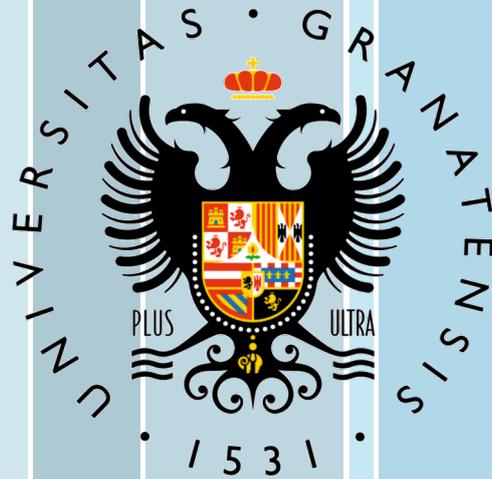


Universidad de Granada
Instituto de Investigación del Agua



Bioremediación de aguas contaminadas con
hidrocarburos mediante sistemas
bio-absorbentes

Tesis Doctoral
Alfonso Rodríguez Calvo
Granada 2017

UNIVERSIDAD DE GRANADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DEL AGUA



**BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON
HIDROCARBUROS MEDIANTE SISTEMAS
BIO-ABSORBENTES**

Tesis Doctoral

ALFONSO RODRÍGUEZ CALVO

GRANADA, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Alfonso Rodríguez Calvo
ISBN: 978-84-9163-647-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/41111>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DEL AGUA



**BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS CON
HIDROCARBUROS MEDIANTE SISTEMAS
BIO-ABSORBENTES**

**Memoria presentada por D. Alfonso Rodríguez Calvo
para la obtención del grado de doctor con mención
internacional por la Universidad de Granada**

Fdo: D. Alfonso Rodríguez Calvo

Directores:

Fdo: D. Jesús González López

Fdo: D. Miguel Ángel Gómez Nieto

El doctorando/the doctoral candidate Alfonso Rodríguez Calvo y los directores de tesis/and the thesis supervisor/s: D. Jesús González López y D.Miguel Ángel Gómez Nieto

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizados sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha/Place and date:

Director/es de la tesis/Thesis supervisor/s;

Doctorando/Doctoral candidate

Firma/Signed D. Jesús González López

Firma/Signed Alfonso Rodríguez Calvo

Firma/Signed D.Miguel Ángel Gómez Nieto

Este trabajo de investigación ha sido financiado por la empresa Compañía Logística de Hidrocarburos CLH, S.A.

Agradecimientos

El hecho de realizar un trabajo de investigación durante tanto tiempo, conseguir terminarlo y poder defender esta tesis doctoral no habría sido posible sin el apoyo de toda la gente que me rodea, y es por esto que quiero dedicar unas líneas para agradecer todo lo que han hecho por mí.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, D. Jesús González López, la confianza que ha depositado en mí, su dedicación y tiempo en “encaminarme”, y el trato excepcional que ha tenido conmigo. Muchas gracias de verdad.

A Miguel Ángel Gómez, codirector y tutor de esta tesis, por su atención y consejos desde el inicio, a la hora de ir completando todos los pasos que he tenido que ir siguiendo.

También quiero agradecer a mis compañeros del Instituto del Agua, los que actualmente están y los que han pasado por aquí, especialmente a Clemen, Maxi, Eli, Tatiana, Nacho, Cristina, Chiara, Jessi, Isa, Lucero, Darío, María, Bárbara, Alex, Maribel y Ginés; quiero hacer una mención especial a Ismael, un compañero excepcional que vino a aprender de mí, y creo que al final ha sido 50/50; de todos ellos he aprendido algo y ha sido una suerte compartir esta etapa con vosotros.

Como no podía ser de otra forma, tengo que hacer una mención aparte a Andrea, mi compañera, amiga y casi de la familia. Me has enseñado tanto que no creo que llegue el día en que termine de agradecértelo. Gracias, mil gracias.

Por otro lado, quiero dar las gracias a mis amigos; llamadas de teléfono, whatsapps, cervezas totalmente necesarias y siempre un mensaje de apoyo han hecho que haya sido capaz de poder terminar esta “carrera de fondo”. Gracias al comando Oporto, Pedro, Lola y María; gracias al sector Baiona, Marta, Juan, Antonio, Paula, Héctor y compañía; y gracias a mis amigos de Granada: Adolfo, Araceli, Carlos, Gabriel, Juan, Lucía, Paloma, Val, Agu, Araceli M., Bego, Esther, Isa, Joseto, Marga, María, Marta, Matías, Mónica, Pablo, Rosana, Vela, y muy especialmente a Rafa, Rubén, Fernando y Carmencilla. De verdad muchas gracias.

Por último agradecer a mi familia, no puedo tener una mejor, que siempre han estado pendiente de mí. A mi abuelo, que sé que me apoya más que nadie, a mis tíos Maru, Pepe, Mari Paz, Pepa, Pepo, Concha, Jose, Ana, Agustín y Fina, y a mis primos Gabriela, Kike, Paula, Pepe, Rocío, Manu y Yago.

A mi hermana Cristina y David, que prudentemente preguntaban a mis padres cómo iba “el niño” por miedo a que la respuesta no fuese la que ellos esperaban. Gracias a los dos por estar ahí.

A mi padre, que desde pequeño me enseñó a esforzarme y trabajar duro para conseguir lo que me proponga. Hoy puedes estar orgulloso de lo que has hecho por mí. Gracias por todo papá.

Finalmente, a la persona que ha hecho que yo esté aquí. Lo eres todo para mí, y lo seguirás siendo. Perdóname por mis enfados y mi poca paciencia, ojalá los controlase. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu cariño, tu entrega y por ser como eres. Necesitaría 20 vidas para agradecértelo. Gracias por todo mamá.

Índice

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Hidrocarburos.....	9
1.2 Propiedades de los hidrocarburos.....	13
1.3 Contaminación de aguas por hidrocarburos.....	14
1.4 Métodos de remediación: Físico-químicos.....	17
1.4.1 Absorbentes y adsorbentes.....	18
1.5 Métodos de remediación: Biorremediación.....	21
1.5.1 Factores que influyen en la biodegradación.....	22
1.5.2 Estrategias de biorremediación.....	25
1.5.3 Rutas de biodegradación.....	26
1.5.4 Especies degradadoras.....	32
1.6 Procesos de biopelículas microbianas.....	34
1.7 Exopolisacáridos.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.1 Muestras de Agua.....	45
3.2 Soportes absorbentes.....	46
3.3 Análisis de laboratorio.....	49
3.3.1 Toma y conservación de muestras.....	49
3.3.2 Análisis microbiológicos.....	49
3.3.3 Análisis físico-químicos.....	49
3.3.4 Estudios de Microscopía Electrónica (SEM).....	51
3.4 Ensayos de adherencia microbiana.....	51
3.4.1 Ensayos con la cepa bacteria <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> W18 (Ensayos I y II).....	52
3.4.2 Ensayos con la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado (Ensayos III y IV).....	53
3.5 Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos.....	53

3.5.1	Fase de tratamiento.....	54
3.5.2	Fase de biorremediación.....	60
3.6	Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	62
3.7	Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.....	64
3.8	Ensayos a escala planta piloto.....	65
3.9	Análisis estadístico.....	70
4.	RESULTADOS.....	71
4.1	Ensayos de adherencia microbiana.....	73
4.1.1	Ensayos I y II.....	73
4.1.2	Ensayo III.....	78
4.1.3	Ensayo IVA.....	80
4.1.4	Ensayo IVB.....	84
4.2	Ensayos de absorción y biodegradación.....	88
4.2.1	Ensayo V.....	88
4.2.2	Ensayo VI.....	97
4.2.3	Ensayo VII.....	102
4.2.4	Ensayo VIII.....	110
4.2.5	Ensayo IX.....	119
4.2.6	Ensayo X.....	129
4.3	Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	134
4.4	Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.....	139
4.5	Ensayos a escala planta piloto	145
5.	DISCUSIÓN.....	153
6.	CONCLUSIONES.....	167
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	173

Resumen

La contaminación de aguas con hidrocarburos es un problema medioambiental que ocasiona daños ecológicos de gran importancia con un efecto negativo en diferentes ámbitos (salud, agricultura, pesca...etc.), y por ello provoca un interés y preocupación a nivel científico, social y de las autoridades. Una de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos son los derrames o vertidos, accidentales o intencionados; sin embargo, existen otras fuentes de contaminación mayor, debido a una mayor persistencia y frecuencia, como por ej. los efluentes locales e industriales.

En esta investigación el objetivo ha sido tratar aguas contaminadas con hidrocarburos procedentes de unas instalaciones de almacenamiento, transporte y distribución de hidrocarburos y productos petrolíferos.

Para ello se diseñaron biorreactores en los que se instalaron materiales absorbentes en su interior. Así, el tratamiento del agua se fundamentó en un proceso de biorremediación de los hidrocarburos por parte de las bacterias presentes en el agua; dicha degradación bacteriana se planteó como el resultado de combinar la biodegradación realizada por la microbiota presente en el agua del contaminante disuelto en ella con la degradación realizada por la población microbiana adherida al material absorbente de los hidrocarburos que quedaban retenidos en los mismos. Se estudió la microbiota presente en el agua y adherida a los soportes mediante técnicas microbiológicas, la formación de biopelícula por microscopía electrónica de barrido, y la evolución del contenido en hidrocarburos por gravimetría y cromatografía de gases/espectrometría de masas.

El diseño experimental consistió fundamentalmente en un escalado partiendo de ensayos a escala de laboratorio hasta la instalación de una planta piloto. En los primeros ensayos, se seleccionaron una serie de materiales absorbentes fabricados en fibra de polipropileno (Paño Sentec® y Cordón Sentec®) y corcho granulado (Corksorb® 01025 y Corksorb® 03025) y se alojaron en microcosmos de 1 litro de capacidad. En ellos se estudió la capacidad de estos materiales de promover en su superficie la formación de una biopelícula degradadora empleando en primer lugar una cepa con capacidad de adherencia conocida, *Pseudoalteromonas elyakovii*, para posteriormente comprobar dicha capacidad con la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado. A partir de los resultados de dichos ensayos se descartó el corcho hidrófilo Corksorb® 03025.

En una segunda etapa de ensayo, se diseñaron dos biorreactores de flujo horizontal y vertical, en los que del mismo modo se instalaron materiales absorbentes que retuviesen parte de los hidrocarburos presentes en agua. Se distinguieron dos fases

dentro de los ensayos, la primera de ellas denominada “fase de tratamiento” en la que se hizo pasar el agua a través del material absorbente promoviendo la degradación bacteriana de los hidrocarburos en el propio agua y la retención de los mismos en los soportes absorbentes; en una segunda fase, “fase de biodegradación”, se estudió la degradación microbiana por parte de los microorganismos adheridos de los hidrocarburos absorbidos a los soportes. Los resultados mostraron en primer lugar la necesidad de rediseñar el biorreactor de flujo horizontal para futuras investigaciones, ya que la instalación de las distintas unidades absorbentes en diferentes posiciones favoreció una desigual adhesión microbiana y absorción, y posterior biodegradación de los hidrocarburos retenidos. En cambio el diseño del biorreactor de flujo vertical, en el cual el material absorbente ocupaba la sección de paso de agua en su totalidad, favoreció tanto la adherencia microbiana como la retención y degradación por parte de la microbiota adherida. A partir de los resultados de esta batería de ensayos se determinó que el sistema constituido por el biorreactor de flujo vertical empleando el material absorbente Paño Sentec® era el sistema de tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos más eficaz.

En base a estos últimos resultados, se realizó un nuevo ensayo con este sistema tratando un mayor volumen de agua con una mayor carga de hidrocarburos, obteniendo nuevamente resultados satisfactorios.

Por otro lado, a partir de las cepas identificadas dentro de la microbiota adherida a los soportes absorbentes, se seleccionaron 5 bacterias y se realizaron ensayos de degradación de hidrocarburos empleando cada una de ellas de forma individual. Los ensayos mostraron que únicamente *Brevundimonas diminuta* mostró una capacidad de degradación en detrimento de las cuatro cepas restantes.

Finalmente, la última etapa del escalado consistió en la instalación y puesta en marcha de una planta piloto basada en el sistema de flujo vertical mencionado anteriormente. El diseño de la planta estaba constituido por cuatro biorreactores, dos de ellos con aireación adicional y dos sin ella, trabajando cada dos a distinto caudal. En esta planta se diferenció al igual que en los ensayos anteriores la fase de tratamiento y biorremediación. Los ensayos en planta mostraron nuevamente la eficiencia del sistema en el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos.

Por tanto, se puede concluir que se ha conseguido desarrollar un sistema que emplea materiales bio-absorbentes para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, cuya eficacia viene avalada por los resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

Hydrocarbon polluted waters is an environmental problem which causes serious ecological damage as well as having a negative effect on different areas (health, agriculture, fishing etc.). For this reason, it attracts interest and is a cause for concern not only for the scientific community, but also on a social and political level. One of the main sources of hydrocarbon contamination are spills or dumping, both accidental and intentional. However, there exist other larger sources of pollution due to increased persistency and frequency, for example, local and industrial effluents.

The aim of this research was to treat hydrocarbon polluted waters originating from hydrocarbons and oil product storage, transport and distribution facilities.

For this, bioreactors were designed inside of which absorbent materials were placed. This way, the treatment of the water was based on a hydrocarbon bioremediation process by the bacteria present in the water; said bacterial degradation was the result of combining the biodegradation carried out by the microbiota present in the water, in which the contaminant was dissolved, with the degradation carried out by the microbial population adhered to the absorbent material of the hydrocarbons that were held by these. The microbiota present in the water and adhered to the surfaces via microbiological techniques was studied, as was the formation of biofilm using scanning electron microscopy, and the evolution of the content in hydrocarbons using gravimetry and gas chromatography/ mass spectrometry.

The experimental design essentially consisted of a scale-up system from a laboratory scaled tests to the installation of a pilot plant. In the first tests, a series of absorbent materials made with polypropylene fibre (Pad Sentec® and Barrier Sentec®) and granulated cork (Corksorb® 01025 and Corksorb® 03025) were selected. These were then placed in microcosms with one-litre capacity. In these, the ability of these materials to promote the formation of a degrading biofilm on a surface was studied using firstly a strain whose adhesion capacity was known, *Pseudoalteromonas elyakovii*, and subsequently said capacity was checked with the indigenous microbiota to the polluted site. Corksorb® 03025 was ruled out on the basis of said tests.

In a second test phase, two horizontal and vertical flow setting bioreactors were designed, inside of which absorbent materials that would retain part of the hydrocarbons present in the water were installed. There were two phases in the tests. The first one was called the "treatment phase". In this one, the water was passed through an absorbent material promoting bacterial degradation of the hydrocarbons in the actual water and their retention on the absorbent surfaces. In the second, the "biodegradation phase", the microbial degradation by the adhered microorganisms of

the hydrocarbons sorbed by the surfaces was studied. Firstly, the results highlighted the need for the horizontal flow setting bioreactor to be redesigned in future studies, as the placement of the different absorbent units in different positions favoured an unequal microbial adhesion and absorption and subsequent biodegradation of the retained hydrocarbons. On the other hand, the design of the vertical flow setting bioreactor, in which the absorbent material took up the entire section through which the water passed, favoured both microbial adhesion and the retention and degradation by the attached microbiota. On the basis of this battery of tests it was ascertained that the system made up of the vertical flow setting bioreactor using the absorbent material Pad Sentec® was the most effective for the treatment of hydrocarbon polluted waters.

Based on these last results, a new test was carried out with this system treating a greater volume of water with a greater load of hydrocarbons, again obtaining satisfactory results.

On the other hand, from the strains identified in the microbiota attached to the absorbent surfaces, 5 bacteria were selected and hydrocarbon degradation tests were carried out using each of them individually. The tests showed that only *Brevundimonas diminuta* displayed degradation ability at the expense of the other four strains.

6

Finally, in the last stage of the scale-up process, the pilot plant based on the above-mentioned vertical flow setting system was installed and started functioning. The design of the plant was made up of four bioreactors, two of which had additional aeration, the other two did not, each pair working at different flow rates. In this plant, as was the case with the tests, there were two different phases: the treatment and the bioremediation phases. The plant tests displayed again the effectiveness of the system in the treatment of hydrocarbon polluted waters.

It can therefore be concluded that a system which uses bio-absorbent materials for the treatment of hydrocarbon polluted waters was developed, whose effectiveness has been proven by the results obtained in this research.

1.Introducción

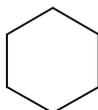
1.1 Hidrocarburos.

Los hidrocarburos, según la RAE, son “compuestos resultantes de la combinación del carbono con el hidrógeno”.

Los hidrocarburos se pueden clasificar en hidrocarburos de cadena abierta o de cadena cerrada:

- Hidrocarburos de cadena abierta:
 - Saturados: Son moléculas unidas mediante enlaces simples y se denominan alcanos. Su fórmula general es C_nH_{2n+2} , siendo n el número de átomos de carbono. Se subdividen en alcanos lineales, o ramificados en el caso de que un átomo de hidrógeno sea sustituido por un grupo funcional llamado grupo alquilo (Harayama et al., 1999). Estos compuestos también son denominados como parafinas (Harayama et al., 2004).
 - Ejemplo: Decano, $CH_3-(CH_2)_8-CH_3$
 - Insaturados: Son moléculas formadas por átomos unidos por enlaces dobles, denominándose alquenos (C_nH_{2n}), o por enlaces triples, en cuyo caso se denominan alquinos (C_nH_{2n-2}). También pueden presentar ramificaciones (Nolan, 2010).
 - Ejemplo: 2-Buteno, $CH_3-CH=CH-CH_3$
 - Ejemplo: 1-Butino, $CH_3-CH_2-C \equiv CH$
- Hidrocarburos de cadena cerrada:
 - Alicíclicos: Se subdividen en saturados e insaturados
 - Saturados: Poseen uno o varios esqueletos de carbono formado exclusivamente por átomos de carbono unidos entre sí mediante enlaces simple. Se denominan cicloalcanos o alcanos cíclicos. Su fórmula general es C_nH_{2n} (Harayama et al., 1999). Estos compuestos también son denominados como naftenos (Harayama et al., 2004).

- Ejemplo: Ciclohexano

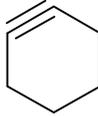


· Insaturados: Presentan en su estructura al menos un enlace doble, en el caso de los cicloalquenos (C_nH_{2n-2}), o un enlace triple (C_nH_{2n-4}), denominándose cicloalquinos.

➤ Ejemplo: Ciclopenteno

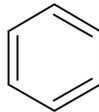


➤ Ejemplo: Ciclohexino



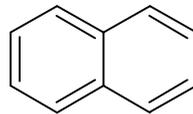
· Aromáticos: También denominados bencénicos, poseen al menos un anillo aromático formado por 6 átomos de carbono unidos por tres enlaces simples y tres dobles enlaces alternos (Harayama et al., 1999).

➤ Ejemplo: Benceno



Dentro de los hidrocarburos aromáticos, destacar los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), formados por dos o más anillos aromáticos.

➤ Ejemplo: Naftaleno



Son subproductos de la combustión incompleta de combustibles fósiles, biomasa y de actividades antropogénicas. Se presentan como sólidos incoloros, blancos / amarillo pálido con baja solubilidad en agua, puntos de fusión y ebullición altos y baja presión de vapor, y son omnipresentes en el medioambiente. Los PAH presentan una elevada toxicidad, de hecho son clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). Además son mutagénicos y carcinógenos. (Haritash and Kaushik, 2009; Pandey et al., 2016; Zhang et al., 2016).

El número de anillos aromáticos influye en las propiedades químicas del hidrocarburo. Por lo general, un aumento en el tamaño y angularidad del PAH resulta en un aumento de su hidrofobicidad y estabilidad electroquímica, lo que

contribuye a disminuir su solubilidad en agua y aumentar su persistencia (Haritash and Kaushik, 2009; Pandey et al., 2016).

Por ejemplo, el naftaleno es el más simple con dos anillos y es el más soluble de los PAH. Por otra parte, el benzopireno, un PAH típico de alto peso molecular con cinco anillos, es uno de los PAH más recalcitrantes y tóxicos (Pandey et al., 2016).

La presencia de los PAH en muy distintos hábitat naturales, la resistencia a la biodegradación, el potencial de bioacumulación y la actividad carcinogénica han hecho que exista una gran preocupación ambiental y sanitaria hacia estos compuestos (Haritash and Kaushik, 2009), lo que ha determinado grandes esfuerzos científicos en su biorremediación.

Tabla 1. Clasificación de hidrocarburos.

CLASIFICACION DE HIDROCARBUROS		
Hidrocarburos de cadena cerrada		
Saturados	Formados por enlaces simples	- Alcanos: Propano, Butano, Pentano...etc.
Insaturados	Poseen dobles o triples enlaces	- Alquenos: 1-Buteno, 2-Penteno...etc. - Alquinos - Propino, 1-Butino...etc.
Hidrocarburos de cadena abierta		
Saturados	Formados por enlaces simples	- Cicloalcanos: Ciclopentano, Ciclohexano...etc.
Insaturados	Poseen dobles o triples enlaces	- Cicloalquenos: Ciclopenteno, 1,3Ciclohexadieno...etc. - Cicloalquinos: Ciclopropino, Ciclobutino...etc.
Aromáticos	Poseen al menos un anillo aromático	- Monoaromáticos: Benceno, Fenol - Aromáticos Policíclicos (PAH): Naftaleno, Fenantreno.

El petróleo puede definirse como un líquido viscoso, bituminoso de origen natural formado por una mezcla de compuestos orgánicos, en su mayoría hidrocarburos. Actualmente se conocen más de 200 hidrocarburos que forman parte del petróleo (Avandeeva et al., 2014).

El petróleo consiste fundamentalmente en una mezcla de compuestos no acuosos e hidrófobos, en su mayoría hidrocarburos aromáticos y alifáticos saturados, además de resinas (piridinas, quinoleínas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) y asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y forfirinas) en menor proporción. (Ganesh Kumar et al., 2014; Grace Liu et al., 2011).

A diferencia de las fracciones aromáticas y saturadas, resinas y asfaltenos, contienen compuestos polares distintos a los hidrocarburos y son las fracciones más pesadas del petróleo. En su composición figuran, además de carbono e hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno. La estructura química de las resinas y asfaltenos es muy compleja (Harayama et al., 1999). En términos generales podemos decir que los asfaltenos son compuestos formados por una gran cantidad de anillos aromáticos unidos entre sí por cadenas parafínicas, solubles en solventes aromáticos e insolubles en alcanos saturados de cadena corta. Las resinas son compuestos poliaromáticos similares a los asfaltenos pero de menor peso molecular y caracterizados por relación cadenas parafínicas/anillos aromáticos más alta.

El petróleo es un compuesto orgánico que se extrae de la corteza terrestre y se transporta a diferentes partes del mundo fundamentalmente mediante oleoductos y buques cisterna. El producto sin refinar se denomina crudo. En la refinería, el petróleo crudo se separa en fracciones ligeras (de gases de refinería y de gasolina), fracciones intermedias (queroseno y gasóleo), y fracciones pesadas (fuelóleo ligero, fuelóleo pesado y asfalto) (Rodríguez-Trigo et al., 2007).

La composición de los hidrocarburos del petróleo varía ampliamente, y cada componente tiene diferentes propiedades físico-químicas (viscosidad, solubilidad y capacidad de absorción, biodisponibilidad o toxicidad) (McGenity et al., 2012). No obstante, los hidrocarburos del petróleo son los componentes más peligrosos del mismo debido a su riesgo medioambiental y para la salud humana (Ros et al., 2014).

Los hidrocarburos son considerados como contaminantes persistentes debido a su naturaleza recalcitrante a la biodegradación, su bioacumulación en el medio ambiente y sus efectos nocivos para la salud al exponerse a ellos (Ganesh Kumar et al., 2014).

1.2 Propiedades de los hidrocarburos.

Existen un gran número de propiedades de los hidrocarburos a tener en cuenta, como son los límites superior e inferior de inflamabilidad, volatilidad, viscosidad, etc. No obstante, considerando las características de nuestro estudio nos referiremos solo a los que afectan a su biodisponibilidad y degradabilidad. En este sentido, en lo que respecta a la disponibilidad de los hidrocarburos para ser degradados, destacar la solubilidad, que representa la capacidad que tiene una sustancia para disolverse en un determinado medio. La solubilidad en agua viene condicionada por la estructura molecular de la sustancia, siendo más insoluble cuanto mayor es la cadena hidrocarbonada de la molécula, cuanto menor es el número de grupos funcionales polares (con oxígeno o nitrógeno), cuanto mayor es el grado de sustitución de hidrógenos por Cl en el caso de organoclorados y cuanto mayor es el número de anillos aromáticos en el caso de PAH. A igualdad de peso molecular, los hidrocarburos aromáticos son más solubles en agua que los alifáticos, hasta 4 veces mayor, por lo que se suelen encontrar en mayor concentración en el agua (Vieira et al., 2007).

En cuanto a la polaridad, destacar que los hidrocarburos son moléculas apolares o débilmente polares (en el caso de los aromáticos), por lo que tienen poca afinidad por el agua y por tanto son difícilmente degradables por los microorganismos de ésta. Además tienen mayor afinidad a medios apolares, por lo que tienden a adsorberse a éstos.

Finalmente, otra propiedad que destacaremos y a la que se hará referencia más adelante, la biodisponibilidad, puede ser definida como la fracción de una molécula que está disponible para una conversión biológica (Guo et al., 2016). Viene determinada fundamentalmente por la solubilidad de la sustancia, y hay que considerar que el uso de surfactantes aumenta la biodisponibilidad de la misma favoreciendo la formación de emulsiones estables (Chen et al., 2013).

La importancia de la solubilidad radica en que para que una sustancia esté disponible para los microorganismos, y así poder degradarla biológicamente, ha de ser soluble en agua o, al menos, poderse dispersar en ella (emulsionar) mediante el uso de surfactantes ya mencionados (Calvo et al., 2009; Christofi and Ivshina, 2002).

Como se acaba de señalar, los hidrocarburos alifáticos son poco solubles en agua; en otras palabras, destacar que la hidrofobicidad que caracteriza a los hidrocarburos alifáticos limita su biodisponibilidad (Pasumarthi et al., 2014).

1.3 Contaminación de aguas por hidrocarburos.

La conservación del medio ambiente en aguas marinas y continentales es objeto de preocupación desde hace años. Existen diversos factores tanto antropogénicos como climáticos que han provocado cambios en los mismos y en los recursos que provienen de ellos (Coll et al., 2016).

Centrándonos en los factores antropogénicos, destacar la contaminación de aguas por hidrocarburos, problema medioambiental que afecta a los ecosistemas acuáticos, a las especies que habitan en ellos, así como a los productos que se obtienen de los mismos. Por ello, esta contaminación supone un riesgo para el medioambiente y para la salud humana, por lo que existe una elevada concienciación a nivel social, científico y de las autoridades por atajar este problema (Soliman et al., 2014).

Los vertidos suponen una amenaza para el medioambiente que, a día de hoy, no parece que vaya a desaparecer a corto plazo a pesar de que se toman medidas preventivas para minimizar su efecto (Al-Majed et al. 2012). La demanda de petróleo se ha visto incrementada en las últimas décadas debido al crecimiento poblacional y a la industrialización (Abbasian et al., 2016), factores estos que determinan que la problemática generada no parezca de fácil resolución. Además hay que considerar que no solo se trata de un problema medioambiental y para la salud, sino que también afecta a otros sectores de la sociedad como el turismo, la pesca o la acuicultura (Cirer-Costa, 2015)

Una de las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos son los derrames o vertidos, accidentales o intencionados, cuyo número se está incrementando en los últimos años debido al aumento del transporte y prospecciones petrolíferas en aguas oceánicas (Bao et al., 2014). En los últimos años, han tenido lugar diversos accidentes de gran magnitud y repercusión, como el hundimiento en 2002 del buque "Prestige" a 130 millas de las costas gallegas y a una profundidad de 3500m; el vertido, de 77.000 toneladas de crudo, afectó a 300km de la costa noroeste de España y parte de la francesa (de la Huz et al., 2005). Fuera de nuestro país, la explosión en 2010 de la plataforma petrolífera "Deepwater Horizon" en el Golfo de México supuso la liberación en aguas marinas de 4,9 millones de barriles de petróleo a una profundidad de 1500m durante 85 días aproximadamente (Liu et al., 2012).

Sin embargo, existen otras fuentes de contaminación de ecosistemas acuáticos que suponen una amenaza mayor, debido a una mayor persistencia y frecuencia, como por ejemplo los efluentes locales e industriales, las instalaciones de almacenamiento de petróleo marítimas y costeras, la quema de residuos...etc. (Silva-Castro et al., 2013).

Por otro lado, en 2003, el Centro Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos de América (National Research Council) dividió los derrames de crudo en cuatro categorías; filtraciones naturales, extracción/producción, consumo y transporte. Según este organismo, más del 60% del crudo presente en masas de agua proviene de filtraciones naturales de origen geológico, en los que la acción humana no influye (Ramseur, 2007).

La persistencia de los hidrocarburos en el medioambiente depende de sus propiedades fisicoquímicas. Cuantos más compleja es su estructura, más halogenados y más hidrófobos son, mayor tendencia tienen a acumularse en sedimentos y asociarse a partículas de éstos (Perelo, 2010).

