las cepas degradadoras de HAPs, correspondientes a las regiones hipervariables V3, V4 y V5 del gen que codifica para el 16S rRNA. Para la obtención de 16S rDNA del consorcio y de las cepas degradadoras de HAPs, se utilizaron el par de cebadores F341-GC y R907 (tabla 2.7) y el programa II de PCR (tabla 2.8).

Se cargaron unos 800 ng de producto de PCR resultante de la amplificación del gen que codifica para el 16S rRNA procedente del DNA total del consorcio AM a los 3, 6 y 15 días de incubación y 100 ng de producto de PCR de las cepas degradadoras de HAPs. Los productos de PCR, se purificaron previamente con el kit Microcon PCR (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificaron con el marcador “Low DNA Mass Ladder” (Gibco BRL). El análisis por DGGE se hizo en un gradiente químico desnaturizante óptimo de formamida y urea del 40-60%, a 60°C y 100 V durante 16 horas, en un equipo DGGE-2001 (CBS Scientific Company).

3.11.1 Preparación de geles desnaturalizantes.

Se analizaron los productos de PCR en geles de poliacrilamida al 6% (p/v), de 0,75 mm de grosor y con un gradiente desnaturalizante de formamida-urea optimizado a un rango de concentraciones crecientes en el sentido de migración electroforética, que oscilaban entre el 40% (parte superior del gel) al 60% (parte inferior del gel). Para la optimización del gradiente, previamente se analizaron las muestras en un gradiente desnaturalizante de formamida-urea del 20-80%, estableciéndose el gradiente 40-60% como el óptimo para una buena separación de las bandas. El 100% de formamida-urea esta definido en una concentración de urea (Fluka) de 7M y una de formamida (Fluka) desionizadas del 40% (p/v).

Para ello fue necesario disponer de 2 stocks al 6% (p/v) de acrilamida con 1X TAE, uno de los cuales con un 0% de contenido desnaturalizante y el otro con un 80% de contenido desnaturalizante. Para desionizar la formamida fue necesario mezclar 100 ml de formamida (Fluka) con 5 g de resina de intercambio iónico AG 501-XB (Biorad) durante 1 hora en agitación con una muesca magnética y posteriormente filtrar, por vacío, con un filtro de fibra de vidrio (Schaefer). La formamida desionizada se conservó a -20°C hasta su utilización. La composición de los stocks de acrilamida al 6% con un 80% o 0% de agentes desnaturalizantes puede verse en la tabla 2.9.

Tabla 2.9. Composición de las soluciones *stock* de acrilamida al 6% necesarias para preparar los geles desnaturalizantes.

Stock 0%: solución 6% acrilamida con 0% agentes desnaturalizante^a

20 ml acrilamida (30% Acrilamida/Bis; 37.5/1 (Biorad))

5 ml 20X TAE

75 ml agua bidesionizada estéril

Stock 80%: solución 6% acrilamida con un 80% de agentes desnaturalizantes^a

20 ml acrilamida (30% Acrilamida/Bis; 37.5/1 (Biorad))

5 ml 20X TAE

33.6 g urea (7M final)

32 ml formamida desionizada (40% p/v final)

agua bidesionizada estéril hasta un volumen final de 100 ml

^a El 100 % de agente desnaturalizante representa acrilamida al 6% p/v en TAE x1 con un 7M de urea y un 40% (p/v) de formamida desionizada. Un 0% de agente desnaturalizante representa acrilamida al 6% (p/v) en TAE x1 sin urea ni formamida. Las soluciones *stock* se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Una vez preparadas las soluciones *stock* de acrilamida al 6% se procedió a la construcción del gel de poliacrilamida y del gradiente desnaturalizante en el soporte vertical del equipo DGGE-2001 (CBS Scientific Company), mediante el empleo de una bomba peristáltica (Amersham Pharmacia Biotech) y una cubeta generadora de gradientes lineales (CBS Scientific company), tal y como se puede observar en la figura 2.2. Para ello fue necesario disponer de 2 tubos: un tubo A que contiene la concentración menor de formamida-urea que se requiere en el gel final y un tubo B que contiene la concentración mayor de formamida-urea que se requiere para la construcción del gradiente. En la tabla 2.10 se especifican los reactivos necesarios para la obtención del tubo A y el tubo B con distintas concentraciones posibles de formamida-urea. La combinación del tubo A y el tubo B en una cubeta generadora de gradientes de concentración lineal, acoplado a una bomba peristáltica de salida, permite la carga de la acrilamida con el gradiente deseado de formamida-urea en los cristales del soporte vertical (fig. 2.3)



Fig. 2.3. Preparación de un gel de DGGE.

Para la construcción del gel con concentraciones desnaturalizantes de formamida-urea del 40% al 60% (40% de concentración de formamida-urea en la parte superior del gel y un 60 % de formamida-urea en la parte inferior del gel), se prepararon 2 tubos: un tubo A conteniendo acrilamida 6% con un 40% de formamida-urea (la concentración menor requerida de formamida-urea) y un tubo B conteniendo acrilamida 6% con un 80% de

formamida-urea (la concentración mayor requerida de formamida-urea del gel). En el tubo A se añadieron 4,4 ml de *stock* 80%, 4,4 ml de *stock* 0% y 8 µl de TEMED y 45 µl de APS como agentes polimerizantes. mientras que para el tubo B, conteniendo acrilamida 6% con un 60% de formamida-urea, se utilizaron 6,6 ml de *stock* 80%, 2,2 ml de *stock* 0% y 8 µl de TEMED y 45 µl de APS como agentes polimerizantes (tabla 2.10). Los dos tubos se agitaron por inversión, con la precaución de evitar formación de espuma y se conservaron en hielo para retrasar la polimerización rápida. Se introdujo el contenido del tubo B (mayor concentración) en el compartimiento más próximo al punto de salida de la cubeta generadora de gradientes, mientras que el contenido del tubo A (menor concentración) se introdujo en el otro compartimiento. Se utilizaron 100 µl de GLB 5X, como colorante, en el tubo B para comprobar la correcta formación del gradiente entre los cristales del soporte sólido del equipo electroforético.

Tabla 2.10. Proporciones necesarias de reactivos en la cubeta formadora de gradiente (se eligen 2 concentraciones finales según el gradiente a preparar).

Reactivos	Concentración de un compartimiento en el formador de gradientes							
	80 %	70 %	60%	50%	40%	30%	20%	0%
Stock 80%	8,8 ml	7,7 ml	6,6 ml	5,5 ml	4,4 ml	3,3 ml	2,2 ml	0 ml
Stock 0%	0 ml	1,1 ml	2,2 ml	3,3 ml	4,4 ml	5,5 ml	6,6 ml	8 ml
TEMED ^a	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	7,2 µl
APS ^b	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl	41 µl

^aTEMED: trimetil-etilendiamonio (BioRad). Se conserva a 4°C

^bAPS: Persulfato de amonio (BioRad). Se prepara al 10% (p/v) en agua Milli-Q estéril y se conservan alicuotas independientes de un solo uso a -20°C.

El gradiente se formó, mediante agitación con muesca magnética del compartimiento del tubo B, permitiendo la comunicación, tipo vasos comunicantes, entre los 2 compartimientos de la cubeta generadora de gradiente, y además simultáneamente, la bomba peristáltica transportaba el contenido final hacia los soportes verticales de cristal para formar el gel desnaturalizante (fig. 2.2). Se enrasó el volumen restante de gel con 8 ml adicionales de acrilamida 6% con un 0% de formamida-urea (tabla 2.5). Se dejó polimerizar el gel durante 2 horas en posición vertical, estático a temperatura de laboratorio (25°C).

3.11.2 Tinción y visualización de geles de DGGE

Para la tinción de geles de poliacrilamida de DGGE se utilizó SybrGold (Molecular Probes). Para ello se mezclaron 4 μ l de SybrGold (10.000x) en 20 ml de TNE 1x, se extendió la mezcla sobre el gel de DGGE y se incubó durante 45 minutos a temperatura de laboratorio en oscuridad. Posteriormente se lavó el gel en 500 ml TAE 1x y finalmente en agua destilada. El gel se visualizó por transiluminación en UV y se fotografió en un equipo Image Master (Amersham Pharmacia Biotech). La fotografía resultante se digitalizó en un scanner Snapscann e25 (Agfa) a 1200 dpi de resolución y la imagen digitalizada se analizó mediante el software Quantity one 4.1 (BioRad).

3.11.3 Escisión y análisis de bandas de DGGE

Se recortaron las bandas de DGGE más predominantes para su posterior estudio. Para ello se utilizó un gel paralelo de DGGE que no se iluminó directamente con luz UV, para evitar lesionar el DNA a analizar. Para ello se iluminó el gel con luz azul resultante de la fluorescencia emitida por una placa convertidora (*Light-converter*, UV products) que emite fluorescencia azul a partir de radiación UV, y por lo tanto no lesiona el DNA. Para la visualización de las bandas de DGGE se utilizaron gafas protectoras con filtro específico para eliminar el exceso de fluorescencia de la placa y así ver la fluorescencia emitida por SybrGold en condiciones de luz azul. Las bandas se recortaron con un bisturí estéril lavado en agua bidesionizada estéril y en etanol 70% previo a cada corte, y se incubaron 16 horas a 4°C en 50 μ l de agua bidesionizada estéril. Posteriormente se utilizaron alicuotas de 2 μ l del sobrenadante, como DNA molde, para una reamplificación por PCR con los cebadores F341-GC y R907 (tabla 2.7) y el programa II de PCR (tabla 2.8), se verificó por DGGE su migración correcta en el gel y se secuenciaron con los mismos cebadores F341 (sin la cola de GC a 5') y R907. En caso de que la secuencia resultante no resultase fiable se clonaba el producto de reamplificación de la banda en el vector pGEM-T easy (Promega), transformando células competentes de *Escherichia coli* DH5a como cepa huésped, tal y como se especifica en apartado 3.12 de este capítulo, y finalmente, se secuenciaban los clones recombinantes de interés.

3.12 OBTENCIÓN DE LIBRERÍAS DE CLONES DE GENES 16S I 18S rRNA

3.12.1 Ligación de productos de PCR

Para la ligación de los productos de PCR de los genes de 16S rRNA o 18S rRNA procedentes del DNA total del consorcio AM a los 15 días de incubación, se utilizó el vector pGEM-T easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se purificaron los productos de PCR resultantes de la PCR mediante el kit Microcon PCR (Millipore) y las reacciones de ligación se llevaron a cabo en 10 μ l finales conteniendo 2 μ l del extracto purificado (relación molar vector e inserto de 1:3), 5 μ l del tampón de ligación específico para la DNA ligasa del bacteriófago T4, 50 ng del vector pGEM-T easy (Promega), y 3 unidades Weiss de DNA ligasa del bacteriofago T4 (Promega). La reacción de ligación se llevó a 10 μ l finales con agua bidesionizada estéril y se incubó durante 16 horas a 15°C. Para detener la reacción de ligación se incubaron las muestras a 65° C durante 10 minutos.

3.12.2 Obtención de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α

Se inocularon 400 μ l de un cultivo O/N de *E. coli* DH α 5 en LB a 37°C, a un Erlenmeyer de 100 ml de capacidad nominal conteniendo 20 ml de LB fresco. A continuación se llevó el cultivo hasta la fase exponencial con una A_{600nm} de 0,6-0,7. En este punto, se repartieron las células en 2 tubos conteniendo 10 ml, y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron las células a 3500 rpm en una centrífuga de sobremesa durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron los “*pellets*” resultantes con 5 ml de cloruro cálcico (CaCl₂) 50 mM, frío (4°C), manteniéndose estáticos durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron en las condiciones anteriormente citadas, y se resuspendieron los *pellets* con 660 μ l de CaCl₂ frío (4°C) a 50mM, manteniéndose durante 1 hora en hielo. A partir de este momento ya se podían transformar las células, aunque se comprobó un incremento en la eficiencia de transformación una vez congelados a -20°C con un 15% (vol/vol) de glicerol.

3.12.3 Transformación de células competentes

Para la transformación se añadieron 2 μl de la reacción de ligación (vector con o sin inserto), a 100 μl de células tratadas con CaCl_2 , y se sometieron a un choque térmico de 2 minutos a 42°C en un baño, seguido de una incubación de 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadió 1 ml de LB fresco y se incubó durante 1 hora a 37°C y 200 rpm de agitación horizontal para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico codificados por el vector. Finalmente se detectó la presencia de clones recombinantes, sembrando 400 μl por extensión en placa detectando la aparición de colonias blancas en placas de LB agar con ampicilina (Sigma), IPTG (Merck) y X-Gal (Merck) a unas concentraciones finales de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente, tras una incubación de 16 horas a 37°C. Las colonias azules corresponden a clones que contienen el vector, el cual les confiere resistencia a la ampicilina, pero sin el inserto, y por lo tanto contienen el gen *lacZ* activo, capaz de transformar el sustrato X-Gal en un producto de coloración azul. Por el contrario, las colonias blancas se corresponden a los clones recombinantes de interés, ya que contienen el vector (les confiere resistencia a la ampicilina) y el inserto por ser incapaces de transformar el sustrato X-Gal debido a la inserción del fragmento de DNA en medio del gen *lac Z*.

3.12.4 Detección de clones recombinantes diferentes mediante restricción enzimática

3.12.4.1 Amplificación del inserto

Se amplificó el inserto de los clones recombinantes (blancos) por PCR a partir de extractos celulares hervidos de los clones recombinantes (apartado 3.8.2), utilizando los cebadores SP6 y T7, que hibridan específicamente con las regiones del vector pGEM-T easy (Promega) colindantes a la zona del inserto. De esta forma se evitó la amplificación del el gen del 16S rRNA propio de la célula huésped (*E. coli* DH5 α). Se utilizó el programa I de PCR (tabla 2.8) con una temperatura de hibridación de 50°C. Posteriormente se analizaron los productos de PCR de unos 1600 pb cuando el inserto era 16S rDNA (librería de clones con genes de 16S rRNA) y 600 pb (aproximadamente) cuando el inserto era 18S rDNA (librería de clones con genes de 18S rRNA) o 16S rDNA procedente de una banda de DGGE..

3.12.4.2 Análisis por digestión enzimática de los clones recombinantes

La digestión del DNA con enzimas de restricción se realizó siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial (Roche) y utilizando el tampón correspondiente suministrado con la enzima.

Se comparó el perfil de los fragmentos de restricción resultantes por restricción enzimática de los clones recombinantes de las librerías de 16S y 18S rDNA. Para ello se analizaron 50 clones de la librería de 16S rDNA y 35 clones de la librería de 18S rDNA. Se utilizaron los enzimas de restricción TaqI (4h a 65°C) y Alu I (2h a 37°C). Los resultados se analizaron mediante electroforesis en agarosa NuSieve (Biowhittaker Molecular Applications) a una concentración del 3% (p/v), y se agruparon los clones según su patrón de restricción. Se secuenciaron los clones recombinantes representantes de los diferentes perfiles de restricción (apartado 3.13).

3.13 SECUENCIACIÓN

Las secuencias de nucleótidos de ambas cadenas se determinaron por el método de Sanger *et al.* (1977), basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos (ddNTPs) mediante PCR. Para la secuenciación se utilizó la pre-mezcla de reacción ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 2.0” (Applied Biosystems), que contiene una Taq polimerasa termoestable, los dideoxinucleótidos marcados y el tampón adecuado. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems) siguiendo el programa IV de PCR (tabla 2.8), con una temperatura de hibridación específica según el cebador utilizado (tabla 2.7).

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para las reacciones de secuenciación correspondieron a los mismos cebadores citados para la amplificación de los genes que codifican para el 16S rRNA y 18S rRNA (tabla 2.7). Para secuenciar el inserto de los clones recombinantes de interés, primero se reamplificaron los insertos con los cebadores SP6 y T7 y, posteriormente, este producto de PCR se secuenció con los cebadores universales (Lane, 1991) necesarios para la secuenciación del gen que codifica para el 16S rRNA (F27, F357, F945, R518, R907 y R1488) o para el 18S rRNA (EF4 y

EF5). La composición de la mezcla de reacción de PCR utilizado para la secuenciación, se detalla en la tabla 2.11.

Tabla 2.11. Composición de la mezcla de reacción para la secuenciación.

Mezcla de reacción
4 µl Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye 2.0)
1-2 µl de DNA molde (0,2 µg ml ⁻¹)
3,2 pmoles de cebador
Agua bidestilada hasta 10 µl

Antes de analizar la reacción de secuenciación en el secuenciador se eliminaron los ddNTP mediante una precipitación de la reacción de secuenciación. Para ello, a un Eppendorff de 1,5 ml se le añadieron los 10 µl de la reacción de secuenciación con 10 µl adicionales de agua bidesionizada esteril. Posteriormente se añadieron 64 µl de etanol 95% y 16 µl de agua bidesionizada estéril, y se dejó precipitar durante 15 minutos a temperatura de laboratorio. A continuación se centrifugó la mezcla a 13000g durante 20 minutos y se eliminó la solución de etanol (sobrenadante). Entonces, se añadieron 200 µl de etanol 70% al *pellet* resultante y se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. Finalmente se eliminó al máximo la solución de etanol (sobrenadante) y se secó el *pellet* al aire o por centrifugación con vacío en un Speed-Vac (Millipore).

Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona, en un secuenciador automático de electroforesis capilar ABI Prism DNA 3700 (Perkin- Elmer).

3.14 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA

Las secuencias fueron estudiadas y ensambladas utilizando el software BioEdit (Hall, 1999). Se verificó la posible presencia de secuencias quiméricas utilizando el programa Check Chimera ubicado en el portal de Ribosomal Data Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)(Maidak *et al.*, 2000).

El análisis de la homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas se llevó a cabo *online* mediante BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Altschul *et al.*, 1997).

Las secuencias finales, se alinearon y se compararon con secuencias obtenidas del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa Clustalw versión 1.8.2.

La divergencia entre las diferentes secuencias obtenidas a partir de los distintos enfoques analíticos, se comparó en una región de 550 pb, que engloba los dominios hipervariables (V3-V5) del gel del 16S rRNA. El árbol filogenético se construyó a partir de una matriz de distancias aplicando el algoritmo de Jukes Cantor (Jukes y Cantor, 1969). La matriz de distancias fue analizada mediante el método de neighbor joining (NJ) con un *bootstrap* de 1000 repeticiones, mediante el programa MEGA versión 2.1. (Arizona State University, Tempe).

3.14.1 Secuencias estudiadas.

Se han obtenido 25 secuencias diferentes en este estudio que se han depositado en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con los números de acceso AY635878-AY635902. Los números de acceso de las secuencias indexadas en el Genbank se indican en las tablas y figuras de este capítulo, así como en el árbol filogenético.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE MICROSCOPIA DEL CONSORCIO AM

Se llevaron a cabo observaciones del consorcio AM por microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerzas atómicas (AFM). Las observaciones llevadas a cabo por microscopía óptica y microscopía electrónica pueden verse en las figuras 2.3 y 2.4 respectivamente.

Por microscopía óptica (fig. 2.4) se observó la presencia de bacterias y hongos según morfología, tamaño y tinción. Concretamente la mayor parte de bacterias eran gram-negativas (fig. 2.3, a). Estos datos están en concordancia con los resultados de microscopía electrónica de transmisión, tanto en los cortes (fig. 2.5d), como en las tinciones negativas (fig. 2.5 g), donde se ven superficies celulares rugosas.

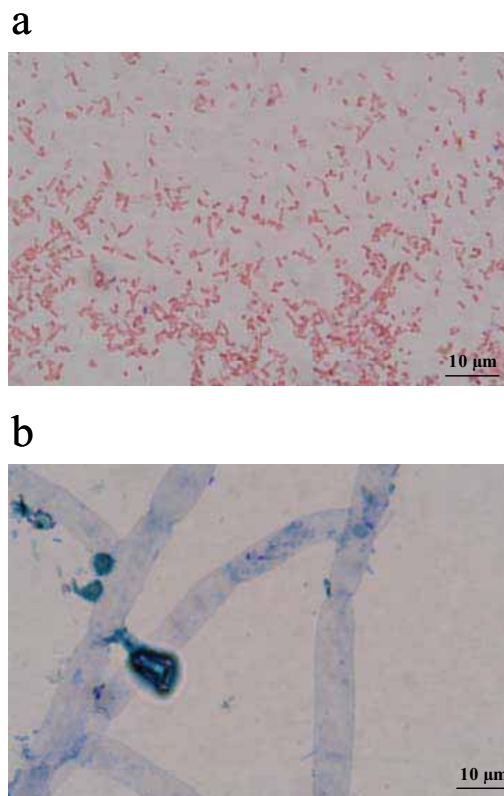
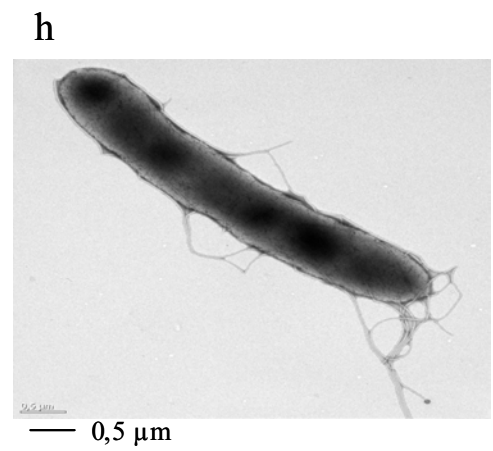
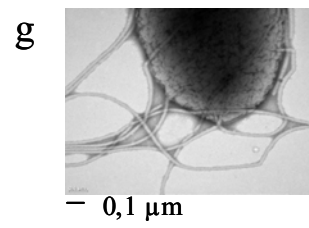
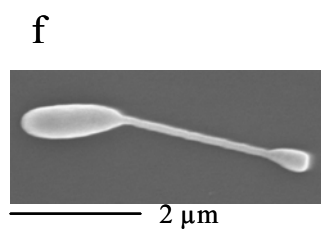
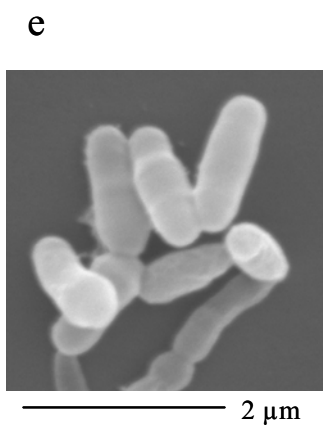
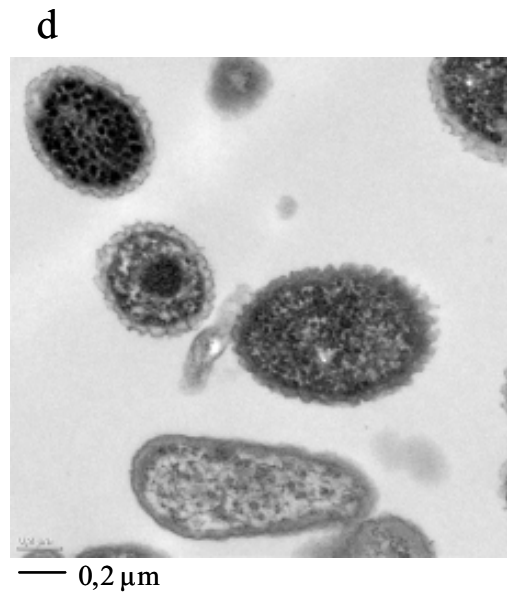
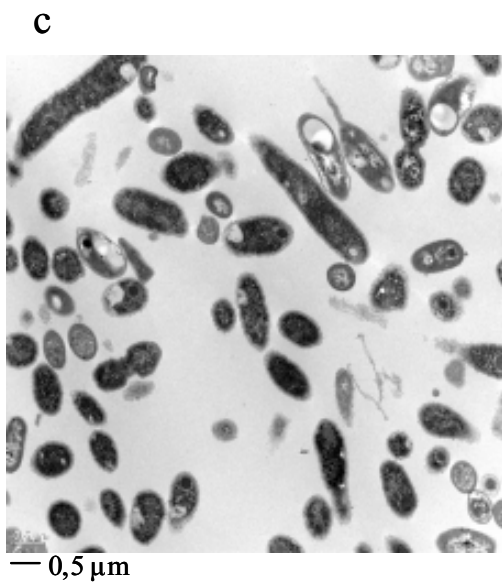
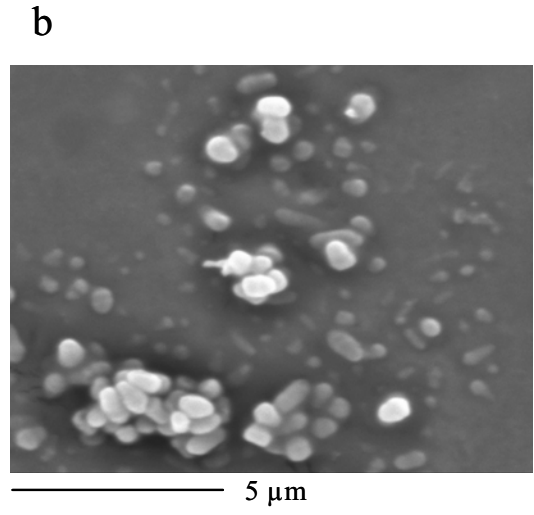
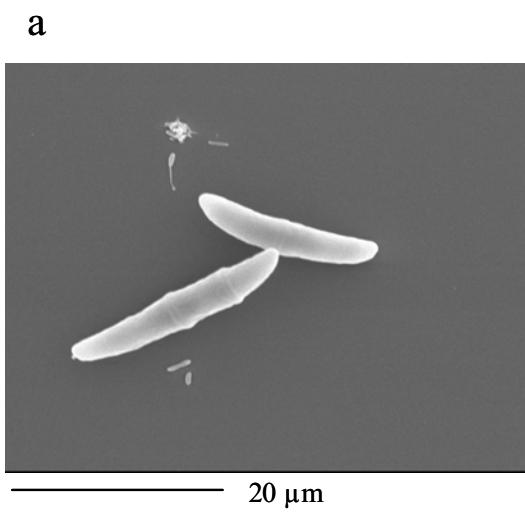


Fig. 2.4. Microscopía óptica del consorcio AM. a) tinción gram y b) detalle de hifas fúngicas en azul de metileno.



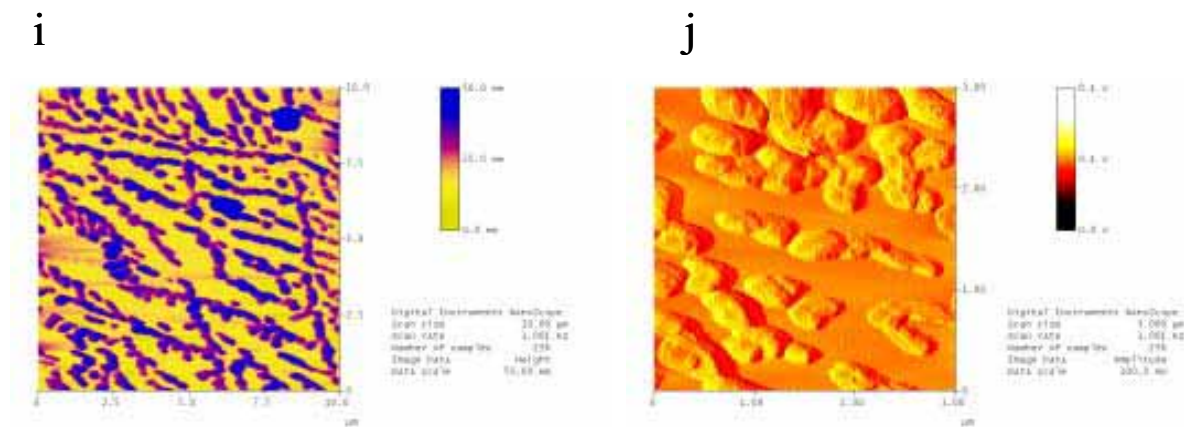


Fig. 2.5. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido (fotografías a,b, e y f) de microscopía electrónica de transmisión (en las fotografías c y d se muestran cortes y en las fotografías g y h se muestran tinciones negativas) y de AFM (fotografías i y j) del consorcio AM a los 15 días de incubación.

Por microscopía electrónica se observó que existían morfologías microbianas muy diversas (fig. 2.5 a, e-h) con un tamaño que oscilaba entre 0,5 µm y 20 µm de longitud y diámetros oscilando entre 0,5 µm y 5µm (fig. 2.5 a y c). Se observaron morfologías cocobacilares y bacilares (fig. 2.5 fotografías a, b, e y h) y una morfología muy característica propia del grupo de la familia de las Hyphomicrobiaceas (fig. 2.5 f) definida por la presencia de una prosteca y una gemma terminal en las fases finales de su ciclo de división celular (fig. 2.5 f). Como puede verse por tinción negativa en observaciones por TEM (fig. 2.5 g y h) los bacilos, a su vez presentaban flagelación. Además, en las preparaciones de los cortes del consorcio AM visualizados por TEM se constató la presencia de inclusiones densas (negras en TEM) (fig. 2.5 c y d) probablemente debido a una gran absorción del osmio utilizado en el proceso de postfijación (apartado 3.5.1). Esta característica indica una posible naturaleza lipofílica (lipídica) de las inclusiones que ya se han descrito anteriormente en bacterias degradadoras de HAPs como *Mycobacterium* sp. AP1 (Sabaté, 1998).

Mediante microscopía de fuerzas atómicas en modo “tapping” (TMAFM) se observó una mayoría de estructuras bacilares de 0,75-1µm de longitud (fig. 2.5 i-j). La adsorción y extensión de las células en la mica, como se describe en la metodología provoca una cierta deformación en la estructura celular como puede verse en la fig. 2.5 j, lo que hace más compleja su interpretación. Sin embargo, una vez se obtiene una correcta adsorción en la superficie de la mica, la técnica de AFM permite ver todo el conjunto de

microorganismos presentes en una muestra, y además permite estudiar con gran detalle las características de las superficies celulares, como por ejemplo los cambios de la membrana externa en bacterias gram negativas de respecto a los cambios ambientales (Norman *et al.*, 2005).

Se observó una estructura de gran tamaño (20 μm de longitud y 5 μm de diámetro) propia de células eucariotas. Esta gran estructura en forma de coma mostraba un tabique de ubicación descentrada (fig. 2.5 a) también fue detectada mediante microscopia óptica con tinción azul de metileno, tanto en el consorcio AM, como en el hongo aislado en agar BHB LB1:10 (fig. 2.4 b). Esta cepa de hongo podría pertenecer al género *Fusarium*, según interpretaciones llevadas a cabo por Esther Gaya del Departamento de Botánica de la Universidad de Barcelona, basadas en los datos morfológicos de la ascospora visualizada por SEM y microscopia óptica, como también por su crecimiento filamentosos y blanquecino en medio sólido. En realidad tal y como se explicará más adelante, los resultados de la secuenciación del gen que codifica para el 18S rRNA de cepas puras cultivadas de este hongo confirmaron que pertenecía al grupo de los Ascomycota con una elevada similitud con los géneros *Fusarium* y *Penicillium*.

4.2 EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN HETERÓTROFA Y DEGRADADORA DE HAPs

Se determinó la población heterótrofa y degradadora de HAPs periódicamente mediante NMP miniaturizado a lo largo del tiempo de incubación (0, 3, 6, 9 y 15 días). Como se puede observar en la figura 2.5, las dos poblaciones (heterótrofa y degradadora de HAPs) aumentaron su población hasta 2 órdenes de magnitud aproximadamente, durante la incubación, pero de forma diferente (fig. 2.6).

La población microbiana heterótrofa mostró un incremento importante al tercer día de incubación, mientras que la población degradadora de HAPs no alcanzó su máximo hasta los 6 días de cultivo ($1,15 \times 10^8$ NMP ml^{-1}). Asimismo, la proporción de degradadores de HAPs respecto a la población heterótrofa total varió durante el tiempo de incubación, siendo alrededor del 10% al principio y al final de la incubación, mientras que el máximo se alcanzó a los 6 días de incubación con un 50% de población degradadora de HAPs. Como puede observarse en la figura 2.6 (a), estos datos son consistentes con la

cinética de biodegradación de los HAPs, donde se observan las tasas de degradación más elevadas entre los 4 y 6 días de incubación.

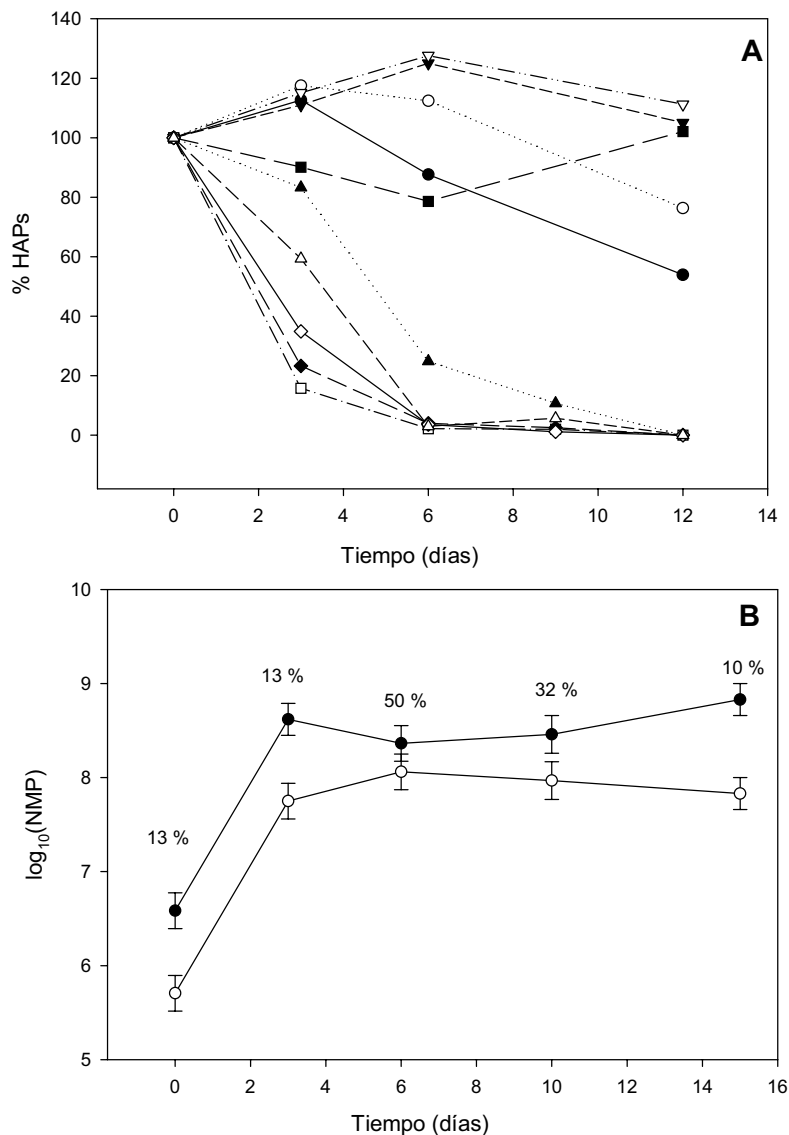


Fig. 2.6. A). Cinética de degradación de una mezcla de 5 HAPs por el consorcio AM durante 15 días de incubación. Los símbolos en blanco y negro representan los cultivos y los controles abióticos respectivamente. Las concentraciones finales (%) de fluoreno (●), fenantreno (■), antraceno (▲), fluoranteno (▼) y pireno (◆) fueron determinadas mediante análisis por HPLC de los extractos orgánicos según Sabaté (1998). **B)** Evolución de la población heterótrofa y degradadora de HAPs (NMP) durante el periodo de incubación de 15 días. Los porcentajes (%) dentro del gráfico indican la proporción de degradadores de HAPs.

4.3 AISLAMIENTO Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS AISLADAS

Con la finalidad de aislar el mayor número de cepas presuntivamente diferentes, se diseñaron diferentes estrategias de aislamiento, a los 15 días de incubación del consorcio AM, para aislar cepas heterótrofas degradadoras de materia orgánica en general y cepas heterótrofas degradadoras de HAPs. Se sembró por extensión en placa, un banco de diluciones del consorcio AM en placas con agar BHB LB 1:10.

4.3.1 Aislamiento de cepas heterótrofas

A partir de placas de agar BHB LB1:10 se aislaron inicialmente 20 cepas bacterianas y un hongo filamentoso, en base a su morfología colonial y velocidad de crecimiento. Todas las cepas bacterianas fueron gram negativas. Se detectaron 10 secuencias distintas para el gen que codifica el 16S rRNA, con lo que finalmente se determinó la existencia de 10 cepas bacterianas distintas (AMS1-AMS10) y una cepa fúngica (AMF1) (tabla 2.12). Se aisló el mismo hongo tanto en en agar BHB LB1:10 como en agar Sabouraud (verificado por secuenciación del gen que codifica para el 18S rRNA). Ninguna de las cepas aisladas en LB 1:10, excepto la cepa AMS7, fue capaz de generar halos o transformación del color del medio en placas con agar mineral y HAPs.

En total se aislaron 10 cepas bacterianas distintas (AMS1-AMS10) y una cepa fúngica (AMF1).

4.3.2 Aislamiento de cepas degradadoras de HAPs

Para aislar cepas degradadoras de hidrocarburos se sembró el consorcio AM en placas de agar mineral (BHB) con cada uno de los 5 HAPs (fluoreno (en cristales), antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno (esprayados)). Igualmente, a partir de la dilución mayor con resultados positivos en las placas de NMP para los degradadores de HAPs, se sembraron placas de agar mineral con fenantreno (disuelto en el agar).

Tal y como puede observarse en la figura 2.7, se pudo detectar la formación de halos de presunta degradación en placas de agar mineral con fenantreno, antraceno,

fluoranteno y pireno, así como la aparición de coloración amarillo-pardo en el crecimiento en agar mineral con fluoreno, tras 3-4 semanas de incubación a 25 °C y en la oscuridad.

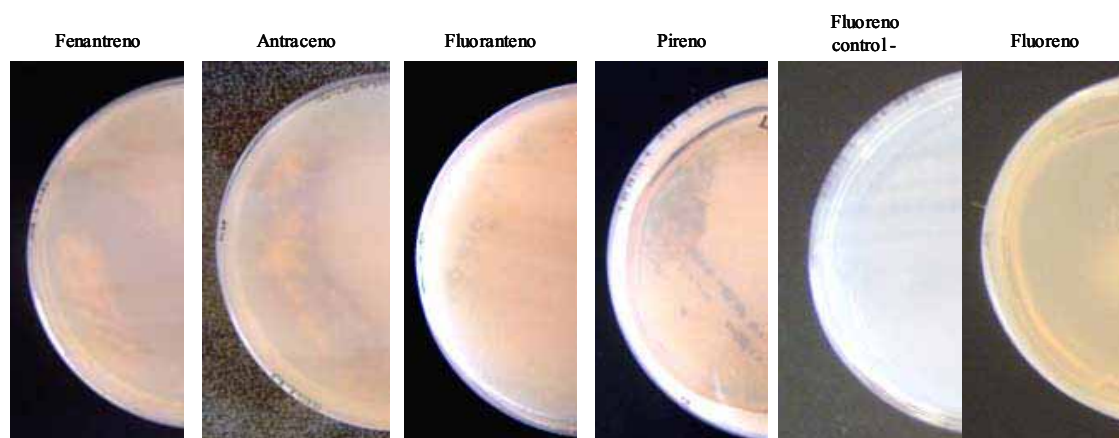


Fig. 2.7. Crecimiento del consorcio AM en agar mineral (BHB) con HAPs.

El aislamiento y purificación de cepas degradadoras de HAPs a partir de las resiembras de microorganismos presentes en los halos de degradación, en agar BHB LB 1:10 no fue posible. Los cultivos puros obtenidos no generaban halos de degradación en las placas con HAPs, probablemente debido a la presencia de asociaciones muy complejas entre los diferentes microorganismos presentes en los halos de degradación iniciales

Por lo tanto, para aislar verdaderos degradadores de HAPs se desarrolló un nuevo método, que consistió en cultivar en agar mineral (BHB) con fenantreno disuelto (0,1% (p/v)), las diluciones positivas más elevadas de las placas de microtitulación (NMP) utilizadas para la determinación de la población degradadora de HAPs. Se eligió el fenantreno, debido a que se trata del HAP más degradable de la mezcla. Sorprendentemente, solamente se encontró un tipo de morfología colonial de crecimiento muy lento. A los 7-14 días de incubación, se observaron colonias lisas blanquinosas grisáceas de 1 mm de diámetro. Se purificaron 5 colonias al azar (todas de la misma morfología) de las placas de agar fenantreno sembrándolas en agar BHB LB 1:10, y todas ellas mantuvieron la capacidad de generar halos de presunta degradación en placas esprayadas con fenantreno. Las 5 cepas mostraron la misma secuencia del gen 16S rRNA, la cual también fue idéntica a la cepa AMS7 aislada a partir del consorcio AM directamente en BHB LB1:10. La secuencia 16S rRNA de la cepa AMS7 era un 98,5%

similar a *Sphingomonas* sp cepa S3 (AB040739), una cepa degradadora de nonilfenol aislada en aguas residuales de una planta de tratamiento (Fujii, 2001) (tabla 2.12).

4.3.3 Secuencias de genes 16S rRNA y 18S rRNA de las cepas aisladas

Como puede observarse en la tabla 2.12 se obtuvieron 10 secuencias distintas de 16S rRNA y una de 18S rRNA a partir de cepas microbianas aisladas en BHB LB 1:10. Todas las secuencias mostraron una gran similitud (97.8%-100%) con secuencias disponibles en las bases de datos Genbank y RDP.

Tabla 2.12. Similitud de las secuencias obtenidas de las cepas aisladas del consorcio AM.

	Long. (pb)	Sim. (%) ^a	Secuencia de mayor similitud (n° acceso de EMBL/Genbank)	Grupo taxonómico ^b
AMS1 (AY635892) ^d	1006	99.7	<i>Pseudomonas</i> sp. P400Y-1 (AB076857)	<i>Pseudomonas</i> y relativos
AMS2 (AY635893)	977	99.2	<i>Flavobacteriaceae</i> str. 2 (AB024308)	<i>Cytophaga</i> grupo I
AMS3 (AY635894)	1042	100	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 19833 (AJ300772)	<i>Xanthomonas</i>
AMS4 (AY635895)	795	99.6	<i>Ochrobactrum</i> sp. LMG 20570 (AY040351)	<i>Rhizobium-Agrobacterium</i>
		99.6	<i>Ochrobactrum</i> sp. 4FB13 (AF229879)	
AMS5 (AY635896)	1012	97.9	<i>Labrys monachus</i> (AJ535707)	<i>Rhizobium-Agrobacterium</i>
AMS6 (AY635897)	1025	97.8	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (AF273082)	<i>Xanthomonas</i>
		97.8	γ -Proteobacteria incultivable (AJ619053)	
AMS7 (AY635898)	1373	98.5	<i>Sphingomonas</i> sp. S-3 (AB040739)	<i>Sphingomonas</i>
AMS8 (AY635899)	729	100	β -Proteobacteria PI_GH1.1.B4 (AY162039)	<i>Bordetella</i>
		100	Clon bacteriano WIB-B04 (AY345517)	
AMS9 (AY635900)	637	99.8	<i>Ochrobactrum</i> sp. mp-6 (AF526521)	<i>Rhizobium-Agrobacterium</i>
AMS10 (AY635901)	916	98.5	<i>Alcaligenes defragrans</i> TJ4 (AF508102)	<i>Bordetella</i>
		98.5	<i>Alcaligenes defragrans</i> N1 (AF508100)	
AMF1 (AY635902)	536	100	Ascomiceto no cultivado (AB074659)	<i>Ascomycota</i> (Eukarya)
		99.4	<i>Fusarium culmorum</i> UPSC 1981, <i>Penicillium</i> sp. CMW8605, <i>Neocosmospora vasinfecta</i> (AF548073, AF434694, NV32414)	

^a Similitud entre secuencias (%) comparadas con las disponibles en las bases de datos EMBL y Genbank.^b

Los grupos taxonómicos están definidos en el Ribosomal database Project. ^c Los números de acceso de las secuencias al Genbank y EMBL se indican entre paréntesis.

En resumen, cuatro de las cepas aisladas pertenecieron al subgrupo de las α -Proteobacterias (géneros *Sphingomonas*, *Labrys* y *Ochrobactrum*), dos a las β -Proteobacterias (géneros *Alcaligenes* y *Achromobacter*) y tres a las γ -Proteobacterias

(géneros *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas* y *Pseudomonas*), y una al grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) (familia Flavobacteriaceae). La cepa fúngica perteneció al grupo Ascomycota (género *Fusarium* o *Penicillium*).

4.4 CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADADORA DE HAPS DE LAS CEPAS AISLADAS

Se evaluó la capacidad degradadora de HAPs de cada una de las cepas microbianas aisladas (AMS1-AMS10 y AMF1). En primer lugar se estudió su capacidad degradadora por medio de la aparición o no de halos en placas esprayadas con HAPs (apartado 4.3.2). Para verificar la capacidad biodegradadora de HAPs de las cepas aisladas se llevaron a cabo unos experimentos de biodegradación de HAPs en medio mineral líquido (BHB) con la mezcla de 5 HAPs a la misma concentración final que en el consorcio AM, y en las mismas condiciones de incubación descritas para el consorcio AM.

Como puede verse en la tabla 2.13 la cepa AMS7 fue la cepa que mostró la mejor capacidad degradadora de HAPs, y además, desarrolló halos evidentes de presunta degradación en placas de agar mineral esprayadas con fenantreno y antraceno, mientras que también generó pigmentación marrón en placas de agar mineral con fluoreno, fluoranteno y pireno. No obstante, el comportamiento de la cepa AMS7 en agar mineral y HAPs no es del todo coincidente con el consorcio AM, ya que este último era capaz de desarrollar halos de presunta degradación con los 5 HAPs (fig. 2.7). La cepa fúngica AMF1 creció en placas con agar mineral y HAPs pero no fue capaz de generar halos.

Los ensayos de biodegradación de HAPs en medio líquido mostraron que solamente las cepas bacteriana AMS7 y la cepa fúngica AMF1 pudieron degradar los 5 HAPs de forma evidente (tabla 2.13) aunque no en la misma magnitud que el consorcio AM, el cual degradó la totalidad de los HAPs. Sin embargo, es destacable la degradación producida por AMS7 a nivel del fluoreno, fenantreno y antraceno (98-99%) y la degradación significativa de fluoranteno y pireno (63% y 25 % de biodegradación respectivamente). Las cepas AMS1 y AMS6 únicamente degradaron una proporción insignificante de fluoreno, mientras que las cepas AMS2, AMS3 y AMS4 degradaron ligeramente el fluoreno y el fenantreno.

Tabla 2.13 Biodegradación (%) de HAPs por las cepas aisladas y el consorcio AM a los 15 días de incubación.

Cepa	Fluoreno ^a	Fenantreno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno
AMS1	6	0	0	0	0
AMS2	34	13	0	0	0
AMS3	43	16	0	0	0
AMS4	20	6	0	0	0
AMS5	0	0	0	0	0
AMS6	8	0	0	0	0
AMS7	98	98	99	63	25
AMS8	0	0	0	0	0
AMS9	0	0	0	0	0
AMS10	0	0	0	0	0
AMS11	46	21	4	26	24
Consortium AM	100 ^b	100	100	100	100

^a Media aritmética de muestras por duplicado. El coeficiente de variación fue inferior al 10%.^b La concentración final de HAPs estaba por debajo del límite de detección ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.5 ESTUDIO DEL CONSORCIO AM POR DGGE

4.5.1 Perfil de DGGE del periodo de incubación del consorcio AM

El consorcio AM se subcultivó cada 15 días y el principal periodo de degradación de HAPs se encontró en los primeros 6 días de incubación conjuntamente con un cambio de las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de HAPs (fig. 2.6). Por lo tanto se llevó a cabo un estudio del consorcio AM mediante DGGE de 16S rRNA total amplificado por PCR a partir del DNA genómico del consorcio a los 3, 6 y 15 días de incubación. La comparación de los tres perfiles de DGGE (fig. 2.8) reveló que existía un perfil similar a lo largo del periodo de máxima degradación (3 y 6 días) con 4-5 bandas detectables. Sin embargo, se encontraron hasta 8 bandas en el perfil de DGGE correspondiente a los 15 días de incubación, en el punto final del periodo de incubación.

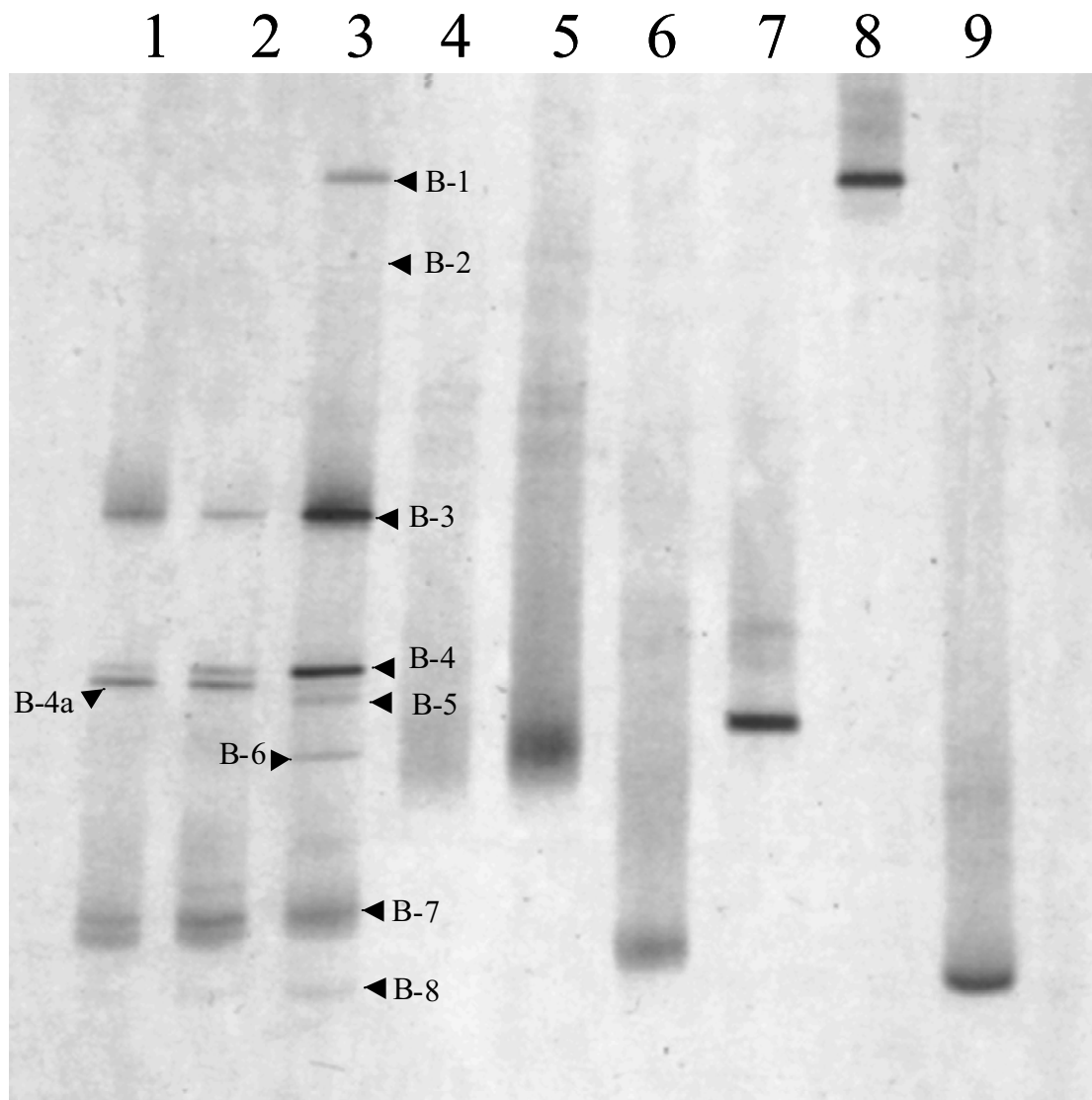


Fig. 2.8. Análisis de DGGE de fragmentos de 16S rDNA amplificados por PCR a partir del DNA genómico del consorcio AM a lo largo de los 15 días de incubación, y de las cepas aisladas degradadoras de HAPs. Carril 1, consorcio AM (3 días de incubación); carril 2, consorcio AM (6 días de incubación); carril 3, consorcio AM (15 días de incubación); carriles 4-9: cepas degradadoras AMS7, AMS1, AMS3, AMS4, AMS2 y AMS6, respectivamente.

Aunque la diversidad fue más elevada hacia el final del periodo de incubación, es interesante comentar, que durante todo el periodo de incubación (inicio y fin) siempre se encontraron 2 bandas coincidentes de DGGE (las bandas AMB3 y AMB4)

4.5.2 Caracterización por DGGE del consorcio AM a los 15 días de incubación

Tal y como puede observarse en la figura 2.8 se detectaron 8 bandas en el consorcio AM a los 15 días de incubación. Solamente se pudieron secuenciar 6 bandas de DGGE ya que no fue posible la reamplificación de las bandas B2 y B5 por PCR.

Tabla 2.14. Similitud de las secuencias obtenidas a partir de las bandas de DGGE del consorcioAM.

	Long. (pb)	Sim. (%) ^a	Secuencia de mayor similitud (n° acceso de EMBL/Genbank)	Grupo taxonómico ^b
AMB1 (AY635885) ^c	579	99.6	<i>Flavobacteriaceae</i> strain. 2 (AB024308)	<i>Cytophaga</i> grupo I
AMB3 (AY635886)	586	99.8	<i>Alcaligenes defragrans</i> TJ4 (AF508102)	<i>Bordetella</i>
		99.8	<i>Alcaligenes defragrans</i> N1 (AF508100)	
AMB4 (AY635887)	560	99.6	<i>Pandoraea pnomenusa</i> 38742 (AY268170)	<i>Burkholderia</i>
AMB4a (AY635891)	504	99.4	<i>Alcaligenes defragrans</i> TJ4 (AF508102)	<i>Bordetella</i>
		99.4	<i>Alcaligenes defragrans</i> N1 (AF508100)	
AMB6 (AY635888)	585	98.1	<i>Aminomonas aminovorvus</i> C2A1 (AY027801)	<i>Nitrosomonas</i>
AMB7 (AY635889)	559	100	<i>Alcaligenes</i> sp. PNCB-1 (AY090020)	<i>Bordetella</i>
		100	<i>Alcaligenes</i> sp. str. 151 (AJ002802)	
AMB8 (AY635890)	541	98.1	<i>Ultramicrobacterium</i> sp. 12-3 (AB008507)	<i>Xanthomonas</i>
		98.1	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. UR374 (AY124375)	

^a Similitud entre secuencias (%) comparadas con las disponibles en las bases de datos EMBL y Genbank.

^b Grupos taxonómicos definidos en Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). ^c Los números de acceso de las secuencias al Genbank y EMBL, se indican entre paréntesis.

Todas las bandas de DGGE mostraron una gran similitud en secuencia (98-100%) respecto a las secuencias disponibles en las bases de datos Genbank y EMBL. Como se muestra en la tabla 2.14 se encontraron cuatro bandas pertenecientes a las β -Proteobacterias (géneros *Alcaligenes*, *Pandorea* y *Aminomonas*), una banda perteneciente a las γ -Proteobacterias (género *Ultramicrobacterium* o *Pseudoxanthomonas*) y otra perteneciente a las CFB (familia de las *Flavobacteriaceae*).

Las bandas AMB3, AMB4, AMB7 y levemente AMB8 siempre fueron detectadas en los perfiles de DGGE durante los tres intervalos de tiempo analizados (3, 6 y 15 días). Asimismo, la banda AMB4a estaba presente durante el tercer y sexto día de incubación, pero no en el decimoquinto día. Esta banda (AMB4a) era un 99,4% similar a *Alcaligenes*

defragrans TJ4 (AF508102) una bacteria desnitrificante y degradadora de fenol en condiciones aeróbicas.

Las cepas degradadoras de HAPs (tabla 2.13) fueron analizadas por DGGE para determinar si comigraban con alguna de las bandas de DGGE del consorcio AM (fig. 2.8). Solamente dos de las cepas degradadoras (AMS2 y AMS6) mostraron bandas comunes con el perfil de DGGE del consorcio AM (bandas AMB1 y AMB8) a los 15 días de incubación. Sin embargo, la banda AMB8 también fue detectada con leve intensidad al tercer y sexto día. La cepa AMS7, que fue la que mostró mayor poder degradador de HAPs (tabla 2.13), transformando los 5 HAPs de la mezcla, no se encontró en ninguno de los perfiles de DGGE del consorcio AM. No obstante, esto podría ser debido a que la cepa AMS7 no era detectable por DGGE (fig. 2.8, carril 4) cuando se utilizó un gradiente de formamida:urea de 40-60%, que era el óptimo para una buena diferenciación de las bandas para el consorcio AM. La cepa AMS7 sí que era detectable por DGGE en gradientes desnaturizantes de 20-80% ubicándose entre las bandas AMB6 y AMB7, pero no comigraba con ninguna banda del consorcio AM y las otras cepas degradadoras. En realidad, la baja resolución que se obtenía utilizándose un gradiente desnaturizante de formamida:urea del 20-80%, obligó a utilizar el de 40-60% aunque la cepa AMS7 no fuera detectable.

4.6 LIBRERÍAS DE CLONES DE GENES 16SrRNA Y 18S RRNA.

Se construyeron 2 librerías de clones recombinantes a partir de la amplificación por PCR, de los genes que codifican para el 16S rRNA (inserto de 1500 pb) y 18S rRNA (inserto de 600 pb), en muestras de DNA genómico del consorcio AM a los 15 días de incubación. Se obtuvieron 50 clones recombinantes en la librería de 16S rRNA y 25 clones en la librería de 18S rRNA. Todos los clones fueron analizados por restricción enzimática mediante las endonucleasas TaqI (clones 16S rRNA) y Alu I (clones 18S rRNA).

4.6.1 Librería de genes 16S rRNA

En la figura 2.9 puede verse un ejemplo de perfiles de restricción, resultantes para los clones recombinantes de la librería de genes 16S rRNA. Se secuenciaron clones representantes de cada uno de los perfiles de restricción diferentes.

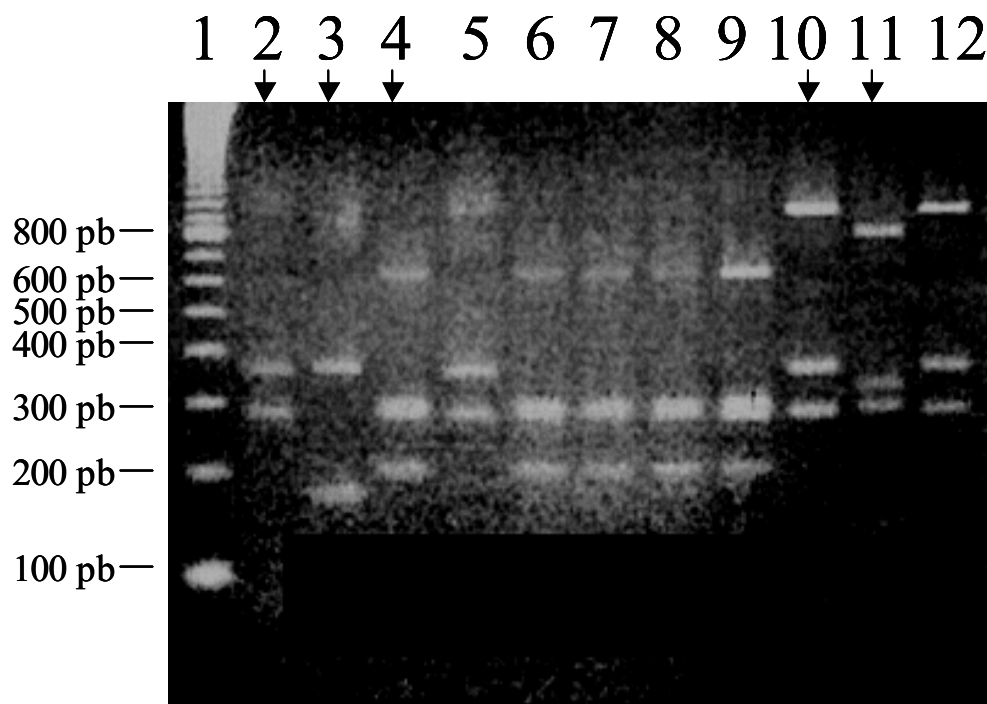


Fig. 2.9. Digestión enzimática de los clones de la librería de genes de 16S rRNA (ARDRA) con la endonucleasa Taq I. Gel de agarosa Nusieve al 3% (p/v) donde el carril 0 representa el marcador y los carriles del 1-11 representan a los clones AM1C-AM11C. Las flechas indican perfiles de restricción distintos (AM1C, AM2C, AM3C, AM9C y AM10C).

Se obtuvieron 5 patrones de restricción diferentes, confirmados por secuenciación, en la librería de genes 16S rRNA. Las secuencias resultantes se pueden ver en la tabla 2.15, y representaban secuencias pertenecientes a los subgrupos de las α - y β -Proteobacterias y al grupo de las *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB), representados por los géneros *Sphingomonas*, *Aminomonas*, *Alcaligenes* y a una cepa no cultivable del grupo CFB. Las secuencias en general mostraron una elevada similitud que osciló entre el 98% y el 99,6%, excepto para el clon AMC10 que tuvo una secuencia con una similitud máxima del 95% respecto a un clon ambiental no clasificado).

El 84 % de los clones (50 clones) pertenecieron a las β -Proteobacterias, representado por los perfiles de restricción equivalentes los clones AMC1, AMC3, AMC9 y AMC15, y sorprendentemente ninguno de ellos tenía secuencias coincidentes con alguna de las cepas aisladas. En realidad, los clones AMC3 y AMC15 representaban dos perfiles de restricción fue detectado en el 52% del total de clones de la librería. Sin embargo, el clon AMC2, que representaba tan sólo el 4 % de la librería de 16S rRNA, con un total de 2

clones (tabla 2.15), contenía una secuencia coincidente con la cepa AMS7, la principal cepa degradadora de HAPs.

Tabla 2.15. Similitud de las secuencias obtenidas en las librerías de clones recombinantes con genes 16S rRNA y 18S rRNA.

Clon	Prop. clones	Long. (pb)	Sim. (%) ^a	Secuencia de mayor similitud (n° acceso de EMBL/Genbank)	Grupo taxonómico ^b
AMC1 (AY635878) ^c	10/50 ^d	1540	99.1	<i>Achromobacter xylooxidans</i> subsp. xylooxidans, (AF411021)	<i>Bordetella</i>
			99.1	<i>Achromobacter xylooxidans</i> (AF411019)	
AMC2 (AY635879)	2/50	880	98.2	<i>Sphingomonas</i> sp. S-3 (AB040739)	<i>Sphingomonas</i>
AMC3 (AY635880)	16/50	1008	98.0	<i>Aminomonas aminovorans</i> C2A1 (AY027801)	<i>Methylophilus</i>
AMC9 (AY635881)	6/50	808	99.6	<i>Alcaligenes</i> sp. DT (AF451852)	<i>Bordetella</i>
AMC10 (AY635882)	4/50	804	95.4	Bacteria de rizosfera (AJ252591)	<i>Lewinella</i>
AMC15 (AY635883)	10/50	818	98.6	<i>Aminomonas aminovorans</i> C2A1 (AY027801)	<i>Methylophilus</i>
AMCF1 ^e (AY635884)	25/25	536	100	Ascomiceto no cultivado (AB074659)	<i>Ascomycota</i>
			99.4	<i>Fusarium culmorum</i> UPSC 1981 (AF548073)	(<i>Eukarya</i>)
			99.4	<i>Penicillium</i> sp. CMW8605 (AF434694)	
				<i>Neocospora vasinfecta</i> (NV32414)	

^a Similitud entre secuencias (%) comparadas con las disponibles en las bases de datos EMBL y Genbank.

^b Grupos taxonómicos definidos en la institución de Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

^c Los números de acceso de las secuencias al Genbank y EMBL, se indican entre paréntesis. ^d Proporción en el total de la librería ^e AMCF1 fue el único representante encontrado en la librería de genes de 18S rRNA.

4.6.2 Librería de genes 18S rRNA

Solamente se encontró un tipo de secuencia en la librería de clones de genes 18S rRNA. Todos los clones mostraron el mismo perfil de restricción con Alu I, y la secuenciación al azar de 10 clones mostró la misma secuencia. Esta secuencia, representada por el clon AMCF1, fue la misma que la encontrada para el hongo aislado (AMF1) degradador de HAPs con un 100% de similitud a un ascomiceto no cultivable (AB074659) y un 99,4% de similitud con *Fusarium culmorum* (AF548073). Teniendo en cuenta que las esporas encontradas por microscopia electrónica de barrido (fig. 2.5) se

correspondían al género *Fusarium*, y que estas esporas eran idénticas a las encontradas en el hongo degradador (idéntico al clon AMCF1), se pudo concluir que el hongo degradador del consorcio pertenecía al género *Fusarium*.

5 DISCUSIÓN

Se ha llevado a cabo un estudio y seguimiento de los cambios poblacionales de la población heterótrofa y degradadora de HAPs del consorcio AM, y se han identificado y clasificado taxonómicamente los componentes obtenidos AM mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

El objetivo inicial fue establecer el tiempo de incubación más adecuado para llevar a cabo el estudio de la diversidad microbiana mediante tres estrategias diferentes: aislamiento en placa, DGGE y librería de clones de genes rRNA. Finalmente se eligió el decimoquinto día de incubación, coincidente con el momento del subcultivo en medio fresco, ya que se observó que este presentaba la mayor población microbiana (fig. 2.6b) y el mayor número de bandas de DGGE (fig. 2.8). Este hecho es coincidente con otros trabajos como el de Van Hamme *et al.* (2000), donde se encuentra la mayor diversidad de organismos de un cultivo mixto bacteriano incubado en una mezcla de hidrocarburos del petróleo, al final del periodo de incubación.

Se han analizado un total de 23 secuencias de eubacterias (16S rRNA) y 2 secuencias de hongos (18S rRNA), que se han obtenido a partir de cepas aisladas, DGGE de 16S rDNA y librerías de clones de genes 16S rRNA y 18S rRNA. Concretamente se han obtenido 11 secuencias diferentes en el aislamiento de cepas, 7 secuencias diferentes en el estudio por DGGE, y 7 secuencias diferentes en la librería de clones de genes rRNA. Es importante destacar que las secuencias obtenidas por DGGE son bastante largas (550-580 pb) próximas a la máxima longitud que permite esta técnica (Muyzer *et al.*, 1993; Yu y Morrison 2004) englobando 3 regiones hipervariables (V3-V5) del gen de 16S rRNA. Este hecho ha permitido que el estudio comparativo de las secuencias obtenidas a partir de las cepas aisladas, DGGE, y librería de clones se haya podido realizar en una región de solapación bastante amplia y que engloba tres regiones hipervariables del gen de 16S rRNA.

5.1 CEPAS AISLADAS DEL CONSORCIO AM

De las 11 cepas aisladas, 3 pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (AMS1), *Sphingomonas* (AMS7) y *Alcaligenes* (AMS10) (tabla 2.12) los cuales son grupos

importantes que se asocian a bacterias degradadoras de petróleo o derivados (Van Hamme *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro caso, de estas tres cepas solamente AMS7, la cual tiene una secuencia de 16S rRNA con una similitud del 98,2% a *Sphingomonas* sp S3, mostró capacidad de biodegradar los 5 HAPs ensayados (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluranteno y pireno). La cepa AMS3 que por similitud de secuencia se asignó al género *Stenotrophomonas*, degradó fluoreno (43%) y fenantreno (16%). Cabe decir que en otros trabajos se han encontrado cepas pertenecientes al género *Stenotrophomonas* que son capaces de degradar HAPs de tres, cuatro y hasta cinco anillos aromáticos (Juhasz *et al.*, 2000). También, dentro del género *Ochrobactrum* (cepas AMS4 y AMS9 de este trabajo (tabla 2.12)) se encuentran cepas degradadoras de productos derivados del petróleo, entre los cuales algunos HAPs (Van Hamme *et al.*, 2000; Van Hamme *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro caso las cepas AMS4 y AMS9 no han mostrado actividad degradadora, o insignificante para ninguno de los 5 HAPs ensayados. La cepa AMS5, asignada por similitud de secuencia al género *Labrys*, no degradó ninguno de los HAPs ensayados. Hasta la fecha no se ha descrito en la literatura ninguna cepa degradadora de HAPs perteneciente a este género. En relación a la cepa AMS2, clasificada como una *Flavobacteriaceae* del grupo de las CFB, y degradadora de fluoreno (34%) y fenantreno (13%), es importante destacar que MacNaughton *et al.* (1999) encontraron 2 microorganismos pertenecientes al grupo CFB en un estudio de evaluación de la aplicación de diferentes técnicas de biorremediación en arenas contaminadas con crudo de petróleo. Asimismo, Whiteley y Bailey (2000) describieron que el grupo *Cytophaga-Flavobacterium* (perteneciente a las CFB) era predominante en un bioreactor industrial biodegradador de fenol. En general los géneros encontrados en el consorcio AM fueron bastante coincidentes con los descritos por Van Hamme *et al.* (2000) (*Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Alcaligenes*) en un cultivo mixto degradador de hidrocarburos del petróleo

En relación a la caracterización catabólica, solamente 5 de las 10 cepas bacterianas aisladas fueron capaces de degradar en cierto grado alguno de los 5 HAPs de la mezcla (fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno y pireno) (tabla 2.11). Las cepas AMS7 (*Sphingomonas* sp.) y AMF1 (*Fusarium* sp.) degradaron todos los HAPs de la mezcla, pero en ningún caso en la misma extensión que el consorcio AM. En realidad es conocido que ciertas especies de hongos puedan degradar parcialmente, oxidar cometabólicamente o mineralizar incluso los HAPs (Cerniglia *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1992) y en

particular también se han encontrado especies de *Fusarium* con actividad degradadora de HAPs (Potin *et al.*, 2004). Asimismo, Boonchan *et al.*, (2000) demostraron que co-cultivos definidos de bacterias y hongos podían mineralizar cantidades significativas de benzo(a)pireno por procesos de cometabolismo en presencia de pireno.