Cuando un derrame llega a una masa de agua, deja de existir como una mezcla de componentes y sufre una serie de procesos fisicoquímicos y microbiológicos, como se observa en la figura 1 (Kleindienst et al., 2015)

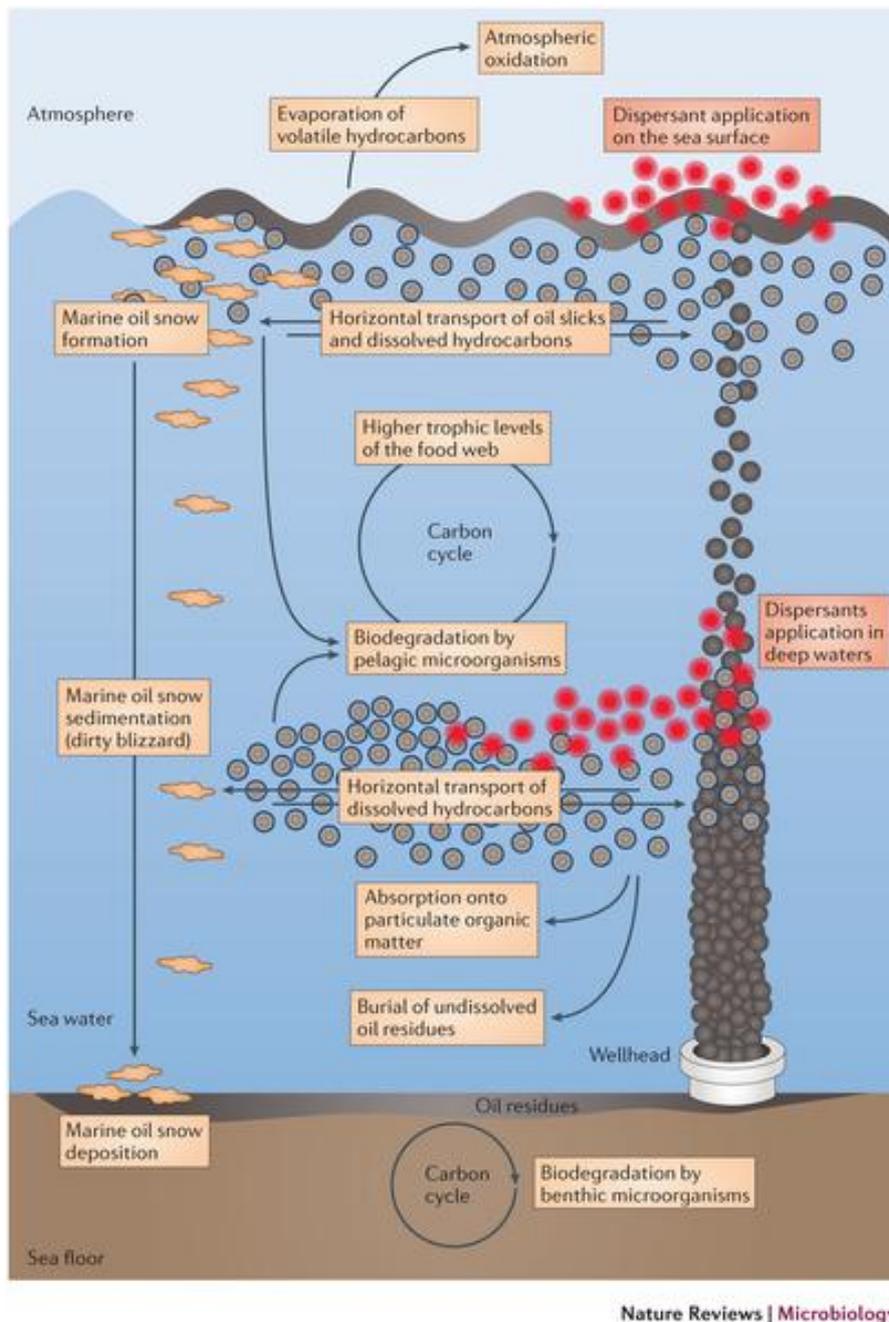


Figura 1. Procesos ocurridos en una masa de agua tras un derrame (Kleindienst et al., 2015). El destino del derrame depende de las condiciones meteorológicas así como de la composición del mismo. El impacto ambiental se agrava al llegar a zonas costeras o riberas, donde puede provocar la muerte masiva de especies por diversas vías, como la ingesta de crudo o la pérdida de propiedades hidrofóbicas de la piel o de las plumas de las aves, lo que les provoca la muerte por hipotermia, por citar algunos ejemplos (McGenity et al., 2012).

Los efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre los seres vivos puede clasificarse en tres categorías: Efectos directos letales (impiden la respiración o modifican la resistencia térmica, como en el caso de las aves mencionado

anteriormente, provocando la muerte), efectos directos subletales (se producen tras la ingestión de los hidrocarburos provocando alteraciones genéticas, bioquímicas o fisiológicas que reducen la supervivencia y eficacia biológica) o indirectos (provocando cambios en los ecosistemas que derivan en modificaciones de las estructuras de las comunidades biológicas y de la red de interacciones existentes) (MAPAMA, 2017).

Los hidrocarburos pueden entrar dentro de la cadena alimentaria, lo que supone un riesgo de intoxicación para todos los miembros de la misma, incluida la población humana, como se ha mencionado anteriormente (Dellagnezze et al., 2014).

En lo que respecta a acuicultura y pesca, la presencia de hidrocarburos en el mar puede provocar la disminución y hasta la pérdida de ciertas especies de peces, mariscos y otros organismos que no tienen la capacidad de degradarlos, utilizarlos o reciclarlos (Rodríguez-Chaves et al., 2014). En el ámbito del turismo, obviamente el hecho de que un derrame se produzca próximo a una zona de gran afluencia turística supone un perjuicio económico ante el descenso de la afluencia de visitantes (Rekadwad and Khobragade, 2015).

1.4 Métodos de remediación: Físico-químicos.

Tradicionalmente los métodos que se han empleado para la eliminación de hidrocarburos han sido físicos y en ocasiones químicos. Sin embargo, aunque son métodos de eficacia contrastada, rara vez son totalmente efectivos (Röling et al., 2002).

Entre los métodos físico-químicos destacan entre otros el uso de barreras y skimmers, la quema *in situ* de crudo en agua, o el uso de dispersantes. El problema de estas técnicas son sus limitaciones y que en general son poco respetuosas con el medio ambiente (Al-Majed et al. 2012; Yoo et al., 2012).

El uso de barreras y skimmers presenta la ventaja de que no supone ningún daño medioambiental (Castro et al., 2010). Las barreras concentran, contienen o desvían el contaminante, mientras que la recuperación del mismo se hace mediante el uso de bombas o skimmers (Muttin, 2008). La limitación de estos mecanismos es que las barreras sólo son eficaces en condiciones de agua tranquila con poco viento o pocas corrientes, además de que la tasa de recuperación viene influenciada por la viscosidad, temperatura y espesor del derrame (Al-Majed et al. 2012; Broje and Keller, 2007).

La quema de crudo en agua *in situ* permite eliminar entre 100 y 300 toneladas a la hora, pero la generación de una gran cantidad de humo (que da lugar a una "lluvia de

crudo”), la generación de residuos viscosos y la emisión de gases tóxico limitan esta práctica (Al-Majed et al., 2012).

Como ya se ha destacado, la solubilidad de los hidrocarburos en agua es baja y la degradación biológica de los mismos se produce en la interfase entre estos compuestos y el agua. Los dispersantes son tensioactivos que reducen la tensión interfacial de dicha interfase facilita la dilución de los hidrocarburos y por tanto su biodisponibilidad y biodegradación (Personna et al., 2014; Zhao et al., 2015). Sin embargo la limitación del uso de éstos es que su coste es elevado y que contienen compuestos tóxicos para la flora y fauna acuática (USDA, 2008).

1.4.1 Absorbentes y adsorbentes.

Otro método físico que se ha empleado desde años para el tratamiento de aguas con hidrocarburos es el uso de absorbentes, elementos que absorben el hidrocarburo, y que posteriormente hay que gestionar como residuo. Su uso es generalmente más costoso que los procedimientos mecánicos convencionales excepto para los derrames de petróleo pequeños. Los absorbentes generalmente tienen que ser esparcidos y recuperados a mano, limitando así el área que puede ser limpiada por este proceso (USDA, 2008), con la problemática añadida de que posteriormente se genera un residuo cuya gestión tiene un elevado coste tanto a nivel técnico como económico. (ITOPF., 2014).

Dentro de los absorbentes se distinguen los materiales inorgánicos, caracterizados por ser materiales minerales baratos, de elevada densidad y de grano fino, ya sean naturales o procesados, y por tener una baja capacidad de retención de sólidos, por lo que liberan parte del material absorbido mientras se van hundiendo. Son materiales peligrosos y difíciles de manejar. Como ejemplos, la vermiculita, vidrio volcánico o cenizas tratadas mediante diversos métodos (Al-Majed et al. 2012; Gobierno de Canarias, 2005).

También se distinguen los absorbentes orgánicos. En primer lugar, los orgánicos naturales, cuyas principales limitaciones son que su capacidad de absorción es moderada, algunos de ellos tienden a hundirse y cuando se emplean sueltos son difícilmente recuperables, pero presentan la ventaja de que son biodegradables. Como ejemplos podemos citar el corcho o la turba (Gobierno de Canarias, 2005). En cuanto a los orgánicos sintéticos, decir que son los más empleados y consisten en materiales orgánicos sintetizados de manera artificial, como por ejemplo la fibra de poliuretano o de polipropileno; están disponibles en múltiples configuraciones (rollos, paños...etc.),

tienen una elevada capacidad de absorción y aunque no son biodegradables, son medioambientalmente seguros. (Al-Majed et al. 2012; Gobierno de Canarias, 2005).

Por otro lado, hay autores que hacen referencia al proceso de adsorción como uno de los mejores métodos para la eliminación de contaminantes en agua, especialmente para aquellos que son difícilmente biodegradables. Un adsorbente se define como un material que atrae y retiene en su superficie iones, átomos o moléculas. Aunque se trata de una tecnología que data de 1814, en la actualidad existen plantas de tratamiento de aguas que emplean esta técnica, que se caracteriza por su simplicidad en cuanto a instalación, operación, y su relativo bajo coste. Existen una gran variedad de materiales adsorbentes como el carbón activo, las zeolitas, sílice o arcillas (Bhatnagar, 2012; USDA, 2008).

Esta técnica se emplea para recuperar hidrocarburos de efluentes químicos y petroquímicos, y se precisa de adsorbentes con elevada superficie específica y una considerable vida útil (Hussein and Muthanna, 2016)

En bibliografía se puede observar que hay autores que emplean el término “sorbent” para hacer referencia a la adsorción, y otros en cambio se refieren al proceso de absorción. De hecho también se ha encontrado que se emplea el término “absorbente” a materiales o productos oleofílicos e hidrofóbicos, es decir que absorben y/o adsorben productos oleosos y repelen el agua (Gobierno de Canarias, 2005; USDA, 2008). De aquí en adelante, el término absorbente hará referencia a un material con capacidad de absorción y/o adsorción y los ejemplos mencionados anteriormente serán aplicables tanto a adsorbentes como a absorbentes, tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Tipos de materiales absorbentes.

TIPO DE ABSORBENTE	EJEMPLOS	CARACTERÍSTICAS
Orgánicos Sintéticos	Espuma de Poliuretano Fibra de Polietileno Fibra de Polipropileno Poliestireno en polvo Tejidos de Poliéster/Algodón	<ul style="list-style-type: none"> - Absorben hasta el 90% de su volumen o hasta 25% de su peso. - Comercializados en distintas configuraciones (mantas, rollos, paños...etc.). - No biodegradables, pero ambientalmente seguros (inertes).
Orgánicos Naturales	Corcho Turba Paja Hierba Caña de azúcar Semillas de algodón Espigas de maíz Serrín Fibra de celulosa Lana	<ul style="list-style-type: none"> - Absorben 5-10 veces su peso. - Biodegradables. - Tendencia a hundirse. - Liberan material absorbido al hundirse. - Si se emplean sueltos son difícilmente recuperables.
Inorgánicos	Vermiculita Vidrio volcánico Cenizas volcánicas Tierra de diatomeas Perlita Tizas Lana de vidrio	<ul style="list-style-type: none"> - Absorben 3-6 veces su peso. - Material ha de ser molido de grano fino (desventaja). - Pueden ser abrasivos. Difíciles y peligrosos de manejar.

Entre los ejemplos citados en la tabla 2, destacar el corcho, absorbente natural y económico del cual se obtienen subproductos como el corcho en polvo o los gránulos de corcho que son ampliamente empleados como absorbentes de hidrocarburos en agua (Pintor et al., 2012; Vilar et al., 2012), y la fibra de polipropileno, material sintético

de gran capacidad de absorción, disponible en múltiples configuraciones y de gran resistencia física y química (Wei et al., 2003).

1.5 Métodos de remediación: Biorremediación.

Los métodos fisicoquímicos tienen una efectividad limitada y pueden resultar poco económicos ante el reto que supone la remediación de hidrocarburos, ya sea ante episodios de contaminación eventuales como ante vertidos que se producen de forma regular. Debido a ello, es necesario recurrir a procesos naturales como la biorremediación (Röling et al., 2002 ; Vieira et al., 2007).

La biorremediación es un proceso biológico por el cual son eliminados la mayor parte de los hidrocarburos presentes en el medioambiente, que se basa en la capacidad metabólica de los microorganismos para transformar o mineralizar los contaminantes orgánicos en sustancias menos nocivas y no peligrosas, que luego se integran en ciclos biogeoquímicos naturales (Margesin and Schinner, 2001; McGenity et al., 2012). Se trata de un complejo proceso, que se aplica tanto al tratamiento de suelos como de aguas contaminadas, en el que están implicados una gran cantidad y variedad de microorganismos que emplean los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, por lo que a día de hoy, se postula como uno de los procesos más importantes en la eliminación de hidrocarburos del medioambiente. Estos microorganismos deben ser autóctonos del área contaminada (Dellagnezze et al., 2014; Guibert et al., 2012; Pandey et al., 2016).

Numerosos autores han estudiado y demostrado la capacidad de degradación de los microorganismos, presentando esta técnica como una prometedora alternativa a los tradicionales métodos físico-químicos (Beolchini et al., 2010; Díaz et al., 2000; Rodrigues et al., 2015; Sherafatmand and Ng, 2015; Townsend et al., 2004)

La biorremediación es una tecnología de remediación de hidrocarburos no destructiva, respetuosa con el medioambiente, económica y eficaz en cuanto a su tratamiento, aunque no siempre viable desde el punto de vista logístico, que intenta acelerar la biodegradación natural de los contaminantes optimizando las condiciones que influyen en dicho proceso (Lv et al., 2016; Margesin and Schinner, 2001; Zamani et al., 2014).

Para comprender el alcance y las vías de la biorremediación de hidrocarburos es esencial comprender primero las propiedades del contaminante en cuestión (composición, concentración, estado físico...etc.), los factores que influyen en la tasa de biodegradación, así como los mecanismos de degradación llevados a cabo por los microorganismos (Varjani, 2017).

A la hora de evaluar el avance del proceso de degradación biológica o grado de biorremediación de un contaminante, existen indicadores de biodegradación ampliamente usados desde hace tiempo. Destacar las relaciones pristano/fitano, c17 (heptadecano)/pristano y c18 (octadecano)/fitano como los más empleados (Dellagnezze et al., 2014; Ten Haven et al., 1988).

1.5.1 Factores que influyen en la biodegradación.

La tasa de biorremediación viene determinada fundamentalmente por las características del contaminante y por el tipo de microorganismos presentes en el emplazamiento contaminado (Hassanshahian et al., 2013). No obstante existen una serie de factores que influyen en que el proceso se desarrolle con mayor o menor efectividad.

- Factores físico-químicos.
- Composición del vertido o fuente de contaminación.

La composición del agente contaminante influye como no podía ser de otra forma en la eficiencia o rapidez del proceso de biorremediación. En el caso de la contaminación por hidrocarburos, la composición del crudo o cualquier otro vertido, influye en la composición de la población bacteriana. Así, en función del tipo de hidrocarburo, la biodegradación será más o menos viable (Sugiura et al., 1996).

En general, los alcanos de cadena intermedia (C10-C20) son los que se degradan más fácilmente, mientras que los policíclicos aromáticos (PAH) suelen ser difícilmente biodegradables. Así, la degradación biológica de las fracciones del crudo comienza degradando las fracciones alifáticas y las aromáticas más ligeras, mientras que el resto de fracciones aromáticas, junto con resinas y asfaltenos son consideradas recalcitrantes y únicamente consiguen ser eliminadas en condiciones óptimas en las que se alcanzan elevadas tasas de biodegradación; en ocasiones es necesario el uso previo de biosurfactantes y bioemulgentes (Hassanshahian et al., 2013; Leahy and Colwell, 1990; Ward et al., 2003)

De este modo, en general la biodegradabilidad de los componentes del petróleo decrece en el siguiente orden: Alcanos > Alcanos de cadena ramificada > Alquenos ramificados > Aromáticos ramificados de bajo peso molecular > Monoaromáticos > Cicloalcanos > PAHs > Asfaltenos (Tyagi et al., 2011).

- Estado físico de los hidrocarburos.

Cuando se produce un vertido, como consecuencia del viento o de las olas se forman emulsiones de crudo en el agua. La dispersión de hidrocarburos en la columna de agua en forma de emulsiones de aceite en agua aumenta la superficie del producto y por lo tanto su disponibilidad para el ataque microbiano. En cambio grandes masas de hidrocarburos tienen baja relación área/volumen por lo que la tasa de degradación es menor (Leahy and Colwell, 1990).

- Concentración.

La tasa de degradación de la mayoría de compuestos orgánicos es proporcional a la concentración del mismo, aunque en el caso de los hidrocarburos aromáticos de peso molecular mayor las tasas de biodegradación están relacionadas con la solubilidad del compuesto (Leahy and Colwell, 1990). Los hidrocarburos suponen una fuente de carbono y energía para los microorganismos, pero también en ocasiones resultan tóxicos, reduciendo la diversidad y abundancia bacteriana, que también se ven alteradas por las condiciones ambientales (Jung et al., 2014).

- Oxígeno.

La biodisponibilidad de oxígeno influye notablemente en la tasa de biodegradación de hidrocarburos (Personna et al., 2014). La importancia de la disponibilidad de oxígeno radica en el hecho de que la vía aeróbica, la cual se describe más adelante, es la estrategia más efectiva para la degradación de hidrocarburos (Abbasian et al., 2015; Varjani, 2017). Normalmente en las capas superiores de las columnas de agua marina, así como en masas de agua dulce no suele haber problema de disponibilidad de oxígeno (Leahy and Colwell, 1990).

- Temperatura.

La temperatura influye de manera notable en la tasa de biorremediación, fundamentalmente por su influencia sobre la actividad enzimática y sobre la naturaleza del contaminante. Un descenso de la temperatura supone una menor actividad enzimática, y por tanto una menor tasa de biodegradación. Además una temperatura baja implica mayor viscosidad del contaminante, así como una menor volatilidad de los alcanos de cadena corta y una mayor solubilidad de éstos, retrasando el inicio del proceso de biodegradación. Por tanto una mayor temperatura favorece la degradación biológica de los hidrocarburos, siempre que no se superen los 40°C, temperatura a partir de la cual la toxicidad del hidrocarburo aumenta (Salleh et al., 2003).

· pH.

Las tasas de degradación más elevadas se producen en condiciones de pH cercanas a la neutralidad, mientras que en condiciones de pH extremos tienen una influencia negativa en las tasas de degradación. En ambientes ácidos la biodegradación suele ser llevada a cabo por hongos, que normalmente son más tolerantes a valores bajos de pH, al igual que les sucede a las bacterias alcalófilas en el caso opuesto, en ambientes alcalinos (Salleh et al., 2003).

· Nutrientes.

La presencia de nutrientes, fundamentalmente nitrógeno y fósforo, es fundamental para que se lleve a cabo la degradación microbiana de hidrocarburos contaminantes, ya que la ausencia de ellos representa un factor limitante del proceso. Sin embargo, una elevada concentración de nutrientes también inhibe el proceso de degradación, fundamentalmente por la descompensación de la relación NPK (Nitrógeno, Fósforo y Potasio) (Das and Chandran, 2010). Por ello hay que encontrar la concentración y la selección de nutrientes adecuada, como demuestran algunas investigaciones ya realizadas (Nikolopoulou et al., 2013; Liebeg and Cutright, 1999).

· Salinidad.

La influencia que puede ejercer la salinidad en la biodegradación de hidrocarburos realmente puede deberse a la influencia sobre la actividad microbiana, ya que en ocasiones la actividad de determinadas bacterias se ve reducida en ambientes hipersalinos (Salleh et al., 2003).

· Presión Hidrostática.

Del mismo modo que la salinidad, la presión influye en la actividad microbiana y por tanto en la degradación biológica llevada a cabo por dichos microorganismos (Margesin and Schinner, 2001).

- Factores biológicos.

Varios son los factores que explican la eficacia de las técnicas de biorremediación en la degradación de los hidrocarburos contaminantes. Entre ellos destacar la biodegradabilidad de la mayoría de las fracciones de hidrocarburos presentes en crudos y sus derivados, la capacidad biodegradadora de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado, la versatilidad metabólica y capacidad de adaptación a las variaciones ambientales de estas poblaciones microbianas, o el enriquecimiento de las poblaciones degradadoras tras la llegada del contaminante. Sin embargo, en numerosas ocasiones los procesos de biorremediación se ven limitados por la poca

diversidad de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado o por la escasez de microorganismos con sustrato específico para degradar diferentes hidrocarburos en dicho emplazamiento (Calvo et al., 2008; Varjani, 2017).

1.5.2 Estrategias de biorremediación.

Existen dos estrategias de biorremediación, la bioestimulación y el bioaumentación. La primera de ellas, la bioestimulación, consiste en la adición de nutrientes, como nitrógeno o fósforo, para incentivar el crecimiento de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado y favorecer así el proceso de biorremediación (Dellagnezze et al., 2014). Cuando se produce un episodio de contaminación por hidrocarburos como por ejemplo un vertido, se incrementa la relación entre el carbono y el nitrógeno (C:N), y el carbono y el fósforo (C:P), limitando el proceso de biodegradación. Por otro lado hay que destacar que tanto ambientes marinos como humedales de agua dulce se caracterizan por carencia de nutrientes. Por tanto, esta adición de nutrientes favorece la degradación biológica de hidrocarburos (Das and Chandran, 2010; Mohajeri et al., 2010).

Otras alternativas en la estrategia de bioestimulación para degradar sustancias hidrófobas es la adición de sustancias con capacidad biosurfactante o bioemulgente. Se trata de sustancias sintetizadas por microorganismos que aumentan la solubilidad y por tanto la biodisponibilidad de los hidrocarburos reduciendo la tensión interfacial entre éste y el agua o emulsionándolos (Calvo et al., 2009).

Por otro lado, el bioaumentación consiste en inocular microorganismos degradadores en el ecosistema contaminado, ya sean autóctonos o alóctonos, contemplando incluso la inoculación de microorganismos modificados genéticamente. Algunos autores recomiendan el bioaumentación únicamente en casos en los que la bioestimulación no haya resultado exitosa. Y es que existe controversia sobre si esta técnica es adecuada o no, fundamentalmente por cómo influye el inóculo en la población bacteriana ya existente debido a episodios de depredación o competencia, así como por las limitaciones que imponen las condiciones fisicoquímicas del emplazamiento y del contaminante. (El Fantroussi and Agathos, 2005; Mroziak and Piotrowska-Seget, 2010; Wu et al., 2016).

1.5.3 Rutas de biodegradación.

Aunque existen una gran diversidad de microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos y en numerosos estudios se han aislado de ecosistemas contaminados, existe poca información relativa a los mecanismos de degradación que estos emplean (Tanase et al., 2013; Van Hamme et al., 2003).

El proceso de biodegradación incluye una serie de etapas en las que se emplean diferentes enzimas. Los hidrocarburos pueden ser metabolizados por diferentes microorganismos o por consorcios formados por cepas bacterianas pertenecientes al mismo o a diferentes géneros, bien para obtener energía o para incorporarlos como biomasa celular. Los microorganismos tienen mayor tendencia por degradar hidrocarburos alifáticos que aromáticos, fundamentalmente por la mayor biodisponibilidad de los primeros. Así, los hidrocarburos más sencillos pueden ser degradados por una amplia variedad de microorganismos, mientras que solo unos pocos son capaces de degradar los compuestos más complejos como PAHs, resinas y asfaltenos (Varjani, 2017).

Las rutas de degradación son llevadas a cabo mediante sistemas enzimáticos específicos. Este proceso de degradación biológica se inicia bien mediante la fijación de las células microbianas al sustrato, o bien produciendo biosurfactantes/bioemulgentes, biopolímeros, disolventes y ácidos (Varjani, 2017).

- Degradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos.

Los hidrocarburos alifáticos, dentro de la fracción saturada, se dividen en alcanos lineales, ramificados y cicloalcanos. A su vez, dentro de los alcanos lineales, se ha de distinguir entre gaseosos (menos de 8 átomos de carbono), los denominados de bajo peso molecular (C8-C16), de medio peso molecular (C17-C28) y de elevado peso molecular (>C28). Como ya se ha mencionado anteriormente, los de menor peso molecular son los más fácilmente degradables y medida que aumenta el peso molecular y la estructura es más completa, la biodegradación es más compleja, pero es cierto que alcanos de hasta 44 átomos de carbono pueden ser biodegradados. Además, las ramificaciones interfieren en el proceso de biodegradación inhibiendo el ataque microbiano y los cicloalcanos son especialmente resistentes a la biodegradación. En lo referente a la fracción insaturada, decir que los alquenos debido a la alta reactividad del doble enlace son más susceptibles a ser degradados que alcanos y aromáticos, pero cuanto más insaturada es la cadena hidrocarbonada más difícil es que se produzca la degradación biológica (Abbasian et al., 2015; Atlas, 1981).

La degradación de los hidrocarburos alifáticos por parte de microorganismos se inicia mediante una oxidación de un grupo metilo terminal del mismo, obteniéndose un hidrocarburo con un grupo alcohol siendo así una molécula más reactiva y empleando para ello una enzima alcano monooxigenasa. A continuación, el alcohol resultante se oxida mediante la enzima deshidrogenasa (alcohol deshidrogenasa) a aldehído, que a su vez se oxida a ácido graso mediante otra enzima deshidrogenasa (aldehído deshidrogenasa). Este ácido graso puede entrar en un proceso de β -oxidación oxidándose a acetilcoenzima-A, que es incorporada al ciclo de Krebs (Abbasian et al., 2015; Atlas, 1981).

La ruta de degradación de ramificados y cíclicos, a pesar de ser más recalcitrantes por su mayor insolubilidad y/o mayor toxicidad, existen microorganismos con capacidad de degradarlos biológicamente y en general sigue las mismas etapas que en los alcanos. En el caso de hidrocarburos alifáticos insaturados la oxidación inicial puede producirse sobre el doble enlace generándose un anillo epóxido mediante un proceso de epoxidación (Abbasian et al., 2015; Atlas, 1981).

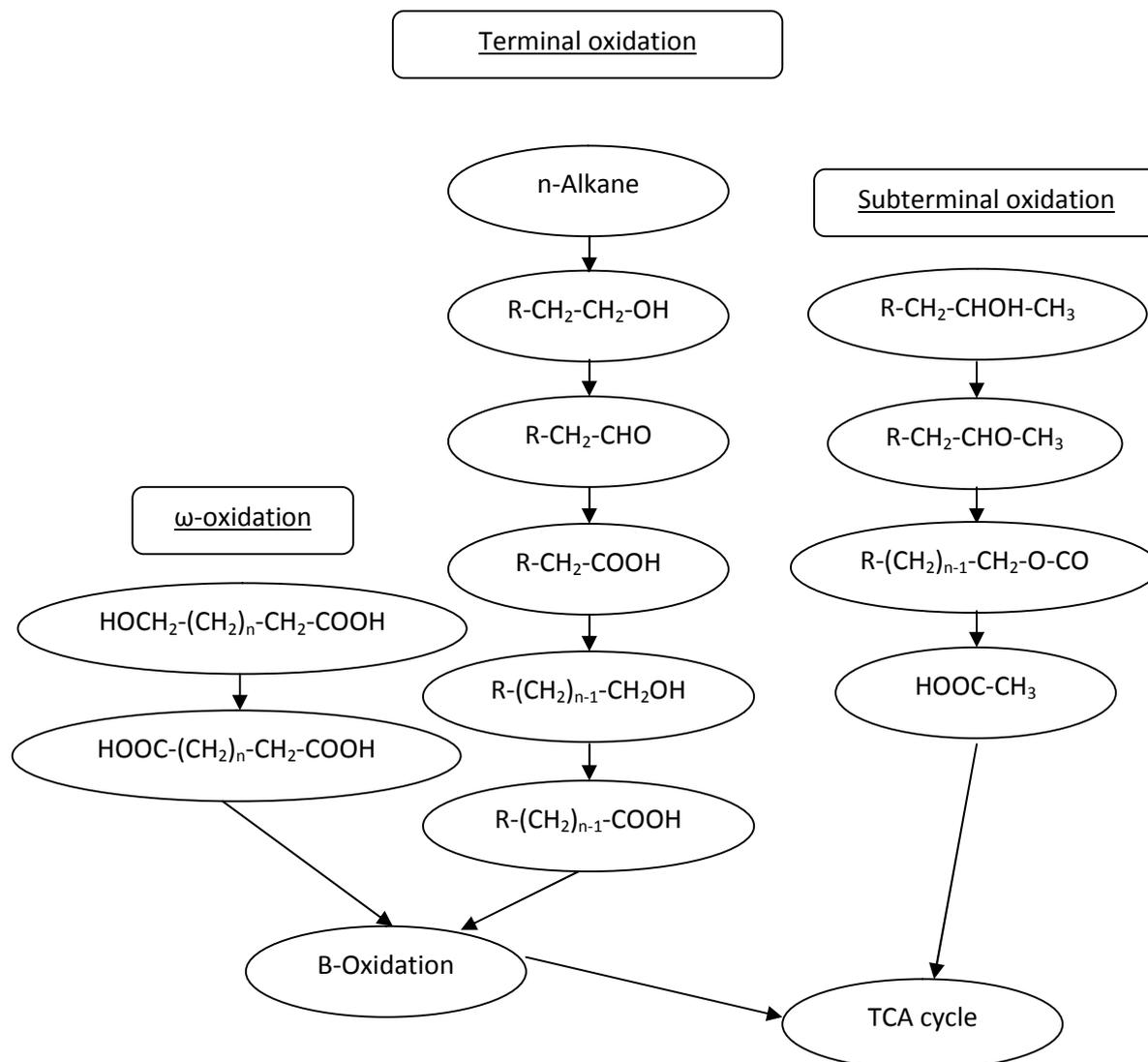


Figura 2. Esquema de la degradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos (Abbasian et al., 2015).

- Degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos.

La ruta de degradación biológica en el caso de hidrocarburos aromáticos se inicia con la oxidación del hidrocarburo a un compuesto "cis-dihydrodiol", mediante la ruptura del anillo aromático incorporando dos átomos de oxígeno empleando para ello la enzima dioxigenasa; la oxidación del anillo aromático es la etapa limitante del proceso de degradación de estos compuestos. Una vez perdida la aromaticidad, se produce una nueva oxidación a catecol, y de ahí existen dos rutas de degradación que dan lugar a diferentes ácidos (ácido succínico, fumárico, pirúvico y acético) junto con aldehído y acetilcoenzima-A, que son empleados por los microorganismos para la síntesis celular de sus constituyentes y la obtención de energía para ello (Juhasz and Naidu, 2000).

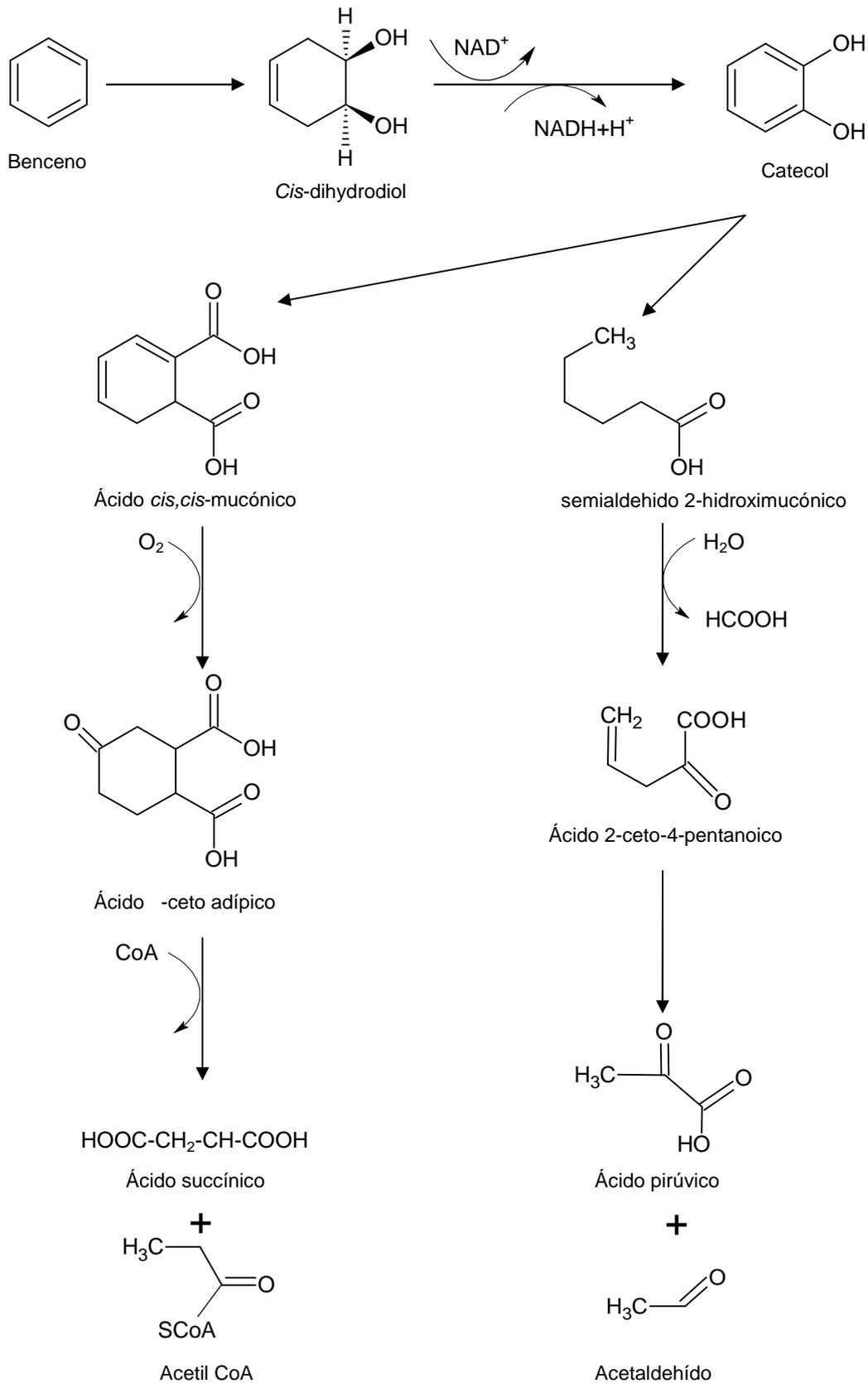


Figura 3. Esquema de la degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos (Juhasz and Naidu, 2000).

- Degradación anaeróbica de hidrocarburos alifáticos.

En el proceso de degradación anaeróbica de hidrocarburos existe un aceptor de electrones distinto al O₂. En el caso de la degradación anaeróbica se produce la adición de fumarato produciendo bencil succinato, que tras una serie de reacciones (oxidaciones, reducciones...etc.) da lugar a compuestos empleados como fuente de carbono y energía por los microorganismos (Widdel and Rabus, 2001).

- Degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos.

En el caso de hidrocarburos aromáticos, la ruta de degradación mejor caracterizada es la del tolueno, en la que la adición de fumarato mediante la enzima bencilsuccinato sintetasa da lugar a bencil succinato, que tras una serie de β-oxidaciones se convierte en bencilcoenzima-A. Tras una serie de reducciones se obtiene acetilcoenzima-A (Van Hamme et al., 2003).

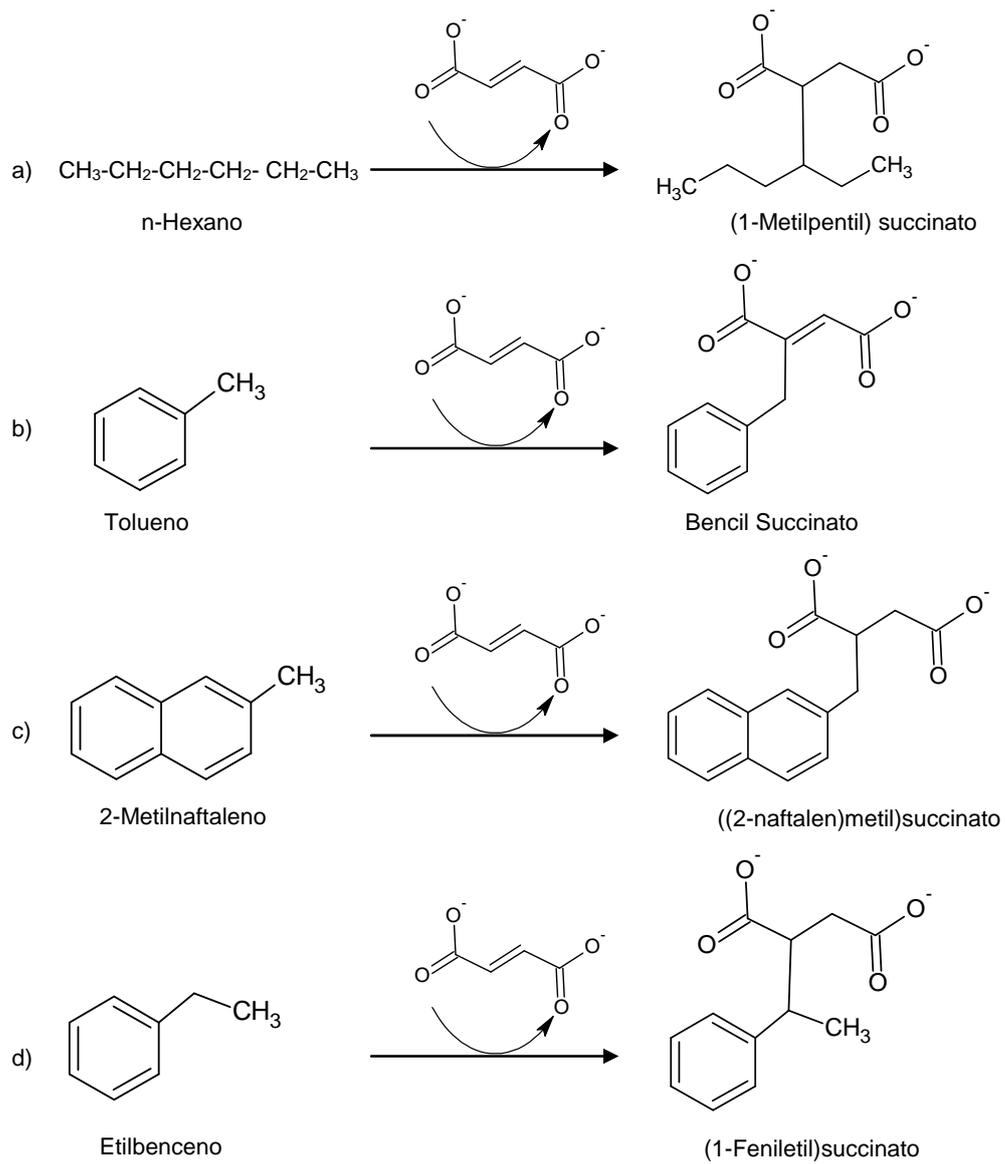


Figura 4. Esquema de la degradación anaeróbica de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Widdel and Rabus, 2001).

1.5.4 Especies degradadoras.

Como ya se ha expuesto, los agentes que llevan a cabo el proceso de biorremediación son los microorganismos presentes en el emplazamiento contaminado. A partir de algunos ensayos realizados se ha concluido que el proceso de biorremediación conduce a un aumento de la abundancia bacteriana del suelo debido a la presencia de nutrientes, acompañado de una disminución de la diversidad microbiana ya que únicamente sobreviven aquellas especies capaces de adaptarse a dicho emplazamiento contaminado. El proceso de biorremediación también conduce a cambios estructurales y funcionales en las comunidades microbianas (Ros et al., 2014).

En aguas contaminadas con hidrocarburos las comunidades cambian y constan de multitud de especies coexistentes, debido al uso compartido de recursos y es que el petróleo crudo consiste en una variedad de hidrocarburos químicamente distintos, que requieren mecanismos específicos para la activación y degradación. Los microorganismos rara vez actúan de forma aislada, por lo que hay que considerar consorcios microbianos como agentes de degradación y las interacciones entre sus miembros (McGenity et al., 2012).

En las últimas décadas el conocimiento acerca de la ecología, la fisiología, la bioquímica y la genética de los microorganismos degradadores de hidrocarburos ha avanzado de forma considerable. Existe una amplia variedad de microorganismos, incluyendo algas, bacterias, hongos y levaduras, que tienen la capacidad de degradar los hidrocarburos. Sin embargo, la comunidad bacteriana juega un papel fundamental en la biorremediación de la contaminación por hidrocarburos debido a una mayor versatilidad (Ganesh Kumar et al., 2014).

En lo que respecta a las bacterias, Das and Chandran (2010) indicaron que los géneros *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia*, y *Mycobacterium* son los principales géneros responsables de la biodegradación de hidrocarburos; además señalaron que los géneros *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, y *Rhodococcus* eran los principales géneros involucrados en la degradación biológica de hidrocarburos aromáticos, mientras que destacaron al género *Acinetobacter* en el caso de alcanos lineales.

En la tabla 3 se recogen las especies degradadoras recogidas por Pandey et al., (2016).

Tabla 3. Especies bacterianas degradadoras de hidrocarburos (Pandey et al., 2016).

HIDROCARBUROS	ESPECIES
Alcanos	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Candida Antarctica</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Ochrobactrum sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Alcaligene odorans</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> y <i>Rhodococcus sp.</i>
Monoaromáticos	<i>Brevibacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>B. stereothermophilus</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Ochrobactrum sp.</i> y <i>Achromobacter sp.</i>
PHA	<i>Alcaligenes odorans</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Achromobacter sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Mycobacterium flavescens</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Xanthomonas sp.</i>

También hay que destacar la competencia entre bacterias, por lo que el hecho de que aunque una bacteria predomine en presencia de una determinada fracción de hidrocarburos la presencia de otra hace que esta desaparezca. Podríamos citar el trabajo de McKew et al., (2007) en microcosmos que contenían agua marina adicionada de un determinado hidrocarburo y comprobaron que la presencia de pristano produjo un enriquecimiento selectivo de *Alcanivorax sp.*, y *Cycloclasticus sp.*, mientras que la adición de alcanos C12-C32 originaba un incremento de *Thalassolituus sp.* Resulta por tanto evidente que la presencia de un determinado hidrocarburo determina cambios significativos en las comunidades microbianas.

En el caso de la degradación fúngica, según Pandey et al., (2016) la degradación de los PAHs puede ser llevada a cabo por dos grupos de hongos, hongos no ligninolíticos (*Chrysosporium pannorum*, *Cunninghamella elegans* y *Aspergillus niger*) y ligninolíticos (*Pleurotus ostreatus* y *Antrodia vaillantii*). También las algas tienen la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos, como en el caso de las especies *Chlorella vulgaris* o *Scenedesmus platydiscus*.

Por su parte Das and Chandran (2010) destacaron como géneros fúngicos degradadores de hidrocarburos *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces* y *Graphium*.

Finalmente dentro de este apartado destacar que en estudios anteriores realizados por el grupo de investigación de Microbiología ambiental RNM270, se aisló la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, a partir de agua de mar extraída de fondo marino (4000 m de profundidad) en las proximidades del hundimiento del petrolero Prestige (Rodríguez-Calvo et al., 2017), y que se caracteriza por su capacidad de adherencia y formación de biopelículas.

1.6 Procesos de biopelículas microbianas.

El uso de microorganismos autóctonos en estado planctónico presentan la desventaja de que los microorganismos son diluidos en la masa de agua por lo que la opción más favorable es inmovilizarlos/adherirlos a un soporte (Radwan et al., 2002). Los microorganismos inmovilizados mantienen sus funciones biológicas con mayor estabilidad lo que hace que la eficacia de sus actividad celular se vea incrementada (Juarez-Jiménez et al., 2012).

El estilo de vida bacteriana más extendido es aquel en el que las bacterias viven adheridas a una superficie determinada formando una comunidad denominada biopelícula (Costerton et al., 1995). Una biopelícula se define como un conjunto de células microbianas inmovilizadas en una matriz polimérica, constituida por exopolisacáridos formados por las propias células, asociado a una superficie o interfase biótica o abiótica. Dicha biopelícula actúa como un ecosistema independiente extremadamente complejo (Davies et al., 1998; Percival et al., 2011).

Debido a la variedad de biopelículas en cuanto a estructura y composición definidas fundamentalmente por las condiciones ambientales, también a la variedad de las distintas superficies sobre las cuales se puede formar ésta, y a la complejidad del sistema en sí, no se puede definir un “Modelo de biopelícula” como tal, aunque sí se ha determinado el proceso de formación de la misma (Percival et al., 2011):

1. Formación de una película acondicionadora.

Los microorganismos no se adhieren directamente a una superficie o sustrato, si no que ésta previamente es acondicionada, de modo que en medio acuáticos está formada fundamentalmente por exopolisacáridos, además de glucoproteínas y compuestos húmicos. El papel que la película acondicionadora determina en el desarrollo de la biopelícula es su capacidad para modificar las propiedades físico-químicas del sustrato, además de proporcionar una fuente concentrada de nutrientes e importantes oligoelementos. Las características de la superficie influyen notablemente, de modo que las superficies más rugosas, hidrófobas y no polares, con presencia de fimbrias y flagelos favorecen la adhesión microbiana. Es importante señalar que las

películas acondicionadoras pueden realmente inhibir en lugar de promover la adhesión de ciertas bacterias (Percival et al., 2011).

2. Acercamiento de los microorganismos a las proximidades y adhesión a la superficie.

El transporte de células microbianas y nutrientes a una superficie se logra generalmente mediante una serie de procesos dinámicos de fluidos bien establecidos.

El proceso de adhesión se inicia con una adhesión reversible (o unión débil), seguida de una adhesión ya irreversible (o unión permanente); El grado de adhesión depende fundamentalmente del microorganismo en cuestión, además de la distancia de éste a la superficie y de las ya citadas propiedades de la misma como la presencia de exopolisacáridos, hidrofobicidad...etc. (Percival et al., 2011).

3. Formación de la biopelícula.

Tras el proceso de adhesión se produce el crecimiento microbiano, la formación de microcolonias y el “reclutamiento” de microorganismos adicionales. El crecimiento microbiano se debe a la producción y acumulación de polímeros extracelulares o exopolisacáridos (EPS). A medida que crece el número de microorganismos y la cantidad de matriz extracelular, se van agregando otras células, crece el espesor de la biopelícula y se forman canales a través de los que circula agua, oxígeno, nutrientes y otras sustancias. Debido a la complejidad de la estructura de la biopelícula se producen ambientes diferenciales donde varían las condiciones de pH, oxígeno y nutrientes, de modo que se produce una especialización de la población en cada uno de ellos.

Los microorganismos pueden crear condiciones favorables a otros tipos de microorganismos, estableciéndose una relación de cooperación entre ellos que les protege de perturbaciones externas, mejorando su supervivencia y adaptación (Percival et al., 2011).

4. Fase de dispersión.

En esta fase parte de los microorganismos adheridos a la superficie se separan de la misma. Algunos autores han categorizado esta separación en erosión, desprendimiento y abrasión. Se ha demostrado que existen diversos factores que influyen en este proceso como el pH o la temperatura, y que el grado de influencia en esta fase, y el desarrollo de esta fase en sí es específico de cada microorganismo (Percival et al., 2011).

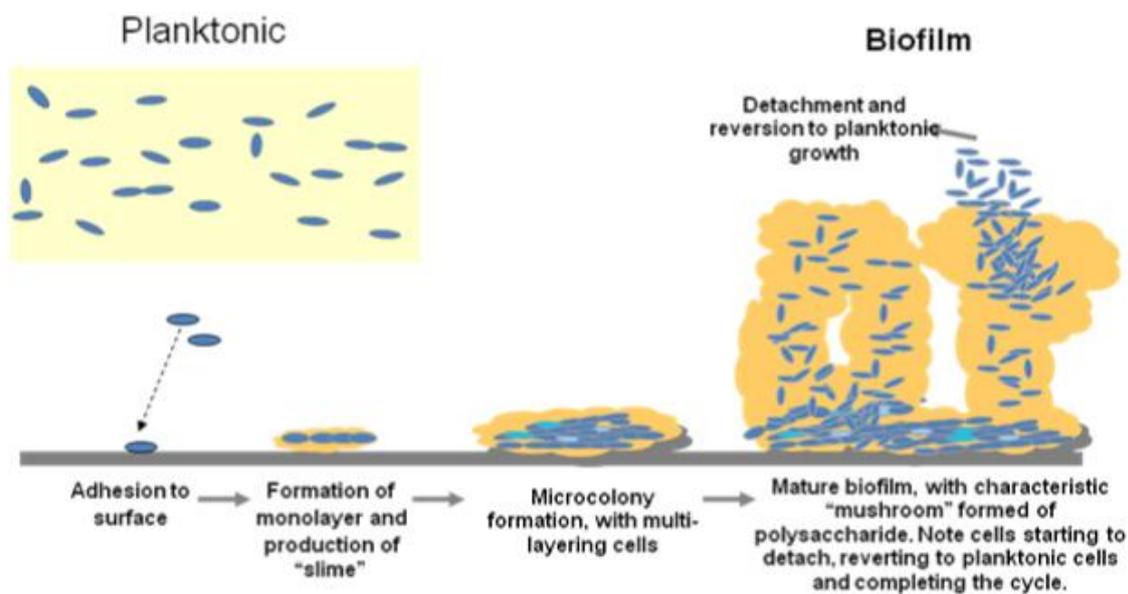


Figura 5. Esquema del proceso de formación de la biopelícula (Vasudevan, 2014).

Hay que destacar que los microorganismos que forman una biopelícula poseen una mayor eficiencia degradadora. Además las células de una biopelícula tienen mejores posibilidades de adaptación y supervivencia (especialmente durante períodos de estrés), ya que están protegidas dentro de la matriz, suponiendo una ventaja considerable respecto a los microorganismos planctónicos; la formación de una biopelícula protege a los microorganismos de distintos factores ambientales como puede ser la desecación o la radiación solar, además de permitir un mayor control del proceso de biodegradación (Al-Kharusi et al., 2016; Chandran and Das, 2011).

El uso de microorganismos inmovilizados ha sido ampliamente estudiado para la degradación de un gran número de sustancias tóxicas y en numerosos ámbitos y aplicaciones. Se ha demostrado la eficacia de los sistemas de tratamiento de aguas y efluentes industriales utilizando microorganismos inmovilizados (Calderón et al., 2013; Chandran and Das, 2011; Leyva-Díaz et al., 2015; Radwan et al., 2002). En consecuencia, la inmovilización de la biomasa puede ser un método eficaz para retener microorganismos degradadores, tales como degradadores de hidrocarburos.

1.7 Exopolisacáridos.

Los polisacáridos son biomoléculas complejas formadas por monosacáridos o azúcares simples unidos por enlaces glucosídicos. Cuando estas moléculas son producidas por células bacterianas y se encuentran en la superficie de éstas, se denominan exopolisacáridos o polisacáridos extracelulares (EPS), y pueden estar asociadas a otras macromoléculas de dicha superficie o totalmente distribuidos por ellas. Puede ser que se encuentren bien estructurados y unidos a las células, polisacáridos capsulares, o formando estructuras menos rígidas que se disocian fácilmente en el medio, en cuyo caso se denominan “capas mucosas” (Sutherland, 1972) .

La presencia de EPS asociados a células bacterianas se reconoce por la formación de colonias mucosas en el crecimiento de los microorganismos en medio sólido o por el aumento de la viscosidad del medio cuando se encuentran en un medio líquido. La visualización de exopolisacáridos se puede realizar mediante técnicas de microscopía tales como la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) o la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (Uad, 2012).

En muchas ocasiones los microorganismos producen exopolisacáridos en respuesta a amenazas o ataques que provienen del medio en el que habitan, por lo que se podría decir que los EPS actúan como protectores de la propia bacteria. Así, por ejemplo debido a la capacidad de retención de agua por su carácter hidrófilo, los EPS protegen a la célula de la desecación (Martínez-Checa, 1999).

Debido al ámbito de nuestro estudio de investigación, es obligatorio destacar que los EPS son esenciales como mecanismos de adhesión de biopelículas ya que son el componente fundamental de la matriz que conforman dicho ecosistema y llevan a cabo numerosas funciones tales como asegurar la integridad estructural, la adherencia de la superficie celular y la protección frente al estrés ambiental (Whiteley and Lee, 2015).

También hay que resaltar la capacidad bioemulgente de los EPS, que como ya hemos visto antes aceleran el proceso de biodegradación al aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes en agua, en este caso de los hidrocarburos, al estabilizar la emulsión que forman los hidrocarburos en agua (Uad, 2012).

Toda esta información pone de relevancia que los hidrocarburos son unos compuestos complejos, difícilmente tratables y que suponen un problema medioambiental que es necesario abordar y buscar soluciones que sean más eficientes y respetuosas con el medioambiente. Bajo esta premisa, el grupo de investigación RNM270 de la

Universidad de Granada, al cual pertenezco, lleva años investigando en esta materia con resultados más que satisfactorios.

Esta investigación, que en parte es una continuación o tiene su origen en otras ya realizadas, busca lograr desarrollar una tecnología que suponga una solución a dicho problema y que satisfaga los objetivos que se plantean para dicha investigación.

2. Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de un sistema de tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos, basado en el uso de materiales bioabsorbentes, en el cual la eliminación de dichos contaminantes sea consecuencia de un proceso combinado de absorción y biorremediación.

El planteamiento de dicha tecnología es tratar el agua haciéndola recircular a través de soportes absorbentes que tengan capacidad de adherencia microbiana. De este modo, la microbiota autóctona degradará en parte los hidrocarburos presentes en agua, así como los retenidos en los soportes al formar una biopelícula degradadora adherida a la superficie de los mismos.

Para alcanzar estos objetivos se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar materiales con alta capacidad de absorción de hidrocarburos que tengan la capacidad/propiedad de favorecer una adhesión microbiana en su superficie.
2. Diseño y construcción de un biorreactor a escala de laboratorio adaptado a las características del material absorbente seleccionado, que permita el adecuado tratamiento de efluentes contaminados con hidrocarburos.
3. Estudio de los procesos de biotransformación de los hidrocarburos, tanto en el agua a tratar por parte de la microbiota presente en el agua, como en los materiales absorbentes una vez retenidos por parte de la población microbiana adherida. De este modo se verificará la capacidad degradadora de la población microbiana disuelta en agua y aquella que forma una biopelícula adherida a los materiales absorbentes.
4. Selección de microorganismos con capacidad de degradación de hidrocarburos.
5. Escalado del sistema a nivel de planta piloto y establecimiento de las condiciones operacionales que permitan el correcto funcionamiento de la tecnología.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestras de Agua

Las muestras de agua utilizadas en nuestro estudio, procedieron de la empresa CLH, Compañía Logística de Hidrocarburos, ubicada en el puerto de Motril (Granada) (Figura 6). CLH es una empresa española dedicada al almacenamiento, transporte y distribución de hidrocarburos y productos petrolíferos. Como consecuencia de su actividad en sus instalaciones se generan unas aguas residuales contaminadas con hidrocarburos, debido a la condensación que se produce en los tanques de almacenamiento de producto (Figura 7), a la limpieza de barcos que transportan combustibles por vía marítima o al agua de lluvia que al caer en las instalaciones de la compañía arrastran los hidrocarburos. Destacar que los tanques de almacenamiento son unos depósitos cilíndricos fabricados en acero al carbono donde queda almacenado el producto que llega vía marítima, con un diámetro de 20 o 30m y una altura de 18m.

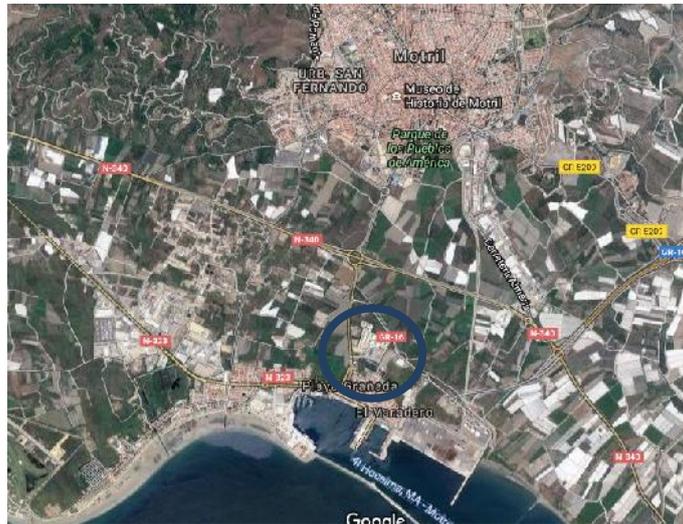


Figura 6. Localización de las instalaciones de CLH en Motril (Granada).



Figura 7. Vista de los depósitos de almacenamiento de las instalaciones de CLH en Motril (Granada).

Las aguas mencionadas tienen como destino común, un depósito recolector denominado “API” (Figura 8), que actúa como sistema de separación de la mezcla

hidrocarburo-agua. Este depósito/sistema API, con unas dimensiones de 6x4x3,8m y una capacidad de 91,2m³, posee una cinta o skimmer que recoge y extrae la capa superior de hidrocarburos generada durante el proceso de decantación. No obstante este método no determina la depuración completa del agua y además se genera un residuo sólido cuya gestión supone un elevado coste.



Figura 8. Vista general del depósito “API”(A). Detalle del skimmer instalado en el mismo (B).

Para realizar nuestro estudio se tomaron muestras de agua en recipientes de 25L de capacidad. La procedencia de dichas aguas fue tanto de la purga de los tanques de almacenamiento ya mencionados tomando el agua del paquete de purga (cámara de acero inoxidable asociada a los mismos que recoge el agua de condensación purgada), como del propio depósito API, tomando el agua a partir de la conducción de entrada o de salida del mismo. Una vez recogidas las muestras, se transportaron a las instalaciones del instituto del Agua de la Universidad de Granada para su posterior almacenamiento a 4°C en ausencia de luz. En la posterior descripción de los ensayos se indica la procedencia del agua empleada en cada uno de ellos.

3.2 Soportes absorbentes.

Los soportes absorbentes empleados en este estudio de investigación se seleccionaron atendiendo a su capacidad de absorción. Los materiales seleccionados como soportes fueron:

- Soportes de corcho. CorkSorb®.

Los soportes de corcho CorkSorb® son absorbentes 100% natural y biodegradables, empleados en restauración de sistemas acuáticos contaminados con hidrocarburos, que una vez utilizados pueden ser retirados del agua tratada y sometidos a procesos de biorremediación. En nuestro caso, este tipo de soportes fue suministrado por la empresa ADENSA S.A. Específicamente, en nuestro estudio se utilizaron dos soportes de corcho CorkSorb® 01025 y CorkSorb® 03025, cuyas características técnicas se detallan en la tabla 4.

El soporte CorkSorb® 01025, es un absorbente hidrófobo con textura granular que consiste en corcho con capacidad de absorción de aceites, hidrocarburos y disolventes sin absorber agua. En nuestro estudio se empleó en ocasiones alojado en una malla o en tejido inerte, de forma que pudieran ser manipulados los soportes de forma más idónea.

El soporte CorkSorb® 03025 es un material absorbente hidrófilo que consiste en gránulos de corcho que absorben los aceites, hidrocarburos, disolventes y agua.

Tabla 4. Características técnicas de los soportes absorbentes Corksorb®.

SOPORTES DE CORCHO. CORKSORB®		
SOPORTE	CorkSorb® 01025	CorkSorb® 03025
		
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS	<p>Embalaje: Bolsa papel 25 l (1,5 kg - 2,0 kg) o paquete con 4 "almohadas" de 100g de corcho granulado.</p> <p>Capacidad de absorción: 9,43 l de aceite/kg de absorbente, 17,3 l/bolsa.</p> <p>Densidad: 60 - 70 kg/m³</p> <p>Granulometría: 0,5 - 3 mm</p>	<p>Embalaje: Bolsa papel 25 l (5,3 kg – 9,2 kg) de corcho granulado.</p> <p>Capacidad de absorción: 20,1l de aceite/kg de absorbente, 12 l/bolsa.</p> <p>Densidad: 230 - 350 kg/m</p> <p>Granulometría: 0,5 - 1 mm</p>

· Soportes de fibra de polipropileno.

Los absorbentes "Oilsorb" de la empresa Sentec S.L., son un medio eficaz y económico para la contención y recuperación de vertidos de aceites y combustibles sobre tierra o agua dada su facilidad de manejo y su elevada absorción. En nuestro estudio se aplicaron dos tipos de estos absorbentes, cuyas características técnicas se detallan en la tabla 5.

El soporte Paño Sentec® tiene una presentación en forma de almohadillas cuadrangulares hechas de fibra de polipropileno o de rollo desenrollable. Sus características hacen al mismo ideales para recoger pérdidas de lubricantes de máquinas, líquidos refrigerantes, fluidos hidráulicos, fluidos de corte en la industria del metal, derrames de hidrocarburos sobre tierra o agua, etc. El Rollo Sentec® tiene una

presentación cilíndrica en el que el material queda enrollado y se emplea a escala planta piloto.

El soporte Cordón Sentec® está construido como barreras de fibra de polipropileno recubiertas de tela. Desde un punto de vista general estos absorbentes se han venido utilizando para grandes derrames de hidrocarburos evitando la extensión del vertido y la contaminación de zonas sensibles.