Es importante destacar que el 90% de las cepas aisladas pertenecían al grupo filogenético de las Proteobacterias, y un 10% al grupo CFB. Concretamente, el 40% de las cepas pertenecían a la subclase de las α -Proteobacterias, el 30% a las γ -Proteobacterias y el 20% de las cepas pertenecieron a la subclase de las β -Proteobacterias.

5.2 ESTUDIO POR DGGE DEL CONSORCIO AM

Las bandas de DGGE AMB4 (similar en un 99,6% con *Pandorea pnomenusa*) y AMB7 (100% similar a *Alcaligenes sp.* cepa 151) que fueron detectadas a los 3, 6 y 15 días de incubación, no coincidieron en secuencia (en el rango de 550 pb que comprende los dominios hipervariables V3-V5 del gen 16S rRNA) con ninguna cepa aislada, pero podrían tener alguna función importante, en el consorcio AM, durante el periodo de degradación de HAPs del cultivo (0-6 días fig. 2.6 a). Hasta la fecha no se han descrito cepas degradadoras de HAPs pertenecientes al género *Pandorea*, aunque esto no supone necesariamente que la banda AMB4 no esté implicada indirectamente en la degradación de HAPs, ya que también podría utilizar los metabolitos resultantes de la degradación de los HAPs parentales producidos por otros componentes microbianos del consorcio como la cepa bacteriana AMS7 y la cepa fúngica AMF1. En el periodo de máxima degradación de HAPs también fue detectada la banda AMB4a (94% de similitud con *Alcaligenes defragrans*) la cual no se detectó en el día 15 (punto temporal del estudio comparativo entre técnicas), y en consecuencia AMB4a también podría pertenecer a una cepa potencialmente degradadora de HAPs. En realidad, el género *Alcaligenes* contiene cepas con actividad degradadora de HAPs (Van Hamme *et al.*, 2003).

De un total de 6 bandas de DGGE identificadas, el 83% pertenecieron al grupo de las Proteobacterias (66% a la subclase β -Proteobacteria y un 16% de las bandas pertenecientes a la subclase de las γ -Proteobacterias) y el 17% pertenecieron al grupo filogenético de las CFB. Los datos de DGGE que se han obtenido para el consorcio AM son bastante similares respecto a los componentes microbianos que encontraron Kanaly *et*

al., (2000) en un consorcio degradador de benzo(a)pireno. Concretamente, Kanaly *et al.* (2000) encontraron 10 bandas de DGGE, de las cuales el 80% pertenecían al grupo de las Proteobacteria (20% de las bandas pertenecientes a las subclase α -Proteobacterias, 50% a las β -Proteobacterias y el 10% a las γ -Proteobacterias), un 10% pertenecientes a los Cytophagales (grupo CFB) y un 10% pertenecientes a los Actinomicetos.

En el presente estudio, 3 de las bandas de DGGE (AMB8, AMB1 y AMB3) coincidieron en secuencia con 3 de las 10 cepas bacterianas aisladas (AMS6, AMS2 y AMS10). Recientemente, también se han descrito proporciones similares de secuencias coincidentes obtenidas por DGGE y aislamiento de cepas. Frontera *et al.*, (2002), en un consorcio microbiano degradador de hopanos y otros biomarcadores, obtuvieron 10 cepas aislables (cultivables) y un perfil de DGGE complejo con 15 bandas resueltas. Seis de las 15 bandas (aproximadamente el 30%) eran coincidentes con cepas aisladas del consorcio. Sin embargo, este estudio, se llevó a cabo con fragmentos de 16S rDNA amplificados de 323 pb de longitud (para el DGGE) conteniendo únicamente una región hipervariable (V9) del gen 16S rRNA que se comparó con las cepas aisladas. En nuestro estudio se ha comparado una región mayor (588 pb), conteniendo tres regiones hipervariables (V3-V5) del gen 16S rRNA, que recientemente han sido recomendadas para estudios de DGGE de fragmentos largos de 16S rDNA (Yu y Morrison, 2004) y, además, se han comparado las secuencias obtenidas mediante tres metodologías (DGGE, aislamiento de cepas y librería de genes rRNA).

5.3 ESTUDIO DEL CONSORCIO AM POR LIBRERÍAS DE CLONES

La subclase de las β -Proteobacterias fue el grupo filogenético predominante en la librería de clones de genes 16S rRNA (64% de las secuencias diferentes encontradas en la librería) de la misma forma que en el DGGE. Un 16% de las secuencias diferentes que se han encontrado, pertenecieron tanto al grupo de las CFB como a la subclase de las α -Proteobacterias. Es importante destacar, que solamente 2 de las secuencias, representadas por los clones AMC1 y AMC2 que representan tan solo el 24% de los clones de la librería de genes 16S rRNA, son coincidentes con otras técnicas, mientras que, el 76 % de los clones de la librería representados por clones AMC3, AMC9, AMC10 y AMC15 no coinciden con otras secuencias obtenidas en este estudio. Sorprendentemente, se detectó únicamente, una coincidencia entre las técnicas independientes de cultivo (DGGE y

librería clones), entre el clon AMC1, que representa el 20% de la librería, y la banda de DGGE AMB7.

5.4 COMPLEMENTARIEDAD DE LAS TÉCNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO

Se detectó una baja frecuencia de secuencias coincidentes entre técnicas independientes de cultivo (que derivan de la amplificación de genes 16S rRNA a partir del DNA total del consorcio). Esto, podría ser debido a la utilización de diferentes cebadores (tabla 2.7), a posibles amplificaciones preferentes de ciertos DNA moldes o a otras limitaciones inherentes de las técnicas dependientes de la PCR, así como de cada una de las 2 técnicas en particular (apartado 1.1.6.2.7) (Dunbar *et al.*, 1997; Dunbar *et al.*, 1999; Head *et al.*, 1998). El clon AMC2, que solamente representaba al 4% de la librería, fue la única secuencia de la librería coincidente con alguna cepa cultivable (fig. 2.10), y en concreto con la cepa AMS7, la que mostró un mayor potencial degradador de HAPs (tabla 2.13). Esta falta de coincidencia existente entre las secuencias derivadas de cepas aisladas y librerías de clones de genes 16S rRNA, también ha sido observada en otros trabajos, como en el caso de Vainio *et al.* (1997), donde no se encontró ninguna secuencia coincidente entre las 2 técnicas (librería de clones y cepas cultivadas). Sin embargo, también existen estudios con resultados coincidentes entre las dos metodologías, como es el caso de Massol *et al.* (1997) que encontraron en una comunidad microbiana de células fijas degradadoras de HAPs de un reactor biológico, que un 90% de las cepas aisladas eran coincidentes con un 33% de las secuencias derivadas de una librería de clones.

Las secuencias obtenidas por DGGE y cepas cultivables incluyeron más casos coincidentes entre técnicas, que las secuencias obtenidas en la librería de clones. De este modo, por DGGE, 4 de las 7 bandas obtenidas, las bandas AMB1, AMB3, AMB7 y AMB8, coincidieron con secuencias obtenidas a partir de las cepas aisladas y de la librería de clones (fig. 2.14), mientras que en el caso de las cepas cultivables, el 40% de las secuencias, en particular las cepas AMS2, AMS6, AMS7 y AMS10 también fueron coincidentes con secuencias obtenidas a partir de DGGE y librería de clones.

Tabla 2.16. Secuencias finales de genes 16S rRNA y 18SrRNA encontradas en las diferentes metodologías.

Grupo	Cepas aisladas ^b	Librería de clones ^b	Bandas DGGE ^b	Coincidencias por secuencia ^c	Consortio AM ^b
α -Proteobacteria	4	1	0	1	4
β -Proteobacteria	2	4	4	2	8
γ -Proteobacteria	3	0	1	1	3
CFB ^a	1	1	1	1	2
Ascomycetos	1	1	ND ^d	1	1
Total	11	7	6	6	18

^aCFB: grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. ^b Número de secuencias diferentes encontradas. ^c Secuencias coincidentes entre técnicas. No se encontró ninguna coincidencia triples (entre las tres técnicas). ^dND: no determinado

Como puede observarse en el árbol filogenético que se muestra en la figura 2.10, construido con una región de solapamiento de 550 pb para todas las secuencias de 16S rRNA que se han obtenido en este estudio, se han detectado 6 casos de secuencias coincidentes entre métodos: AMB8=AMS6, AMB1=AMS2, AMB3=AMS10, AMB7=AMC1, AMC2=AMS7. En ninguno de los casos se ha detectado una coincidencia triple entre los tres métodos.

El grupo filogenético de las Proteobacterias es dominante en el consorcio AM, con un 83% de las secuencias totales, mientras que un 11% de las secuencias pertenecieron al grupo CFB y un 6% al hongo ascomiceto. En particular dentro de las Proteobacterias, la subclase de las α -Proteobacterias representa un 22% de las secuencias, las β -Proteobacterias representa un 44% de las secuencias y las γ -Proteobacterias representan un 17% de las secuencias. Las proporciones totales de los grupos taxonómicos encontrados, resultantes de las secuencias obtenidas a partir de todos los métodos utilizados, no fueron coincidentes con las encontradas en cada método en particular.

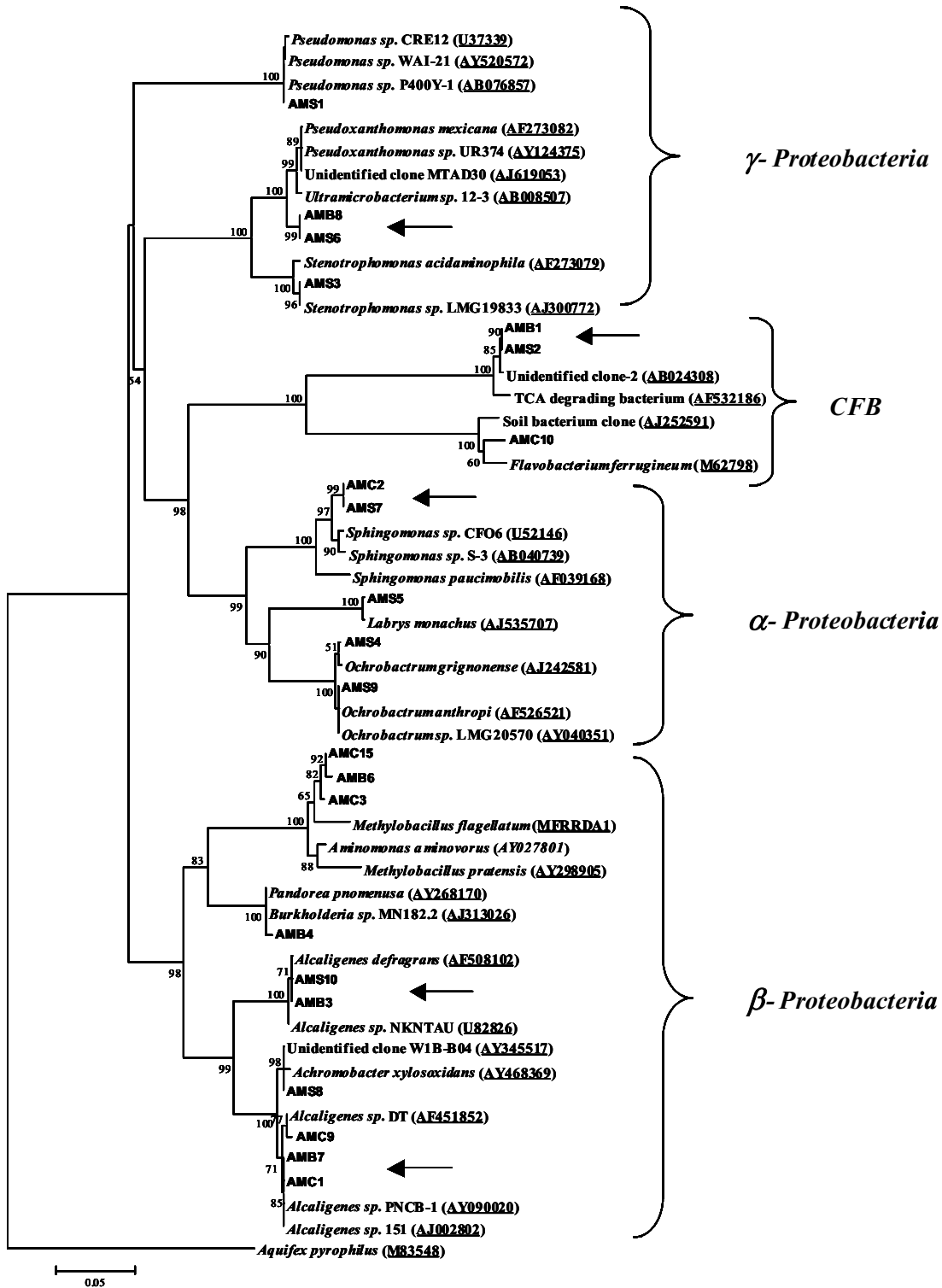


Fig 2.10. Árbol filogenético construido por Neighbor-Joining (apartado 3.14) a partir de una región de 550 pb que engloba las regiones hipervariables V3-V5, y que muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias de genes 16S rRNA que se han obtenido a partir de las cepas aisladas (AMSx), DGGE (AMBx) y librería de clones (AMCx) y secuencias disponibles en el GenBank. La distancia filogenética entre secuencias se calculó con el algoritmo Jukes Cantor. Los valores de Bootstrap superiores a 50%, obtenidos de un total de 1000 réplicas (valor de Bootstrap = 1000), se muestran en las ramas del árbol. El árbol tiene como raíz a *Aquifex pyrophilus*. Las flechas indican coincidencias entre secuencias.

Como puede verse en la tabla 2.16, las β -proteobacterias eran dominantes (66% y 57% de las secuencias) por DGGE y librería de clones respectivamente, mientras que solamente representaban un 20% de las cepas aisladas. Sucedió lo contrario con las subclases α - y γ -Proteobacteria, las cuales fueron mucho más frecuentes entre las cepas cultivables. El grupo de las CFB se encontró en las tres metodologías, aunque en una frecuencia menor.

No se han encontrado secuencias pertenecientes al grupo de los actinomicetos como por ejemplo los géneros *Rhodococcus* y *Arthrobacter*, ni especies del género *Mycobacterium*, a pesar de ser grupos conocidos por su potencial degradador de HAPs, especialmente, de más de tres anillos. (Kanaly y Harayama, 2000; Van Hamme *et al.*, 2003). Esto podría ser debido a la falta de superficies colonizables en los enriquecimientos clásicos realizados en medio líquido. Según un estudio de Bastiaens *et al.*, (2000), donde se comparan técnicas clásicas de enriquecimiento (como en el consorcio AM) con una nueva metodología en que se adicionan al medio líquido superficies hidrofóbicas donde se adsorben los HAPs, se concluye que el sustrato físico en el cual está ubicado el HAPs (líquido en enriquecimientos tradicionales, e hidrofóbico en la nueva metodología) condiciona el tipo de diversidad microbiana que se selecciona. De este modo se encontraron principalmente especies de *Sphingomonas* en los enriquecimientos tradicionales con HAPs, mientras que en los enriquecimientos donde se utilizaron las superficies hidrofóbicas con los HAPs adsorbidos en ellas, exclusivamente se encontraron especies de *Mycobacterium*. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Stach y Burns (2002), donde se compara la diversidad microbiana encontrada en enriquecimientos con HAPs, tanto por metodología clásica, como por enriquecimientos donde se ha estimulado la formación de biofilms. Sin embargo, en ciertas ocasiones se ha conseguido aislar cepas degradadoras del género *Mycobacterium* a partir de técnicas clásicas de enriquecimiento (Kanaly *et al.*, 2000; Sabaté *et al.*, 1998). En consecuencia y debido a que en el presente estudio no se han utilizado cebadores específicos para estos grupos de microorganismos, no se puede descartar de forma definitiva la presencia de estos grupos bacterianos.

Los resultados obtenidos en este estudio, indican que los métodos dependientes de cultivo contribuyen con un elevado número de secuencias no coincidentes (siete) en el

análisis de los componentes microbianos del consorcio AM, mientras que las técnicas independientes de cultivo analizadas, DGGE y librería de clones, generan solamente dos y cuatro secuencias únicas o no coincidentes, respectivamente. Asimismo, únicamente el 40% de las cepas aisladas fue identificada por alguno de los dos métodos moleculares independientes de cultivo utilizados. En otro estudio comparativo entre técnicas, para la determinación de la diversidad de cuatro comunidades microbianas de suelo, Dunbar *et al.*, (1999) encontraron unos resultados similares respecto al porcentaje de cepas aisladas (41%) que también fueron identificadas, por lo menos, mediante una técnica molecular independiente de cultivo. Por lo tanto, los microorganismos cultivables podrían representar una fracción significativa de la población total presente en el consorcio AM. En referencia a la importancia de los microorganismos cultivables en el total de la diversidad de una comunidad microbiana, Pearce *et al.* (2003) también han observado la relevancia de la fracción microbiana cultivable en la diversidad de una comunidad bacterioplanctónica, estudiada con métodos dependientes e independientes de cultivo.

Se han identificado 19 secuencias microbianas diferentes como componentes microbianos del consorcio AM. Esta elevada diversidad del consorcio AM, supone uno de los casos con mayor número de componentes identificados en un consorcio microbiano obtenido por cultivos de enriquecimientos clásicos en el laboratorio. En realidad, hasta la fecha la mayor parte de consorcios microbianos descritos contienen menos componentes microbianos que los que se han descrito en el consorcio AM (Sugiura *et al.*, 1997; Kanaly *et al.*, 2000; Van Hamme *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Frontera *et al.*, 2002; Stach y Burns, 2002). La gran diversidad encontrada es debido a la utilización y complementariedad que han presentado las tres metodologías que se han llevado a cabo en este trabajo. Asimismo, no debe descartarse que la diversidad real del consorcio AM sea superior a la aquí descrita debido a las limitaciones inherentes que pueden presentar las técnicas moleculares (apartado 1.1.6.2.7), así como las limitaciones propias de las técnicas de cultivo (apartado 1.1.6.1).

Si la caracterización taxonómica de un consorcio microbiano presenta un elevado grado de complejidad, su caracterización catabólica aún puede presentar mayores dificultades (Dejonghe *et al.*, 2003). Aunque la caracterización catabólica del consorcio AM no ha sido el objetivo de este trabajo, se hace necesario un cierto grado de discusión.

Los cultivos de enriquecimiento a partir de muestras naturales cultivadas con ciertos productos del petróleo o con algunos componentes específicos, producen tras numerosos subcultivos en medio fresco y sustrato renovado, consorcios no definidos pero metabólicamente especializados. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural, principalmente debido a su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla o producto suministrado como fuente de carbono y energía inicial. Esta población tiene una eficiencia potencialmente mayor en degradar compuestos conocidos y desconocidos de la mezcla, o sustrato utilizado como fuente de carbono y energía. Como ejemplos de cooperación microbiana, en un consorcio microbiano se han descrito fenómenos de cometabolismo, generación y aporte de factores de crecimiento al cultivo, solubilización de sustratos y eliminación de metabolitos tóxicos por ciertos microorganismos (Gibson y Subramanian, 1984; Bouchez *et al.*, 1995; Kanaly *et al.*, 2002). Es importante destacar que debido a la cooperación metabólica existente en un consorcio microbiano, en el consorcio AM se pueden haber seleccionado poblaciones degradadoras de los HAPs parentales, pero también poblaciones degradadoras de productos o metabolitos intermedios del catabolismo de los HAPs parentales, o poblaciones degradadoras de productos finales de degradación (*dead-end products*) que se acumulan como resultado de procesos de cometabolismo (Bouchez *et al.*, 1999; Grifoll *et al.*, 1995). Un claro ejemplo de cooperación metabólica se describe en una serie de trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, donde primero, se detectó que la actividad degradadora de fluoreno de *Arthrobacter* sp F101 era inhibida por la presencia de ciertos metabolitos finales (básicamente fluorenona) de su propio metabolismo (Casellas *et al.*, 1997), pero si esta cepa se utilizaba en un co-cultivo conjuntamente con una cepa degradadora de fluorenona como era *Pseudomonas mendocina* MC2, la degradación del fluoreno suministrado era completa y no se acumulaba fluorenona en el medio de cultivo. (Casellas *et al.*, 1998).

En el caso del consorcio AM, un consorcio que lleva más de 7 años subcultivándose periódicamente cada 15 días, el mantenimiento de su capacidad catabólica y su elevado número de componentes microbianos detectados (19), indican que la población microbiana no degradadora de HAPs también es beneficiosa para el consorcio y que, en consecuencia, existen una serie de interdependencias complejas que se han ido estableciendo en el consorcio. Aunque no seamos capaces de determinar la función de cada

uno de los microorganismos identificados en este estudio, es bastante factible que tras 260 subcultivos (con un factor de dilución 1:100), todos los microorganismos identificados tengan un nicho determinado en el sistema, ya que en caso contrario se habrían perdido por el factor de dilución en cada subcultivo.

Recientemente se ha recomendado, para estudios de DGGE, la utilización de secuencias de 16S rRNA que incluyan al menos 2 regiones hipervariables para mejorar la validez filogenética de los resultados de diversidad y, concretamente, se recomienda la utilización de las regiones hipervariables V3-V5 para el análisis de fragmentos largos para DGGE (Yu y Morrison, 2004). Este es uno de los primeros estudios en los que se comparan secuencias amplias de genes 16S rRNA analizadas por DGGE que incluyan las tres regiones hipervariables V3, V4 y V5, y donde además, se comparan con secuencias de 16S rDNA obtenidas a partir de cepas aisladas y librería de clones de 16S rDNA.

Los resultados de este trabajo indican la necesidad de utilizar distintas estrategias para el análisis de un consorcio microbiano, englobando técnicas dependientes e independientes de cultivo. Este trabajo, corrobora otros trabajos donde se ha visto que la diversidad de los consorcios microbianos es más compleja de la que se había descrito con anterioridad. (Yang *et al.*, 2001; Kanaly *et al.*, 2002)

6 CONCLUSIONES

1. Se ha caracterizado la diversidad microbiana de un consorcio degradador de HAPs de forma polifásica con la utilización de técnicas dependientes de cultivo: aislamiento de cepas y NMP, y técnicas independientes de cultivo: análisis por microscopia, DGGE de 16S rDNA y librería de clones de 16S rDNA.
2. Se han encontrado un total de 19 secuencias microbianas distintas pertenecientes a las subdivisiones α -, β - y γ -Proteobacteria, al grupo Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (CFB) y un hongo del grupo Ascomycota. El consorcio AM, es uno de los consorcios microbianos obtenidos en laboratorio con un mayor número de componentes microbianos.
3. La división taxonómica de las Proteobacterias constituye el grupo mayoritario con un 84% de las secuencias encontradas.
4. Se ha encontrado un 50% de las secuencias totales pertenecientes a la subdivisión de las β -Proteobacterias (*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Pandorea*, *Aminomonas*), un 21% pertenecientes a las α -Proteobacterias (*Sphingomonas*, *Ochrobactrum*, *Labrys*), un 14% a las γ -Proteobacterias (*Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas*), y un 10% a las CFB (*Flavobacterium* y clon ambiental de la rizosfera).
5. La subdivisión de las β -proteobacterias se ha encontrado en todas las metodologías, pero principalmente en las técnicas independientes de cultivo (DGGE y librería de clones), mientras que las subdivisiones α - y γ -Proteobacteria se han encontrado principalmente entre las cepas aisladas. No se han encontrado α -Proteobacterias por DGGE ni γ -Proteobacterias en la librería de clones.
6. Únicamente la cepa bacteriana AMS7 y la cepa fúngica AMF1, de un total de 11 cepas aisladas, degradan los 5 HAPs de la mezcla (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno), aunque no en la misma

extensión que el propio consorcio AM. Las cepas AMS2, AMS3 y AMS4 degradan levemente el fluoreno y el fenantreno, mientras que las cepas AMS1 y AMS6 apenas degradan el fluoreno. El resto de cepas no degradan ninguno de los HAPs.

7. La cepa AMS7, perteneciente al género *Sphingomonas*, principal degradadora de HAPs se encuentra también en la librería de clones, pudiéndose considerar por lo tanto, como un componente importante del consorcio AM. Asimismo, las bandas de DGGE AMB3, AMB4 y AMB7, pertenecientes a los géneros (*Alcalienes* y *Pandorea*), y detectables durante todo el periodo de incubación, así como la banda AMB4a (*Alcaligenes*), presente en el periodo de máxima degradación de HAPs, podrían representar microorganismos degradadores de HAPs o con funciones importantes en el consorcio AM.
8. Se ha puesto de manifiesto que las diferentes metodologías utilizadas son necesarias y se complementan entre si, encontrándose una mayor diversidad microbiana en conjunto que la encontrada de forma individual con cada una de las técnicas.

Capítulo III:

Diseño y evaluación de ensayos de biotratabilidad para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos



“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer”

Johann Wolfgang von Goethe

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL SUELO

1.1.1 Estructura y componentes del suelo

El suelo se define como la parte superior de la corteza terrestre, y se trata de un sistema formado por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar. El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico.

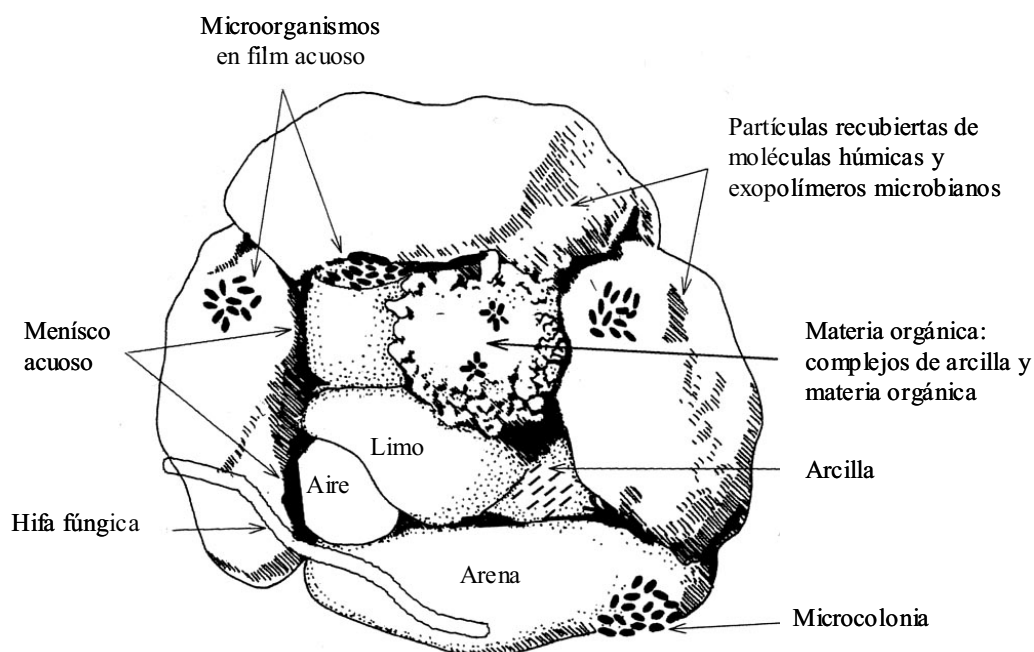


Fig. 3.1. Esquema de la disposición en el espacio de los agregados constituyentes de un suelo.

Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm diámetro), limos (2-50 μm de diámetro), arcillas (inferior a 2 μm de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa (fig. 3.1). Los poros pueden contener agua o aire, de manera que existen tres fases: sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales

y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar enormemente, afectando dicha actividad.

1.1.2 Las poblaciones microbianas

La red de poros formada como resultado de la asociación de las partículas minerales (arenas, limos y arcillas) y la materia orgánica (fig. 3.1), muestra una gran variedad de tamaños y espacios, lo que condiciona el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes (Sessitsch *et al.*, 2001). En términos generales se encuentran del orden de 10^6 - 10^9 bacterias cultivables por gramo de suelo, mientras que los hongos se encuentran en dos órdenes de magnitud menos como unidades formadoras de colonias, pero representan una parte importante de la biomasa del suelo (Alexander, 1977; Atlas y Bartha 1997). Sin embargo, la estructura de la población microbiana en los microhábitats (poros) del suelo, aún sigue siendo poco conocida (Sessitsch *et al.*, 2001), y además se estima que tan solo un 0,1-1% de los microorganismos son cultivables (Amann *et al.*, 1995). La organización estructural de las partículas del suelo, confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido de agua líquida, así como de un pH variable (Ladd *et al.*, 1996). Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo (Kästner, 2000b).

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación (Alexander, 1999). Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo (Kastner, 2000b). Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de

biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando los compuestos no sean de gran recalcitrancia (Alexander, 1999). Únicamente en aquellos casos de contaminación puntual o de compuestos de gran recalcitrancia, puede ser necesaria la inoculación de poblaciones alóctonas, procedentes de cultivos de laboratorio con capacidades degradativas especializadas, para posibilitar la degradación de los contaminantes existentes. Sin embargo, a menudo la falta de adaptación de las poblaciones exógenas, puede poner en peligro su supervivencia (Dejonghe *et al.*, 2001; Kastner, 2000). Por lo tanto, antes de iniciar cualquier estudio de biorremediación, es esencial conocer si la población microbiana existente en el suelo es potencialmente degradadora de los contaminantes presentes y es suficiente para llevar a cabo el proceso de biodegradación en un tiempo razonable (Wrenn y Venosa, 1996).

1.1.3 Destino ambiental de los contaminantes orgánicos en un suelo

Como resultado de actividades antrópicas cada año se liberan grandes cantidades de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos en el medio ambiente. La contaminación de suelos, es una consecuencia bastante común de la actividad industrial (Ulrici, 2000).

La existencia de tres fases en el suelo (sólida, líquida y gaseosa), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierten en un compartimento ambiental muy complejo. La distribución de los contaminantes orgánicos se encuentra condicionada por estas características, pudiéndose encontrar adsorbidos sobre el particulado o materia orgánica (mayoritariamente aquellos compuestos de elevada hidrofobicidad como los HAPs y los aceites minerales), en disolución, o en fase de vapor (Mackay y Betts, 1991; Means *et al.*, 1980; Weissenfels *et al.*, 1992). Al igual que en los medios acuáticos, los contaminantes orgánicos que se encuentran en la superficie pueden sufrir evaporación o fotooxidación. De este modo en el conjunto del suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser transformados fisicoquímicamente o sufrir biodegradación (Bossert y Bartha, 1984). El proceso de transformación más importante es la biodegradación. Los microorganismos suelen estar distribuidos en el suelo formando microcolonias que se encuentran separadas unos 100 μm , y situadas en poros pequeños entre 0,8 y 3 μm (Harms *et al.*, 1996).

Además los productos de oxidación parcial procedentes de los compuestos orgánicos (como los HAPs y otros hidrocarburos) pueden ser movilizados en la fase acuosa (son más polares), pudiendo ser transportados hasta otros suelos o ambientes acuosos (Bossert y Bartha, 1984).

1.2 LEGISLACIÓN AMBIENTAL DE SUELOS CONTAMINADOS

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

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

1.2.1 Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005) (BOE núm. 172 de 20-7-1995)

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

1.2.2 Ley de Residuos (10/1998)

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

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

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

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

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

1.2.2.1 Real Decreto de 14 de enero de 2005 (9/2005)

En él se encuentra una relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo (101 áreas de trabajo, donde quedan englobadas las 18000 actividades industriales inventariadas en el Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005)) y criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

Para declarar que un suelo está contaminado es necesario demostrar que los compuestos químicos presentes implican un riesgo inaceptable para el uso del suelo (urbano, industrial o agrícola o natural). Se define riesgo como la probabilidad de que un contaminante presente en el suelo entre en contacto con algún receptor con consecuencias adversas para la salud de las personas o para el medio ambiente. Se define riesgo inaceptable como una situación en que la frecuencia esperada de aparición de cáncer en la población expuesta exceda del 1 por 100.000 casos. Para la evaluación de los riesgos ambientales ligados a la existencia de contaminantes en suelos se seguirá la normativa europea (Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión Europea, de 28 de junio de 1994).

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

En la tabla 3.1 pueden observarse los niveles genéricos de referencia (NGR) para distintos compuestos químicos orgánicos. Los NGR son aquellas concentraciones a partir de las cuales hay que realizar un estudio de riesgos para determinar si el riesgo es aceptable según el uso del suelo, para la salud humana y para el medio ambiente. Las concentraciones de los NGR son distintas en función de que el suelo sea de uso urbano, industrial, agrícola o para la protección de los ecosistemas. Para el uso urbano del suelo se tienen en cuenta: la inhalación de vapores del suelo y partículas de suelo contaminado, ingestión de suelo y contacto dérmico con el suelo. Para un uso industrial no se tiene en cuenta el contacto dérmico, mientras que para otros usos (agrícola) se tienen en cuenta las vías de contacto del uso urbano y además la ingestión de alimentos contaminados.

Tabla 3.1. Listado de compuestos potencialmente contaminantes y sus niveles genéricos de referencia (expresados en mg kg⁻¹ suelo), según el uso del suelo, descritos en el anexo V del Real Decreto 9/2005, 14 de enero.

Componente	Uso industrial	Uso urbano	Otros usos (agrícola)	Org. Suelo ¹	Org. Acuat. ¹	Vert. Terr. ¹
Diclorometano	60	6	0.6			
1,1-Dicloroetano	100	70	7		0.06	4.18
1,2-Dicloroetano	5	0.5	0.005		0.16	0.24
1,1,2-Tricloroetano	10	1	0.1		0.16	0.3
1,2,2-Tetracloroetano	3	0.3	0.03		0.02	0.04
1,1-Dicloroetileno	1	0.1	0.01			
Tricloroetileno	70	7	0.7		0.21	0.45
Tetracloroetileno	10	1	0.1	0.01	0.06	0.15
1,2-Dicloropropano	4	0.5	0.05	4.24	0.07	0.43
1,3-Dicloropropeno	7	0.7	0.07		0.1	0.58
Acenafteno	100	60	6		0.02	4.85
Acetona	100	10	1		0.54	6.71
Aldrin	1	0.1	0.01	0.01	0.01	0.01
Antraceno	100	100	45		0.01	22
Benzo(a)antraceno	20	2	0.2	3.8	0.01	
Debenzo(a,h)antraceno	3	0.3	0.03			
Benceno	10	1	0.1	1	0.2	0.11
Clorobenceno	35	10	1	1	0.03	7.66
A,2-Diclorobenceno	100	70	7		0.11	3.15
1,4-Diclorobenceno	40	4	0.4	0.1	0.16	0.53
1,2,4-Triclorobenceno	90	9	0.9	0.05	0.79	0.94
p-Cloranilina	30	3	0.3	0.14	0.01	0.09
Clordano	1	0.1	0.01	0.04	0.01	0.01
Cloroformo	5	3	0.7		0.01	0.01
Cloruro de vinilo	1	0.1	0.01			
Cresol	100	40	4			
Criseno	100	100	20			
DDE	60	6	0.6	0.14	0.01	0.01
DDT	20	2	0.2		0.01	0.01
DDD	70	7	0.7			
Diedrin	1	0.1	0.01	0.13	0.01	0.01
1,4-Dioxano				1.45	13.9	
Endosulfano	60	6	0.6	0.01	0.01	0.04

Endrin	1	0.1	0.01		0.01	0.01
Estireno	100	100	20	0.68	0.25	100
Etilbenceno	100	20	2		0.08	4.6
Decabromofenil éter					2.66	59.7
Pentabromodifenil éter				0.32	5.18	0.01
Octabromo difenil eter					0.51	0.24
Fenol	100	70	7	0.27	0.03	23.7
2-Clorofenol	100	10	1	0.04	0.01	0.12
2,4-Diclorofenol	10	1	0.1	0.2	0.06	0.02
2,4,5-Triclorofenol	100	100	10	0.05	0.09	3.3
2,4,6-Triclorofenol	60	9	0.9	0.4	0.012	0.03
Pentaclorofenol	1	0.1	0.01	0.02	0.01	0.01
Fluoranteno	100	80	8	1	0.03	1.96
Benzo(b)Fluoranteno	20	2	0.2			
Benzo(k)fluoranteno	100	20	2			
Fluoreno	100	50	5	0.22	0.02	2.84
Heptacloro epóxido	1	0.1	0.01	11	0.29	3.7
Hexacloro benceno	1	0.1	0.01	5.7	0.01	0.01
Hexacloro butadieno	10	1	0.1		0.01	
Hexaclorociclohexano	1	0.1	0.01		0.25	0.05
Hexacloroetano	9	0.90	0.09		0.03	0.03
Naftaleno	10	8	1	0.1	0.05	0.06
PCB	0.8	0.08	0.01			
Nonilfenol				0.34	0.031	0.78
Pireno	100	60	6		0.01	1.2
Benzo(a)pireno	2	0.2	0.02	0.15	0.01	
Indeno (1,2,3-cd) Pireno	30	3	0.3			
Tetracloruro de carbono	1	0.5	0.05		0.12	
Tolueno	100	30	3	0.3	0.24	13.5
Xileno	100	100	35		0.07	
TPH	50	50	50	50	50	50

¹NGR para la protección de ecosistemas. Org. suelo: Organismos del suelo; Org. Acuát.: organismos acuáticos; Vert. Terr. vertebrados terrestres.

Sin embargo, tal y como se ha descrito anteriormente, en la UE existen diferentes NGR dependiendo del país legislador. Un ejemplo puede verse al comparar los NGR para los HAPs del Real decreto 9/2005, con los NGR que hasta la fecha tenía definidos la Generalitat de Catalunya, según la normativa holandesa (tabla 3.2). Así, el NGR para el

naftaleno es similar en las dos normativas, mientras que para el antraceno son iguales para el uso urbano pero muy diferentes para el uso industrial. Para otros HAPs como fluoranteno, criseno, benzo(a)antraceno y benzo(k)fluoranteno los NGR son muy diferentes en las dos normativas. Además en ambas normativas no se contemplan todos los 16 HAPs prioritarios de la EPA. Asimismo, cabe destacar que mientras la normativa española fija 50 mg kg⁻¹ de TPH como el umbral a partir del cual es necesario un estudio de riesgo, en la normativa holandesa se permiten hasta 5000 mg kg⁻¹ de aceites minerales (con una elevada proporción de TPH) para el uso industrial del suelo.

Tabla 3.2. Niveles genéricos de referencia expresados en mg kg⁻¹ para los 16 HAPs contaminantes prioritarios de la EPA, según el Real Decreto 9/2005 y la Generalitat de Cataluña (que sigue en parte, los NGR de la legislación holandesa).

	NGR: Real Decreto 9/2005		NGR: Generalitat de Cataluña	
	Urbano	Industrial	Urbano	Industrial
Acenaftileno	ND ¹	ND	ND	ND
Acenafteno	60	100	ND	ND
Naftaleno	8	10	5	15
Fluoreno	100	50	ND	ND
Fenantreno	ND	ND	5	10
Antraceno	100	100	100	1300
Fluoranteno	80	100	15	1000
Pireno	100	60	ND	ND
Criseno	100	100	1.5	55
Benzo(a)antraceno	2	20	10	535
Benzo(a)pireno	0.02	2	0.08	7.5
Benzo(b)fluoranteno	2	20	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	20	100	50	535
Benzo(g,h,i)perileno	ND	ND	100	535
Dibenzo(a,h)antraceno	3	0.03	ND	ND
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	ND	ND	50	535

¹ ND: no determinado

Estas marcadas diferencias, así como la ausencia de algunos compuestos, implican que todavía será necesario un tiempo para completar e incluso corregir algunos valores ya

definidos. Además, no se contempla el hecho de que los contaminantes, aún estando a una misma concentración, pueden tener efectos muy diferentes, dependiendo del suelo (tanto por la textura como por el contenido en materia orgánica) y de su biodisponibilidad real.

Una vez llevado a cabo el análisis de riesgos, si se aconseja la descontaminación del suelo, hay que tener en cuenta tanto el tiempo del proceso, como el coste económico de las diferentes metodologías potenciales.

1.3 VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

Entre las distintas tecnologías disponibles para la descontaminación de un suelo, es importante diferenciar aquéllas que suponen una solución temporal o el posible traslado del contaminante a otros compartimentos ambientales de aquéllas que potencialmente pueden transformar los contaminantes en productos inocuos (Alexander, 1999). La tecnología de la biorremediación, basada en la utilización de los microorganismos y su potencial metabólico biodegradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos (Alexander, 1999), tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos (excavación, extracción química y incineración) tanto por su menor coste económico (Ulrici, 2000), como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos (Exner, 1994; Klein, 2000)

En la tabla 3.3 puede observarse que los costes de las técnicas biológicas (*bioventing*, biopila, *landfarming* y plantas de tratamiento biológico) son mucho más rentables económicamente que las técnicas fisicoquímicas. Una consecuencia de ello es que en Alemania, en 1998, aproximadamente de las 2,2 MTm de suelo que fueron tratadas en las 109 plantas de tratamiento que dispone, un 60% fueron tratadas de forma biológica (Klein, 2000). Si tenemos en consideración que cada planta de tratamiento de suelos, tiene una capacidad de $4 \cdot 10^5 \text{ Tm año}^{-1}$, se podría llegar a tratar una cantidad de suelo 10 veces superior que la procesada en 1998.

Una de las limitaciones que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas fisicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable según las normativas. Durante un proceso de biorremediación se produce una ralentización del

proceso de biodegradación ya sea por un enriquecimiento de componentes más recalcitrantes o por una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes (Alexander, 1999; Alexander, 2000).

Tabla 3.3. Costes económico en la remediación de suelos contaminados.

Tipo de tratamiento	Coste (\$ Tm ⁻¹)	Referencias
Bioventing/Biosparging	10-140	(EPA 2004; Fan y Tafuri, 1994)
Biopila	30-110	(EPA 2004; Fan y Tafuri, 1994)
Landfarming	5-30	(EPA 2004; Fan y Tafuri, 1994)
Planta de tratamiento Biológico	30-60	(Klein, 2000)
Lavado del suelo	75-600	(Dennis <i>et al.</i> , 1994)
Calentamiento por resistividad eléctrica	30-400	(Environmental Science and Technology.Editorial, 2000)
Desorción térmica a elevada T ^a	350-450	(Environmental Science and Technology.Editorial 2000; EPA 2004)
Desorción térmica a baja T ^a	30-70	(EPA, 2004)
Incineración	500-1000	(Environmental Science and Technology.Editorial 2000)
Excavar + vertedero	35	(Environmental Science and Technology, Editorial 2000)

Sin embargo, las técnicas fisicoquímicas, aún pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de contaminantes, alteran o eliminan por completo la microbiota autóctona del suelo, modifican las características fisicoquímicas del suelo, y además, no eliminan los contaminantes, si no que los trasladan a otro compartimento ambiental. Por lo tanto no cumplen con los criterios de sostenibilidad en los que se debería basar la ley de protección de suelos.

1.4 FACTORES QUE CONDICIONAN LA BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO.

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura,

humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles.

El pH, temperatura y la humedad

Cada cepa microbiana tiene un determinado rango de tolerancia a factores ambientales como son: la temperatura, el pH y la salinidad, los cuales pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas. En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales a pH y temperaturas extremas y en suelos salinos la biodegradación se ralentiza, siendo los rangos óptimos para la biodegradación: pH entre 6-8 y temperaturas entre 20-30°C (Alexander, 1999).

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes y de los iones. Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino (Sharpley, 1991). En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6-8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4-5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4-7,8) (Dibble y Bartha, 1979). Verstraete *et al.* (1976) consiguieron duplicar la biodegradación de un suelo contaminado con gasolina incrementando el pH de 4,5 a 7,4. Para alcalinizar un suelo se utiliza arena de caliza e iones Ca^{2+} y Mg^{2+} mientras que para acidificar un suelo se utiliza FeSO_4 (Baker, 1994). Sin embargo, con poblaciones microbianas adaptadas también se ha descrito biodegradación de HAPs en suelos extremadamente ácidos a pH 2 (Stapleton, 1998).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. La mayor parte de estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas (20-30°C) son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados (ver revisión Menn *et al.* 2000). No obstante, también se ha descrito biodegradación de hidrocarburos temperaturas extremas: a 10°C en suelos subárticos y subalpinos (Sparrow y Sparrow, 1988; Margesin y Schinner, 1997a,b), 5°C en suelos árticos (Whyte *et al.*, 1999) y hasta 60°C por una cepa termófila de

Bacillus stearothermophilus aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Sorkoh *et al.*, 1993).

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica. Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como también la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Alexander, 1999; Menn *et al.*, 2000). Dibble y Bartha (1979), describieron un rango de humedad óptimo del 30-90% de la capacidad de campo para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, mientras que Lajoie y Strom (1994) y Pramer y Bartha (1972), recomendaron llevar a cabo procesos de biorremediación a una humedad entre el 50 y 70% de la capacidad de campo. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos suele utilizarse una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (Menn *et al.*, 2000).

Estructura química

De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los *n*-alcanos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C₁₀-C₂₀) son los sustratos más fácilmente degradables por los microorganismos del suelo, y que por lo tanto tienden a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo, los alcanos de cadena larga (>C₂₀) son más difíciles de degradar debido a su (elevado peso molecular) y su baja solubilidad en agua (Chaîneau *et al.*, 1995). Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que los *n*-alcanos y alcanos ramificados. Asimismo, los HAPs que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HAP de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad (Kästner, 2000). Las fracciones de resinas y asfaltenos son las que presentan una menor

degradabilidad debido a la complejas estructuras químicas y al elevado peso molecular de sus moléculas (Harayama *et al.*, 1997, 1999).

Biodisponibilidad

La tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los microorganismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la adsorción, la absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes (Stucki y Alexander, 1987; Tabak *et al.*, 1994 y 1995; Harms *et al.*, 1996; Bosma *et al.*, 1997). Un fenómeno que afecta de forma negativa a la biodisponibilidad de los contaminantes es el envejecimiento o *ageing* que se define como la pérdida de la biodegradabilidad de los compuestos a lo largo del tiempo en el suelo (aunque la población microbiana mantenga intacto su potencial catabólico), el cual es más importante en suelos con elevado contenido en materia orgánica (Huesemann, 1995; Nocentini, 2000; Breedveld y Sparrevik, 2001). Este efecto se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción con la materia particulada del suelo, absorción a la materia orgánica del suelo, a la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos; a la disolución en fases líquidas no acuosas (FLNAs), o a la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo (Loosdrecht *et al.*, 1990; Weissenfels *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1993; Alexander, 1995; Shuttleworth y Cerniglia, 1995; Alexander, 1999; Bosma *et al.*, 1997). Con la finalidad de aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes existen numerosos ejemplos en la bibliografía de la utilización de tensioactivos sintéticos y biotensioactivos en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Volkering y Breure, 1998 ; Chritofi y Ivshina, 2002)

Presencia de aceptores de electrones

La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O₂ como aceptor final de

electrones), ya que en ausencia de O_2 , y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} y Fe^{3+}) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Holliger y Zehnder, 1996; Grishchenkov *et al.*, 2000; Boopathy, 2002; Massias *et al.*, 2003).

Nutrientes inorgánicos

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo (Menn *et al.*, 2000).

La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Dott *et al.*, 1995; Breedveld y Sparrevik, 2001; Chaineau *et al.*, 2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (U.S. EPA, 1995), y dentro de este intervalo se han descrito proporciones C:N de 600:10 (Dibble y Bartha, 1979), 500:10 (Zhou y Carwford, 1995) y de 100:10:1 a 300:10:1 respecto al COT a degradar (Bossert y Bartha, 1984, Oudot y Dutrieux, 1989; Alexander, 1999; Atagana *et al.*, 2003). Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos. Morgan y Watkinson (1992) describieron una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico. Asimismo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación (Zhou y Crawford, 1995; Margesin y Schinner, 1997; Genouw *et al.*, 1994). Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA[®] 22) para la biorremediación de suelos contaminados (Lindstrom *et al.*, 1991; Pritchard y Costa, 1991) Además es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amonio se puede

unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio) (Morgan y Watkinson ,1992).

1.5 FASES NECESARIAS PARA LA APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE LA BIORREMEDIACIÓN

Para la implantación de una tecnología de biorremediación se deben llevar a cabo una serie de etapas. En cada una de ellas están implicados distintos profesionales (hidrogeólogos, químicos ambientales, microbiólogos e ingenieros) que deberán trabajar de forma coordinada. A título de resumen deben cumplirse las siguientes etapas:

- I. Investigación del emplazamiento en relación con los contaminantes, el tipo de suelo y el entorno (caracterización fisicoquímica del suelo, estudio geotécnico e hidrogeológico y análisis de riesgos).
- II. Desarrollo de ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio
- III. Desarrollo de ensayos a escala piloto
- IV. Implantación de la tecnología de biorremediación escogida

1.6 LOS ENSAYOS DE TRATABILIDAD EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

Para evaluar si un tratamiento biológico es apropiado para la descontaminación de un suelo, es necesario caracterizar tanto las poblaciones microbianas como la biodegradabilidad de los contaminantes del suelo. Además, debido a que existen una gran variedad de parámetros fisicoquímicos y biológicos que condicionan el proceso de biorremediación, también es necesario evaluar la influencia de los factores que afectan al proceso de la biodegradación. Para ello se diseñan los ensayos de tratabilidad, que se definen como un conjunto de experimentos realizados a escala de laboratorio, previos a la implementación de cualquier tecnología de biorremediación a un suelo contaminado (Cattaneo *et al.*, 1997; Dibble y Bartha, 1979; Zhou *et al.*, 1995).

Es importante destacar que los ensayos de tratabilidad se realizan en la fase posterior a la caracterización hidrogeológica del emplazamiento así como a la

identificación del tipo, grado y distribución de la contaminación, y que por lo tanto, es necesario que sean sencillos y rápidos debido a que generalmente, la aplicación de la biorremediación en enclaves contaminados, necesitan de una actuación urgente, ya sea por motivos medioambientales como por motivos legales.

Los ensayos de tratabilidad representan una parte muy pequeña de los costes totales de recuperación de cualquier emplazamiento y, sin embargo, la información que pueden proporcionar es fundamental ya que pueden disminuir el coste final, y lo que es más importante, aumentar las posibilidades de éxito en la descontaminación del suelo.

En la figura 3.2 puede observarse el diagrama de flujo que sigue el protocolo que se ha diseñado.

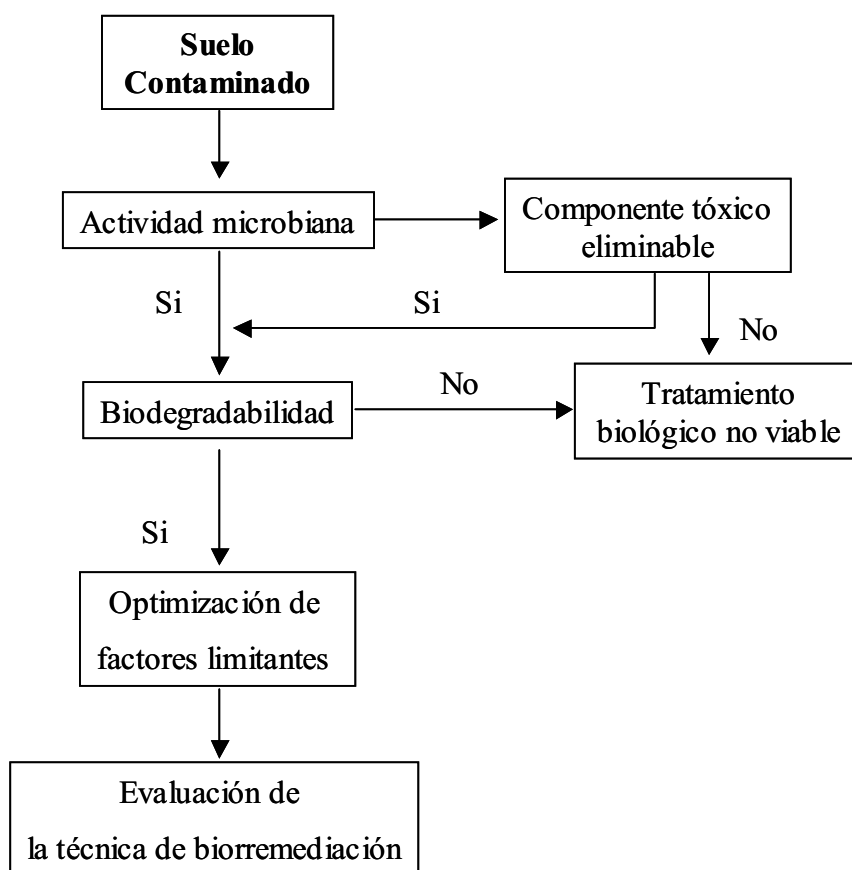


Fig. 3.2. Diagrama de flujo de los pasos previos necesarios para la implementación de la biorremediación de un suelo contaminado, en los que están basados los ensayos de tratabilidad.

En primer lugar se debe llevar a cabo una caracterización microbiológica, y determinar la cantidad de población microbiana degradadora de los contaminantes y su proporción respecto a la población total heterótrofa de la microbiota indígena del suelo contaminado. Además es necesario evaluar si la población microbiana autóctona está metabólicamente activa o es activable en condiciones de bioestimulación. Una vez caracterizado el suelo, los contaminantes y la población microbiana, es necesario determinar la biodegradabilidad de los contaminantes mediante ensayos rápidos de biodegradabilidad (fase I) y en caso afirmativo evaluar los factores fisicoquímicos y biológicos que afectan a la biodegradación (fase II), en ensayos de microcosmos.

2 OBJETIVOS

- I. Diseñar un protocolo de ensayos de tratabilidad a escala de laboratorio, para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos
- II. Aplicar el protocolo a dos suelos contaminados por hidrocarburos
- III. Evaluar la información generada para su posible validación.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los hidrocarburos (líquidos y sólidos) se obtuvieron de las casas comerciales Fluka, Aldrich o Sigma. Los disolventes, principalmente utilizados para procesos de extracción, fueron de calidad para análisis de residuos orgánicos de la casa comercial Baker. Todos los compuestos utilizados fueron de la mayor pureza disponible comercialmente. El agua utilizada fue bisdesionizada calidad Milli-Q.

3.2 MUESTRAS DE SUELO

Se han llevado a cabo ensayos de biotratabilidad a escala de laboratorio en dos suelos contaminados por hidrocarburos.

3.2.1 Suelo A:

Se obtuvo de una zona industrial abandonada en las proximidades de Barcelona. Se recogieron cuatro muestras de suelo que se tamizaron (<1 cm de diámetro) y se combinaron.

Como puede observarse en el cromatograma (GC-FID) de la figura 3.3, la matriz contaminante del suelo es rica en aceites minerales, y se encuentra en una elevada concentración de TPH (20970 mg kg⁻¹ suelo). En la tabla 3.4 se muestran las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo, de las cuales son destacables, el alto contenido en carbono orgánico total (2,1%) coincidente con la elevada concentración de TPH, un contenido en nutrientes inorgánicos muy bajo (< 0,1 mg kg⁻¹ suelo) que se correspondía con una conductividad eléctrica baja (164 μS cm⁻¹) y un bajo contenido en arcillas y limos (5%). El pH era neutro-básico, y las poblaciones microbianas heterótrofa y degradadora eran abundantes (3,8 x 10⁷ y 1,8 x 10⁶ NMP g⁻¹ de suelo, respectivamente).

3.2.2 Suelo B:

Se obtuvo de una zona industrial abandonada en las proximidades de Santander. Se recogieron cuatro muestras de suelo que se tamizaron (<1 cm de diámetro) y se combinaron.

Como puede observarse en el cromatograma (GC-FID) de la figura 3.3, la matriz contaminante del suelo es rica en fracción saturada del petróleo muy pesada y no identificable que contiene el 91% de TPH, mientras que el 9% restante lo componen HAPs.

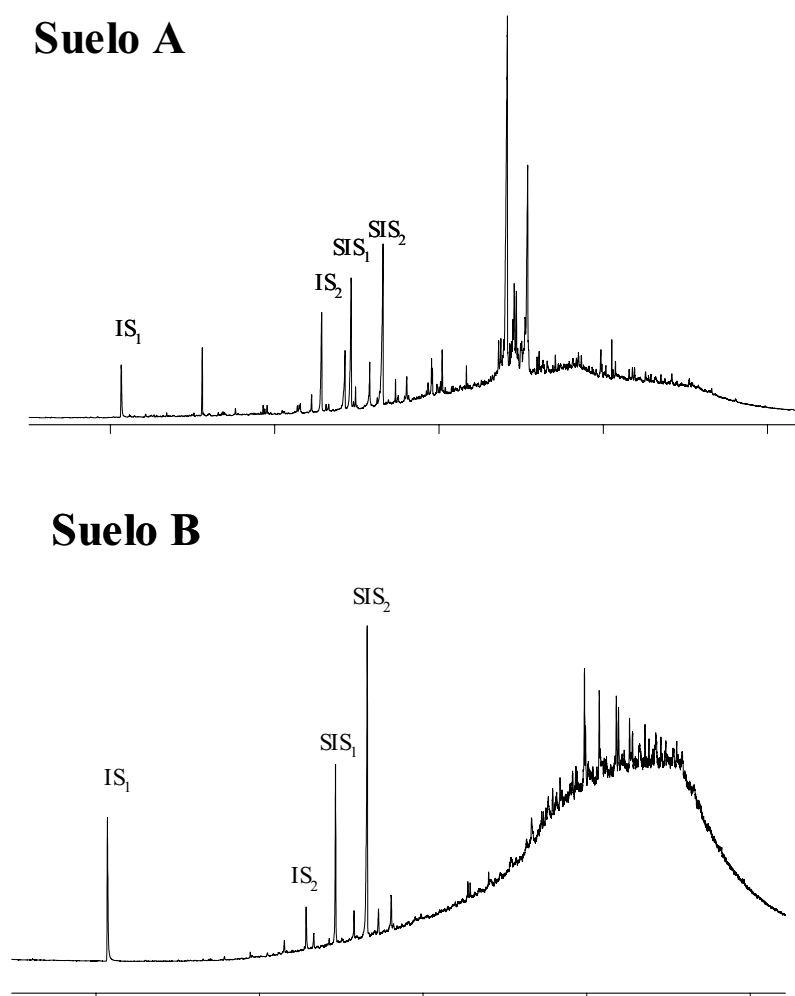


Fig. 3.3. Perfiles cromatográficos (GC-FID) de los TPH del suelo A y suelo B. IS₁ e IS₂ corresponden a estándares internos (naftaleno-*d*₈ y α-androstano respectivamente); SIS₁ y SIS₂ corresponden a estándares internos *surrogates* (antraceno-*d*₁₀ y ortoterfenil respectivamente).

En la tabla 3.4 se muestran las principales características fisicoquímicas y microbiológicas de ambos suelos. Son destacables en el suelo B, el alto contenido en carbono orgánico total (5,2%), un contenido en nutrientes inorgánicos muy bajo ($\leq 1 \text{ mg kg}^{-1}$) que se correspondía con una conductividad eléctrica muy baja del suelo ($90 \mu\text{S cm}^{-1}$) y un bajo contenido en arcillas y limos (5%). El pH era neutro-básico, y las poblaciones microbianas heterótrofa y degradadora eran abundantes aunque un orden de magnitud inferiores que el suelo A ($2,9 \times 10^6$ y $5,6 \times 10^5 \text{ NMP g}^{-1}$ de suelo, respectivamente)

Tabla 3.4. Características físico-químicas y microbiológicas de los suelos A y B.

	Suelo A	Suelo B
Textura	Arena/gravas 95% Limos + Arcillas 5%	Arena/gravas 99% Limos + Arcillas 1%
COT ¹ (% p/p)	2,1	5,2
Nitrógeno total (% p/p)	0,21	<0,01
Capacidad de campo (%)	28,5	13,2
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	164	90
pH	7,8	8,2
Nitrato + nitrito (mg kg^{-1} suelo)	<0,1	0,85
Amonio (mg kg^{-1} suelo)	<0,1	<0,1
Fosfato (mg kg^{-1} suelo)	<0,1	1,0
EOT ² (mg kg^{-1} suelo)	23016	31700
TPH ³ (mg kg^{-1} suelo)	20970	25700
HAPs ⁴ (mg kg^{-1})	ND	1987
Heterótrofos	$3,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$
Degradadores <i>n</i> -alcanos	$1,8 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$
Degradadores de HAPs	ND	$2,2 \times 10^5$

¹COT: carbono orgánico total. ²EOT: extracto orgánico total. ³TPH: hidrocarburos totales del petróleo.

⁴HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos. ND: no determinado

3.3 PROTOCOLO DEL ENSAYO DE TRATABILIDAD

Los ensayos de biotratabilidad incluyeron 2 fases de estudio (fig. 3.4).

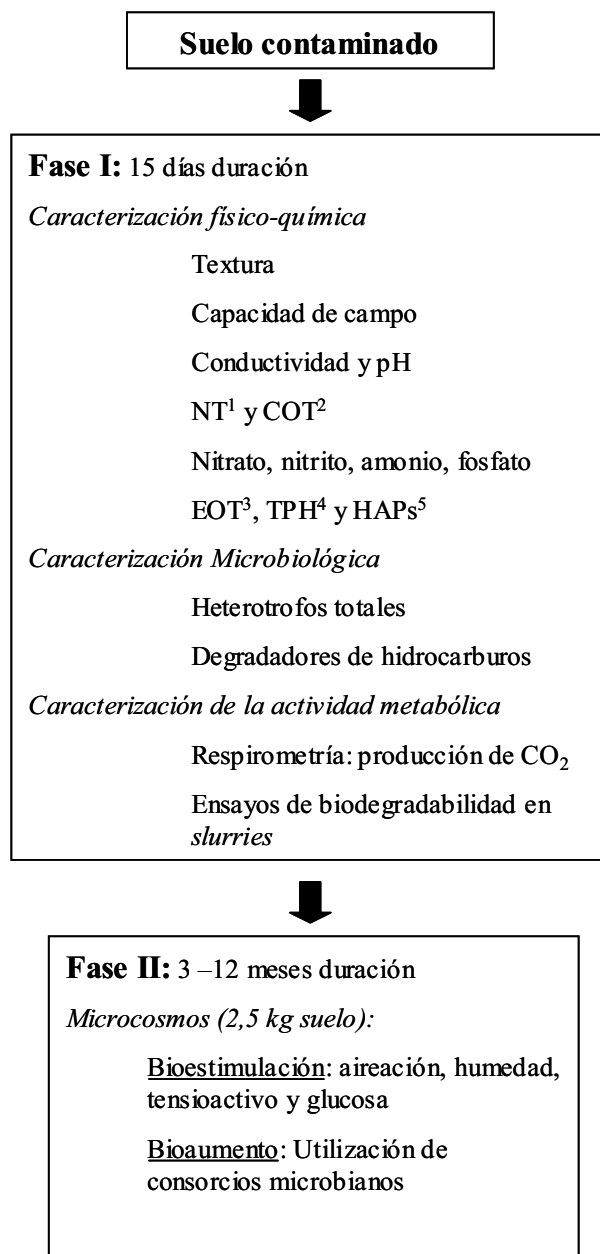


Fig. 3.4. Fases de estudio presentes en el estudio de tratabilidad de un suelo contaminado por hidrocarburos. ¹NT: nitrógeno total; ²COT: carbono orgánico total. ³EOT: extracto orgánico total. ⁴TPH: hidrocarburos totales del petróleo. ⁵HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La primera fase consistió en un estudio a corto plazo, basado en una caracterización físicoquímica, microbiológica y ecotoxicológica del suelo. Se llevó a cabo un estudio respirométrico del suelo (producción de CO₂) en diferentes condiciones de bioestimulación, para determinar si la microbiota presente en el suelo era activa metabólicamente o potencialmente activa. También se llevó a cabo un ensayo de Microtox[®] como indicador de la presencia de posibles inhibidores y ensayos rápidos de

biodegradabilidad en *slurries* (resuspensiones del suelo en agua y nutrientes inorgánicos). Los resultados obtenidos en la primera fase del protocolo tuvieron como objetivo determinar si el suelo contaminado era apto para aplicar la tecnología de la biorremediación.

La segunda fase consistió en un estudio a medio-largo plazo en microcosmos con 2,5 kg de suelo, donde se evaluaron distintos tratamientos de bioestimulación y bioaumento.

3.3.1 Análisis fisicoquímico del suelo

3.3.1.1 Determinación de la textura del suelo

La textura de un suelo es la cantidad relativa de arenas, limos y arcillas expresadas en porcentaje (%) de la fracción mineral del suelo una vez tamizado por un tamiz de 2 mm de diámetro de malla. Se define como arena al particulado con tamaños comprendidos entre 0,05 mm y 2 mm de diámetro; limos al particulado entre 2 μm y 50 μm y arcillas al particulado con diámetro inferior a 2 μm .

Para determinar la textura de un suelo existen dos posibles metodologías: una basada en la utilización de tamices con distinto diámetro de poro y otra basada en las diferentes velocidades de sedimentación del particulado según la ley de Stockes. Debido a que los suelos contaminados contenían un elevado nivel de contaminación, y que por lo tanto podían existir agregaciones difíciles de separar y analizar según la técnica de los tamices, finalmente se utilizó la técnica de la sedimentación según Gee y Bauder (1986). Para ello, primero se eliminó la materia orgánica, mezclando 20 gramos de suelo tamizado por 2 mm, con 50 ml de H_2O_2 en una botella de cristal de 1000 ml de capacidad nominal, y se dejó reposar hasta que la efervescencia desapareció. Posteriormente se añadieron 40 ml de dispersante $(\text{NaPO}_3)_6$ 1N, y se llevó el conjunto a un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para desagregar el cemento interparticular. Posteriormente, se llevó todo el contenido a una probeta de cristal de 1000 ml de capacidad y se enrasó a un volumen final de 1000 ml con agua desionizada y se mezcló por inversión durante 2 minutos tapando la probeta con Parafilm[®] y se dejó sedimentar el particulado, recogiendo volúmenes de 5 ml de la suspensión a 5 cm de la superficie en diferentes momentos según la ley de Stockes.

Se obtuvo una alícuota inicial justo después de la agitación inicial, para determinar el peso seco del conjunto de arenas, limos y arcillas. Los limos y arcillas se recogieron a los 40 segundos y los limos a las 2 horas. Se tuvo en cuenta el efecto del dispersante en el peso seco final, obteniendo alícuotas sin suelo pero con el dispersante utilizado.

3.3.1.2 Determinación de la humedad y la capacidad de campo

La humedad de un suelo se define como la cantidad de agua que existe en un suelo, referida en porcentaje (% p/p). Para ello se secaron muestras de suelo, a 105°C durante 16 horas, en viales de vidrio previamente tarados y se calculó el contenido de agua del suelo por diferencia gravimétrica.

La capacidad de campo, se refiere a la cantidad máxima de agua (expresada en valores de humedad) que es capaz de retener el suelo justo en el momento que llega al estado de saturación. Para su determinación es necesario saturar el suelo con agua, y eliminar el exceso de agua por gravedad. Finalmente, se determina el contenido de agua (humedad) del suelo cuando ya no se libera agua por escorrentía. Para ello se emplearon viales de plástico de 100 ml de capacidad nominal, que se perforaron en su base (1 cm de separación entre poros) y se añadió fibra de vidrio para evitar que se escapara el particulado del suelo cuando se encontrara colmatado de agua. A continuación se añadieron 30 gramos de suelo secado 16h a 105°C, y se taró el conjunto. Posteriormente se colmató el suelo con agua y se dejó que el exceso de agua se eliminara por gravedad. Finalmente se determinó la humedad del suelo saturado (cuando ya no perdía agua por gravedad), obteniéndose así la capacidad de campo del suelo.