Tabla 5. Características técnicas de los soportes absorbentes Sentec®.

SOPORTES DE FIBRA DE POLIPROPILENO. SENTEC®		
SOPORTE	Paño/Rollo Sentec®	Cordón Sentec®
		
CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS	<p>Embalaje: Paquete de 200 paños de 40 x 52cm o de 1 rollo de 100cm x 42m</p> <p>Capacidad de absorción: 150 – 200L (dependiendo del combustible).</p> <p>Composición: polipropileno: 99,7 %, pigmento azul: 0,3 %.</p> <p>Peso seco: 175 g/m².</p>	<p>Embalaje: Cada paquete contiene 10 cordones de 125 x 7,5cm de diámetro. Peso del paquete: 4,5 kg</p> <p>Capacidad de absorción: 30 – 40L (dependiendo del combustible).</p> <p>Composición: polipropileno: 99,5 %, pigmento azul: 0,5 %.</p>

3.3 Análisis de laboratorio.

3.3.1 Toma y conservación de muestras.

Las muestras de agua fueron tomadas en frascos de vidrio de 1L de capacidad y fueron conservadas en condiciones de oscuridad a 4°C (Guiñez et al., 2017).

Las muestras de material absorbente o “soporte” se conservaron también en frascos de vidrio y en condiciones de oscuridad a 4°C. A la hora de tomar una muestra de dicho frasco para cualquier análisis se hizo por el método de “mezcla perfecta”, homogeneizando el material absorbente de forma que las muestras fuesen lo más representativas posibles.

3.3.2 Análisis microbiológicos.

El recuento de microorganismos heterótrofos presentes en el agua y adheridos al soporte se realizó mediante la técnica de siembra en placas de 0,1 ml de diluciones seriadas (1/10) en solución salina al 0,9%, en medio TSB 1/10, Oxoid®, (Caldo de Tripticasa Soja) adicionado de 14 g de Agar (Difco) como agente solidificante. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas. Todos los análisis se realizaron por triplicado para poder realizar el análisis estadístico de los resultados.

Destacar que a la hora de realizar la diluciones seriadas cuando se realizaba el análisis microbiológico a los soportes, los tubos de solución salina fueron sonicados durante 10 minutos en un baño modelo Ultrasons-H (JP Selecta©). Con objeto de conocer la cantidad exacta de muestra se calculó el peso seco de las mismas, seleccionando tres muestras de 1g aprox., y secándolas a 105°C durante 24h y volviéndolas a pesar; por diferencia de gravimetría se calculó el % de humedad de las muestras.

3.3.3 Análisis físico-químicos.

- Gravimetría

El análisis de hidrocarburos totales (TPH) se determinó por gravimetría según la norma EPA 8015. La extracción de hidrocarburos en agua se realizó empleando 100 ml de agua contaminada y 100ml de hexano/acetona (1:1) en matraces enlenmeyer de 500ml. Los matraces se agitaron a 70 rpm durante 1 hora en un agitador orbital AOS-0 (A & E Lab©), tras lo cual se dejó decantar la mezcla durante 1 hora en embudos de decantación de 1L para separar las fases (Figura 9). La fase acuosa se desechó y la fase del disolvente se filtró a través de papel de celulosa, recogiendo el filtrado en matraz redondo de 500ml. Los matraces se llevaron al rotavapor para eliminar el disolvente, a 90 rpm (modelo Laborota 4000 efficient -Heidolph©-). Una vez eliminado

el disolvente se dejaron secar los balones, se pesaron, y la diferencia de pesada respecto al peso de cada balón corresponde a la cantidad de TPH.

Por su parte, la extracción de los hidrocarburos absorbidos en los soportes se hizo del mismo modo que en el caso del agua, empleando 10 g de soporte y con la salvedad de que una vez agitados los matraces se sometieron a sonicación durante 10 minutos en un baño modelo Ultrasons-H (JP Selecta©). Con objeto de conocer la cantidad exacta de muestra se calculó el peso seco de las muestras, seleccionando tres muestras de 1g aprox., y secándolas a 105°C durante 24h y volviéndolas a pesar; por diferencia de gravimetría se cálculo el % de humedad de las muestras. Todos los análisis se realizaron por triplicado para poder realizar el análisis estadístico de los resultados.



Figura 9. Extracción de hidrocarburos.

- Cromatografía Gases-Espectrometría de masas.

Una vez extraídos los hidrocarburos, según lo descrito anteriormente, las muestras fueron diluidas en 20ml de cloroformo para posteriormente determinar las fracciones de hidrocarburos presentes en un cromatógrafo de gases HP 5890 Serie II (Hewlett Packard©), con una columna capilar (30 m x 0,32 mm I.D.) y helio como gas portador a 1,6 ml/min. Las determinaciones se realizaron con una velocidad de calentamiento de 4°C/min hasta una temperatura de 310°C. Cada fracción de hidrocarburos fue detectada usando un detector Selectivo de masa HP 5973 (Hewlett Packard©) en modo SCAN (barrido), los resultados obtenidos se compararon con un sistema de datos HP Chemstation que posee una librería Wiley 275 con aproximadamente 270.000 espectros de masa (EPA. 1996). Todos los análisis se realizaron por triplicado para poder realizar el análisis estadístico de los resultados.



Figura 10. Cromatógrafo de gases – Espectrómetro de masas.

3.3.4 Estudios de Microscopía Electrónica (SEM).

Las muestras de soporte para su examen mediante microscopía electrónica fueron conservadas en condiciones de frío (4°C) inmersas en una solución fijadora de PBS al 2.5% en glutaraldehído hasta su análisis. Previamente, se llevó a cabo un procedimiento para su correcta preparación que consistió en la eliminación del líquido fijador que contenía la muestra y la posterior adición de un nuevo mililitro de la solución fijadora. Este proceso se repitió dos veces con un margen de 20 minutos entre ambas. Finalmente las muestras fueron analizadas en el servicio de microscopía electrónica de la Facultad de Farmacia y del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

3.4 Ensayos de adherencia microbiana

Estos ensayos se llevaron a cabo con objeto de determinar la capacidad de adherencia o adhesión microbiana por parte de los soportes absorbentes seleccionados. Para ello se realizaron cuatro ensayos diferentes que fueron denominados como I, II, III y IV. En los ensayos I y II se empleó una cepa aislada previamente por el grupo de investigación de Microbiología ambiental RNM270 a partir de agua de mar extraída en las proximidades del hundimiento del petrolero “Prestige” y de conocida capacidad de adherencia y formación de biopelícula, *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 (Rodríguez-Calvo et al., 2017). En los ensayos III y IV se evaluaron estas propiedades de los soportes empleando la microbiota autóctona del agua contaminada.

Para estos ensayos se diseñaron microcosmos de 1L de capacidad con 400 ml de medio de cultivo y el volumen equivalente a 200ml de soporte absorbente (Figura 11).

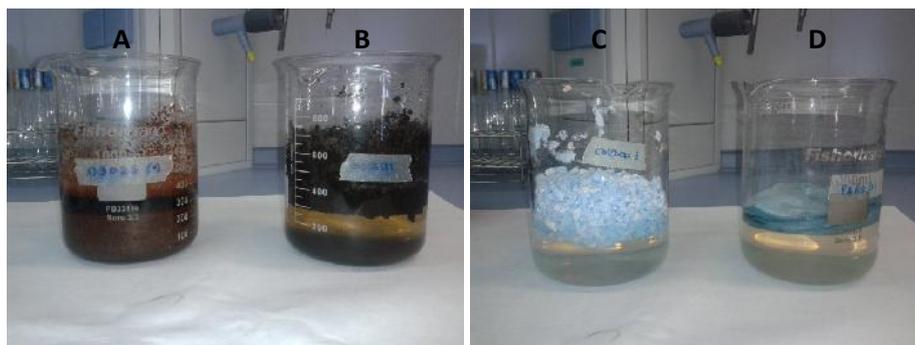


Figura 11. Microcosmos empleados en los ensayos de adherencia. A) CorkSorb® 03025 B) CorkSorb® 01025 C) Cordón Sentec® D) Paño Sentec®.

3.4.1 Ensayos con la cepa bacteria *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 (Ensayos I y II).

Para la realización de estos dos ensayos de adherencia de microorganismos a los soportes objeto de estudio, se empleó la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, aislada en nuestro laboratorio a partir de agua de mar extraída de fondo marino (4000 m de profundidad) en las proximidades del hundimiento del petrolero “Prestige” (Rodríguez-Calvo et al., 2017).

En el ensayo I se empleó el medio de cultivo LB (Sezonov et al., 2007), rico en nutrientes, al 3% de sales cuya composición es la siguiente: peptona 10 g, extracto de levadura 5 g y 1 L de solución stock de sales al 3% (Rodríguez-Valera et al., 1981).

En el ensayo II se empleó el medio BH (Deziel et al., 1996), el cual fue empleado para el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos en medio mínimo, con la siguiente composición: MgSO₄·7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 1 g, CaCl₂·2H₂O 0.02 g, NH₄NO₃·6H₂O 1 g, FeCl₃ 0.05 g, agua destilada 1 L y agar 20 g.

Los microcosmos fueron inoculados con 10 ml de un cultivo de 18h de *Pseudoalteromonas elyakovii* W18, procediéndose con posterioridad a su incubación a la temperatura de 28°C en agitación a 100 rpm durante 7 días.

Los tiempos de muestreo se realizaron en los días 0, 1, 2 y 7. Las muestras se tomaron y conservaron tal y como se describe en el apartado “2.3.1. Toma y conservación de muestras”. En el transcurso de los ensayos se determinó el crecimiento de *P. elyakovii* tanto en suspensión como adherido al soporte así como el estudio de la adhesión microbiana a la superficie del material absorbente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Todos los ensayos se realizaron por triplicado para poder realizar el análisis estadístico de los resultados.

3.4.2 Ensayos con la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado (Ensayos III y IV).

En los ensayos III A y IV A se empleó en los microcosmos agua procedente de las instalaciones de la planta de CLH en Motril (Granada), en lugar de medio de cultivo inoculado con la cepa W18. De esta forma se pudo estudiar la adhesión de la microbiota autóctona de dicha agua contaminada. Igualmente se realizó un ensayo que denominamos IV B en el que el agua real procedente de las instalaciones de CLH fue artificialmente contaminada con un 10% (v/v) de diesel.

Como en los ensayos I y II se utilizaron microcosmos de 1L de capacidad con 400ml de agua contaminada y el volumen equivalente a 200ml de soporte; en este caso se emplearon únicamente los soportes CorkSorb® 01025 y Paño Sentec®. Los microcosmos se incubaron a la temperatura de 28°C en agitación a 100 rpm durante 20 días.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para poder realizar el análisis estadístico de los resultados. Los tiempos de muestreo se realizaron a los 0, 1, 2, 7, 14 y 20 días en el ensayo III y a los 0, 2, 5, 7, 14 y 20 días en el ensayo IV. Las muestras se tomaron y conservaron tal y como se describe en el apartado “2.3.1. Toma y conservación de muestras”. Se llevó a cabo el análisis de la microbiota autóctona (en suspensión y adherida al soporte), así como el estudio de la adhesión microbiana a la superficie del material absorbente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, en el ensayo IVA y IVB, se realizó el análisis de TPH (Hidrocarburos totales del Petróleo) por gravimetría y de las distintas fracciones de hidrocarburos por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS).

3.5 Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos.

En este grupo de ensayos acometimos una serie de experimentos que podemos denominar de eliminación y/o absorción de hidrocarburos, en la que el agua a tratar es recirculada y entra en contacto con el material absorbente; de esta forma parte de los hidrocarburos son degradados por las bacterias presentes en el agua y parte quedan absorbidos los hidrocarburos en dichos soportes. Posteriormente existe una segunda fase de biodegradación en la que se estudió la biodegradación de los hidrocarburos absorbidos sobre los soportes por parte de microorganismos adheridos a los mismos. Estos ensayos fueron denominados V, VI, VII, VIII, IX y X.

3.5.1 Fase de tratamiento.

En esta primera fase de los ensayos se emplearon dos tipos de biorreactores. El primero de ellos, un biorreactor de flujo horizontal, consistente en un prisma rectangular que se construyó en metacrilato con unas dimensiones de 0.5x0.3x0.345m. y un volumen útil de 39,4L. El agua a tratar (50L) se recirculó de acuerdo con el esquema especificado en la figura 12. El sistema así construido permitió albergar hasta 6 unidades soportes en posición vertical.

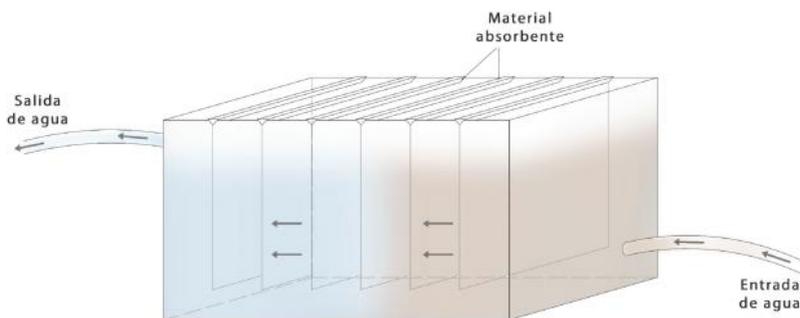


Figura 12. Esquema de funcionamiento del biorreactor de flujo horizontal.

El segundo sistema utilizado, fue un biorreactor de flujo vertical de 1L de capacidad en cuyo interior se alojó el material absorbente. De igual modo que en el caso anterior el agua a tratar (25L) entró por la parte inferior y salió por la parte superior dentro de un circuito cerrado de recirculación tras entrar en contacto con el material absorbente. Un esquema del sistema se muestra en la figura 13.

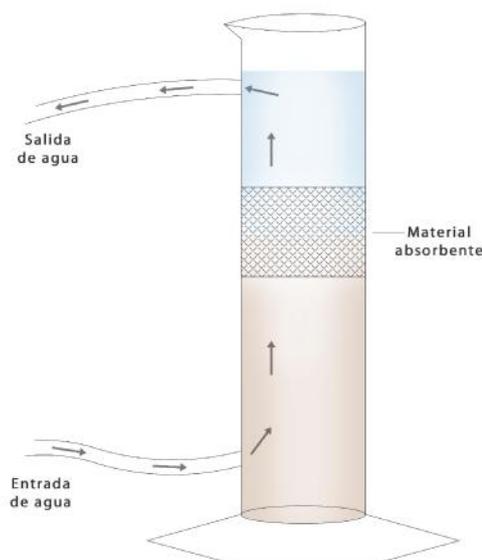


Figura 13. Esquema de funcionamiento del biorreactor de flujo vertical.

En los ensayos V y VI se emplearon soportes de Paño Sentec®. En el ensayo V se trabajó con dos biorreactores de flujo horizontal a dos caudales diferentes (18 y 36 l/h) y empleando en cada caso 3 soportes absorbentes de Paño Sentec®. En el ensayo VI solo se trabajó con un biorreactor de flujo vertical a 36 l/h y empleando 6 soportes absorbentes de Paño Sentec®. Estos ensayos tuvieron una duración de 72 y 48 horas respectivamente (Figura 14).

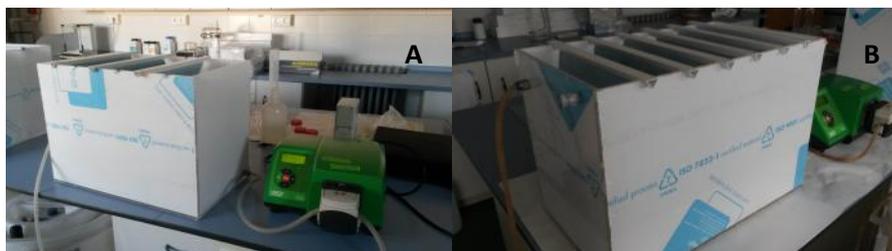


Figura 14. Biorreactores empleados en los ensayos V (A) y VI (B).

Por otro lado, en el ensayo VII se emplearon 4 soportes absorbentes de Paño Sentec®, también a 36 l/h, en el biorreactor de flujo horizontal. También en este ensayo VII se estudió la absorción de hidrocarburos empleando un biorreactor de flujo vertical en cuyo interior se colocó el material absorbente CorkSorb® 01025 alojado en una malla a mitad de altura. Este ensayo tuvo una duración de 7 días (Figura 15).



Figura 15. Biorreactores empleados en el ensayo VII. Flujo horizontal (A) y vertical (B).

Finalmente en los ensayos VIII, IX y X se emplearon respectivamente el soporte absorbente CorkSorb® 01025 en ambos biorreactores (3 almohadas en el reactor de flujo horizontal y una malla en el reactor de flujo vertical), el soporte Cordón Sentec® también en ambos biorreactores, y el soporte Paño Sentec® únicamente en el biorreactor de flujo vertical. En todos estos ensayos el periodo de estudio tuvo una duración de 7 días (Figuras 16, 17 y 18).

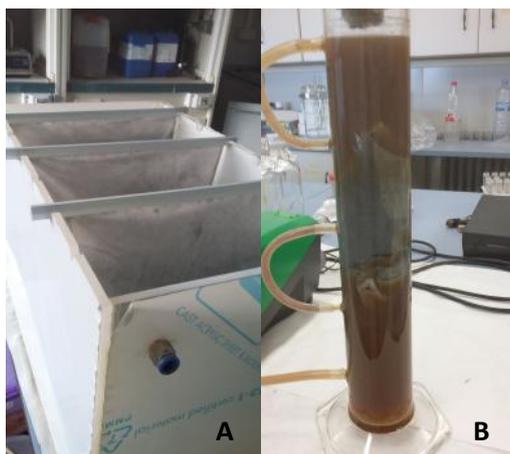


Figura 16. Biorreactores empleados en el ensayo VIII. Flujo horizontal (A) y vertical (B).

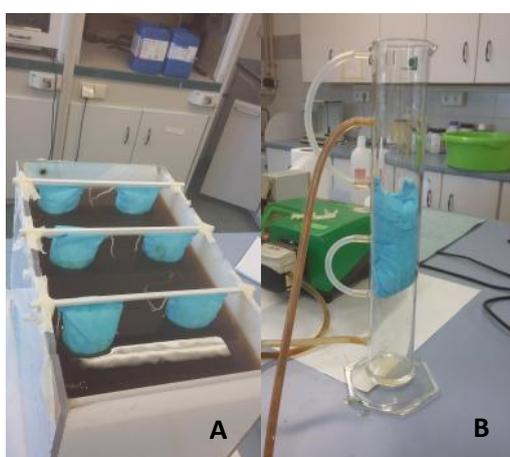


Figura 17. Biorreactores empleados en el ensayo IX. Flujo horizontal (A) y vertical (B).



Figura 18. Biorreactor empleado en el ensayo X. Flujo vertical.

Los biorreactores seleccionados, el material absorbente empleado y las condiciones de operación se resumen en la tabla 6. Las muestras se tomaron y conservaron tal y como se describe en el apartado “2.3.1. Toma y conservación de muestras”.

Tabla 6. Características operacionales utilizadas en los experimentos V-XI. Fase de tratamiento

ENSAYO	MATERIAL ABSORBENTE EMPLEADO		TIEMPO DE ENSAYO (días)	CAUDAL EMPLEADO (l/h)
	(1) BIORREACTOR de flujo horizontal	(2) BIORREACTOR de flujo vertical		
V	3xPaño Sentec® (X2) (24g)		3	Q ₁₁ =18 Q ₁₂ =36
VI	6xPaño Sentec® (24g)		2	Q ₁ =36
VII	4xPaño Sentec® (24g)	20 g CorkSorb® 01025	7	Q ₁ =36 Q ₂ =18
VIII	3x 100g CorkSorb® 01025	20 g CorkSorb® 01025	7	Q ₁ =36 Q ₂ =18
IX	6 x 60g Cordón Sentec®	40 g Cordón Sentec®	7	Q ₁ =36 Q ₂ =18
X		1 x Paño Sentec® (36g)	7	Q ₂ =18

En los ensayos V y VI, con una duración de 72 y 48 horas respectivamente, los análisis del agua tratada en los biorreactores se realizaron transcurridas 0, 12, 24 y 48h, además de a las 72h en el caso del ensayo V, mientras que en los soportes absorbentes presentes en los biorreactores se realizaron análisis transcurridos 24 y 48h de funcionamiento, además de a las 72h en el caso del ensayo V. Hay que destacar que el “tiempo inicial” corresponde a la concentración de hidrocarburos en el agua de entrada, mientras que el “tiempo 0” corresponde a la concentración tras el primer ciclo de recirculación.

Específicamente los análisis llevados a cabo en las muestras de agua y soporte fueron:

- Evolución de la microbiota bacteriana en el agua tratada a lo largo de las 72/48 horas de tratamiento mediante la determinación del nº de microorganismos cultivables (recuento en placa).
- Determinación del nº de microorganismos adheridos al soporte transcurridas 24h y 48h, además de a las 72h en el caso del ensayo V, mediante la determinación del nº de microorganismos cultivables (recuento en placa).

- Evolución de la variación de TPH por gravimetría en el agua tratada a lo largo de las 72/48 horas de tratamiento.
- Cuantificación gravimétrica de los TPH absorbidos a los soportes transcurridas 24h y 48h, además de a las 72h en el caso del ensayo V.
- Determinación por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), de la variación de las distintas fracciones de hidrocarburos en el agua tratada a lo largo de las 72/48 horas de tratamiento.
- Determinación, por GC/MS de la concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en los soportes transcurridas 24h y 48h, además de a las 72h en el caso del ensayo V.
- Estudio de la microbiota bacteriana adherida al material absorbente por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

El ensayo VII tuvo una duración de 7 días. Los muestreos se realizaron a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 7 días en el caso del agua a tratar, y a los 1, 3 y 7 días en el caso del material absorbente alojado en el biorreactor de flujo horizontal. En el caso del material absorbente localizado en el biorreactor de flujo vertical, solo se pudo realizar un muestreo al final del tratamiento (7 días) ya que debido a la configuración de dicho equipo no fue posible muestrear en el transcurso del ensayo.

También destacar que de nuevo el “tiempo inicial” corresponde a la concentración de hidrocarburos en el agua de entrada, mientras que el “tiempo 0” corresponde a la concentración tras el primer ciclo de recirculación. Como en los ensayos anteriores, las determinaciones realizadas fueron:

- Evolución de la microbiota bacteriana en el agua tratada durante los 7 días de tratamiento mediante la determinación del nº de microorganismos cultivables (recuento en placa).
- Determinación del nº de microorganismos adheridos al soporte mediante la determinación del nº de microorganismos cultivables (recuento en placa) en el transcurso y al final del tratamiento en el caso de los soportes empleados en el biorreactor “pecera”; en el caso del soporte absorbente empleado en el biorreactor “columna” únicamente al final del tratamiento.
- Evolución de la variación de TPH por gravimetría en el agua tratada durante los 7 días de tratamiento.

- Cuantificación gravimétrica de los TPH absorbidos a los soportes en el transcurso y al final del tratamiento en el caso de los soportes empleados en el biorreactor “pecera”; en el caso del soporte absorbente empleado en el biorreactor “columna” únicamente al final del tratamiento.
- Determinación por cromatografía de gases/espectrometría de masas GC/MS, de la variación de las distintas fracciones de hidrocarburos en el agua tratada durante el tratamiento.
- Determinación, por GC/MS de la concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en los soportes en el transcurso y al final del tratamiento en el caso de los soportes empleados en el biorreactor “pecera”; en el caso del soporte absorbente empleado en el biorreactor “columna” únicamente al final del tratamiento.
- Estudio de la microbiota bacteriana adherida al material absorbente por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Finalmente en los ensayos VIII-X, también con una duración de 7 días, los muestreos se realizaron a los tiempos 0, 1, 3 y 7 días en el caso del agua a tratar, y al final del ensayo a los 7 días en el caso del material absorbente, tanto en el caso del soporte empleado en el biorreactor con flujo horizontal como en el caso del alojado en el biorreactor con flujo vertical. Hay que destacar que los análisis realizados al material absorbente solo se pudieron realizar al final del tratamiento ya que debido al formato de los soportes (almohadas de corcho y el propio Cordón Sentec®) empleados en los biorreactores no se podía muestrear en el transcurso del ensayo.

Nuevamente destacar que el “tiempo inicial” corresponde a la concentración de hidrocarburos en el agua de entrada, mientras que el “tiempo 0” corresponde a la concentración tras el primer ciclo de recirculación.

En estos ensayos se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

- Evolución de la microbiota bacteriana en el agua tratada a lo largo de los 7 días de tratamiento mediante la determinación del nº de microorganismos cultivables (recuento en placa).
- Determinación del nº de microorganismos adheridos al soporte al final del tratamiento mediante la determinación del nº de microorganismos cultivables (recuento en placa).

- Evolución de la variación de TPH por gravimetría en el agua tratada a lo largo de los 7 días de tratamiento.
- Cuantificación gravimétrica de los TPH absorbidos a los soportes al final del tratamiento.
- Determinación, por cromatografía de gases/espectrometría de masas GC/MS, de la variación de las distintas fracciones de hidrocarburos en el agua tratada a lo largo de los 7 días de tratamiento.
- Determinación, por GC/MS de la concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en los soportes al final del tratamiento.

3.5.2 Fase de biorremediación.

Una vez finalizada la fase de tratamiento de las aguas procedentes de CLH, se procedió a la extracción de los materiales absorbentes, depositándose los mismos en depósitos estériles con humedad controlada, con el objetivo de estudiar la posible biodegradación de los hidrocarburos absorbidos por parte de la biopelícula microbiana formada durante la fase de tratamiento.

Para llevar a cabo el mencionado estudio de biodegradación los soportes se instalaron en microcosmos de 500 y 1000 ml de capacidad a temperatura ambiente durante varios meses, en función de la disponibilidad de soporte, manteniendo un nivel adecuado de humedad, entre el 50 y 80% recomendado por otros autores (Calvo et al., 2009) mediante riegos periódicos (Figura 19). Bajo estas condiciones se determinó el número de microorganismos mediante la técnica de recuento en placa y la concentración de hidrocarburos por gravimetría (TPH) y por GC/SM (fracciones de hidrocarburos) para determinar si se producía una disminución de la concentración de los mismos debido a una degradación biológica por parte de la microbiota adherida a los soportes.



Figura 19. Fases de biorremediación de los ensayos VIII, IX y X.

La fase de biorremediación se llevó a cabo en los ensayos VIII, IX y X con una duración de 5 a 10 meses (Ensayos VIII y IX: 8 meses. Ensayo X: 5 meses). Se tomaron muestras a distintos tiempos para llevar a cabo los siguientes análisis y determinaciones:

- Determinación del número de bacterias adheridas al soporte mediante la determinación del número unidades formadoras de colonias (recuento en placa).
- Cuantificación gravimétrica de los TPH por absorbidos a los soportes.
- Determinación, por GC/MS de la concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en los soportes al final del tratamiento.
- Estudio de la microbiota bacteriana adherida al material absorbente por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

3.6 Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Tal y como se ha indicado, en la fase de biodegradación que acaba de ser descrita se cuantificó el número de microorganismos adheridos a los soportes, y esta cuantificación se realizó por la técnica de recuento en placa de microorganismos viables. A partir de las placas de cultivo y atendiendo a la morfología colonial, se seleccionaron una serie de microorganismos con objeto de obtener una colección de cepas bacterianas para la construcción de futuros consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos.

Un total de 10 cepas bacterianas fueron finalmente seleccionadas para su identificación taxonómica, las cuales fueron posteriormente reaisladas para garantizar su pureza en medio TSA.

Para ello se procedió a su clasificación genética en las instalaciones del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. En primer lugar se aisló DNA de cada cepa bacteriana y seguidamente se procedió a amplificar la región de interés (fragmento de unos 1100 pb del gen rDNA 16S). Posteriormente se purificó el amplicón y finalmente se procedió a su secuenciación en ambos sentidos. Una vez obtenidas las secuencias se realizó el *contig* de ambas secuencias.

Para la identificación de las bacterias, se introdujeron las secuencias en la base de datos GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Una vez identificadas y con el objetivo de establecer posibles consorcios bacterianos con la capacidad de degradar hidrocarburos, se procedió a realizar una serie de ensayos de biodegradación de diesel con dichos microorganismos previamente seleccionados. Para ello en cada ensayo se inocularon 6 matraces con 100ml de medio de cultivo BH (Figura 20), y a tres de ellos se les adicionó un 1% de diesel, previamente esterilizado empleando filtros de 0.22µm “PTFE Sterile Syringe Filter” MBL©. Todos fueron inoculados al 1% con una las cepas aisladas e identificadas y se incubaron durante 7 días a 140rpm a 30°C. Además se prepararon otros 3 matraces solamente con medio de cultivo BH y diesel al 1% como control.



Figura 20. Matracas con medio BH empleados para la búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Los tiempos de muestreo se realizaron en los días 0, 2, 4 y 7 días. Se estudió la degradación de dicho diesel por parte de la bacteria en los matracas que contenían diesel, para lo cual se cuantificaron los TPH por gravimetría al inicio y al final del ensayo, así como las diferentes fracciones por GC/MS. Además, se estudió el crecimiento microbiano en presencia y ausencia de diesel mediante la técnica de recuento en placa para observar el comportamiento de la cepa en cuestión en un ambiente contaminado.

3.7 Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

Este ensayo se realizó con la finalidad de verificar la eficacia del sistema formado por el biorreactor de flujo vertical y el Paño Sentec® como material absorbente, procediéndose para ello a recircular periódicamente cantidades de agua contaminada con una carga elevada de hidrocarburos a través del mismo de forma discontinua.

De este modo se trató un volumen de agua (20L aprox.) haciéndolo pasar por el material absorbente durante 8 ciclos de recirculación y con un caudal de 18L/h. Al finalizar se analizó el agua tratada. A continuación se procedió a tratar otro volumen de agua similar en las mismas condiciones. De esta forma se pretendió comprobar la eficacia de la fase de tratamiento.

Una vez finalizada esta fase, se procedió a extraer el material absorbente y a alojarlo en un contenedor estéril bajo condiciones controladas, para dar paso a la fase de biodegradación, cuya metodología fue descrita anteriormente en el apartado de “ensayos de absorción y biodegradación”. De esta forma se pretendió comprobar la eficacia del material absorbente Paño Sentec® como material en el que se produce una degradación biológica de los hidrocarburos absorbidos.

Las muestras se tomaron y conservaron tal y como se describe en el apartado “2.3.1. Toma y conservación de muestras”. En este estudio se analizó el contenido de hidrocarburos en agua así como los hidrocarburos absorbidos en el soporte y la degradación biológica de los mismos mediante la cuantificación por gravimetría de los TPH y de las distintas fracciones por GC/MS.

3.8 Ensayos a escala planta piloto.



Figura 21. Vista general de la Planta Piloto en instalaciones de CLH en Motril (Granada).

En la última fase de este estudio se realizó el escalado del proceso a nivel de planta piloto (Fig. 21). Esta planta consta de 4 columnas de flujo vertical (Fig. 22) para tratar aguas contaminadas con hidrocarburos en las instalaciones de la empresa CLH en Motril. Las columnas fueron fabricadas en acero inoxidable (Norma ATEX) y con unas dimensiones de 1,65 x 0,5 m. En su interior se instaló el material absorbente en el interior de una reja metálica que posibilitaba la fácil introducción y manejo del material (Fig. 23). Además se habilitaron puntos de muestreo a la entrada y a la salida así como un difusor para introducir aireación en dos de ellas, con el objeto de establecer dos columnas óxicas y dos anóxicas. El material absorbente seleccionado fue fibra de polipropileno en forma de rollo suministrado por la empresa SENTEC S.L.

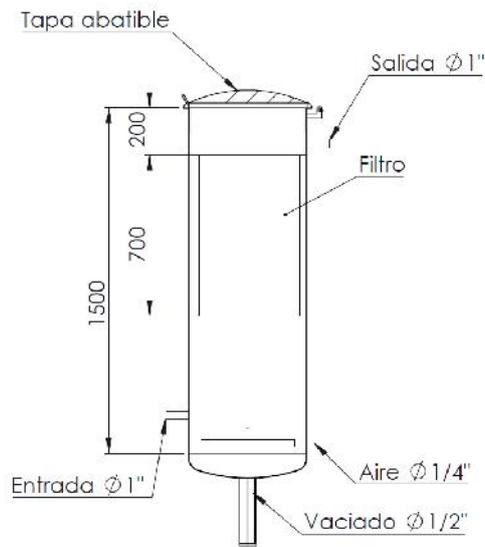


Figura 22. Sección de columna. Planta Piloto en instalaciones de CLH en Motril (Granada).



Figura 23. Material absorbente empleado. Planta Piloto en instalaciones de CLH en Motril (Granada).

La entrada de caudal se situó en la parte inferior de la columna, de modo que el flujo en las columnas fue en todas ellas ascendente atravesando de forma homogénea el material absorbente, donde quedan adheridos los microorganismos del agua y absorbidos los hidrocarburos.

Para completar la planta se instalaron dos bombas para impulsar el agua desde la balsa API hasta las columnas, una con un caudal de trabajo de 0-3 L/min (para las columnas 1 y 2) y otra con un caudal de 0-10 L/min (para las columnas 3 y 4). Así mismo, se instalaron una serie de válvulas para redirigir el paso de flujo en función de las condiciones de trabajo, así como caudalímetros y manómetros y un panel de control para controlar las condiciones de operación. Además las columnas 2 y 4 contaron con una entrada de aireación adicional y una sonda de oxígeno.

De este modo quedó instalada la planta piloto con 4 columnas (Figura 24), dos que operaron con un caudal de 3 L/min y dos con un caudal de 10 L/min, y en cada caso una con aireación y otra sin ella. Por último, las conducciones de la instalación se diseñaron de forma que tanto las dos columnas sin aireación como las dos que trabajan con aireación pudiesen operar de forma independiente; de esta forma se podrá recircular el agua tantas veces como se desee a mayor y menor caudal de flujo de forma independiente bajo ambas condiciones. Así, se puede evaluar cómo influye el caudal en el tratamiento del agua problema, empleando aireación y sin ella. El diagrama de flujo de toda instalación se muestra en la figura 25.



Figura 24. Vista de los 4 biorreactores instalados. Planta Piloto en instalaciones de CLH en Motril (Granada).

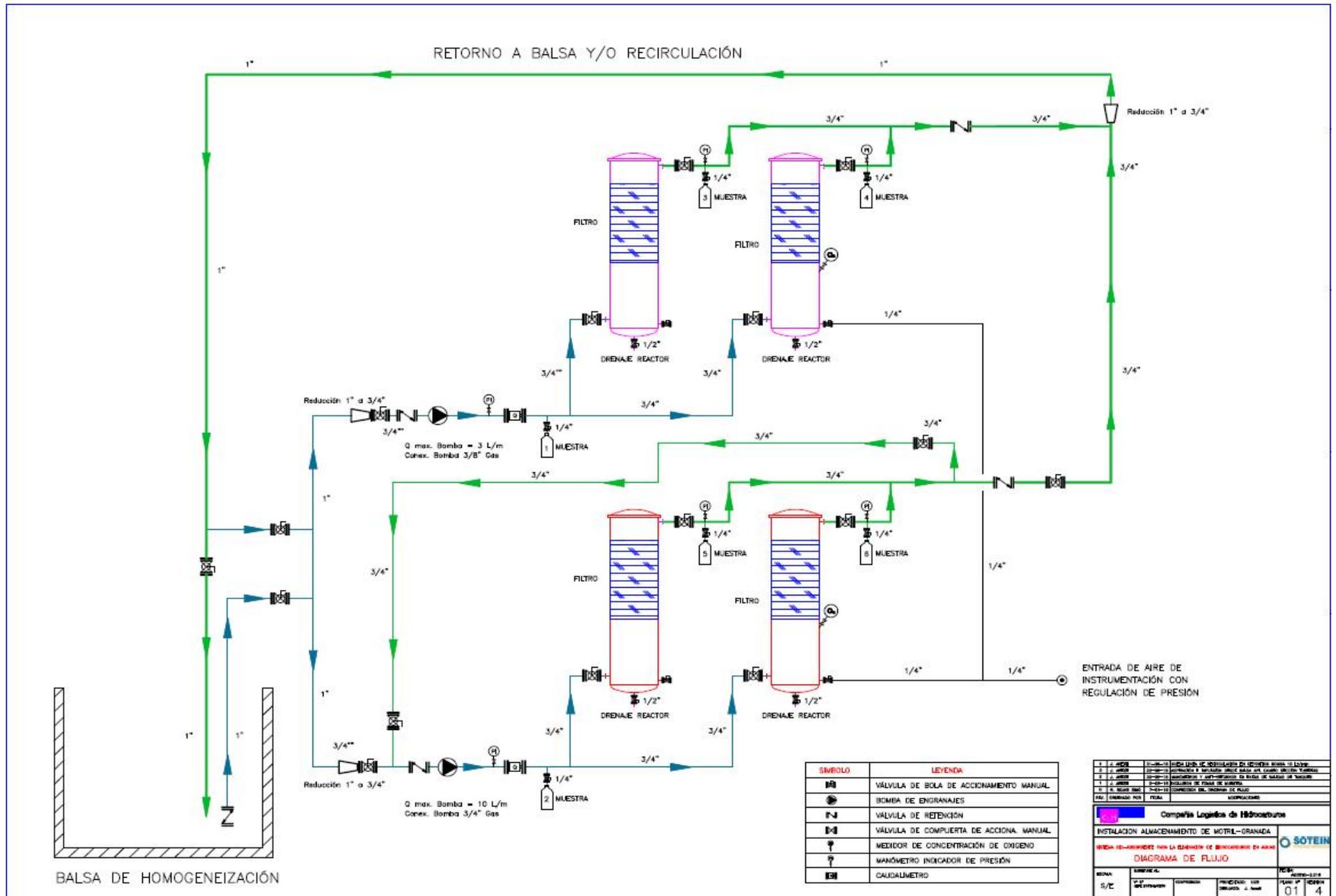


Figura 25. Diagrama de flujo. Planta Piloto en instalaciones de CLH en Motril (Granada).

Los ensayos se realizaron alternando bajo y alto caudal, ausencia y presencia de suministro de oxígeno. Se llenaron los tanques y se establecieron circuitos cerrados de recirculación. Se establecieron 8 ciclos de recirculación, y se procedió de forma similar a la que se describe en los ensayos que en dichos ensayos de laboratorio: se recirculó el agua a tratar, se analizó una vez finalizados los 8 ciclos, y en caso de que dicho agua se encontrase libre de hidrocarburos (o con un contenido suficientemente bajo), se procedió a tratar otro volumen de agua equivalente al volumen útil del tanque en las mismas condiciones. En caso contrario, se volvió a recircular ese mismo volumen de agua.

Una vez finalizada esta fase, cuando los materiales absorbentes no tuvieron más capacidad de absorción, se procedió a extraerlos (Figura 26A) y alojarlos en recipientes para dar paso a la fase de biorremediación (Figura 26B), siguiendo la metodología descrita para esta fase en el apartado “2.5.2. Fase de biorremediación” de los ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos.



Figura 26. Extracción del material absorbente (A). Fase de biorremediación (B). Planta Piloto en instalaciones de CLH en Motril (Granada).

Las muestras se tomaron y conservaron tal y como se describe en el apartado “2.3.1. Toma y conservación de muestras”. Posteriormente se determinó el contenido en hidrocarburos del agua por gravimetría, para cuantificar los TPH, y por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) para cuantificar las distintas fracciones, y se emplearon las mismas técnicas para estudiar la degradación biológica de los hidrocarburos absorbidos en los soportes cuantificando el contenido de hidrocarburos en los mismos.

3.9 Análisis estadístico.

Se realizó un Análisis de Varianza Bifactorial para medir la adherencia microbiana a los soportes en los procesos de tratamiento de agua contaminadas con hidrocarburos comparado con la población microbiana en suspensión. Para este análisis se consideraron como factores el tiempo de ensayo y medio/soporte de crecimiento. Por otro lado se realizó un Análisis de Varianza Unifactorial para comparar la absorción entre diferentes soportes, considerándose como factor el tipo de material.

Para evaluar la distribución normal de los datos se usó la prueba de doble vía de Shapiro-Wilk. En caso de que las pruebas no pasaran la distribución normal, se procedió a realizar un análisis por rangos con $p < 0.001$. Una vez establecida la diferencia de medias se procedió a realizar la prueba paramétrica de Tukey para establecer diferencia significativa ($p < 0.05$). Se utilizó el programa SigmaPlot 12 con un 95% de nivel de confianza.

4. Resultados

4.1 Ensayos de adherencia microbiana.

Como se ha mencionado anteriormente en el apartado de materiales y métodos, los ensayos de adherencia microbiana, denominados I, II, III y IV, se realizaron con objeto de comprobar la capacidad de adherencia de los soportes absorbentes que se seleccionaron al comienzo de esta investigación.

4.1.1 Ensayos I y II.

- Ensayo I.

Tanto en el ensayo I realizado en medio LB, como en el ensayo II realizado en medio BH, se empleó el recuento microbiano en el medio y adherido al soporte como herramienta para estudiar la adherencia microbiana a cada uno de los mismos. Comparando la población microbiana presente en el medio de cultivo y la adherida al material absorbente se puede afirmar que dichos materiales tenían capacidad de adherir microorganismos a su superficie/estructura y desarrollar así una biopelícula. En las figuras 27 y 28 se muestra ambos crecimientos microbianos empleando cada uno de los materiales absorbentes seleccionados en medio LB (Ensayo I): CorkSorb® 01025, CorkSorb® 03025, Paño Sentec® y Cordón Sentec®.

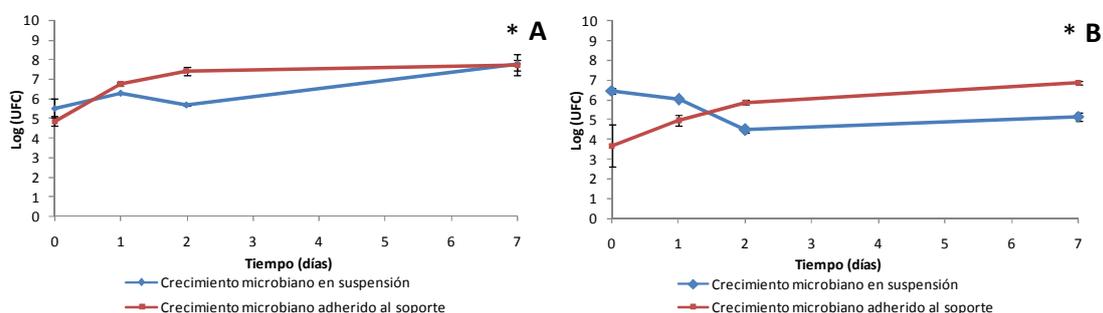


Figura 27. Evolución del número de microorganismos de *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en medio LB con los soportes Corksorb® 01025 (A) y Corksorb® 03025 (B). Ensayo I. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

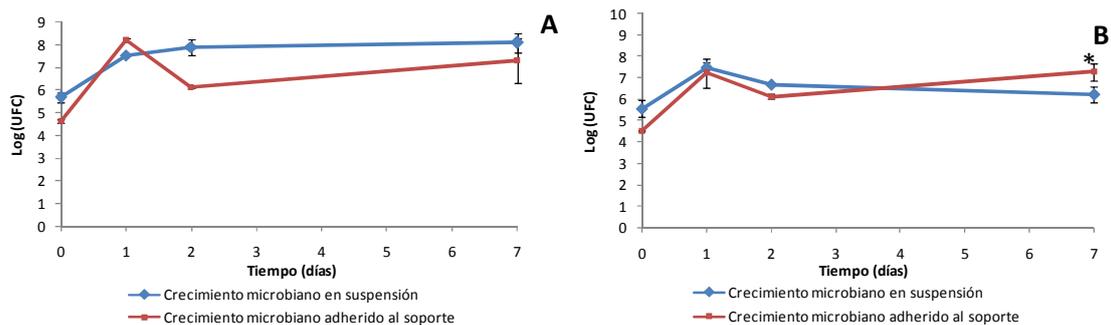


Figura 28. Evolución del número de microorganismos de *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en medio LB con los soportes Paño Sentec® (A) y Cordón Sentec® (B). Ensayo I. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

En el ensayo realizado en el medio LB se observó en general un buen crecimiento microbiano tanto en microorganismos adheridos al soporte como en microorganismos en suspensión. En todas las experiencias la concentración de los microorganismos adheridos al material absorbente fue similar o incluso superior que en el caso de los microorganismos en suspensión (Figuras 27 y 28).

Sin embargo el comportamiento fue diferente según el soporte objeto de estudio. En el caso de los soportes CorkSorb®, en el caso del corcho hidrófobo (CorkSorb® 01025) hubo un crecimiento de la población microbiana en suspensión y adherida, alcanzando valores alrededor de 7,7 Log (UFC/ml) al final del ensayo (7 días). De igual modo ocurrió en el caso del corcho hidrófilo (CorkSorb® 03025), aunque en este caso los valores de Log (UFC/ml) son menores y por tanto se produce un crecimiento microbiano menor, pudiéndose sugerir un menor grado de colonización del soporte (Figura 27).

En el caso del soporte CorkSorb® 01025, en el día 2 se observa la mejor relación soporte/medio. En el soporte CorkSorb® 03025 la biopelícula parece más estable, siendo la mejor relación soporte/medio a tiempo 7 días. Sin embargo el crecimiento fue menor que en el soporte CorkSorb® 01025.

Respecto a los soportes de fibra de polipropileno, hubo un evidente aumento de la población microbiana adherida al soporte en el transcurso del ensayo, tal como muestra la figura 28. Empleando el soporte absorbente Paño Sentec® se alcanzó un valor cercano a 8 Log (UFC/ml) en el medio de cultivo y próximo a 7,5 Log (UFC/ml) en el soporte absorbente en el caso de la microbiota adherida. En el caso del Cordón Sentec® se observa un comportamiento similar con un valor cercano a 7,5 Log

(UFC/ml) en el soporte absorbente en el caso de la microbiota adherida, aunque la población microbiana en suspensión se mantuvo en torno a 6,2 Log (UFC/ml).

El hecho de que los valores de Log (UFC/ml) fueran tan elevados tanto en suspensión como adherido al soporte pudo deberse al elevado contenido en nutrientes del medio de cultivo LB, por lo que los resultados obtenidos pudieron no ser concluyentes, por lo que se repitió el ensayo con un medio de cultivo con un menor contenido en nutrientes, el medio BH (Ensayo II).

En las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido se observa la elevada población bacteriana adherida a los soportes, aunque es evidente una menor colonización del soporte absorbente CorkSorb® 03025. Como hemos indicado anteriormente estos resultados pueden ser consecuencia de la elevada concentración de nutrientes del medio de cultivo LB (Figuras 29 y 30).

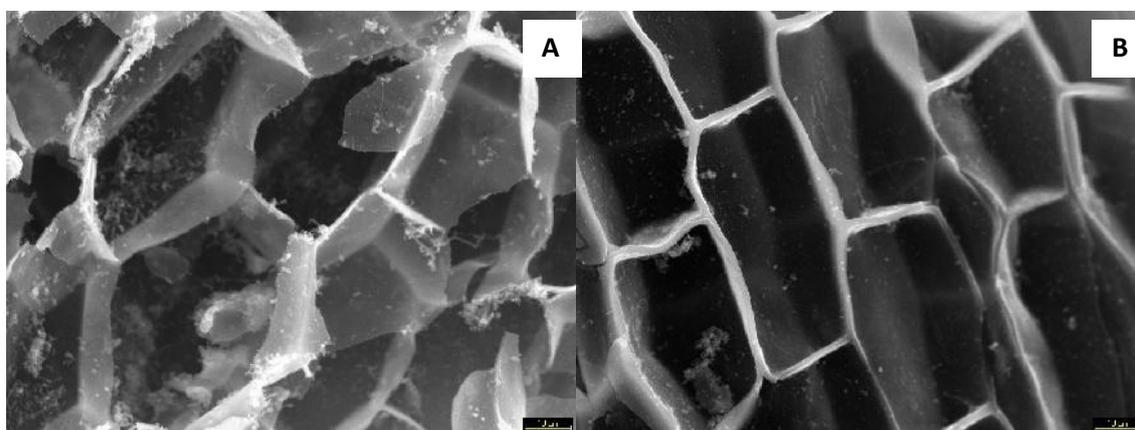


Figura 29. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie de los soportes Corksorb® 01025 (A) y Corksorb® 03025 (B). Ensayo I.

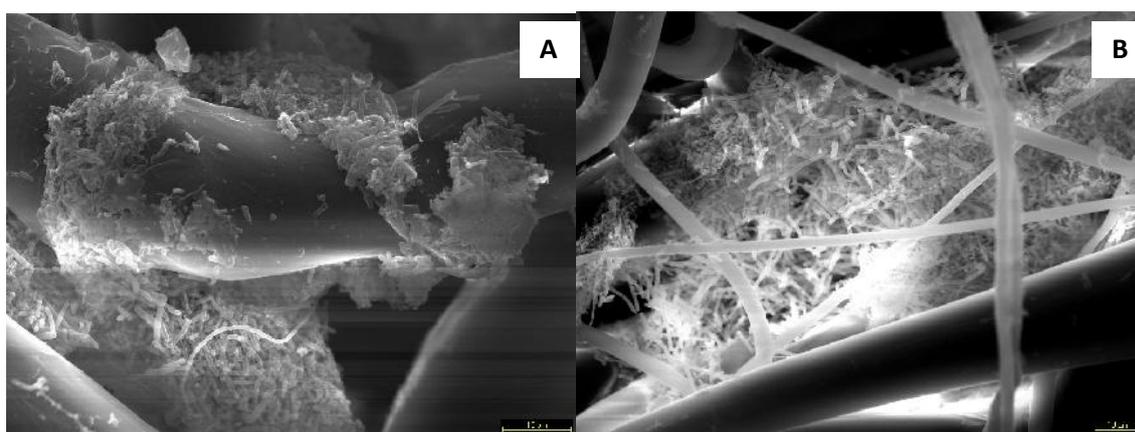


Figura 30. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie de los soportes Paño Sentec® (A) y Cordón Sentec® (B). Ensayo I.

- Ensayo II.

En el ensayo II en el caso de los dos soportes de corcho Corksorb®, la adherencia de microorganismos a dichos soportes fue muy diferente en cada uno de los dos casos, tal y como se observa en la Figura 31. La adherencia al soporte hidrófobo CorkSorb® 01025 fue incrementándose con el transcurso del ensayo, siguiendo la misma tendencia que el crecimiento microbiano en el medio de cultivo.

Por su parte la adherencia al soporte hidrófilo CorkSorb® 03025 fue moderada durante los 2 primeros días de ensayo, tras los cuales se observa una disminución de los microorganismos adheridos al soporte, lo que podría sugerir un desprendimiento de la biopelícula formada. En el caso del soporte hidrófobo CorkSorb® 01025 se alcanzan valores de Log (UFC/ml) muy superiores a los del soporte hidrófilo, llegando a un valor máximo cercano a 6 Log (UFC/ml).

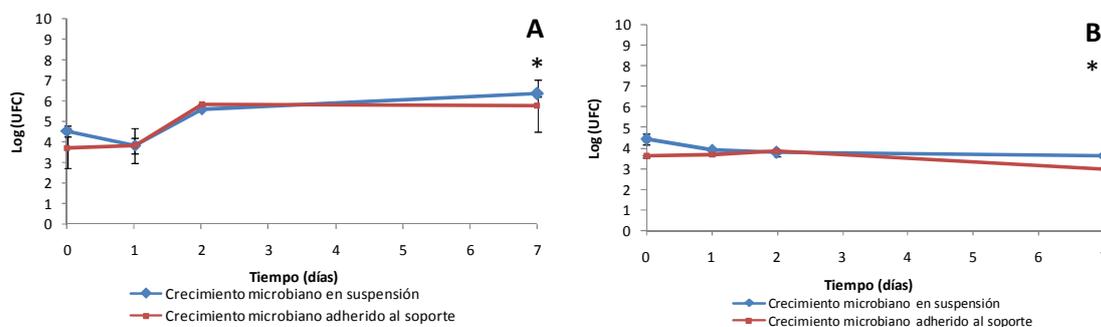


Figura 31. Evolución del número de microorganismos de *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en medio BH con los soportes Corksorb® 01025 (A) y Corksorb® 03025 (B). Ensayo II. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

Por su parte, los soportes de fibra de polipropileno sí mostraron un comportamiento bastante similar en lo que se refiere a adherencia de microorganismos en ambos casos. El crecimiento microbiano tanto en el medio de cultivo como en la adhesión a los soportes Paño Sentec® y Cordón Sentec® fue muy similar y se alcanzaron valores de Log (UFC/ml) muy próximos a 7 y 6,5 respectivamente al final de este ensayo II, tal y como se puede observar en la figura 32.

Los resultados obtenidos empleando los soportes de fibra de polipropileno indican que, al igual que en el medio de cultivo rico en nutrientes LB, estos soportes presentan buenas características de adhesión con independencia de las características nutricionales del medio de cultivo utilizado.

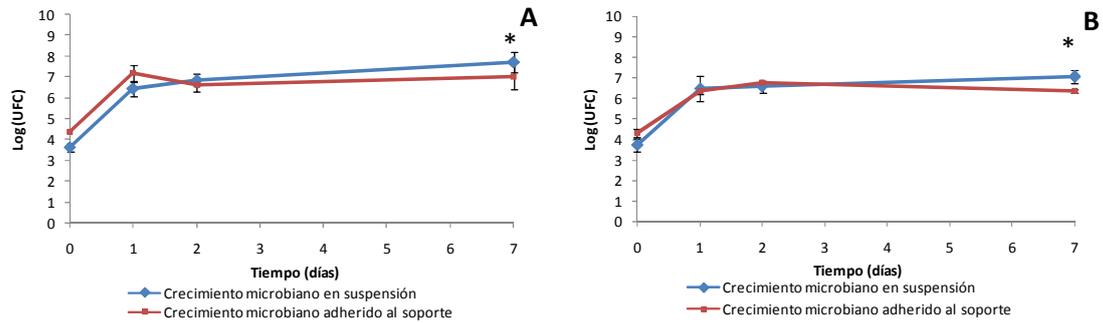


Figura 32. Evolución del número de microorganismos de *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en medio BH con los soportes Paño Sentec® (A) y Cordón Sentec® (B). Ensayo II. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

Los resultados de los ensayos de adherencia de la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 a los distintos soportes objeto de estudio reflejan el alto grado de eficacia de dichos soportes en cuanto a adhesión y crecimiento microbiano en los mismos alcanzándose valores de Log (UFC/ml) considerablemente elevados durante el transcurso de los ensayo, a excepción del soporte CorkSorb® 03025.

Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido del ensayo II muestran una menor adherencia microbiana a los soportes que en el caso del ensayo I y además muestran la poca capacidad de adherencia del soporte absorbente CorkSorb® 03025 (Figuras 33 y 34).

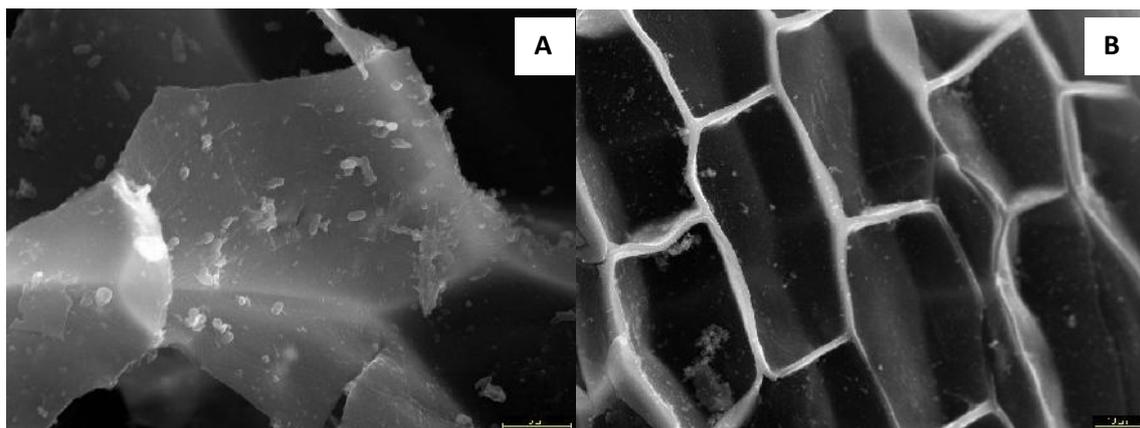


Figura 33. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie de los soportes Corksorb® 01025 (A) y Corksorb® 03025 (B). Ensayo II.

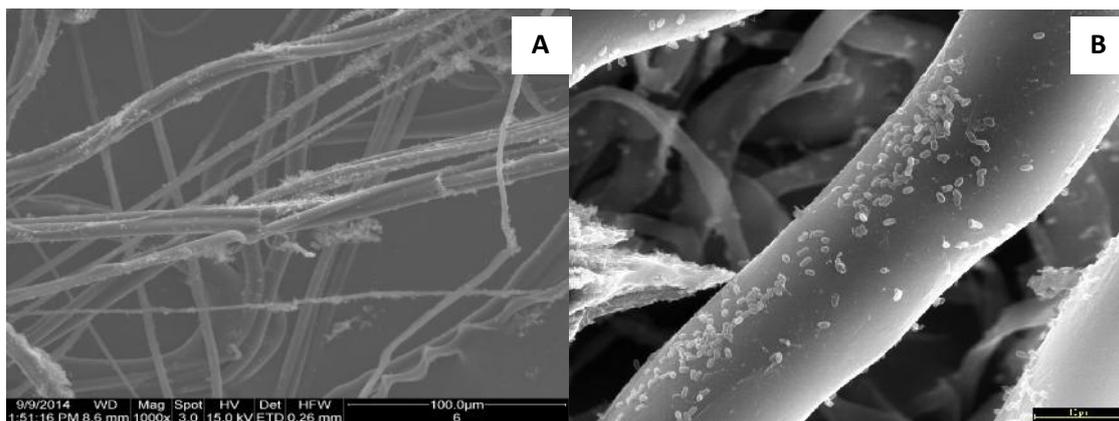


Figura 34. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie de los soportes Paño Sentec® (A) y Cordón Sentec® (B). Ensayo II.

4.1.2 Ensayo III.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos I y II, fueron seleccionados dos de los cuatro soportes para comprobar la capacidad de adherencia, en este caso, de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado: los soportes CorkSorb® 01025 y Paño Sentec®.

Una vez más, en ambos casos se observó un crecimiento microbiano adherido al soporte absorbente superior al crecimiento microbiano en suspensión. En el caso del soporte CorkSorb® 01025 esta población microbiana adherida creció en la primera fase del ensayo, dicho crecimiento se ralentizó a partir de los 2 días de ensayo y alcanzó un valor máximo a los 14 días de ensayo con un valor cercano a 5 Log (UFC/ml). A partir de aquí comenzó a descender, quizás por un leve desprendimiento de la biopelícula originada, siendo algo inferior a la población en suspensión al final del ensayo. En el caso del soporte Paño Sentec®, la población de microorganismos adheridos al soporte creció hasta alcanzar su máxima concentración transcurridos 7 días de ensayo, (concentración superior a 5,5 Log (UFC/ml)), produciéndose también un leve desprendimiento a partir de ahí pero manteniéndose en valores superiores a los correspondientes al soporte CorkSorb® 01025 (Figura 35).

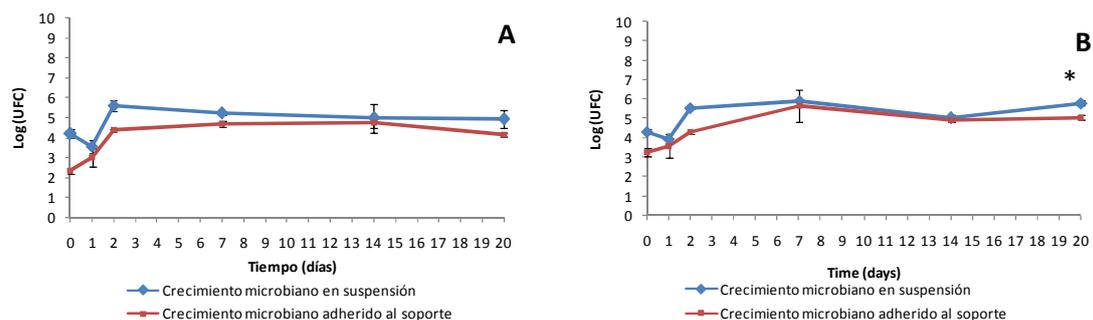


Figura 35. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) con los soportes Corksorb® 01025 (A) y Paño Sentec® (B). Ensayo III. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

En la figura 36 se compara la respuesta de la población microbiana en presencia y en ausencia de un soporte absorbente. Como se puede observar, en el caso de ambos soportes su presencia no afectó a la población microbiana en suspensión, dado que la concentración microbiana en el control negativo alcanza prácticamente el mismo valor de Log (UFC/ml) que empleando CorkSorb® 01025 y Paño Sentec®.