3.3.1.3 Determinación del carbono orgánico total (COT) y del nitrógeno total

El COT y el nitrógeno total se cuantificaron por combustión en un NA2100 Protein Nitrogen Analyzer (Thermoquest CE Instruments). La técnica de la combustión calcula el carbono y nitrógeno total de una muestra, por lo que también detecta el carbono inorgánico (carbonatos) de la muestra.

Para determinar el carbono orgánico, se eliminaron los carbonatos de la muestra de suelo mediante acidificación de acuerdo con el método ISO 10694. Para ello se utilizaron 0,5 g de muestra tamizada por 2 mm y triturada en un mortero de vidrio, que se depositó en

un vaso de precipitados de 50 ml de capacidad nominal. A continuación se añadió HCl 4M hasta no observarse efervescencia. Se agitó 30 minutos a 60°C para que se liberaran totalmente los carbonatos. Se ajustó el pH a 7,5-8 añadiendo MgO (previamente muflado a 900 °C durante 30 minutos y conservado en un desecador con silicagel y NaOH como trampa de CO₂). Finalmente se secó el conjunto a 60°C, se pulverizó la costra seca resultante y se analizó el COT y el nitrógeno total por combustión.

3.3.1.4 Determinación de la concentración de nutrientes inorgánicos

Los nutrientes inorgánicos (nitrato, nitrito, fosfatos y amonio) fueron determinados por cromatografía iónica a partir de lixiviados de resuspensiones de suelo con agua bidesionizada en proporción 1:10 (p/v) según Page *et al.* (1982). Para ello se mezclaron 10 gramos de suelo con 100 ml de agua bidesionizada, se agitó horizontalmente durante 1 hora a 250 rpm y se dejó reposar durante 30 minutos. Se utilizaron alícuotas filtradas por 0,45 µm para los posteriores análisis.

3.3.1.4.1 Nitratos, nitritos y fosfatos

Se determinaron los nitratos, nitritos y fosfatos a partir de lixiviados con una conductividad inferior a 1000 µS cm⁻¹, en un equipo de cromatografía iónica equipado con un sistema de bombeo Waters 515, una columna Waters IC-PAK Anions (Waters Corporate) y un detector UV/V Kontron 332 (Kontron Instruments) y un detector de conductividad Wescan (Wedan Instruments). Cabe destacar que no se pudieron analizar lixiviados preparados en KCl 2M, (método recomendado debido al intercambio iónico), debido a que la elevada conductividad que presentaban, obligaba a una excesiva dilución del lixiviado, y además, el ión cloruro a elevadas concentraciones eclipsaba la señal del nitrito. Por estos motivos se decidió realizar los lixiviados en agua bidesionizada y no con KCl 2M.

3.3.1.4.2 Amonio

A partir de los lixiviados filtrados se determinaron las concentraciones de amonio por el método automatizado del fenato según Standard Methods 4500-NH₃ H, (American Public Health Association, 1992) en un Technicon Autoanalyzer II (Bran and Luebbe Analyzing Technologies Inc.)

3.3.1.5 Determinación del pH

La determinación del pH en suelo se realizó según el método de la pasta saturada en una suspensión de suelo:agua en proporción 1:2,5 (p/v). Para ello se resuspendieron 10 g de suelo en 25 ml de agua, se agitó la mezcla durante 40 minutos y se midió el pH en un Crison micro pH 2000 (Crison).

3.3.1.6 Determinación de la conductividad eléctrica

Para calcular la conductividad eléctrica del suelo (parámetro relacionado con la presencia de iones en el suelo) se partió de una resuspensión suelo:agua en proporción 1:5 (p/v) que se agitó en un shaker durante 1 hora a 200 rpm. Se midió la conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$) de la resuspensión en un conductímetro Crison 522 (Crison)

3.3.2 Estudio de la población microbiana

3.3.2.1 Determinación de la población microbiana heterótrofa y degradadora de alcanos.

La enumeración de la población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos se llevó a cabo utilizando la técnica del número más probable (NMP) miniaturizado (Wrenn y Venosa, 1996) tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.6.2.2 del capítulo I.

3.3.2.2 Ensayos de respirometría

Para evaluar si la población microbiana existente en el suelo era activa metabólicamente o potencialmente activa, se llevaron a cabo una serie de ensayos respirométricos, que consistieron en la cuantificación del CO_2 producido por la microbiota indígena del suelo en diferentes condiciones. Los suelos se analizaron con una humedad equivalente al 60% de capacidad de campo (CC) y a temperatura de laboratorio ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) durante 10 días. Sin embargo, en el suelo B se alargó el ensayo hasta 40 días debido a su baja actividad metabólica. Se llevaron a cabo los siguientes ensayos por duplicado y en réplicas independientes:

1. Suelo sin tratar (60% CC),
2. Suelo (60% CC) con nutrientes (15 mg de NH₄Cl y 2 mg de K₂HPO₄)
3. Suelo (60% CC) con nutrientes y glucosa (1% p/p) como sustrato fácilmente asimilable para evaluar la actividad metabólica potencial de la microbiota indígena.
4. Control negativo (sin suelo). El CO₂ cuantificado en este ensayo se restaba de los ensayos con suelo.

Para ello se utilizaron 10 g de suelo, en viales de plástico (de 100 ml de capacidad) estériles. Se depositaron los viales con suelo en jarras de cristal de 1l de capacidad, herméticamente tapadas, que contenían 50 ml de agua, para mantener las condiciones de humedad. Se utilizaron 10 ml de NaOH 0,2N, dentro de viales de centelleo de 20 ml de capacidad, que se ubicaron dentro de la jarra de cristal, como trampa de CO₂. Periódicamente (cada 24-48 horas) se sustituían las trampas de CO₂ por otras nuevas recién preparadas.

Se determinó la cantidad de CO₂ producido mediante titulación ácido base del NaOH libre según las reacciones químicas que se muestran en la figura 3.5

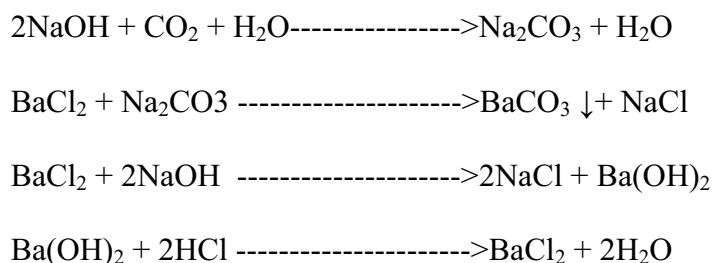


Fig. 3.5. Reacciones químicas que se producen durante el ensayo de respirometría.

Tal y como se puede observar en la figura 3.5 antes de realizar la titulación ácido base, se precipitó el Na₂CO₃ resultante con 10 ml de BaCl₂ (0,2N). La valoración ácido base se realizó utilizando un volumen x de HCl (0,1N) necesario para virar el medio, donde se añadieron 3 gotas de fenofaleina (1mg fenofaleina ml⁻¹ etanol 95%) como indicador.

Durante la producción de CO₂, una parte del NaOH se combina con el CO₂ y otra parte queda libre (fig. 3.5). Para calcular la producción de CO₂ se tuvo en cuenta que 10

ml. de NaOH (0.2N) se corresponden a 1 mmol de CO₂. Se determinó la porción de NaOH residual (en la titulación se utilizan x ml. de HCl 0.1N, correspondiente a x/2 ml. de NaOH 0.2N) y, por diferencia, se calculó la cantidad de NaOH consumida (10 - (x/2)). Esta cantidad al mutiplicarla por el factor 10⁻⁴ (1 ml NaOH = 10⁻⁴ moles de CO₂) proporcionó los moles de CO₂ desprendido. La expresión matemática final fue:

$$\text{mmoles CO}_2 \text{ producido} = 1 - (0,05 \times \text{ml utilizados de HCl } 0,1\text{N})$$

3.3.3 Ensayos de toxicidad

La determinación de la toxicidad aguda de lixiviados del suelo y del EOT, se llevó a cabo mediante el test de Microtox[®] (Azur Environmental Inc.). Este ensayo se basa en el principio de que cuanto mayor es la toxicidad de una muestra (para *Vibrio fischeri*), menor es la emisión de luz. En el ensayo de Microtox[®] se determina la EC₅₀, la cual se define como la concentración de la muestra en la que se observa una disminución del 50% de la emisión de luz original de *Vibrio fischeri*. Para ello se estudia el efecto de diferentes concentraciones problema en la emisión de luz mediante un fotomultiplicador. Posteriormente se obtiene, matemáticamente, la EC50 a partir de la función dosis-respuesta.

Para ello, se reconstituyeron liofilizados comerciales (Microbics Corporation) de *Vibrio fischeri* según las instrucciones del fabricante y se incubaron a 15°C durante 30 minutos, frente a un banco de diluciones de lixiviados de suelo o de EOT de suelo. Los lixiviados de suelo se obtuvieron de acorde con el protocolo de Microtox[®] en fase sólida, según instrucciones del fabricante. Para obtener los lixiviados de suelo se resuspendieron 7 g de suelo en 35 ml de NaCl 3,5% (p/v) y se agitó durante 10 minutos con muesca magnética. A continuación se filtraron 5 ml (2 cm por debajo de la superficie) en filtros de 0,45 µm de diámetro de poro y se hizo un banco de diluciones del lixiviado filtrado con NaCl 3,5% como solvente. El EOT del suelo (apartado 3.3.6.1) se diluyó en un banco de diluciones con DMSO como solvente.

3.3.4 Ensayos rápidos de biodegradabilidad en suelo resuspendido en agua (*slurries*)

3.3.4.1 Tratamientos

Para determinar la biodegradabilidad de los contaminantes de los suelos A y B, se diseñaron una serie de experimentos de biodegradación a escala de laboratorio en condiciones óptimas y de incubación corta. Para ello se utilizaron Erlenmeyers de 250 ml de capacidad nominal con resuspensiones de 12,5 g de suelo, tamizado por 2 mm, en 50 ml de agua bidesionizada. Se incubaron durante 20 días, en oscuridad, a 25°C y en agitación horizontal a 200 rpm. Los distintos tratamientos se hicieron por duplicado con réplicas independientes:

1. Suelo no tratado
2. Suelo suplementado con nutrientes inorgánicos (NH_4NO_3 y K_2HPO_4) a una concentración final equivalente a la proporción molar 100C:10N:1P en relación al COT.
3. Suelo con nutrientes inorgánicos y formaldehído al 3% (v/v) (control abiótico)

3.3.4.2 Análisis químico

Se analizaron las concentraciones finales de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) tanto de la fase acuosa de los *slurries* como del suelo.

Para obtener el extracto orgánico total de la fase acuosa, se llevó a cabo una extracción seriada (3 series) líquido-líquido con 20 ml de diclorometano por serie, en un embudo de decantación. El extracto orgánico total de la fase sólida (suelo) se obtuvo mediante extracción en Soxhlet tal y como se describe en el apartado 3.3.6.1. Los extractos orgánicos se secaron en embudos conteniendo Na_2SO_4 anhidro y posteriormente se combinaron y se concentraron en un rotavapor (Büchi) y corriente de N_2 hasta un volumen final de 1 ml. Para obtener los TPH se llevó a cabo un fraccionamiento del EOT por cromatografía en columna, tal y como se describe en el apartado 3.3.6.2. Los TPH se cuantificaron por gravimetría.

3.3.5 Ensayos con microcosmos

Para simular condiciones ambientales próximas a situaciones de bioremediación reales, pero en condiciones óptimas de biodegradación aeróbica, se prepararon una serie de microcosmos donde se estudiaron diferentes condiciones de bioestimulación y bioaumento. Para ello se utilizaron bandejas de aluminio con 2,5 kg de suelo tamizado por 0,6 cm, tapados para evitar la fotooxidación y contaminaciones cruzadas. Se ajustaron todos los microcosmos a una humedad equivalente al 60% de la capacidad de campo de cada suelo (tabla 3.4). Esta humedad se ha utilizado en varios estudios de biorremediación de suelos contaminados (Dibble y Bartha, 1979; Margesin, *et al.*, 2000). Para facilitar la aireación del suelo y para ajustar la humedad óptima al 60% CC, se agitó mecánicamente el suelo con una espátula estéril y se añadió el agua destilada necesaria dos veces por semana. Los microcosmos se incubaron durante 360 días a temperatura ambiente (15-30°C) protegidos de la luz.

Se llevaron a cabo 5 tratamientos distintos por duplicado, con réplicas independientes, para el suelo A y para el suelo B, 4 de bioestimulación y 1 de bioaumento.:

1. Tratamiento base (B): Suelo 60% CC: suelo aireado dos veces por semana mediante agitación mecánica y con una humedad equivalente al 60% de CC mantenida mediante la adición de agua bidesionizada durante los procesos de mezcla.
2. Tratamiento con nutrientes (N): Tratamiento base con adición de nutrientes inorgánicos (NH_4NO_3 y K_2HPO_4) en dos adiciones en los primeros 30 días de incubación, y a una concentración final equivalente a la proporción molar 100C:10N:1P respecto al COT.
3. Tratamiento con tensioactivo (NS): Tratamiento con nutrientes con adición del tensioactivo Tween 80 (0,25 % p/v del agua intersticial).
4. Tratamiento de bioaumento (NI): Tratamiento con nutrientes con adición de inóculos microbianos. Se inoculó con la cantidad necesaria para alcanzar una población final de 10^8 microorganismos g^{-1} de suelo. Se utilizó el consorcio microbiano TD, especializado en la degradación de gasoil, para inocular el suelo A

y el consorcio microbiano F1AA, especializado en la degradación de fracciones pesadas de crudo de petróleo, para inocular el suelo B (Viñas *et al.*, 2002). Se eligieron estos consorcios como inóculos, debido a que la fuente de carbono y energía a la que están especializados es similar en composición, a la matriz contaminante del suelo A y B respectivamente (fig. 3.6). La obtención de la biomasa microbiana necesaria para la inoculación de los microcosmos, se obtuvo mediante crecimientos previos de los consorcios en LB, tal y como se especifica en el apartado 3.6.2.1 del capítulo I. La inoculación fue a los 0 días y a los 270 días.

5. Tratamiento con sustrato fácilmente asimilable (NG): Tratamiento con nutrientes con la adición de glucosa a una concentración final del 0,2% (p/p suelo).

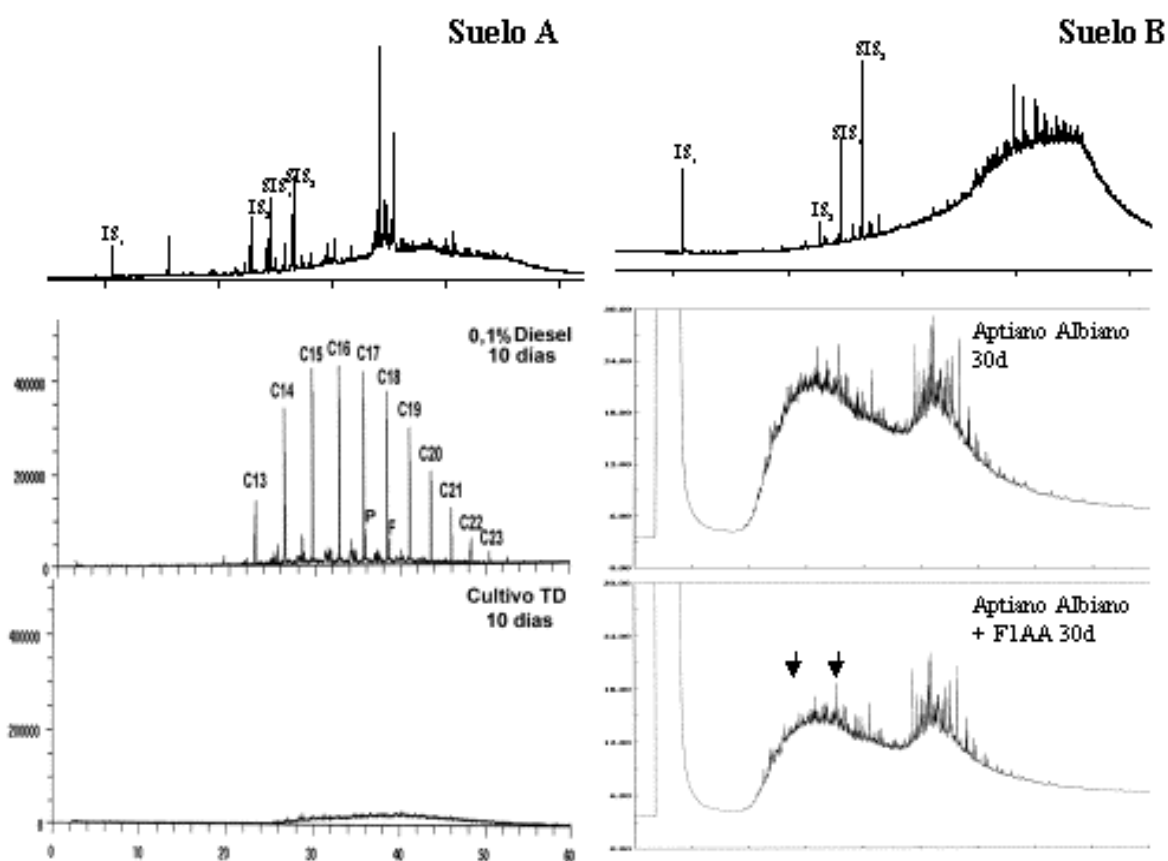


Fig. 3.6. Perfiles cromatográficos (GC-FID) del suelo A y el suelo B comparados con los perfiles de gasoil y crudo Aptiano Albiano degradados por los consorcios TD y F1AA respectivamente.

Cabe destacar que para cada suelo se mantuvieron como controles 2 microcosmos con suelo no alterado, sin aireación, adición de aditivo ni humedad corregida durante los 360 días de incubación. Además en el suelo A, los nutrientes inorgánicos desaparecieron a los 270 días de incubación y se añadieron nuevamente a la concentración establecida.

3.3.6 Análisis químico de hidrocarburos

Durante los 360 días de incubación se determinó la concentración de TPH en los microcosmos a los 0, 30, 60, 90, 180, 270 y 360 días (el suelo A se incubó 360 días y el suelo B 270 días). Para ello se combinaron 2 submuestras de 10 g de cada microcosmos (cada tratamiento se realizaba por duplicado en microcosmos independientes) que se secaron al aire durante 16 horas y posteriormente se tamizaron por 2 mm. A partir de estas muestras tamizadas se inició el análisis químico de hidrocarburos.

3.3.6.1 Extracto orgánico total (EOT)

Para obtener el EOT de las muestras de suelo de los microcosmos se llevó a cabo una extracción por Soxhlet de 10 gramos de suelo tamizado por 2 mm, mientras que en la fase de los *slurries*, se filtraron en papel de filtro (previamente limpiado con diclorometano) y se dejó secar el contenido entre 1 y 3 días para poder llevar a cabo la extracción del EOT por Soxhlet. Para ello (en ambos casos), antes de la extracción se añadió ortoterfenil y antraceno- d_{10} como estándares internos de tipo *surrogate* a una concentración final en el suelo de $80 \mu\text{g g}^{-1}$ y $40 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, a partir de *stocks* de 1mg ml^{-1} en acetona. Se dejó evaporar la acetona y, a continuación, se añadieron 10 g de Na_2SO_4 anhidro y se mezcló el conjunto. A partir de esta mezcla, se llevó a cabo la extracción en Soxhlet durante 24 horas, utilizándose como solvente la mezcla diclorometano:acetona, en proporción volumétrica 1:1. El extracto orgánico resultante (100 ml) se deshidrató en una columna de Na_2SO_4 anhidro (10cm longitud x 2,5 cm ancho) y posteriormente se evaporó en un rotavapor (Büchi) hasta 1 ml final.

3.3.6.2 Hidrocarburos totales del petróleo (TPH)

La fracción TPH se define como aquellos hidrocarburos del EOT pertenecientes a la fracción saturada (F1) y la fracción aromática (F2), según el método 3611b de la EPA

(US Environmental Protection Agency, 1996). Para ello se fraccionaron 0,6 ml de EOT (concentrado a 1 ml) por cromatografía en columna de alúmina, según el método EPA3611. Las fracciones saturada (F1) y aromática (F2) se concentraron hasta 1 ml mediante rotavapor (Büchi) y corriente moderada de N₂. Se combinaron 0,6 ml de cada fracción concentrada para obtener la fracción TPH analizable por gravimetría y se combinaron los 0,4 ml restantes para determinar la concentración de TPH mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID).

El análisis de GC-FID se realizó en un cromatógrafo de gases Trace 2000 series (Thermoquest CE Instruments). Antes de analizar las muestras por GC-FID se añadieron como estándares internos, α -androstano (utilizado para cuantificar hidrocarburos alifáticos) y naftaleno-*d*₈ (utilizado para cuantificar hidrocarburos aromáticos) a una concentración de 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Los compuestos fueron separados en una columna capilar DB-5 (J &W Scientific) con una longitud de 30 metros y 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de fase de 0,25 μm . El detector y el inyector se programaron a una temperatura constante de 320°C y 280°C respectivamente. El programa térmico se describe a continuación: Temperatura inicial de 60°C durante 5 minutos, seguido de un gradiente de 3°C min⁻¹ hasta una temperatura final de 320°C que se mantuvo durante 13 minutos. El gas portador fue helio de máxima pureza con un flujo constante de 1.1 ml minuto⁻¹ y el volumen de inyección fue de 1 μl en modalidad *splitless* durante 30 segundos. La concentración de TPH, se calculó aplicando la recta de calibración construida a partir de las áreas totales de cromatogramas conteniendo distintas concentraciones de un estándar comercial de hidrocarburos alifáticos (rango C₁₀-C₄₀) (Accustandard).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las 2 fases establecidas en el protocolo de ensayos de tratabilidad diseñado, los resultados obtenidos se describen en dos apartados:

- a) Enumeración de las poblaciones microbianas y evaluación de su actividad metabólica real y potencial, y biodegradabilidad de los contaminantes presentes en el suelo A y B.
- b) Influencia de distintos parámetros fisicoquímicos y de la inoculación de consorcios específicos en la biorremediación de los suelos A y B.

4.1 FASE I DEL ESTUDIO DE TRATABILIDAD

4.1.1 Poblaciones microbianas y respirometría

Tal y como puede observarse en la tabla 3.4, el suelo A presentaba una población microbiana más elevada que el suelo B (un orden de magnitud), tanto para la población heterótrofa como para la población degradadora de alcanos. Ambos suelos presentaron poblaciones degradadores de hidrocarburos (alcanos) destacables ($1,8 \times 10^6$ y $5,6 \times 10^5$ NMP g^{-1} suelo A y B respectivamente). Sin embargo, la proporción de la población degradadora de hidrocarburos (alcanos) fue superior en el suelo B (19,3%) que en el suelo A (4,7%). Asimismo, fue destacable la presencia de degradadores de HAPs en el suelo B, estando en un orden de magnitud equivalente a los degradadores de alcanos (10^5 microorganismos g^{-1} suelo), lo que podría deberse a que los TPH del suelo B contenían un 9% de HAPs en su composición.

Sin embargo, se observaron grandes diferencias en la producción de CO_2 detectada en los ensayos de respirometría entre los suelos A y B lo que indicaría la existencia de diferencias en la actividad metabólica de las poblaciones microbianas indígenas de los 2 suelos (fig. 3.7). La cinética de acumulación de CO_2 en el suelo A indicó un progresivo incremento en la actividad respiratoria aeróbica, especialmente cuando se añadieron nutrientes o nutrientes y glucosa, alcanzándose acumulaciones de 0,63 y 2,13 mmoles de CO_2 respectivamente, en 10 días de incubación. Sin embargo, el suelo B se mostró inactivo durante los primeros 5 días de incubación, mientras que a los 10 días de incubación,

únicamente se observó una leve acumulación de CO₂ (0,47 mmoles de CO₂) cinco veces menor respecto al suelo A. Es importante destacar, que el suelo B, con presencia de glucosa, necesitó hasta 40 días de incubación para acumular cantidades de CO₂ equivalentes a las alcanzadas por el suelo A en 10 días. Estas grandes diferencias observadas en los 2 suelos, podrían deberse a una ausencia de fuentes de carbono y energía asimilables y/o a la presencia de compuestos tóxicos en el suelo 2.

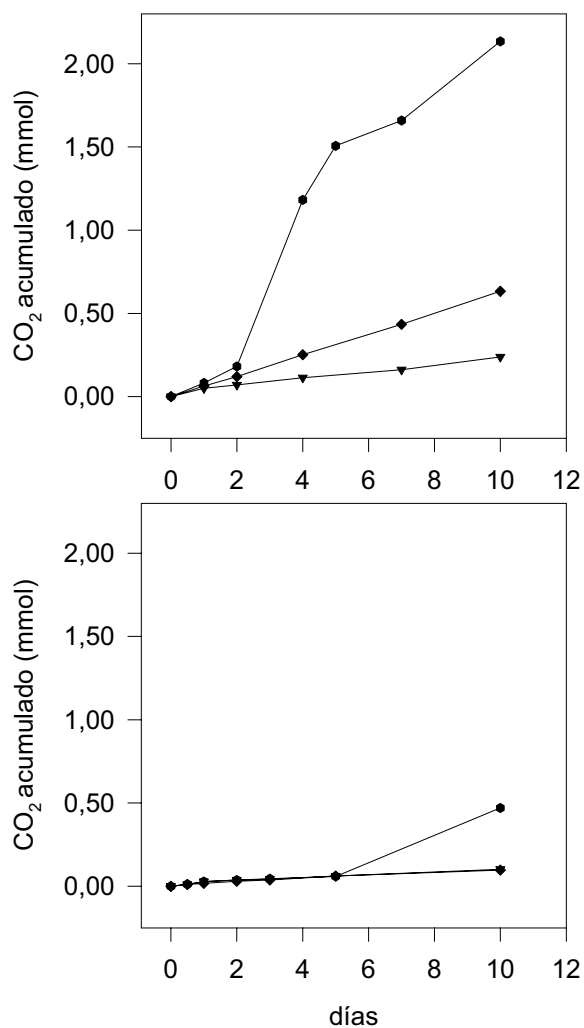


Fig. 3.7. Ensayos respirométricos de acumulación de CO₂ en los suelos A y B. Respirometrías. Todos los tratamientos fueron llevados a cabo, por duplicado, con 10 g de suelo con una humedad equivalente al 60% de la capacidad de campo (CC), en jarras de vidrio de 1L de capacidad. Los nutrientes inorgánicos utilizados fueron NH₄Cl y K₂HPO₄. (▼) Suelo; (◆) Suelo con nutrientes; (●) Suelo con nutrientes y glucosa.

4.1.2 Estudio de la toxicidad aguda

Para complementar los resultados obtenidos en las respirometrías y evaluar la posible toxicidad aguda de los contaminantes presentes en el suelo, se estudiaron los lixiviados y el extracto orgánico total (EOT), calculando la EC_{50} mediante ensayos de Microtox[®]. La EC_{50} , se define como aquella concentración de la solución problema (lixiviado o EOT) que causa una disminución del 50% de la emisión de luz de *Vibrio fischeri*. Por lo tanto cuanto menor sea la EC_{50} resultante, mayor será la toxicidad de la muestra problema. La EC_{50} de un lixiviado, se expresa en valores de concentración (%) de suelo en el lixiviado (p/v), mientras que la EC_{50} del EOT se expresa como la cantidad de extracto que existiría en una cantidad determinada de suelo. Por lo tanto una EC_{50} de lixiviado de un 15% indicaría que 15g de suelo en 100 ml de lixiviado causarían una disminución del 50% de la emisión de luz de *Vibrio fischeri*, mientras que una EC_{50} de 0,6 g de suelo para el EOT, representaría que el EOT existente en 6g de suelo disminuiría un 50% la emisión de luz.

La EC_{50} de los EOT mostró que el extracto del suelo A presentaba una toxicidad 13 veces mayor que el EOT del suelo B (EC_{50} de 0,635 g y 8,45 g respectivamente). Sin embargo, ambos suelos presentaron una toxicidad similar de lixiviados (21,65% y 19,98% respectivamente). Por lo tanto se descartó la toxicidad del suelo B (que era menos tóxico a nivel del EOT)) como la causa de la baja producción de CO_2 observada en el suelo B durante los ensayos respirométricos (fig. 3.7).

Los valores de toxicidad encontrados para los lixiviados en ambos suelos son bastante inferiores a los observados en suelos con elevada toxicidad aguda. En realidad, Kwan y Dutka (1992) definieron una $EC_{50} \geq 2\%$ (p/v) , para ensayos en fase sólida de Microtox[®] , como el umbral para considerar un suelo como no tóxico. Sin embargo, se han encontrado EC_{50} inferiores al 2% en suelos no-contaminados (Marwood *et al.*, 1998). Heard *et al.*, (1993) detectaron mediante Microtox[®] una EC_{50} inicial de 0.0025% (4 ordenes de magnitud inferior a la EC_{50} detectada en el suelo A y B) en *shurries* de un suelo contaminado con creosota no envejecida, rica en pentaclorofenol, y tras una biodegradación del 98%, la EC_{50} encontrada fue 4-6% según el tratamiento, siendo 5 veces inferior a la EC_{50} detectada en los suelos A y B. Asimismo Knoke *et al.* (1999) y Kyle *et al.* (1999) encontraron una EC_{50} inicial de 0,05, también en suelos contaminados con

creosota rica en pentaclorofenol que tras distintos tratamientos de biorremediación alcanzó valores de 0,1-0,2.

Tal y como se ha descrito en trabajos anteriores (Cook y Wells, 1996; Marwood *et al.*, 1998), es importante destacar que a EC_{50} superiores a 0,1%, los resultados de los ensayos en fase sólida muestran una gran dispersión debido a un enmascaramiento de la luz, así como también a la adhesión de la población de *Vibrio fischeri* en el particulado de la resuspensión del suelo analizado. Asimismo, también se ha descrito que pueden producirse interacciones entre la población de *Vibrio fischeri* y otros componentes naturales o contaminantes del suelo (Hund y Traunspurger, 1994; Kaiser y Ribo, 1988) que pueden alterar el resultado. En consecuencia en el presente estudio se ha modificado el ensayo en fase sólida de Microtox[®], filtrando el lixiviado antes de aplicarlo a *Vibrio fischeri* lo que ocasiona en parte unos valores mayores de la EC_{50} , debido en gran medida, a las bajas solubilidades que presentan los hidrocarburos. Por el contrario, el ensayo de Microtox[®] llevado a cabo con el EOT solubilizado en DMSO mostró valores de EC_{50} inferiores debido probablemente a una mayor solubilidad del extracto-DMSO en agua.

4.1.3 Ensayos rápidos de biodegradabilidad

Para determinar la biodegradabilidad de la matriz contaminante del suelo, se llevaron a cabo una serie de ensayos rápidos de biodegradabilidad, que consistieron en resuspensiones de suelo en medio líquido (*slurries*) y nutrientes inorgánicos en Erlenmeyers incubados en condiciones ambientales óptimas (agitación y temperatura) durante 20 días.

Los resultados también revelaron grandes diferencias de biodegradabilidad en el suelo A y el suelo B. El suelo A mostró una disminución de los TPH del 46% a los 20 días de incubación, mientras que la población indígena del suelo B solamente degradó un 12% de los TPH (fig. 3.8). Los controles abióticos con formaldehído no mostraron disminución de los TPH tras 20 días de incubación, lo que indicaba la baja volatilidad de la matriz contaminante.

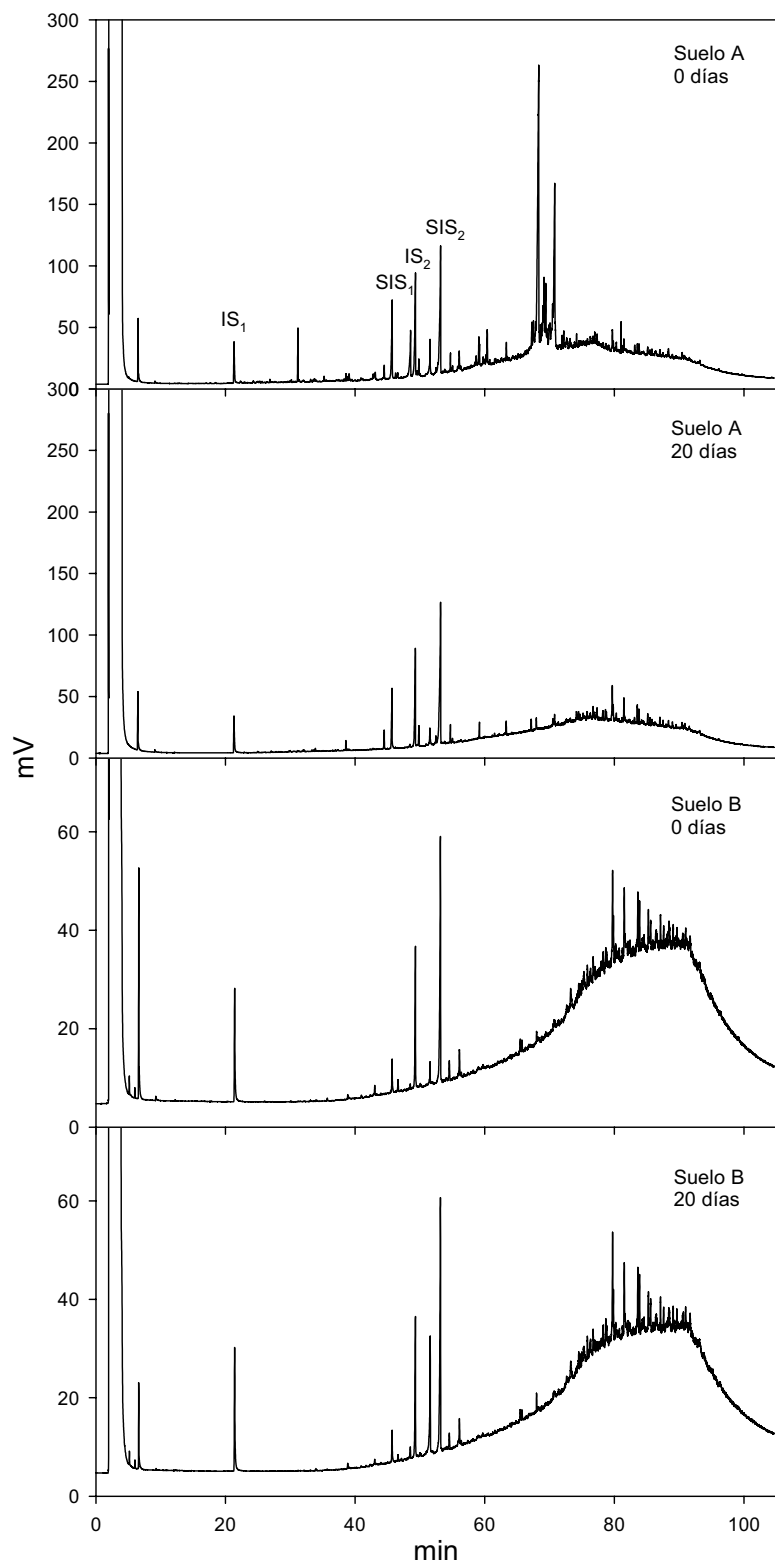


Fig. 3.8. Perfiles cromatográficos (GC-FID) de los TPH del suelo A y suelo B en los experimentos de biodegradabilidad de tipo *slurry* a los 0 y 20 días de incubación. IS₁ e IS₂ corresponden a estándares internos (naftaleno-d₈ y α -androstano respectivamente); SIS₁ y SIS₂ corresponden a estándares internos *surrogates* (antraceno-d₁₀ y ortoterfenil respectivamente).

El perfil cromatográfico del suelo A era similar al de los aceites minerales, mientras que el del suelo B correspondía a una fracción muy pesada de un producto petrolífero al presentar una zona no resuelta (UCM) con muy pocos picos resueltos en la zona más pesada del cromatograma (región equivalente a $>C_{30}$). Por lo tanto, probablemente la elevada recalcitrancia de la matriz contaminante del suelo B podría explicar la ausencia de actividad respiratoria (producción de CO_2 en las respirometrías) así como también la escasa biodegradación alcanzada en los ensayos de biodegradabilidad rápida.

Para comprobar la falta de biodegradabilidad de los contaminantes del suelo B, se llevaron a cabo otra serie de ensayos con incubación larga (60 días). En este caso, se añadió extracto de levadura $0,5g L^{-1}$, y se añadió la misma proporción de nutrientes inorgánicos en forma de NH_4NO_3 y K_2HPO_4 manteniendo las mismas proporciones para facilitar la activación metabólica de la población microbiana en condiciones de baja disponibilidad de los contaminantes. Como puede observarse en la tabla 3.5, no se alcanzó una biodegradación significativa a los 60 días de incubación, y solamente el tratamiento inoculado con el consorcio F1AA especializado en la fracción saturada pesada de crudo de petróleo, alcanzó un 7% de biodegradación.

Tabla 3.5. EOT y TPH finales de los ensayos de slurry del suelo B a los 0 y 60 días de incubación.

	EOT	TPH
Suelo (0d)	31650	28012
Suelo + N (60d)	31125	29062
Suelo + N + Consorcio F1AA (60d)	31970	26062

4.2 FASE II DEL ESTUDIO DE TRATABILIDAD

En el protocolo diseñado se ha propuesto una segunda fase de estudio en la que se llevan a cabo una serie de ensayos de biorremediación a largo plazo (270 para el suelo B y 360 días para el suelo B), simulando diferentes condiciones de bioestimulación y bioaumento en microcosmos que contenían 2,5 kg de suelo con 6 cm de espesor. De esta forma se evaluaron una serie de condiciones ambientales óptimas y más cercanas a los estudios de campo que los ensayos de biodegradabilidad rápidos igualmente necesarios

para determinar la existencia de una población microbiana potencialmente degradadora y la biodegradabilidad de los contaminantes presentes en un suelo

4.2.1 Microcosmos del suelo A

Las concentraciones iniciales de TPH variaron según la metodología utilizada. Por gravimetría se detectaron 20970 mg kg⁻¹ de TPH (un suelo no contaminado presentó 165 mg kg⁻¹ de TPH gravimétricos), sin embargo, mediante GC-FID se detectaron 11975 mg kg⁻¹ de TPH, utilizando un patrón comercial de *n*-alcanos de rango C₁₀-C₄₀. Utilizando un patrón de aceite mineral, se determinó que el 80% de los TPH (GC-FID), eran aceites minerales, con una concentración inicial de 9521 mg kg⁻¹.

La biodegradación de TPH observada en los microcosmos durante los 360 días de incubación siguió una cinética bifásica. Un primer periodo de biodegradación rápida que comprendía los primeros 60 días de incubación y un segundo periodo de biodegradación lenta entre los 60 y el final del periodo de incubación (360 días para el suelo A y 270 días para el suelo B)(fig. 3.9)

El tratamiento básico (B), con aireación, una humedad del 60% de la capacidad de campo (CC) y sin adición de nutrientes inorgánicos, mostró una respuesta retardada en la reducción de la concentración de TPH, en los primeros 60 días, momento a partir del cual presentó un descenso gradual de los TPH hasta alcanzar un 55% de biodegradación (5360 mg kg⁻¹) a los 270 días, manteniéndose hasta los 360 días (Tabla 3.6). Sin embargo, los microcosmos con adición de nutrientes (N, NS, NI y NG), mostraron velocidades máximas de biodegradación de los TPH durante los primeros 30 días (fig. 3.9). Después de 60 días de incubación, en los tratamientos con adición de nutrientes, se detuvo la biodegradación excepto el tratamiento con adición de nutrientes y glucosa.

La adición de nutrientes comportó una aceleración del proceso de biodegradación en las primeras fases, eliminando el periodo de adaptación observado en el tratamiento básico. Aunque en la bibliografía se encuentran una gran variedad de respuestas a la adición de nutrientes en estudios de biorremediación, la aceleración inicial del proceso de degradación causada por la adición de nutrientes, también ha sido descrita por otros autores (Lewis *et al.*, 1986; Steffensen y Alexander 1995; Swindoll *et al.*, 1998).

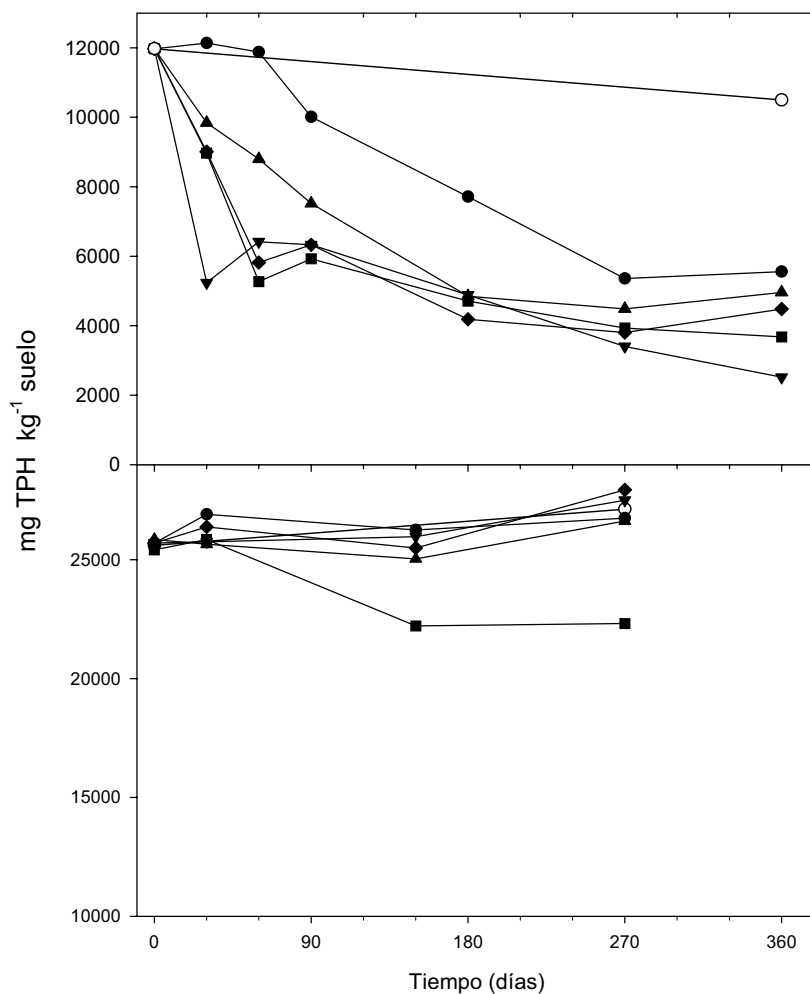


Fig. 3.9. Evolución de la concentración de TPH en los microcosmos de suelo A y suelo B. Todos los tratamientos se llevaron a cabo a una humedad equivalente al 60% cc y aireación por agitación mecánica 2 veces por semana, excepto el suelo A control, donde no se ajustó la humedad durante el proceso. (●) tratamiento básico (B; suelo 60% CC aireado); (■) nutrientes (N); (◆) nutrientes y inóculo (TD para el suelo A y F1AA para el suelo B) (NI); (▲) nutrientes y tensioactivo (NS); (▼) nutrientes y glucosa (NG) y (○) control (no tratado).

El tratamiento básico (B) necesitó 270 días de incubación para alcanzar una concentración de 5500 mg kg^{-1} , equivalente a los resultados obtenidos con 60 días de incubación en los tratamientos con adición de nutrientes.

No obstante, como puede observarse en la tabla 3.4, no se encontraron formas de nitrógeno inorgánico (NO_3^- , NO_2^- y NH_4^+) en el suelo A, mientras que sí se detectó

nitrógeno total a una concentración de $2100 \text{ mg N} \cdot \text{kg}^{-1}$ (0,21% p/v). En consecuencia, la población microbiana existente en el suelo A, y en concreto en el tratamiento básico (B) sin la adición de nutrientes inorgánicos, tuvo que obtener nitrógeno para su crecimiento. Los mecanismos podrían haber sido desde transformaciones lentas del nitrógeno total a formas asimilables y de inmediata incorporación a la biomasa microbiana, hasta la fijación de nitrógeno atmosférico. En cambio, en los tratamientos con adición de nutrientes (N y P), la biodisponibilidad inmediata de las fuentes de nitrógeno y fósforo se tradujo en una utilización rápida de los hidrocarburos, y la eliminación del periodo de adaptación.

Tabla 3.6. Biodegradación (%) de los TPH en el suelo A, determinada por GC-FID.

Tratamiento	0d	30d	60d	90d	180d	270d	360d
B	(11975) ¹	-1	1	16	36	55	54 (5557)
N		25	56	51	61	67	54 (3680)
NS		18	27	37	60	63	59 (4962)
NI		25	51	47	65	68	63 (4485)
NG		56	46	47	59	72	79 (2518)

¹ Los valores entre paréntesis representan la concentración de TPH (mg kg^{-1}) determinada por GC-FID. Los porcentajes de biodegradación (%) han sido calculados, por duplicado a partir de microcosmos independientes, comparando las concentraciones de TPH con las del día 0, ya que se observó una leve disminución de los TPH en el suelo control después de 360 días de incubación (fig. 3.9)

El tratamiento con nutrientes y glucosa (NG), fue el más eficiente. A los 270 días, la concentración de TPH (GC-FID) descendió hasta 3353 mg kg^{-1} , lo que representó un 72% de biodegradación. El proceso de biodegradación continuó de forma gradual hasta los 360 días (79% de biodegradación) mientras que en los otros tratamientos la biodegradación se detuvo alrededor de los 270 días de incubación. Estos resultados coinciden con otros estudios donde la adición de glucosa incrementa la degradación de contaminantes (Hess *et al.*, 1990; Hendriksen *et al.*, 1992). Sin embargo, también se han descrito efectos negativos (Entry *et al.*, 1993; Carmichael *et al.*, 1997; Foght *et al.*, 1998).

El tratamiento con nutrientes y tensioactivo Tween 80 (NT) mostró una biodegradación más gradual, sobretodo en los primeros 6 meses. En realidad, podrían existir relaciones de competencia a nivel de sustratos de crecimiento para la población microbiana indígena, entre el Tween 80 y los hidrocarburos contaminantes, tal y como ya se ha descrito en otros estudios (Thiem, 1994; Liu *et al.*, 1995). En este caso, este

comportamiento sería contrario al observado en el tratamiento con glucosa, donde no se observó una relación de competencia en la utilización de la glucosa y los hidrocarburos. Otra posibilidad sería que la presencia del tensioactivo podría facilitar una mayor extracción de los contaminantes, sin embargo, se utilizaron estándares *surrogate* para corregir las posibles diferencias de extractabilidad entre tratamientos.

En el tratamiento equivalente a un bioaumentación (NI), la inoculación del consorcio TD, especializado en la degradación de gasoil, no mostró una biodegradación mayor que los otros tratamientos con nutrientes. Este hecho, va en concordancia con otros estudios donde la inoculación de poblaciones microbianas exógenas en suelos contaminados no causaban mayor biodegradación de los hidrocarburos que la propia población indígena adecuadamente biostimulada (Venosa *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1997). La población microbiana natural, especialmente en enclaves con contaminación crónica de hidrocarburos, como el suelo A, suele ser capaz de degradar los hidrocarburos si se optimizan las condiciones ambientales y los hidrocarburos son biodisponibles (Alexander, 1999)

Todos los tratamientos con adición de nutrientes (N, NS, NG y NI), excepto el tratamiento con tensioactivo (NS) mostraron unos valores de TPH residuales bastante estables (fig. 3.9) y por lo tanto una caída del proceso de biodegradación. Tal y como se ha descrito en otros estudios, la cinética de degradación de contaminantes orgánicos en suelos, habitualmente muestra una fase inicial de biodegradación rápida seguido de un periodo con pequeños o inexistentes cambios de las concentraciones residuales. Esta cinética es conocida como el fenómeno del “palo de hockey” (Alexander, 1999; Alexander 2000). Esta dinámica puede estar causada por una disminución de los nutrientes inorgánicos, disminución de la población microbiana, baja biodisponibilidad, condiciones fisicoquímicas desfavorables y un aumento de la recalcitrancia de los contaminantes residuales (Manilal *et al.*, 1991; Heusemann, 1997; Alexander, 1999; Alexander, 2000). En el caso del suelo A, se suplementaron nutrientes inorgánicos adicionales y se reinoculó el consorcio TD a los 270 días de incubación, sin causar ningún efecto en la cinética de degradación. Asimismo, los niveles de la población microbiana a los 180 días se mantuvieron con niveles suficientemente elevados, y similares a los iniciales (tabla 3.4),

para explicar la caída del proceso de biodegradación a largo plazo (10^7 - 10^8 NMP g^{-1} de heterótrofos; 10^6 - 10^7 NMP g^{-1} de degradadores de alcanos).

Con la finalidad de entender mejor los motivos de la caída del proceso biodegradativo, observado a partir de los 180 días de incubación, se examinó el contenido relativo de aceites minerales ligeros respecto a los aceites minerales pesados presentes en los TPH del suelo A, durante toda la incubación (360 días) y en todos los tratamientos (Sabaté *et al.*, 2004). Los aceites minerales ligeros disminuyeron mientras que hubo un enriquecimiento evidente, en aceites minerales pesados, de mayor recalcitrancia a lo largo del proceso de biodegradación, especialmente a partir de los 180 días de incubación. Estos resultados fueron coincidentes con los descritos por Song *et al.* (1990), donde, después de un experimento de biorremediación en suelos contaminados, también se acumuló una fracción residual de elevada recalcitrancia.

El proceso de enriquecimiento en aceites minerales pesados, va ligado a una menor biodisponibilidad de los hidrocarburos (tienen una constante de solubilidad más baja que los aceites minerales pesados) y una mayor recalcitrancia, debido a su elevado peso molecular. Estos factores podrían explicar tanto la caída del proceso de biodegradación a partir de los 180 días y además serían coincidentes con una disminución sustancial de la población microbiana al final del experimento (360 días), alcanzándose una población heterótrofa de tan solo 10^4 NMP g^{-1} cuando entre los 0 y 180 días se mantuvo en 10^6 - 10^7 NMP g^{-1} , probablemente por problemas de accesibilidad al sustrato y/o metabolización de los contaminantes residuales

4.2.2 Microcosmos del suelo B

La concentración de TPH inicial del suelo B, fue de 25700 mg kg^{-1} , determinada por métodos gravimétricos. Únicamente el tratamiento base (B) sin adición de nutrientes, alcanzó una ligera biodegradación (10 %) tras 270 días de incubación. En ninguno de los tratamientos con adición de nutrientes, se observó biodegradación significativa de los contaminantes (fig. 3.9). También cabe destacar, que incluso la inoculación del consorcio F1AA, especializado en la biodegradación de una fracción saturada pesada de crudo de petróleo semidegradado (Viñas *et al.*, 2002), tampoco mejoró la biodegradación.

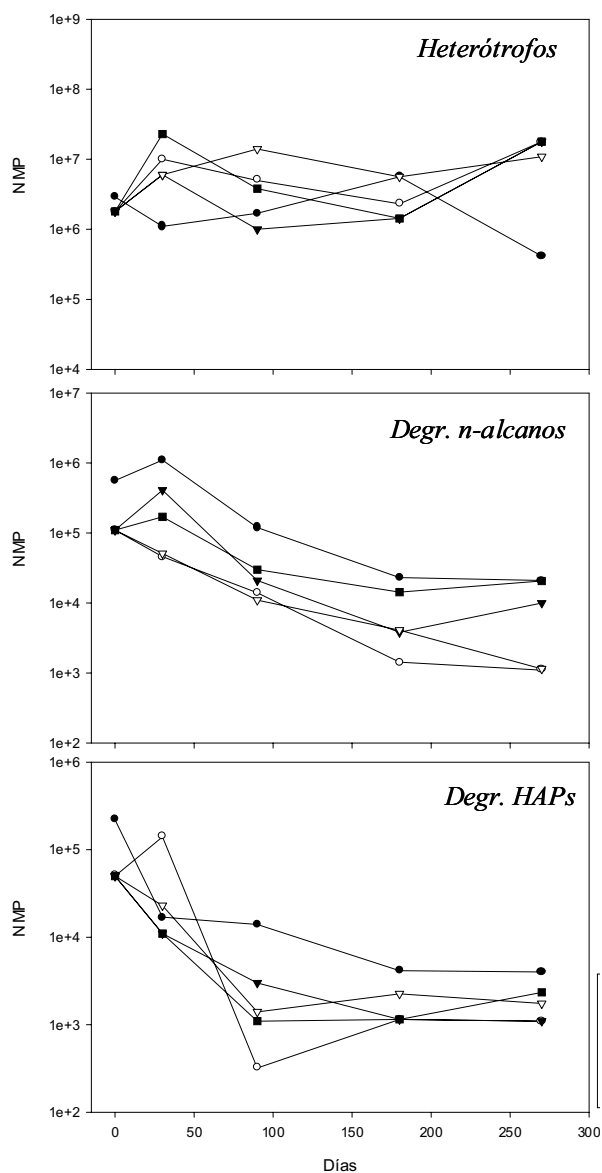


Fig. 3.10. Evolución de las población microbiana heterótrofa total, degradadora de *n*-alcanos y degradadora de HAPs en los microcosmos del suelo B.

Como puede observarse en la figura 3.10, la población microbiana degradadora de hidrocarburos disminuyó gradualmente durante los 270 días de incubación, desde una población inicial de 10^5 - 10^6 NMP g^{-1} de degradadores de *n*-alcanos hasta 10^3 - 10^4 NMP g^{-1} a los 270 días. Igualmente ocurrió con los degradadores de HAPs que inicialmente eran del orden de 10^5 NMP g^{-1} suelo y disminuyeron hasta una población final de 10^3 NMP g^{-1} suelo. Sin embargo, la población heterótrofa se mantuvo durante todo el periodo de incubación con niveles elevados (10^6 - 10^7 NMP g^{-1} suelo). Por lo tanto, la disminución de

la población degradadora estuvo relacionada con la falta de biodegradación durante el proceso de biorremediación. La disminución de la población microbiana podría ser causada por una disminución de la biodisponibilidad o la falta de sustratos metabolizables (fracción saturada pesada) durante el proceso de incubación. Los componentes orgánicos no hidrocarbonados, los cuales son abundantes ya que representan el 50 % del COT (tabla 3.4), podrían mantener los niveles de población heterótrofa en los microcosmos.

En el suelo B, la ausencia de biodegradación observada en los microcosmos, fue coincidente con los resultados observados previamente en la fase I (apartado 4.1), donde se evaluó la actividad metabólica de la población indígena (respirometría y NMP) y la biodegradabilidad de los contaminantes mediante ensayos de tipo *slurrie*.

La información obtenida en la primera fase de los ensayos de tratabilidad, ayuda a decidir si es factible la aplicación de la biorremediación en un suelo contaminado. Esta fase consiste en una serie de ensayos simples y rápidos que requieren de unos 30 días entre experimentos y procesamiento de datos. Si los resultados de la fase I son favorables para la aplicación de la tecnología de la biorremediación, se puede pasar a una segunda fase donde se evalúan, en microcosmos, los factores ambientales que pudieran condicionar la biodegradación microbiana de los contaminantes del suelo. Debido a que existe una gran disparidad en los efectos de los distintos parámetros ambientales en la biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos, es necesario llevar a cabo la segunda fase del protocolo para establecer las condiciones de bioestimulación y la necesidad o no de realizar un bioaumento.

5 CONCLUSIONES

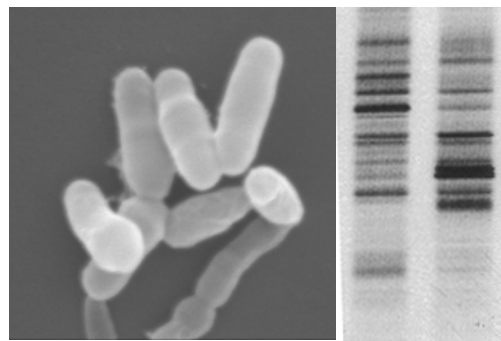
1. Se ha diseñado un protocolo de ensayos de tratabilidad, a escala de laboratorio, previo a la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos que consta de 2 fases de estudio.
 - a) En la primera fase de estudio se evalúa la presencia de poblaciones microbianas, la actividad metabólica real y potencial y la biodegradabilidad de los contaminantes presentes en el suelo.
 - b) En la segunda fase de estudio se estudia la optimización de las condiciones fisicoquímicas (humedad, aireación, nutrientes inorgánicos) y biológicas (posibilidad de inocular poblaciones microbianas alóctonas) que pueden condicionar el proceso de biodegradación durante la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.
2. Se han aplicado los ensayos de tratabilidad a dos suelos contaminados con diferentes fuentes de hidrocarburos.
3. El suelo A, contaminado con aceites minerales, presentó una población degradadora y metabólicamente activa. Los contaminantes eran biodegradables por la misma población autóctona. La aireación y la humedad han sido los factores claves para que existiera una importante biodegradación de los contaminantes, mientras que la adición de nutrientes inorgánicos ha acelerado el proceso en las primeras fases eliminando el periodo de adaptación. La adición de glucosa permitió alcanzar la máxima degradación de los TPH a largo plazo (360 días).
4. La cinética de degradación de los TPH del suelo A, mostró un comportamiento bifásico, del tipo “palo de hockey” debido a un enriquecimiento en aceites minerales pesados, más recalcitrantes y de menor biodisponibilidad, durante el proceso de biodegradación.
5. El suelo B, contaminado con una fracción saturada pesada del petróleo, presentó una población microbiana degradadora de hidrocarburos significativa, pero que no

era metabólicamente activa ni activable. La matriz contaminante no era biodegradable ni a corto ni a largo plazo, ni en *slurries*, ni en microcosmos respectivamente. La falta de biodegradabilidad y de actividad microbiana se atribuyó a una baja biodisponibilidad y una elevada recalcitrancia de los contaminantes, y no a fenómenos de toxicidad. Los resultados negativos de la primera fase de los ensayos de tratabilidad, ya anticiparon los resultados obtenidos a largo plazo en microcosmos.

6. La información obtenida en la primera fase de los ensayos de tratabilidad, permite decidir, en un corto intervalo de tiempo, si es factible la aplicación de la biorremediación en un suelo contaminado, mientras que la segunda fase permite establecer las condiciones óptimas de biorremediación en procesos aeróbicos.

Capítulo IV:

Biorremediación de un suelo contaminado por creosota: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica



“Restablecer la conexión con la trama de la vida significa reconstruir y mantener comunidades sostenibles....Podemos aprender mucho de lo ecosistemas, verdaderas comunidades sostenibles de plantas, animales y microorganismos [...] En los ecosistemas, la complejidad de su red es consecuencia de su biodiversidad; por tanto, una comunidad ecológica diversa es una comunidad resistente”.

Fritjof Capra “La trama de la vida”

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA CREOSOTA

La creosota es un producto líquido viscoso de textura aceitosa, utilizado para la conservación de la madera que habitualmente se emplea en el tratamiento de traviesas de ferrocarril, en postes de la red de telefonía y de transmisión de energía eléctrica y en cercados o puentes.

Se obtiene fundamentalmente por procesos de destilación entre 200 y 400°C de alquitranes procedentes de la combustión (900-1200°C) de carbones grasos (hulla). Su composición química es compleja, estando formada por 150-200 componentes químicos diferentes, de los cuales un 85% son hidrocarburos aromáticos policíclicos de origen pirolítico (HAPs) de 2 hasta 5 anillos aromáticos (tabla 4.1); un 10% son compuestos fenólicos (tabla 4.2) y un 5% son de compuestos heterocíclicos (N-, S-, y O-) (tabla 4.3). Asimismo, es importante destacar que más del 50% de la composición de la creosota esta representado por HAPs de dos y tres anillos (Mueller *et al.*, 1989), y que además, los HAPs, al ser mayoritariamente de origen pirolítico, están mayormente representados por HAPs no metilados (Blumer, 1976).

Las propiedades fisicoquímicas de los diferentes componentes de la creosota condicionan su destino ambiental. De esta forma, los compuestos fenólicos y algunos hidrocarburos heterocíclicos presentan elevadas solubilidades (3 a 4 órdenes de magnitud superiores a los HAPs de 3 o más anillos) y por lo tanto pueden ser movilizados en las fases acuosas del suelo y, en consecuencia, pueden afectar sistemas acuosos colindantes al suelo contaminante (superficiales o subterráneos). Asimismo, los componentes más volátiles (HAP de 2 anillos, compuestos fenólicos y heterociclos de bajo peso molecular) pueden disminuir paulatinamente del suelo pasando a la atmósfera.

En consecuencia, los compuestos presentes en suelos contaminados con creosota pueden ser diferentes en función del tiempo transcurrido desde el episodio de contaminación. Así, un suelo con contaminación reciente de creosota se caracteriza por presentar compuestos contaminantes parecidos a los descritos en las tablas 4.1-4.3, mientras que en un suelo con contaminación remota (meses-años) puede presentar una

proporción aún mayor en HAPs pesados (de tres o más anillos) y una menor proporción de compuestos fenólicos e hidrocarburos heterocíclicos (Mueller *et al.*, 1989).

Tabla 4.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) predominantes en la creosota.

HAP	PM ¹	Proporción ² (%)	Solubilidad (mg l ⁻¹) ³
Naftaleno	128	13	31.7
2-metilnaftaleno	142	13	25.4
Fenantreno	178	13	1.3
Antraceno	178	13	0.07
1-metilnaftaleno	142	8	28.5
Bifenil	154	8	7.5
Fluoreno	166	8	2.0
2,3-dimetil naftaleno	156	4	3.0
2,6- dimetilnaftaleno	156	4	2.0
Acenafteno	154	4	3.9
Fluoranteno	202	4	0.26
Pireno	202	2	0.14
Criseno	228	2	0.002
Antraquinona	208	1	ND
2-metilantraceno	192	1	0.04
2,3-benzo(b)fluoreno	216	1	0.002
Benzo(a)pireno	252	1	0.003

¹PM: Peso molecular; ²Proporción respecto a los HAPs totales ; ³ Solubilidad en agua a 25°C. Datos según Mueller *et al.*, (1989).

La toxicidad y mutagenicidad intrínseca de los componentes que forman la creosota obligó a la unión europea a redactar una Directiva Comunitaria en el año 2001 (2001/90/CE), donde se prohibió el uso de maderas tratadas con creosota en cualquier tipo de obra que estuviera en contacto directo con la población. Solamente se permitió la aplicación de creosota, con unas concentraciones de benzo(a)pireno y fenol inferiores a 50 y 30000 mg kg⁻¹, en travesías de ferrocarril, postes eléctricos y de telecomunicaciones, cercados y en puertos y vías navegables. Su uso, sin embargo, ha estado relativamente generalizado en parques y jardines públicos, paseos marítimos y obras similares.

Tabla 4.2. Compuestos fenólicos predominantes en la creosota.

Compuesto	PM ¹	Proporción ² (%)	Solubilidad (mg l ⁻¹) ³
Fenol	94	20	82000 ³
o-Cresol	108	10	25920
m-Cresol	108	10	23500
p-Cresol	108	10	24000 ⁴
Pentaclorofenol	266	10	14
Xilenol (isómeros)	122	35	3544-6232
2,3,5-Trimetilfenol	136	5	ND

¹ PM: Peso molecular; ² Proporción respecto a los HAPs totales. ³ Solubilidad en agua a 25°C ⁴ Solubilidad en agua a a 40°C. Datos según Mueller *et al.*, (1989).

Tabla 4.3. Compuestos heterocíclicos predominantes de la creosota.

Compuesto	PM ¹	Proporción ² (%)	Solubilidad acuosa ³ (mg l ⁻¹)
N-Heterocíclicos			
Quinolina	129	10	6718
Isoquinolina	129	10	4522
Carbazol	167	10	1
2,4-dimetilpiridina	107	10	ND
Acridina	179	5	5
Anilina	93	5	3400
2-4-metilquinolina	143	5	ND
Pirrol	67	5	ND
Pirrolidina	71	5	ND
S-Heterocíclicos			
Benzotiofeno	134	10	10
Dibenzotiofeno	184	10	10
O-Heterocíclicos			
Dibenzofurano	168	10	10

¹ PM: Peso molecular; ² Proporción respecto a los HAPs totales. ³ Solubilidad en agua a 25°C. Datos según Mueller *et al.*, (1989).

La complejidad en la composición de la creosota, así como también la elevada recalcitrancia y toxicidad de muchos de sus componentes, es la causa que el estudio de la biorremediación de un suelo contaminado con creosota represente un caso modelo referente a la biorrecuperación de un suelo contaminado con una matriz química compleja y recalcitrante.

1.2 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HAPS

1.2.1 Marco teórico

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se encuentran presentes, como contaminantes químicos, en todos los compartimentos ambientales (Clark, 1989; Fernández *et al.*, 1992; Samanta *et al.*, 2002). Su origen puede ser petrógeno (encontrándose en el crudo de petróleo y derivados) o pirolítico (encontrándose en la creosota, combustión de combustibles fósiles, incineración de residuos orgánicos) cuando son generados a elevadas temperaturas durante la combustión incompleta de casi cualquier material orgánico (National Academy of Sciences, 1983).

Los microorganismos juegan un papel importante en la degradación de HAPs en los ecosistemas acuáticos y terrestres, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural (Prince 1993; Shuttleworth y Cerniglia 1995; Kästner, 2000). La optimización científica de la biodegradación microbiana es la base para las distintas tecnologías de biorremediación (Alexander, 1999), el uso de las cuales ha sido efectivo y descrito en bastantes estudios en el tratamiento de suelos contaminados por HAPs (Mueller *et al.*, 1989; Guerin 1999; Eriksson *et al.*, 2000; Atagana 2004).

En emplazamientos contaminados por hidrocarburos, especialmente en zonas con exposición larga a los contaminantes, la población microbiana indígena habitualmente responde favorablemente a estrategias de bioestimulación, multiplicándose y metabolizando el residuo de interés (Harayama, 1997; Alexander 1999). Sin embargo, en otros casos cuando la población microbiana degradadora de hidrocarburos es baja, el bioaumentación puede ser beneficioso (Mikesell y Boyd 1988; Atlas y Bartha, 1997; Vogel, 1996; Boon *et al.*, 2000). La velocidad en la degradación microbiana de HAPs en suelos y

sedimentos está limitada por la transferencia de masas a la fase acuosa de HAPs presentes en forma cristalina, adsorbidos al suelo y/o solubilizados en fases líquidas no acuosas (NAPLs) (Harms y Bosma, 1996; Bosma *et al.*, 1997).

La degradación microbiana de HAPs en un suelo está condicionada por una serie de factores físicoquímicos (temperatura, pH, salinidad, fuentes de N y P, estructura molecular del contaminante y biodisponibilidad) y biológicos (población microbiana adaptada al catabolismo del contaminante), que condicionan el éxito del proceso de biorremediación (apartado 1.4, capítulo III). También, la baja biodisponibilidad de los HAPs en suelos condiciona el resultado del proceso de biorremediación. La baja biodisponibilidad de los HAPs se debe a sus bajas constantes de solubilización en agua (disminuye a medida que incrementa el peso molecular y el número de anillos de los HAPs) y a elevadas K_{ow} y K_{oc} (tabla 2.1 capítulo II), que limita la transferencia de masas a la fase acuosa (Kästner, 2000). Asimismo, los procesos de envejecimiento (*ageing*) o de biodegradación y la interacción de los HAPs con los coloides, arcillas y materia orgánica del suelo, también limitan la biodisponibilidad de los HAPs en suelos (Ortega-Calvo y Saiz-Jiménez 1998; Ressler *et al.*, 1999; Alexander, 2000; Niqui-Arroyo *et al.*, 2003). Las poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos pueden mejorar la biodisponibilidad o la accesibilidad a los HAPs, excretando biotensioactivos (Kanga *et al.*, 1997; Ron y Rosenberg 2001; Ron y Rosenberg 2002; Abalos *et al.*, 2004), incrementando la hidrofobicidad de la membrana externa expresando menor cantidad de antígeno-O en la producción de LPS (Norman *et al.*, 2005), formando biofilms (Ressler *et al.*, 1999), o mediante procesos de quimiotaxis (Ortega-Calvo *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta que cada emplazamiento contaminado puede responder de diferente forma a los distintos parámetros que afectan la biodegradación microbiana, se han desarrollado una serie de ensayos de tratabilidad (capítulo III) donde se puede determinar la biodegradabilidad del contaminante, la presencia y potencial metabólico frente a los contaminantes de la población microbiana autóctona y se evalúa el efecto de la adición de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P), inóculos exógenos, tensioactivos sintéticos o biotensioactivos u otros aditivos como pueden ser fuentes de hierro oleofílicas (octoato de hierro).

No obstante, en la mayor parte de estudios referentes a ensayos de tratabilidad o de biorremediación de suelos contaminados en general, el control del proceso únicamente se realiza por análisis químico de los contaminantes iniciales sin englobar otros aspectos importantes, como el estudio de la estructura y dinámica de las poblaciones microbianas asociada al proceso de biodegradación, y un análisis ecotoxicológico a lo largo del proceso de biodegradación.

1.2.2 Estudio de las poblaciones microbianas en procesos de biorremediación de suelos contaminados

Es necesario mejorar el conocimiento acerca de la composición de las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuales son los microorganismos capaces de adaptarse y explotar los hábitats contaminados. Asimismo, teniendo en cuenta que el metabolismo de sustratos orgánicos en sistemas naturales se produce mediante interacciones metabólicas complejas, con la participación de microorganismos diferentes, es necesario estudiar las poblaciones microbianas presentes en el suelo de la forma más representativa posible. Sin embargo, la mayor parte de microorganismos presentes en muestras ambientales no se pueden cultivar en medios de cultivo en el laboratorio (solamente un 0,1-0,01% son cultivables) y los que son cultivables, pueden no ser representativos de la población presente en la muestra (Amann *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998; Delong 2004; Torsvik *et al.*, 2003; Zengler *et al.*, 2002).

Las técnicas de biología molecular aplicadas a los estudios de biorremediación ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura, composición y cambio poblacional de las comunidades microbianas del suelo durante los procesos de biodegradación. Existen diferentes técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas en sistemas naturales (ver apartado 1.1.6.2 del capítulo II). En este estudio se ha elegido el DGGE de genes 16SrRNA para el estudio de la población microbiana, por ser una técnica que permite detectar rápidamente de un modo cualitativo y semicuantitativo (relativo) los diferentes productos de PCR de genes 16SrRNA de la comunidad (Muyzer *et al.*, 1993; Fromin *et al.*, 2002). Con un gradiente desnaturante optimizado, se asume que cada banda de DGGE representa una unidad taxonómica operativa (OTU), la cual se

puede denominar con el término especie para simplificar el análisis (Hughes *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos por DGGE, así como por otras metodologías basadas en la amplificación de genes 16SrRNA por PCR, no reflejan del todo la realidad. Las razones son metodológicas, como pueden ser: diferencias en la lisis celular durante la extracción de ácidos nucleicos, amplificación selectiva de genes 16SrRNA por PCR, recombinación genética y formación de quimeras durante la PCR, y diferencias en el número de copias génicas u operones de genes 16SrRNA en genomas de diferentes organismos (ver apartado 1.1.6.2.7 del capítulo II para más detalles).

Se ha estudiado, mediante técnicas moleculares, la estructura y composición de comunidades microbianas asociadas a ambientes contaminados por crudo de petróleo (Macnaughton *et al.*, 1999; Colores *et al.*, 2000; Roling-Wilfred *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2004; Kaplan y Kitts, 2004; Roling Wilfred *et al.*, 2004), diésel (Bundy *et al.*, 2002), MTBE (Zein *et al.*, 2004), PCBs (Nogales *et al.*, 1999; Nogales *et al.*, 2001; Abraham *et al.*, 2002) y pesticidas (Singh *et al.*, 2003). Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan estudiado de forma exhaustiva las comunidades microbianas existentes en suelos contaminados por HAPs (Siciliano *et al.*, 2003; Andreoni *et al.*, 2004). Además, los pocos estudios con suelos contaminados por HAPs, no realizaron un seguimiento de la dinámica de las poblaciones microbianas mediante técnicas moleculares durante el proceso de biodegradación. Asimismo, los estudios se realizaron con concentraciones muy bajas de HAPs (Andreoni *et al.*, 2004), o con suelos dopados con aceites minerales pesados que contenían HAPs de bajo peso molecular (Siciliano *et al.*, 2003).

1.2.3 Estudios de ecotoxicidad en la biorremediación de suelos contaminados

1.2.3.1 Importancia de los estudios ecotoxicológicos

El objetivo principal en la recuperación de suelos contaminados es la disminución de la concentración de contaminantes, hasta unos niveles establecidos por la legislación vigente que impliquen la ausencia de un riesgo inaceptable para la salud humana. Se define riesgo, como la probabilidad de que un contaminante entre en contacto con algún receptor con consecuencias adversas para la salud de las personas o para el medio ambiente. El Real Decreto 9/2005 define como riesgo inaceptable de una sustancia para la salud humana, como aquella situación (concentración y tiempo de exposición) en que la frecuencia

esperada de aparición de cáncer en la población expuesta exceda del 1 por 100.000 casos. Por lo tanto, el riesgo de un suelo contaminado se relaciona habitualmente con la concentración de ciertos componentes específicos, para los que se ha establecido el efecto dosis-respuesta en ensayos con organismos vivos. No obstante, la mayor parte de los suelos contaminados difieren de estas condiciones al menos en dos factores importantes:

- a) Los contaminantes, raramente existen de forma individual, ya que se presentan en forma de mezclas orgánicas complejas, que pueden ser tóxicas o alterar, positivamente o negativamente, el comportamiento de los constituyentes legislados o de interés (Boyd y Sun, 1990; Efrogmson y Alexander, 1995; Ghoshal y Luthy, 1996; Rutherford *et al.*, 1998).
- b) Los contaminantes habitualmente están presentes en el suelo durante años o décadas, pudiéndose encontrar secuestrados en los microporos del suelo e incluso reaccionando con la materia orgánica o incorporándose en las sustancias húmicas del suelo (Alexander, 1995; Hatzinger y Alexander, 1995; Ghoshal y Luthy, 1996; Guthrie y Pfaender, 1998).

En consecuencia, es poco probable que la biodisponibilidad de un contaminante presente en una matriz orgánica compleja (con problemas de transferencia de masas) (Ghosh *et al.*, 2000) y que además puede estar envejecida (ageing), coincida con la que resulte de ensayar el contaminante de forma individual y en un suelo recientemente dopado. Además, las interacciones sinérgicas o antagónicas que pueden producirse tanto entre los diferentes contaminantes, como con la matriz del suelo, así como también la dificultad de detectar y cuantificar todos los componentes y los metabolitos de degradación de una matriz contaminante, justifican la necesidad de complementar el análisis químico con estudios ecotoxicológicos (Hund y Traunspurger, 1994). En realidad, en los últimos años se ha observado un creciente interés en incorporar los ensayos ecotoxicológicos para complementar la toma de decisiones en proyectos de recuperación (Renoux *et al.*, 1995; Salanito *et al.*, 1997; Saterbak *et al.*, 1999) y para redefinir las concentraciones límite a nivel legal (Braud-Grasset *et al.*, 1993; Debus y Hund, 1997; Dorn *et al.*, 1998; Dorn y Salanito, 2000).

1.2.3.2 Ensayos de ecotoxicidad

En los últimos años, se han empezado a utilizar ensayos de ecotoxicidad, tanto en el laboratorio como en estudios de campo, para el seguimiento de procesos de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos (Thomas y Cline, 1985; Wang y Bartha, 1990; Salanitro *et al.*, 1997; Saterbak *et al.*, 1999). Los diferentes ensayos de ecotoxicidad descritos en suelos utilizan diferentes niveles tróficos, como bacterias, invertebrados, protozoos, anfibios, algas y plantas (Greene *et al.*, 1988; Hund y Traunspurger, 1994; Keddy *et al.*, 1995; Dorn *et al.*, 1998; Juvonen *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 1983). A continuación se describen los ensayos de ecotoxicidad más utilizados en suelos, que corresponden a ensayos de toxicidad aguda y a ensayos de genotoxicidad.

1.2.3.2.1 Ensayos de toxicidad aguda

1.2.3.2.1.1 Microtox[®] (*Vibrio fischeri*)

El ensayo de Microtox[®] es un bioensayo de toxicidad aguda, basado en la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Se ha demostrado que la bioluminiscencia se ve afectada de forma directamente proporcional a la presencia de tóxicos, con lo que se puede analizar el efecto de diferentes concentraciones de una muestra problema en la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*. La EC₅₀ se define como aquella concentración del extracto problema o lixiviado (g suelo ml⁻¹ lixiviado) donde se observa una disminución de un 50% en la bioluminiscencia de una población de *Vibrio fischeri*. El ensayo de Microtox[®] se utiliza mayoritariamente para analizar la toxicidad aguda de muestras de agua (ISO/FDIS 11348-3), pero en los últimos años, también se ha utilizado para el análisis rápido de toxicidad aguda en suelos (Cook y Wells, 1996; Johnson, 1997; Ringwood *et al.*, 1997; Dorn y Salanitro, 2000; Harkey y Young, 2000; Stronkhorst *et al.*, 2003), mediante el ensayo en fase sólida (SPT) (Azur Environmental, 1995). Este ensayo consiste en llevar a cabo un Microtox[®] con un lixiviado del suelo. Para ello se añade la población de *Vibrio fischeri* a las distintas concentraciones de lixiviado, se incuba durante 15 minutos, se filtra la mezcla para eliminar el particulado y se analiza la bioluminiscencia del lixiviado filtrado en un luminómetro (Azur Environmental, 1995). Este proceso tiene el inconveniente que, a concentraciones elevadas de lixiviado, se pierde parte de la población de *Vibrio fischeri* adherida al particulado durante el proceso de filtración (Benton *et al.*,

1995; Ringwood *et al.*, 1997) y por lo tanto se tiende a sobreestimar la toxicidad aguda de los lixiviados por pérdidas de bioluminiscencia. Recientemente se ha mejorado el método con la aparición del ensayo básico de fase sólida (BSPT) (Azur Environmental, 1995), en el cual no es necesario filtrar las incubaciones del lixiviado incubadas con *Vibrio fischeri* antes de cuantificar la bioluminiscencia en el luminómetro. Sin embargo, los diferentes trabajos realizados recientemente con el BSPT (Mowart y Bundy, 2001, 2002a y 2002b; Abbondanzi *et al.*, 2004 y Iacondini *et al.*, 2004) sugieren que esta mejora sigue sobreestimando la toxicidad aguda a elevadas concentraciones de lixiviados por la disminución de la bioluminiscencia, debido a problemas de turbidez. Este ensayo puede utilizarse para interpretar resultados de toxicidad de lixiviados de suelo (filtrando el lixiviado antes del ensayo) y del particulado del suelo (sin filtrar el lixiviado).

1.2.3.2.1.2 Lumbrícidos (*Eisenia foetida*)

Es un ensayo de toxicidad aguda (letalidad) llevado a cabo con el invertebrado *Eisenia foetida* (oligoqueto), en el que se determina como afecta un suelo o muestra problema a la letalidad (14 días) y reproducción (28 días) de una población de *Eisenia foetida* adulta, según un protocolo estandarizado (E 1676-95, ASTM, 1995; ISO 11268-1). En este ensayo se obtiene una LD₅₀ (dosis letal 50), que es la dilución del suelo (con un suelo no tóxico) en la cual la mortalidad es del 50 % de los individuos, a los 14 días de incubación. Es un ensayo que ha sido utilizado para el estudio del impacto ambiental de pesticidas, herbicidas, metales pesados y HAPs en suelos (April *et al.*, 1990; Hund y Traunspurger, 1994; Kelsey y Alexander, 1997; Salanitro *et al.*, 1997). Su frecuente utilización se debe a la fácil manipulación, adquisición y mantenimiento de *Eisenia foetida* y además permite el contacto directo del lumbrícido con el suelo. Estos organismos son capaces de ingerir grandes volúmenes de suelo y su respuesta frente a los contaminantes puede analizarse según su supervivencia, comportamiento y reproducción.

1.2.3.2.1.3 Plantas superiores

Se han utilizado diferentes especies de plantas superiores para ensayos de toxicidad aguda en suelos, en estudios de crecimiento (incluye el estudio de la germinación de semillas y del crecimiento de cotiledones y planta adulta) y de supervivencia (ISO 11269-2). Las especies más utilizadas son *Lactuca Sativa* (lechuga) (Folsom *et al.*, 1991; EPA

1996), *Lolium Perenne* (centeno) (ASTM E1598-94, 1997) para suelos y *Lemma minor* (Environment Canada EPS 1/RM/37- 1999) y *Echinochloa Crusgalli* (Walsh *et al.*, 1991) para zonas pantanosas o inundadas. En estos ensayos también se determina la inhibición de crecimiento (en peso seco) tanto de cotiledones como de planta adulta. Sin embargo, es importante destacar que en los estudios de campo, las condiciones ambientales, y en concreto la salinidad y la dificultad en la diferenciación de cotiledones jóvenes de las plantas de ensayo con las de otras plantas circundantes, pueden alterar los resultados del ensayo.

1.2.3.2.2 Ensayos de genotoxicidad

1.2.3.2.2.1 Ensayo de teratogénesis en embriones de *Xenopus laevis* (FETAX)

El FETAX es un ensayo en el que se evalúa el efecto teratogénico y tóxico (inhibición de crecimiento y letalidad) de una muestra ambiental en embriones del anuro *Xenopus laevis* (Dumont *et al.*, 1983). Es un ensayo, que ha sido validado recientemente por la ASTM (E 1439-98) (Dumont *et al.*, 2003), y que es repetitivo, de bajo coste, tiempo razonable (96 h), fiable y que además, si se utiliza conjuntamente con fracción microsomal hepática activada, correlaciona hasta un 95% con estudios calibrados realizados con mamíferos (Bantle *et al.*, 1996; Prati *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 2003; Fort *et al.*, 2003). El FETAX se ha utilizado en un amplio espectro de situaciones como son: detergentes, pesticidas, disolventes, extractos de sedimentos, suelos y calidad de aguas en depuradoras (Dumont, 2003; Fort, 2003). En este ensayo se obtiene la LD₅₀, cuantificación y tipo de teratogénesis en embriones vivos e inhibición del crecimiento en la longitud media de los embriones vivos, a las 96 horas (estadio 46 de desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*).

1.2.3.2.2.2 Comet test

El ensayo del “comet test” fue descrito por primera vez por Singh *et al.*, (1988), modificando un protocolo de observación del DNA en células individuales embebidas en un gel de agarosa descrito por Rydberg y Johanson (1978). Este ensayo de genotoxicidad es capaz de detectar lesiones en el DNA causadas por agentes alquilantes, intercalantes y por daño oxidativo (Henderson *et al.*, 1998) y ha sido aplicado en diferentes áreas como: estudios clínicos, de radiología, genética y ecotoxicidad en diferentes matrices ambientales. Se puede aplicar a cualquier tipo de célula eucariota incluidas las células

vegetales (Cerda, *et al.*, 1993; Tice, 1995; Cotelle y Férard, 1999). La utilización de celomocitos de *Eisenia foetida* para el ensayo del “comet test” tiene la ventaja de que se puede acoplar al ensayo de toxicidad aguda normalizado para esta especie (E 1676-95, ASTM, 1995; ISO 11268-1). Para ello, se engloban los celomocitos de individuos de *Eisenia foetida*, expuestos previamente a un tóxico o matriz ambiental, en un gel de agarosa muy delgado extendido en un portaobjetos, se someten las células a una lisis alcalina para desenrollar el DNA y a continuación se lleva a cabo una electroforesis de corta duración. Posteriormente, se observa la migración resultante del DNA por microscopia de fluorescencia, tiñendo el DNA con DAPI o naranja de acridina. Un DNA no dañado, migrará agrupado en forma esférica, mientras que en un celomocito con parte del DNA dañado, la migración será en parte agrupada y lenta (DNA intacto) y en parte más difusa y rápida (DNA dañado), generando una migración del DNA parecida a un cometa (el núcleo sería el DNA intacto y la cola sería el DNA dañado). Se cuantifica la lesión del DNA de forma geométrica, densitométricamente y estadísticamente para una población de celomocitos determinada.

1.2.3.2.2.3 Ensayos de mutagénesis en bacterias

Los ensayos de mutagenicidad se basan en la detección, en organismos diana, de fenotipos específicos después de un contacto con agentes fisicoquímicos. El cambio fenotípico, como por ejemplo la supervivencia en unas determinadas condiciones, o una mayor bioluminiscencia, puede ser resultado de cambios en las propiedades bioquímicas causadas por cambios genéticos. Debido a que los mecanismos de mutagénesis son comunes para todos los organismos vivos, se acepta que un mutágeno para un tipo celular debería considerarse también mutagénico para células de otros organismos (Wegrzyn y Czyz, 2003). Las células procariontas tienen una tasa de crecimiento más elevada, un cultivo y manipulación genética más simples, que los convierte en organismos ideales para este tipo de ensayo.

Test de Ames (*Salmonella Typhimurium*)

El test de Ames, utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* como organismo indicador de mutagénesis. Fue descrito hace más de 30 años (Ames, 1971) y constituye uno de los ensayos de mutagénesis más conocido, habiéndose ensayado miles de

compuestos químicos (Mortelmans y Zeiger, 2000). Este ensayo ha sido modificado en varias ocasiones desde su aparición (Ames *et al.*, 1973a,b, 1975; McCann *et al.*, 1975; Maron y Ames 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000). Se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* modificadas genéticamente en genes implicados en la biosíntesis de la histidina (gen *his*), en la reparación del DNA (gen *uvrB*) y en la biosíntesis del lipopolisacárido (gen *rfa*), lo que implica que la cepa sea auxotrofa para la histidina, tenga una permeabilidad más elevada de la membrana externa respecto a moléculas de elevado peso molecular y que además las mutaciones que tengan lugar no sean reparadas de forma eficiente (Ames *et al.*, 1973). Para extrapolar los datos de mutagénesis del test de Ames a mamíferos, es necesario llevar a cabo una preincubación del extracto a analizar con fracción microsomal hepática inducida (fracción S9). La duración del ensayo es de 48 horas. Se han detectado mutaciones de sustitución de base, inhibidores de síntesis de DNA, intercalantes del DNA y productos que lesionan el DNA (Wegrzyn y Czyz, 2003).

Mutatox

Se trata de un ensayo de genotoxicidad que utiliza como organismo indicador una cepa mutante de *Vibrio fischeri* (M169), con muy baja capacidad bioluminiscente (Ulitzur *et al.*, 1980; Bulich y Isenberg 1981; Ulitzur y Weiser 1981). El ensayo es parecido al ensayo Microtox[®], aunque en este caso la incubación de *Vibrio fischeri* M169 es de 24 horas (Microtox[®] es de 15-30 minutos). En este caso, cuando hay mutagénesis se incrementa la emisión de luz respecto a la cepa control. Para simular el metabolismo de los mamíferos, es necesario preincubar la muestra con fracción microsomal hepática S9 inducida (Johnson, 1992). Se ha observado que en muchos estudios donde se combinan el Mutatox y el test de Ames, las sensibilidades encontradas en ambos ensayos son comparables (Jarvis *et al.*, 1996, Hauser *et al.*, 1997; Vismara *et al.*, 1997; Johnson y Long, 1998; Bekaert *et al.*, 1999), salvo algunas excepciones (Madill *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

En los capítulos I y II, se ha estudiado el potencial catabólico de una serie de consorcios microbianos de interés para su utilización como inóculos en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos y, en concreto, se ha profundizado en la composición microbiana del consorcio AM, especializado en la biodegradación de HAPs de 3 y 4 anillos. En el capítulo III, se han diseñado una serie de ensayos de tratabilidad y se han aplicado a 2 suelos contaminados por hidrocarburos: uno con aceites minerales y otro con un producto petrolífero rico en fracción saturada. Por lo tanto, era interesante conseguir un suelo contaminado con HAPs, por ser ésta una familia de hidrocarburos de gran interés ambiental, donde aún no se habían probado los ensayos de tratabilidad. Asimismo, el hecho de tener un consorcio degradador de HAPs (consorcio AM) y la larga experiencia del grupo de investigación en el metabolismo de HAPs, nos decidió a trabajar con un suelo contaminado con creosota, la cual está muy enriquecida en HAPs

Así pues los objetivos de este capítulo han sido:

1. Aplicar los ensayos previos de tratabilidad a un suelo contaminado con creosota rico en HAPs
2. Caracterizar el proceso de biodegradación de HAPs desde un punto de vista multidisciplinar: físico-químico, microbiológico y ecotoxicológico.
3. Profundizar en el conocimiento de la estructura y la dinámica de las poblaciones microbianas, durante el proceso de biodegradación asociado a distintos procesos de bioestimulación.
4. Estudiar el efecto del bioaumentación en la biodegradación y en las poblaciones microbianas del suelo

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de optimizar el proceso de biorremediación de un suelo contaminado por HAPs, así como para mejorar el conocimiento básico de los procesos asociados a la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, se aplicaron los ensayos de tratabilidad (descritos en el capítulo III) en un suelo contaminado con creosota. La fase I de los ensayos consistió en la caracterización fisicoquímica del suelo, ensayos de respirometría (donde además, se determinó la biodegradación de TPH y evolución de las poblaciones microbianas) y una optimización de las condiciones de humedad para el proceso de biodegradación. En la fase II se monitorizó, en microcosmos, el proceso de biodegradación de HAPs diana, TPH y compuestos polares, la evolución de las poblaciones microbianas, la toxicidad y la genotoxicidad, a lo largo de 200 días de tratamiento.

Para este estudio se utilizó un suelo contaminado con creosota de textura franco-arcillosa, con un contenido elevado de HAPs. Se analizó la biodegradación de los TPH y la evolución de los compuestos polares del suelo mediante GC-FID y GC-MS respectivamente. Se evaluó el efecto de distintos tratamientos de biorremediación en las poblaciones microbianas, tanto por NMP como por DGGE del gen 16S rRNA. Los perfiles resultantes de DGGE se analizaron estadísticamente y además se identificaron filogenéticamente, por secuenciación, las bandas de DGGE predominantes. Se evaluó la toxicidad aguda de los lixiviados del suelo por Microtox[®] y la toxicidad del suelo en *Eisenia foetida*, mientras que para la genotoxicidad potencial se estudió el efecto de los TPH frente al DNA (lineal y circular), mediante el empleo de microscopia de fuerzas atómicas (AFM).

3.2 SUELO

El suelo se obtuvo de una planta industrial de creosotado de maderas en las proximidades de Barcelona. La contaminación del suelo era consecuencia del proceso de secado y almacenamiento de troncos de madera, los cuales estaban dispuestos en acopios,

una vez tratados con creosota y contaminaban el suelo por goteo de la creosota sobrante (figura 4.1).



Fig. 4.1. Visión panorámica y detallada de los acopios de troncos tratados con creosota durante el proceso de secado.

Se excavaron los primeros 20 cm de suelo, se tamizó el suelo por 6 mm y se obtuvieron un total de 50 kg de suelo resultantes de una muestra compuesta de cinco zonas de una parcela (fig. 4.1) que se llevaron al laboratorio y se conservaron a 4°C hasta su análisis.

3.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL SUELO

3.3.1 Análisis físicoquímico

El análisis físicoquímico de la muestra de suelo incluyó la determinación de la textura (granulometría), humedad, capacidad de campo, pH, conductividad eléctrica, nutrientes inorgánicos (nitratos, nitritos, amonio y fosfato) y carbono orgánico total (COT). Las determinaciones se llevaron a cabo según las especificaciones descritas en el apartado 3.3.1 del capítulo III

3.3.2 Análisis microbiológico

3.3.2.1 Hetrotrofos totales y degradadores de HAPs

La enumeración de la población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se llevó a cabo según la técnica del número más probable (NMP) miniaturizado (Wrenn y Venosa 1996), tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.6.2.2 del capítulo I, utilizándose TSB para cuantificar la población heterótrofa y medio mineral BMTM (ver composición en el apartado 3.3 del capítulo I) con una mezcla de HAPs (dibenzotiofeno, fenantreno, fluoreno y antraceno).

3.3.2.2 Ensayos respirométricos

Para evaluar si la población microbiana existente en el suelo era activa metabólicamente o potencialmente activa, se llevaron a cabo una serie de ensayos respirométricos, que consistieron en la cuantificación de CO₂ producido por la microbiota indígena del suelo en diferentes condiciones. Los ensayos se realizaron con una humedad equivalente al 60% de capacidad de campo y a temperatura de laboratorio (25°C ± 2°C), durante 13 días. Se añadieron 2 ensayos adicionales a los descritos en el apartado 3.3.2.2 del capítulo III, con 2 fuentes alternativas de nitrógeno (NH₄NO₃ y KNO₃). Se llevaron a cabo los siguientes ensayos por duplicado (para 10 g de suelo) y en réplicas independientes:

1. Suelo sin tratar (60% CC).
2. Suelo (60% CC) con nutrientes A (15 mg NH₄Cl y 2 mg K₂HPO₄).
3. Suelo (60% CC) con nutrientes A y glucosa (1% p/p) como sustrato fácilmente asimilable para evaluar la actividad metabólica real y potencial de la microbiota indígena.
4. Suelo (60% CC) con nutrientes B (NH₄NO₃ y K₂HPO₄) a una proporción molar de 300C:10N:1P respecto al COT.
5. Suelo (60% CC) con nutrientes C (KNO₃ y KH₂PO₄) a una proporción molar de 300C10:N:1P respecto al COT.
6. Control negativo (sin suelo). El CO₂ cuantificado en este ensayo se restaba de los ensayos con suelo.

La cuantificación del CO₂ producido se determinó según el protocolo descrito en el apartado 3.3.2.2 del capítulo III. Asimismo, para verificar si la producción de CO₂ se relacionaba con la biodegradación de TPH, se analizó gravimétricamente la biodegradación resultante de TPH (apartado 3.4.2), así como también se cuantificó la población microbiana heterótrofa y degradadora de HAPs (apartado 3.3.2.1).

3.4 MICROCOSMOS

3.4.1 Optimización de la humedad del suelo

Con el objetivo de definir el contenido en agua óptimo del suelo para llevar a cabo los ensayos de biorremediación en microcosmos, se ensayaron 5 humedades diferentes (5%, 20%, 40%, 60% y 75% de la capacidad de campo), comparando con un control abiótico autoclavado. Los ensayos se llevaron a cabo en viales de vidrio de 100 ml de capacidad, conteniendo 60 gramos de suelo con KNO₃ y KH₂PO₄ como fuente adicional de N y P para alcanzar una proporción molar equivalente a 300C:10N:1P en el suelo. La incubación fue de 15 días y los experimentos se realizaron por triplicado en réplicas independientes. Se determinó la biodegradación existente a nivel de los TPH (gravimetría) (apartado 3.4.4.2).

3.4.2 Tratamientos

Se diseñaron 7 tratamientos diferentes (1M-7M) que se detallan en la tabla 4.4. Cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado en microcosmos independientes que consistieron en jarras de vidrio de 1 L, lavadas por ultrasonidos y autoclavadas, a las que se añadió 600 g de suelo tamizado por 6 mm y que se taparon con papel de aluminio (figura 4.2). La aireación y la humedad se controlaron dos veces por semana, mezclando el suelo con agua desionizada estéril. Se incubaron en un armario extractor de gases durante 200 días a temperatura de laboratorio (20-25°C) y resguardados de la luz para evitar procesos de fotooxidación.

Los tratamientos llevados a cabo fueron: 2 tratamientos controles (suelo no tratado (1M) y suelo esterilizado (3M)); 4 tratamientos de bioestimulación, con el factor común de

la aireación (mediante agitación mecánica) y una humedad del 40% de capacidad de campo (2M: sin adición de nutrientes; 4M: con adición de nutrientes; 5M: con nutrientes y biotensioactivo; 7M: con nutrientes y octoato de hierro), y 1 tratamiento de bioaumentación (6M: suelo aireado con una humedad del 40% CC con adición de nutrientes e inoculado regularmente con biomasa procedente del consorcio AM degradador de HAPs). La adición de octoato de hierro en uno de los tratamientos se llevó a cabo debido a que se ha descrito que el hierro puede ser un elemento limitante para la biodegradación de HAPs (Dibble y Bartha 1976; Solanas, 1981)

Para realizar un seguimiento detallado de los procesos asociados a la biodegradación del suelo en los diferentes tratamientos, se llevaron a cabo análisis químicos (nutrientes inorgánicos y biodegradación de TPH, HAPs y polares), microbiológicos (NMP), moleculares (DGGE) y de ecotoxicidad y genotoxicidad (Microtox de lixiviados, ensayo de toxicidad aguda y reproductivo en *Eisenia foetida*, FETAX de lixiviados, y AFM) periódicamente durante los 200 días de incubación. Los intervalos de muestreo fueron los días 0, 21, 45, 90, 135 y 200. Para cada muestreo se tomaron cinco submuestras de cada microcosmos hasta reunir un total de 30 g que se conservaron a -20°C hasta su análisis, excepto para la determinación de la población microbiana heterótrofa y degradadora de HAPs, que se realizó el mismo día de muestreo.



Fig. 4.2. Detalle de los microcosmos.

Para confirmar que las diferencias observadas eran significativas, se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos resultantes mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y

el test de Duncan, con un nivel de significación α de 0,05. Para ello se utilizó el programa Statgraphics Plus version 5 (Statistical Graphics Corp.).

Tabla 4.4. Descripción de los tratamientos de biorremediación llevados a cabo en microcosmos.

Código	Tratamiento ^a	Descripción
1M	Suelo no tratado	Suelo en las condiciones originales (humedad equivalente a un 5,8% de la capacidad de campo del suelo).
2M	Básico	Suelo bioestimulado por aireación y una humedad equivalente al 40% CC.
3M	Autoclavado	Suelo autoclavado 3 veces a 121°C durante 20 minutos, con una periodicidad de 24 horas.
4M	Nutrientes ^b	Suelo aireado, con una humedad del 40% CC y adición de nutrientes inorgánicos (KNO ₃ y K ₂ HPO ₄) a una concentración final equivalente a la proporción molar de 300C:10N:1P respecto al COT.
5M	Nutrientes ^b + Biosurfactante	Tratamiento con nutrientes (4M) y adición del biotensioactivo M _{AT10} compuesto por ramnolípidos producidos por la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10 (Abalos <i>et al.</i> , 2004 y apartado 3.7.1 capítulo I) a una concentración de 150 mg L ⁻¹ en el agua intersticial. Se añadió tensioactivo al principio del experimento y a los 130 días.
6M	Nutrientes ^b + Inóculo ^c	Tratamiento con nutrientes (4M) y inoculación de biomasa del consorcio microbiano AM degradador de HAPs (Viñas <i>et al.</i> , 2002 y capítulo II). Se inoculó 5 veces durante los 200 días de incubación (día 14, 26, 57, 120, y 165) a la concentración necesaria para alcanzar 10 ⁸ células g ⁻¹ de suelo en cada inoculación.
7M	Nutrientes ^b + Octoato de hierro	Tratamiento con nutrientes (4M) y adición de ion férrico (a los 0 días y 145 días de incubación) en forma de octoato de hierro, como fuente oelofílica de hierro y a una concentración de 250 μ M del ión férrico en el agua intersticial, según Solanas (1981).

^a Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado en microcosmos independientes en jarras de vidrio de 1L de volumen, a las que se añadió 600 g de suelo tamizado (<6 mm). Dos veces por semana se airearon y se corrigió la humedad de las pérdidas de agua por evaporación.

^b Se añadió 1/3 del total de nutrientes inorgánicos al principio del experimento (día 0) y los 2/3 restantes se añadieron a los 50 y 85 días respectivamente.

^c Para obtener bioamasa del consorcio AM, a los 6 días de incubación se subcultivó en 500 ml de TSB y se incubó 16h hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,8, equivalente a un total de 5×10^{10} células en los 500 ml de TSB. Las células se lavaron con NaCl 0,85M y se utilizó el pellet resuspendido en NaCl 0,85M (30 ml) para inocular cada microcosmos del tratamiento 6M.

3.4.3 Seguimiento de los nutrientes inorgánicos

Con el fin de detectar disminuciones en la concentración de los nutrientes inorgánicos presentes, se llevó a cabo un seguimiento de la concentración de nitratos, nitritos, amonio y fosfato a lo largo de los 200 días de incubación en los intervalos de muestreo citados anteriormente. La metodología llevada a cabo fue según las especificaciones descritas en el apartado 3.3.1 del capítulo III.

3.4.4 Análisis químico de hidrocarburos y de compuestos polares

Los disolventes, principalmente utilizados para los procesos de extracción, fueron de calidad para análisis de residuos orgánicos de la casa comercial Baker. Todos los compuestos utilizados fueron de la mayor pureza disponible comercialmente. El agua utilizada fue bidesionizada (Milli-Q).

3.4.4.1 Extracto orgánico total (EOT)

La muestra de suelo se secó durante 16h a temperatura de laboratorio (22-25°C) y posteriormente se tamizó por 2 mm. Se utilizó ortoterfenil como estándar interno surrogate a una concentración final de 125 mg kg⁻¹ de suelo (250 µl de una solución stock de 1 mg ml⁻¹ en acetona).

El extracto orgánico total se obtuvo mediante extracción en baño de ultrasonidos. Para ello se mezclaron 2 gramos de suelo con 2 g de Na₂SO₄ anhidro y se colocaron en tubos de vidrio de centrifuga de 20 ml de capacidad nominal. Se sometió la muestra a cinco ciclos de extracción por ultrasonidos. En cada ciclo de extracción se añadieron 10 ml de diclorometano:acetona en proporción 1:1 (vol/vol), y se sometió la muestra a 15 minutos de ultrasonidos. Posteriormente, para separar el particulado en suspensión del extracto orgánico, se centrifugó la muestra a 3000 g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante (extracto orgánico). Los extractos orgánicos se secaron en un embudo conteniendo Na₂SO₄ anhidro y se concentraron en un rotavapor (Büchi) y corriente de N₂ hasta sequedad. Se calculó el extracto orgánico total por gravimetría.

3.4.4.2 Hidrocarburos totales del petróleo (TPH)

Para obtener los TPH se llevó a cabo un fraccionamiento del extracto orgánico total (EOT) por cromatografía en columna según el método 3611b de la EPA, tal y como se describe en el apartado 3.7.2.2.1 del capítulo I. Los TPH se cuantificaron por gravimetría y por GC-FID.

Para determinar la concentración de TPH por GC-FID, previamente se realizó una recta patrón con la fracción TPH del mismo suelo con 5 concentraciones conocidas, calculadas gravimétricamente y por duplicado. Posteriormente se aplicó la calibración a las muestras reales. Para ello, se utilizó un cromatógrafo modelo Trace 2000 (Termostest) equipado con una columna capilar DB5 (J&W) de 30 metros longitud por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm espesor de fase. El detector y el inyector se programaron a una temperatura constante de 310°C y 280°C respectivamente. El programa térmico se describe a continuación: Temperatura inicial de 50°C durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 4°C minuto^{-1} hasta una temperatura final de 310°C mantenida durante 10 minutos. El gas portador fue helio de máxima pureza con un flujo constante de 1.1 ml minuto^{-1} y el volumen de inyección fue de 1 μl en modalidad splitless durante 30 segundos.

3.4.4.3 Análisis de HAPs diana

Se analizaron los 16 HAPs prioritarios de la EPA (Keith y Telliard, 1979) y los HAPs metilados predominantes mediante GC-FID. La determinación de la concentración de cada HAP en el suelo se llevó a cabo teniendo en cuenta las rectas de calibración realizadas para cada uno de los HAPs (rectas de calibración con 5 concentraciones diferentes y por duplicado). Las condiciones de GC-FID fueron las que se han descrito anteriormente para los TPH (apartado 3.4.4.2). Es importante destacar, que previamente al análisis por GC-FID, se verificó mediante GC-MS la pureza de los picos resueltos.

3.4.4.4 Análisis de compuestos polares

Para obtener la fracción polar se llevó a cabo un fraccionamiento del extracto orgánico total (EOT) por cromatografía en columna, según el método 3611 de la EPA (apartado 3.7.2.2.1, capítulo I). Una vez purificada la fracción equivalente a los TPH (F1 +

F2), se obtuvo la fracción polar mediante una elución 100 ml de metanol. Finalmente, se concentró en un rotavapor (Büchi) y corriente moderada de N₂ hasta sequedad y se analizó la fracción polar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y por GC-MS.

3.4.4.4.1 Análisis de la fracción polar por HPLC

Para el análisis de la fracción polar, se resuspendió el extracto polar con 1000 µl de metanol y se filtró a través de un filtro de 4 mm de diámetro de nylon de 0,22 µm de poro y se inyectó directamente en un equipo de HPLC (Hewlett Packard) formado por una bomba HP1050, una columna Chromspher C₁₈ (Chrompack) de 25 cm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 5 µm, y equipado con un detector ultravioleta-visible de diodos en fila HP1040M serie II. Las condiciones del programa de HPLC fueron las siguientes: gradiente lineal de metanol-agua acidificada con ácido ortofosfórico (0,7 ml l⁻¹ de ácido ortofosfórico 85% en agua), empezando con 10:90 (vol/vol) y finalizando con 95:5 (vol/vol) en 20 min., seguido de un isocrático de 95:5 (vol/vol) durante 10 minutos. El flujo fue constante de 1 ml min⁻¹. Se detectaron compuestos polares de estructura aromática a una longitud de onda de 254 nm.

3.4.4.4.2 Análisis de la fracción polar por GC-MS

Para el análisis de la fracción polar por GC-MS fue necesario derivatizar la muestra antes de su análisis. Para ello se resuspendió el extracto polar seco con 200 µl de acetato de etilo y se derivatizó añadiendo trimetilsilil-trifluoracetamida (TMSTFA) (Sigma) en una proporción 1:1 (vol/vol), se incubó la mezcla durante 16 horas a temperatura de laboratorio (22-25°C), protegida de la luz, y finalmente, se secó con corriente de N₂ para eliminar el exceso de TMSTFA. Se resuspendió el extracto seco derivatizado con 200 µl de acetato de etilo y se analizó por GC-MS. Para ello, se utilizó un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard) modelo 5890 series II equipado con una columna HP-5 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y con un tamaño de partícula de 0,25 µm; y con un espectrógrafo de masas modelo 5989A (Hewlett Packard) como detector, operando con una energía de ionización de 70 eV. Las muestras se inyectaron en *splitless* durante 30 segundos utilizando helio como gas portador. La temperatura inicial fue de 50°C durante 2 minutos, seguido de un gradiente de 4°C minuto⁻¹ hasta una temperatura final de 310°C mantenida durante 10 minutos.

3.4.4.5 Fraccionamiento isotópico de HAPs

La discriminación o fraccionamiento isotópico del carbono es un proceso selectivo en el cual se altera la proporción de isótopos estables ^{13}C y ^{12}C , presentes en las moléculas con carbono. El fraccionamiento isotópico se produce principalmente por procesos biológicos y en mucha menor medida por procesos físicos tales como la evaporación o la adsorción-desadsorción (Morasch *et al.*, 2001; Richnow *et al.*, 2003a). Es importante destacar, que en la naturaleza el porcentaje de isótopos ^{12}C es mayoritario (98,89%) respecto al ^{13}C (1,11%), mientras que la proporción de ^{14}C es negligible, y en consecuencia, los cambios en la proporción de ^{13}C se observan a pequeña escala (‰) (Meckenstock *et al.*, 2004). El fraccionamiento isotópico de tipo biológico ocurre durante la fijación de CO_2 atmosférico en cloroplastos de algas y plantas por la acción de la ribulosa-bifosfato-carboxilasa (Rubisco), fijando preferentemente CO_2 con isótopos ^{12}C (O'Leary, 1981), y en bacterias y arqueobacterias autótrofas (Preus *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2002). La disminución en la proporción de isótopos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ que ocurre en la materia orgánica vegetal respecto a las rocas evaporíticas se ha conservado durante el tiempo geológico, y por lo tanto, los componentes del petróleo y del carbón también muestran una proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ inferior. El catabolismo de hidrocarburos y moléculas orgánicas, en general, también produce un fraccionamiento isotópico del carbono, utilizándose de forma selectiva la forma isotópica ^{12}C frente a la ^{13}C , y por lo tanto incrementando la proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de las moléculas residuales no metabolizadas.

En este trabajo se ha determinado si la biodegradación del fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno provoca un fraccionamiento isotópico en las moléculas residuales. Para ello se analizó, en el extracto TPH, la proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los HAPs mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas de proporción isotópica (GC-IRMS) (Finnigan MAT Delta spectrometer). El detector IRMS calcula la proporción de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ a partir del CO_2 formado tras un proceso de combustión para cada uno de los compuestos resueltos por cromatografía. La proporción $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se expresa en forma de $\delta^{13}\text{C}$ la cual se define en relación a un estándar de referencia V-PDB (un fósil de Belemnita del cretácico) (Craig 1975), como se muestra en la ecuación:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\left(\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ muestra}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ estándar PDB}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

El programa y las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se han descrito en el apartado 3.4.4.2. Una vez los compuestos eran eluidos de la columna GC, el efluente era trasladado hasta una cámara de combustión a 940°C, donde las moléculas orgánicas eran convertidas en CO₂ gas y vapor de agua. El vapor de agua era eliminado mediante una trampa Nafion[®] y los posibles óxidos de nitrógeno formados eran reducidos a N₂ gas en una columna reductora a 600°C. Finalmente, el CO₂ purificado era analizado en el espectrómetro de masas de proporción isotópica obteniéndose la $\delta^{13}\text{C}$.

Se comprobó y corrigió la deriva de señal ($\delta^{13}\text{C}$), la cual dependía de la temperatura del programa cromatográfico, mediante un estándar de *n*-alcanos de referencia con $\delta^{13}\text{C}$ certificada para cada componente. Además se utilizó el estándar PDB para verificar la fiabilidad de la respuesta del IRMS, y también se utilizó el ortoterfenil (presente en todas las muestras a analizar) para certificar la fiabilidad del análisis. Debido a que la $\delta^{13}\text{C}$ puede verse afectada por la concentración de HAPs analizada, se comprobó mediante un patrón de HAPs la repetitividad de la $\delta^{13}\text{C}$ en el rango de concentraciones de trabajo de las muestras reales de los microcosmos

3.4.5 Seguimiento de las poblaciones microbianas

Se estudió la evolución de la población microbiana en los diferentes tratamientos durante los 200 días de incubación (0, 21, 45, 90, 135 y 200 días de incubación), tanto por técnicas dependientes de cultivo (número más probable de la población heterótrofa total y degradadora de HAPs), como por técnicas independientes de cultivo (mediante DGGE de productos de PCR del gen 16S rRNA).

3.4.5.1 Población heterótrofa total y degradadora de HAPs

Para la enumeración de la población microbiana heterótrofa total y de la población degradadora de HAPs, se utilizó la técnica del NMP miniaturizado en placas de microtitulación (Wrenn *et al.*, 1996), tal y como se describe en el apartado 3.6.2.2 del capítulo I. Para ello, en cada tratamiento y momento de muestreo se reunieron 10 g de suelo, procedente de 3 submuestras de cada uno de los microcosmos y se llevó a cabo un banco de diluciones en Ringer 1/4.

3.4.5.2 DGGE

Para estudiar la evolución de la población microbiana en los diferentes tratamientos de biorremediación mediante técnicas independientes de cultivo, se utilizó la técnica de la electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE) de productos de PCR de genes 16S rRNA presentes en el DNA total del suelo. Para ello fue necesario, en primer lugar, la extracción del DNA genómico del suelo, en segundo lugar, la amplificación por PCR de genes 16S rRNA y, finalmente, la visualización por DGGE de los diferentes fragmentos de genes 16S rRNA amplificados. Posteriormente, se estudió el perfil de DGGE mediante métodos estadísticos de análisis multivariante (análisis de componentes principales (ACP), así como también se purificaron y se secuenciaron aquellas bandas predominantes de DGGE. Se analizaron los tratamientos 1M (suelo no tratado), 2M (bioestimulación sin adición de nutrientes), 4M (bioestimulación con nutrientes) y 6M (bioestimulación con nutrientes y bioaumentación).

3.4.5.2.1 Extracción de DNA genómico del suelo

Para decidir el método de muestreo, inicialmente se realizó la extracción de DNA total del suelo de los tres microcosmos de un tratamiento 1M y 2M. Por un lado se combinaron los extractos de DNA y se amplificaron por PCR los genes 16S rRNA y por otro se amplificaron por separado los DNAs de cada microcosmos. Finalmente se resolvieron por DGGE y se observó que la similitud en todos los casos era elevada (un coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0,80-0,85). Por lo tanto se decidió llevar a cabo la extracción de DNA de una muestra compuesta (0,75 g) procedente de los tres microcosmos para cada tratamiento y momento de muestreo. Para ello se utilizó el método de *bead-beating*, utilizando el kit UltraClean DNA Soil (MoBio Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la acción combinada de la lisis química mediante SDS y una lisis mecánica con micro-esferas de zirconio (0,5 mm de diámetro), en un proceso de agitación violenta por vortex. Finalmente, el DNA se purificó mediante columnas de sílica y precipitación con alcoholes siguiendo las intrusiones del fabricante. Sin embargo, para evitar procesos de inhibición de PCR, fue necesario un paso adicional de purificación mediante la utilización del kit comercial Clean DNA Wizard (Promega).

3.4.5.2.2 PCR

Se amplificaron por PCR las regiones hipervariables V3 a V5 de genes 16S rRNA del DNA total del suelo. Para ello se utilizaron los cebadores F341-GC y R907 correspondientes a las posiciones 341-358 y 907-928 según la numeración del gen 16S rRNA en *Escherichia coli* (Edwards *et al.*, 1989; Yu y Morrison 2004) y el programa II de PCR (ver características de los cebadores y del programa de PCR en las tabla 2.7 y 2.8 del capítulo II). Todas las PCRs fueron llevadas a cabo en 50 μ l de volumen de reacción conteniendo 1,25 unidades de AmpliTaq Gold polimerasa (Perkin-Elmer, Alemania), 10 mM Tris HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, cada deoxinucleosido trifosfato a una concentración de 200 μ M, 0,5 μ M de cada cebador y 1 μ l de DNA molde (aproximadamente 800 ng de DNA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorff). La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 3.9 del capítulo II.

3.4.5.2.3 Electroforesis de geles con gradiente desnaturizante (DGGE)

Se realizó el DGGE a partir de los productos de PCR de genes 16S rRNA del DNA total del suelo. Para ello se utilizaron 800 ng de producto de PCR, purificado mediante el kit Microcon PCR (Millipore) y cuantificado con el marcador Low DNA Mass Ladder (Gibco BRL), que se cargaron en geles de poliacrilamida (Biorad) al 6% (p/vol), de 0,75 mm de grosor (para obtener mejor resolución), con un gradiente desnaturizante de formamida-urea óptimo en el rango 35-70% (100% de desnaturizante equivale a urea 7M y un 40% p/vol de formamida). La preparación de los geles desnaturizantes se realizó según la metodología descrita en el apartado 3.11.1 del capítulo II. Para el DGGE se utilizó tampón de electroforesis TAE 1x (Tris 40 mM, acetato sódico 20 mM y EDTA 1mM equilibrado a pH 7,4) en un equipo DGGE-2001 System (CBS Scientific Company) a 100V y una temperatura de 60°C durante 16 horas.

La tinción y visualización de los geles de DGGE se llevó a cabo utilizando SybrGold (Molecular Probes) tal y como se ha descrito en el apartado 3.11.2 del capítulo II.

3.4.5.2.4 Análisis de geles de DGGE

3.4.5.2.4.1 Visualización de geles y densitometría de geles

Los geles se visualizaron por transiluminación en UV y se fotografiaron en un equipo Image Master (Amersham Pharmacia Biotech). La fotografía resultante se digitalizó en un scanner Snapscann e25 (Agfa) a 1200 dpi de resolución y la imagen digitalizada se analizó mediante el software Quantity one 4.1 (BioRad).

Se normalizaron todos los picos resultantes de la densitometría de los geles, obteniendo la intensidad relativa de cada pico (P_i), la cual se define como la proporción entre la intensidad de la banda y la suma de todas las intensidades de todas las bandas del mismo carril. Posteriormente, para simplificar el análisis y también corregir el ruido de fondo, para los cálculos posteriores únicamente se tuvieron en cuenta aquellos picos con más de un 2% de P_i , siguiendo las recomendaciones descritas por Fromin *et al.* (2002).

3.4.5.2.4.2 Índice de diversidad y dominancia

A lo largo de los 200 días de incubación se calculó el índice teórico de diversidad de Shannon-Weaver (H') y de dominancia de Simpson (SI) para los tratamientos 1M, 2M y 4M (tabla 4.4). Los dos índices se calcularon según la función matemática :

$$H' = -\sum P_i \log P_i$$

$$SI' = \sum (P_i)^2$$

3.4.5.2.4.3 Análisis de componentes principales (ACP)

Para evaluar el efecto de la adición de nutrientes en la bioestimulación, así como el periodo de incubación en los perfiles de DGGE, y por lo tanto en los cambios poblacionales, se analizaron los perfiles de DGGE obtenidos en los tratamientos 1M, 2M y 4M a los 0, 21, 45, 90, 135 y 200 días mediante análisis estadístico multivariante con un análisis de las componentes principales (ACP). En primer lugar, fue necesario identificar las bandas de DGGE según su R_f (definido como la distancia que migra una banda respecto al frente o longitud de la migración del gel). Una vez calculado el R_f de cada banda, se utilizó este valor para identificar las bandas de igual migración entre los diferentes carriles. Finalmente, se realizó el ACP siendo P_i el valor cuantitativo y R_f el

valor cualitativo. Para el ACP se utilizó la aplicación StatistiXL version 1.4 acoplado al paquete informático de Microsoft Excel.

3.4.5.2.5 Secuenciación y análisis filogenético de Bandas de DGGE

3.4.5.2.5.1 Aislamiento y secuenciación de bandas de DGGE

Se recortaron las bandas de DGGE predominantes para su posterior estudio. Para ello se utilizó un gel paralelo de DGGE que no se iluminó directamente con luz UV, para evitar lesionar el DNA a analizar (véase apartado 3.11.3 del capítulo II para más detalles). Las bandas se recortaron con un bisturí estéril lavado en agua Milli-Q estéril y en etanol 70% previo a cada corte, y se incubaron 16 horas a 4°C en 50 µl de agua Milli-Q estéril. Posteriormente se utilizaron alícuotas de 2µl del sobrenadante como DNA molde para una reamplificación por PCR con los cebadores F341-GC y R907 (tabla 2.7 del capítulo II) y el programa II de PCR (tabla 2.8 capítulo II) y se comprobó por DGGE su migración correcta en el gel y se secuenciaron con los mismos cebadores F341 (sin la cola de GC a 5') y R907.

Las secuencias de nucleótidos de ambas cadenas se determinaron por el método de Sanger *et al.* (1977), basado en la síntesis y terminación con dideoxinucleótidos (ddNTPs) mediante PCR. Para la secuenciación se utilizó la pre-mezcla de reacción ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorff) siguiendo el programa V de PCR (tabla 2.8 del capítulo II), con una temperatura de hibridación específica según el cebador utilizado (tabla 2.7 del capítulo II). La composición de la mezcla de reacción de PCR, utilizado para la secuenciación, se detalla en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Composición de la mezcla de reacción.

Mezcla de reacción
4 µl Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye 3.1)
2 µl Tamón de reacción
1-2 µl de DNA molde (0,2 µg ml ⁻¹)
3,2 pmoles de cebador
Agua bidestilada hasta 20 µl

Antes de analizar la muestra en el secuenciador automático, se eliminaron los ddNTP mediante una precipitación de la reacción de secuenciación. Para ello, a un Eppendorff de 1,5 ml se le añadieron los 20 µl de la reacción de secuenciación. Posteriormente se añadieron 5 µl de EDTA 125 mM y 60 µl de etanol 100%, se agitó levemente en un vortex y se dejó precipitar durante 15 minutos a temperatura de laboratorio. A continuación, se centrifugó la mezcla a 13000 g durante 20 minutos a 4°C y se eliminó la solución de etanol (sobrenadante). Entonces, se añadieron 200 µl de etanol 70% al *pellet* resultante y se centrifugó a 13000 g. durante 2 minutos a 4°C. Finalmente, se eliminó al máximo la solución de etanol (sobrenadante) y se secó el *pellet* al aire o en centrifugación con vacío en un Speed-Vac (Millipore).

Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona, en un secuenciador automático de electroforesis capilar ABI Prism DNA 3700 (Perkin- Elmer).

En aquellas bandas de DGGE donde las secuencias resultantes no fueron fiables, se clonó el producto de reamplificación en el vector pGEM-T easy (Promega) transformando células competentes de *Escherichia coli* DH5α, tal y como se especifica en el apartado 3.12 del capítulo II, y finalmente se secuenciaron los clones recombinantes de interés.

3.4.5.2.5.2 Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron estudiadas y ensambladas utilizando el software BioEdit (Hall 1999). Se inspeccionó la posible presencia de secuencias quiméricas utilizando el programa Check Chimera ubicado en el portal de *Ribosomal Data Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)(Maidak *et al.*, 2000). El análisis de la homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas se llevó a cabo *online* mediante BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias finales se alinearon y se compararon con secuencias obtenidas del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante el programa Clustalw versión 1.8.2.

La divergencia entre las diferentes secuencias obtenidas se comparó en una región de 550 pb, que engloba los dominios hipervariables (V3-V5) del gel del 16S rRNA. Para la construcción de un árbol filogenético se generó una matriz de distancias aplicando el

algoritmo de Jukes Cantor (Jukes y Cantor, 1969), a partir del alineamiento de las secuencias estudiadas con las secuencias existentes en el Genbank y el portal RDP. Finalmente, a partir de la matriz de distancias y aplicando el método de neighbor joining (NJ) con un bootstrap de 1000 repeticiones, se construyó el árbol filogenético utilizando el programa MEGA versión 2.1 (Arizona State University, Tempe).

3.4.5.2.5.3 Secuencias estudiadas

Las 38 secuencias identificadas en este capítulo se depositaron en el GenBank con los números de acceso AY58562-AY58599.

3.4.5.3 Efecto del bioaumentación en la diversidad microbiana del suelo

Para comprobar el efecto de la inoculación de poblaciones microbianas alóctonas en la diversidad de un suelo bioestimulado con nutrientes (6M), se compararon los tratamientos 6M, 4M (bioestimulación con nutrientes) y 1M (no tratado) a lo largo del periodo de incubación, mediante análisis estadístico de similitud entre perfiles de DGGE. Para ello, se identificaron las bandas según el Rf, se normalizaron las intensidades de la densitometría de cada carril y se calculó el coeficiente de correlación (similitud) de Pearson entre situaciones experimentales. Finalmente se construyó un dendograma, mediante el método de UPGMA, a partir de la matriz resultante de coeficientes de similitud de Pearson. Para el análisis de similitud y construcción del dendograma se utilizó la aplicación StatistiXL version 1.4 ejecutada con el paquete informático de Microsoft Excel.

3.4.6 Evaluación de la ecotoxicidad durante el proceso de biorremediación

La evaluación de la ecotoxicidad en procesos de biorremediación de matrices contaminantes complejas como la creosota, es de gran importancia. Esto es debido a que en algunos procesos metabólicos asociados a la biodegradación se pueden generar productos de oxidación parcial, que pueden presentar una mayor toxicidad que los productos parentales. Es importante conocer la evolución de la ecotoxicidad tanto para estudios de riesgo como para la mejora del conocimiento de los procesos de biodegradación y, en consecuencia, certificar que el proceso de biorremediación ha sido favorable más allá de la disminución en la concentración de contaminantes.

Para evaluar la ecotoxicidad del suelo se ha analizado tanto la toxicidad aguda como la genotoxicidad potencial. La toxicidad aguda se analizó mediante ensayos de Microtox[®] (*Vibrio fischeri*) en lixiviados de suelo y un ensayo de letalidad y reproducción en anélidos (*Eisenia foetida*), mientras que la genotoxicidad potencial se determinó analizando el efecto de extractos orgánicos del suelo (TPH) frente a DNA lineal y circular, mediante la utilización de microscopia de fuerzas atómicas (AFM).

3.4.6.1 Microtox[®]

La determinación de la toxicidad aguda de lixiviados del suelo se llevó a cabo mediante el ensayo de Microtox[®] (Azur Environmental Inc.), tal y como se ha descrito en el apartado 3.3.3 del capítulo III.

3.4.6.2 Ensayo de toxicidad aguda y capacidad reproductora en *Eisenia foetida*

Los ensayo de toxicidad aguda y reproducción en *Eisenia foetida* fueron llevados a cabo en colaboración con el equipo del Dr. Miquel Borrás de la unidad de Toxicología ambiental del Parc Científic de la UB.

En el ensayo de toxicidad aguda se determinó la letalidad y/o cambio de peso que produjo el suelo contaminado sobre el anélido *Eisenia foetida*, comparado con un suelo control no tóxico. Se analizó la toxicidad aguda del suelo no tratado (1M) y el suelo bioestimulado con nutrientes (4M) a lo largo del proceso de biorremediación (200 días) y el suelo bioestimulado sin nutrientes (2M) solamente a los 200 días de incubación.

Para ello se utilizaron 600 g de suelo de los tratamientos 1M y 4M de 0, 21, 45, 90 y 135 días de incubación y 600 g de los tratamientos 1M, 2M y 4M a los 200 días de incubación. Los suelos se depositaron en unos contenedores homologados para el ensayo según la normativa OECD 207 a una humedad del 40% de capacidad de campo, junto con 10 individuos adultos de *Eisenia foetida* por contenedor. El periodo de incubación del ensayo fue de 14 días a temperatura constante de 20 °C ± 2°C, con aireación y corrección de la humedad una vez por semana y un fotoperiodo regulado por luz artificial de 8-10 horas de luz. Se comparó el peso y supervivencia de los anélidos a los 0, 7 y 14 días de incubación entre los suelos contaminados y un suelo control no tóxico (10% de turba, 20%

arcillas, 70% de arenas y 0,3-1% de CaCO₃). Para ello los individuos de *Eisenia foetida* fueron lavados, secados y pesados, y se comprobó su supervivencia a los 0, 7 y 14 días de incubación.

Para el ensayo de reproducción de *Eisenia foetida* se alargó la incubación del ensayo de toxicidad aguda hasta los 28 días. Cada semana se observó el número de huevos (*cocoons*) y descendientes generados, comparando con un suelo control no tóxico anteriormente descrito.

3.4.6.3 Ensayo de toxicidad aguda y teratogénesis en embriones de *Xenopus laevis* (FETAX)

El FETAX es un ensayo de toxicidad aguda y de teratogénesis que se realiza a lo largo del desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*. En este estudio se ha evaluado mediante FETAX (siguiendo la normativa E 1439-98 de la ASTM) la toxicidad y teratogenicidad de lixiviados de suelo bioestimulado con nutrientes (4M) e incubados durante 90 y 200 días comparado con el suelo no tratado (1M) de 200 días.

3.4.6.3.1 Obtención del lixiviado

Para cada muestra se ensayaron 3 concentraciones diferentes de lixiviado con 2 réplicas por dilución. Para obtener el lixiviado se diluyó cada suelo con suelo control 1:1 (p/p) (ver composición en el apartado 3.4.6.2) y a continuación se resuspendieron 300 gramos de suelo diluido con 400 ml de solución FETAX (composición de la solución FETAX en 1000 ml de H₂O bidesionizada: 625 mg NaCl, 96 mg NaHCO₃, 30 mg KCl, 15 mg CaCl₂, 60 mg CaSO₄ · 2H₂O, 75 mg MgSO₄ a pH 7,6-7,9) a 40°C durante 48 horas, a continuación se extrajo el sobrenadante que se definió como la concentración x1 a partir del cual se ensayaron las diluciones 1:10, 2:10 y 5:10 con solución FETAX.

3.4.6.3.2 Obtención y preparación de embriones

Para la obtención de embriones de *Xenopus laevis* se extrajo la capa de gelatina inmediatamente después de la puesta de huevos. Para la desglatinización, se agitó suavemente la puesta con una solución de L-cisteína (al 2% con solución FETAX y pH 8,1) durante un breve periodo de tiempo para evitar la reducción de la supervivencia de los embriones. A continuación se eligieron embriones en buen estado según el “*Atlas of*

abnormalities: a guide for the performance of Fetax” (Bantle *et al.*, 1991), en los estados embrionarios comprendidos entre la media blástula (estadio 8) y la gástrula temprana (estadio 11).

3.4.6.3.3 Diseño experimental

Para cada concentración se utilizaron 2 placas de petri conteniendo 25 embriones cada una con 10 ml de solución FETAX con lixiviado. Se utilizaron 4 placas con embriones y solución FETAX sin lixiviado como control negativo, 6-aminonicotinamida como control positivo y, además, se evaluó el lixiviado del suelo control utilizado para diluir los suelos. Los ensayos FETAX se incubaron durante 96 horas a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ donde el 90% de los embriones en buen estado llegan al estadio 46. Cada 24 horas se renovó la solución FETAX (y por lo tanto el lixiviado) controlando que el pH se mantuviera alrededor de 7.5 ± 0.5 . El proceso de renovación se realizó con precaución para no dañar los embriones.

Se determinó el tipo y cantidad de malformaciones ocurridas durante el desarrollo embrionario, la mortalidad, así como la longitud de los embriones a las 96 horas de incubación. Con estos datos se intentó determinar la concentración de lixiviado que afectó al desarrollo embrionario del 50 % de los embriones (EC_{50}) o a la supervivencia de los mismos (LD_{50}).

3.4.6.4 **Genotoxicidad potencial**

Para valorar la genotoxicidad potencial de la matriz contaminante del suelo se ha propuesto una nueva metodología mediante el uso de la microscopia de fuerzas atómicas (AFM), llevada a cabo con la colaboración de la Dra. M. J. Prieto y el equipo de nanotécnicas de los Servicios Científicotécnicos de la UB. Esta técnica examina la interacción y el efecto de los extractos orgánicos, procedentes de enclaves contaminados, con el DNA lineal y circular (CCC).

3.4.6.4.1 Fundamento de la técnica de AFM

La microscopia de fuerzas atómicas (AFM) es una técnica que utiliza un microscopio de alta resolución, llamado genéricamente microscopio de campo próximo, que apareció en la década de los 80 (Binnig *et al.*, 1986). No fue hasta la década de los 90 que empezó a aplicarse a estudios de biología molecular, concretamente en el campo de las interacciones DNA/RNA-proteína y enzima-sustrato (Hansma 1996a; Hansma 1996b; Schaper y Jovin, 1996; Hansma *et al.*, 1997; Rippe *et al.*, 1997; Hansma y Pietrasanta 1998).

El funcionamiento de un microscopio de fuerzas atómicas se basa en la interacción de una punta de sílice (sonda), ubicada en un extremo de un brazo de dimensiones micrométricas (*cantilever*), y la muestra, la cual se deposita sobre una superficie completamente lisa, como por ejemplo, mica verde recién exfoliada. Se miden los desplazamientos que se ve obligada a realizar la punta para mantener la fuerza constante, al analizar la muestra depositada en la superficie lisa. El cambio de nivel o posición de la punta es detectado por un fotodetector de 4 cuadrantes, el cual recibe constantemente un haz láser reflejado desde la superficie del brazo (fig. 4.3a). Con esta información se genera un mapa topográfico (fig. 4.3b) en el que se puede observar el perfil o aspecto de la molécula, o la interacción molecular estudiada, con una resolución de hasta 10 pm en condiciones optimizadas y ausencia de vacío (Colton *et al.*, 1997).

Dentro de la familia de modalidades que usa la técnica de AFM (*contact mode*, *non-contact mode* y *tapping mode*), la mayoría de imágenes de DNA se han obtenido con el modo TMAFM (Tapping Mode Atomic Force Microscopy), en el cual el contacto entre la punta y la muestra es intermitente y débil, minimizándose las fuerzas laterales para que las muestras apenas sean dañadas y arrastradas, ya que el DNA es un material blando (fig. 4.3b).

A diferencia de los microscopios electrónicos, por AFM se pueden estudiar las muestras en aire o en líquidos y en ausencia de vacío

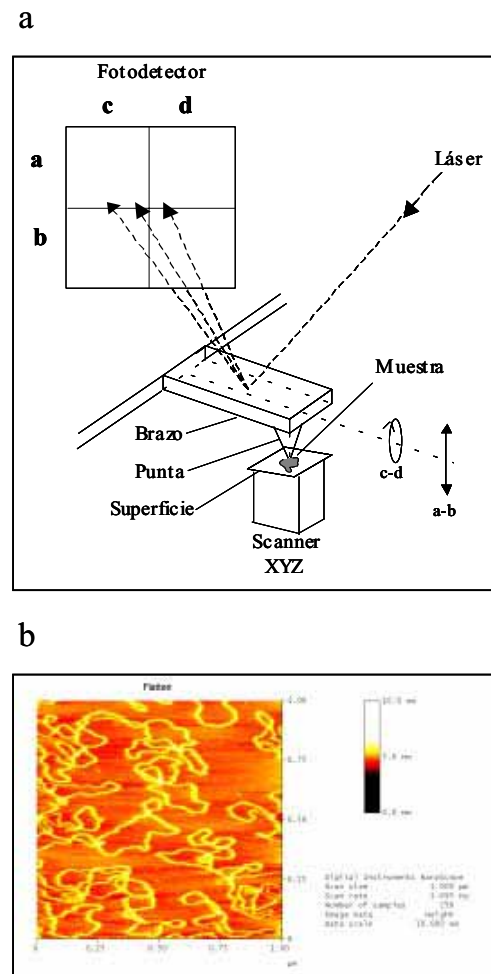


Fig. 4.3. a) Esquema de la estructura y funcionamiento de un microscopio de fuerzas atómicas funcionando en "Tapping Mode" b) Plásmido pBR322 observado por TMAFM .

3.4.6.4.2 DNA utilizado

Se utilizó, como DNA lineal, un producto de PCR de 587 pb de longitud procedente de la amplificación del gen 16S rRNA con los cebadores F341-GC y R907 mediante el programa II de PCR (tabla 2.7 y 2.8 capítulo II) a partir del DNA genómico de una cepa bacteriana de laboratorio. Para utilizar el producto de PCR por AFM, previamente se purificó el DNA mediante el kit Wizard-SV clean DNA (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cuantificar el DNA lineal se utilizó el marcador "Low DNA Mass Ladder" (Gibco). Como DNA circular (CCC) se utilizó el plásmido pBR322 purificado y cuantificado (Bhoeringer).

3.4.6.4.3 Preparación de muestras de TPH

Se analizaron extractos de TPH del tratamiento 2M (bioestimulación sin nutrientes) al final de su incubación (200 días) que se compararon con el suelo no tratado (1M) a los 200 días de incubación. Debido a problemas de adsorción del DNA lineal en la mica a elevadas concentraciones de DMSO, se optó por ensayar los TPH disueltos en un 4% de DMSO en tampón Hepes (4 mM Hepes pH 7,4, 5 mM KCl y 2mM MgCl₂). Para ello, se evaporaron 50µl de extracto de TPH en diclorometano (equivalente a 0,1 gramos de suelo) y posteriormente se resuspendió con 20 µl de DMSO, y una vez solubilizado el extracto, se añadieron 480 µl de tampón Hepes. Posteriormente se realizó el banco de diluciones (con un factor de 10) con Hepes-DMSO 4% hasta la dilución 1:10⁶. Finalmente se filtraron las diluciones con filtros de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro para eliminar precipitados y particulado.

Todas las diluciones filtradas (1M y 2M) se incubaron con DNA y se analizaron, para ver el posible cambio del mismo por los compuestos presentes, comparándolo también con un DNA control sin el extracto de TPH. Para cada dilución se incubaron 2,33 µl del extracto de TPH (4% DMSO) con 8,25 µl de DNA (15 ng de DNA lineal o circular) diluido en tampón HEPES, durante 4 horas a 25°C y en oscuridad. Para su visualización por AFM, se procedió depositando 3 µl de cada incubación durante 2 minutos sobre una superficie de mica verde recién exfoliada (Ashville-Schoonmaker Mica Co.), y a continuación se lavó energicamente con abundante agua Milli-Q , secándose después con una corriente moderada de nitrógeno.

3.4.6.4.4 Condiciones de AFM

Las muestras fueron analizadas en un equipo de AFM Nanoscope III Multimode (Digital Instrumentals Inc.) funcionando en “Tapping Mode” (TMAFM) a una tasa de rastreo de 1-3 Hz. Las sondas de AFM (Nanosensors GmbH) contenían un brazo de silicona monocristalina de 125 µm de largo con una punta cónica de silicio incluida en un extremo, y mostraban una frecuencia de resonancia media de $f_0=330\text{kHz}$ y una constante de muelle $K= 50\text{N/m}$. El brazo es rectangular y el radio de la punta es de 10 nm, con un ángulo del cono de 35°. Las condiciones ambientales fueron: ausencia de vacío, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa inferior al 40%.