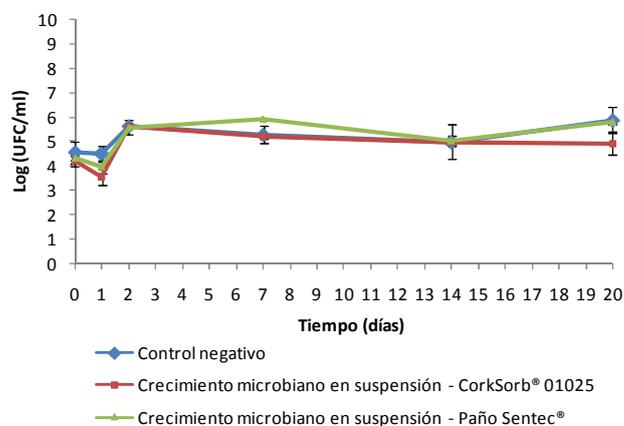


Figura 36. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en suspensión en ausencia (control negativo) y en presencia de los soportes Corksorb® 01025 y Paño Sentec®, expresado en Log (UFC/ml agua). Ensayo III.

Finalmente, las imágenes de SEM muestran la adhesión microbiana a la superficie de ambos soportes, CorkSorb® 01025 y Paño Sentec® (Figuras 37 y 38).

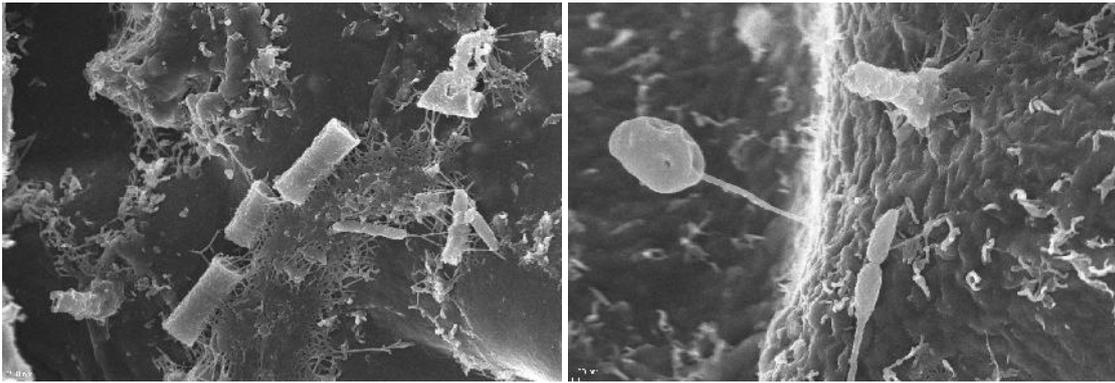


Figura 37. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte CorkSorb® 01025. Ensayo III.

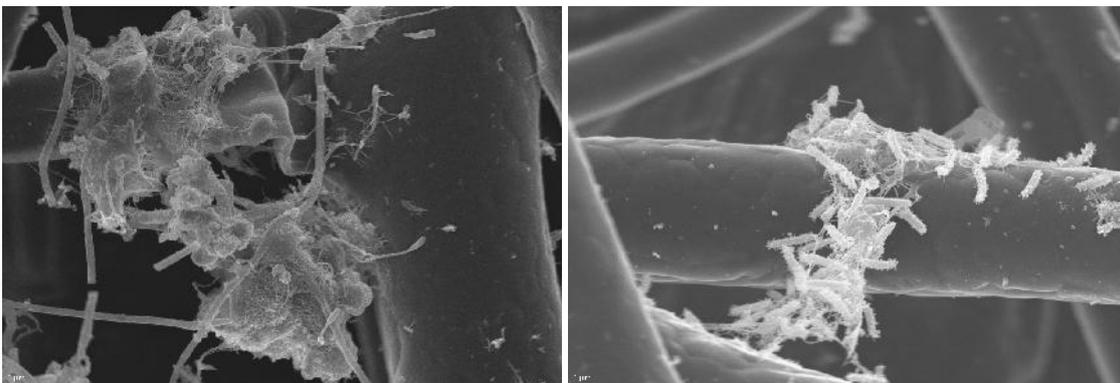


Figura 38. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Paño Sentec®. Ensayo III.

4.1.3 Ensayo IVA.

En este ensayo IVA, en el que se empleó un agua con un contenido moderado (en torno a 10.000ppm TPH) de hidrocarburos, se observó nuevamente una población microbiana adherida al soporte superior a la población en suspensión en ambos casos. Además en el caso del Paño Sentec®, la población adherida es muy superior a la que hay en suspensión, es decir el proceso de adhesión se produce con una elevada efectividad, y de hecho la población microbiana en el medio alcanza valores similares de Log (UFC/ml) a los alcanzados en el control negativo o en ausencia de soporte absorbente (Figura 39). Además destacar que la adhesión al soporte Paño Sentec® es superior a la que se produce en el ensayo III, realizado en agua con un contenido en hidrocarburos bajo, y que se produce un desprendimiento de la microbiota adherida a t14.

En el caso del soporte CorkSorb® 01025, tanto la población adherida como la población presente en el medio es ligeramente superior a la existente en el ensayo III,

y siguió el mismo patrón de comportamiento, con una población adherida ligeramente inferior a la presente en suspensión transcurridos 20 días de ensayo.

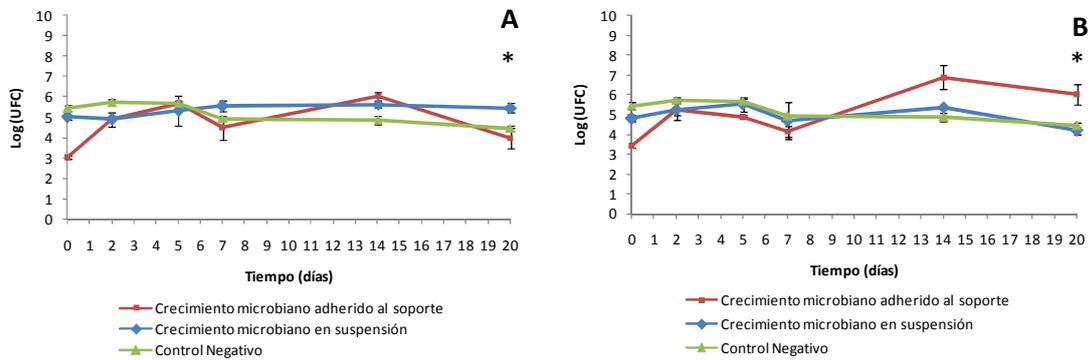


Figura 39. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) con los soportes Corksorb® 01025 (A) y Paño Sentec® (B), así como en ausencia de los mismos (Control Negativo, expresado en Log (UFC/ml agua)). Ensayo IVA. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

En cuanto al análisis de las distintas concentraciones de hidrocarburos, la figura 40 muestra la evolución de los TPH al comienzo y al terminar el ensayo, y las figuras 41 y 42 muestran como disminuyen las distintas fracciones en el agua al final del ensayo y como aumenta la concentración de las mismas ya que parte de ellos quedan absorbidos en ambos soportes, aunque de forma moderada.

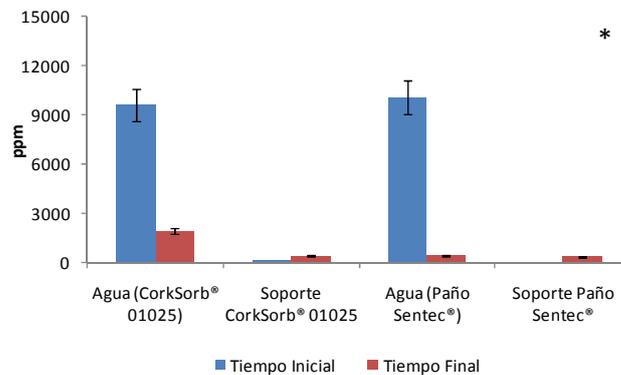


Figura 40. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) y absorbidos a los soportes Corksorb® 01025 y Paño Sentec® (mg/L agua tratada) a tiempo inicial y final. Ensayo IVA. (*) Existen diferencias significativas entre la absorción al soporte Corksorb® 01025 y al Paño Sentec®.

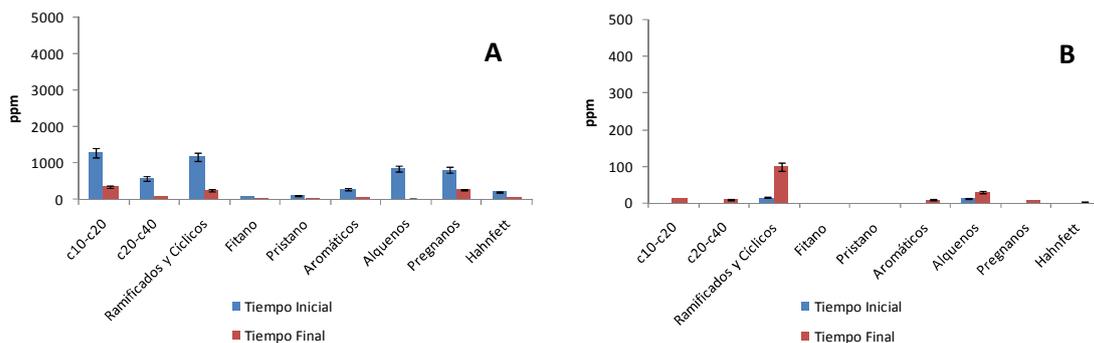


Figura 41. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) (A) y absorbidas al soporte Corksorb® 01025 (mg/L agua tratada) (B) a tiempo inicial y final. Ensayo IVA.

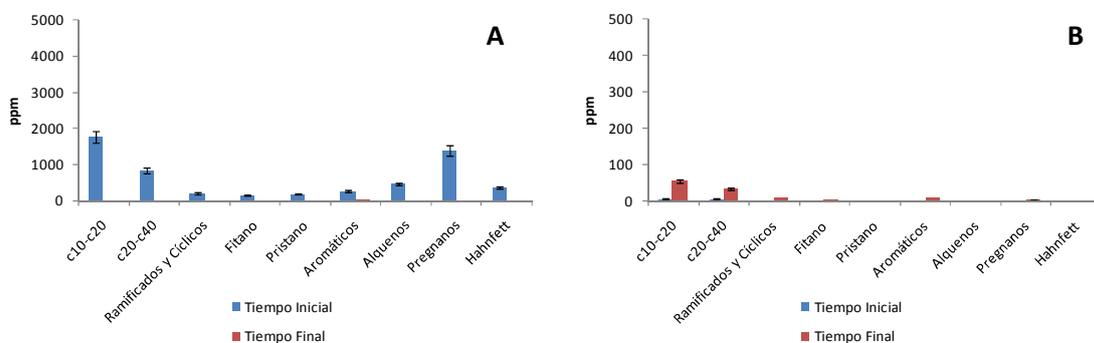


Figura 42. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) (A) y absorbidas al soporte Paño Sentec® (mg/L agua tratada) (B) a tiempo inicial y final. Ensayo IVA.

En las tablas 7 y 8 se recogen los indicadores de biodegradación existentes en agua y en ambos soportes. Estos son la relación entre fitano y pristano, c17 y pristano, y c18 y fitano, y la disminución de los valores de dichas relaciones son indicadores de la existencia de un proceso de biodegradación. En el caso del microcosmos con corcho Corksorb® 01025, destaca la reducción de la relación entre c18 y fitano en casi un 40%, así como en el soporte Paño Sentec® se observa la disminución en gran medida de las relaciones pristano/ fitano y c18/fitano (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Indicadores de biodegradación en agua y en soporte Corksorb® 01025 a tiempo inicial y final (ND - No Detectado). Ensayo IVA.

INDICADORES	Agua		Soporte	
	Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo Inicial	Tiempo Final
Relación Pristano/Fitano	1,343	1,302	ND	1,354
Relación C17/Pristano	ND	1,189	ND	0,976
Relación C18/Fitano	2,054	1,315	ND	1,211

Tabla 8. Indicadores de biodegradación en agua y en soporte Paño Sentec® a tiempo inicial y final (ND - No Detectado). Ensayo IVA.

INDICADORES	Agua		Soporte	
	Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo Inicial	Tiempo Final
Relación Pristano/Fitano	1,153	ND	2,132	0,352
Relación C17/Pristano	1,497	ND	1,171	1,776
Relación C18/Fitano	1,260	ND	2,819	0,586

Finalmente, las imágenes SEM (Figuras 43 y 44) respaldan una vez más los resultados mostrados anteriormente en lo referente a adhesión microbiana; de hecho se puede observar en la figura 43B la huella que dejan las bacterias en la superficie al desprenderse.

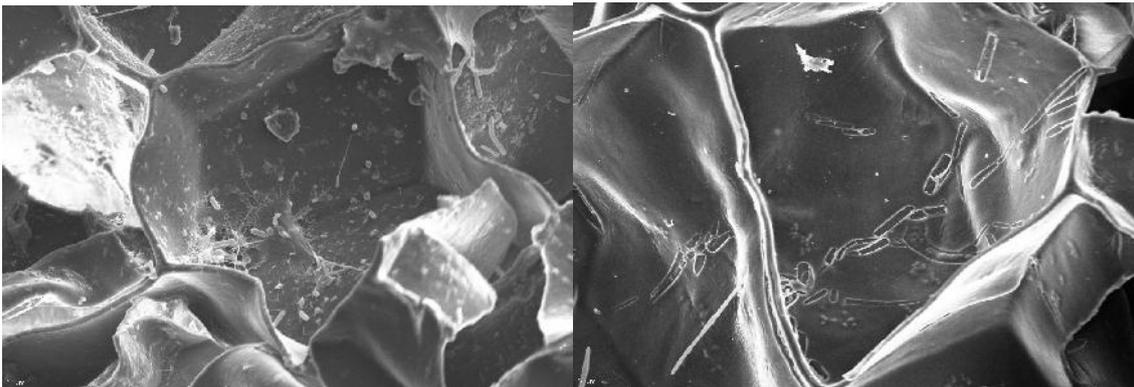


Figura 43. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Corksorb® 01025. Ensayo IVA.

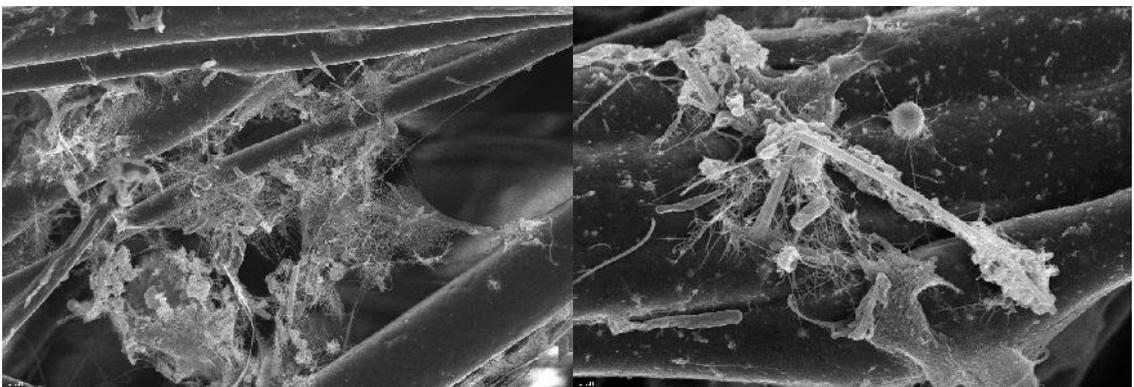


Figura 44. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Paño Sentec®. Ensayo IVA.

4.1.4 Ensayo IVB.

Finalmente, los resultados obtenidos en el ensayo IVB, donde el contenido en hidrocarburos en agua era elevado (en torno a 20.000ppm TPH) ya que se adicionó diesel al agua empleada para el ensayo IVA, se muestran en las figuras 45, 46, 47 y 48. En el caso del CorkSorb® 01025 nuevamente las poblaciones microbianas son superiores a las del Ensayo IVA donde el contenido en hidrocarburos del agua a tratar era moderado.

En el caso del Paño Sentec®, la población microbiana adherida es superior a la del ensayo IVA y por consiguiente muy superior a la del ensayo III. Además destacar que el incremento de la población microbiana adherida al soporte Paño Sentec® se produce en una fase de ensayo más avanzada (al final del ensayo) que en el ensayo IVA, donde el máximo valor de Log (UFC/ml) se alcanza a t14. (Figura 45).

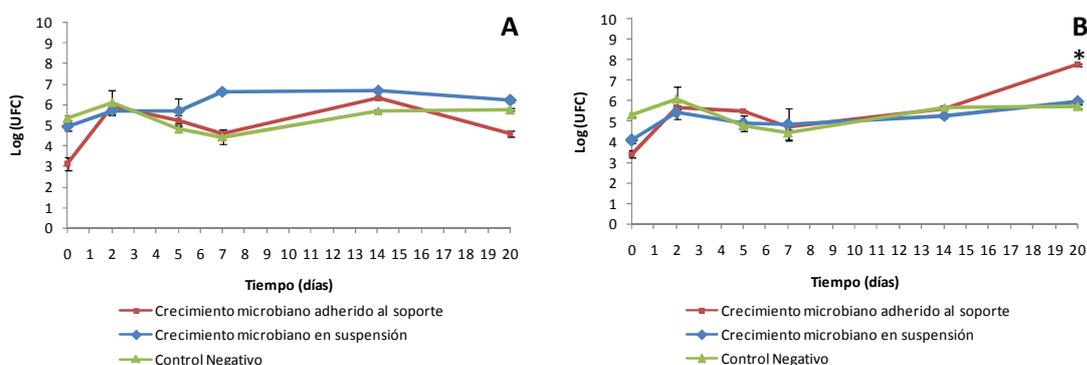


Figura 45. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y adheridos al soporte (expresado en Log (UFC/ml soporte)) con los soportes Corksorb® 01025 (A) y Paño Sentec® (B), así como en ausencia de los mismos (Control Negativo, expresado en Log (UFC/ml agua)). Ensayo IVB. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

La evolución de la concentración de los TPH empleando ambos soportes en el ensayo IVB se representa en la figura 46, donde se observa como los hidrocarburos de forma clara son eliminados del agua contaminada, en parte debido a una degradación en el propio agua, y en parte debido a que quedan absorbidos en el soporte. Las figuras 47 y 48 muestran la evolución de las fracciones de hidrocarburos en presencia de ambos soportes, y muestran la gran capacidad de absorción y concentración de las mismas por parte de los absorbentes CorkSorb® 01025 y Paño Sentec®, quedando el agua prácticamente libre de hidrocarburos al finalizar el ensayo IVB.

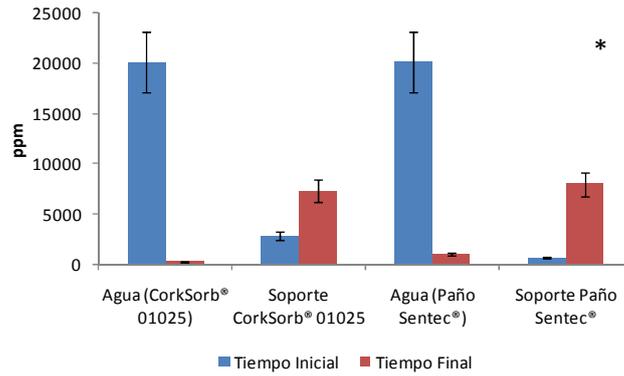


Figura 46. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) y absorbidos a los soportes Corksorb® 01025 y Paño Sentec® (mg/L agua tratada) a tiempo inicial y final. Ensayo IVB. (*) Existen diferencias significativas entre la absorción al soporte Corksorb® 01025 y al Paño Sentec®.

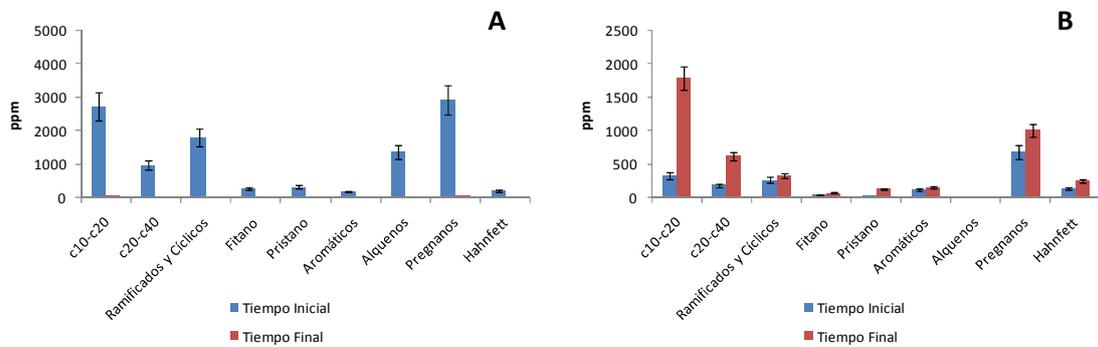


Figura 47. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) (A) y absorbidas al soporte Corksorb® 01025 (mg/L agua tratada) (B) a tiempo inicial y final. Ensayo IVB.

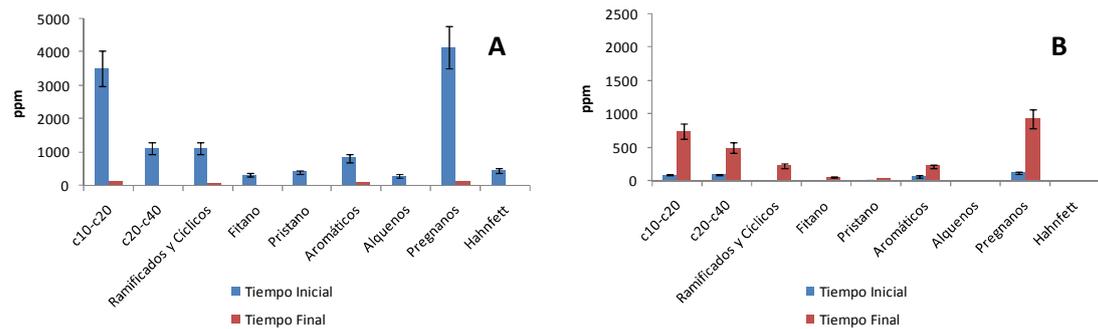


Figura 48. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) (A) y absorbidas al soporte Paño Sentec® (mg/L agua tratada) (B) a tiempo inicial y final. Ensayo IVB.

En cuanto a los indicadores de biodegradación (Tablas 9 y 10), destacar la reducción de la relación pristano/fitano en el paño Sentec® en más de un 50%.

Tabla 9. Indicadores de biodegradación en agua y en soporte Corksorb® 01025 a tiempo inicial y final (ND - No Detectado). Ensayo IVB.

INDICADORES	Agua		Soporte	
	Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo Inicial	Tiempo Final
Relación Pristano/Fitano	1,178	1,256	0,734	1,801
Relación C17/Pristano	ND	1,858	2,852	1,091
Relación C18/Fitano	1,339	1,851	1,596	2,550

Tabla 10. Indicadores de biodegradación en agua y en soporte Paño Sentec® a tiempo inicial y final (ND - No Detectado). Ensayo IVB.

INDICADORES	Agua		Soporte	
	Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo Inicial	Tiempo Final
Relación Pristano/Fitano	1,267	1,361	1,420	0,558
Relación C17/Pristano	1,381	1,170	1,572	2,774
Relación C18/Fitano	1,532	1,472	ND	1,565

Finalmente, las figuras 49 y 50 de Microscopía Electrónica de Barrido muestran la población bacteriana adherida a la superficie de los soportes empleados.

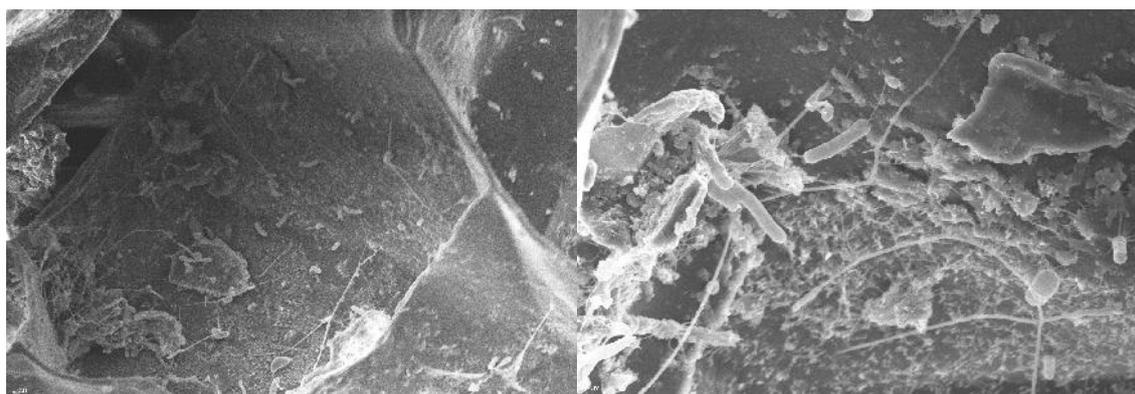


Figura 49. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Corksorb® 01025. Ensayo IVB.

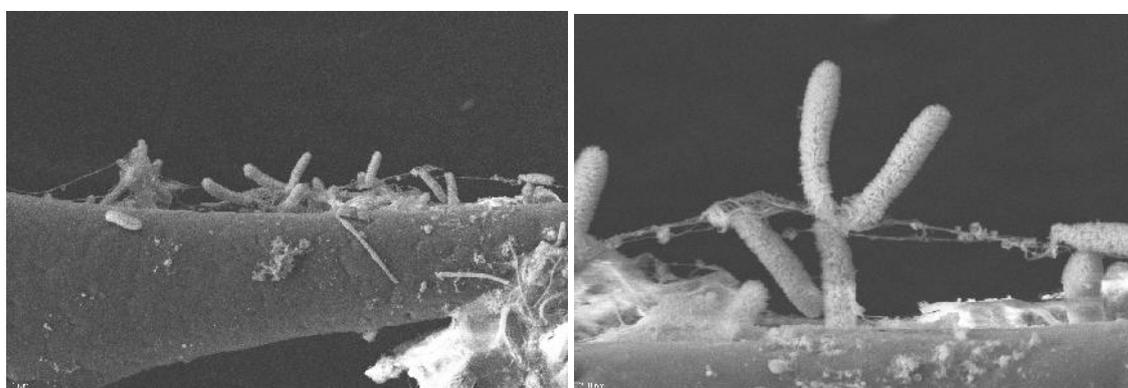


Figura 50. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Paño Sentec®. Ensayo IVB.

Los resultados de estos 4 ensayos mostraron en primer lugar que el soporte de corcho hidrófilo CorkSorb® 03025 no es un material absorbente adecuado para adherir a su superficie microorganismos. Además quedó demostrado la tendencia de la microbiota autóctona del agua contaminada con hidrocarburos a adherirse a la superficie de los soportes para formar una biopelícula, la cual aumenta su estabilidad a medida que aumenta la concentración de hidrocarburos, como en el caso del absorbente CorkSorb® 01025, donde la biopelícula se desprende en tiempos más avanzados del ensayo según aumenta la concentración de hidrocarburos en agua. Finalmente destacar el buen comportamiento de los soportes CorkSorb® 01025 y Paño Sentec® como absorbentes de hidrocarburos y como materiales con capacidad de adhesión de microorganismos para formar biopelículas.

4.2 Ensayos de absorción y biodegradación

4.2.1 Ensayo V.

El ensayo V, tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se llevó a cabo en dos biorreactores de flujo horizontal empleando tres soportes Paño Sentec® equidistantes entre ellos y trabajando a dos caudales diferentes, $Q_{11}=18$ L/h y $Q_{12}=36$ L/h durante 72h. Los paños fueron denominados 1, 2 y 3, en función de su colocación a partir de la entrada de caudal.

Como se observa en la figura 51, en el agua procedente de la planta de CLH en Motril, que se mantuvo en recirculación en cada uno de los biorreactores, la microbiota se mantuvo estable durante las 72 horas de incubación. No se observaron diferencias significativas entre ambos caudales.

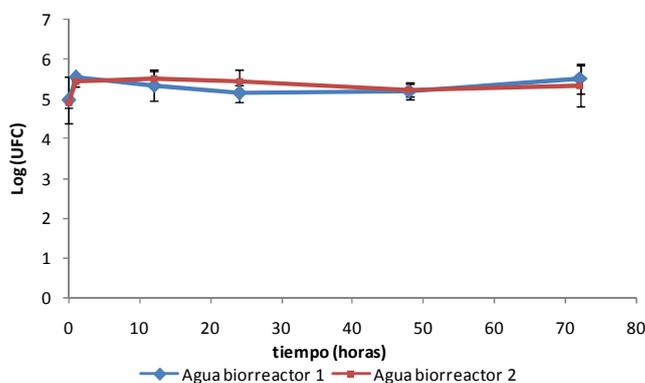


Figura 51. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) en ambos biorreactores empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

Resultados similares se observaron en la cuantificación de los microorganismos adheridos al Paño Sentec® (Figura 52). Indicar que la microbiota se mantuvo estable y que hubo una buena adherencia a los soportes absorbentes, encontrándose al finalizar el ensayo una población microbiana adherida a los mismos algo inferior que en suspensión en el agua en el caso del primer reactor, y similar en el caso del segundo en el que se empleaba un caudal superior. En el biorreactor 1 ($Q_{11}=18$ L/h) se alcanzaron valores comprendidos entre 4,8 y 5 Log (UFC/ml), mientras que en el biorreactor 2 ($Q_{12}=36$ L/h) se alcanzaron valores ligeramente superiores, entre 5 y 5,5 Log (UFC/ml) al finalizar el ensayo.

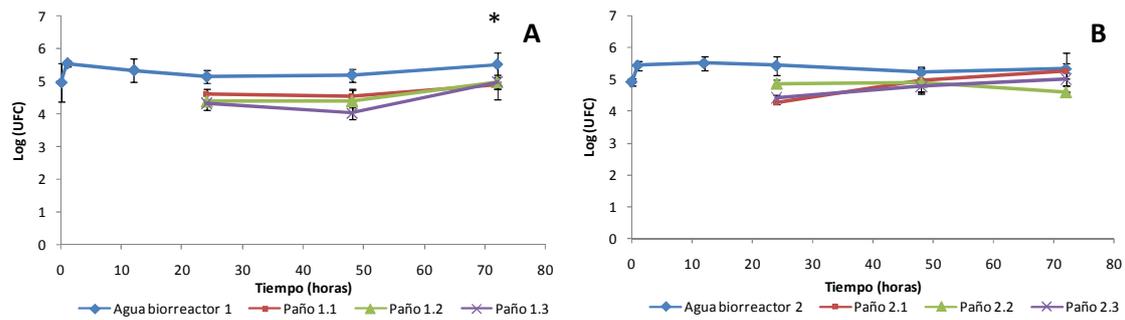


Figura 52. Evolución del número de microorganismos en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y adheridos a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)) de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en los biorreactores 1 (A) y 2 (B) empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida a los soporte.