4 RESULTADOS

Los resultados obtenidos se han descrito siguiendo las 2 fases establecidas en el protocolo de ensayos de tratabilidad diseñado en el capítulo III:

Fase I: Caracterización fisicoquímica del suelo, enumeración de las poblaciones microbianas, evaluación de su actividad metabólica real y potencial y biodegradabilidad de la creosota en el suelo.

Fase II: Influencia de distintos parámetros fisicoquímicos y de la inoculación del consorcio AM degradador de HAPs en la biorremediación del suelo contaminado con creosota. Seguimiento microbiológico mediante técnicas dependientes de cultivo (NMP) e independientes de cultivo (DGGE) y ecotoxicológico mediante ensayos de toxicidad aguda (Microtox[®] y *Eisenia foetida*) y de genotoxicidad potencial (AFM) de los procesos de biorremediación.

4.1 FASE I DEL ESTUDIO DE TRATABILIDAD

4.1.1 Características fisicoquímicas del suelo

El suelo estudiado procede de los primeros 20 cm, habiéndose descartado los 2 cm superficiales debido a grandes acumulaciones de corteza vegetal y costras sólidas de creosota (fig. 4.1). Los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo se muestran en la tabla 4.6.

El suelo presentaba una textura (granulometría) clasificada como arcillosa/franco-arcillosa con un elevado contenido en arcillas y limos (68% de la granulometría) y en consecuencia, una elevada capacidad de campo (27%). Sin embargo, en el momento del muestreo, el suelo estudiado tenía un contenido muy escaso de agua (1,6 %). La conductividad era baja como también lo eran las concentraciones de nitratos, nitritos, amonio y fosfato. El suelo era orgánico con un COT elevado (4,2%) y un contenido de 8000 mg TPH kg⁻¹ suelo que representaba un 10% del COT. Las fuentes inorgánicas de nitrógeno estaban en una proporción molar C:N de 1100:1 respecto al COT y 133:1 (C:N)

respecto al carbono equivalente a los TPH, proporciones molares inferiores a la óptima 10-30:1 (C:N) (Alexander, 1999). El pH era neutro-básico, favorable para procesos de biodegradación, así como la presencia de una elevada población microbiana degradadora de HAPs ($1,8 \times 10^5$ NMP g^{-1} suelo) que representaba un 12% de la población heterótrofa total.

Tabla 4.6. Características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo.

Textura	Arcilloso/Franco-arcilloso
Arcillas (%)	40
Limos (%)	28
Arenas (%)	32
Humedad (%)	1,6
100% CC (% , humedad)	27,7
pH _(1:2,5)	7,5
Conductividad ($\mu S\ cm^{-1}$)	228
Nitrógeno Total (%)	$0,15 \pm 0,01$
Nitrato ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	$17,2 \pm 0,85$
Nitrito ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	< 0,5
Amonio ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	$2,8 \pm 0,80$
Fosfato ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	<0,5
COT (%)	$4,22 \pm 0,23$
EOT ² ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	12510 ± 452
TPH _{gra} ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	8615 ± 510
TPH _{GC-FID} ($mg\ kg^{-1}$ suelo)	8196 ± 480
Heterótrofos totales (NMP g^{-1} suelo)	$1,5 \times 10^6$
Degradadores de HAPs (NMP g^{-1} suelo)	$1,8 \times 10^5$

4.1.2 Caracterización de la matriz contaminante del suelo

El suelo presentaba una elevada concentración inicial de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) (entre 8200 y 8600 $mg\ kg^{-1}$ cuantificados por gravimetría y GC-FID) que representaban un 85% del extracto orgánico total (EOT), mientras que el 90% de los TPH eran compuestos pertenecientes a la fracción aromática, en concordancia con proporciones encontradas en otros emplazamientos contaminados con creosota (Mueller *et al.*, 1989). No se detectaron compuestos fenólicos, naftaleno ni sus alquil-derivados por GC-FID, ni por

GC-MS (siendo el límite de detección de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$). Teniendo en cuenta que el suelo no estuvo afectado por aportes de creosota durante los 3 meses previos al muestreo, es probable que una parte de los HAPs y los TPH desapareciera por volatilización, fotooxidación, lixiviación, envejecimiento (*ageing*) y/o biodegradación, así como también durante el proceso de creosotado de la madera realizado a elevadas temperaturas ($>100^\circ\text{C}$). En concordancia con lo descrito anteriormente, las concentraciones de acenafteno, fluoreno y fenantreno eran claramente inferiores a las de fluoranteno (tabla 4.7), cuando en suelos recientemente contaminados con creosota ocurre lo contrario (Mueller *et al.*, 1989).

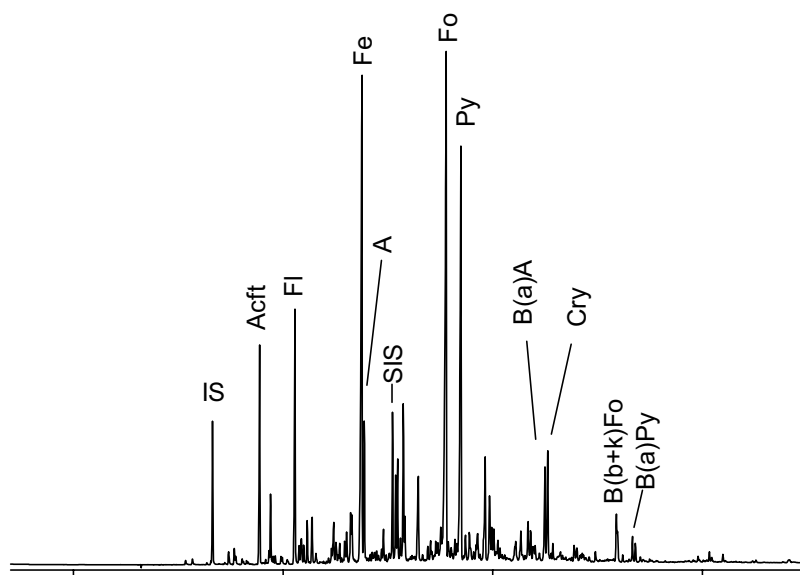


Fig. 4.4. Perfil cromatográfico (GC-FID) del extracto de TPH del suelo. IS, estándar interno; SIS, estándar interno surrogado; Acft, acenafteno; Fl, fluoreno; Fe, fenantreno; A, antraceno; Fo, fluoranteno; Py, pireno; B(a)A, benzo(a)antraceno; Cry, criseno; B(b+k)Fo, benzo(b)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno; B(a)Py, benzo(a)pireno.

Los HAPs de 3 y 4 anillos fueron los más abundantes, con concentraciones elevadas que oscilaron entre los 100 y 700 mg kg^{-1} mayoritarios (tabla 4.7), superando en todos los casos los umbrales de los niveles de referencia para suelos de uso industrial definidos en el Real Decreto 9/2005 y la normativa holandesa seguida, hasta la fecha, por la Generalitat de Catalunya. Cabe mencionar que las concentraciones de fenantreno, fluoranteno y pireno representaban el 51% del total de los 16 HAPs prioritarios de la EPA.

También se encontraron HAPs de 5 anillos como el benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno (fig. 4.4 y tabla 4.7).

Tabla 4.7. Composición de la fracción aromática del suelo contaminado con creosota.

Componente	Concentración. (mg kg ⁻¹ suelo)	NGR ¹ (mg kg ⁻¹ suelo)	
		A	B
EOT	11900 ± 452	ND ²	ND
TPH	8196 ± 480	50	2000
Acenafteno	151 ± 4	100	ND
Fluoreno	182 ± 2	50	ND
Fenantreno	496 ± 24	ND	10
Antraceno	114 ± 15	100	1300
3C ₁ -fenantreno	72 ± 6	ND	ND
2C ₁ -fenantreno	78 ± 4	ND	ND
C ₁ -antraceno	25 ± 5	ND	ND
CYP 4/9C ₁ -fenantreno	131 ± 7	ND	ND
1C ₁ -fenantreno	40 ± 1	ND	ND
Fluoranteno	693 ± 48	100	1000
Pireno	387 ± 30	60	ND
Benzo(a)antraceno	108 ± 10	20	535
Criseno	144 ± 10	100	55
Benzo(b+k)fluoranteno	82 ± 7	20/120	ND/535
Benzo(a)pireno	21 ± 2	2	7,5

¹A: Niveles genéricos de referencia para los 16 HAPs prioritarios de la EPA en suelos de uso industrial definidos en el Real Decreto de 14 de enero de 2005 (9/2005) (A) y en la Junta de Residus de la Generalitat de Catalunya según la normativa holandesa (B). ²ND: sin valor definido

4.1.3 Caracterización microbiológica del suelo y ensayos de respirometría

En las condiciones iniciales (1,5 % de humedad), el suelo presentaba una abundante población heterótrofa (1,5 x 10⁶ NMP g⁻¹) y degradadora de HAPs (1,8 x 10⁵ NMP g⁻¹ suelo) la cual representaba un 12% de la población heterótrofa total. La elevada proporción de población degradadora y la presencia de fenantreno (HAP poco volátil) en unas

concentraciones claramente inferiores a las del fluoranteno, indicaban la posible existencia de procesos de biodegradación llevados a cabo por la microbiota autóctona del suelo.

Para determinar la actividad metabólica de la población microbiana y la biodegradabilidad de la matriz contaminante, se llevaron a cabo una serie de ensayos respirométricos (ensayos ampliados respecto al apartado 3.3.2.2 del capítulo III) (fig. 4.5), que se complementaron con una determinación de la población microbiana heterótrofa total y degradadora de HAPs (fig. 4.6) y con una cuantificación de la biodegradación de los TPH, antes y después de la respirometría. Como puede observarse en la figura 4.5, la población microbiana del suelo mostró una fase de latencia de 1 día tras el cual en todos los casos existió una gran producción de CO₂ durante los 13 días de duración del ensayo respirométrico.

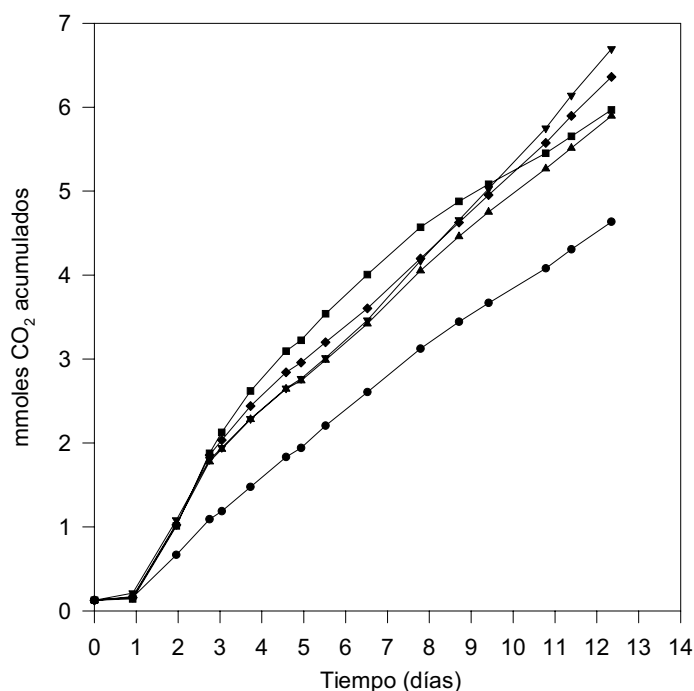


Fig. 4.5. Producción de CO₂ acumulada en 10 gramos de suelo en diferentes condiciones de bioestimulación. ●, 60% cc; ▲, 60% cc + 15 mg NH₄Cl + 2 mg K₂HPO₄; ■, 60% cc + 15 mg NH₄Cl + 2 mg K₂HPO₄ + Glucosa 1%; ▼, 60% cc + NH₄NO₃ + K₂HPO₄ (en proporción molar 300:C:10N:1P respecto COT); ◆, 60%cc + KNO₃ + K₂HPO₄ (en proporción molar 300:C:10N:1P respecto COT).

La bioestimulación sin adición de nutrientes inorgánicos implicó una actividad metabólica elevada (4,1 mmoles acumulados a los 10 días), muy superior a la observada

con el suelo contaminado con aceites minerales descrito en el capítulo III (apartado 4.1.1 y fig. 3.7 del capítulo III) que acumuló 0,20 mmoles de CO₂ en 10 días sin adición de nutrientes ni glucosa. La bioestimulación con adición de diferentes nutrientes inorgánicos (NH₄Cl, NH₄NO₃ y KNO₃ como fuente de nitrógeno y K₂HPO₄ como fuente de fósforo), produjo una respuesta similar (5,2-5,7 mmoles de CO₂ acumulados a los 10 días), ligeramente superior a la bioestimulación sin nutrientes y muy superior respecto al suelo contaminado con aceites minerales bioestimulado con nutrientes, descrito en el capítulo III (apartado 4.1.1 del capítulo III), que acumuló 0,6 mmoles de CO₂. La adición de glucosa no incrementó la producción de CO₂ tras 10 días de respirometría y exhibió una respuesta similar a los tratamientos con nutrientes.

La elevada producción de CO₂ coincidió con un incremento de las poblaciones microbianas entre 1 y 2 ordenes de magnitud en la población heterótrofa total y en la degradadora de HAPs (fig. 4.6).

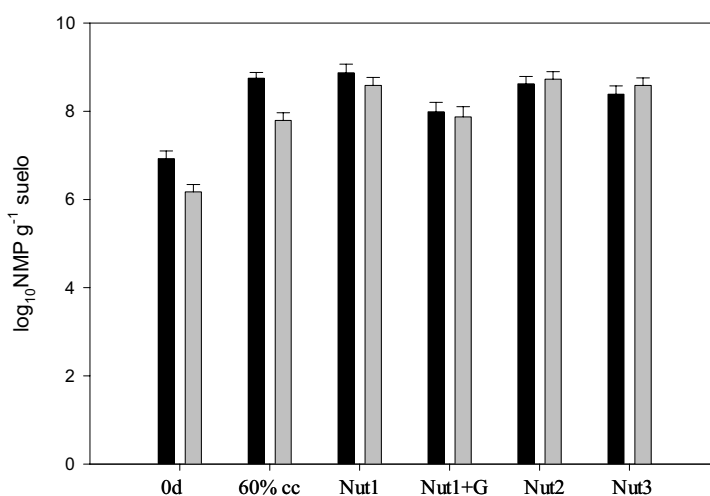


Fig. 4.6. Evolución de las poblaciones heterótrofa total y degradadora de HAPs (NMP) antes y después de los ensayos de respirometría. Barras negras (heterótrofos), barras grises (degradadores de HAPs). 0d, Suelo al inicio de la respirometría; 60%cc, suelo al 60% cc sin adición de nutrientes; Nut 1, 60% cc + 15 mg NH₄Cl + 2 mg K₂HPO₄; Nut1 +G, 60% cc + 15 mg NH₄Cl + 2 mg K₂HPO₄ + Glucosa 1%; Nut2, 60% cc + NH₄NO₃ + K₂HPO₄ (en proporción molar 300:C:10N:1P respecto COT); Nut3, 60%cc + KNO₃ + K₂HPO₄ (en proporción molar 300:C:10N:1P respecto al COT).

En las respirometrías con adición de nutrientes, se alcanzaron poblaciones superiores a 10⁸ NMP g⁻¹ con una proporción del 70-100 % de degradadores de HAPs. Sin

embargo, el ensayo sin nutrientes aumentó la población en un orden de magnitud conservando la proporción inicial de degradadores de HAPs (15%). Todos los tratamientos ensayados causaron una biodegradación de los TPH entre el 10-17%.

4.2 FASE II DEL ESTUDIO DE TRATABILIDAD (MICROCOSMOS)

Una vez observado, en la fase I del estudio de tratabilidad, que el suelo contaminado con creosota presentaba una notable población microbiana degradadora de HAPs, metabólicamente activa y bioestimulable, y que la matriz contaminante era biodegradable en las condiciones fisicoquímicas del suelo, se procedió a la fase II del estudio. En esta fase se evaluó, en microcosmos, el efecto de diferentes factores fisicoquímicos y biológicos en la biodegradación de la creosota, la dinámica y la estructura de las poblaciones microbianas implicadas y la ecotoxicidad del suelo durante el proceso de biorremediación.

Se eligieron KNO_3 y K_2HPO_4 en una proporción 300C:10N:1P respecto al COT, como fuentes de N y P para los tratamientos de bioestimulación con nutrientes de la fase II, ya que se comprobó, en los ensayos de producción de CO_2 , que fue el tratamiento que causó una mayor biodegradación de TPH (17%), además de una importante producción de CO_2 (5,5 mmoles a los 10 días), solamente inferior al tratamiento con NH_4NO_3 y K_2HPO_4 (5,7 mmoles de CO_2 a los 10 días) el cual degradó un 10% de los TPH al finalizar la respirometría.

4.2.1 Optimización de la humedad del suelo

Para determinar la humedad óptima del suelo se evaluaron 5 contenidos de agua (5%, 20%, 40%, 60% y 75% de la capacidad de campo) en condiciones de bioestimulación (agua con aireación y con KNO_3 y K_2HPO_4 como fuentes de N y P) en microcosmos miniaturizados (60 gramos de suelo en viales de vidrio de 100 ml de capacidad).

Como puede observarse en la figura 4.7, los mejores resultados se alcanzaron con un 40% y un 60% de la capacidad de campo, presentando un porcentaje de biodegradación de los TPH del 20-22%, significativamente superiores ($P < 0,05$) a los otros tratamientos (14% de biodegradación con un 20% cc y 75% cc). El suelo no tratado (5% de capacidad

de campo) no mostró biodegradación en los TPH ($P > 0,05$ respecto los TPH iniciales). El suelo autoclavado experimentó una disminución del 7% respecto a las condiciones iniciales, probablemente por procesos de volatilización y absorción de los contaminantes a la materia orgánica, ya que la población microbiana (analizada mediante NMP) no era viable. Teniendo en cuenta la textura franco-arcillosa del suelo se eligió el 40%, y no el 60% de la capacidad de campo, para llevar a cabo los tratamientos en microcosmos para favorecer una mejor aireación del suelo.

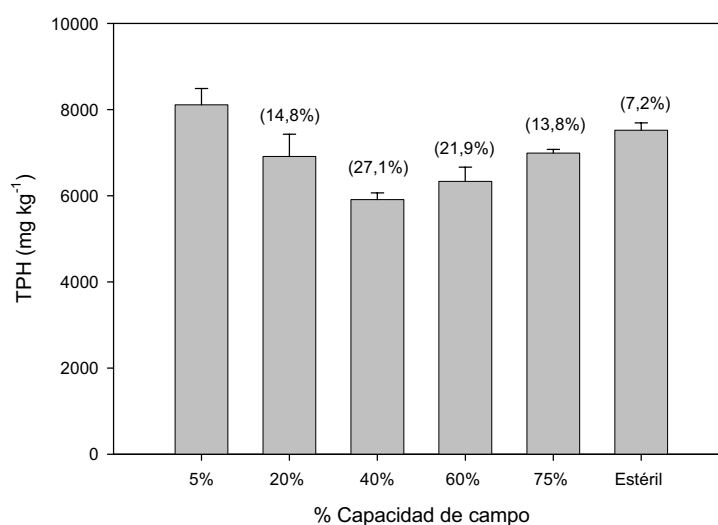


Fig. 4.7. Efecto del contenido de agua del suelo en la biodegradación de los TPH después de 15 días de incubación. Los porcentajes de biodegradación se indican entre paréntesis. Las barras indican la desviación estándar ($n=3$).

4.2.2 Biodegradación de TPH y HAPs

El tratamiento 1M (suelo no tratado) se utilizó como control a partir del cual se calculó la biodegradación de los TPH y los HAPs diana en los diferentes tratamientos, ya que la concentración de TPH no disminuyó significativamente ($P > 0,05$) en el transcurso de los 200 días de incubación (tabla 4.8 y fig. 4.9-10), mientras que si existió una leve disminución en el suelo estéril (autoclavado, 3M). El mismo comportamiento se observó para los HAPs diana (tabla 4.8 y fig. 4.9-10), con la excepción del acenafteno y fluoreno que disminuyeron un 26% y un 46% respectivamente, en los 2 tratamientos durante los 200 días de incubación (fig. 4.10), probablemente debido a fenómenos de volatilización.

Todos los tratamientos de bioestimulación (2M, 4M-7M), tras 200 días de incubación, degradaron los TPH de forma muy significativa con porcentajes de degradación con valores del 63% y 79% para el tratamiento 2M (valores graviméticos y por GC-FID respectivamente) y del 56% y 72-74% para los tratamientos 4M-7M (tabla 4.8).

Tabla 4.8. Concentración y degradación (%) de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) y HAPs diana en los diferentes tratamientos de biorremediación en microcosmos.

	Concentración (mg kg ⁻¹ suelo seco)		(% Degradación de TPH y HAPs a los 200 días de incubación)				
	1M (200d)	3M (200d)	(2M)	(4M)	(5M)	(6M)	(7M)
TPH (gravim.)	8566 ± 354 a	7900 ± 173 b	63 c	56 d	56 d	56 d	54 d
TPH (gc-fid)	8120 ± 285 a	7570 ± 39 b	79 c	74 d	73 d	73 d	72 d
Acenafteno	80 ± 7 a	74 ± 2 a	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
Fluoreno	137 ± 10 a	117 ± 3 b	100 c	100 c	100 c	100 c	100 c
Fenantreno	510 ± 23 a	465 ± 10 b	96 c	96 c	97 c	96 c	96 c
Antraceno	85 ± 8 a	95 ± 2 a	84 b	81 b	79 b	80 b	87 b
3C1Fe	75 ± 1 a	71 ± 2 a	100 b	100 b	100 b	100 b	94 b
2C1Fe	81 ± 2 a	78 ± 3 a	100 b	100 b	88 c	83 b	82 c
C1A	20 ± 1 a	21 ± 1 a	100 b	47 c	44 c	48 c	46 c
CYP4/9C1Fe	128 ± 4 a	116 ± 3 b	97 c	89 c	89 c	89 c	88 c
1C1Fe	41 ± 2 a	40 ± 2 a	100 b	100 b	89 b	100 c	100 b
Fluoranteno	728 ± 38 a	707 ± 33 a	92 b	92 b	94 b	92 b	91 b
Pireno	403 ± 9 a	386 ± 8 a	87 b	90 c	90 c	89 c	88 b
B(a)A	115 ± 3 a	112 ± 4 a	72 b	43 c	40 c	41 c	39 c
Cryseno	153 ± 8 a	147 ± 5 a	62 b	39 c	35 c	34 c	33 c
B(b+k)fteno	71 ± 12 a	80 ± 16 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Benzo(a)pireno	22 ± 1 a	19 ± 1 a	11 a	9 a	0 a	4 a	4 a
HAPs totales ²	2649 ± 130	2518 ± 148	87a	84b	83b	83b	83b

¹Diferentes caracteres (letras) en una fila representan la existencia de diferencias significativas ($P < 0,05$) en concentración y biodegradación entre tratamientos (1M a 7M). ²La concentración de HAPs totales es la suma de las concentraciones de los 16 HAPs prioritarios de la EPA y de los alquilfenantrenos. *Tratamientos:* 1M: suelo no tratado; 2M Suelo bioestimulado (60%cc y aireado) sin nutrientes; 4M suelo bioestimulado con nutrientes; 5M suelo bioestimulado con nutrientes y adición de biotensioactivo; 6M Suelo bioestimulado con nutrientes e inoculado con el consorcio AM; 7M, suelo bioestimulado con nutrientes y adición de octoato de hierro

En la figura 4.8, se muestran a modo de ejemplo los perfiles cromatográficos (GC-FID) obtenidos antes y después del proceso de biorremediación en los tratamientos 1M (suelo no tratado), 2M (suelo al 60% cc) y 4M (suelo al 60% cc con nutrientes), donde puede observarse la reducción significativa de los TPH con una desaparición casi completa del acenafteno, fluoreno y los HAPs de 3 anillos (fenantreno y antraceno), una disminución muy significativa del fluoranteno y pireno y moderada del criseno y benzo(a)antraceno.

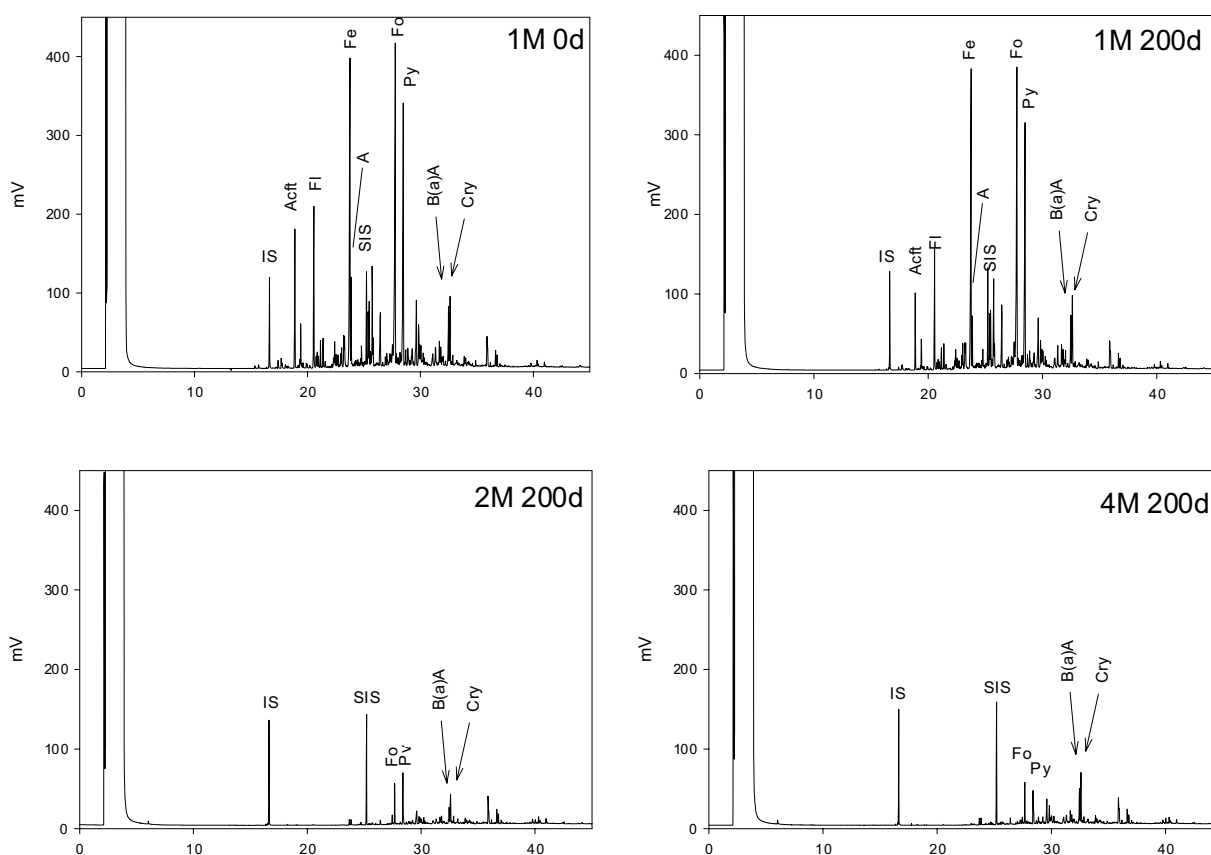


Fig. 4.8. Perfiles cromatográficos de la fracción TPH del suelo contaminado con creosota a los 0 y 200 días de incubación en los microcosmos 1M (suelo no tratado), 2M (bioestimulación sin nutrientes) y 4M (bioestimulación con nutrientes). IS, estándar interno; SIS, estándar interno surrogate; Acft, acenafteno; Fl, fluoreno; Fe, fenantreno; A, antraceno; Fo, fluoranteno; Py, pireno; B(a)A, benzo(a)antraceno; Cry, criseno.

Las cinéticas de biodegradación de los TPH (fig. 4.9) y de los HAPs diana (fig. 4.10) observadas (fig. 4.9) siguieron una cinética del tipo “palo de hockey” (Alexander, 1999) caracterizada por una biodegradación muy significativa en la primera fase seguida de una disminución de la velocidad de biodegradación a medio y largo plazo. Matemáticamente todas las cinéticas experimentales (TPH y HAPs diana) se ajustaron a

funciones de descomposición de primer orden ($y=ae^{-kt}$ y $y=y_0 + e^{-kt}$, con un $r^2=0,70-0,80$ y $r^2=0,95-0,99$ respectivamente, siendo “y” la concentración en un momento determinado, “k” la constante o tasa de degradación y “t” el tiempo transcurrido). Sin embargo, para poder comparar las tasas de degradación (k) con otros estudios, fue necesario ajustar las cinéticas experimentales a la expresión $y=ae^{-kt}$ en cada caso. Teniendo en cuenta que el ajuste matemático durante todo el periodo de incubación (200 días) no se ajustaba correctamente ($r^2 < 0,80$), fue necesario buscar los intervalos de tiempo que se ajustaran mejor ($r^2 > 0,95$) a la función. Finalmente quedaron establecidos 2 periodos de tiempo: periodo inicial (días 0-45) y periodo tardío (días 90-200), definiéndose para cada uno la k_1 y k_2 respectivamente. Por lo tanto, las cinéticas de biodegradación observadas fueron de tipo bifásico, ya que presentaron 2 tasas de biodegradación (k_1 y k_2) significativamente diferentes a lo largo del periodo de incubación (tabla 4.9).

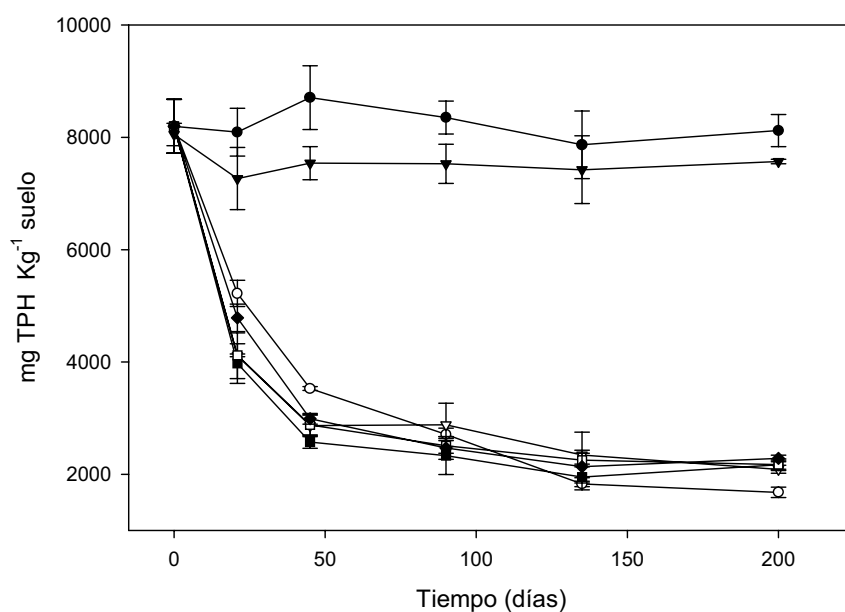


Fig. 4.9. Evolución de la concentración de TPH del suelo durante 200 días de incubación en microcosmos. Las barras muestran la desviación estándar (n=3). Tratamientos: ●, 1M (no tratado); ○, 2M (sin nutrientes); ▼, 3M (estéril); ■, 5M (nutrientes y biotensioactivo); □, 6M (nutrientes e inóculo AM); ▽, 4M (nutrientes); ◆, 7M (nutrientes y octoato de hierro). Los tratamientos de bioestimulación 2M, 4M-7M se realizaron a una humedad equivalente al 60% de la capacidad de campo con aireación por agitación mecánica.

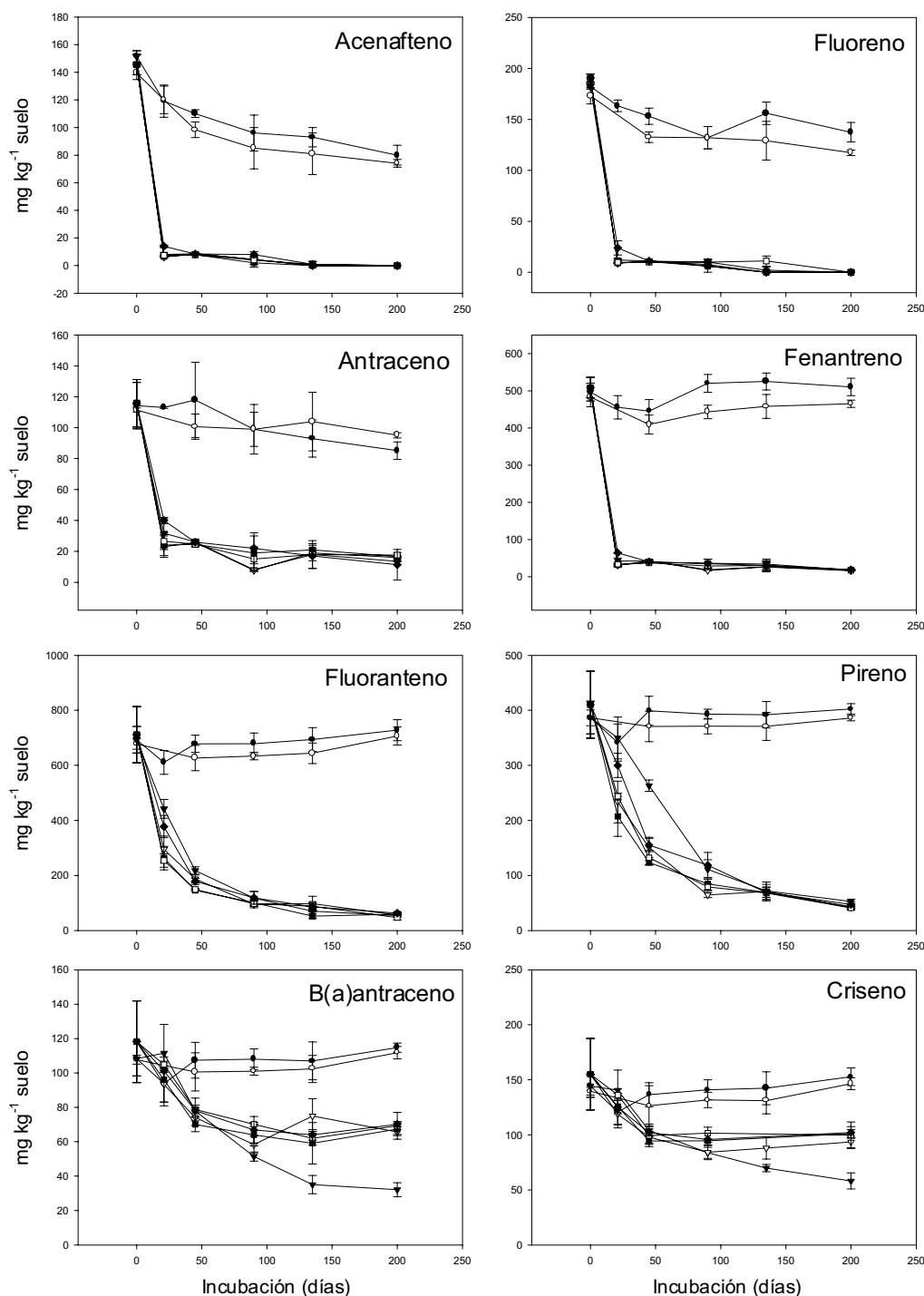


Fig. 4.10. Evolución de la concentración de HAPs diana de 3 y 4 anillos en el suelo durante 200 días de incubación en microcosmos. Las barras muestran la desviación estándar (n=3). Tratamientos: ●, 1M (no tratado); ○, 3M (estéril); ▼, 4M (sin nutrientes); ▽, 4M (nutrientes); ■, 5M (nutrientes y biotensioactivo); □, 6M (nutrientes e inóculo AM; ◆, 7M (nutrientes y octoato de hierro). Los tratamientos de bioestimulación 2M, 4M-7M se realizaron a una humedad equivalente al 60% de la capacidad de campo con aireación por agitación mecánica.

Es importante destacar que la k_2 fue un orden de magnitud inferior a la k_1 en todos los tratamientos, con valores cercanos a cero en los tratamientos con nutrientes (tabla 4.9). Durante los primeros 45 días, la tasa de degradación de primer orden observada en la degradación de TPH, en la bioestimulación sin nutrientes (tratamiento 2M), fue ligeramente inferior ($P < 0,05$) que la observada en los tratamientos con nutrientes. Sin embargo, la tasa de biodegradación de TPH a largo plazo (90-200 días) fue superior ($P < 0,05$) en el tratamiento 2M que en los tratamientos con nutrientes, coincidente con una mayor biodegradación final de los TPH los 200 días (tabla 4.8). Asimismo, las tasas de biodegradación (k_1 y k_2) observadas en este estudio son similares a las observadas en estudios de biorremediación de suelos contaminados con crudo de petróleo (Venosa et al., 1996; Kaplan y Kitts, 2004) cuya composición en hidrocarburos era rica en alcanos y fracción saturada, más biodegradables que los HAPs presentes en el suelo contaminado con creosota.

Tabla 4.9 Tasas de biodegradación de primer orden (k), según la expresión $y = e^{-kt}$, en la degradación de TPH y HAPs diana durante el proceso de biorremediación en microcosmos.

Tratamiento ¹	TPH		Acenafteno ²	Fluoreno ²	Fenantreno ²	Antraceno ²	
	k_1 , día ⁻¹	k_2 , día ⁻¹	k , día ⁻¹	k , día ⁻¹	k , día ⁻¹	k , día ⁻¹	
2M	-0.0200 a ²	-0.0039 a	-0.0133 a	-0.1240 a	-0.1107 a	-0.0264 a	
4M	-0.0245 b	-0.0019 b	-0.0113 a	-0.1412 a	-0.1269 a	-0.0265 a	
5M	-0.0269 c	-0.0008 b	-0.0157 a	-0.1406 a	-0.1261 a	-0.0265 a	
6M	-0.0244 b	-0.0010 b	-0.0124 a	-0.1373 a	-0.1252 a	-0.0236 a	
7M	-0.0237 b	-0.0006 b	-0.0124 a	-0.0965 a	-0.0923 a	-0.0254 a	

	Fluoranteno		Pireno		Benzo(a)antraceno		Criseno	
	k_1 , día ⁻¹	k_2 , día ⁻¹	k_1 , día ⁻¹	k_2 , día ⁻¹	k_1 , día ⁻¹	k_2 , día ⁻¹	k_1 , día ⁻¹	k_2 , día ⁻¹
2M	-0.0258 a ³	-0.0067 a	-0.0089 a	-0.0067 a	-0.0111 a	-0.0043 a	-0.0062 a	-0.0041 a
4M	-0.0283 a	-0.0048 a	-0.0223 b	-0.0041 a	-0.0103 a	-0.0002 b	-0.0102 b	-0.0017 b
5M	-0.0339 b	-0.0048 a	-0.0265 b	-0.0062 a	-0.0117 a	-0.0008 b	-0.0111 b	-0.0004 b
6M	-0.0334 b	-0.0068 a	-0.0252 b	-0.0059 a	-0.0092 a	-0.0008 b	-0.0100 b	-0.0016 b
7M	-0.0297 a	-0.0057 a	-0.0217 b	-0.0063 a	-0.0093 a	-0.0008 b	-0.0092 b	-0.0007 b

k , periodo 0-200 días; k_1 periodo 0-45 días; k_2 periodo 90-200 días. ¹Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado en réplicas (microcosmos) independientes a una humedad equivalente al 40 % de la capacidad de campo. Los códigos de tratamiento se describen en la tabla 4.4. ²Acenafteno, fluoreno y

fenantreno fueron degradados prácticamente a la totalidad durante los primeros 21 días (fig. 4.10). Sus tasas de biodegradación (k) incluyen todo el periodo de incubación (200 días) con un ajuste matemático satisfactorio ($r^2 > 0,95$)³ Los caracteres (letras) diferentes, en una misma columna, al lado de las tasas de biodegradación indican que existen diferencias significativas en las tasas entre tratamientos ($P < 0,05$).

Los HAPs de dos y tres anillos (acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno) fueron ampliamente degradados durante los primeros 45 días (fig. 4.10), con la misma tasa de biodegradación (k) en todos los tratamientos para cada compuesto ($P > 0,05$; tabla 4.8 y 4.9). La excepción fue el 1-metil-antraceno, el cual presentó una mayor biodegradación ($P > 0,05$) en la bioestimulación sin nutrientes (100% de biodegradación en el tratamiento 2M y un 44-48% de biodegradación en los tratamientos con nutrientes 4M-7M) (tabla 4.8). Es destacable que el fenantreno y el antraceno no fueron completamente degradados (96% y 80% respectivamente; fig. 4.10 y tabla 4.8) en todos los tratamientos de bioestimulación (2M, 4M-7M), lo que podría explicarse por la disminución de la biodisponibilidad de las bajas concentraciones residuales (Sabaté *et al.*, *sometido*).

Las cinéticas de biodegradación del fluoranteno no fueron afectadas por la adición de nutrientes a lo largo de los 200 días de incubación, mientras que para el pireno, durante el periodo inicial (0-45 días), las tasas de biodegradación (k_1) fueron superiores ($P < 0,05$) con la adición de nutrientes (tabla 4.9).

La biodegradación de benzo(a)antraceno y criseno fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en la bioestimulación sin adición de nutrientes (tratamiento 2M) que en la bioestimulación con nutrientes (tratamientos 4M-7M) (fig. 4.10 y tabla 4.8), alcanzándose biodegradaciones del 72% y 62% respectivamente en el tratamiento 2M y un 40%, y 35% de biodegradación respectivamente en los tratamientos con nutrientes. Además, es importante destacar que durante el periodo tardío (90-200 días), la tasa de biodegradación (k_2) del benzo(a)antraceno y del criseno sin adición de nutrientes (2M) fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que con la adición de nutrientes (4M-7M), llegando a ser entre 3 y 10 veces respectivamente (tabla 4.9). No se observó una biodegradación significativa ($P > 0,05$) de HAPs de 5 o más anillos como el benzo(a)pireno y el benzo(b) y benzo(k)fluoranteno. Los porcentajes y cinéticas de biodegradación de HAPs fueron similares a los descritos en otros estudios de biorremediación de suelos contaminados con creosota (Eriksson *et al.*, 2000; Atagana, 2004).

Se ajustó matemáticamente la cinética experimental de biodegradación de los HAPs de 4 anillos a la función $y = y_0 + e^{-kt}$ por ser esta expresión la que mejor simulaba ($r^2 > 0,98$) el periodo completo de 200 días de incubación. A partir de las ecuaciones resultantes (fig. 4.11) se estimaron las concentraciones finales de pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno y criseno para el tratamiento 2M.

Como puede verse en la figura 4.11, las concentraciones teóricas finales no difirieron mucho de las concentraciones experimentales (entre 2 y 9 mg kg⁻¹ suelo).

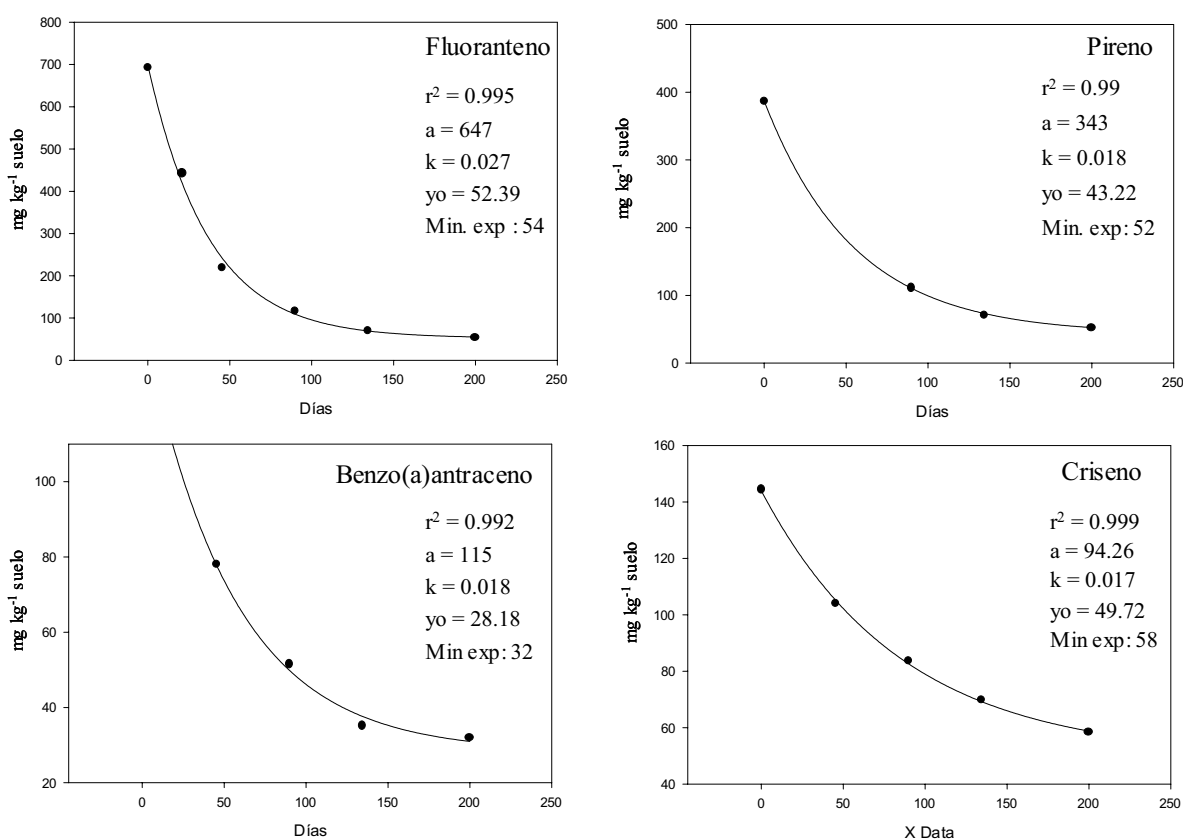


Fig. 4.11. Ajuste matemático de las cinéticas de biodegradación observadas para el fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno en el tratamiento 2M según la función $y = y_0 + ae^{-kt}$. Min exp. indica la concentración observada a los 200 días de incubación, mientras que y_0 es el mínimo teórico cuando t tiende a infinito.

El fluoranteno disminuiría 2 mg kg⁻¹ adicionales pasando de 54 a 52 mg kg⁻¹; el benzoantraceno disminuiría 4 mg kg⁻¹ adicionales pasando de 32 a 28 mg kg⁻¹; mientras que el pireno y el criseno disminuirían hasta 9 mg kg⁻¹ adicionales pasando de 52 mg kg⁻¹

el primero y 58 mg kg^{-1} el segundo hasta concentraciones finales de 43 y 49 mg kg^{-1} respectivamente. La extrapolación matemática de las concentraciones finales (tiempo infinito) permite establecer el tiempo y efectividad potencial de los procesos de biorremediación y predecir si se podrán alcanzar los niveles genéricos de referencia (NGR) de la legislación vigente.

4.2.3 Fraccionamiento isotópico en la biodegradación de HAPs

Para evaluar la posible existencia de un fraccionamiento isotópico durante el proceso de biodegradación se eligieron los HAPs de 4 anillos, fluoranteno, pireno, criseno y benzo(a)antraceno, por ser aquellos que no fueron degradados en su totalidad y además presentaban una disminución gradual de la concentración a lo largo de los 200 días de incubación.

En primer lugar, se evaluó la respuesta del GC-IRMS frente a concentraciones crecientes (por triplicado) de los 4 HAPs a analizar que fueran representativas de las concentraciones encontradas en el suelo, y de este modo detectar fenómenos de deriva de la señal, en los cuales la $\delta^{13}\text{C}$ calculada puede incrementar a medida que se aumenta la concentración de los analitos a estudiar. Previamente se corrigieron los valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos, en comparación con un estándar de *n*-alcanos de composición isotópica conocida para todos los componentes, para corregir una ligera deriva de señal observada con el incremento de temperatura en el GC-IRMS.

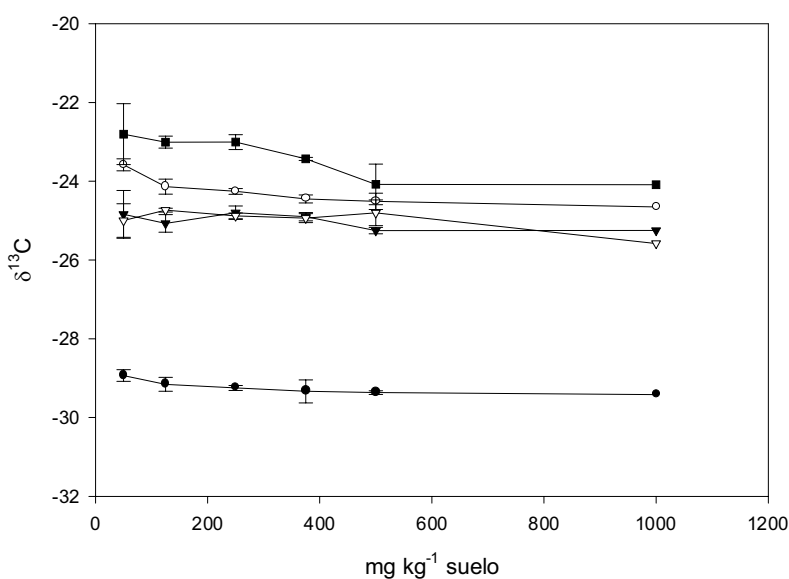
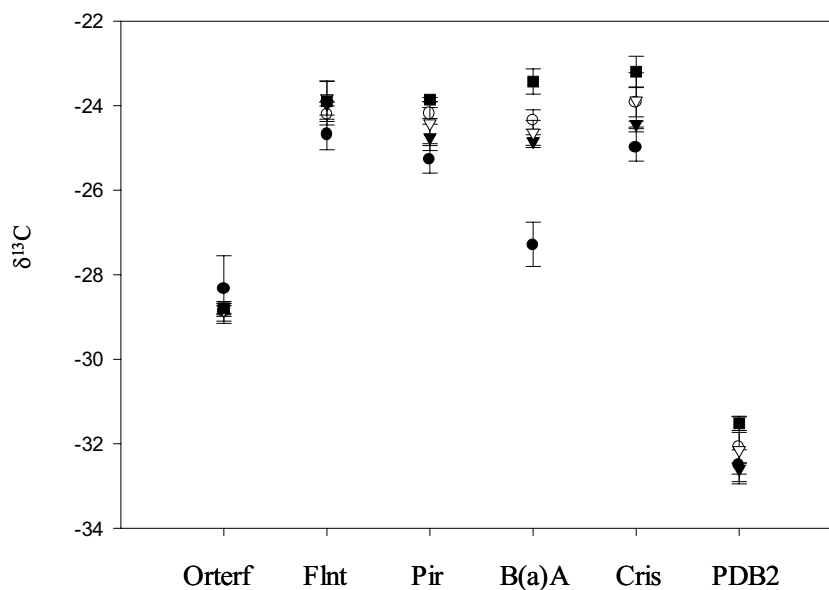


Fig. 4.12. (pág anterior) Efecto de la concentración de HAPs en la determinación de la $\delta^{13}\text{C}$ por GC-IRMS. Las concentraciones reales en el vial a analizar eran 5 veces inferiores, al igual que en las muestras procedentes del suelo. ●, ortoterfenil; ○, fluoranteno; ▼, pireno; ▽, benzo(a)antraceno; ■, criseno.

Como puede observarse en la figura 4.12, no existió deriva de señal para el benzo(a)antraceno ni el pireno en el rango de concentraciones $50\text{-}500\text{ mg kg}^{-1}$ (con un incremento de la $\delta^{13}\text{C}$ de $0,19\text{ ‰}$ y $0,52\text{ ‰}$ respectivamente), tampoco se observó deriva en el criseno en el rango de concentraciones $50\text{-}250\text{ mg kg}^{-1}$ (con una incremento de $\delta^{13}\text{C}$ de $0,21\text{ ‰}$). Sin embargo, se detectó deriva en el caso del fluoranteno, donde en el rango $50\text{-}1000\text{ mg kg}^{-1}$ se observó un incremento de la $\delta^{13}\text{C}$ de $1,03\text{ ‰}$. El estándar ortoterfenil no experimentó deriva entre 50 y 1000 mg kg^{-1} .

Como puede observarse en la figura 4.13, no existió fraccionamiento isotópico significativo ($P > 0,05$) para el fluoranteno y el pireno, manteniéndose en una $\delta^{13}\text{C}$ de $-24,1 \pm 0,52$ y $-24,7 \pm 0,61$ respectivamente, aún existiendo una biodegradación del 92% y del 87% respectivamente y una eliminación de 644 y 350 mg de fluoranteno y pireno respectivamente por kg de suelo. Sin embargo, si que existió fraccionamiento isotópico significativo ($P < 0,05$) durante la biodegradación del benzo(a)antraceno y del criseno.

A)



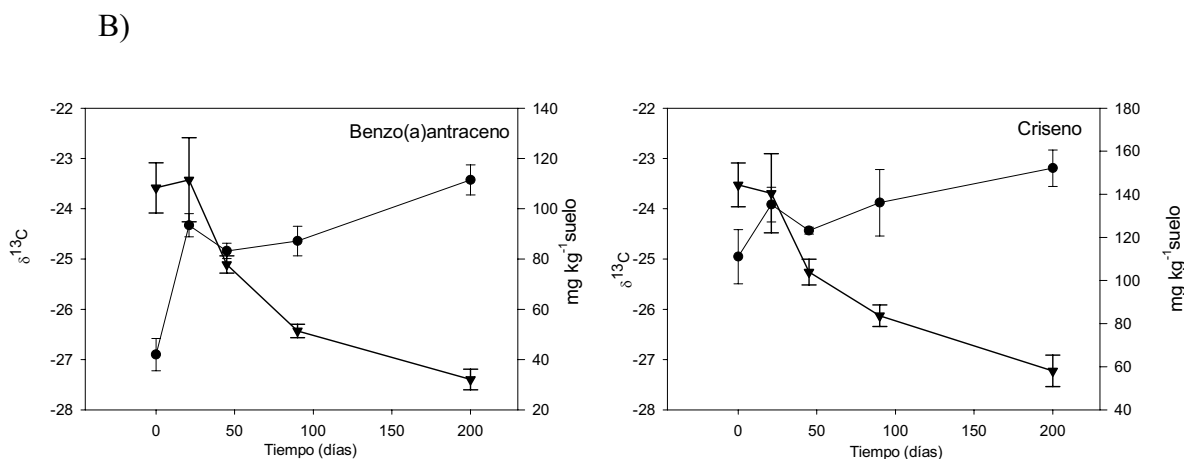


Fig. 4.13. A) Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno a lo largo del proceso de bioerremediación. Ortoterf, ortoterfenil; Flnt, fluoranteno; Pir, pireno; B(a)A, benzo(a)antraceno, Cris, criseno; PDB2, estándar Peedee Belemnita (diferente a PDBV) Ortoterfenil y PDBV se utilizaron como controles de sensibilidad del GC-IRMS. ●, 0 días; ○, 21 días; ▼, 45 días; ▽, 90 días; ■, 200 días **B)** Evolución de la $\delta^{13}\text{C}$ y la concentración de benzo(a)antraceno y criseno en el suelo durante 200 días de incubación. ●, $\delta^{13}\text{C}$; ▼, concentración (mg HAP kg⁻¹suelo).

El benzo(a)antraceno incrementó la $\delta^{13}\text{C}$ en un 3,48 ‰ (pasando de $\delta^{13}\text{C}$ de -26,90 a -23,42 ‰) y el criseno incrementó la $\delta^{13}\text{C}$ en un 1,76 ‰ (de -24,95 a -23,19) . Sin embargo, en ambos casos se observa el mayor fraccionamiento en los primeros 21 días de incubación, periodo en el que todavía no ha habido una degradación significativa, seguido de un fraccionamiento más gradual asociado a la biodegradación (fig. 4.13b).

4.2.4 Análisis de la fracción polar

Se analizaron los extractos polares de los tratamientos más representativos (1M, 2M y 4M) por HPLC y por GC-MS (extractos polares derivatizados con TMS) a lo largo de los 200 días de incubación. El análisis de la fracción polar por GC-MS mostró una presencia inicial de varios compuestos polares y su degradación gradual en ambos tratamientos (2M y 4M)(fig. 4.14).

La mayoría de los compuestos de la fracción polar resueltos por GC-MS no fueron identificados debido a su baja concentración y pureza. Se detectó antraquinona (identificada por GC-MS) en el suelo no tratado a lo largo de los 200 días, que fue degradada en los tratamientos de bioestimulación (2M y 4M) en los primeros 45 días. También se detectó la aparición de 4-penta-ciclofenantrenona coincidente con la

degradación del 4-ciclo-pentafenantreno en los primeros 45 días, que fue degradada posteriormente.

Para confirmar la desaparición observada por GC-MS se analizó la fracción polar por HPLC, al principio y al final del proceso de biorremediación. Como puede observarse en la figura 4.15, la bioestimulación sin adición de nutrientes fue el tratamiento de bioestimulación más eficaz, pudiéndose observar la eliminación de la mayoría de los picos resueltos de la fracción polar. Nuevamente las bajas concentraciones y pureza de los picos evitaron su correcta identificación.

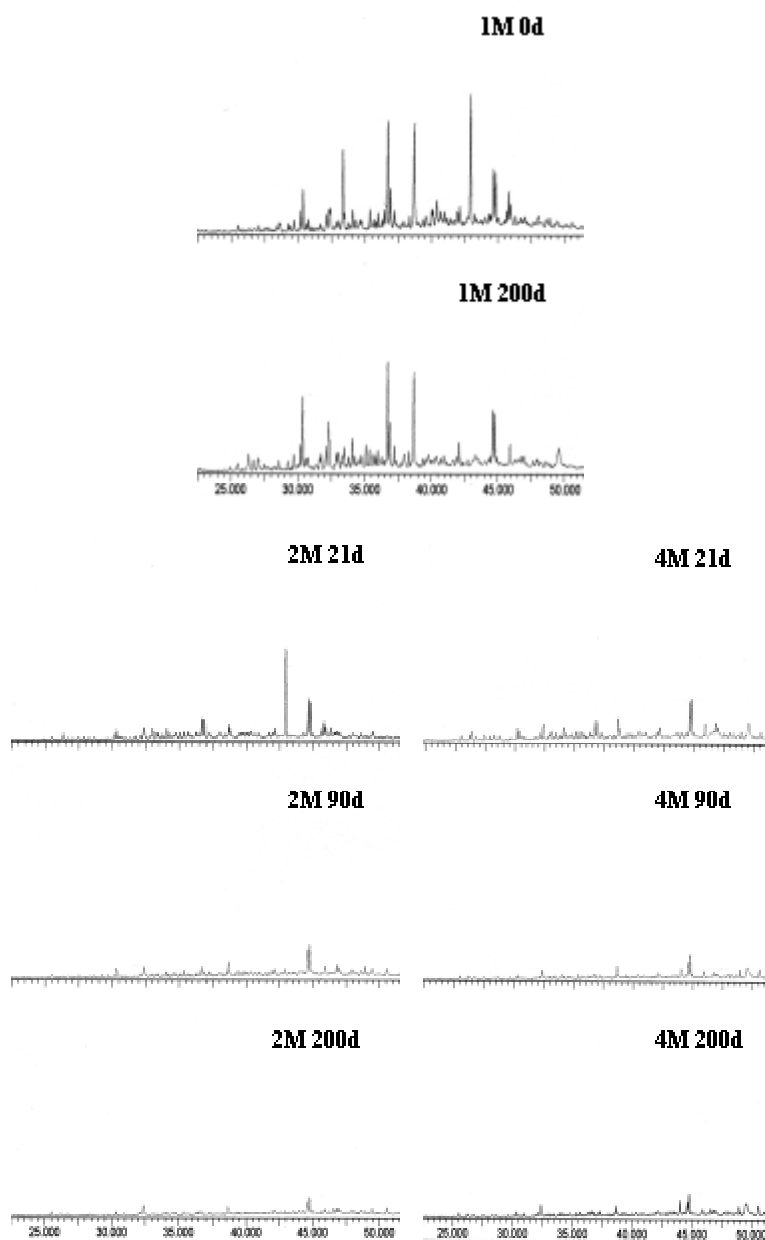


Fig. 4.14. (Pág anterior) Evolución del extracto polar del suelo, analizado por GC-MS, en los tratamientos de bioestimulación sin nutrientes (2M) y con nutrientes (4M) a lo largo de 200 días de incubación. 1M (suelo no tratado).

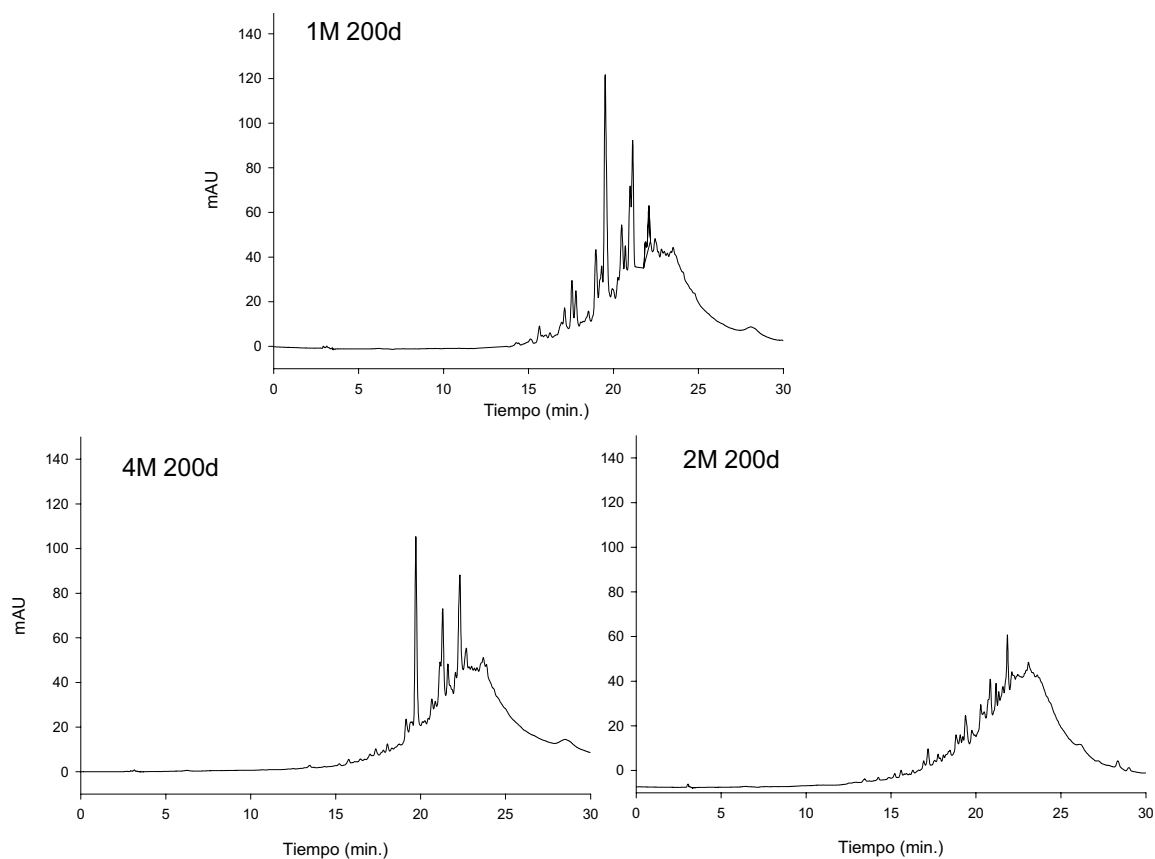


Fig. 4.15. Extracto polar del suelo antes y después de la bioestimulación con nutrientes (4M) y sin nutrientes (2M) analizado por HPLC.

4.2.5 Evolución del COT y nutrientes inorgánicos

Debido a que todos los tratamientos con nutrientes alcanzaron una biodegradación parecida de los TPH y del EOT, ligeramente inferior al tratamiento de bioestimulación sin nutrientes, se comparó el tratamiento 4M (como representante de los tratamientos con adición de nutrientes) con el 2M y con el suelo no tratado (1M).

El contenido de COT no varió significativamente ($P > 0,05$) en el suelo no tratado y el estéril a lo largo de los 200 días de tratamiento (4,3% aproximadamente), mientras que al final del proceso de bioestimulación (200 días) disminuyó hasta una concentración final

del 3,5 % (un 18% del COT inicial). No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos de bioestimulación (2M y 4M).

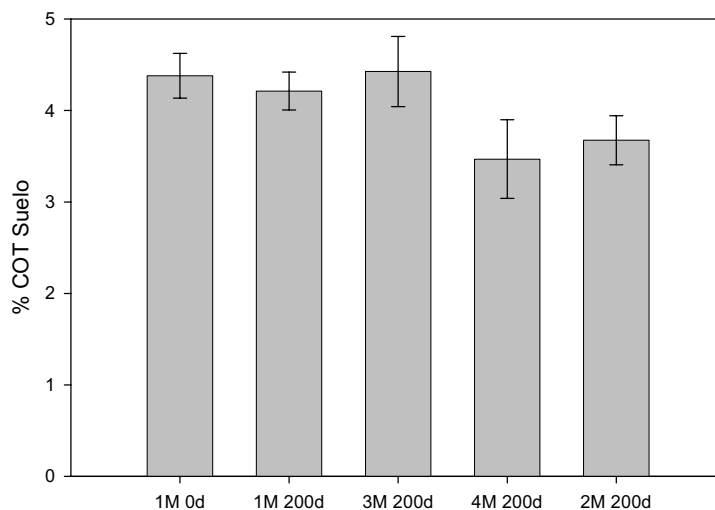


Fig. 4.16. Carbono orgánico total (COT) del suelo, expresado en porcentaje (% p/p), antes y después del proceso de biorremediación (1M, suelo no tratado; 3M, suelo estéril; 2M, bioestimulación sin adición de nutrientes 4M, bioestimulación con nutrientes).

La biodegradación de TPH observada, supuso la eliminación aproximada de unos 6000 mg TPH kg^{-1} suelo, que aplicando el factor de Van Bemmelen (1,7g materia orgánica = 1g carbono orgánico) y suponiendo que fuera por mineralización de los TPH, implicarían solamente una disminución de un 8% del COT. Por lo tanto los nutrientes inorgánicos añadidos en este estudio probablemente fueron excesivos ya que se calcularon en base al 100 % del COT, cuando en realidad se ha degradado solamente un 18%.

La disminución del 18% del COT no coincidió con una utilización de los nutrientes añadidos en el suelo. En realidad la concentración de NO_3^- incrementó a lo largo de la bioestimulación con nutrientes (tratamientos 4M y 6M), a medida que los nutrientes fueron añadiéndose (tres adiciones), hasta alcanzar concentraciones muy elevadas (10.000 mg $\text{NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ de suelo) (fig. 4.17). El suelo bioestimulado sin nutrientes (2M) mantuvo unos niveles bajos de NO_3^- (10-20 mg $\text{NO}_3^- \text{kg}^{-1}$ suelo) durante los 200 días de tratamiento (fig. 4.17).

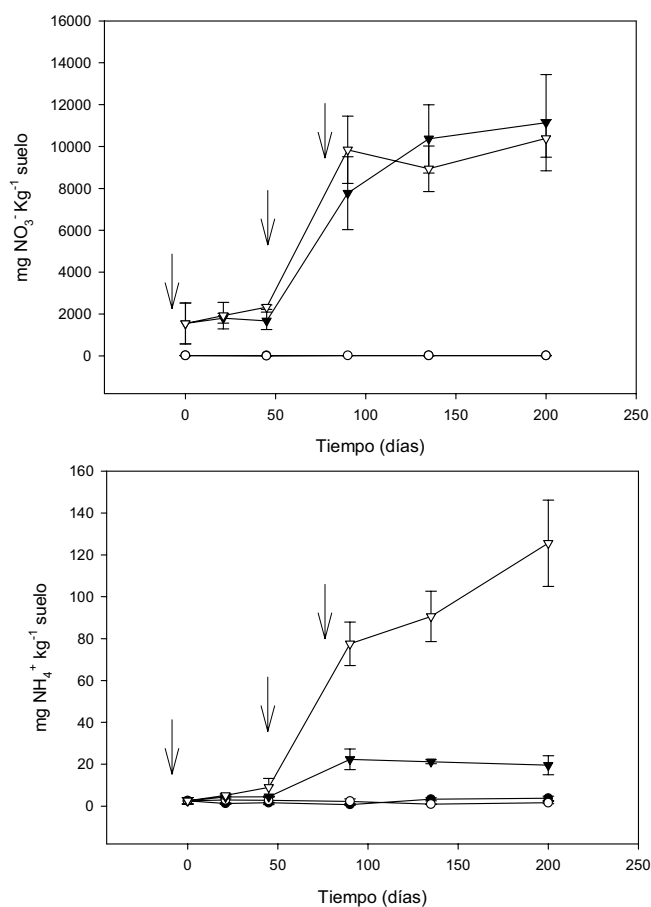


Fig. 4.17. Evolución de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en el suelo durante el proceso de biorremediación (200 días). ● (1M), suelo no tratado; ○ (2M), bioestimulación sin adición de nutrientes; ▼ (4M), bioestimulación con nutrientes; ▽ (6M), bioaumentación con nutrientes. Las flechas indican las fechas de adición de nutrientes (1/3 de la cantidad total por adición).

En los tratamientos con adición de KNO_3 , se observó una acumulación leve de amonio para el tratamiento 4M (de 2,5 a 20 $\text{mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ de suelo) e importante en el bioaumentación 6M (de 2,5 a 125 $\text{mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ de suelo). En el tratamiento 2M (sin nutrientes) disminuyó levemente (de 2,5 a 1,6 $\text{mg NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ de suelo).

4.2.6 Evolución de las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de HAPs

Para analizar el efecto de los diferentes tratamientos de biorremediación en las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de HAPs, se llevó a cabo una enumeración mediante NMP miniaturizado, a partir de muestras compuestas formadas por

las tres réplicas de cada tratamiento. La enumeración se realizó a los 0, 20, 45, 90, 135 y 200 días de tratamiento. Como puede observarse en la figura 4.18, en los tratamientos de bioestimulación con adición de nutrientes (4M-7M), ambas poblaciones aumentaron entre 2 y 3 órdenes de magnitud en los primeros 21 días, alcanzándose poblaciones heterótrofas y degradadoras de HAPs del orden de 10^8 y 10^7 NMP g^{-1} de suelo respectivamente. Sin embargo, en la bioestimulación sin adición de nutrientes (2M) las poblaciones microbianas incrementaron de forma más gradual, presentando un aumento de 1 a 2 órdenes de magnitud a los 21-45 días de tratamiento, alcanzándose poblaciones heterótrofas y degradadoras de HAPs del orden de 10^7 y 10^6 NMP g^{-1} de suelo respectivamente. Después de 90 días, el tamaño de las poblaciones heterótrofas y degradadoras de HAPs disminuyó hasta valores iniciales en los tratamientos 4M-7M, mientras que en el tratamiento 2M la población degradadora de HAPs mantuvo un orden de magnitud mayor ($1,3 \times 10^6$ NMP g^{-1} suelo seco) que al inicio del experimento ($1,6 \times 10^5$ NMP g^{-1} suelo seco). En el suelo no tratado (1M), el tamaño de la población heterótrofa se mantuvo constante en los primeros 135 días del experimento ($1,5-1,8 \times 10^6$ NMP g^{-1} suelo), y 90 días en el caso de la población degradadora ($1,8-2,4 \times 10^5$ NMP g^{-1} suelo seco). En el periodo 135-200 días las dos poblaciones microbianas disminuyeron hasta un orden de magnitud (fig. 4.19). El suelo estéril (3M) no mostró población viable en los primeros 90 días del experimento, mientras que en el periodo 135-200 días su población ($60-100$ NMP g^{-1} suelo) era 4 órdenes de magnitud inferior al resto de los tratamientos.

La aireación, el contenido óptimo de agua en el suelo (40% CC) y la no adición de nutrientes inorgánicos (tratamiento 2M) causaron un incremento importante en la proporción de la población degradadora de HAPs, alcanzando valores superiores al 50% durante el periodo comprendido entre los 90 y 200 días (inicialmente la población degradadora representaba un 2-6% del total), con un máximo del 100% en el día 135 ($1,65 \times 10^6$ NMP g^{-1} suelo seco). Sin embargo, la adición de nutrientes inorgánicos (tratamientos 4M-7M) no cambió la proporción de degradadores respecto a la que presentaba el suelo inicial y el no tratado (1M), manteniendo una proporción del 12-24% durante todo el periodo de incubación.

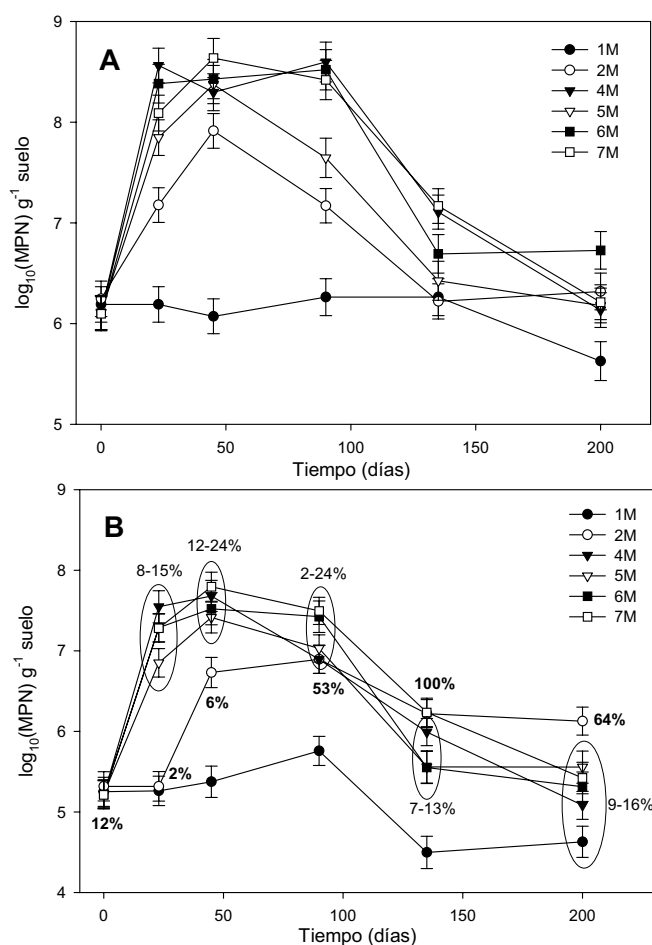


Fig. 4.18. Evolución de las poblaciones microbianas heterotrofas (A) y degradadoras de HAPs (B) a lo largo de los 200 días de incubación en los 7 tratamientos de biorremediación en microcosmos. 1M, suelo no tratado; 2M, bioestimulación sin adición de nutrientes; 4M, bioestimulación con nutrientes; 5M, nutrientes + biotesioactivo; 6M, nutrientes + inóculo AM (bioaumento); 7M, nutrientes + octoato de hierro. 3M, suelo estéril (autoclavado) ($< 100 \text{ NMP g}^{-1}$ de suelo) y no detectable hasta los 135 días de incubación. Las áreas con círculo indican el porcentaje de degradadores de HAPs para los tratamientos 4M-7M (en el tratamiento 2M los porcentajes se muestran en negrita).

Durante todo el experimento no se observaron diferencias significativas en los tratamientos con nutrientes (4M-7M) respecto al tamaño de las poblaciones microbianas heterótrofa y degradadora de HAPs, ni en la biodegradación de los TPH y HAPs. Asimismo, la inoculación del suelo tratado con nutrientes (tratamiento 6M) con el consorcio microbiano AM degradador de HAPs, no causó ningún cambio en las poblaciones heterótrofa y degradadora de HAPs ni en la biodegradación de TPH y HAPs, respecto al resto de tratamientos con nutrientes (4M, 5M y 7M).

4.2.7 Análisis de las poblaciones microbianas por DGGE

Los resultados que se han observado en la biodegradación de los TPH y los HAPs y en los contajes de la población heterótrofa y degradadora de HAPs, revelaron la existencia de tres comportamientos generales que se podrían separar en tres grupos según los tratamientos: a) suelo no tratado (1M); b) suelo bioestimulado sin adición de nutrientes (2M) y c) suelo bioestimulado con adición de nutrientes (4M-7M). Por lo tanto, se ha estudiado el efecto de diferentes condiciones de bioestimulación en la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana por DGGE, eligiendo los tratamientos 1M, 2M y 4M como representantes de los tres comportamientos descritos en el curso de los 200 días de biorremediación en microcosmos. Además, se estudió mediante DGGE el efecto de la inoculación del consorcio AM (bioaumentación, 6M) en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo receptor (bioestimulado con nutrientes), comparándolo con la población del suelo no tratado (1M) y bioestimulado con nutrientes no inoculado (4M).

El DNA genómico de la comunidad fue extraído de todos los microcosmos (réplicas), utilizando el kit comercial “ultraclean DNA soil extraction kit” (MoBio Laboratories, Inc.). Se obtuvieron cantidades suficientes de DNA de elevado peso molecular (5-20µg DNA g⁻¹ suelo) en todos los microcosmos (fig. 4.19a).

Para amplificar mediante PCR genes 16S rRNA (620 pb aproximadamente) fue necesario un paso adicional de purificación del DNA extraído, utilizando el kit “Wizard clean DNA” (Promega) y una dilución 1:10 del DNA resultante (fig. 4.19b). Los protocolos tradicionales de purificación del DNA mediante fenolización y precipitación o la dilución del DNA molde no facilitaron la amplificación posterior, por PCR, de genes 16S rRNA (fig. 4.19c).

Como puede observarse en la figura 4.20, el perfil de DGGE de la comunidad bacteriana del suelo (1M) era complejo (27-28 bandas de DGGE) y no varió (tratamiento 1M) a lo largo del periodo de 200 días del experimento (fig. 4.20). Sin embargo, los tratamientos de bioestimulación con y sin nutrientes (4M y 2M respectivamente) experimentaron cambios destacables en la composición y estructura de la comunidad microbiana. En particular, los perfiles de DGGE iniciales (21 y 45 días) eran claramente

diferentes en cuanto a la posición y la intensidad relativa de las bandas. Los tratamientos 2M y 4M mostraron 22-24 y 19-22 bandas a los 21-45 días de incubación.

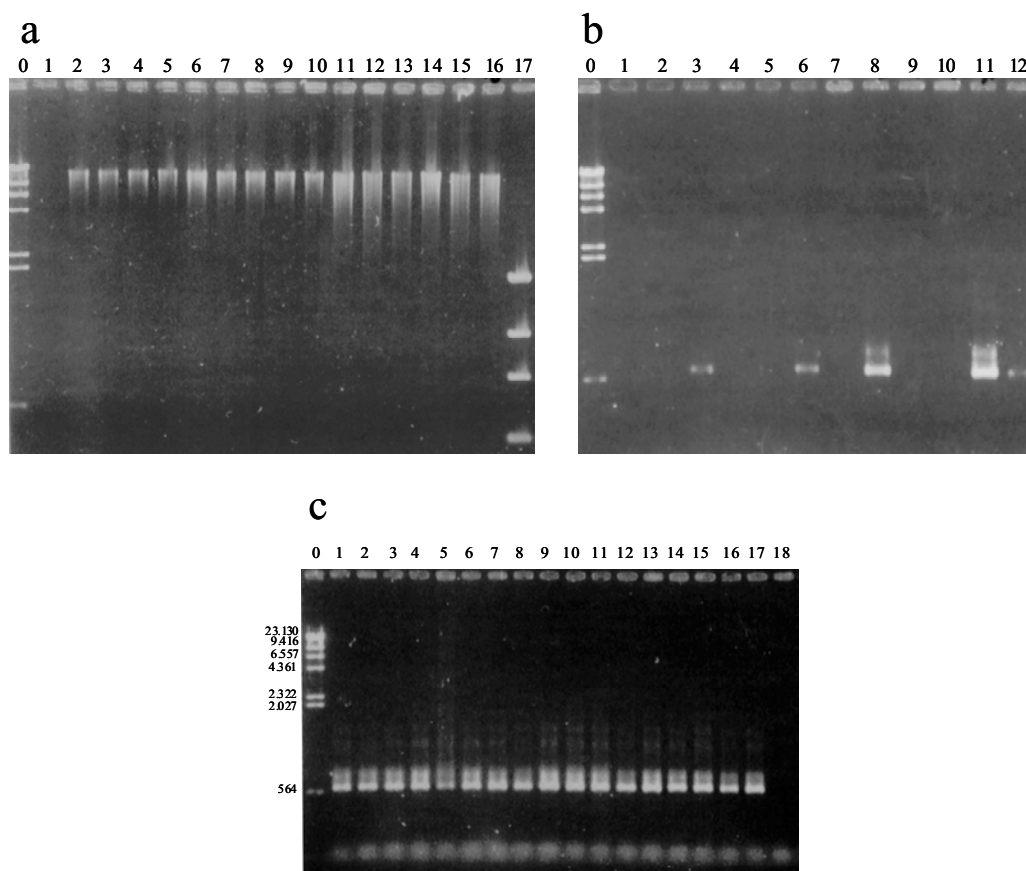


Fig. 4.19. Geles de electroforesis de DNA **a)** DNA genómico obtenido a partir de 0,75 g. suelo (15 microcosmos, carriles 2-17). Carril 1, blanco. Los carriles 0 y 17 contienen los marcadores λ Hind y Low mass DNA ladder respectivamente. Al lado del marcador λ Hind se indican los tamaños (pb) de DNA de las bandas. **b)** Análisis de diferentes métodos de purificación de DNA molde: PCR de genes 16Sr RNA de dos DNA, procedentes del suelo contaminado con creosota. Carril 0, marcador; carriles 1-3 diluciones 1, 1:10, 1:100 de DNA1 kit MoBio + purificación clásica; Carriles 4-6, diluciones 1, 1:10, 1:100 de DNA2 kit MoBio + purificación clásica; carriles 7-9 DNA1 kit MoBio + kit Wizard: diluciones 1, 1:10, 1:100; carriles 10-12, diluciones 1, 1:10, 1:100 DNA2 MoBio + kit Wizard. **c)** Productos de PCR de genes 16S rRNA de DNA genómico de suelo (kit MoBio + kit Wizard) dilución 1:10 de diferentes microcosmos (tratamiento 1M carriles 1-6; tratamiento 2M, carriles 7-11; tratamiento 4M, 12-17). carril 0, marcador λ Hind; carril 18, blanco sin DNA molde.

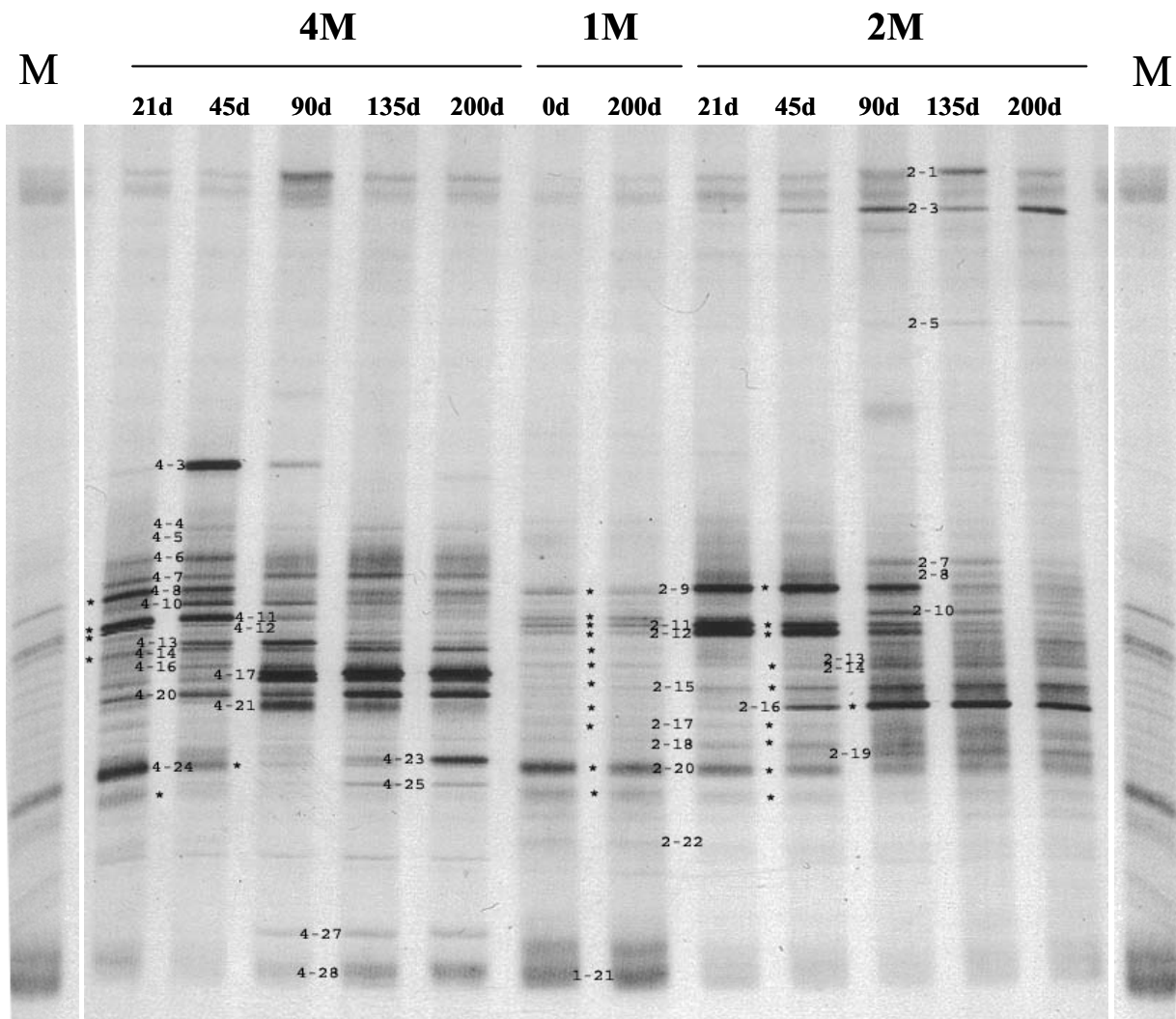


Fig. 4.20. Gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE) (35-70% de formamida:urea) de genes 16S rRNA amplificados por PCR de los tratamientos 1M (suelo no tratado), 2M (bioestimulación sin nutrientes) y 4M (bioestimulación con nutrientes) a lo largo del periodo de incubación de 200 días en microcosmos. Los carriles M, contienen la muestra 1M 0d como marcador. Cada carril contiene genes 16S rRNA amplificados a partir de una muestra de suelo combinada, resultante de la mezcla de las tres réplicas (microcosmos independientes) para cada tratamiento. Los asteriscos indican las bandas coincidentes con el suelo no tratado a los 0 días (suelo inicial).

La evolución de la diversidad, calculada a partir del índice de Shannon-Weaver (H'), a lo largo de los 200 días de incubación (fig. 4.21), reveló una importante reducción de la diversidad a los 21 y 45 días en el tratamiento con adición de nutrientes (4M), mientras que la no adición de nutrientes (2M) mostró una reducción importante de la diversidad a los 45 días, pero presentando un cierto retraso respecto al tratamiento 4M. A

los 21 días el tratamiento 2M no disminuyó de forma importante su diversidad. En el periodo tardío (90-200 días) la diversidad se mantuvo más baja en los tratamientos 2M y 4M que en el suelo no tratado (1M), aunque el tratamiento sin nutrientes (2M) mostró una diversidad mayor que el suelo con adición de nutrientes (4M) al final del experimento.

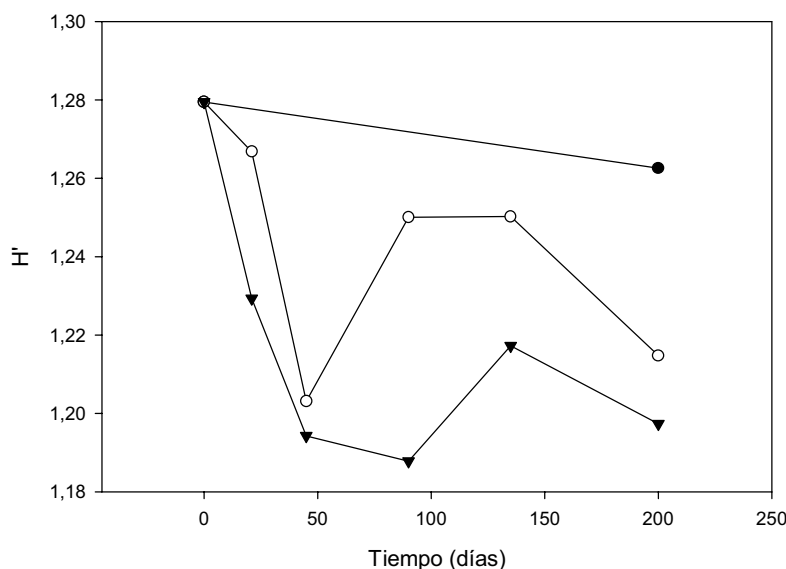


Fig. 4.21. Evolución del índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') a lo largo de los 200 días de incubación. ■, suelo no tratado (1M); ○, suelo bioestimulado sin adición de nutrientes (2M); ▼, suelo bioestimulado con adición de nutrientes (4M).

Además, la dominancia (importancia relativa de las bandas) calculada a partir del índice de Simpson (SI'), fue más elevada en el momento inicial (0 días) (0,071) y disminuyó paulatinamente durante los primeros 90 días hasta llegar a 0,057 y 0,064 en el tratamiento 2M y 4M respectivamente. A partir de entonces, el SI' incrementó de forma gradual, y al final del periodo de incubación (200 días) se alcanzaron valores superiores a los iniciales del día 0 (0,075 y 0,077 en los tratamientos 2M y 4M).

Es importante destacar, que los perfiles de DGGE en los tratamientos 2M y 4M mostraron una estabilización a partir de los 90 días de incubación, cuando las tasas de biodegradación de TPH y HAPs disminuyeron de forma considerable (tabla 4.9). Sin embargo, no se encontraron coincidencias en la migración de la bandas entre los tratamientos de bioestimulación a lo largo de los 200 días, ni en un mismo tratamiento, al comparar el perfil de bandas de DGGE del periodo inicial (0-45 días) con el del periodo tardío (90-200 días).

Durante el periodo inicial (0-45 días), en el suelo bioestimulado sin adición de nutrientes (2M) las bandas con mayor intensidad relativa (respecto el mismo carril) fueron: B2-9, B2-11, B2-12 y B2-20, que a su vez co-migraron con bandas del suelo no tratado (1M). Durante el periodo tardío (90-200 días), las bandas dominantes fueron: B2-1, B2-3, B2-15, B2-16 y B2-19, de las cuales únicamente las bandas B2-15 y B2-16 co-migraron con alguna banda del suelo no tratado, lo que indicaba que se había producido un cambio importante en la estructura de la población microbiana durante el proceso de bioestimulación (fig. 4.20, fig. 4.25, tabla 4.10).

En el suelo bioestimulado con nutrientes (4M), durante el periodo inicial (0-45 días) hubo un mayor número de bandas predominantes (9 bandas), con intensidades relativas elevadas (>5%), que en el tratamiento 2M (5 bandas). Las bandas dominantes fueron: B4-3, B4-4, B4-6, B4-7, B4-8, B4-11, B4-12, B4-13 y B4-24. Cuatro de las nueve bandas (B4-8, B4-11, B4-12 y B4-24) co-migraron con bandas del suelo no tratado. En el periodo tardío (90-200 días) las bandas dominantes fueron B4-14, B4-17, B4-20, B4-23 y B4-28, pero solamente la banda B4-14 co-migró con una banda del suelo no tratado (1M), lo que indicaba que se había producido un cambio importante en la estructura de la población microbiana durante el proceso de bioestimulación, como también había sucedido con la bioestimulación sin nutrientes (fig. 4.20, fig. 4.25, tabla 4.10).

4.2.7.1 Estudio de cambios poblacionales mediante análisis de componentes principales (ACP) de perfiles de DGGE.

A partir del análisis visual del gel de DGGE se observaron diferencias claras entre los microcosmos dependiendo del tiempo y del tipo de bioestimulación. Para confirmar los cambios observados en la estructura de la comunidad microbiana del suelo, se digitalizó el gel de DGGE (fig. 4.20) y se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) de tipo no estandarizado, en base a la presencia/ausencia e intensidad relativa de cada banda de DGGE.

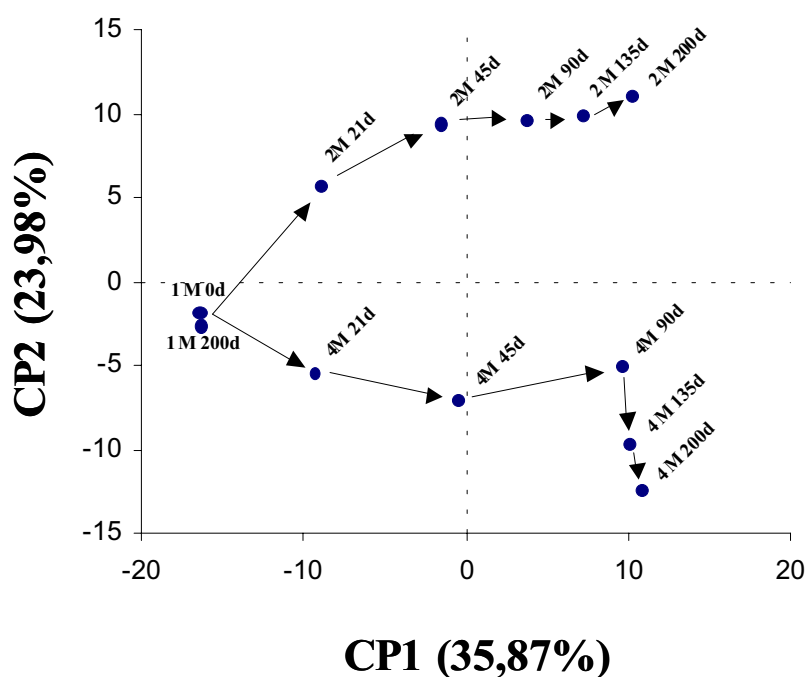


Fig. 4.22. Diagrama 2D resultante del análisis de componentes principales (ACP) de los perfiles de DGGE a lo largo de los 200 días de tratamiento. 1M, 2M y 4M representan el suelo no tratado (seco), bioestimulado sin adición de nutrientes y bioestimulado con adición de nutrientes respectivamente. Los días de incubación se indican después del código de tratamiento; por ejemplo, el punto 4M135d representa el tratamiento 4M a los 135 días de incubación. Entre paréntesis está representado el porcentaje de la varianza que representan cada uno de los componentes principales.

El ACP reveló tres grupos diferentes: en el primer grupo se encontraba el suelo no tratado (a los 0 y 200 días de incubación) y en el segundo y el tercer grupo los suelos con y sin adición de nutrientes respectivamente. Los dos primeros componentes principales resultantes del ACP, CP1 y CP2, representaban un 35,9% y un 24,0% de la varianza de los datos. Ambos tratamientos de bioestimulación (2M y 4M) mostraron rápidamente, en los primeros 21 días, una separación clara respecto al suelo no tratado en el primer componente (CP1) (fig. 4.22). Asimismo, los dos tratamientos de bioestimulación mostraron un incremento gradual del primer componente a lo largo de los 200 días de incubación, que les alejaba en el transcurso del experimento del punto inicial. Los 2 tratamientos (2M y 4M) mostraron comportamientos contrarios para el segundo componente (CP2): el tratamiento 2M incrementó de forma gradual (a lo largo de los 200 días), mientras que el tratamiento 4M tendió a disminuir los valores del CP2. Este hecho podría explicarse debido a que los factores de correlación más elevados (en valor absoluto)

de las bandas de DGGE, respecto al CP2 (CP2 *loading*), fueron positivos para el tratamiento 2M y negativos para el tratamiento 4M (tabla 4.10). El análisis de la varianza de los valores de la CP2 mostró que existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos de bioestimulación 2M y 4M a lo largo del tiempo de incubación. De forma coincidente, el mayor cambio observado en ambos tratamientos de bioestimulación se produjo en los primeros 45 días de incubación, periodo en el cual las tasas de biodegradación de TPH fueron más elevadas (tabla 4.9).

Es interesante destacar que solamente dos bandas fueron coincidentes entre los tratamientos 2M y 4M. Las bandas B2-11 y B2-20 fueron idénticas (co-migraban y tenían la misma secuencia de gen 16SrRNA) a B4-12 y B4-24 respectivamente. Además, estas bandas de DGGE mostraron una dinámica similar en ambos tratamientos (fig. 4.20 y fig. 4.24-25) y presentaban los coeficientes de correlación más negativos con el CP1 (CP1 *loading* de 0,909 y 0,961 respectivamente). Su dinámica (disminución de la intensidad relativa) a lo largo de los 200 días de incubación podría explicar el incremento gradual (positivo) acaecido en el CP1, en ambos tratamientos. Las bandas del tratamiento 2M con las correlaciones más elevadas para el CP2 fueron B2-3 y B2-16, mientras que en el tratamiento 4M la banda B4-17 mostró la correlación más negativa con el CP2. La banda B4-3, la más abundante en el periodo inicial (0-45 días) en el tratamiento 4M, desapareció después de los 90 días y no mostró una elevada correlación con ninguno de los dos CP. Sin embargo, esta banda podría ser importante en la biodegradación de HAPs de tres anillos, cuya biodegradación es la más rápida en el periodo inicial.

4.2.7.2 Análisis filogenético y dinámica de las bandas de DGGE

Se cortaron las bandas visibles más prominentes de los tratamientos de bioestimulación (2M y 4M) y se secuenciaron para determinar su afiliación filogenética, basada en un fragmento de 587 pb del gen 16S rRNA que engloba las regiones hipervariables V3-V5. Las bandas pertenecientes al suelo no tratado no fueron cortadas, debido a que se presentaban a bajas intensidades, pero se asignaron a bandas de igual migración de los tratamientos 2M y 4M (fig. 4.20 y tabla 4.10). La tabla 4.10 muestra las secuencias con mayor similitud a las bandas cortadas de DGGE.

Tabla 4.10. Similitud filogenética y propiedades de las bandas cortadas de DGGE en los tratamientos de bioestimulación 2M y 4M.

Banda DGGE	Nº acceso.	ACP loadings ^c		Sim ^a (%)	Organismo con mayor similitud (Nº acceso Genbank)	Grupo filogenético ^b
		CP1	CP2			
Tratamiento 2M						
B2-1 (135-200d) ^c	AY758563	0.490	0.248	98.4	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> Q1 (SY37525)	α-Proteobacteria
B2-3 (90-200d)	AY758564	0.390	0.826	97.7	Clon ambiental CFB (AY038771)	CFB ^d group
B2-5	AY758565	-0.012	0.596	95.4	<i>Cytophaga sp.</i> MDA2507 (AY238333)	CFB group
B2-7	AY758566	0.565	-0.458	96.7	No cultivable (AF465658)	γ-Proteobacteria
B2-8 (21-45d)	AY758567	0.399	-0.297	98.5	<i>Acidovorax sp.</i> UFZ-B517 (AF235010)	β-Proteobacteria
B2-9* ^g (21-90d)	AY758568	-0.407	0.299	97.1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> (AF442742)	γ-Proteobacteria
B2-11* (21-90d)	AY758569	-0.909	0.337	96.7	Environmental clone (AJ318120)	α-Proteobacteria
B2-12* (21-90d)	AY758570	-0.477	0.643	98.4	<i>Sphingomonas sp.</i> CFO6 (SC52146)	α-Proteobacteria
B2-13	AY758571	0.189	0.531	96.4	<i>Sphingomonas sp.</i> JS1 (SSP427917)	α-Proteobacteria
B2-14*	AY758572	0.189	0.531	98.6	Clon ambiental AP-16 (AY145553)	α-Proteobacteria
B2-15* (45-200d)	AY758573	0.882	-0.186	94.5	Clon ambiental (AB074615)	γ-Proteobacteria
B2-16* (45-200d)	AY758574	0.646	0.644	99.6	Clon ambiental (AB074615)	γ-Proteobacteria
B2-17*	AY758575	-0.813	-0.064	99.8	Clon ambiental (AY133099)	α-Proteobacteria
B2-18*	AY758576	-0.058	-0.657	96.3	<i>Sphingomonas sp.</i> (X72723)	α-Proteobacteria
B2-19 (90-200d)	AY758577	0.630	-0.199	97.2	Clon ambiental C5-K12 (UBA421218)	γ-Proteobacteria
B2-20* (21-45d)	AY758578	-0.961	0.100	99.8	<i>Azospirillum</i> (clon) GCPF30 (AY129799)	α-Proteobacteria
B2-22	AY758579	-0.166	0.547	97.3	<i>Roseomonas genomospecies</i> (AY150048)	α-Proteobacteria
Tratamiento 4M						
B4-3 (45d)	AY758580	0,097	-0,278	100	<i>Sphingomonas sp.</i> S37 (AF367204)	α-Proteobacteria
B4-4	AY758581	0,643	-0,538	94.7	<i>Brevundimonas alba.</i> H12C5 (AF296688)	α-Proteobacteria
B4-5	AY758582	-0,675	0,337	99.4	<i>Trojanella thessalonices</i> (AF069496)	α-Proteobacteria
B4-6 (21-45d)	AY758583	0,565	-0,458	98.5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATU295683)	α-Proteobacteria
B4-7 (21d, 90-200d)	AY758584	0,399	-0,297	97.5	<i>Alcaligenes sp.</i> (ASP16SRRN)	β-Proteobacteria
B4-8* (21-45d)	AY758585	-0,407	0,299	98.9	<i>Xanthomonas sp.</i> V4.BO.41 (AJ244722)	γ-Proteobacteria
B4-10 (45-135d)	AY758586	0,342	-0,667	93.9	Clon ambiental JG34-KF-155 (AJ532712)	γ-Proteobacteria
B4-11* (21-45d)	AY758587	-0,597	-0,559	99.8	<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> (AB022428)	α-Proteobacteria
				99.2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505 (X94100)	
B4-12* (21-45d)	AY758588	-0,909	0,337	95.3	<i>Sphingomonas adhaesiva</i> (SA16SRD3)	α-Proteobacteria
				96.6	Clon ambiental (AJ318120)	
B4-13 (45-90d)	AY758589	0,435	0,003	92.7	<i>Erythrobacter sp.</i> (AB011075)	α-Proteobacteria
B4-14* (135-200d)	AY758590	0,263	-0,669	95.1	<i>Xanthomonas sp.</i> V4.BO.41 (AJ244722)	γ-Proteobacteria
B4-16 (90d)	AY758591	0,189	0,531	100	Clon β-Proteobacteria (AY162039)	β-Proteobacteria
				99.8	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (AF225979)	
B4-17 (90-200d)	AY758592	0,519	-0,787	95.0	<i>Xanthomonas sp.</i> V4.BO.41 (AJ244722)	γ-Proteobacteria
B4-20 (21-200d)	AY758593	0,882	-0,186	98.8	<i>Alcaligenes faecalis</i> (BAC509012)	β-Proteobacteria
B4-21 (90-135d)	AY758594	0,646	0,644	96.3	<i>Xanthomonas sp.</i> V4.BO.41 (AJ244722)	γ-Proteobacteria
B4-23 (135-200d)	AY758595	0,630	-0,199	97.8	<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257 (AY260150)	α-Proteobacteria
B4-24* (21-45d)	AY758596	-0,961	0,100	99.8	<i>Azospirillum</i> clone GCPF30 (AY129799)	α-Proteobacteria
B4-25	AY758597	0,514	-0,679	90.1	<i>Erythrobacter sp.</i> AS-45 (ESP391206)	α-Proteobacteria
B4-27	AY758598	0,586	-0,666	93.2	<i>Roseomonas genomospecies</i> (AY150050)	α-Proteobacteria
B4-28 (135-200d)	AY758599	-0,612	-0,340	96.6	<i>Rhodococcus sp.</i> RHA6 (RS16316)	Gram + ricos en G+C

(pág. anterior) ^a Se muestra el porcentaje de similitud (%) de la secuencia más similar encontrada en el Genbank. ^b El grupo filogenético se ha definido según la secuencia más próxima de Ribosomal Data Project (Maidak *et al.*, 2000). ^c Se muestra entre paréntesis los periodos de incubación en que la intensidad relativa fue superior al 5%. La intensidad relativa se calculó eliminando el ruido de fondo de la imagen digitalizada de DGGE (fig. 4.20) con el software Quantity one versión 4.4.1 (Biorad). ^d CFB: grupo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. ^e Los *loadings* de ACP, son coeficientes de correlación positivos o negativos de una banda en particular (evolución de su intensidad relativa de banda) con cada uno de los 2 componentes principales (CP1 y CP2). Un coeficiente cercano a 1 (en valor absoluto) implica que los cambios en intensidad de banda de dicha banda, están relacionados con cambios en el componente principal.

La mayoría de secuencias mostraron una similitud superior al 95% con secuencias existentes en el Genbank y RDP.

Teniendo en cuenta la asignación de las bandas del suelo no tratado con bandas de los tratamientos 2M y 4M, se determinó que el suelo original contenía 5 bandas pertenecientes a la subclase de las α -Proteobacterias (en los grupos de *Sphingomonas*, *Rizobium-Agrobacterium*, y *Azospirillum*) y 8 a γ -Proteobacterias (grupo de las *Xanthomonas*), según la clasificación del RDP (Maidak *et al.*, 2000).

Para el suelo bioestimulado sin nutrientes (2M) se cortaron 17 bandas de DGGE, de las cuales un 53% pertenecieron a la subclase de las α -Proteobacterias (9 bandas), un 6% a las β -Proteobacterias (1 banda), un 29% a las γ -Proteobacterias (5 bandas) y un 12% (2 bandas) al grupo de las *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) (tabla 4.10). Las bandas pertenecientes al grupo de la CFB aparecieron a medio y largo plazo (45-200 días). No se encontró ninguna secuencia perteneciente a los grupos de *Rhodococcus* y a *Mycobacterium* a lo largo de los 200 días de incubación (fig. 4.23).

Para el suelo bioestimulado con adición de nutrientes (4M), se cortaron 20 bandas de DGGE, de las cuales un 55% fueron similares a la subclase de las α -Proteobacterias (11 bandas), un 15% a las β -Proteobacterias (3 bandas), un 25% a las γ -Proteobacterias (5 bandas) y un 5% al grupo de las Gram positivas ricas en G+C (1 banda). A diferencia del tratamiento 2M, no se encontraron secuencias pertenecientes al grupo de las CFB (fig. 4.23).

4.2.7.2.1 Periodo inicial (0-90 días) en el tratamiento 2M

Se encontraron 5 bandas dominantes (intensidad relativa superior al 5%): B2-11, B2-12, B2-20, B2-8 y B2-9. Tres de ellas (B2-11, B2-12 y B2-20) pertenecieron a la subclase de las α -Proteobacterias. B2-11 y B2-12 pertenecían al grupo taxonómico de las *Sphingomonas* y eran un 97% y un 98% similares a un clon ambiental perteneciente a una comunidad microbiana de un biofiltro industrial degradador de gasolina (Friedrich *et al.*, 2002) y a *Sphingomonas* sp CFO6 degradadora de carbofurano (Feng *et al.*, 1997), respectivamente. La banda B2-20 era idéntica en secuencia a una cepa de *Azospirillum* detectada en una caverna pobre en nutrientes inorgánicos (no publicado). El resto fueron la B2-8, con un 98% de similitud con *Acidovorax* sp. UFZ-B517, una β -Proteobacteria degradadora de clorobencenos y la banda B2-9, similar en un 97% a *Xanthomonas axonopodis*, una γ -Proteobacteria de interés agronómico (Cubero y Graham 2002). En el periodo inicial de biodegradación (0-45 días) no se encontraron bandas pertenecientes al grupo de las CFB (la banda B2-3 se detectó a partir del día 45 pero a intensidades relativas muy bajas) ni al grupo de la Gram positivas ricas en G+C.

Como se muestra en la figura 4.24, las bandas B2-11 y B2-20 fueron las más abundantes (aproximadamente un 10% de la intensidad relativa) en el día 0, pero disminuyeron levemente durante el transcurso de la incubación. B2-12 y B2-9 fueron incrementando desde el inicio del experimento y alcanzaron su máximo a los 21-45 días (9% y 15% de intensidad relativa respectivamente).

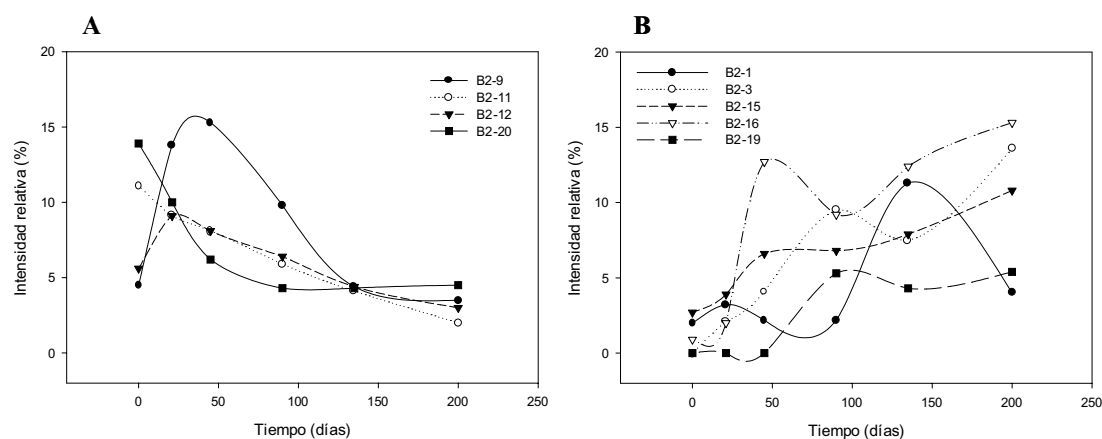


Fig. 4.24. Intensidad relativa de las bandas dominantes de DGGE en la bioestimulación sin adición de nutrientes (2M). A) bandas dominantes en periodo inicial (0-45 días). B) Bandas dominantes en el periodo tardío (90-200 días).

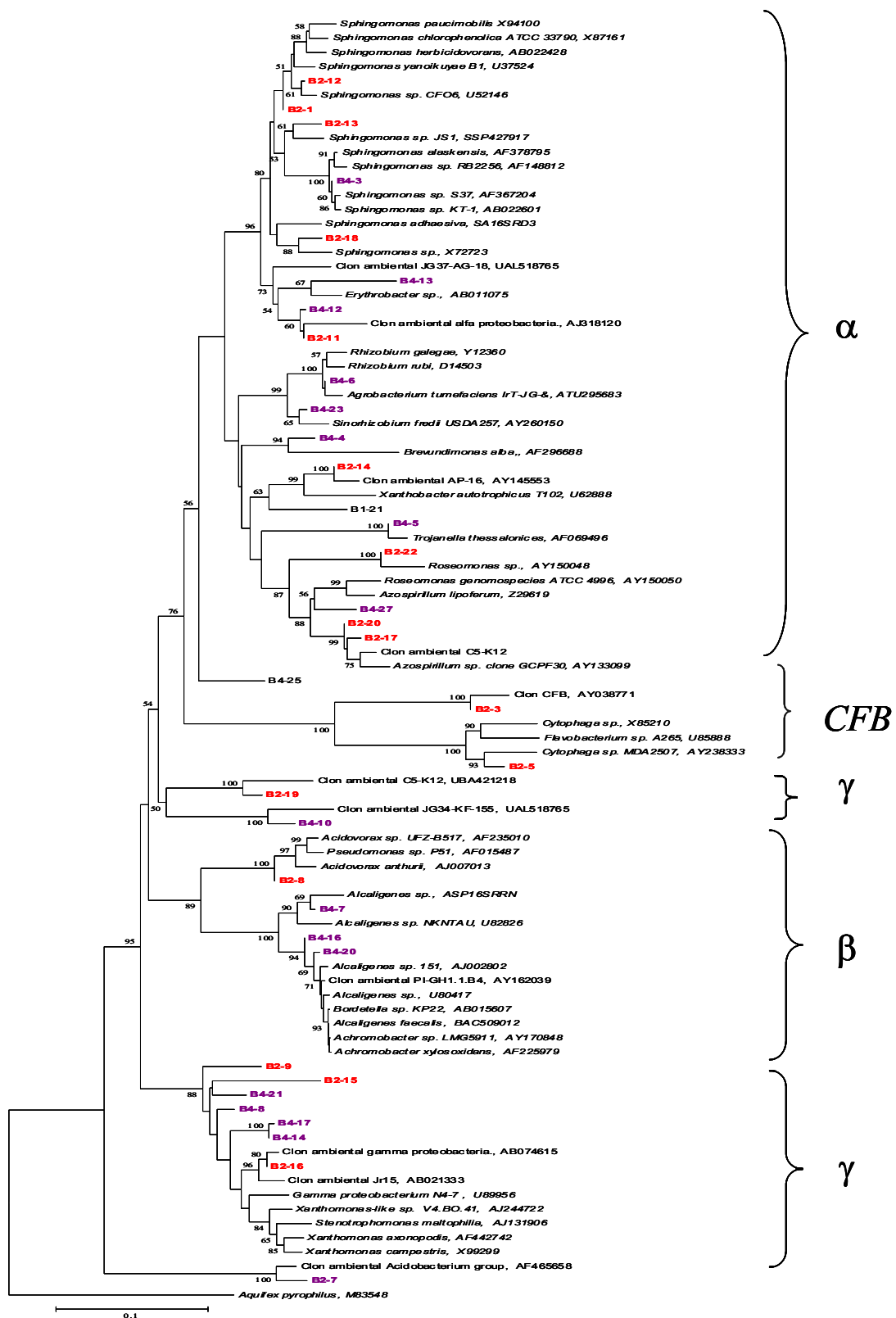


Fig. 4.23. Árbol filogenético construido por Neighbor-Joining (apartado 3.14) a partir de una región 587 pb que engloba las regiones hipervariables V3-V5, y que muestra las relaciones filogenéticas entre las

secuencias de genes 16S rRNA que se han obtenido a partir de las bandas de DGGE cortadas en el tratamiento 2M (B2-x) y 4M (B4-x) y secuencias disponibles en el GenBank y RDP. La distancia filogenética entre secuencias se calculó con el algoritmo Jukes Cantor. Los valores de *bootstrap* superiores a 50%, obtenidos de un total de 1000 réplicas (*bootstrap* = 1000), se muestran en las ramas del árbol. El árbol tiene como raíz a *Aquifex pyrophilus*.

4.2.7.2.2 Periodo tardío (90-200 días) en el tratamiento 2M

Se detectaron 5 bandas dominantes (>5% de intensidad relativa) principalmente pertenecientes a la subclase de las γ -Proteobacterias. Las bandas B2-15 y B2-16 fueron similares en un 94,5% y un 99,6% respectivamente a clones ambientales pertenecientes al grupo de *Xanthomonas*, mientras que B2-19 fue similar a otra γ -Proteobacteria no cultivable (Nakabachi *et al.*, 2003). Solamente una de las cinco bandas dominantes (B2-1) perteneció al grupo de las α -Proteobacterias, mostrando un 98% de similitud respecto a *Sphingomonas yanoikuyae*, un degradador de HAPs (Wang y Lau 1996). Finalmente, B2-3 presentó un 97,7% de similitud con un miembro incultivable del grupo de las CFB (O'Sullivan *et al.*, 2002). No se encontraron secuencias pertenecientes a los β -Proteobacterias ni a las Gram positivas ricas en G+C.

Las bandas B2-16, B2-3 y B2-15 presentaron la mayor intensidad relativa al final del experimento, con valores del 10-15% (fig. 4.20 y fig. 4.24). La intensidad relativa de la banda B2-1 aumentó entre los días 90 y 135, con una disminución posterior hasta el final del experimento. La banda B2-19 aumentó su intensidad entre los 45 y 90 días de incubación para mantenerse constante (5-7%) hasta el final de la incubación (fig. 4.20 y 4.24).

4.2.7.2.3 Periodo inicial (0-90 días) en el tratamiento 4M

Se detectaron 9 bandas dominantes (>5% de intensidad relativa). Seis bandas fueron similares a la subclase de las α -Proteobacterias, y de estas, 4 pertenecieron al grupo de las *Sphingomonas*: B4-3 era un 100% similar a *Sphingomonas* sp S37, una cepa degradadora de clorofenol (Godoy *et al.*, 2003); B4-311 era un 99,8% similar a *Sphingomonas herbicidovorans* y un 99,2% similar a *Sphingomonas paucimobilis* EPA505, una cepa aislada de un suelo contaminado con creosota y degradadora de HAPs de 3 y 4 anillos (Mueller *et al.*, 1990); B4-13 era un 92,7% similar a *Erytrobacter* sp; B4-6

era un 98,5% similar a una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* encontrada en un suelo contaminado por radionúclidos (Selenska-Pobell *et al.*, 2001). Es importante destacar que las bandas B4-12 (95,3 % similar a *Sphingomonas adhaesiva*) y B4-24 (100% similar a un *Azospirillum* no cultivado) coincidieron con las bandas B2-11 y B4-24, en migración por DGGE y en secuencia. Solamente se encontraron estas 4 bandas coincidentes entre los tratamientos de bioestimulación. Solamente una banda dominante fue similar a la subclase de las β -Proteobacterias (98% de similitud con *Alcaligenes faecalis*, y a *Achromobacter* sp. aislado de muestras clínicas (Coenye y Vandamme 2003)). Dos bandas de DGGE (B4-8 y B4-10) fueron similares a la subclase de las γ -Proteobacterias (B4-8 era un 98,9% similar a *Xanthomonas* sp. y B4-10 era un 93,9% similar a un clon ambiental). No se detectaron bacterias pertenecientes al grupo de las CFB ni a las Gram positivas ricas en G+C (tabla 4.10).

Como puede observarse en la figura 4.26, las bandas B4-24, B4-11 y B4-12 fueron las más abundantes en el día 0 (con un 10-14% de intensidad relativa por banda), pero disminuyeron después de 21 días de incubación. No obstante, B4-7 y B4-8 incrementaron significativamente a los 21 días de incubación (alcanzando un 6 y 11 % de intensidad relativa respectivamente), pero B4-8 disminuyó paulatinamente hasta el final del experimento, y B4-7 se mantuvo con un 6-10% de intensidad relativa. Las bandas B4-3, B4-13 y B4-10 aumentaron en intensidad tras 21 días de incubación, alcanzando su máximo a los 45 días (8-13% de intensidad relativa), disminuyendo rápidamente a partir de entonces, con la excepción de B4-10, que mostró una disminución suave después de los 45 días de incubación. Las bandas B4-6 y B4-20 incrementaron gradualmente su intensidad relativa durante los primeros 45 días, y se mantuvieron estables (8-10% de intensidad relativa) hasta el final del experimento (fig. 4.20 y 4.25).

4.2.7.2.4 Periodo tardío (90-200 días) en el tratamiento 4M

Se detectaron 9 bandas dominantes (>5% de intensidad relativa). Solamente una de las bandas (B4-23) perteneció a la subclase de las α -Proteobacterias (B4-23 era un 97,8% similar a *Sinorhizobium fredii*), no detectándose ninguna secuencia similar al grupo de las *Sphingomonas*. Dos bandas de DGGE, B4-20 y B4-7, pertenecieron a la subclase de las β -Proteobacterias: B4-20 era un 98,8% similar a *Achromobacter* sp. y B4-7 era un 97,5%

similar a *Alcaligenes* sp, un cepa degradadora de 3-clorobenzoato (Krooneman *et al.*, 1996). Cuatro de las bandas correspondieron a γ -Proteobacterias, tres de las cuales, B4-14, B4-17 y B4-21, mostraron un 95-96% de similitud respecto a una misma cepa de *Xanthomonas* (Fritz, 2000), mientras que B4-10 era un 93,9% similar a un clon ambiental de un suelo contaminado con restos de una mina de uranio (Selenska-Pobell *et al.*, 2001). Una de las bandas (B4-28) mostró un 96,6% de similitud en secuencia respecto a una cepa de *Rhodococcus*, género conocido por su capacidad degradadora de HAPs. No se encontró ninguna secuencia perteneciente al grupo de las CFB (fig. 4.20 y 4.25).

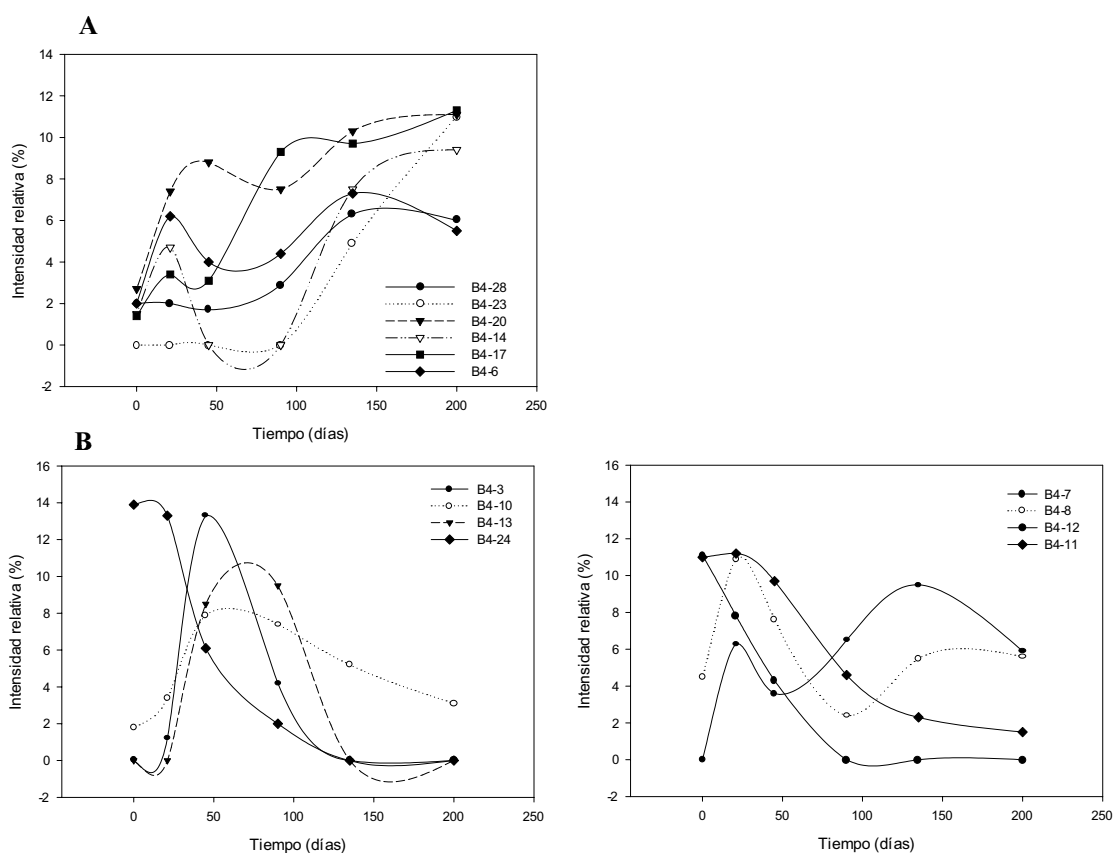


Fig. 4.25. Intensidad relativa de las bandas dominantes de DGGE en la bioestimulación con adición de nutrientes (4M). A) bandas dominantes en periodo inicial (0-45 días). B) Bandas dominantes en el periodo tardío (90-200 días).

Las bandas B4-23, B4-20, B4-17 y B4-14 fueron las más abundantes (9-14% intensidad relativa por banda). B4-20 incrementó de forma notable entre los 45 y 90 días y se mantuvo estable o incrementando levemente (8-10% intensidad relativa) hasta el final del experimento. La banda B4-28 incrementó en los primeros 45 días y después mantuvo

un incremento gradual hasta el final con valores de 8-10% de intensidad relativa. B4-17 aumentó su intensidad de forma notable en el periodo 45-90 días y se mantuvo estable (8-10% de intensidad relativa) hasta el final de la incubación. Las bandas B4-23 y B4-14 aumentaron drásticamente a largo plazo (135-200 días) hasta alcanzar intensidades relativas del 8-10%. La banda perteneciente al género *Azospirillum* (B2-20) disminuyó de forma notable los primeros 90 días (del 14% al 5%) y se mantuvo estable (4-5% de intensidad relativa) hasta el final (fig. 4.20 y 4.25).

4.2.7.2.5 Grupos filogenéticos durante la biorremediación

Las bandas de DGGE cortadas y secuenciadas en los tratamientos 2M (17 bandas) y 4M (20 bandas) representaban el 73-84 % y el 81-90% de la intensidad total (sumatorio de las intensidades relativas) de cada carril (0-200 días) respectivamente. Por ello, teniendo en cuenta la elevada representatividad de las bandas cortadas en cada tratamiento y para cualquier periodo de incubación, se analizó la representatividad de los grupos filogenéticos principales (α -, β -, γ -Proteobacteria, CFB y Gram positivos ricos en G+C) para los tratamientos 2M y 4M y a lo largo de los 200 días de incubación, correlacionándose con el proceso de biodegradación.

Como puede observarse en la figura 4.26, inicialmente, cuando las tasas de biodegradación eran más elevadas (tabla 4.10), la subclase de las α -Proteobacterias era el grupo dominante en ambos tratamientos, pero a lo largo de los primeros 90 días disminuyó notablemente de forma paralela a la disminución de TPH observada (fig. 4.9) ($r^2=0,93$ y $0,78$ en los tratamientos 2M y 4M respectivamente). Por otro lado, la subclase de las γ -Proteobacterias, dominada por el grupo de las *Xanthomonas*, incrementó su intensidad relativa conforme la concentración de TPH disminuía (correlación inversa, $r^2=0,92$ y $0,79$ en los tratamientos 2M y 4M respectivamente). En el tratamiento 4M, durante el periodo 90-200 días, las α -Proteobacterias y γ -Proteobacterias coexistieron en el periodo tardío (90-200 días) con unas intensidades relativas similares (35-40% intensidad relativa), mientras que en la bioestimulación sin nutrientes (2M), coexistieron con intensidades similares en el periodo 45-135 días (37-46% de intensidad relativo por grupo filogenético). En el período 135-200 días, en el tratamiento 2M, las γ -Proteobacterias incrementaron hasta alcanzar un 50% de la intensidad relativa mientras que las α -Proteobacterias

disminuyeron hasta representar un 25% de la intensidad relativa total (fig. 4.26). El grupo de las CFB solamente fue detectado en el tratamiento 2M. Este grupo aumentó su intensidad relativa, de forma gradual, después de 45 días de incubación, cuando las tasas de biodegradación de TPH y HAPs disminuyeron, alcanzando su máximo a los 200 días (22% intensidad relativa). La evolución de la intensidad relativa del grupo CFB, a lo largo de los 200 días de incubación, mostró un comportamiento inverso a la concentración de los TPH ($r^2=0,67$). Por otro lado, la subclase de las β -Proteobacterias (representado básicamente por el grupo filogenético de *Bordetella-Alcaligenes* según el RDP) y el grupo de las Gram positivas ricas en G+C no fueron detectados en el tratamiento 2M, mientras que en el tratamiento 4M aumentaron su representación gradualmente durante los 200 días de incubación, de forma inversa a la evolución de la concentración de TPH ($r^2=0,85$ y $r^2=0,50$ para las β -Proteobacterias y Gram positivas ricas en G+C respectivamente).

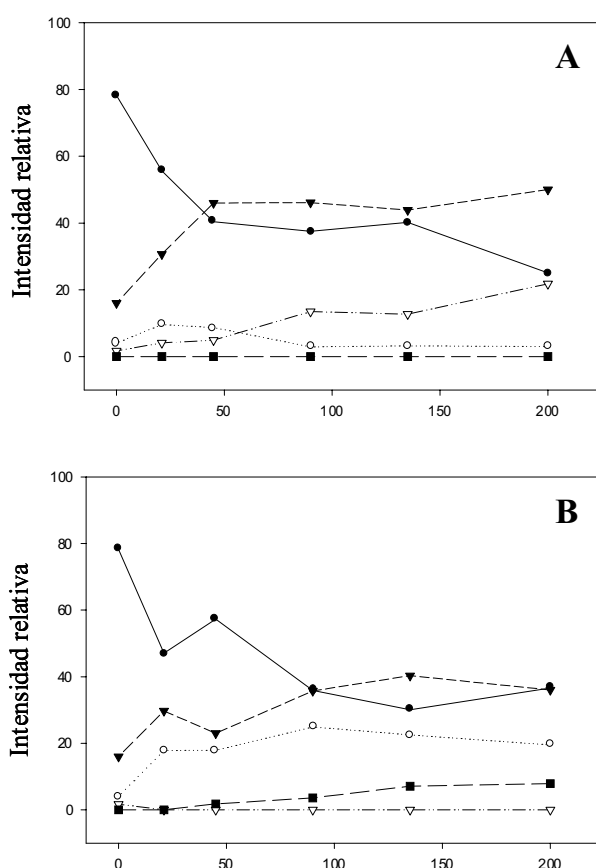


Fig. 4.26. Distribución relativa de los grupos filogenéticos principales durante el experimento de biorremediación en microcosmos. A) Bioestimulación sin adición de nutrientes (2M). B) Bioestimulación

con adición de nutrientes (4M). ●, α -Proteobacteria; ○, β -Proteobacteria; ▼, γ -Proteobacteria; ▽, CFB; ■, Gram positivos ricos en G+C.

En resumen, en el día 0 la subclase de las α -Proteobacterias (78%) era el grupo dominante en el suelo contaminado, seguido por las γ -Proteobacterias (16%), mientras que otros grupos eran poco frecuentes o no detectados. Durante el proceso de biodegradación, la población microbiana cambió de forma muy significativa, y tras 200 días, en la bioestimulación sin adición de nutrientes (2M), dominó la población de las γ -Proteobacterias (50% intensidad relativa), seguida de las α -Proteobacterias y el grupo CFB (22%). En la bioestimulación con nutrientes (4M) dominaron las α - y γ -Proteobacterias (36 % intensidad relativa en ambos grupos), seguidos del grupo de las β -Proteobacterias (19% de intensidad relativa) y las Gram positivas ricas en G+C (8% de intensidad relativa).

Para determinar si existía alguna relación entre las dinámicas de los diferentes grupos filogenéticos observados respecto a las cinéticas de biodegradación de los HAPs estudiados (3 y 4 anillos), se llevó a cabo un análisis de correlación lineal entre la intensidad de los grupos filogenéticos y las concentraciones de los diferentes HAPs diana. Se pudo determinar que en la bioestimulación sin nutrientes (tratamiento 2M) el grupo CFB mostró la mayor correlación (inversa) con las concentraciones de pireno, benzo(a)antraceno y criseno ($r^2=0,81-0,85$), mientras que el grupo de las α -Proteobacterias y γ -Proteobacterias mostraron correlaciones positivas e inversas respectivamente con el fluoranteno ($r^2=0,92$ y $0,94$ respectivamente), fenantreno ($r^2=0,76$ ambos grupos) y el antraceno ($r^2=0,84$ ambos grupos). La subclase de las β -Proteobacterias no mostró buenas correlaciones con los HAPs diana ($r^2=0-0,4$). Sin embargo, en la bioestimulación con nutrientes (tratamiento 4M), las α y β -Proteobacterias mostraron las correlaciones positivas y negativas más elevadas, respectivamente, respecto al fluoranteno y pireno ($r^2=0,83-0,89$). Asimismo, las β -Proteobacterias mostraron la mejor correlación (inversa) con las concentraciones de fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno y criseno ($r^2=0,84-0,92$). La subclase de las γ -Proteobacterias exhibió las correlaciones más bajas para concentraciones de HAPs diana en el tratamiento 4M.

Por lo tanto, la existencia de diferentes correlaciones entre los mismos grupos filogenéticos con la evolución de los TPH y los HAPs en los tratamientos 2M y 4M, la

falta de bandas coincidentes (coinciden 2 bandas para cada tratamiento) en los perfiles de DGGE y la diferenciación clara de la estructura de las poblaciones de ambos tratamientos analizado por ACP, indicaría la existencia de poblaciones microbianas diferentes y ,además, con actividades distintas.

4.2.7.3 Análisis por DGGE del efecto de la inoculación del consorcio AM en la población microbiana del suelo

La inoculación del suelo con biomasa del consorcio AM, especializado en la degradación de HAPs de tres y cuatro anillos (tratamiento 6M), no mejoró la capacidad degradadora del suelo respecto a los TPH y HAPs diana (Tabla 4.8 y 4.9) en comparación con los tratamientos 4M y 2M. Además, las poblaciones microbianas heterótrofas y degradadoras de HAPs no incrementaron (respecto al tratamiento 4M), aunque el suelo había sido inoculado en cinco ocasiones con 10^8 NMP g^{-1} suelo durante los 200 días del proceso de biorremediación.

Para determinar si la inoculación periódica del suelo bioestimulado con adición de nutrientes, con el consorcio AM, había modificado la estructura de la comunidad del suelo, se llevó a cabo un estudio por DGGE de los perfiles de genes 16S rRNA de los tratamientos 6M (bioestimulación con nutrientes y bioaumentación) comparados con el tratamiento 4M (bioestimulación con nutrientes) y el 1M (suelo no tratado) a lo largo del periodo de incubación de 200 días. Se calcularon índices de similitud entre perfiles de DGGE, basados en el coeficiente de correlación de Pearson, obteniéndose una matriz de distancias, a partir de la cual se obtuvo el árbol de similitudes mediante un análisis de cluster. El coeficiente de correlación de Pearson es un índice de similitud objetivo que tiene en cuenta la presencia/ausencia de la banda, así como su intensidad relativa y que se puede utilizar para analizar datos resultantes de DGGE (Boon *et al.*, 2002). En la figura 4.27 pueden observarse los perfiles de DGGE obtenidos y la relación de similitud entre los tratamientos 1M, 4M y 6M a lo largo de los 200 días de incubación. Al principio del experimento (21-45 días) los perfiles obtenidos en la bioestimulación (4M) y en el bioaumentación (6M) fueron muy similares, formando 2 agrupaciones (*clusters*) a los 21 y 45 días, cada uno de los cuales incluía dos tratamientos. Ninguna banda del inóculo AM pudo ser detectada en el suelo inoculado durante los 200 días del experimento, con la excepción de una de ellas detectada en el día 90 (fig. 4.27).

Teniendo en cuenta, que se llevaron a cabo 5 inoculaciones durante los 200 días (días 14, 26, 57, 120 y 165), con biomasa necesaria para llegar a una población de 10^8 NMP g^{-1} de suelo en cada adición, este resultado implicaría que el inóculo AM no compite de forma satisfactoria con la comunidad microbiana indígena del suelo en el periodo inicial (0-45 días) de biodegradación HAPs. Sin embargo, a los 200 días de incubación los perfiles de los tratamientos 4M y 6M sí que presentaron más diferencias entre si que en las fases iniciales del proceso de biorremediación. Por lo tanto, parece ser que en el periodo inicial (0-45 días), cuando el proceso de biodegradación era dominante, la inoculación de una población exógena no afectó a la distribución de la población microbiana indígena, mientras que en el periodo tardío (90-200 días), cuando la biodegradación de TPH y HAPs era mucho más lenta, la inoculación del consorcio AM podría haber provocado ligeros cambios en la distribución de la población (fig. 4.27).

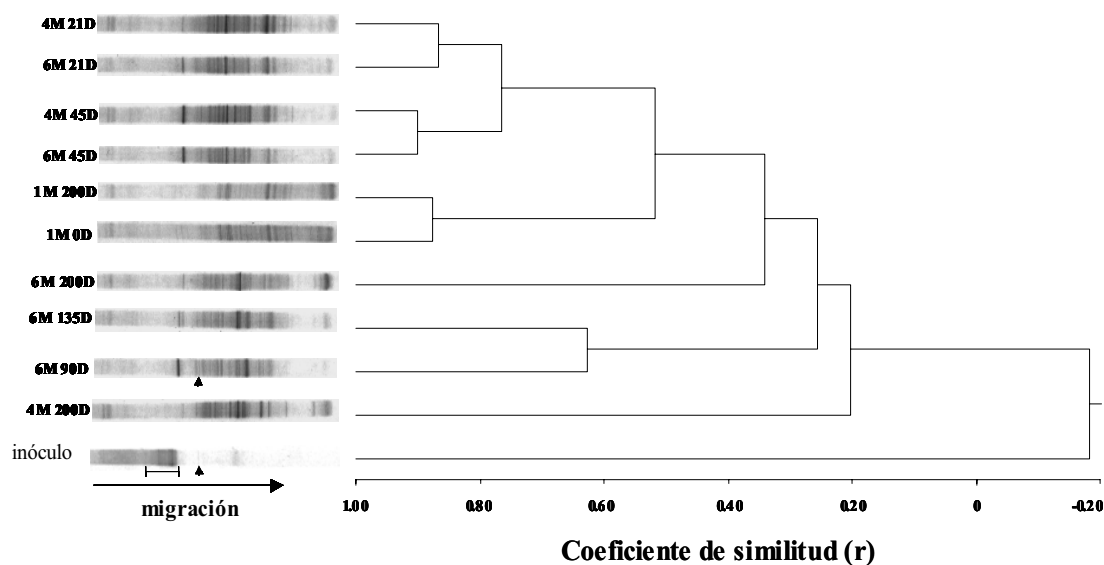


Fig. 4.27. Dendrograma de similitud de perfiles de DGGE obtenidos en los tratamientos 1M, 4M y 6M durante 200 días de incubación. Dendrograma construido mediante el método “unweighted pair group” a partir de una matriz de distancias del coeficiente de correlación de Pearson. Suelo no tratado (1M), bioestimulación con adición de nutrientes (4M), bioestimulación + bioaumentación (6M), y suelo no tratado (1M). El segmento presente en el carril del inóculo representa a las bandas principales que no se observan en los suelos inoculados. La flecha indica la única banda del inóculo detectable en los suelos inoculados.