En cuanto al análisis de la concentración hidrocarburos en agua (TPH) se observó que en el agua tratada en el reactor con el caudal bajo Q_{11} , no hubo una disminución significativa al final del tratamiento (Figura 53); en el caso del caudal elevado Q_{12} se produjo una disminución de TPH moderada de un 53,8%.

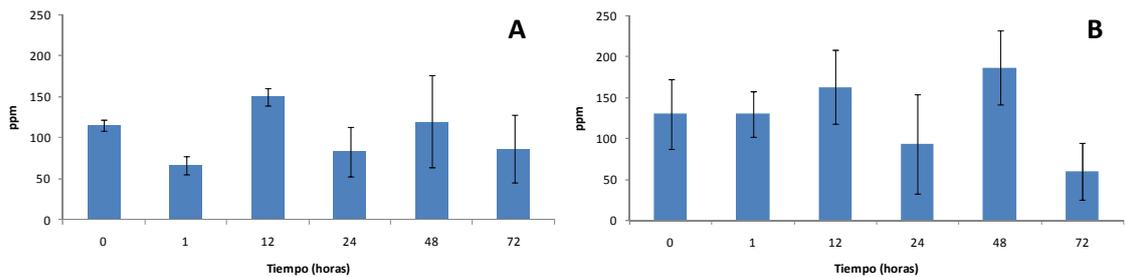


Figura 53. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo V en los biorreactores 1 (A) y 2 (B) empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

Hay que destacar que la mayor parte de las fracciones de hidrocarburos ven reducida su concentración hasta niveles no detectables, siendo más acusada dicha reducción a caudal de 36L/h (se produce transcurridas 24h) que a caudal de 18 L/h (se produce transcurridas 48h).

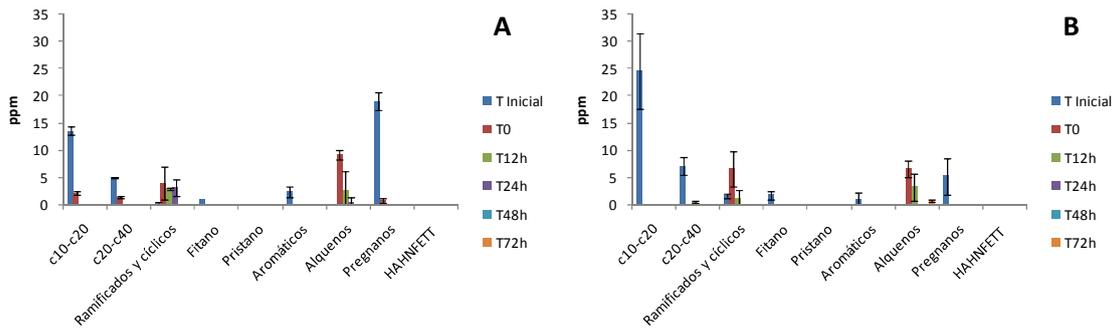


Figura 54. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo V en los biorreactores 1 (A) y 2 (B) empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

Destacar que se estudiaron los índices de biodegradación en el agua (pristano/fitano, c17 (heptadecano)/pristano, y c18 (octadecano)/fitano) y teniendo en cuenta que el pristano no se detectó en ningún tiempo de muestreo y que el fitano únicamente fue detectado a tiempo inicial, ninguno de ellos fue representativo.

Finalmente, con respecto a la absorción de hidrocarburos por parte de los materiales absorbentes, destacar que el sistema formado por tres soportes absorbentes Paño Sentec® retiene en mayor medida cuando el caudal de operación es mayor, tal y como se observa en la figura 55 (22,46 mg/L agua tratada a caudal bajo frente a 44,22 mg/L a caudal alto transcurridas 72h). En la figura 56 se muestra como en cada uno de los paños se produjo dicha absorción, siendo superior en el último Paño Sentec® a 18L/h; en el biorreactor 2 (caudal de trabajo 36L/h), durante las primeras 48h la absorción se produjo en mayor medida en los dos primeros soportes absorbentes, siendo ligeramente superior en el tercero y último a las 72h.

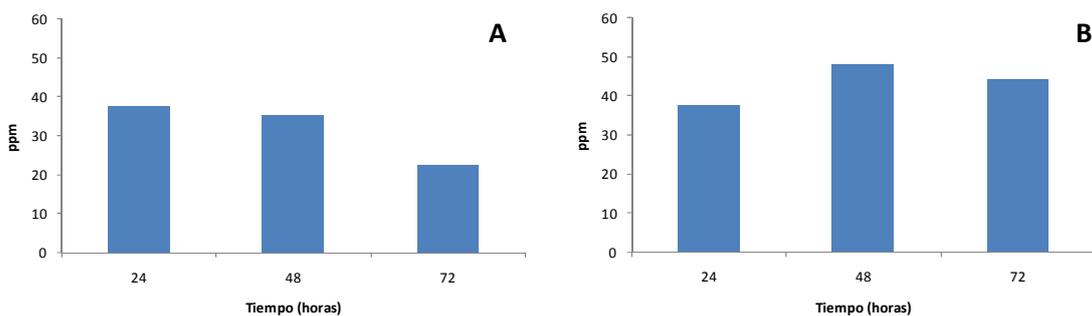


Figura 55. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo V en los biorreactores 1 (A) y 2 (B) empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

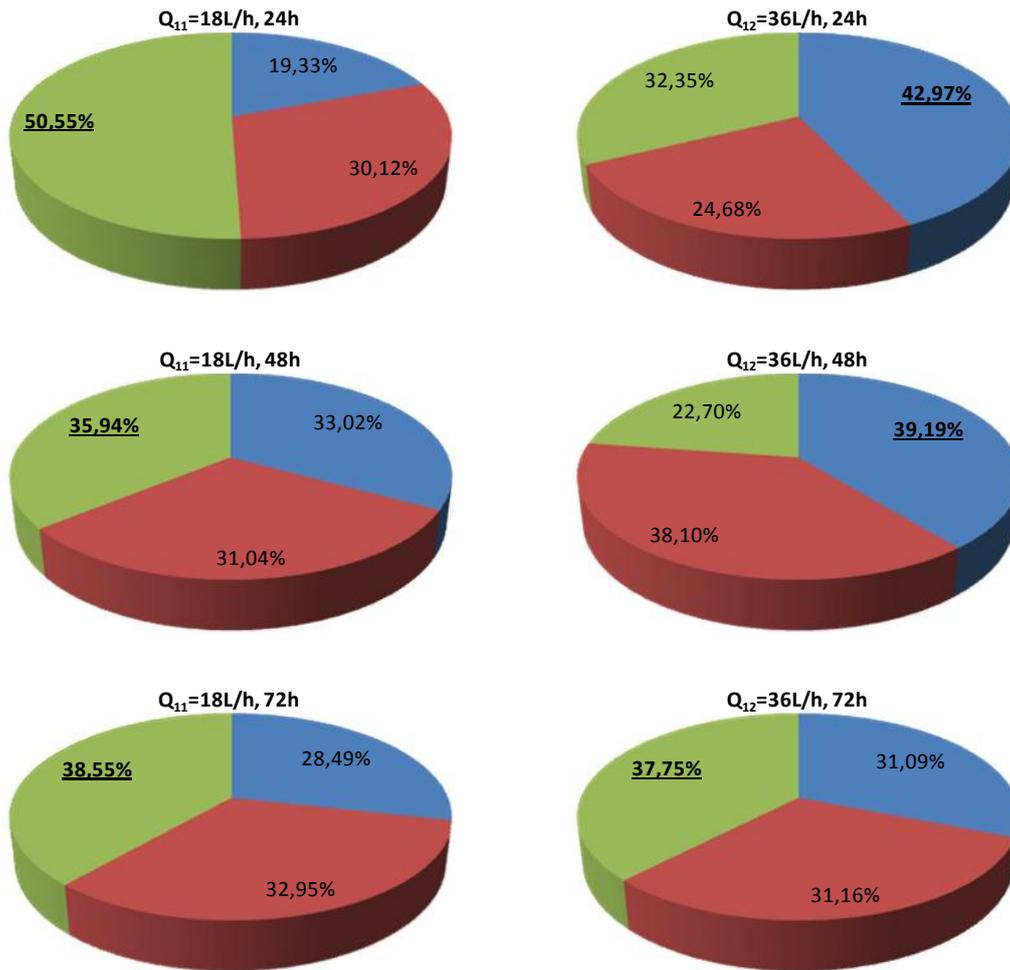


Figura 56. Porcentaje de absorción de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes (azul Paño Sentec®1, rojo Paño Sentec®2 y verde Paño Sentec®3) transcurridas 24, 48 y 72h, en los biorreactores 1 ($Q_{11}=18L/h$) y 2 ($Q_{12}=36L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

Atendiendo a las diferentes fracciones de hidrocarburos, en el biorreactor 1 ($Q_{11}=18L/h$) la retención de la mayor parte de las fracciones se produce en el tercer y último soporte absorbente Paño Sentec® (Figura 57).

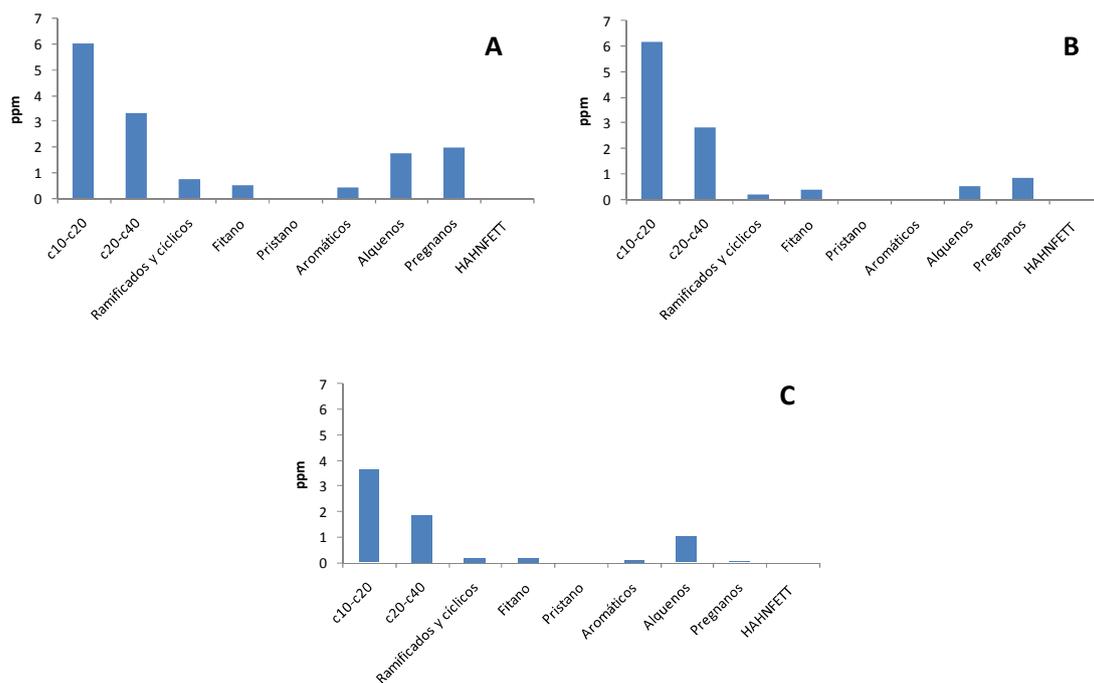


Figura 57. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas a los soportes (mg/L agua tratada) transcurridas 24 (A), 48 (B) y 72h (C), en el biorreactor 1 ($Q_{11}=18L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

El porcentaje de absorción de cada uno de los soportes absorbentes Paño Sentec® para cada una de las fracciones queda reflejado en las tablas 11-13, siendo nuevamente mayoritaria la absorción en el último soporte absorbente, principalmente a las 24 y 48h.

Tabla 11. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 24h en el biorreactor 1 ($Q_{11}=18L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo V.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3
c10-c20	6,021	22,30%	31,82%	45,88%
c20-c40	3,308	16,68%	23,53%	59,79%
Ramificados y cíclicos	0,758	0,00%	9,86%	90,14%
Fitano	0,508	16,66%	33,80%	49,55%
Pristano	ND	ND	ND	ND
Aromáticos	0,393	23,10%	21,51%	55,40%
Alquenos	1,770	0,00%	5,61%	94,39%
Pregnanos	1,971	8,26%	41,84%	49,89%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

Tabla 12. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 48h en el biorreactor 1 ($Q_{11}=18L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo V.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3
c10-c20	6,191	27,18%	32,32%	40,50%
c20-c40	2,818	38,82%	30,88%	30,30%
Ramificados y cíclicos	0,185	0,00%	39,01%	60,99%
Fitano	0,379	25,89%	30,73%	43,38%
Pristano	ND	ND	ND	ND
Aromáticos	ND	ND	ND	ND
Alquenos	0,524	53,94%	10,55%	35,51%
Pregnanos	0,815	11,77%	24,06%	64,17%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

Tabla 13. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 72h en el biorreactor 1 ($Q_{11}=18L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo V.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3
c10-c20	3,633	25,39%	32,49%	42,12%
c20-c40	1,836	25,92%	37,99%	36,10%
Ramificados y cíclicos	ND	ND	ND	ND
Fitano	0,214	26,08%	30,25%	43,67%
Pristano	ND	ND	ND	ND
Aromáticos	ND	ND	ND	ND
Alquenos	1,015	40,17%	28,89%	30,94%
Pregnanos	0,083	40,33%	27,93%	31,74%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

De igual modo en la figura 58 y en las tablas 14-15 se exponen los resultados obtenidos en el biorreactor 2 con un caudal de 36 L/h, observándose que las fracciones siguen el mismo patrón que los TPH, ya que se produce una mayor absorción en el primer soporte, fundamentalmente a las 24 y 48h.

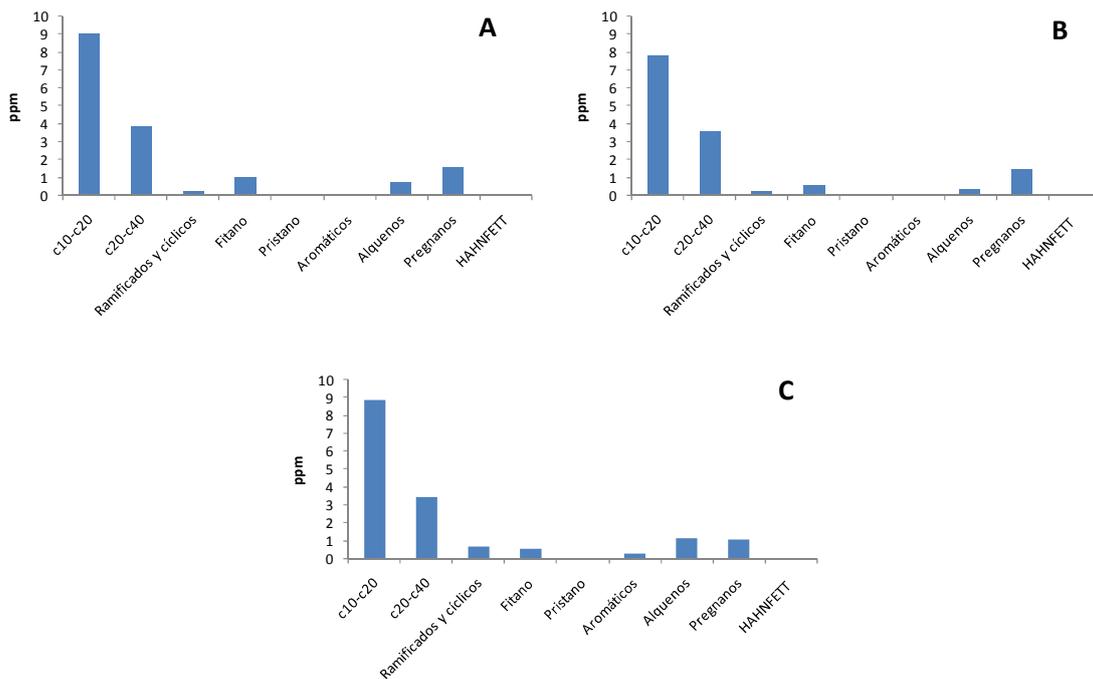


Figura 58. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas a los soportes (mg/L agua tratada) transcurridas 24 (A), 48 (B) y 72h (C), en el biorreactor 2 ($Q_{12}=36L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec®. Ensayo V.

Tabla 14. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 24h en el biorreactor 2 ($Q_{12}=36L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo V.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3
c10-c20	9,071	46,74%	17,61%	35,65%
c20-c40	3,800	55,79%	13,56%	30,65%
Ramificados y cíclicos	0,205	38,97%	30,44%	30,59%
Fitano	0,979	70,45%	7,93%	21,62%
Pristano	ND	ND	ND	ND
Aromáticos	ND	ND	ND	ND
Alquenos	0,734	44,93%	14,60%	40,46%
Pregnanos	1,617	54,93%	2,74%	42,33%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

Tabla 15. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 48h en el biorreactor 2 ($Q_{12}=36L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo V.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3
c10-c20	7,793	39,66%	26,78%	33,56%
c20-c40	3,543	37,57%	25,72%	36,71%
Ramificados y cíclicos	0,244	50,38%	24,55%	25,07%
Fitano	0,552	41,03%	26,43%	32,54%
Pristano	ND	ND	ND	ND
Aromáticos	ND	ND	ND	ND
Alquenos	0,355	23,89%	24,12%	51,98%
Pregnanos	1,476	38,31%	17,43%	44,26%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

Tabla 16. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 72h en el biorreactor 2 ($Q_{12}=36L/h$) en el transcurso del Ensayo V empleando tres soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo V.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3
c10-c20	8,867	27,73%	33,40%	38,88%
c20-c40	3,452	30,21%	33,99%	35,80%
Ramificados y cíclicos	0,641	49,05%	50,95%	0,00%
Fitano	0,521	28,71%	32,43%	38,86%
Pristano	ND	ND	ND	ND
Aromáticos	0,236	36,99%	63,01%	0,00%
Alquenos	1,123	20,42%	51,01%	28,57%
Pregnanos	1,050	19,60%	20,38%	60,03%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

Por último, la evolución del índice de biodegradación c18/fitano se muestra en la tabla 17, ya que al no detectar el pristano en ninguno de los materiales absorbentes, los índices restantes no pudieron ser calculados.

Tabla 17. Índices de biodegradación en los soportes Paño Sentec® transcurridas 24, 48 y 72h en los biorreactores de flujo horizontal 1 ($Q_{11}=18L/h$) y 2 ($Q_{12}=36L/h$) (ND - No Detectado). Ensayo V.

INDICADORES	Paño Sentec®		
	24h	48h	72h
Relación C18/Fitano (Q_{11})	1,229	1,537	1,490
Relación C18/Fitano (Q_{12})	2,577	1,364	1,308

A la vista de los resultados, se puede afirmar que es preferible trabajar con un caudal elevado, ya que en el biorreactor 2 en el que se trabajó con un caudal de 36L/h hubo una mayor adherencia microbiana a los soportes (Figura 52) así como una mayor eliminación de hidrocarburos totales (TPH) y de las distintas fracciones de los mismos del agua contaminada (Figuras 53 y 54), que en el caso del biorreactor 1 (caudal de trabajo de 18 L/h) empleando la misma cantidad de material absorbente. Además, esta mayor adherencia microbiana y eliminación de hidrocarburos del agua correspondió a una mayor presencia de hidrocarburos absorbidos en los soportes en el caso del biorreactor 2 (Figura 55).

También señalar que a un caudal menor parece que parte de los hidrocarburos absorbidos volvieron al agua. Por otro lado también se observa que la absorción se produjo de forma desigual en los soportes absorbentes, y que al modificar el caudal de trabajo esta distribución también se vio modificada. Finalmente destacar que a mayor caudal se observa como el índice c18/fitano disminuye con el transcurso del ensayo, indicativo de la existencia de un proceso de biodegradación (Tabla 17).

Finalmente, en la figura 59 se detalla la adhesión de los microorganismos procedentes del emplazamiento contaminado al material absorbente Paño Sentec® en dos imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

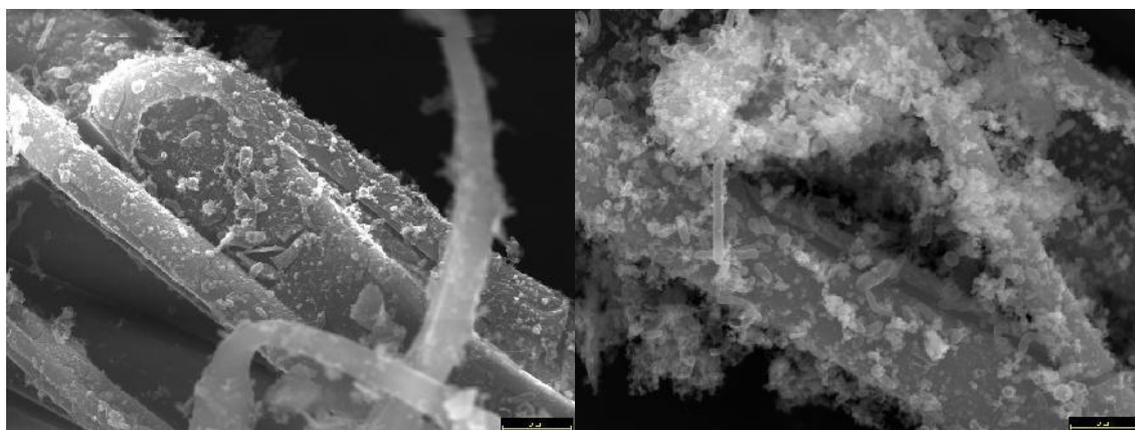


Figura 59. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Paño Sentec®. Ensayo V.

4.2.2 Ensayo VI.

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo V, se planificó este nuevo ensayo VI, empleando un caudal de 36L/h y duplicando la cantidad de material absorbente.

El ensayo VI, tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se llevó a cabo en un biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®, equidistantes cada uno de ellos y trabajando a un caudal de 36 L/h durante 48h. Los paños fueron denominados 1, 2, 3, 4, 5 y 6 atendiendo a su posición a partir de la entrada de caudal.

Como se observa en la figura 60, en el agua procedente de la planta de CLH en Motril, que se mantuvo en recirculación en el biorreactor, la microbiota se mantuvo estable dentro del margen de 5,5 a 6,5 Log (UFC/ml) durante las 48 horas de incubación, observándose un descenso de la misma con el transcurso del ensayo debido a la adherencia microbiana a cada uno de los soportes absorbentes.

Se puede observar en dicha gráfica que, al igual que en ensayos anteriores, en el caso de los soportes la población microbiana adherida fue similar o ligeramente inferior a la que se encuentra en suspensión. Además, en los soportes colocados en las posiciones centrales fue donde se encontró una mayor población microbiana a las 24h, con valores de Log (UFC/ml) similares a los de suspensión en agua; a las 48 se igualaron los valores de la población adherida a los distintos soportes y los de la población en suspensión (Figura 61).

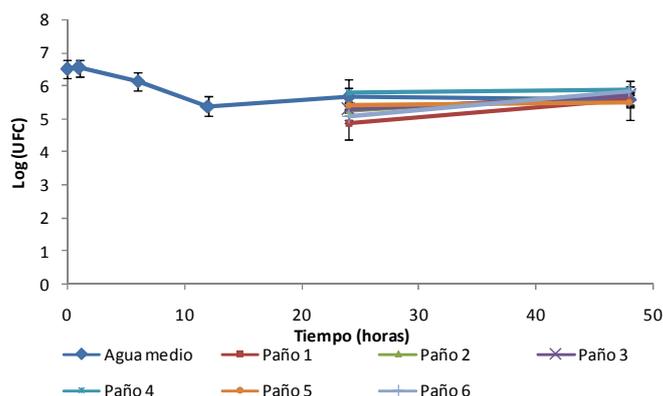


Figura 60. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y adherida a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

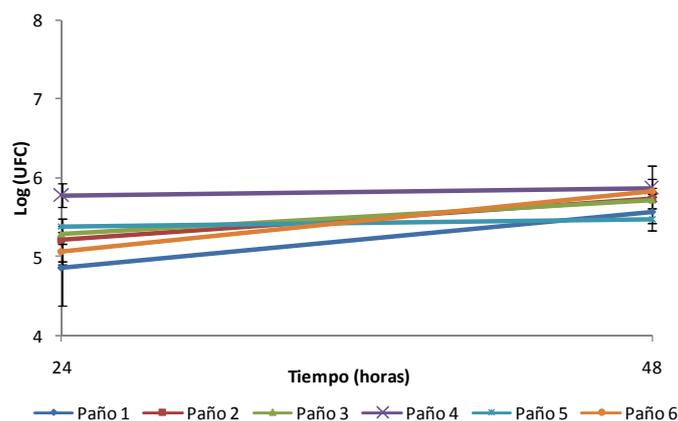


Figura 61. Evolución del número de microorganismos adheridos a los soportes de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

Respecto a la variación en la concentración de hidrocarburos en términos de TPH determinados por gravimetría, se observó que en el agua tratada en el biorreactor hubo una disminución significativa al final del tratamiento (Figura 62); en este ensayo se produjo una disminución en la concentración de TPH de un 91,4%, superior a la que se produjo en el ensayo anterior; hay que destacar que puede deberse además de a una degradación de los hidrocarburos en agua, a la existencia de una mayor superficie de absorbente en este ensayo. De igual modo, las diferentes fracciones vieron reducida su concentración hasta niveles prácticamente no detectables.

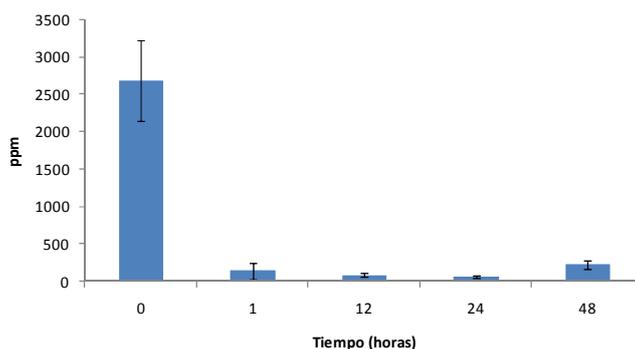


Figura 62. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

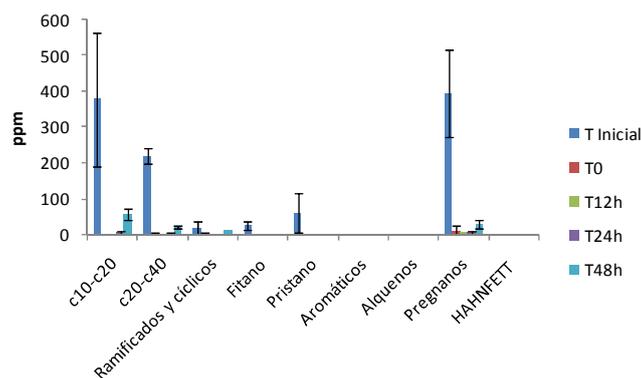


Figura 63. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

Al igual que en el ensayo V, el cálculo de los índices de biodegradación no fue relevante ya que a excepción de tiempo inicial, en el resto de los tiempos de muestreo ni fitano ni pristano fueron detectados por cromatografía.

Finalmente, en lo que respecta a la absorción de hidrocarburos por parte de los soportes absorbentes Paño Sentec®, se observó una mayor retención de hidrocarburos totales (TPH) con el transcurso del ensayo (508,73 mg/L agua tratada transcurridas 48h) (Figura 64), siendo mayor la absorción en los soportes colocados en las posiciones centrales (Figura 65).

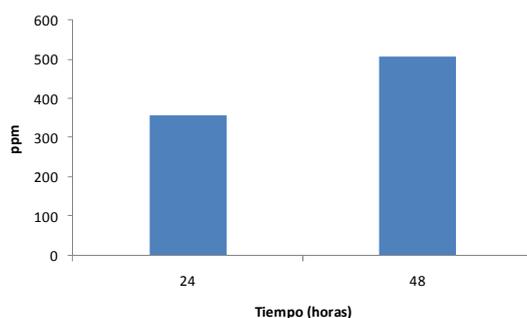


Figura 64. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

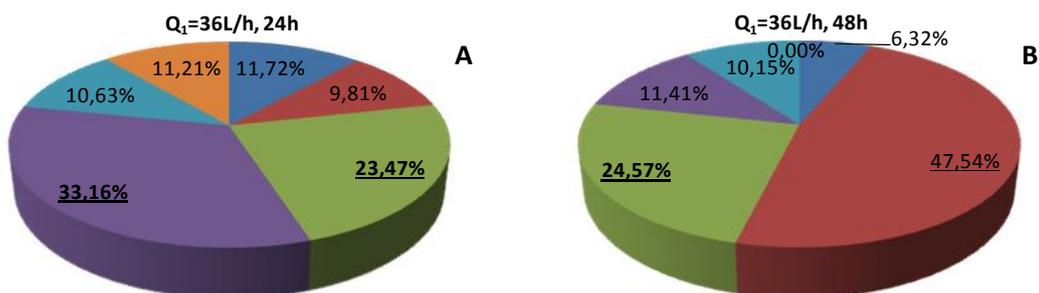


Figura 65. Porcentaje de absorción de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes (azul Paño Sentec®1, rojo Paño Sentec®2, verde Paño Sentec®3, morado Paño Sentec®4, celeste Paño Sentec®5 y naranja Paño Sentec®6) transcurridas 24 (A) y 48h (B), en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

En lo que respecta a las fracciones de hidrocarburos absorbidas, en la figura 66 se observa de igual forma que en la gráfica 64, una mayor absorción a las 48h de ensayo y en mayor proporción en los soportes instalados en las posiciones centrales (Tablas 18-19).