4.2.8 Estudio ecotoxicológico del proceso de biorremediación

Se estudió la toxicidad aguda y la genotoxicidad potencial a lo largo del proceso de biorremediación. Para ello se eligieron los tratamientos 1M, 2M y 4M, ya que representaban los tres tipos diferentes de comportamientos observados, tanto a nivel de la biodegradación de TPH y HAPs, como de la estructura y dinámica de poblaciones microbianas. La toxicidad aguda se estudió mediante ensayos de Microtox[®] (*Vibrio fischeri*) en lixiviados de suelo y ensayos de letalidad y reproducción en anélidos (*Eisenia foetida*), mientras que la genotoxicidad potencial del suelo se determinó mediante FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*) en lixiviados del suelo y mediante microscopia de fuerzas atómicas (AFM), estudiando el efecto de extractos orgánicos del suelo (TPH) frente a DNA lineal y circular.

4.2.8.1 Toxicidad aguda

4.2.8.1.1 Microtox[®] de lixiviados

El lixiviado del suelo, analizado por Microtox[®], presentó una EC₅₀ inicial del 20% (20g de suelo en 100 ml⁻¹ lixiviado), que se mantuvo constante en el suelo no tratado a lo largo de los 200 días de incubación (fig. 4.28).

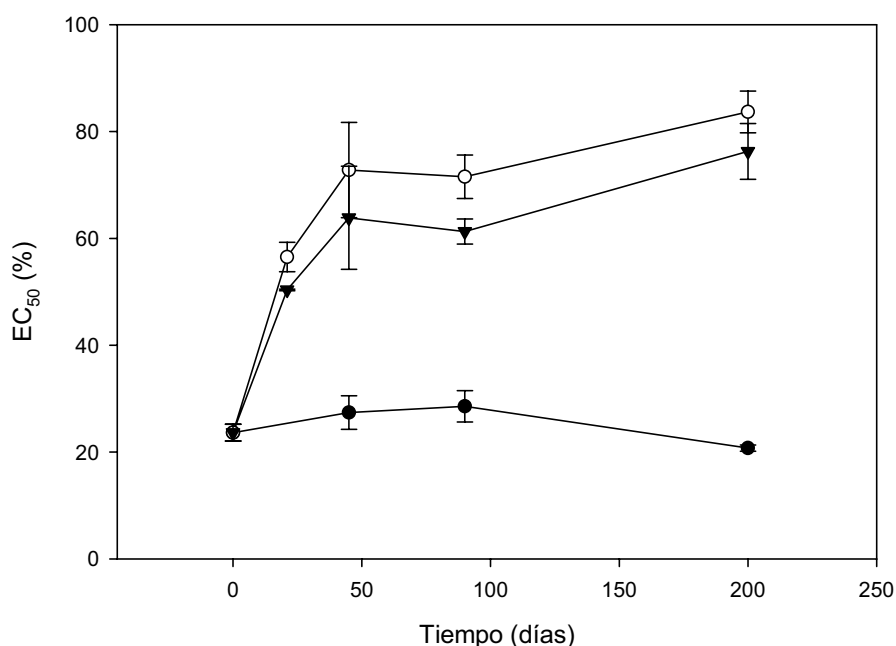


Fig. 4.28 (pág anterior) Evolución de la toxicidad (EC_{50}) de lixiviados de suelo en microcosmos, analizada por Microtox[®] a lo largo de los 200 días de incubación. Suelo no tratado (●); Suelo bioestimulado con adición de nutrientes (▼); Suelo bioestimulado sin adición de nutrientes (○). Las barras en cada punto representan la desviación estándar (n=3).

Sin embargo, en los tratamientos de bioestimulación (2M y 4M) la toxicidad disminuyó de forma significativa ($P < 0,05$), al aumentar 3-3,5 veces la EC_{50} durante los primeros 45 días (EC_{50} de 63% y 70% en los tratamientos 4M y 2M respectivamente). Durante el periodo 90-200 días la toxicidad disminuyó ligeramente respecto al día 45, alcanzándose una EC_{50} de 76-80% en ambos tratamientos de bioestimulación (fig. 4.28). No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los valores de EC_{50} obtenidos en los tratamientos 2M y 4M al final del experimento. Sin embargo, en el día 90 de incubación, la toxicidad del lixiviado observada en el tratamiento de bioestimulación con nutrientes (4M) era superior ($P < 0,05$) que en la bioestimulación sin adición de nutrientes (2M). Es importante destacar la correlación lineal que existió entre la disminución de la concentración de TPH y la EC_{50} observada en los lixiviados ($r^2 = 0,96-0,97$) en ambos tratamientos de bioestimulación.

4.2.8.1.2 Ensayo de letalidad y reproducción de *Eisenia foetida*

Aunque la toxicidad de lixiviados del suelo, analizada por Microtox[®] (*Vibrio fischeri*), disminuyó a lo largo del proceso de biorremediación, no ocurrió lo mismo con el ensayo de letalidad y reproducción de oligoquetos realizado con *Eisenia foetida*. Como puede observarse en la tabla 4.11, el suelo contaminado con creosota era letal para toda la población de *Eisenia foetida* durante todo el proceso de biorremediación. Incluso la dilución del suelo en proporción 1:1 p/p, utilizando un suelo control no contaminado y no letal (tabla 4.11), mantenía la letalidad del suelo.

Además, se comprobó que la concentración de nutrientes (KNO_3 y KH_2PO_4) utilizadas para la bioestimulación con nutrientes (tratamiento 4M) también era letal para *Eisenia foetida*, en el suelo control no contaminado. No obstante, se comprobó que la toxicidad del suelo bioestimulado sin adición de nutrientes (tratamiento 2M) también era letal para la población de *Eisenia foetida*. La escasa supervivencia observada en el suelo contaminado (5% en 1M a los 200 días y 10% en 4M 200 días) no presentó descendencia.

Tabla 4.11. Ensayo de toxicidad aguda (letalidad) y reproducción en oligoquetos (*Eisenia foetida*).

Tratamiento	Mortalidad (%) (suelo 1)	Mortalidad (%) (suelo 1:1)	Descendencia (individuos)
Suelo control	10	10	120
Suelo control + Nutrientes ¹	100	100	ND
1M 0d	100	100	ND
1M 200d	100	95	0
4M 21d	100	100	ND
4M 90d	100	100	ND
4M 200d	100	90	0
2M 200d	100	100	ND

¹ Se añadieron KNO₃ y K₂HPO₄ como nutrientes a la misma concentración que la utilizada en el tratamiento 4M.

4.2.8.2 Genotoxicidad potencial

4.2.8.2.1 Ensayo FETAX

Los ensayos de genotoxicidad realizados con embriones de *Xenopus laevis* en lixiviados de suelo se realizaron con el suelo no tratado (1M) y el suelo bioestimulado con nutrientes (4M) (tabla 4.12). No se pudo llevar a cabo con el tratamiento 2M, por falta de muestra de suelo.

El lixiviado del suelo bioestimulado presentó, al final del experimento, una letalidad similar a la del suelo no tratado (LD₅₀>50% de concentración de suelo), mientras que a los 90 días, el tratamiento 4M incrementó su toxicidad con una LD₅₀ entre 20% y 50%. Los embriones supervivientes no mostraron diferencias significativas (P>0,05) en la longitud (mm) entre tratamientos (1M y 4M), ni tampoco en comparación al suelo control y solución FETAX. En ambos tratamientos, la proporción de embriones vivos con malformaciones incrementó al aumentar la concentración del suelo contaminado (tabla 4.12), alcanzándose valores de un 60-80% de embriones vivos malformados. La mayor parte de las malformaciones en el suelo no tratado fueron en el intestino, la notocorda y en los ojos, mientras que en el suelo bioestimulado con nutrientes (4M), las malformaciones fueron mayoritariamente a nivel del intestino.

Tabla 4.12. Resultados del ensayo FETAX realizado con con lixiviados de suelo no tratado y bioestimulado con nutrientes (4M).

Tratamiento	Mortalidad (%)	Longitud vivos (mm)	Malformados (%)	Malformación
C+ (1:10) ²	100	ND ¹	ND	ND
C+ (1:5)	100	ND	ND	ND
C+ (1:2)	92	ND	100	Intestino
Sol. FETAX ³	0	10,13 ± 0,42	21,15	Intestino
Suelo control	10	10,00 ± 0,43	39,13	Intestino
1M 200d (1:10)	18	9,34 ± 0,72	48,8	Intestino
1M 200d (1:5)	32	8,01 ± 1,42	79,4	Intestino, notocorda, ojos
1M 200d (1:2)	38	9,03 ± 0,47	61,3	Intestino, notocorda
4M 200d (1:10)	20	9,70 ± 0,48	45,0	Intestino
4M 200d (1:5)	36	9,79 ± 0,44	31,2	Intestino
4M 200d (1:2)	35	9,34 ± 0,40	81,0	Intestino
4M 90d (1:10)	20	9,95 ± 0,50	40,0	Intestino
4M 90d (1:5)	22	9,85 ± 0,46	38,5	Intestino
4M 90d (1:2)	68	9,62 ± 0,71	62,5	Intestino

¹ND: No determinado por falta de individuos supervivientes. ². C+: 6-aminonicotinamida. (1:x) factor de dilución x aplicado a una muestra o al suelo. ³Sol.FETAX; solución FETAX utilizada para el crecimiento de embriones de *Xenopus laevis* y para conseguir los lixiviados del suelo.

4.2.8.2.2 Estudio del Efecto del extracto TPH al DNA por AFM

Para determinar el efecto potencial que producen los TPH del suelo contaminado en el DNA, se analizó el efecto de diferentes concentraciones de TPH en tampón Hepes-DMSO (4% de DMSO) frente a DNA lineal (600 pb) y circular (pBR322). Es importante resaltar que no se pudieron utilizar elevadas concentraciones de DMSO (100%) que habrían solubilizado por completo los TPH, debido a que en estas condiciones el DNA no se adsorbía a la mica y, por lo tanto, no se podía visualizar por AFM.

Como puede verse en la figura 4.19, en el DNA circular no se observaron, comparativamente, modificaciones apreciables en su estructura, en ninguna de las concentraciones de TPH ensayadas en el suelo no tratado (fig. 4.29A) y en el suelo bioestimulado con nutrientes (fig. 4.29B). Sin embargo, con el DNA lineal si se observaron diferencias entre el suelo no tratado (fig. 4.29C) y el bioestimulado (fig. 4.29D).

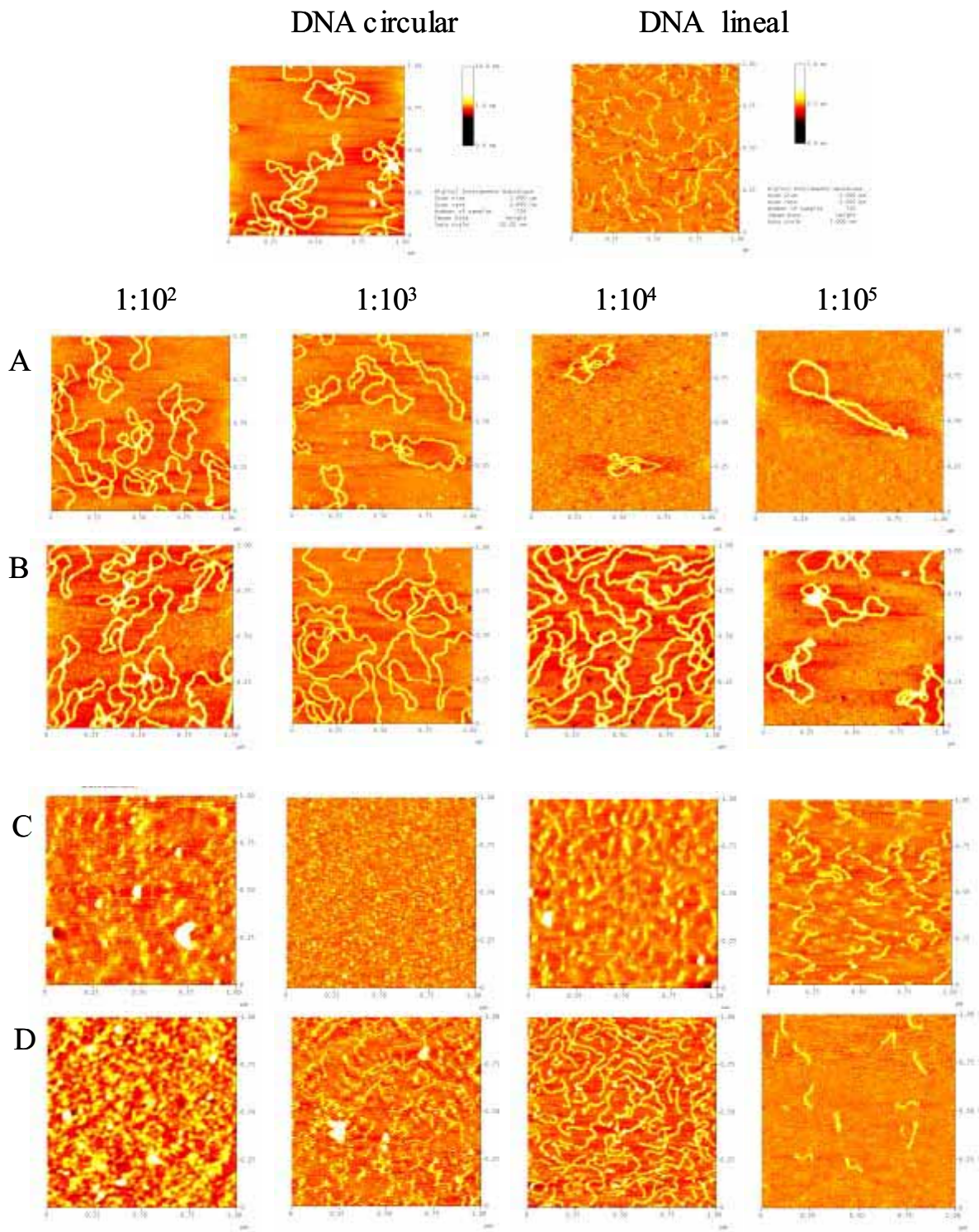


Fig. 4.29. Microfotografías de AFM de DNA circular (A y B) y DNA lineal (C y D) incubado con diferentes concentraciones de TPH (diluciones 10^{-2} - 10^{-5} equivalen a $20\text{mg}-20\ \mu\text{g}$ suelo ml^{-1}). Suelo no tratado (A y C) y suelo bioestimulado sin nutrientes (B y D) al final del proceso de biorremediación (200 días).

Concretamente en la dilución mayor (1:10⁵), equivalente a los TPH de 20 µg de suelo, el DNA con el extracto del suelo no tratado se observaron modificaciones y fondos de degradación, mientras que el DNA con extracto TPH del suelo bioestimulado, no presenta alteraciones en su estructura y no se observaron fondos de degradación. A una concentración de TPH equivalente a 200 µg de suelo ml⁻¹ se observaron diferencias muy destacables en el comportamiento de los extractos de los suelos, ya que el DNA fue completamente degradado por extractos del suelo no tratado (fig. 4.29 C, 1: 10⁴), mientras que el DNA aún mantenía una buena estructura con el extracto del suelo bioestimulado. Fueron necesarios 100 veces más de extracto de suelo bioestimulado (2 mg de suelo) para ver una transformación parcial y un fondo de degradación de DNA lineal (fig. 4.29D 1:10³) equivalente al observado en el suelo no tratado (fig. 4.29 C, 1: 10⁵).

5 DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado la aplicabilidad y los procesos fisicoquímicos, biológicos y ecotoxicológicos que se presentan durante los procesos de biodegradación en los ensayos de tratabilidad, a escala de laboratorio, de un suelo contaminado con creosota originario de una planta de creosotado con más de 30 años de funcionamiento.

5.1 CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL SUELO

La elevada concentración inicial de TPH (8200mg TPH kg⁻¹ suelo), una composición de TPH enriquecida en HAPs de tres y cuatro anillos (tabla 4.7, fig. 4.4) y una granulometría franco-arcillosa conferían al suelo características recalcitrantes y de interés ecotoxicológico. La elevada proporción de la población microbiana degradadora de HAPs encontrada en el suelo original (tabla 4.6), una elevada producción de CO₂ durante los ensayos respirométricos (fig. 4.5), el aumento en la proporción de degradadores de HAPs tanto en las respirometrías como en los microcosmos (fig. 4.6 y 4.18) y la ausencia de fase de latencia en la cinética de degradación de los TPH (fig. 4.9) revelaban la presencia de una población microbiana indígena preadaptada, degradadora de HAPs, y metabólicamente activable.

5.2 EFECTO DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LA DEGRADACIÓN DE HAPS

Las cinéticas de degradación de TPH mostraron un patrón bifásico (k_1 y k_2), con cinéticas de eliminación de primer orden en todos los tratamientos de biorremediación (tabla 4.9). Este comportamiento podría ser debido a diversos factores, como son: la disminución en la biodisponibilidad de los HAPs (Ressler *et al.*, 1999; Alexander 2000), la acumulación de metabolitos de HAPs tóxicos (Casellas *et al.*, 1997; Kazunga y Aitken 2000; Kazunga *et al.*, 2001), o el enriquecimiento de compuestos más recalcitrantes (Sabaté *et al.*, 2004) y también a un cambio en las poblaciones microbianas (Friedrich *et al.*, 2000; Frontera *et al.*, 2002; Massol *et al.*, 1997; Roling Wilfred *et al.*, 2004).

Para determinar si la biodisponibilidad era un factor limitante a lo largo del proceso de biodegradación, el Dr. J. Sabaté del grupo de investigación diseñó un protocolo basado

en extracciones suaves de los TPH con β -ciclodextrinas, para determinar la fracción HAP desadsorbible del suelo y por lo tanto biodisponible (Sabaté *et al.*, *sometido*). Los HAPs, pueden penetrar en las cavidades que incluyen las ciclodextrinas, reduciendo su concentración en la fase acuosa y, por lo tanto, acelerando el proceso de desadsorción. Por ello, la cantidad de HAPs extraíbles mediante las ciclodextrinas se corresponde a la fracción desadsorbible y se puede considerar como fracción biodisponible.

Tabla 4.13. Concentraciones de HAPs de 3 y 4 anillos, experimentales y teóricas calculadas a partir de la fracción desadsorbible determinada mediante extracción suave con β -ciclodextrinas (Sabaté *et al.*, *sometido*).

		Conc. inicial (mg kg ⁻¹ suelo)	% Desadsorbible		Conc. 200d teórica ²	Conc observada (mg kg ⁻¹ suelo)
			0 días	200 días		
FE ¹	1M	496±24	98.4±0.7	98.6±0.2	7.1	510±23
	2M			56.0±7.8	7.0	16±0.7
	4M			57.8±5.2	7.8	19±0.9
A ¹	1M	114±15	95.3±0.8	93.2±1.6	5.8	85±6
	2M			50.4±3.0	6.7	14±0.1
	4M			65.5±1.2	5.5	16±0.8
FLNT ¹	1M	693±48	94.9±3.8	95.8±3.1	30.8	728±38
	2M			35.7±6.5	35.2	55±6
	4M			47.8±5.1	29.3	56±1
PIR ¹	1M	387±30	87.8±1.1	88.6±3.1	45.9	403±9
	2M			36.3±6.7	33.6	53±4
	4M			47.8±5.1	21.9	42±2
B(a)A ¹	1M	108±10	89.8±3.2	89.7±2.0	11.8	115±3
	2M			68.4±9.0	10.2	32±4
	4M			73.0±4.1	17.7	66±2
CRI ¹	1M	144±10	83.8±4.4	82.5±3.4	26.8	153±8
	2M			65.4±9.0	20.1	58±7
	4M			86.3±4.2	12.8	94±5
B(a)P ¹	1M	21±2	0	0	21.2	21.2±2
	2M		0	0	21.2	19.3±1
	4M		0	0	21.2	19.9±2

¹ FE, fenantreno; A, antraceno; FLNT, fluoranteno; PIR, pireno; B(a)A, benzo(a)antraceno; CRI, criseno; B(a)P, benzo(a)pireno. ²Concentración final teórica, calculada a partir del porcentaje (%) desadsorbible en la concentración final experimental.

Como puede observarse en la tabla 4.13, los HAPs de 3 y 4 anillos presentaron una biodisponibilidad elevada (95-98% y 83-94% respectivamente) al inicio del experimento que fue disminuyendo a lo largo del proceso de biorremediación (tabla 4.13). El benzo(a)pireno no fue desadsorbible mediante ciclodextrinas y tampoco fue degradado en los tratamientos de bioestimulación. Por lo tanto, la disminución de la biodisponibilidad podría ser una de las causas de las cinéticas bifásicas de degradación de TPH y HAPs. No obstante, la biodisponibilidad no es la única causa, ya que el benzo(a)antraceno y criseno eran bastante biodisponibles (73% y 86% respectivamente) al final del experimento, con concentraciones aún elevadas (66 y 94 mg kg⁻¹) y estables desde los 90 días de incubación, indicando que el proceso de biodegradación se había detenido (k_2 próximas a cero (tabla 4.9)).

La acumulación de metabolitos resultantes de la oxidación de HAPs puede reducir la viabilidad de algunos degradadores de HAPs y, además, puede inhibir la degradación de HAPs (Casellas *et al.*, 1997; Kazunga y Aitken 2000; Kazunga *et al.*, 2001): En este estudio, ésta no pudo ser la causa, ya que aunque inicialmente se detectara la presencia de varios productos oxidados, fueron degradados a lo largo de los 200 días del proceso de biorremediación (fig. 4.14 y 4.15). La disminución de la fracción polar coincidió con una reducción de la toxicidad (3-4 veces) de los lixiviados del suelo, determinado por Microtox[®] (fig. 4.28). Asimismo el ensayo FETAX con lixiviados del suelo mostró que el proceso de bioestimulación implicó la eliminación de la teratogenia en ojos y notocorda, pero no en el intestino, sin embargo, no se encontraron diferencias en la mortalidad (LD₅₀) de embriones expuestos a diferentes concentraciones de lixiviado. Es importante destacar que en el lixiviado no fueron detectados HAPs parentales (límite de detección 0,5 mg HAP kg⁻¹ suelo), mientras que estaban presentes los compuestos más polares (más solubles en agua).

Teniendo en cuenta que el suelo original presentaba un contenido muy bajo en agua (1,6% p/p) y que no existió una disminución de la concentración de TPH en el suelo no tratado durante el experimento en microcosmos, se puede afirmar que el contenido en agua, la aireación y la existencia de una población microbiana degradadora y metabólicamente activable han sido los factores clave para la biorremediación del suelo.

Todos los tratamientos de bioestimulación con adición de nutrientes (nutrientes, nutrientes con biotensioactivo, nutrientes y bioaumentado, nutrientes y octoato de hierro) no han mostrado diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos, y tampoco han mejorado el proceso de biorremediación respecto a la bioestimulación sin adición de nutrientes. Las cantidades de nutrientes añadidas en estos tratamientos fueron establecidas con el objetivo de alcanzar una proporción molar de 300C:10N:1P respecto al COT, muy parecida a la proporción 250C:10N definida por Atagana *et al.*, (2004) para un suelo contaminado por creosota. La cantidad requerida de N y P fue repartida en tres adiciones para evitar una inhibición en la biodegradación causada por cambios osmóticos bruscos (Walworth *et al.*, 1997; Walworth y Reynolds 1995). No obstante, las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy variadas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (U.S. EPA, 1996) y de hecho la mayor parte de las proporciones óptimas de C:N que se describen en la bibliografía oscilan dentro de este rango (Bossert y Bartha, 1984; Oudot y Dutrieux, 1989; Huesemann, 1994; Alexander, 1999; Atagana *et al.*, 2003). Se han descrito proporciones C:N de 600:10 (Dibble y Bartha, 1979), de 500:10 (Zhou y Crawford, 1995) respecto al COT a degradar. Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios. Morgan y Watkinson (1992) encontraron una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico. Asimismo, se ha descrito que el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación (Genouw *et al.*, 1994; Zhou y Crawford, 1995; Margesin y Schinner, 1997).

Como puede observarse en la fig. 4.10 y en la tabla 4.9, los tratamientos con nutrientes implicaron tasas de biodegradación a largo plazo (k_2) cercanas a cero en la biodegradación de benzo(a)antraceno y criseno, mientras que en la bioestimulación sin adición de nutrientes las tasas finales de biodegradación (k_2) fueron más elevadas indicando que continuaba el proceso de biodegradación de estos compuestos. Estos resultados sugieren la existencia de un efecto negativo en la adición de nutrientes para la biodegradación de HAPs en el periodo tardío. En realidad, los nutrientes añadidos no fueron utilizados y se acumularon en el suelo a lo largo del proceso de biorremediación

(fig. 4.17), alcanzándose conductividades superiores a $1500 \mu\text{S cm}^{-1}$ y concentraciones de NO_3^- superiores a $8000 \text{ mg NO}_3 \text{ kg}^{-1}$ suelo (la conductividad inicial del suelo era de $228 \mu\text{S cm}^{-1}$ con $17 \text{ mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ suelo). La presencia de un exceso de nutrientes podría haber inhibido la biodegradación de los HAPs de elevado peso molecular. La inhibición de la biodegradación en suelos contaminados, debido a la salinidad, también ha sido descrita en otros trabajos: Rhykerd *et al.* (1995) observaron una disminución en la biodegradación de aceite de motor en un suelo contaminado, debido a un incremento en la salinidad producido por NaCl, mientras que Braddock *et al.* (1997) atribuyeron a la salinidad, causada por el exceso de nutrientes, la causa principal de la disminución de la actividad microbiana en un suelo contaminado por hidrocarburos.

En un estudio reciente, Röling *et al.* (2002), sugirieron que la adición de nutrientes inorgánicos podría implicar diferencias en las tasas de biodegradación y variaciones en las poblaciones microbianas. En el presente trabajo los cambios diferenciales observados en las poblaciones microbianas debido a las distintas concentraciones de nutrientes podrían explicar las diferentes capacidades degradadoras observadas entre los tratamientos de bioestimulación con y sin la adición de nutrientes.

Al final del proceso de biorremediación, las concentraciones alcanzadas de HAPs residuales de 3 y 4 anillos fueron inferiores a los NGR definidos en el Real Decreto 9/2005, excepto para el benzo(a)antraceno (NGR= 20 mg kg^{-1} suelo) que disminuyó hasta concentraciones de 32 mg kg^{-1} y 65 mg kg^{-1} en los tratamientos 2M y 4M-7M respectivamente, y el benzo(a)pireno (NGR= 2 mg kg^{-1}) que no fue degradado y se mantuvo en 21 mg kg^{-1} suelo. Sin embargo en el tratamiento 2M, únicamente eran desadsorbibles 22 mg de benzo(a)antraceno kg^{-1} suelo (tabla 4.13) y la cinética de biodegradación estimada matemáticamente indicaba que solamente se podían biodegradar 4 mg kg^{-1} adicionales (fig. 4.11), por lo que difícilmente se puede esperar que se alcancen concentraciones inferiores a los NGR. No obstante, las concentraciones desadsorbibles (de interés ecotoxicológico) de benzo(a)antraceno y de benzo(a)pireno (fig. 4.13), en el tratamiento 2M, cumplen con los NGR (tabla 4.7). Los TPH fueron degradados en un 79% en el tratamiento 2M hasta alcanzar una concentración final de $1677 \pm 92 \text{ mg kg}^{-1}$ por debajo de los 2000 mg kg^{-1} de la normativa holandesa (tabla 4.7) y aún por encima de los $50 \text{ mg TPH kg}^{-1}$ definidos en el Real Decreto 9/2005. Los tratamientos de bioestimulación

con nutrientes (4M-7M) alcanzaron niveles de TPH superiores (2080-2200 mg TPH kg⁻¹) a los definidos en la normativa holandesa. Estos resultados cuestionan los NGR establecidos en el Real Decreto 9/2005, ya que se debería comprobar que los contaminantes en el suelo sean desabsorbibles para poder definir realmente unas concentraciones de riesgo.

Discriminación isotópica de HAPs

En los estudios hidrogeológicos se utiliza la discriminación o fraccionamiento isotópico de hidrocarburos para demostrar, de forma indirecta, la existencia de procesos de biodegradación de hidrocarburos de bajo peso molecular en las aguas subterráneas contaminadas por hidrocarburos (Meckenstock *et al.*, 2004), siendo los procesos de biodegradación anaeróbica (en presencia de nitratos, ión férrico y sulfatos) donde el proceso de fraccionamiento isotópico es más significativo (Landmeyer *et al.*, 1996). La técnica del IRMS, a concentraciones experimentales bajas, puede tener problemas en detectar fraccionamiento isotópico en hidrocarburos de más de 14 carbonos (Morasch *et al.*, 2004). Los HAPs de más de 2 anillos se presentan en concentraciones bajas (por problemas de solubilidad) en los acuíferos, y por lo tanto no han sido muy estudiados por IRMS. En la bibliografía, solamente se ha observado fraccionamiento isotópico en la biodegradación aeróbica y anaeróbica del naftaleno (Morasch *et al.*, 2002 y Griebler *et al.*, 2004, respectivamente) y anaeróbica del 2-metilnaftaleno (Griebler *et al.*, 2004; Steinbach *et al.*, 2004). No se ha detectado fraccionamiento isotópico en la biodegradación de fluoranteno (Trust *et al.*, 1995; Preus *et al.*, 1989), ni del 2-metilfenantreno (Mazeas *et al.*, 2002; Steinbach). En realidad, la mayor parte de estudios se han basado en el estudio de hidrocarburos de bajo peso molecular (Meckenstock *et al.*, 2004). Se ha descrito fraccionamiento isotópico en la biodegradación de metano en condiciones aeróbicas y anóxicas (Barker y Fritz 1981; Coleman *et al.*, 1981), en la biodegradación de BTEX (Griebler *et al.*, 2004; Meckenstock *et al.*, 2002; Richnow *et al.*, 2003b; Sherwood Lollar *et al.*, 1999; Stehmeier *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2000), MTBE (Kolhatkar, *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2002), naftaleno (Richnow *et al.*, 2003) y familias cloradas del etileno (Ertl *et al.*, 1996; Sherwood Lollar *et al.*, 1999; Slater *et al.*, 2000; Vieth *et al.*, 2003).

En este estudio se ha observado, por primera vez, discriminación isotópica en la biodegradación de benzo(a)antraceno y criseno, con un incremento de la $\delta^{13}\text{C}$ de $-27,27$

$\pm 0,52$ a $-23,42 \pm 0,29$ para el benzo(a)antraceno y de $-24,96 \pm 0,34$ a $-23,19 \pm 0,36$ para el criseno. Sin embargo, no se ha producido fraccionamiento isotópico en la degradación de fluoranteno y pireno tras una biodegradación del 92 y 87 % respectivamente. Estos resultados son sorprendentes debido al elevado número de átomos de carbonos que contienen el benzo(a)antraceno y criseno (18). La diferencia respecto a otros estudios radica en las concentraciones estudiadas, por encima de 100 mg kg^{-1} , que están 2 ordenes de magnitud por encima de las encontradas en los estudios realizados hasta la fecha. No obstante, en los primeros 21 días de incubación, no se produjo una biodegradación significativa para el benzo(a)antraceno y criseno, y en cambio la $\delta^{13}\text{C}$ incrementó significativamente (fig. 4.13a). Este hecho, y teniendo en cuenta la dispersión elevada en las concentraciones encontradas en los primeros 21 días (fig. 4.13b), dificulta la interpretación de este resultado en el periodo inicial. No obstante, en el periodo 45-200d si que existió un incremento de la $\delta^{13}\text{C}$ asociado a la biodegradación de los 2 HAPs. Para verificar el proceso de fraccionamiento sería necesario la purificación del benzo(a)antraceno y el criseno de los extractos degradados y verificar de nuevo por IRMS que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ no estén afectados por otros componentes orgánicos. Las $\delta^{13}\text{C}$ obtenidas para el fluoraneno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno no son coincidentes en creosotas de diferente origen (Trust *et al.*, 1998). Estas diferencias pueden producirse en los procesos de destilación química, en las reacciones químicas llevadas a cabo en el proceso de refinado de crudo y derivados y en los procesos de síntesis, pudiéndose alterar las proporciones isotópicas en los componentes de los productos derivados del petróleo (Smallwood *et al.*, 2002) y creosotas (Trust *et al.*, 1998). Por lo tanto, es necesario conocer y comparar las $\delta^{13}\text{C}$ de los componentes encontrados con las de la matriz contaminante original en cada caso.

5.3 RESPUESTA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS A LA BIORREMEDIACIÓN DE HAPS

En la actualidad existe un interés creciente en conocer el comportamiento de las poblaciones microbianas, existentes en ambientes contaminados, así como conocer su respuesta frente a procesos de biorremediación. El estudio de la composición de una comunidad microbiana implicada en la degradación de HAPs y su dinámica en procesos de biorremediación, contribuye a la mejora del conocimiento de los procesos de

biodegradación de HAPs, así como de los métodos de biorremediación. La determinación de los componentes de una comunidad microbiana puede facilitar la construcción y utilización de sondas de DNA u oligonucleótidos para poder determinar de forma más específica los miembros de interés de una comunidad microbiana degradadora de HAPs.

En el periodo inicial (0-45 días) del proceso de biorremediación, la adición de nutrientes causó un aumento importante tanto de la población heterótrofa total, como de la degradadora de HAPs, mientras que, en el suelo bioestimulado sólo con aireación y una humedad óptima (40% capacidad de campo), se observó un incremento menor en el tamaño de las poblaciones microbianas y un retraso en el incremento de la población degradadora de HAPs (fig. 4.18). Estos comportamientos diferentes son consistentes con las cinéticas de degradación de TPH observadas (k_1) durante el periodo inicial (0-45 días). Como puede observarse en la figura 4.9 y tabla 4.9, se detectó una tasa significativamente mayor de biodegradación de los TPH en los tratamientos con adición de nutrientes. Sin embargo, la proporción de la población microbiana degradadora de HAPs aumentó de forma notable en el tratamiento sin nutrientes (2M) entre los 21 y 45 días de incubación, alcanzando el 100% a los 135 días, mientras que en los tratamientos con nutrientes, se observó una proporción de degradadores de HAPs mucho menor, parecida a la del suelo original. Además, al final del experimento, el tratamiento sin nutrientes presentó una población microbiana degradadora de HAPs mayor (1 orden de magnitud) que los tratamientos con nutrientes. Por lo tanto, la presencia mayoritaria de una población microbiana degradadora de HAPs en el tratamiento sin nutrientes, en el periodo tardío (90-200 días), podría estar relacionado con unas tasas de biodegradación más elevadas observadas para los TPH y HAPs recalcitrantes como es el caso del benzo(a)antraceno y criseno.

La diversidad microbiana (H') disminuyó en todos los tratamientos en el periodo de máxima biodegradación (0-45 días), pasando de 1.28 al principio, a 1,18 a los 90 días, y se mantuvo con valores bajos hasta el final de la incubación. En otros trabajos de biorremediación se han descrito tanto incrementos, como disminuciones de la diversidad microbiana durante los procesos de biodegradación. Los resultados aquí presentados estarían de acuerdo con los de Andreoni *et al.*, (2004) donde también observaron una

disminución de la diversidad durante el proceso de biodegradación de un suelo contaminado con HAPs, mientras que Kaplan y Kitts (2004) y Zucchi *et al.*, (2003) encontraron un aumento en la diversidad durante la biorremediación de un suelo contaminado con crudo de petróleo. Además, la dominancia (SI) disminuyó durante el periodo inicial (0-45 días) con tasas de degradación máximas, e incrementó cuando las tasas de biodegradación fueron bajas (90-200 días). En este estudio, la población microbiana ya estaba aclimatada a la contaminación con HAPs, y la disminución de la diversidad observada durante el proceso de biorremediación podría explicarse debido a la predominancia de los microorganismos degradadores de HAPs. De hecho, se ha descrito que los cambios en la biodisponibilidad de los HAPs y el enriquecimiento en las formas más recalcitrantes de HAPs (ambos fenómenos observados en este trabajo) pueden cambiar la estructura de la población microbiana y las interacciones multi-sustrato (Bastiaens *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2000; Lotfabad y Gray 2002; Bodour *et al.*, 2003).

Se han encontrado 13 géneros diferentes a partir de la secuenciación de las bandas recortadas de DGGE, durante la bioestimulación del suelo contaminado con creosota: *Sphingomonas*, *Azospirillum*, *Roseomonas*, *Brevundimonas*, *Trojanella*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Sinorhizobium*, *Erytrobacter*, *Cytophaga* y *Rhodococcus*. Es interesante recalcar que mientras en el tratamiento 2M (sin nutrientes) 9 de las 17 bandas recortadas tuvieron como secuencias de mayor similitud a bacterias no cultivables, en el tratamiento 4M (adición de nutrientes) 17 de las 20 bandas recortadas tuvieron como secuencias más similares a bacterias cultivables (tabla 4.10 y fig. 4.23). Este hecho coincide con otros estudios de ecología microbiana llevados a cabo con muestras de ambientes naturales, con bajo contenido en nutrientes, donde la mayor parte de las secuencias encontradas tienen mayor similitud con microorganismos no cultivables (clones o bandas de DGGE/TGGE) (Head *et al.*, 1998; DeLong 2004).

Durante el periodo inicial de biodegradación en ambos tratamientos de bioestimulación (2M y 4M), los filotipos (bandas de DGGE) dominantes pertenecieron a los géneros de *Sphingomonas* y *Azospirillum* (α -Proteobacteria) (fig. 4.26, tabla 4.10). Además, las únicas 2 bandas coincidentes entre ambos tratamientos pertenecieron a estos géneros (B2-11=B4-12 y B2-20=B4-24). Por lo tanto, teniendo en cuenta que ambos tratamientos de bioestimulación presentaron unas cinéticas de TPH y HAPs similares a lo

largo de los primeros 90 días, estos filotipos podrían estar relacionados con las elevadas tasas de biodegradación observadas para el acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, alquil-antraceno/fenantrenos, fluoranteno y pireno. Estos resultados son consistentes con otros estudios que demuestran que las especies de *Sphingomonas* están asociadas con la biodegradación de los HAPs con tasas de desadsorción más elevadas, tanto en cultivo líquido (Friedrich *et al.*, 2000; Grosser *et al.*, 2000), como en suelos contaminados (Bodour *et al.*, 2003; Leys *et al.*, 2004). Además, Kasai *et al.*, (2001) y Röling *et al.* (2002), observaron la dominancia de la subclase de las α -Proteobacteria. Röling *et al.*, (2002), observaron tal dominancia 6 días después de dopar sedimentos intermareales con crudo de petróleo, y Kasai *et al.* (2001) encontraron dominancia de organismos de la subclase de las α -Proteobacteria en arenas de playa afectadas por un vertido reciente de crudo de petróleo. El filotipo representado por las bandas B2-20 y B4-24, pertenecientes al género *Azospirillum*, puede contribuir a la obtención de formas adicionales de nitrógeno asimilables en el suelo, ya que el género *Azospirillum* es conocido por ser un fijador de nitrógeno aeróbico.

Por otro lado, durante el periodo tardío (90-200 días), la población dominante en el tratamiento 2M perteneció a los géneros (en orden de prevalencia): *Xanthomonas*, *Sphingomonas* y *Cytophaga* (tabla 4.10 y fig. 4.23), los cuales pertenecen a los grupos filogenéticos de las γ -Proteobacterias, α -Proteobacterias y *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (Bacteroidetes), respectivamente (fig. 4.26). En el tratamiento 4M, no se encontraron filotipos pertenecientes al grupo de *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, mientras que por orden de prevalencia se detectaron: γ -Proteobacteria (*Xanthomonas*), α -Proteobacteria (*Sinorhizobium*, *Erytrobacter* y *Roseomonas*) y β -Proteobacteria (*Alcaligenes* y *Achromobacter*). También se encontró una banda (B4-28) perteneciente al género *Rhodococcus*, dentro del grupo filogenético de los Gram positivos ricos en G+C, el cual no fue detectado en el tratamiento 2M.

La mayor parte de las secuencias obtenidas por DGGE fueron similares a las de bacterias Gram negativas y, por lo tanto, podrían indicar la existencia de limitaciones en la extracción de DNA genómico. Sin embargo, el método de extracción utilizado en este estudio fue capaz de extraer DNA genómico de bacterias gram-positivas como

Rhodococcus (en este trabajo), y las cepas de laboratorio de los géneros *Mycobacterium* y *Bacillus*, lo que sugeriría que realmente las bacterias gram-negativas son las dominantes en el suelo contaminado por creosota y también durante el proceso de biorremediación. No obstante, en relación al género *Mycobacterium*, hay que tener en cuenta sus bajas tasas de crecimiento, y que a elevadas concentraciones de HAPs en suelos su diversidad se ve muy reducida (Cheung y Kinkle, 2001). Esta podría ser una de las razones por las cuales no se detecta este género en el suelo. Además, si tenemos en cuenta que la técnica del DGGE solamente puede detectar una población que representa hasta un 0,1% (Muyzer *et al.*, 1993), hubiera sido necesaria la utilización de cebadores específicos de género para descartar de forma definitiva la presencia del mencionado género, así como de otros grupos de microorganismos (Cheung y Kinkle, 2001; Leys *et al.*, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2002).

5.4 ENSAYO DE BIOAUMENTO

En el tratamiento de bioaumentación (6M) no se observaron diferencias con el tratamiento 4M, ni en las tasas de degradación de TPH y HAPs, ni en la estructura de la comunidad (determinada por DGGE y NMP). Como puede observarse en la figura 4.27, solamente una de las bandas visibles del consorcio AM, especializado en la biodegradación de HAPs de 3 y 4 anillos (estudiado en los capítulos I y II), fue detectada (de forma muy leve) en el suelo inoculado. En consecuencia, los microorganismos inoculados no compitieron de forma favorable con la comunidad bacteriana indígena del suelo, aunque fueran originarios de un suelo contaminado con HAPs (Sabaté 1998; Viñas *et al.*, 2002), que el tamaño de cada inoculación fuera equivalente a 10^8 NMP g⁻¹ suelo, o que se hubieran llevado a cabo 5 inoculaciones (tabla 4.4) a lo largo de los 200 días. Además, la estructura de la población bacteriana fue muy similar a la del suelo bioestimulado con nutrientes (4M) durante los primeros 45 días (fig. 4.27) aunque se hubiera inoculado en 2 ocasiones (días 14 y 26). Como se ha comentado anteriormente, en el periodo inicial (0-45 días) se producían las tasas máximas de biodegradación de TPH y HAPs. Por lo tanto, la población microbiana indígena del suelo cambió independientemente de la inoculación de la población alóctona, indicando que el proceso de biodegradación, juntamente con la presencia de nutrientes a elevadas concentraciones (tratamientos 4M-7M) eran los factores más importantes que gobernaban los cambios de las poblaciones microbianas. Durante el periodo final (90-200 días), el proceso de biodegradación se encontraba prácticamente

detenido en la bioestimulación con nutrientes (k_2 próximas a 0 en los tratamientos 4M-7M (tabla 4.9)), momento en el cual se observaron cambios diferentes en las poblaciones del suelo bioestimulado con nutrientes no inoculado (4M) y el inoculado (6M), aunque ninguna de las bandas de DGGE coincidía con las del inóculo.

Como ya se ha comentado en el capítulo II (apartado 1.1.5), existen muchos ejemplos de éxitos (tabla 2.3, capítulo II) y fracasos en la utilización de inóculos microbianos exógenos especializados en la descontaminación de diferentes enclaves contaminados. En general, para que un proceso de bioaumentación funcione es necesario:

a) Que la contaminación sea reciente, que las poblaciones microbianas no estén adaptadas al contaminante (falta de episodios previos y recurrentes de contaminación) y que las poblaciones microbianas degradadoras estén en muy baja proporción o inexistentes, debido a problemas de toxicidad o condiciones ambientales desfavorables. (Alexander, 1999; Vogel, 1996).

b) Que los microorganismos presenten una tolerancia y supervivencia en las condiciones ambientales del suelo receptor y que estén especializados en la biodegradación de la matriz contaminante del suelo. (Alexander, 1999; Vogel, 1996).

En este estudio la población del suelo ya estaba adaptada a la matriz contaminante y además era metabólicamente activable, por lo que la población del inóculo exógeno no ha podido competir favorablemente.

5.5 EFECTO DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN EN LA ECOTOXICIDAD DEL SUELO.

Los diferentes enfoques ecotoxicológicos llevados a cabo durante el proceso de biorremediación mostraron diferentes resultados, a veces contradictorios y otras veces complementarios.

El ensayo de toxicidad aguda de lixiviados del suelo mediante Microtox[®] (*Vibrio fischeri*) mostró una disminución de hasta 3-4 veces la toxicidad, en la bioestimulación con y sin nutrientes, mientras que el suelo no tratado conservó su toxicidad inicial hasta el final

del experimento. De todos modos, las EC₅₀ observadas (20-28% suelo no tratado y 76-83% finales en suelo tratado) fueron bajas o muy bajas comparadas con otros estudios realizados con suelos contaminados con creosota. Kwan y Dutka (1992) definieron una EC₅₀ ≥ 2% (p/v) , para ensayos en fase sòlida de Microtox[®] , como el umbral por encima del cual puede considerarse un suelo como no tóxico. Heard *et al.*, (1993) detectaron mediante Microtox[®] una EC₅₀ inicial de 0.0025% (4 ordenes de magnitud inferior a la EC₅₀ detectada en el suelo) en *shurries* de un suelo contaminado con creosota no envejecida, rica en pentaclorofenol, y tras una biodegradación del 98%, la EC₅₀ encontrada fue de un 4-6% según el tratamiento. Estos valores suponen una EC₅₀ 3 o 4 veces inferior a la EC₅₀ detectada en el suelo del presente estudio. Asimismo, Knoke *et al.* (1999) y Kyle *et al.* (1999) encontraron una EC₅₀ inicial de 0,05, también en suelos contaminados con creosota rica en pentaclorofenol que tras distintos tratamientos de biorremediación, alcanzó valores de 0,1-0,2. En un estudio similar con Microtox[®] en fase sòlida, realizado en un suelo dopado con 6000 mg creosota kg⁻¹ suelo, Phillips *et al.* (1999) no observaron un incremento claro en la EC₅₀ a lo largo del proceso de biorremediación del suelo (con un 50% de biodegradación de TPH y HAPs). Sin embargo, en los estudios citados se ha llevado a cabo el Microtox[®] en fase sòlida, mientras que en el presente estudio se ha filtrado el lixiviado antes de incubarlo con *Vibrio fischeri*, para evitar pérdidas de luz por exceso de particulado. Por lo tanto, las EC₅₀ del suelo estudiado no son comparables en valor con las discutidas anteriormente. No obstante, el Microtox[®] de lixivios del suelo ha sido el test ecotoxicológico que mejor se ha correlacionado con la disminución de los TPH del suelo (r²=0,96). Por lo tanto, a partir de los datos de EC₅₀ de Microtox[®] de lixivios filtrados, no se puede concluir que el suelo sea toxico, pero se puede afirmar que la toxicidad ha disminuido 3-4 veces de forma relativa respecto al estado inicial y en los 2 tipos de bioestimulación.

El test de toxicidad aguda de *Eisenia foetida* (supervivencia durante 14 días de incubación en el suelo) mostró que el proceso de biorremediación no disminuyó la letalidad del suelo inicial (0% de supervivencia), ni a la concentración original, ni diluido un 50% con un suelo control. Además no existió descendencia en los escasos individuos supervivientes (5-10%). Este hecho no es sorprendente, ya que los individuos de *Eisenia foetida* son muy sensibles frente a los HAPs e hidrocarburos del petróleo (Marwood *et al.*, 1998; Knoke *et al.*, 1999), y a veces es necesario trabajar a concentraciones bajas o con

una batería de diluciones muy extensa para determinar cambios en la toxicidad aguda. Phillips *et al.* (1999) también encontraron una mortalidad del 100% antes y después de la biorremediación de un suelo contaminado con creosota, mientras que Charrois *et al.*, (2001), en un interesante estudio realizado con diferentes suelos contaminados con creosota, a unas concentración parecidas a la del suelo aquí estudiado, donde además se llevó a cabo una biorremediación en ensayos de tipo *slurrie*, observaron que cuando la proporción HAPs/EOT (extracto orgánico total) del suelo tratado disminuía de forma significativa (de 0,086 a 0,0092 en el suelo tratado), desaparecía la mortalidad en la población de *Eisenia foetida* (100% mortalidad en el suelo no tratado). En nuestro caso, la proporción de HAPs/EOT disminuye entre 3 y 4 veces (tabla 4.14) durante la biorremediación del suelo, pero la mortalidad de *Eisenia foetida* se mantiene en un 100%. Esta elevada mortalidad no dependió de la acumulación de metabolitos polares derivados del proceso de biodegradación, ya que estos disminuyeron a lo largo del proceso (fig. 4.14-4.15), y además los TPH biodegradados representaron un 78-82% del EOT degradado, lo que confirmaba la no acumulación de fracción polar y sí, en cambio, una mineralización y/o asimilación de los TPH.

Tabla 4.14. Concentraciones y proporciones de EOT, TPH y HAP al principio y el final del proceso de biorremediación.

Tratamiento	EOT ¹ (mg kg ⁻¹ suelo)	TPH ¹ (mg kg ⁻¹ suelo)	EOT/TPH	HAPs ² (mg kg ⁻¹ suelo)	HAPs/EOT	(%)HMW HAPs ³
1M 0d	11900±452	8566±354	1,38 (1,44) ⁴	2656	0,223	14
2M 200d	5017±480	3133±125	1,60 (2,99)	331	0,066	62
4M 200d	6350±427	3733±38	1,70 (3,01)	422	0,066	57

¹Extracto orgánico total (EOT) y TPH calculados por gravimetría. ² Suma de los 16 HAPs prioritarios de la EPA (incluidos los alquil-fenantrenos). ³HMW HAPs, son los HAPs de elevado peso molecular representados por: criseno, benzo(a)antraceno, benzo (b+K)fluoranteno, benzo(a)pireno y indeno (1,2,3 c-d) pireno. El porcentaje (%) expresa la proporción respecto a la suma de los HAPs prioritarios de la EPA (columna anterior). ⁴ Entre paréntesis se indica la proporción MOE/TPH teniendo en cuenta los valores de TPH obtenidos por GC-FID.

El mantenimiento en la letalidad del suelo para *Eisenia foetida* podría ser debido al enriquecimiento relativo observado en los HAPs más pesados (criseno, benzo(a)antraceno,

benzo(b+k)fluorano, benzo(a)pireno, indeno(a,b,c 1-3)pireno), que representan un 57-62% del total de los HAPs prioritarios de la EPA al final del experimento (tabla 4.14).

La disminución en la toxicidad aguda observada en el Microtox[®] de lixiviados, a lo largo del proceso de bioestimulación, podría deberse a la disminución de la fracción polar del suelo (fig. 4.14-15) y a las bajas solubilidades en agua de los HAPs de elevado peso molecular, los cuales no fueron detectables en los lixiviados (límite de detección 0,5 mg HAP kg⁻¹ suelo).

El ensayo FETAX es un test normalizado (E 1439-98. *American Society for testing materials (ASTM)*) que presenta una elevada correlación (proxima al 95%) con estudios calibrados con componentes tóxicos en mamíferos. Combina ensayos de toxicidad aguda (análogo al Microtox[®]), teratogénesis y de inhibición del crecimiento en embriones del Anuro *Xenopus laevis*. El ensayo FETAX con lixiviados del suelo mostró que el suelo no tratado producía malformaciones, principalmente en el intestino y en la notocorda y ojos, mientras que el bioestimulado solamente presentaba malformaciones intestinales. Sin embargo, mostró una elevada letalidad en todos los casos y no se encontraron diferencias en la mortalidad (LD₅₀) de embriones expuestos a diferentes concentraciones de lixiviado del suelo no tratado y bioestimulado. No se encontraron diferencias en la longitud de los embriones vivos entre el suelo tratado, no tratado y los controles. Los resultados obtenidos coinciden con otros estudios FETAX realizados con suelos contaminados con HAPs. Concretamente, Fort *et al.*, (1995 y 1997) demostraron, mediante ensayos FETAX, que los suelos contaminados con HAPs y productos petrolíferos provocaban una elevada mortalidad y también inducían teratogénesis, a diferencia de los pesticidas organoclorados, y los metales pesados, que no se mostraban letales o poco letales, pero sí con un gran potencial teratogénico. Prati *et al.*, (2000) encontraron una disminución en la longitud de los embriones expuestos a suelos contaminados con crudo de petróleo, mientras que en nuestro caso no se han observado diferencias significativas. El lixiviado del suelo estaba formado principalmente por compuestos polares y, por lo tanto, el ensayo de Microtox[®] y el FETAX serían los más adecuados para detectar el efecto de esta fracción durante el proceso de biorremediación.

Para evaluar la genotoxicidad del extracto TPH a lo largo del proceso de biorremediación, se ha puesto a punto y aplicado un nuevo ensayo. Este ensayo se basa en

en la visualización, mediante AFM, del estado estructural de un DNA diana (lineal o circular) que ha sido incubado previamente con un extracto ambiental problema (en este caso el extracto TPH). Solamente con el DNA lineal se pudo observar un comportamiento del tipo dosis-respuesta, en el que a concentraciones crecientes de TPH del suelo, se modificaba o se degradaba con mayor extensión el DNA. Parece pues, que el DNA lineal (*dúplex*) es la forma de DNA en la que se pueden observar mayores transformaciones y por lo tanto sería la más adecuada para aplicar este tipo de ensayo de genotoxicidad con extractos orgánicos ambientales.

No se observaron modificaciones apreciables de estructura en el DNA circular (plásmido pBR322). Probablemente con el DNA circular si que existan interacciones y procesos de modificación de su morfología, pero hay que tener en cuenta que en una mezcla de compuestos se pueden llevar a cabo modificaciones, que a veces pueden ser antagónicas (superenrollamiento y desenrollamiento) en cuanto a su estructura CCC, y por lo tanto el efecto global sería una aparente no modificación al visualizarlos por AFM (Coury *et al.*, 1996; Pietrasanta *et al.*, 2000; Berge *et al.*, 2002;

Se ha comprobado, utilizando DNA lineal, que el extracto de TPH al final del proceso de bioestimulación sin nutrientes, es menos genotóxico en 2 órdenes de magnitud, que el extracto inicial del suelo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este ensayo se han utilizado concentraciones de un 4% de DMSO, que no son capaces de solubilizar el 100% de los componentes del extracto TPH problema.

Por lo tanto, este nuevo ensayo aquí presentado necesita una serie de optimizaciones para ser expuesto como una nueva técnica a escala molecular para estudios de genotoxicidad. Por un lado, la solución de algunos problemas técnicos como la adhesión del DNA a la mica a elevadas concentraciones de DMSO, para poder trabajar de forma más representativa con extractos hidrofóbicos, quizás también buscando otro disolvente. Además hay que tener en cuenta que existen muchos compuestos progenotóxicos que necesitan ser metabolizados por determinadas enzimas como las oxidasas asociadas al citocromo P-450, para convertirse en potentes agentes genotóxicos que forman aductos con las bases del DNA (Ames *et al.*, 1973; Ashby y Tennant, 1988). En nuestro caso concreto también hubiera sido necesaria una incubación previa del extracto orgánico con fracción

microsomal hepática de rata (fracción S9) para su aplicación como ensayo de genotoxicidad a mamíferos. No obstante, en este último, debería ponerse a punto un sistema de separación eficiente para obtener el extracto orgánico modificado sin fracción microsomal proteica y, de este modo, evitar la presencia de artefactos en la observación posterior por AFM.

En resumen, con los datos obtenidos en los distintos ensayos de ecotoxicidad llevados a cabo, es importante destacar que el ensayo de Microtox[®] de lixiviados ha sido el único que ha mostrado una disminución clara de la toxicidad aguda, mientras que en los ensayos de FETAX y *Eisenia foetida* se han encontrado elevadas mortalidades que no han disminuido con el tratamiento. En el ensayo FETAX se ha detectado una disminución de la teratogeneicidad, mientras que no ha existido inhibición del crecimiento en los embriones vivos. En el ensayo de genotoxicidad potencial (DNA incubado con extracto TPH y visualizado por AFM) se ha detectado una disminución significativa de la genotoxicidad potencial en el suelo tratado. Teniendo en cuenta la disparidad de resultados obtenidos en los distintos ensayos de ecotoxicidad, parece razonable recomendar la utilización de diferentes ensayos, que engloben diferentes organismos vivos o estrategias in vitro, para un correcto seguimiento de la ecotoxicidad de un suelo durante un proceso de biorremediación

5.6 APLICACIÓN FUTURA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO

Se ha comprobado que la población microbiana degradadora de HAPs del suelo es activa o metabólicamente activable en condiciones óptimas de humedad y aireación. Asimismo, se ha demostrado que la creosota presente en el suelo es biodegradable, a nivel de los TPH y HAPs de 3 y 4 anillos, hasta alcanzar concentraciones que en su mayoría son aceptables para la legislación (Real Decreto 9/2005 y normativa Holandesa). A partir de estos resultados, conjuntamente con la Junta de Residus de la Generalitat de Catalunya y una empresa privada de ingeniería, se ha decidido llevar a cabo la biorremediación del suelo a escala piloto, mediante una biopila dinámica, en el mismo emplazamiento contaminado, que supondrá una aplicación pionera de esta tecnología en nuestro país.

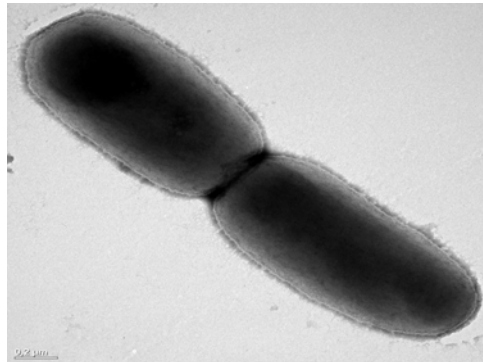
6 CONCLUSIONES

1. Se han aplicado los ensayos de tratabilidad, presentados en el capítulo III, a un suelo contaminado con creosota y se ha seguido un proceso de biorremediación a nivel fisicoquímico, microbiológico y ecotoxicológico.
2. El suelo contaminado con creosota contiene una importante población microbiana degradadora de HAPs y metabólicamente muy activa.
3. La información proporcionada en la primera fase de los ensayos de tratabilidad se ha visto confirmada con los resultados obtenidos en la segunda fase del protocolo, lo que valida la utilización de esta primera fase para dar una respuesta rápida a la posible aplicación de una tecnología de biorremediación a un suelo contaminado.
4. La aireación y la humedad a nivel del 40% de la capacidad de campo han sido los factores claves para alcanzar una importante biodegradación de los TPH y de los HAPs de 3 y 4 anillos, por parte de la población autóctona del suelo.
5. La adición de nutrientes inorgánicos aumenta las tasas de biodegradación de los TPH y de los HAPs de 3 y 4 anillos durante el periodo inicial (0-45 días), pero disminuye e incluso detiene la biodegradación de los TPH, del benzo(a)antraceno y del criseno, en el periodo tardío (90-200 días). En esta última fase la población degradadora de HAPs presenta valores inferiores a los que presentan los tratamientos sin nutrientes.
6. La adición de biotensioactivos y de octoato de hierro no han mejorado el rendimiento alcanzado por el tratamiento con aireación y humedad óptima.
7. El bioaumentación llevado a cabo con la inoculación del consorcio AM no ha representado una mejora de la biodegradación alcanzada por las poblaciones microbianas autóctonas.

8. En todos los tratamientos de bioestimulación se ha observado una cinética de degradación bifásica, caracterizada por presentar un periodo inicial con elevadas tasas de biodegradación seguido de un periodo tardío con bajas tasas de biodegradación de los TPH y de los HAPs de 3 y 4 anillos.
9. La disminución de la actividad biodegradadora observada en el periodo tardío, tanto a nivel de los TPH como de los HAPs, está relacionada con una disminución de la biodisponibilidad de los HAPs de elevado peso molecular para el tratamiento 2M y con la biodisponibilidad y el exceso de nutrientes para los tratamientos 4M-7M.
10. Durante el periodo inicial de bioestimulación correspondiente a la etapa de máxima biodegradación, la diversidad de la comunidad microbiana disminuye. El análisis por DGGE combinado con ACP muestra que la estructura y la composición de las comunidades microbianas cambia de forma distinta en ambos tratamientos, a lo largo de todo el proceso de biodegradación.
11. Únicamente se han encontrado 2 bandas comunes de DGGE entre ambos tratamientos de bioestimulación, pertenecientes a las α -Proteobacterias (géneros *Sphingomonas* y *Azospirillum*), que podrían estar relacionadas con la biodegradación de los HAPs de tres anillos y con la del fluoranteno y del pireno, durante las fases iniciales más rápidas de biodegradación.
12. Las subclases de las α - y γ -Proteobacterias son dominantes durante las fases iniciales de máxima biodegradación, y también en el periodo tardío, conjuntamente con filotipos pertenecientes al grupo CFB en la bioestimulación sin nutrientes y con las β -Proteobacterias en la bioestimulación con nutrientes.
13. El grupo de las CFB podría estar relacionado con procesos de biodegradación del periodo tardío, al correlacionarse significativamente con las cinéticas de degradación del benzo(a)antraceno y del criseno, en el tratamiento sin nutrientes.

14. La estructura de la comunidad microbiana, así como su capacidad degradadora, se ha visto afectada durante el proceso de biorremediación por la adición de nutrientes inorgánicos, interacciones interespecíficas, cambios en la biodisponibilidad de los HAPs y enriquecimiento de HAPs recalcitrantes de elevado peso molecular, como el benzo(a)antraceno y el criseno
15. Al inicio del proceso, el suelo presentaba compuestos polares resultado del metabolismo de distintos HAPs. La bioestimulación ha supuesto su desaparición gradual como resultado de la colaboración metabólica de distintas poblaciones microbianas activadas en el proceso.
16. El proceso de biorremediación disminuye la toxicidad y la teratogeneidad de los lixiviados evaluados por los ensayos de Microtox[®] y FETAX, pero no disminuye la letalidad del suelo entero frente a *Eisenia foetida*.
17. Se ha iniciado la puesta a punto y se ha aplicado, por primera vez a muestras ambientales, la técnica de AFM para la evaluación de la genotoxicidad. Los resultados preliminares muestran una disminución de la genotoxicidad potencial de los TPH en el suelo bioestimulado.

Bibliografía



*“Los hechos no dejan de existir sólo
porque sean ignorados”*

Thomas Henry Huxley (Naturalista)

-
- Abalos, A., A. Pinazo, R. Infante, M. Casals, F. García y M. A. Manresa.** 2001 Physico chemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* **17**:1367-1371.
- Abalos, A., M. Viñas, J. Sabaté, M. A. Manresa y A. M. Solanas.** 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas Aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. **15**:249-260.
- Abbondanzi, F., N. Calace, T. Campisi, A. Iacondini, M. Leoni, B. M. Petronio y M. Pietroletti.** 2004 An integrated study to evaluate the paper mill sludge utilisation for metal-contaminated soil remediation. En: V.S. Magar y M.E. Kelley (Eds), *In Situ and On-Site Bioremediation—2003, Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, Orlando, FL, June 2003*, Battelle Press, Columbus, OH, USA paper L-05.
- Abraham, W. R., B. Nogales, P. N. Golyshin, D. H. Pieper, y K. N. Timmis.** 2002. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr. Opin. Microb.* **5**:246-253.
- Aceves, M., J. Grimalt, J. Albaigés, F. Broto, L. Comellas y M. Grassiot.** 1988. Analysis of hydrocarbons in aquatic sediments. II. Evaluation of common preparative procedures for petroleum and chlorinated hydrocarbons. *J. Chromat.* **436** :503-509.
- Adamson, A. y A. Gast.** 1997. Emulsions. Foams and aerosols. *Physical Chemistry of Surfaces*. Wiley and Sons. New York. pp. 500-528.
- Albaigés, J., J. Algaba, E. Clavell y J. O. Grimalt.** 1986 Petroleum geochemistry of the Tarragona Basin (Spanish Mediterranean off-Shore). *Org. Geochem.* **10** :441-450.
- Alexander, M.** 1977. Introduction into soil microbiology. John Wiley & Sons. New York.
- Alexander, M.** 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Env. Sci Technol.* **29**:2713-2717
- Alexander, M.** 1999. Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego
- Alexander, M.** 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Env. Sci. Technol.* **34**:4259-4265.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers y D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Microb. Meth.* **215**: 403-410.
-

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. Schäffer, J. Zang, Z. Zang, W. Miller y D. L. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid. Res.* **25**:3389-3402.
- Alvey, S. y D. E. Crowley.** 1996. Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. *Env. Sci. Technol.* **30**:1596-1603.
- Amann, R. I, W. Ludwig y K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Rev.* **59**: 143-169.
- American Society for Testing and Materials (ASTM)** 1995. Standard Guide for Conducting a Laboratory Soil Toxicity Test with Lumbricid Earthworm *Eisenia Foetida*, Standard Designation E 1676-95
- American Society for Testing and Materials (ASTM).** 1997. Standard Practice for conducting Early Seedling Growth Test. ASTM 1598-94. En *Annual Book of Standards. Water and Environmental Technology.* Vol 11.05.
- Ames, B. N.** 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. En *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection* Ed. Hollaender, A. New York, NY: Plenum. pp. 267-282
- Ames, B. N., F. D. Lee, y W. E. Durston.** 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 782-786.
- Ames, B; W. E. Durston, E. Yamasaki y F. D. Lee.** 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**:2281-2285
- Ames, B. N., J. McCann y E. Yamasaki.** 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian- microsome mutagenicity test. *Mut. Res.* **31**:347-364.
- Andreoni, V., G. Baggi, M. Colombo, L. Cavalca, M. Zangrossi y S. Bernasconi.** 1998. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by a specialised organism and by indigenous soil microflora: bioaugmentation and self-mediated ability for soil restoration. *Lett Appl. Microbiol.* **27**: 86-92.
- Andreoni, V., L. Cavalca, M. A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell' Amico, M. Colombo y L. Gianfreda.** 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* **57**: 401-412.

-
- April, W., R. C. Sims, J. L. Sims y J. E. Matthews.** 1990. Assessing detoxification and degradation of wood preserving and petroleum wastes in contaminated soil. *Waste. Manag. Res.* **8**:45-65
- Ashby, J. y R. W. Tenant.** Chemical structure, salmonella mitagenecity and extent of carcinogenecity as indicators of fenotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by us nci/ntp. *Mutation. Res.* **204**:17-115.
- Atagana, H. I., R. J. Haynes y F. M. Wallis.** 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* **14**: 297–307
- Atagana, H. I.** 2004. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology.* **96**:510-520.
- Atlas, R. M. y R. Bartha.** 1997. *Microbial Ecology, fundamentals and applications.* The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood City, CA.
- Azur Environmental.** 1995. Microtox[®] Basic Solid-Phase Test (Basic SPT), Carlsbad, CA, USA.
- Baker, K. H.** 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. En: Bioremediation. Baker, K. H. y D. S. Herson. (Eds). New York. McGraw-Hill. pp. 203-259
- Bantle, J. A., J. N. Dumont, R. A. Finch, G. Linder y D. J. Fort.** 1991. Atlas of Abnormalities : a guide for the performance of FETAX. Stillwater, Oklahoma. State Publications
- Bantle, J.A., R. A. Finch, D. T. Burton, D. J. Fort, D. A. Dawson, G. Linder, J. R. Rayburn, M. Hull, M. Kumsher-King, A. M. Gaudet-Hull y S. D. Turley.** 1996. FETAX interlaboratory validation study: Phase III . Part 1 testing. *Journal of Applied Toxicology* **16** :517-528.
- Barbeau, C., L. Deschenes, D. Karamanev, Y. Comeau y R. Samson.** 1997. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:745-752.
- Barkay, T., S. Navon-Venezia, E. Z. Ron y E. Rosenberg.** 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2697-2702.
- Barker, J. F. y P. Fritz.** 1981. Carbon isotope fractionation during microbial methane oxidation. *Nature.* **273**:289-291.
-

- Barles, R. W., C. G. Daughton y P. H. Hsieh.** 1979. Accelerated parathion degradation in soil inoculated with acclimated bacteria under field conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **8**:647-660.
- Barns, S. M., S. L. Takala y C. R. Kuske.** 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1731-1737.
- 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.
- Bayona, J. M., J. Albaigés, A. M. Solanas, R. Parés, P. Garrigues y M. Ewald.** 1986. Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **23**:289-303.
- Beaudet, R., M. J. Levesque, R. Villemur, M. Lanthier, M. Chenier, F. Lepine y J. G. Bisailon.** 1998. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:135-141.
- Bekaert, C., C. Rast, V. Ferrier, A. Bispo, M. J. Jourdain, y P. Vasseur.** 1999. Use of in vitro (Ames and Mutatox tests) and in vivo (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Org. Geochem.* **30**:953-962.
- Benton, M. J., M. L. Malott, S. S. Knight, C. M. Coopers y W. H. Benson.** 1995 Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria, *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:411-414
- Berge, T., N. S. Jemkins, R. B. Hopkirk, M. J. Waring, J. M. Edwardson y R. M. Henderson.** 2002. Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy. *Nucl. Acid. Res.* **30**:2980-2986
- Binnig, G., C. F. Quate y C. Gerber.** 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**:57-61.
- Blumer, M.** 1976. Polycyclic aromatic compounds in Nature. *Scientific American.* 234:35-45.
- Bodour, A. A., J. M. Wang, M. L. Brusseau y R. M. Maier.** 2003. Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environ. Microbiol.* **5**:888-895.

- Boon, N., J. Goris, P. De Vos, W. Verstraete y E. M. Top.** 2000. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2906-2913.
- Boon, N., W. De Windt, W. Verstraete y E. M. Top.** 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol.Ecol.* **39**:101-112.
- Boonchan, S., M. L. Britz y G. A. Stanley.** 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1007-1019.
- Borneff, J., F. Selenca, H. Knute y A. Maximos.** 1968. Experimental studies on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. *Environ. Res.* **2**:22-24.
- Bosma, T. N. P., P. J. M. Middeldorp, G. Schraa y A. J. B. Zender.** 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Env. Sci. Technol.* **31**:248-252.
- Bossert, I. D. y R. Bartha.** 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. En R. M. Atlas, (ed), *Petroleum microbiology*. MacMillan Publishing Co. New York. pp. 453-473
- Bouchez, M., B. Blanchet y J. P. Vandecasteele.** 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:156-164.
- Bouchez, M., D. Blanchet, V. Bardin, F. Haeseler y J. P. Vandecasteele.** 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation.* **10**:429-435.
- Bourquin, A. W., D. C. Mosteller, R. L. Olsen, M. J. Smith y K. F. Reardon.** 1997. Aerobic bioremediation of TCE-contaminated groundwater: bioaugmentation with *Burkholderia cepacia* PR1301. *In Situ and On-Site Bioremediation, Papers from the International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*, Vol. 4, New Orleans.
- Boyd, S. A. y S. Sun.** 1990. Residual petroleum and polychlorobiphenyl oils as sorptive phases for organic contaminants in soils. *Environ. Sci. Technol.* **24**:142-144
- Braddock, J. F., M. L. Ruth, P. H. Catterall, J. L. Walworth y K. A. McCarthynd.** 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils: Implications for nutrient-amended bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **31**:2078-2084.

- Braud-Grasset, F., S. Baud-Grasset, S. I. Safferman.** 1993. Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere* **26**: 1365–1374.
- Breedveld, G. D. y M. Sparrevik.** 2001. Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation* **11**:391-399.
- Britton, L. N.** 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. En: D.T.Gibson (Ed.) *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker. New York. 89-129.
- Bruce, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike y D. A. Ritchie.** 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3413-3416.
- Budzinski, H., N. Raymond, T. Nadalig, M. Gilewicz, P. Garrigues, J. C. Bertr y P. Caumette.** 1998. Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org.. Geochem.* **28**:337-348.
- Bulich, A.A. y D. L. Isenberg.** 1981. Use of luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. *ISA Transactions* **20**:29–33.
- Bumpus, J. A., G. L. White y R. H. Heflich.** 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science.* 228:1434-1436.
- Bumpus, J. A.** 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:154-158.
- Bundy, J.G., G.I. Paton y C. D. Campbell.** 2002. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* **92** :276-288..
- Campos, R., I. Ramos, J. O. Grimalt y J. Albaigés.** 1988. Compuestos triterpénicos y esteránicos en los crudos de petróleo del campo de Varadero. *Quimindustria* 88 Química Aplicada. Vol.1., Centro de Investigaciones Químicas, Havana. 322A-322D.
- Cardinal, L. J. y M. K. Stenstrom.** 1991. Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation.* **63**:950-957.
- Carmichael, L. M y F. K. Pfender.** 1997. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation* **8**:1-13.
- Casellas, M., P. Fernández, J. M. Bayona y A. M. Solanas.** 1995. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere* **30**:725-740.

- Casellas, M., M. Grifoll, J. M. Bayona y A. M. Solanas.** 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:819-826.
- Casellas, M., M. Grifoll, J. Sabate y A. M. Solanas.** 1998. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* **44**:734-742.
- Cattaneo, M., V. Masson, y C. W. Greer.** 1997. The influence of the moisture on microbial transport, survival and 2,4-D biodegradation with a genetic marked *Burkholderia cepacia* in unsaturated soil columns. *Biodegradation.* **8**:87-96.
- Cerda H, B. V. Hofsten y K. J. Johanson.** 1993. Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. En Leonardi M, J. J. Belliaro y J. J. Raffi (Eds): Recent advances of new methods of detection of irradiated food. Proceedings of the workshop, Ancona, 24–26 September 1991. Luxembourg: Commission of the European Communities, EUR-14315. pp 401–405.
- Cerniglia, C. E.** 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In R.M. Atlas, editor, *Petroleum Microbiology.* p. 99-128. Macmillan Publishing Co. New York.
- Cerniglia, C. E., G. L. White y R. H. Heflich.** 1985. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hidrocarbons. *Arch. Microbiol.* **143**:105-110.
- Cerniglia, C. E. y M. A. Heitkamp.** 1989. Microbial of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. En U.Varanasi (Ed.) *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment.* CRC Press, Inc, Boca Raton.Florida. pp. 1-45.
- Cerniglia, C. E., J. B. Sutherland y S. A. Crow.** 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. En : G. Winkelmann (Ed.) *Microbial degradation of natural products..* VCH. Weinheim. pp. 193-217.
- Cerniglia, C. E.** 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hidrocarbons: past, present and futire applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**:324-333.
- Chaineau, C., H, Morel, y J. L. Oudot.** 1995. Microbial degradation in soil microcosmos of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Env. Sci. Technol.* **29**:1615-1621
- Chaineau, C. H.; C. Yepremian, J. F. Vidalie, J. Ducreux y D. Ballerini.** 2003. Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, and Soil Pollution.* **144**:419-440.

- Charrois, J. W. A., McGill, W. B. y K. L. Froese.** 2001. Acute ecotoxicity of creosote-contaminated soils to *Eisenia foetida* : a survival-based approach. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:2594-2603
- Cheung, P. Y. y B. K. Kinkle.** 2001. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2222-2229.
- Chhatre, S., H. Purohit, R. Shanker y P. Khanna.** 1996. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. *Water Sci. Technol* **34**:187-193.
- Christofi, N. y I. B. Ivshina.** 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation *Journal of Applied Microbiology.* **93**:915–929
- Churchill, S. A., J. P. Harper y P. F. Churchill.** 1999. Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:549-552.
- Clark, C. G. y S. J. L. Wright.** 1970. Detoxification of isopropyl N-phenylcarbamate (IPC) and isopropyl N-3-chlorophenylcarbamate (CIPC) in soil and isolation of IPC-metabolizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **2**:19-27.
- Clark, R. C. y D. W. Brown.** 1977. Petroleum: properties and analyses in biotic and abiotic systems. En : D. C. Malins (Ed.), *Effects of Petroleum on arctic and subarctic environments and organisms.* Academic Press Inc. London. pp. 1-75.
- Clark, R. B.** 1989. Marine pollution. Oxford Science Publications. Clarendon Press. Oxford.
- Clayton, J. R., J. R. Payne y J. S. Farlow.** 1992. *Oil spill dispersants: mechanisms of action and laboratory tests.* CRC Press Inc. Boca Raton, FA.
- Clegg, C. D., D. L. Lovell-Roger y P. J. Hobbs.** 2003. The impact of grassland management regime on the community structure of selected bacterial groups in soils. *FEMS-Microbiol. Ecol.* **43**:263-270.
- Clements, W. H., J. T. Oris y T. E. Wissing.** 1994. Accumulation and food chain transfer of fluoranthene and benzo(a)pyrene in *Chironomus riparus* and *Lepomis macrochirus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**:261-266.
- Clutter, D., R. L. Petrakis, R. L. Stenger y R. K. Jensen.** 1972. Nuclear magnetic resonance spectrometry of petroleum fractions. *Anal. Chem.* **44**:1395-1405.
- Coenye, T y P. Vandamme.** 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* **5**:719-729.

- Cole, S. T. y I. S. Girons.** 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiol.rev.* **14**:139-160.
- Coleman, D. D., J. B. Risatti y M. Schoell.** 1981. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes by methane-oxidizing bacteria. *Geo. Cosm. Acta.* **45**:1033-1037.
- Colores, G. M., R. E. Macur, D. M. Ward y W. P. Inskeep.** 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Env. Microbiol.* **66**:2959-2964.
- Colton, R. J., D. R. Baselt, Y. F. Dufrêne, Green J-B.D., y G. U. Lee.** 1997. Scanning probe microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**:370-377.
- Comeau, Y., C. W. Greer y R. Samson.** 1993. Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:681-687.
- Cook, N. H. y P. G. Wells.** 1996. Toxicity of Halifax harbour sediments: an evaluation of the Microtox Solid Phase Test. *Water Qual. Res. J. Can.* **31**:673-708.
- Cotelle, S. y J. F. Férard.** 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Env. Mol. Mut.* **34**:246-255
- Coury, J. E., L. McFail-Isom, L. D. Williams y L. A. Bottomley.** 1996. A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: Scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:12283-12286
- Craig, H.** 1975. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geo. Cosm. Acta.* **12**:133-135.
- Crawford, R. L. y W. W. Mohn.** 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. *Enzyme Microb. Technol.* **7**:617-620.
- Cubero, J. y J. H. Graham.** 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1257-1264.
- Czyz, A., H. Szpilewska, R. Dutkiewicz, W. Kowalska, A. Biniewska-Godlewska, y G. Wegrzyn, G.** 2002. Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments. *Mut. Res.* **519**:67-74.
- Daane, L. L. y M. M. Häggblom.** 1999. Earthworm egg capsules as vectors for the environmental introduction of biodegradative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2376-2381.

- Dagley, S.** 1981. New perspectives in aromatic catabolism. In T. Leisinger, A. M. Cook, R. Hütter y J. Nüesch, editors, *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*. Academic Press. New York. pp. 181-186
- Davis, J. B. y R. L. Raymond.** 1961. Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a *Nocardia* during growth on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol.* **9**:383-388.
- Debus, R. y K. Hund.** 1997. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination. Part B: Ecotoxicological analysis in soil and soil extracts. *Chemosphere* **35**:238-261.
- Dejonghe, W., N. Boon, D. Seghers, E. M. Top, y W. Verstraete.** 2001. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Env. Microbiol.* **3**:649-657.
- Dejonghe, W., E. Berteloot, J. Goris, N. Boon, K. Crul, S. Maertens, M. Hofte, P. De Vos, W. Verstraete y E. M. Top.** 2003. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1532-1541.
- Delong, E. F.** 2004. Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environ Microbiol.* **6**:875-878.
- DeLonge, E. F., G. S. Wickham y N. R. Pace.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science.* 243:1360-1363.
- Dennis, R. M., D. Dworkin, y A. J. Zupko.** 1994. Soil-Washing processes for site remediation. En D. L. Wise y D. J. Trantolo (Ed), *Remediation of Hazardous waste contaminated soils*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 745-778.
- Desai, J. D. y I. M. Banat.** 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **61**:47-70.
- Dèziel, E., F. Lépine, D. Dennie, D. Boismenu, O. Mamer y R. Villemur.** 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixture of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biophys. Biochim. Acta.* **1440**:244-252.
- Dibble, J. T. y R. Bartha.** 1976. Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**:544-550.
- Dibble, J. R. y R. Bartha.** 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:729-739.

-
- Dorn, P.B., T. E. Vipond, J. P. Salanitro y H. L. Wisniewski.** 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox_, and plants. *Chemosphere* **37**:845–860
- Dorn, P. B. y J. P. Salanitro.** 2000. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation, *Chemosphere* **40**:419–426
- Dott, W., D. Feidieker, M. Steiof, P. M. Beckerc y P. Ktimpfera** 1995. Comparison of Ex situ and In situ Techniques for Bioremediation of Hydrocarbon-polluted Soils. Int. Biodet. Biodegrad. 301-306
- Dumont, J., T. W. Schultz, M. Buchanan y G. Kao.** 1983. Frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)- a short-term assay applicable to complex environmental mixtures. En: Waters. S., C. Claxton, N. Chernoff, (Eds.), Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures. Plenum Press, NY. pp. 393-405.
- Dumont, J. N., J. A. Bantle y G. Linder.** 2003. The history and development of FETAX (ASTM Standard Guide, E-1439 on conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus). ASTM Special Technical Publication STP **1443**:3-22.
- Dunbar, J., S. White y L. Forney.** 1997. Genetic Diversity through the Looking Glass: Effect of Enrichment Bias. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1326-1331.
- Dunbar, J., S. Takala, S. M. Barns, J. A. Davis y C. R. Kuske.** 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1662-1669.
- Edwards, U., T. Rogal, H. Blöker, M. Emde y E. C. Böttger.** 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes-characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. *Nucl. Acid. Res.* **17**:7843-7853.
- Efroymsen, R. A. y M. Alexander.** 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Env. Microbiol.* **57**:1441-1447.
- Efroymsen, R. A. y M. Alexander.** 1995. Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* **29**:515-521
- El Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Verstraete y E. M. Top.** 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:982-988.:
-

- Entry, J. A., K. G. Matson y W. H. Emmingham.** 1993. The influence of nitrogen on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in grassland soils. *Biol. Fertil. Soils.* **16:**179-182.
- Environment Canada EPS 1/RM/37.** 1999 Biological Test Method: Test for measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna Minor*. Method Development and Application Section. Environmental Technology Centre. pp. 98
- Environmental Science and Technology, Editorial.** 2000. Cleaning up with heat treatment. *Env. Sci. Technol.* **34:**338-339A.
- EPA.** 1996. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4225 Seedling Emergence, Tier II. EPA 712-C-96-363
- EPA.** 2004. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; and EPA 510-R-04-002). EPA documents.
- Erickson, D. C., R. C. Loehr y E. F. Neuhauser.** 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water. Res.* **27:**911-919.
- Eriksson, M., A. Swartling y G. Dalhammar.** 1998. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50:**129-134.
- Eriksson, M., G. Dalhammar y A. K. Borg-Karlson.** 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53:**619-626.
- Ertl, S., F. Seibel, L. Eichinger, F. H. Frimmel y A. Kettrup.** 1996. Determination of the ¹³C/¹²C isotope ratio of organic compounds for the biological degradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE). *Act. Hydrochim. Hydrobiol.* **24:**16-21.
- Evans, F. F., A. S. Rosado, G. V. Sebastian, R. Casella, P. L. Machado, C. Holmstrom, S. Kjelleberg, J. D. van Elsas y L. Seldin.** 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49:**295-305.
- Exner J. H.** 1994. Bioremediation: Field Experience. Lewis publishers. Boca ratón, FL, USA.
- Fan, C. Y. y N. Tafuri.** 1994. Engineering application of biooxidation processes for treating petroleum contaminated soil. En D. L. Wise y D. J. Trantolo (Ed.). *Remediation of hazardous waste contaminated soils*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 373-401

- Feng, X., O. Li Tse y A. Ogram.** 1997. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp strain CF06. *Appl. Env. Microbiol.* **63**: 1332-1337.
- Ferguson, R. L., E. N. Buckley y A. V. Palumbo.** 1984. Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:49-55.
- Fernández, P., M. Grifoll, A. M. Solanas, J. M. Bayona y J. Albaigés.** 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.* **26**:817-829.
- Fischer, S. G. y L. S. Lerman.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* **16**:191-200.
- Florence, A. T. y D. Atwood.** 1998. Emulsions. *Physico-Chemical Principles of Pharmacy.* Palgrave. New York. pp. 252-307.
- Foght, J. M., D. L. Gutnick y D. W. S. Westlake.** 1989. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:36-42.
- Foght, J. M., P. M. Fedorak y D. W. S. Westlake.** 1990. Mineralization of [14C]hexadecane and [14C]phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.* **36**:169-175.
- Foght, J. M., K. Semple, C. Gauthier, D. W. S. Westlake, S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang y M. Fingas.** 1998. Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**:322-330.
- Foght, J., K. Semple, C. Gauthier, D. W. S. Westlake, S. Blenkinsopp, G. Sergy, Z. Wang y M. Fingas.** 1999. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. *Environ. Technol.* **20**:839-849.
- Folsom, P.** 1991. A Plant Bioassay for Assessing Plant Uptake of Contaminants from Freshwater Soils or Dredged Material. En Gorsuch J.W, W. R. Lower, W. Wang, y M. A. Lewis (Eds.) *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume.* ASTM STP 1115. American Society for Testing and Materials (ASTM). pp. 172-177
- Fort, D. J., E. L. Stover y D. Norton.** 1995. Ecological hazard assessment of aqueous soil extracts using FETAX. *J. Appl. Toxicol.* **15**:183-191.

- Fort, D. J. y E. L. Stover.** 1997. Significance of experimental design in evaluating ecological hazards of sediments/soils to amphibian species. ASTM Special Technical Publication STP 1317 pp.427-442.
- Fort, D. J., D. W. McLaughlin y J. G. Burkhart.** 2003. The FETAX of today - and tomorrow. ASTM Special Technical Publication STP 1443:23-45.
- Friedrich, M., R. J. Grosser, E. A. Kern, W. P. Inskeep y D. M. Ward.** 2000. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2703-2710.
- Friedrich, U., K. Prior, K. Altendorf y A. Lipski.** 2002. High bacterial diversity of a waste gas degrading community in an industrial biofilter. *Environ. Microbiol.* **4**:721-734.
- Fritz, I.** 2000. Bakterioplankton im Westlichen Mittelmeer. Analyse der taxonomischen Struktur freilebender und partikelgebundener bakterieller Lebensgemeinschaften mit mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden. Thesis. Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig, Braunschweig, Germany.
- Fromin, N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno y P. Rossi.** 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* **4**:634-643.
- Frontera, S. R., F. D. Bost, T. J. McDonald y P. J. Morris.** 2002. Aerobic biodegradation of hopanes and other biomarkers by crude oil-degrading enrichment cultures. *Environ. Sci. Technol.* **36**:4585-4592.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum y A. A. Davis.** 1988. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1426-1429.
- Fujii, K., N. Urano, H. Ushio, M. Satomi y S. Kimura.** 2001. *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of sewage-treatment plant in Tokyo. *Int. J. syst. evol. microbiol.* **51**:603-610.
- Garland, J. L. y A. L. Mills.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2351-2359.

- Gee, G. W and J. W. Bauder.** 1986. Particle-size analysis. Methods of soil analysis. part 1. Physical and mineralogical methods. American Society of Agronomy, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis. pp. 383-411.
- Genouw, G., F. De Naeyer, P. Van Meenen, H. Van deWerf, W, De Nijs y W. Verstraete.** 1994. Degradation of oil sludge by landfarming- a case study at the Ghent harbor. *Biodegradation*. **5**:37-46
- Gentry, T. J., D. T. Newby, K. L. Josephson y I. L. Pepper.** 2001. Soil microbial population dynamics following bioaugmentation with a 3-chlorobenzoate-degrading bacterial culture. Bioaugmentation effects on soil microorganisms. *Biodegradation*. **12**:349-357.
- Ghosh, U., A. S. Weber, J. N. Jensen y J. R. Smith.** 2000. Relationship between PCB desorption equilibrium, kinetics and availability during land biotreatment. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2542-2548
- Ghoshal, S. y R. C. Luthy.** 1996. Bioavailability of hydrophobic organic compounds from nonaqueous phase liquids: The biodegradation of naphthalene from coal tar. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**:1894-1900
- Gibson, D. T. y V. Subramanian.** 1984. Microbial degradation of aromatic compounds. In: Gibson DT (Ed), *Microbial Degradation of Organica compounds*. Marcel Dekker, New York.
- Gilewicz, M, T. Ni'matuzahroh, T. Nadalig, H. Budzinski, P. Doumenq, V. Michotey y J. E. Bertr.** 1997. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:528-533.
- Godoy, F, M. Vancanneyt, M. Martinez, A. Steinbuchel, J. Swings y B. H. A. Rhem.** 2003. *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol- degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol.* **52**:473-477.
- Gomes, N. C. M., H. Heuer, J. Schonfeld, R. Costa, L. Mendonca-Hagler y K. Smalla.** 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil.* **232**:167-180.
- Gray, J. R., G. Lacrampe-Couloume, D. Gandhi, K. M. Scow, R. D. Wilson, D. M. Mackay, y B. S. Lollar.** 2002. Carbon and Hydrogen Isotopic Fractionation during Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether. *Env. Sci. Technol.* **36**:1931-1938.

- Greene, J.C., C. L. Bartels, W. J. Warren-Hicks, B. R. Parkhurst, G. L. Linder, S. A. Peterson y W. E. Miller.** 1988. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA/600/3-88/029. US EPA, Corvallis, OR.
- Greene, E. A., J. G. Kay, K. Jaber, L. G. Stehmeier y G. Voordouw.** 2000. Composition of Soil Microbial Communities Enriched on a Mixture of Aromatic Hydrocarbons 8797. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5282-5289.
- Griebler, C., M. Safinowski, A. Vieth, H.H. Richnow, R. U. Meckenstock.** 2004. Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **38**:617-631
- Griest, W. H., B. A. Tomkins, J. L. Epler y T. K. Rao.** 1979. Characterization of multialkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in energy-related materials. En P. W. Jones y P. Leber (Eds), *Carcinogenesis, Vol. 4*. Raven-Press. New York. pp.395-409.
- Grifoll, M., A. M. Solanas y J. M. Bayona.** 1990. Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with Salmonella/microsome test. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* **19**:175-184.
- Grifoll, M., A. M. Solanas y J. M. Bayona.** 1992a. Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of the Besos and Llobregat rivers (Barcelona, Spain). *Arch. Env. Cont. Toxicol.* **23**:19-25.
- Grifoll, M., M. Casellas, J. M. Bayona y A. M. Solanas.** 1992b. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2910-2917.
- Grifoll, M, S. A. Selifonov, C. V. Gatlin y P. J. Chapman.** 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3711-3723.
- Grigg, B. C., N. A. Assaf y R. F. Turco.** 1997. Removal of atrazine contamination in soil and liquid systems using bioaugmentation. *Pesticide Sci.* **50**:211-220.
- Grimalt, J. O., M. Grifoll, A. M. Solanas y J. Albaigés.** 1991. Microbial degradation of marine evaporitic crude oils. *Geochim. Cosmo. Act.* **55**:1903-1913.
- Grishchenkov, V. G.; R. T. Townsend, T. J. McDonald, R. L. Autenrieth, J. S. Bonner y A. M. Boronin.** 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic

- bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry* (Oxford) **35**:889-896.
- Grosser, R. J., M. Friedrich, D. M. Ward y W. P. Inskeep.** 2000. Effect of Model Sorptive Phases on Phenanthrene Biodegradation: Different Enrichment Conditions Influence Bioavailability and Selection of Phenanthrene-Degrading Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2695-2702.
- Guerin, T. F.** 1999. Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ land treatment. *J. Hazard. Mat.* **65**:305-315.
- Guthrie, E. A. y F. K. Pfaender.** 1998. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ. Sci Technol.* **32**:501-508
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41:95-98.
- Hammel, K. E., W. Z. Gai, B. Green y M. A. Moen.** 1992. Oxidative degradation of phenanthrene by ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1832-1838.
- Hansma, H. G.** 1996a. Atomic force microscope of biomolecules. *J. Vac. Sci. Technol.* **14**:1390-1394.
- Hansma, H. G.** 1996b. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **70**:1933-1939.
- Hansma, H. G., K. J. Kim, D. E. Laney, R. A. Garcia, M. Argaman, M. J. Allen y S. M. Parsons.** 1997. Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: a review. *J. Struct. Biol.* **119**:99-108.
- Hansma, H. G. y L. Pietrasanta.** 1998. Atomic force microscopy and other scanning probe microscopies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**:579-584.
- Harayama, S.** 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 268-273.
- Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai, y K. Shutsubo.** 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:63-70
- Hareland, W., R. L. Crawford, P. J. Chapman y S. Dagley.** 1975. Metabolic function and properties of 4-hydroxyphenylacetic acid 1-hydroxylase from *Pseudomonas acidovorans*. *J. Bacteriol.* **121**:272-285.

- Harkey, G. A. y T. M. Young.** 2000. Effect of soil contaminant extraction method in determining toxicity using the Microtox[®] assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**:276–282.
- Harms, H. y T. M. P. Bosma.** 1996. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol.* **16**:1-9.
- Hatzinger, P. B. y M. Alexander.** 1995. Effect of ageing of chemicals in their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* **29**:537-545
- Hauser, B., G. Schrader y M. Bahadir.** 1997 Comparison of acute toxicity and genotoxic concentrations of single compounds and waste elutriates using the Microtox/Mutatox test system. *Ecotox. Environ. Saf.* **38**:227-231.
- Head, I. M., J. R. Saunders y R. W. Pickup.** 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35**:1-21.
- Heard, C. S., J. G. Mueller, M. D. Brouman y E. T. Manges.** 1993. Bioremediation of creosote contaminated soil in slurry-phase reactors as assessed by chemical and Microtox analyses. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:265-270.
- Henckel, T., M. Friedrich y R. Conrad.** 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the gene of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1980-1990.
- Henderson, L., A. Wolfreys, J. Fedyk, G. Bourner y S. Windebank.** 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis.* **13**:89–94.
- Hendriksen, H. V., S. Larsen y B. K. Ahring.** 1992. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Appl. Env. Microbiol.* **58**:365-370.
- Hess, T. F., S. K. Schmidt, J. Silverstein y B. Howe.** 1990. Supplemental substrate enhancement of 2,4-dinitrophenol mineralization by a bacterial consortium. *Appl. Env. Microbiol.* **56**:1551-1556.
- Heusemann, M. E.** 1997. Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. limitations in bioavailability or inherent recalcitrance? *Bioremed. J.* **1**:27-39.
- Hicks, R., R. I. Amann y D. A. Stahl.** 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2158-2163.

-
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm y J. M. Tiedje.** 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil community. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:703-711.
- Holliger, C. y A. J. Zehnder.** 1996. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Cur. Opin. Biotechnol.* **7**:326-330.
- Howe-Grant, M.** 1996. Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology 4th ed.* Wiley Interscience Publication. New York. pp. 342-480.
- Hristova, K. R., C. M. Lutenegger y K. M. Scow.** 2001. Detection and quantification of methyl tert-butyl ether-degrading strain PM1 by real-time TaqMan PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5154-5160.
- Huesemann, M. H.** 1994. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *J. Soil. Contam.* **3**:318-335.
- Hugenholtz, P. y N. R. Pace.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**:190-197.
- Hughes, J. R., J. J. Hellmann, T. H. Ricketts y B. J. M. Bohannon.** 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4399-4406.
- Hund, K. y W. Traunspurger.** 1994. Ecotox- Evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere.* **29**:371-390
- Iacondini, A., F. Abbondanzi, T. Campisi, N. Saiz, A. Gussoni y M. Visani.** 2004. Bioremediation of PAH-contaminated sites: ecotoxicological monitoring of pilot plants. En: Magar, V. S. y M.E. Kelley (Eds), *In Situ and On-Site Bioremediation—2003, Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, Orlando, FL, June 2003*, Battelle Press, Columbus, OH, USA paper J-11.
- International Association of Research Chemists.** 1983. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear aromatic compounds. Part 1. *Int. Assoc. Res. Chem. Monogr.* **32**:355-364.
- ISO 11268-1** (1993) Soil quality- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). – Part 1 Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.
- ISO 11268-2** (1998) Soil quality- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). – Part 2. Determination of effects on reproduction
-

- ISO 11269-2** (1995) Soil quality- Determination of the effects of pollutants on soil flora. – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants
- ISO/FDIS 11348-3** (1998). Water quality- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test)- Part 1: Method using freeze dried bacteria.
- Jarvis, A. S., M. E. Honeycutt, V. A. McFarland, A. A. Bulich y H. C. Bounds.** 1996. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **33**:193-200.
- Johnson, B. T.** 1992. An evaluation of a genotoxicity assay with liver S9 for activation and luminescent bacteria for detection. *Environmental Toxicology and Chemistry* **11**:473-480.
- Johnson, B. T.** 1997. Microtox[®] toxicity Test System—New Developments and Applications. En: Wells, P. G., K. Lee y C. Blaise, Eds. En: *Microscale Testing in Aquatic Toxicology—Advances, Techniques, and Practice*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA pp. 201-218.
- Johnson, B. T. y E. R. Long.** 1998. Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: a new tandem in vitro testing approach. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**:1099-1106.
- Jones, J. G.** 1977. The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biol.* **7**:67-91.
- Juhasz, A. L., G. A. Stanley y M.L.Britz.** 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:396-401.
- Jukes, T. H y C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. In H.N.Munro, editor, *Mammalian Protein Metabolism*. p. 21-132. Academic press. New York.
- Juvonen, R., E. Martikainen, E. Schultz, A. Joutti, J. Ahtiainen, y M. Lehtokaris.** 2000. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **47**:156–166.
- Kaiser, K. L. E. y J. M. Ribo.** 1988. *Photobacterium phosphoreum* toxicity bioassay. II. toxicity data compilation. *Tox. Assess.* **2**:199-231.
- Kanaly, R. A. y S. Harayama.** 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **182**:2059-2067.

-
- Kanally, R. A., R. Bartha, K. Watanabe y S. Harayama.** 2000. Rapid mineralization of benzo(a)pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4205-4211.
- Kanally, R. A., S. Harayama y K. Watanabe.** 2002. *Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[a]pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5826-5833.
- Kanga, S. A., J. S. Bonner, C. A. Page y M. A. Mills.** 1997. Solubilization of naphthalene and methyl substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactants. *Environ Sci. Technol.* **31**:556-561.
- Kaplan, C. W. y C. L. Kitts.** 2004. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1777-1786.
- Kasai, Y., H. Kishira, K. Syutsubo y S. Harayama.** 2001. Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ. Microbiol.* **3**:246-255.
- Kästner, M.** 2000. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. En H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler y P. Stadler (Eds), *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. pp. 211-240.
- Kästner, M.** 2000. Humification: process or formation of refractory soil organic matter. En J. Klein (Ed), *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. pp. 89-126.
- Kazunga, C. y M. D. Aitken.** 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1917-1922.
- Kazunga, C., M. D. Aitken, A. Gold y R. Sangaiah.** 2001. "Fluoranthene-2,3- and -1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Eenviron. Sci. Technol.* **35**:917-922.
- Keddy, C. J., J. C. Greene y M. A. Bonnell.** 1995. Review of whole-organism biossays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**, 221-251.
- Keith, L. H. y W. A. Telliard.** 1979. Priority pollutants I- a perspective view. *Env. Sci Technol.* **13**:416-423.
-

- Kelsey, J. W. y M. Alexander.** 1997. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:582-585
- Kilbane, J. J., D. K. Chatterjee y A. M. Chakrabarty.** 1983. Detoxification of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid from contaminated soil by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1697-1700.
- Kiyohara, H., K. Nagao y K. Yana.** 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:454-457.
- Klein, J.** 2000. Possibilities, limits, and future developments of soil bioremediation. En H. J. Rehm y G. Reed (Eds), *Environmental processes II. Soil Decontamination, Biotechnology, Vol. 11 b*. Wiley-VCH. Weinheim, FRG. pp. 465-476.
- Knoke, K. L., T. M. Marwood, M. B. Cassidy, H. Lee, J. T. Trevors, D. Liu y A. G. Seech.** 1999. A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* **110**:157-169
- Kogure, K., U. Simudu y N. Taga.** 1980. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **26**:318-323.
- Kolhatkar, R., T. Kuder, P. Philp, J. Allen y J. T. Wilson.** 2002. Use of Compound-Specific Stable Carbon Isotope Analyses To Demonstrate Anaerobic Biodegradation of MTBE in Groundwater at a Gasoline Release Site. *Env. sci. Technol.* **36**:5139-5146.
- Komukai-Nakamura, S., K. Sugiura, Y. Yamauchi-Inomata, H. Toki, K. Venkateswaran, S. Yamamoto, H. Tanaka y S. Harayama.** 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude. *J. Ferm. Bioeng.* **82**:570-574.
- Kopczynski, E. D., M. M. Bateson y D. M. Ward.** 1994. Recognition of chimeric small subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:746-748.
- Kowalchuk, G. A., P. L. E. Bodelier, G. H. J. Heilig, J. R. Stephen y H. J. Laanbroek.** 1998. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:339-350.
- Krooneman, J, E. B. Wieringa, E. R. B. Moore, J. Gerritse, R. A. Prins y J. A. Gottchal.** 1996. Selective isolation and characterization of *Alcaligenes* sp. L6 degrading 3-chlorobenzoate at low oxygen partial pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:24727-2434

- Kwan, K. K., y B. J. Dutka.** 1992. Evaluation of Toxi-chromotest direct sediment toxicity testing procedure and Microtox solid-phase testing procedure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **49**:656-662.
- Kyle, L. K., M. M. Theresa, B. C. Michael, L. Hung, T. T. Jack, L. Dickson y G. S. Alan.** 1999. A Comparison of five Bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil. *Water Air & Soil Poll.* **110**:157-169.
- La Voie, E. J., V. Bedenko, N. Hirota, S. S. Hacht y D. Hoffmann.** 1979. A comparison of the mutagenicity, tumor initiating activity and complete carcinogenicity of polynuclear aromatic hydrocarbons. En: P. W. Jones y P. Leber (Eds), *Carcinogenesis. Vol. 4.* Raven Press. New York. pp. 705-721.
- La Voie, E. J. y J. E. Rice.** 1988. Structure-activity relationships among tricyclic polynuclear hydrocarbons. En: S. K. Yang y B. D. Silverman (Eds.), *Polycyclic aromatic hydrocarbons carcinogenesis: structure activity relationships. Vol I.* CRC Press. Boca Ratón. pp. 151-176
- Ladd, J. N., R. C. Foster, P. Nannipieri y J. M. Oades.** 1996. Soil structure and biological activity. *Soil Biochem.* **9**:23-78.
- Lajoie, C. A. y P. F. Strom.** 1994. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar oil contaminated soil. En Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil. Wise, D. L. y D. J. Trantolo (Eds). New York: Marcel Dekker. pp. 149-162.
- Lamar, R. T., M. W. Davis, D. M. Dietrich y J. A. Glaser.** 1994. Treatment of a pentachlorophenol- and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: a field demonstration. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1603-1611.
- Landmeyer, J. E., D. A. Vroblesky y F. Chapelle.** 1996. Stable carbon isotope evidence of biodegradation zonation in a shallow jet-fuel contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **30**:1120-1128.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S sequencing. En E. Stackebrandt y M. Goodfellow, editores, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons. Chichester, UK pp. 115-175..
- Leahy, J. G. y R. R. Colwell.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**:305-315.
- Lechevalier, M. P.** 1989. Lipids in bacterial taxonomy. En W. M. O'Leary (Ed.), *Practical handbook of microbiology.* CRC. Boca Ratón. pp. 455-561.

- Lee, D. H., Y. G. Zo y S. J. Kim.** 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3112-3120.
- Lewis, D. L., H. P. Kollig y R. E. Hodson.** 1986. Nutrient limitation and adaptation of microbial populations to chemical transformation. *Appl. Env. Microbiol.* **51**:598-603.
- Leys, N. M. E. J., A. Ryngaert, L. Bastiaens, W. Verstraete, E. M. Top y D. Springael.** 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1944-1955.
- Liesack, W., H. Weyland y E. Stackerbrandt.** 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* **21**:191-198.
- Lindstrom, J. E., R. C. Prince, J. C. Clark, M. J. Grossmann y T. R. Yeager.** 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2514-2522
- Linos, A., R. Reichelt, U. Keller y A. Steinbuchel.** 2000. A gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas aeruginosa* AL98, is a potent degrader of natural rubber and synthetic cis-1,4-polyisoprene. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:155-161.
- Liu, Z., A. M. Jacobson y R. G. Luthy.** 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous non ionic surfactants systems. *Appl. Env. Microbiol.* **61**:145-151.
- Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng y L. J. Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA *Appl. Env. Microbiol.* **63**:4516-4522.
- Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde y A. J. B. Zehnder.** 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.* **54**:75-87.
- Lotfabad, S. K. y M. R. Gray .** 2002. Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **60**:361-366.
- Mackay, N. y W. B. Betts.** 1991. The fate of chemicals in soil. En W. B. Betts (Ed), *Biodegradation: natural and synthetic materials*. Springer Verlag. London. pp. 89-117.
- Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. J. Chang y D. C. White.** 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3566-3574.

- Madill, R. E. A., B. G. Brownlee, P. D. Josephy, and N. J. Bunce.** 1999. Comparison of the Ames *Salmonella* Assay and Mutatox Genotoxicity Assay for Assessing the Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds in Porewater from Athabasca Oil Sands Mature Fine Tailings. *Env. Sci. Technol.* **33**:2510-2516.
- Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, C. T. Parker Jr., P. R. Saxman, J. M. Stredwick, G. M. Garrity, B. Li, G. J. Olsen, S. Pramanik, T. M. Schmidt y J. M. Tiedje.** 2000. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucl. Acid. Res.***28**:173-174.
- Manilal, V. B. y M. Alexander.** 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:401-405.
- Mansuy, L. R. P. Philip y J. Allen.** 1997. Source identification of oil spills based on the isotopic composition of individual components in weathered oil samples. *Env. Sci. Technol.* **21**:3417-3425
- Margesin, R. y F. Schinner.** 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:462-468
- Margesin, R. y F. Schinner.** 1997b. Laboratory bioremediation experiments with soil from a diesel-oil contaminated site: significant role of cold adapted microorganisms and fertilizers. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **70**:92-98
- Maron, D. M. y Ames, B. N.** 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut. Res.* **113**:173-215.
- Marwood, T. M., K. Knoke, K. Yau, A. Suchorski-Treamblay, C. A. Flemming, V. Hodge y H. J. Vogel.** 1998. Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **13**:117-126.
- Massias, D., V. Grossi, J. C. Bertrand.** 2003. In situ anaerobic degradation of petroleum alkanes in marine sediments: preliminary results. *Comptes Rendus Geoscience* **335**:435-439.
- Massol-Deyà, D. A., D. A. Odelson, R. F. Hickey y J. M. Tiedje.** 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). En A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas y F. J. Bruijn, (Eds), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publications. Dordrecht. pp. 1-8.
- Massol-Deyà, D. A., R. Weller, L. H. Ríos, J. Z. Zhou, R. F. Hickey y J. M. Tiedje.** 1997. Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:270-276.

- Mazeas, L., H. Budzinski y N. Raymond.** 2002. Absence of stable carbon isotope fractionation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons during aerobic bacterial biodegradation. *Org. Geochem.* **33**:1259-1272
- McCann, J., N. E. Springarn, J. Kobori, y B. N. Ames.** (1975) Detection of carcinogens and mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**:979-983.
- Means, J. C., S. G. Ward, J. J. Hassett y W. L. Banwart.** 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Env. Sci. Technol.* **14**:1524-1528.
- Meckenstock, R. U., B. Morasch, M. Kaestner, A. Vieth y H. H. Richnow.** 2002. Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus.* **2**:141-152.
- Meckenstock, R. U., B. Morasch, C. Griebler y H. H. Richnow.** 2004. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hidrol.* **75**:215-255
- Menn, F-M., J. P. Easter y G. S. Saylor.** 2000. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. pp. 425-439.
- Mikesell, M. D. y S. A. Boyd.** 1988. Enhancement of pentachlorophenol degradation in soil through induced anaerobiosis and bioaugmentation with anaerobic sewage sludge. *Env. Sci. Technol.* **22**:1411-1414.
- Mills, A. L., C. Breuil y R. Colwell.** 1978. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Can. J. Microbiol.* **24**:522-527.
- Mishra, S., J. Jiot, R. C. Kuhad y L. Banwari.** 2001. Evaluation of Inoculum to Stimulate in situ bioremediation of oily sludge-contaminated soil. *Appl. Env Microbiol.* **67**:1675-1681.
- Morasch, B., H. H. Richnow, B. Schink y R. U. Meckenstock.** 2001. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4842-4849.
- Morasch, B., H. H. Richnow, A. Vieth, B. Schink y R. U. Meckenstock.** 2002. Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5191-5194

- Moré, M., J. B. Herrick, M. O. Silva, W. C. Ghiorse y E. J. Madsen.** 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1572-1580.
- Morgan, P. y R. J. Watkinson.** 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Water Res.* **26**:73-78
- Morgan, P. y R. J. Watkinson.** 1994. Biodegradation of compounds of petroleum. En: C. Ratledge (Ed), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Mortelmans, K. y E. Zeiger.** 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mut. Res.* **455**:29-60.
- Mowart, F. S. y K. J. Bundy.** 2001. Correlation of field-measured toxicity with chemical concentration and pollutant availability. *Environ. Int.* **27**:479-489.
- Mowart, F. S. y K. J. Bundy.** 2002a. Experimental and mathematical/computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from Microtox assay. *Adv. Environ. Res.* **6**:547-558.
- Mowart, F. S. y K. J. Bundy.** 2002b. A mathematical algorithm to identify toxicity and prioritize pollutants in field sediments, *Chemosphere* **49**:499-513.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman y P. H. Pritchard.** 1989. Creosote contaminated sites: their potential for bioremediation. *Env. Sci. Technol.* **23**:1197-1201.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, P. J. Blattmann y P. H. Pritchard.** 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1079-1086.
- Müller, H.** 1987. Hydrocarbons in the freshwater environment: a literature review. *Arc. Hydrobiol. Adv. Limnol.* **24**:1-69
- Mulligan, C. N., R. N. Young y B. F. Gibbs.** 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.* **60**:371-380.
- Muyzer, G., E. D. DeWaal y A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.* **59**:695-700.
- Nakabachi, A., H. Ishikawa y T. Kudo.** 2003. Extraordinary proliferation of microorganisms in aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Invertebr. Pathol.* **82**:152-161.

- National Academy of Sciences of USA.** 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects. National Academy Press, Washington, D.C
- Newcombe, D. A. y D. E. Crowley.** 1999. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:877-882.
- Niqui-Arroyo, J. L., M. Bueno-Montes y J. J. Ortega-Calvo.** 2003. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in clay-rich, creosote polluted soils. *Wissenschaftliche Berichte - Forschungszentrum Karlsruhe.* pp. 1213-1219.
- Nocentini, M., D. Pinelli, F. Fava** 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* **41**:1115-1123.
- Nogales, B., E. R. B. Moore, W. R. Abraham y K. N. Timmis.** 1999. Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Env. Microbiol.* **1**:199-212.
- Nogales, B., E. R. B. Moore, E. Llobet-Brossa, R. Rossello-Mora, R. Amann y K. N. Timmis.** 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1874-1884.
- Nohynek, L. J., E. L. Nurmiäho-Lassila, E. L. Suhonen, H. J. Busse, M. Mohammadi, J. Hantula, F. Rainey y M. S. Salkinoja-Salonen.** 1996. Description of chlorophenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains KF1-T, KF3, and NKF1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:1042-1055.
- Norman, R. S., R. F. Frontera-Suau y P. J. Morris.** 2005. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5096-5103.
- O'Leary, M. H.** 1981. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry.* **20**:553-567
- Ortega-Calvo, J. J. y C. Saiz-Jiménez.** 1998. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3123-3126.
- Ortega-Calvo, J. J., A. I. Marchenko, A. V. Vorobyov y R. V. Borovick.** 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**:373-381.

- O'Sullivan, L. A., A. J. Weightman y J. C. Fry. 2002. New degenerate *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*-specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in River Taff epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:201-210.
- Oudot, J y E. Dutrieux. 1989. Hydrocarbon weathering and biodegradation in a tropical estuarine ecosystem. *Mar. Environ. Res.* **27**:195-213.
- Ovreas, L., L. Forney, F. L. Daae y V. Torsvik. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevanet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3367-3373.
- Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane y G. J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbiol. Res.* **152**:359-365.
- Page, A. L., R. H. Miller y D. R. Keeney. 1982. Methods of soil analysis, Part 2. Soil Science Society of America, Madison.
- Palittapongarnpim, M., P. Pokethitiyook, E. S. Upathan y L. Tangbanluekal. 1998. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation* **9**:83-90.
- Pearce, D. A., C. J. van der Gast, B. Lawley y J. C. Ellis-Evans. 2003. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**:59-70.
- Phillips, T. M. A. G. Seech, D. Liu, H. Lee y J. T. Trevors. 2000. Monitoring Biodegradation of Creosote in Soils Using Radiolabels, Toxicity Tests, and Chemical Analysis. *Environ Toxicol* **15**: 99-106
- Pietrasanta, L., B. L. Smith y M. C. MacLeod. 2000. A novel approach for analyzing the structure of DNA modified by benzo(a)pyrene diol epoxide at single-molecule resolution. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:351-355
- Potin, O., C. Rafin y E. Veignie. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int. Biodet. Biodegrad.* **54**:45-52.
- Pramer, D. y R. Bartha. 1972. Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environ. Lett.* **2**:217-224
- Prati, M., E. Biganzoli, P. Boracchi, M. Tesauro, C. Monetti y G. Bernardini. 2000. Ecotoxicological soil evaluation by FETAX. *Chemosphere* **41**:1621-1628.

- Preus, A., R. Shauder, G. Fuchs y W. Stichler.** 1989. Carbon isotope fractionation by autotrophic bacteria with three different carbon dioxide fixation pathways. *J. Biosci.* **44**:397-402
- Prince, R. C.** 1993 Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **19**, 217-242.
- Prince, R. C., D. L. Elmendorf, J. R. Lute, C. S. Hsu, E. Copper, J. Senius, G. Dechert, G. S. Douglas y E. L. Butler.** 1994. $17\alpha(H)21\beta(H)$ -Hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* **28**:142-145.
- Pritchard, P. H. y C. F. Costa.** 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. *Environ. Sci. Technol.* **25**:372-379
- Randall, J. D. y B. B. Hemmingsen.** 1994. Evaluation of mineral agar plates for the enumeration of hydrocarbon-degrading bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **20**:103-113.
- Renoux, A.Y., R. D. Tyagi, Y. Roy y R. Samson.** 1995. Ecotoxicological assessment of bioremediation of a petroleum soil. En: Hinchee, R. E., F. J. Brockman, C. M. Vogel. (Eds.), *Microbial Processes for Bioremediation*. Battelle, Columbus, OH, USA., pp. 259–264
- Ressler, B. P., H.Kneifel y J. Winter.** 1999. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *App. Microbiol. Biotechnol.* **53**:85-91.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J.Cel.Biol.* **17**:208-212.
- Reysenbach, A., L .J. Giver, G. S. Wickham y N. R. Pace.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3417-3418.
- Rhykerd, R. L., R. W. Weaver y K. J. McInnes.** 1995. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. *Environ. Pollut.* **90**:127-130.
- Richnow, H. H., R. U. Meckenstock y M. Kaestner.** 2003a. Perspectives of stable isotope approaches in bioremediation research. *NATO Science Series, IV: Earth and Environmental Sciences.* **19**:367-372.
- Richnow, H. H., E. Annweiler, W. Michaelis y R. U. Meckenstock.** 2003b. Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *J. Cont. Hydrol.* **65**:101-120.

-
- Ringwood, A. H., M. E. DeLorenzo, P. E. Ross y A. F. Holland.** 1997. Interpretation of Microtox solid-phase toxicity test: the effects of sediment composition. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**:1135–1140
- Rippe, K., M. Guthold, P. H. von Hippel y C. Bustamae.** 1997. Transcriptional activation via DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase by scanning force microscope. *J. Mol. Biol.* **270**:125-138.
- Ritz, K., J. W. McNicol, N. Nunan, S. Grayston, P. Millard, D. Atkinson, A. Gollotte, D. Habeshaw, B. Boag, C. D. Clegg, B. S. Griffiths, R. E. Wheatley, L. A. Glover, A. E. McCaig y J. I. Prosser.** 2004. Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**:191-205.
- Roling-Wilfred, F. M., M. G. Milner, D. M. Jones, K. Lee, F. Daniel, J. P. Swannell-Richard, and I. M. Head.** 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5537-5548.
- Roling Wilfred, F.M., M. G. Milner, D. M. Jones, F. Fratepietro, P. J. Swannell Richard, F. Daniel, y I. M. Head.** 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2603-2613.
- Ron, E. Z. y E. Rosenberg.** 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Cur. Opinion Biotechnol.* **13**:249-252.
- Ron, E. Z. y E. Rosenberg.** 2001. Natural roles of biosurfactants. Minireview. *Environmental Microbiology.* **3**:229-236.
- Rosini, F. D.** 1960 Hydrocarbons in petroleum. *Journal of Chem. Educ.* **39**:554-561.
- Rouse, J. D., D. A. Sabatini, J. M. Suflita y J. H. Harwell.** 1994. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. Microbiol.* **24**:325-370.
- Rulkens, W. H.** 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation *Biodegradation.* **8**:401-417
- Rutherford, P. M., D. K. Banerjee, S. M. Luther, M. R. Gray, M. J. Dudas, W. B. McGill, M.A. Pickard y M. J. Salloum.** 1998. Slurry-phase bioremediation of creosote- and petroleum-contaminated soil. *Environ. Technol.* **19**:683-696
-

- Rydberg, B y K. J. Johanson.** 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (eds): DNA repair mechanisms. New York: Academic Press, pp 465–468.
- Sabaté, J.** 1998. Fotooxidación y biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Tesis doctoral, Departamento de Microbiología, Universitat de Barcelona
- Sabaté, J., M. Grifoll, M. Viñas y A. M. Solanas.** 1999. Isolation and characterization of 2-methylphenanthrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:704-712.
- Sabaté, J., M. Viñas, J. M. Bayona y A. M. Solanas.** 2003. Isolation and taxonomic and catabolic characterization of a 3,6-dimethylphenanthrene-utilizing strain of *Sphingomonas* sp. *Can. J. Microbiol.* **49**:120-129.
- Sabaté, J., M. Viñas y A. M. Solanas.** 2004 Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodet. Biodegrad.* **54**:19-25.
- Sabaté, J., M. Viñas y A. M. Solanas.** Bioavailability assessment and environmental fate of PAHs in bioestimulated creosote-contaminated soil. (sometido a *Chemosphere*)
- Salanitro, J. P., P. B. Dorn, M. H. Huesemann, K. O. Moore, I. A. Rhodes, L. M. Jackson, T. E. Vipond, M. M. Western y H. L. Wisniewski.** 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* **31**:1769–1776.
- Samanta, S. K., O. V. Singh y R. K. Jain.** 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* **20**:243-247.
- Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrel, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Utchison, P. M. Slocombe y M. Smith.** 1977. Nuclotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* **265**:687-695.
- Saterbak, A., R. J. Toy, D. C. L. Wong, B. J. McMMain, M. P. Williams, P. B. Dorn, L. P. Brzuzy, E. Y. Chai y J. P. Salanitro.** 1999. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:1591–1607.
- Schaper, A. y T. M. Jovin.** 1996. Striving for atomic resolution in biomolecular topography: the scanning force microscopy (SFM). *Bioessays.* **18**:925-935.
- Selenska-Pobell, S., G. Kampf, K. Flemming, G. Radeva y G. Satchanska.** 2001. Bacterial diversity in soil samples from two uranium waste piles as determined by rep-APD, RISA and 16S rDNA retrieval. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**:149-161.

- Sessitsch, A., A. Weilharter, M. H. Gerzabek, H. Kirchmann y E. Kandeler.** 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Env. Microbiol.* **67**:4215-4224.
- Shapir, N. y R. T. Mandelbaum.** 1997. Atrazine degradation in subsurface soil by indigenous and introduced microorganisms. *J.Agr.Food.Chem.* **45**:4481-4486.
- Sharpley, A. N.** 1991. Effect of soil pH on cation and anion solubility. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* **22**:1391-1399
- Sherwood Lollar, B., G. F. Slater, J. Ahad, B. Sleep, J. Spivack, M. Brennan y P. MacKenzie.** 1999. Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: Implications for intrinsic bioremediation. *Org. Geochem.* **30**:813-820.
- Shuttleworth, K. L. y C. E. Cerniglia.** 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. *Appl. Env Microbiol.* **54**:291-302.
- Siciliano, S. D., J. J. Germida, K. Banks, y C. W. Greer.** 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:483-489.
- Sims, R. C. y M. R. Overcash.** 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil plant systems. *Residue Rev.* **88**:1-68.
- Singer, A. C., E. S. Gilbert, E. Luerpromchai y D. E. Crowley.** 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **54**:838.
- Singh N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice y E. L. Schneider.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**:184 –191.
- Singh, B. K., A. Walker, J. A. Morgan y D. J. Wright.** 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5198-5206.
- Slater, G .F., B. S. Lollar, E. Edwards, B. Sleep, M. Witt, G. M. Klecka, M. R. Harkness y J. L. Spivack.** 2000. Carbon isotopic fractionation of chlorinated ethenes during biodegradation: field applications. Natural Attenuation Considerations and Case Studies: Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, 2nd, Monterey, CA, United States, May 22-25, 2000. pp. 17-24

- Smallwood, B. J., R. P Philip y J. D . Allen.** 2002. Stable carbon isotopic composition of gasolines determined by isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry. *Org. Geochem.* **33**:149-159
- Smit, E., P. Leeflang, B. Glandorf, J. D. van Elsas y K. Wernars.** 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2614-2621.
- Solanas, A. M.** 1981. Contaminación y biodegradación de hidrocarburos en las aguas superficiales del Barcelonés. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Departament de Microbiologia. Barcelona.
- Solanas, A. M., R. Parés, J. M. Bayona y J. Albaigés.** 1984. Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures. *Chemosphere.* **13**:593-601.
- Song, H, X. Wang y R. Bartha.** 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Env. Microbiol.* **56**:652-656.
- Sorkoh, N. A., A. S. Ibrahim, M. A. Ghannoum y S. S. Radwan.** 1993. High temperature hydrocarbon degradation by a *Bacillus stearotherophilus* from oil polluted Kuwaiti desert. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**:123-126
- Sparrow, S. D. y E. B. Sparrow.** 1988. Microbial biomass and activity in a subarctic soil ten year after crude spills. *J. Environ. Qual.* **17**:304-309
- Speight, J. G.** 1991. *The chemistry and technology of petroleum.* John Wiley and Sons. New York.
- Spurr, A. R.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**:31.
- Stach, J. E. M. y R. G. Burns.** 2002. Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environ. Microbiol.* **4**:169-182.
- Staley, J. T. y A. Konopka.** 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**:321-346.
- Stapleton, R. D.** 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4180-4184
- Steffensen, W. S. y M. Alexander.** 1995. Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates. *Appl. Env. Microbiol.* **61**:2859-2862.

- Stehmeier, L. G., E. J. M. Diegor, M. M. Francis, L. Winsor y T. A. Abrajano Jr.** 1999. Use of isotope fractionation in residual hydrocarbons for monitoring bioremediation. International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, 5th, San Diego, 19-22 Abril 1999, pp. 207-212
- Steinbach, A. y W. Michaelis.** 2003. Combined $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ monitoring of in situ biodegradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer."En: Geochemical Processes in Soil and Groundwater: Measurement, Modelling, Upscaling, GeoProc 2002, Bremen, Germany, Mar. 4-7, 2002. pp.169-181.
- Steinbach, A., R. Seifert, E. Annweiler y W. Michaelis.** 2004. Hydrogen and carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons- a field study. *Environ. Sci. Technol.* **38**:609-616
- Steinle, P., P. Thalmann, P. Hohener, K. W. Hanselmann y G. Stucki.** 2000. Effect of environmental factors on the degradation of 2,6-dichlorophenol in soil. *Env. Sci. Technol.* **34**:771-775.
- Straube, W. L., M. J. Jones, P. H. Pritchard y W. R. Jones.** 1999. Bench-scale optimization of bioaugmentation strategies for treatment of soils contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons. *Res.Cons Recycl.***27**:27-37.
- Strong, L. C., H. Mc Tavish, M. J. Sadowsky y L. P. Wackett.** 2000. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil usinr recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. *Environ. Microbiol.* **2**:91-98.
- Stronkhorst, J., C. Schipper, J. Brils, M. Dubbeldam, J. Postman and N. Van De Hoeven.** 2003. Using marine bioassays to classify the toxicity of Dutch Harbor sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**:1535-1547
- Struthers, J. K., K. Jayachandran y T. B. Moorman.** 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use oh this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3368-3375.
- Stucki, G. y M. Alexander.** 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Env. Microbiol.* **53**:292-297.
- Suess, M. J.** 1976. The environmental load of and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total. Environ.***6**:239-250.
- Sugiura, K, M. Ishihara, T. Shimauchi y S. Harayama.** 1997. Physichochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. *Environ. Sci. Technol.***31**:45-51.

- Sutherland, J. B.** 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind. Microbiol.* **9**:53-62.
- Sutherland, J. B., F. Rafii, A. A. Khan y C. E. Cerniglia.** 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. En L. Y. Young y C. E. Cerniglia (Eds), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss. New York. pp. 269-306.
- Suzuki, M. T. y S. J. Giovannoni.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625-630.
- Swindoll, C. M., C. M. Aelion y K. F. Pfaender.** 1998. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation responses of subsurface microbial communities. *Appl. Env. Microbiol.* **54**:212-217.
- Tabak, H. H., C. Gao, L. Lai, X. Yan, S. Pfanstiel, I. S. Kim y R. Govind.** 1994. Determination of bioavailability and biodegradation kinetics of phenol and alkylphenols in soil. En D. W. Tedder y F. G. Pohland (Eds.). *ACS symposium series 554*. Washington. pp. 51-57.
- Tabak, H. H., R. Govind, C. Gao, L. Lai, X. Yan y S. Pfanstiel.** 1995. Determination of bioavailability and biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In D.W.Tedder and F.G.Pohland, editors, *Emerging technologies in hazardous waste management*. ACS symposium series 607. Washington.
- Tchelet, R., R. Meejenstock, P. Steinle y J. R. Van der Meer.** 1999. Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. *Biodegradation.* **10**:113-125.
- Thiem, A.** 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Env. Microbiol.* **60**:258-263.
- Thomas, J.M. y J. F. Cline.** 1985. Modification of the techniques to assess toxicity of hazardous chemicals in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**:201-207.
- Tice, R.R.** 1995. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. En: Phillipps D. H. y S. Venitt (Eds), *Environmental Mutagenesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers. pp 315-339
- Torsvik, V., J. Goksoyr y F. L. Daae.** 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:782-787.
- Torsvik, V., F. L. Daae, R. A. Sandaa y L. Ovreas.** 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* **64**:53-62.

- Torsvik, V., L. Ovreas y T. F. Thingstad.** 2003. Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science*. **296**:1064-1066.
- Truper, H. G.** 1992. Prokariotes- an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiv.Cons.* **1**:227-236.
- Trust, B. A., J. G. Mueller, R. B. Coffin y L. A. Cifuentes.** 1995. The biodegradation of fluoranthene as monitored using stable carbon isotopes. En: Hinchee, R. E., G. S. Douglas y S. K. Ong (Eds). *Monitoring and verification of bioremediation*. Batelle Press, Columbus, USA. pp. 233-239.
- Trust, H. B., C. A. Kelley, R. B. Coffin, L. A. Cifuentes y J. G. Mueller.** 1998. $\delta^{13}\text{C}$ values of polycyclic aromatic hydrocarbons collected from two creosote-contaminated sites. *Chem. Geol.* **152**:43-58.
- Tsai, Y.L. y B. H. Olson.** 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1070-1074.
- U.S. EPA.** 1995. How to evaluate alternative clean-up technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan. *EPA 510-B-95-007*
- Ulitzur, S., I. Weiser, y S. Yannai.** (1980) A new, sensitive and simple bioluminescent test for mutagenic compounds. *Mut. Res.* **74**:113-124.
- Ulrici, W.** 2000. Contaminated soil areas, different countries and contaminants monitoring of contaminants. En H. J. Rehm y G. Reed (Eds.). *Environmental Processes II. Soil Decontamination, Biotechnology, Vol 11b*. Weinheim, FRG. pp. 5-42.
- US. Environmental Protection Agency.** 1996. Test methods for evaluating solid wastes." *online at*. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3611b.pdf>.
- Vainio, E. J., A. Moilanen, T. T. Koivula, D. H. Bamford y J. Hantula.** 1997. Comparison of partial 16S rRNA gene sequences obtained from activated sludge bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **48**:73-79.
- Van Dyke, M. I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee y T. J. Trevors.** 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* **39**:1071-1078.
- Van Elsas, J. D., G. F. Duarte, W. A. Keijzer y E. Smit.** 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Meth.* **43**:133-151.

- Van Hamme, J. D., J. A. Odumeru y O. P. Ward.** 2000. Community dynamics of mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. *Can. J. Microbiol.* **46**:441-450.
- Van Hamme, J. D., A. Singh y O. P. Ward.** 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:503-549.
- Venkateswaran, K., K. M. R. Hoaki, y T. Maruyama.** 1995. Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. *Can. J. Microbiol.* **41**:418-424.
- Venosa, A. D., M. T. Suidan, B. A. Wrenn, K. L. Strohmeier, J. R. Haines, B. L. Eberhart, D. King y E. Holder.** 1996. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware bay. *Environ. Sci. Technol* **30**:1764-1775.
- Verschueren, K.** 1997. *Handbook of environmental data on organic chemicals.* Van Nostrand Reinhold Company. New York.
- Verstraete, W. R., R. Vanlooche y R. de Borger.** 1976. Modeling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. En: Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp. (Sharpley, J. M. A. M. Kaplan (Eds)). Applied Science Publishers. London. pp. 98-112
- Vieth, A., J. Mueller, G. Strauch, M. Kaestner, M. Gehre, R. U. Meckenstock y H. H. Richnow.** 2003. In-situ biodegradation of tetrachloroethene and trichloroethene in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation. *Isotopes in Environmental and Health Studies.* **39**:113-124.
- Viñas, M., M. Grifoll, J. Sabate y A. M. Solanas.** 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**:252-260.
- Vismara, C. y A. Garavaglia.** 1997. 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid Containing Compounds. Genotoxicity Evaluation by Mutatox® Assay and Comparison with Acute (Microtox®) and Embryo (FETAX) Toxicities. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* **58**:582-588
- Vogel, T. M.** 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**:311-316.
- Volkering, F, A. M Breure y W. H. Rulkens.** 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* **8**:401-417.
- Von Wedel, R. J., J. F. Mosquera, C. D. Goldsmith, G. R. Hater, A. Wong, T. A. Fox, W. T. Hunt, M. S. Paules, J. M. Quiros y J. W. Wiegand.** 1988. Bacterial biodegradation of

- petroleum hydrocarbons in groundwater: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. *Wat. Sci. Technol.* **20**:501-503.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer y K. H. Schleifer.** 1993. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1520-1525.
- Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi y K. H. Schleifer.** 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:792-800.
- Walsh, G. E, D. E. Weber, T. L. Simon, y M . K. Brashers.** Toxicity Test of Effluents with Marsh Plants in Water Sediments. En : Gorsuch J. W, W. R. Lower, W. Wang, y M. A. Lewis (Eds.) *Plants for Toxicity Assesstment: Second Volume.* ASTM STP 1115. American Society for Testing and Materials (ASTM). pp. 517-525.
- Walter, M. V., E. C. Nelson, G. Firmstone, D. G. Martin, M. J. Clayton, S. Sympson y S. J. Spaulding.** 1997. Surfactant enhances biodegradation of hydrocarbons: microcosm and field study. *Soil Contam.* **6**:61-77.
- Walworth, J. L. y C. M. Reynolds.** 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *J. Soil. Contam.* **4**:299-310.
- Walworth, J. L., C. R. Woolard, J. F. Braddock y C. M. Reynolds.** 1997. Enhancement and Inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: An approach to determining optimum levels. *J. soil. Contam.* **6**:465-480.
- Wang, X. y R. Bartha.** 1990. Effects of bioremediation on residues, activity, and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biol. Biochem.* **22**:501-505.
- Wang, G. C. Y. y Y. Wang.** 1996. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology.* **142**:1107-1114.
- Wang, Y y P. C. K. Lau.** 1996. Sequence and expression of an isocitrate dehydrogenase-encoding gene from a polycyclic aromatic hydrocarbon oxidizer, *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Gene* **168**:15-21.
- Ward, D. M., M. M. Bateson, R. Weller y A. L. Ruff-Roberts.** 1990. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:105-116.

- Ward, J. A. M., J. M. E. Ahad, G. Lacrampe-Couloume, G. F. Slater, E. A. Edwards y B. S. Lollar.** 2000. Hydrogen Isotope Fractionation during Methanogenic Degradation of Toluene: Potential for Direct Verification of Bioremediation. *Environmental Science and Technology*. **34**:4577-4581.
- Watkinson, R. J., y P. Morgan.** 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*. **1**:79-92.
- Wegrzyn, G. y A. Czyz.** 2003. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *J. Appl. Microb.* **95**:1175-1181
- Weissenfels, W., D. H. Klewer y J. Lanfhoff.** 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:689-696.
- Whise, D. L.** 2000. Bioremediation of contaminated soils. *Marcel Decker. New York.*
- Whiteley, A. S. y M. J. Bailey.** 2000. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2400-2407.
- Whyte, L. G., L. Bourbonniere y C. Bellrose, C.** 1999. Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high arctic. *Can. Biorem. J.* **3**:69-79
- Willumsen, P. A., U. Karlson y P. H. Prichard.** 1998. Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:475-483.
- Wilson, K.** 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. En : F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl, editores, *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. New York. pp. 2.4.1-2.4.2
- Wise, S. A., B. A. Benner, G. D. Burd, S. N. Chester, R. E. Rebert y M. M. Schantz.** 1988. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal standard reference material. *Anal. Chem.* **60**:887-894.
- Wislocki, P. G. y A. Y. H. Lu.** 1988. Carcinogenicity and mutagenicity of proximate and ultimate carcinogens of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenesis: structure-activity relationships Vol. I*. CRC Press. Boca Raton. pp. 1-30.
- Wrenn, B. A. y A. D. Venosa.** Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon-degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* **42** :252-258. 1996.

- Wünsche, L., L. Bruggemann y W. Babel.** 1995. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**:295-305.
- Yang, C. H., D. E. Crowley, J. Borneman y N. T. Keen.** 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:3889-3894.
- Young, M. y S. T. Cole.** 1993. *Clostridium*. En A. L. Sonenshein, J. A. Hoch y R. Losick (Eds), *Bacillus subtilis and other Gram-positive organisms*. American Society for Microbiology. Washington DC. pp. 35-52
- Yu, Z. y M. Morrison.** 2004. Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4800-4806.
- Zein, M., M. T. Suidan y A. D. Venosa.** 2004. MTBE Biodegradation in gravity flow, high-biomass retaining bioreactor. *Env. Sci. Technol.* **38** :3449-3456.
- Zelles, L.** 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* **29**:111-129.
- Zengler, K., G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short y M. Keller.** 2002. Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:15681-15686.
- Zhang, Y. M. y R. M. Miller.** 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (Biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2101-2106.
- Zhang, Y. M. y R. M. Miller.** 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and bid biod biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2101-2106.
- Zhang, Y., W. J. Walter, J. Maier y R. M. Miller.** 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **31**:2211-2217.
- Zhang, L., M. Berg, T. C. Schmidt y S. B. Haderlein.** 2002. Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic carbons in the low-microgram per liter range. *Anal. Chem.* **75**:5575-5583
- Zhou, E. y R. L. Crawford.** 1995. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* **6**:127-140.

Zucchi, M., L. Angiolini, S. Borin, L. Brusetti, N. Dietrich, C. Gigliotti, P. Barbieri, C. Sorlini y D. Daffonchio. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. *J. Appl. Microbiol.* **94**:248-257.