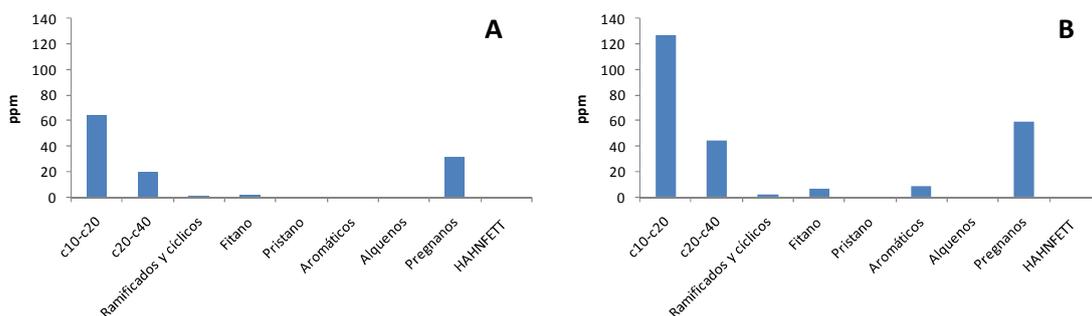


Figura 66. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas a los soportes (mg/L agua tratada) transcurridas 24h (A) y 48h (B) en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec®. Ensayo VI.

Tabla 18. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 24h en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo VI.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3	% Paño Sentec®4	% Paño Sentec®5	% Paño Sentec®6
c10-c20	64,150	14,40%	6,02%	27,42%	41,98%	10,18%	0,00%
c20-c40	19,645	13,30%	2,06%	33,54%	42,38%	8,71%	0,00%
Ramificados y cíclicos	1,548	64,71%	6,96%	0,00%	24,43%	3,90%	0,00%
Fitano	2,384	0,00%	0,00%	41,03%	58,97%	0,00%	0,00%
Pristano	ND						
Aromáticos	0,496	0,00%	0,00%	84,62%	0,00%	0,00%	15,38%
Alquenos	ND						
Pregnanos	31,715	14,54%	1,96%	30,11%	42,20%	11,20%	0,00%
HAHNFETT	ND						

Tabla 19. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridas 48h en el transcurso del Ensayo VI ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo VI.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®1	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3	% Paño Sentec®4	% Paño Sentec®5	% Paño Sentec®6
c10-c20	126,765	9,46%	5,70%	45,00%	20,75%	8,80%	10,29%
c20-c40	44,457	9,24%	5,21%	45,72%	23,64%	8,17%	8,02%
Ramificados y cíclicos	1,818	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	50,53%	49,47%
Fitano	6,347	9,96%	0,00%	51,77%	26,50%	11,78%	0,00%
Pristano	ND						
Aromáticos	7,960	10,64%	10,23%	36,41%	24,45%	0,00%	18,28%
Alquenos	ND						
Pregnanos	59,109	8,44%	4,38%	41,59%	22,77%	13,49%	9,33%
HAHNFETT	ND						

Tabla 20. Índices de biodegradación en los soportes Paño Sentec® transcurridas 24 y 48 h empleando el biorreactor de flujo horizontal. Ensayo VI.

INDICADORES	Paño Sentec®	
	24h	48h
Relación C18/Fitano	2,364	1,675

Finalmente, en la figura 67 se exponen dos imágenes SEM en las que se muestra como se produce la adhesión microbiana al material absorbente Paño Sentec®.

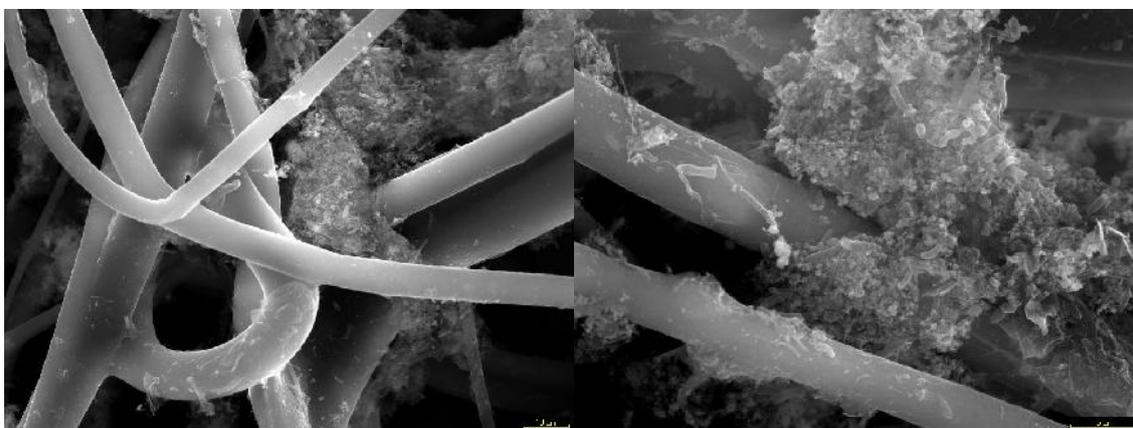


Figura 67. Imágenes SEM. Detalle de las bacterias adheridas a la superficie del soporte Paño Sentec®. Ensayo VI.

Por tanto, a partir de los resultados del ensayo VI, podemos afirmar que la absorción al material absorbente varía en función de la posición de este, y que existe una mayor adhesión microbiana en los que hay una mayor retención (Figura 60). Además, si comparamos los ensayos V y VI, vemos que en éste último la concentración de hidrocarburos al inicio fue superior, lo cual resultó en una mayor población microbiana adherida y a una mayor absorción de hidrocarburos, hecho en el que también influyó una mayor cantidad de material absorbente. Respecto a los índices de biodegradación, nuevamente se muestra únicamente la relación entre octadecano y fitano (Tabla 20) ya que el pristano no fue detectado, y se observa una disminución de dicha relación evidenciando la existencia de una degradación microbiana.

4.2.3 Ensayo VII.

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos V y VI, se decidió llevar a cabo este ensayo empleando un biorreactor de flujo horizontal, con cuatro soportes Paño Sentec®, y uno de flujo vertical alojando en su interior el material absorbente corcho CorkSorb® 01025 (corcho hidrófobo), ya empleado con anterioridad en los ensayos de adherencia microbiana en microcosmos. Además se estableció un tiempo de operación de 7 días.

El ensayo VII, tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se llevó a cabo en un biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec® equidistantes entre ellos y trabajando a un caudal de 36 L/h durante 7 días. Los paños fueron denominados 1, 2, 3, y 4 por su posición a partir de la entrada de caudal. Por otro lado, en el biorreactor de flujo vertical se introdujeron 20g de corcho CorkSorb® 01025 alojado en una malla, con un caudal de 18 L/h durante 7 días.

En primer lugar, haciendo referencia al crecimiento microbiano, en el caso del biorreactor de flujo horizontal la microbiota adherida fue similar o algo inferior a la microbiota en suspensión, como se observa en la figura 68, que se mantuvo en el primer caso entre 6 y 6,5 Log (UFC/ml) y en el segundo entre 6 y 7 Log (UFC/ml) durante los 7 días de ensayo.

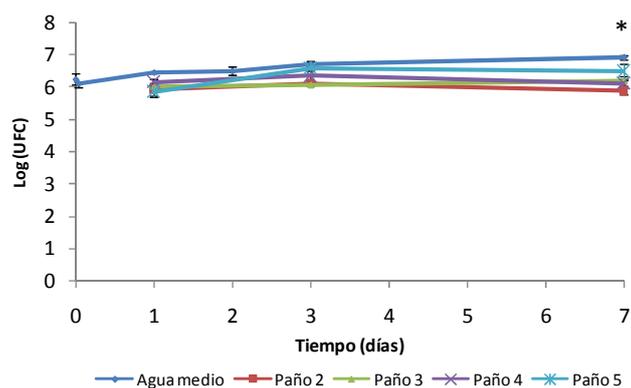


Figura 68. Evolución del número de microorganismos en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y adheridos a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)) de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec®. Ensayo VII. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida a los soportes Paño Sentec® 2 y 3.

Empleando el biorreactor de flujo vertical, la microbiota en suspensión mostró una tendencia ascendente alcanzando valores cercanos a 8 Log (UFC/ml) al final de los 7 días de ensayo, alcanzando 7 Log (UFC/ml) la microbiota adherida al corcho CorkSorb® 01025 (Figura 69).

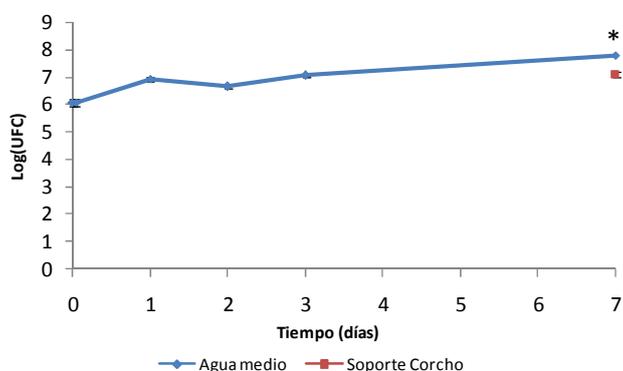


Figura 69. Evolución del número de microorganismos en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y valor final de los mismos adheridos a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)), procedentes de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en el biorreactor de flujo vertical empleando Corcho CorkSorb®. Ensayo VII. (*) Existen diferencias significativas entre población en suspensión y adherida al soporte.

En cuanto al análisis de hidrocarburos, los resultados por gravimetría mostraron una reducción de un 91,9% en cuanto al contenido de hidrocarburos totales TPH en agua, similar al % de reducción del ensayo anterior (Figura 70). Centrándonos en las distintas fracciones de hidrocarburos, la figura 71 muestra que no se produce una reducción de las mismas hasta niveles no detectables.

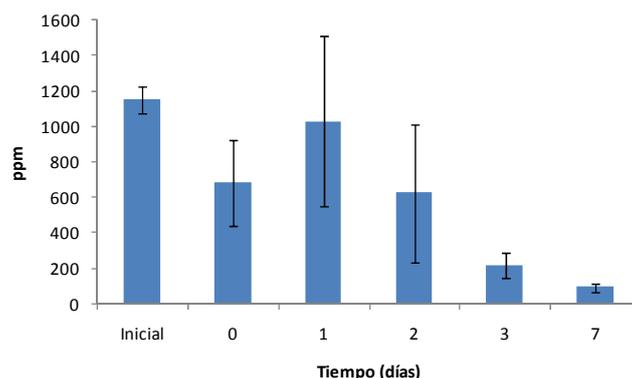


Figura 70. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec®. Ensayo VII.

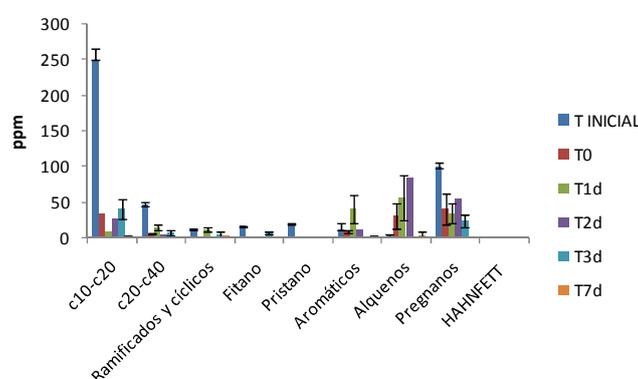


Figura 71. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec®. Ensayo VII.

Al igual que en los ensayos V y VI, la reducción del contenido en hidrocarburos en agua en el transcurso del ensayo hizo que ni fitano ni pristano se encontrasen en una concentración suficiente para ser detectada, por lo que los índices de biodegradación no pudieron ser calculados.

En el caso de los hidrocarburos absorbidos a los soportes absorbentes, se observa en la figura 72 un incremento de la cantidad absorbida con el transcurso del ensayo (118,06 mg/L agua tratada transcurridos 7 días) y una absorción desigual dependiendo de la posición del material absorbente, siendo superior durante el ensayo en las posiciones finales y al final del mismo en el soporte colocado en la última posición (Figura 73). Este patrón de comportamiento también se observa al analizar las diferentes fracciones de hidrocarburos (Figura 74; Tablas 21-23).

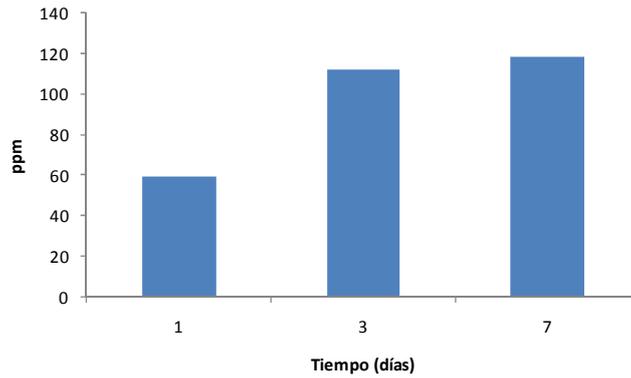


Figura 72. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec®. Ensayo VII.

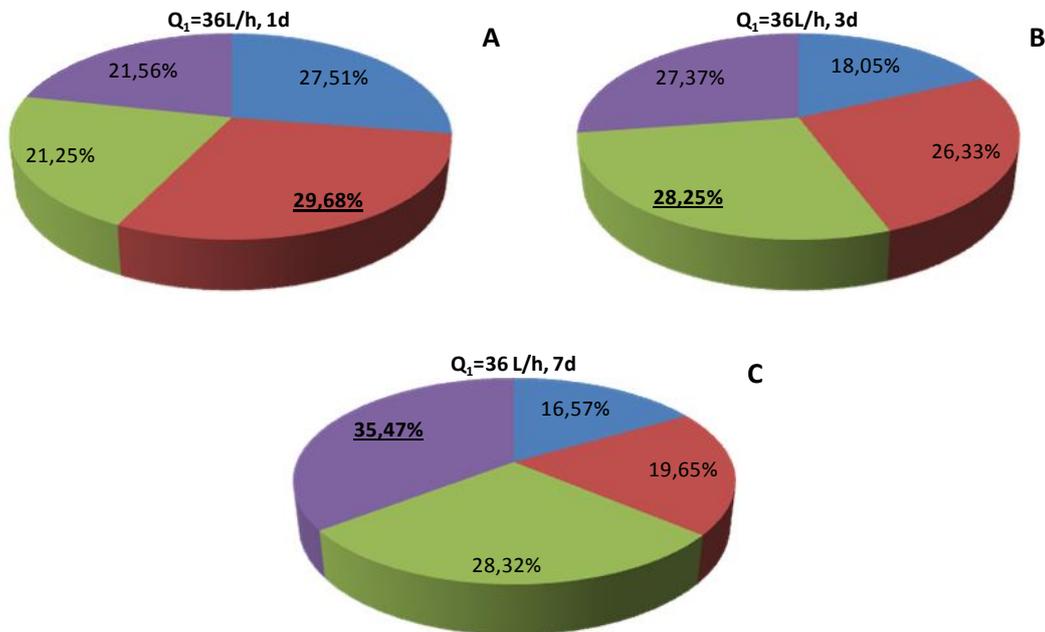


Figura 73. Porcentaje de absorción de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes (azul Paño Sentec®2, rojo Paño Sentec®3, verde Paño Sentec®4, morado Paño Sentec®5) transcurridos 1 día (A), 3 días (B) y 7 días (C), en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec®. Ensayo VII.

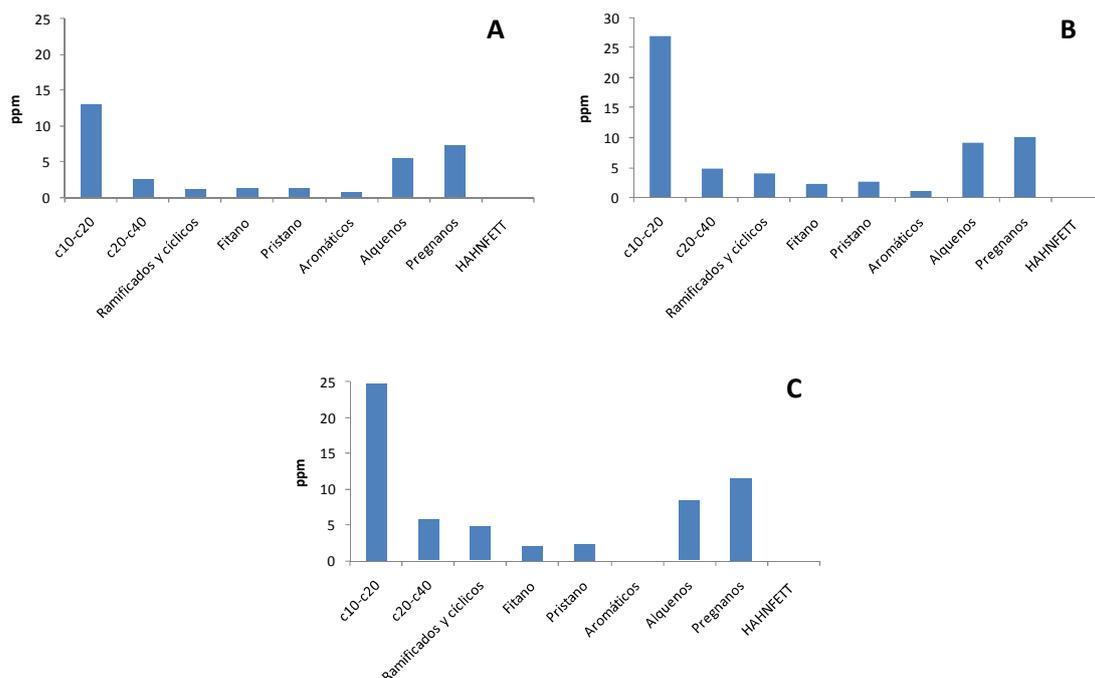


Figura 74. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas a los soportes (mg/L agua tratada) transcurridos 1 día (A), 3 días (B) y 7 días (c) en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec®. Ensayo VII.

Tabla 21. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurrido 1 día en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo VII.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3	% Paño Sentec®4	% Paño Sentec®5
c10-c20	13,021	23,95%	35,55%	20,12%	20,38%
c20-c40	2,497	27,91%	27,93%	17,55%	26,61%
Ramificados y cíclicos	1,181	3,91%	35,71%	37,56%	22,82%
Fitano	1,380	38,81%	19,84%	20,65%	20,70%
Pristano	1,385	26,52%	25,29%	22,52%	25,67%
Aromáticos	0,656	9,68%	35,94%	23,69%	30,69%
Alquenos	5,384	26,28%	31,92%	21,51%	20,30%
Pregnanos	7,276	29,00%	22,63%	21,71%	26,66%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 22. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridos 3 días en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo VII.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3	% Paño Sentec®4	% Paño Sentec®5
c10-c20	27,093	18,91%	25,87%	27,47%	27,75%
c20-c40	4,639	17,63%	27,45%	25,68%	29,24%
Ramificados y cíclicos	3,877	1,54%	56,64%	39,11%	2,72%
Fitano	2,209	16,56%	30,86%	27,08%	25,50%
Pristano	2,614	17,55%	28,40%	27,50%	26,56%
Aromáticos	0,990	34,02%	22,25%	17,53%	26,20%
Alquenos	9,175	25,02%	15,81%	22,67%	36,50%
Pregnanos	10,162	14,23%	27,44%	32,94%	25,40%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 23. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VII ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando cuatro soportes Paño Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo VII.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Paño Sentec®2	% Paño Sentec®3	% Paño Sentec®4	% Paño Sentec®5
c10-c20	24,849	13,29%	26,39%	25,63%	34,69%
c20-c40	5,854	35,84%	20,93%	18,09%	25,14%
Ramificados y cíclicos	4,770	28,27%	3,73%	15,94%	52,05%
Fitano	2,027	18,72%	23,28%	25,13%	32,87%
Pristano	2,358	18,84%	22,89%	24,52%	33,76%
Aromáticos	ND	ND	ND	ND	ND
Alquenos	8,491	13,31%	31,17%	35,23%	20,28%
Pregnanos	11,595	15,44%	26,67%	21,41%	36,48%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND	ND

En este caso debido a la presencia de fitano y pristano los tres índices de biodegradación fueron calculados y se observa un ligero ascenso de los mismos con el transcurso del ensayo, por lo que no evidencian la existencia de un proceso de biodegradación (Tabla 24).

Tabla 24. Índices de biodegradación en los soportes Paño Sentec® transcurridos 1, 3 y 7 días empleando el biorreactor de flujo horizontal. Ensayo VII.

INDICADORES	Paño Sentec®		
	1d	3d	7d
Relación Pristano/Fitano	1,003	1,184	1,163
Relación C17/Pristano	0,956	1,111	1,282
Relación C18/Fitano	1,011	1,150	1,281

En el caso del biorreactor de flujo vertical, en primer lugar destacar una eliminación del 90,3% TPH transcurridos los 7 días de ensayo, y además una reducción de todas las fracciones de hidrocarburos transcurridos 2 días hasta concentraciones no detectables por el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (Figuras 75 y 76). La no detección de fitano y pristano no permite el cálculo de los índices de biodegradación.

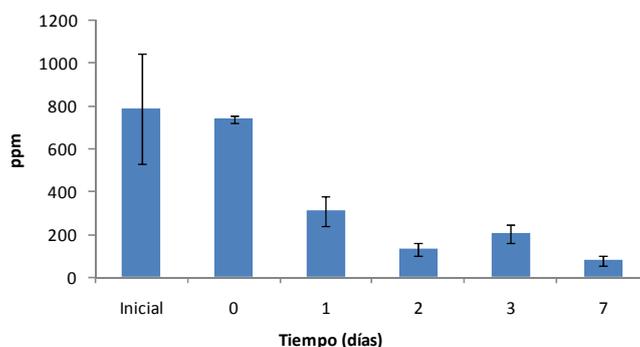


Figura 75. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb®. Ensayo VII.

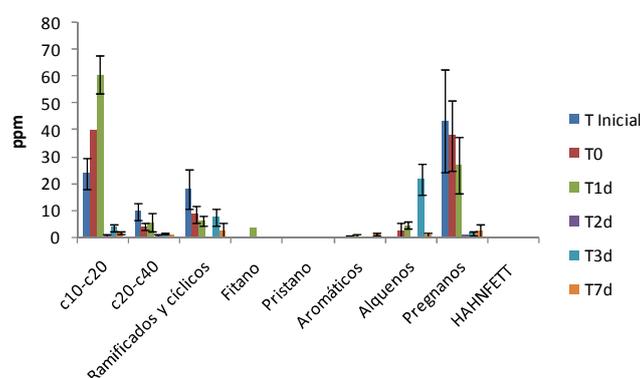


Figura 76. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb®. Ensayo VII.

Respecto a los hidrocarburos retenidos, se contabilizó una absorción por parte del soporte absorbente corcho CorkSorb® 01025 de 212,54 mg/L agua tratada transcurridos los 7 días de ensayo. Respecto a las fracciones de hidrocarburos, en la figura 77 se expone la concentración de las distintas fracciones absorbidas por el material absorbente. Indicar también que la no detección de pristano hizo que solo fuese calculado el índice de biodegradación c18/fitano con un valor de 1,785.

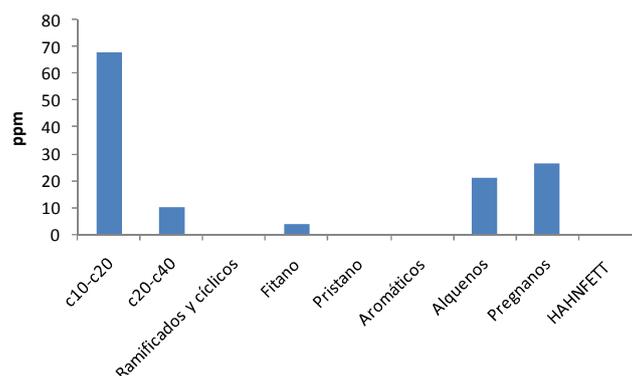


Figura 77. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb®. Ensayo VII.

Al finalizar este ensayo VII, y teniendo en cuenta los resultados de los ensayos V y VI, se puede afirmar que tanto la adhesión microbiana como la absorción de hidrocarburos en el soporte absorbente Paño Sentec® en función de la posición en la que se ubique el mismo; se observó una tendencia a una mayor absorción en las posiciones centrales en el transcurso de los ensayos, y en las finales al finalizar los mismos.

Además, en este último ensayo se constató la eficacia del soporte absorbente corcho CorkSorb® 01025 en término de adhesión microbiana y de absorción de hidrocarburos, así como la eficiencia de la configuración de flujo vertical.

4.2.4 Ensayo VIII.

a) Fase de tratamiento

El ensayo VIII, tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se realizó empleando ambos biorreactores (de flujo horizontal y vertical) y como material absorbente corcho CorkSorb® 01025. En el reactor de flujo horizontal se colocaron tres soportes consistentes en un tejido inerte que alojaba en su interior 100g de corcho hidrófobo granulado, equidistantes entre ellos y que se denominaron 1, 2 y 3 en función de su posición desde la entrada de caudal. En el biorreactor de flujo vertical se alojaron 20g de dicho material absorbente en una malla en el interior de la columna.

En el análisis microbiológico se observó en primer lugar que al final del tratamiento la concentración de microorganismos adheridos era superior en el biorreactor de flujo vertical (Figura 78). Además nuevamente en la posición central en el biorreactor de flujo horizontal se encontró la mayor población microbiana adherida al material absorbente.

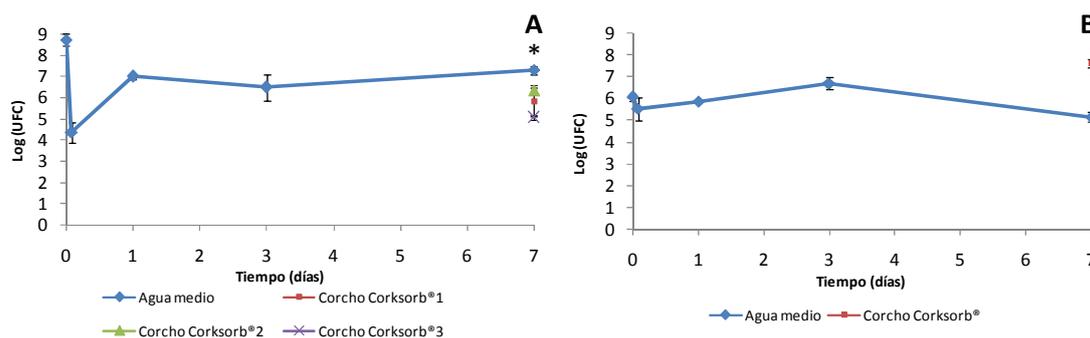


Figura 78. Evolución del número de microorganismos en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y valor final de los mismos adheridos a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)), procedentes de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en el biorreactor de flujo horizontal (A) y en el biorreactor de flujo vertical (B) empleando corcho Corksorb®. Ensayo VIII. (*) Existen diferencias significativas entre la población en suspensión y la adherida a los soportes, entre la adherida al soporte 1 y la adherida al soporte 2, y entre la adherida al soporte 2 y la adherida al soporte 3.

En cuanto al análisis de hidrocarburos en agua, la determinación de TPH por gravimetría en el caso del biorreactor de flujo horizontal demostró que se produce una reducción del contenido de TPH en el agua de un 98,5%, de forma que tras 7 días de ensayo queda constatada la degradación de hidrocarburos producida en agua y a su vez la elevada capacidad de absorción del soporte corcho Corksorb® 01025 (Figura 79). En la figura 79A se representan las concentraciones de hidrocarburos en agua a distintos tiempo del ensayo, correspondiendo al tiempo inicial la concentración en el

agua de entrada y al tiempo 0 la concentración tras el primer ciclo de recirculación. Hay que destacar que esta retención/degradación tuvo lugar a tiempo 0 (tras un ciclo de recirculación) casi en su totalidad, tal y como se observa en la figura 79A. También destacar que en esta configuración (flujo horizontal) parte de los hidrocarburos se soltaron del soporte transcurridos los 7 días del ensayo (Figura 79B).

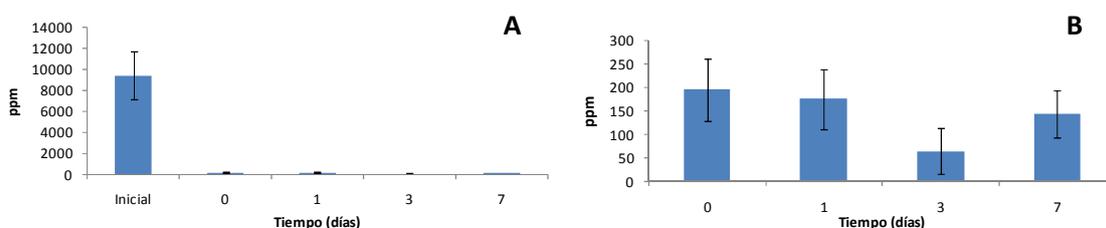


Figura 79. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VIII empleando el biorreactor de flujo horizontal con tres soportes Corcho Corksorb® ($Q_1=36L/h$). Ensayo VIII.

En el caso del biorreactor de flujo vertical se observa que se redujo el contenido de hidrocarburos en agua en un 97,5%, de forma que nuevamente quedó constatada la elevada capacidad de absorción del soporte Corcho Corksorb® 01025 y la capacidad de eliminación del sistema (Figura 80), dado que en esta configuración dicha eliminación también tuvo lugar tras el primer ciclo de recirculación (Figura 80A); en el caso de la configuración en flujo vertical los hidrocarburos absorbidos no se soltaron. Este hecho, junto con una mayor concentración microbiana adherida al soporte que en el caso del biorreactor de flujo horizontal sugiere que la configuración de flujo vertical puede ser más eficaz para la formación de la biopelícula y para la retención de hidrocarburos.

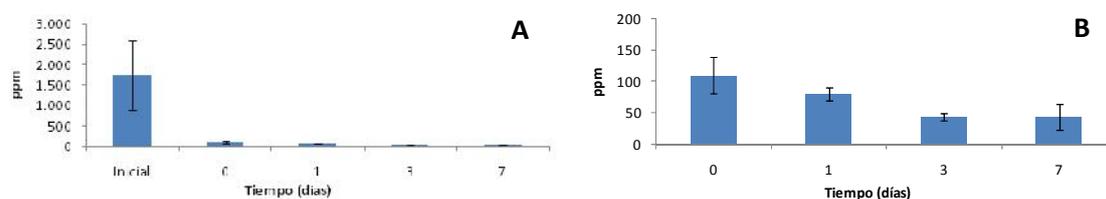


Figura 80. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VIII a tiempo inicial (A), 0, 1, 3 y 7 días (B) empleando el biorreactor de flujo vertical con el soporte Corcho Corksorb® ($Q_2=18L/h$). Ensayo VIII.

Los resultados de cromatografía de gases/espectrometría de masas confirmaron las afirmaciones realizadas con los resultados de gravimetría, ya que se observa un descenso considerable de todas las fracciones de hidrocarburos, siendo incluso más acusado en el caso del biorreactor de flujo vertical (Figuras 81 y 82).

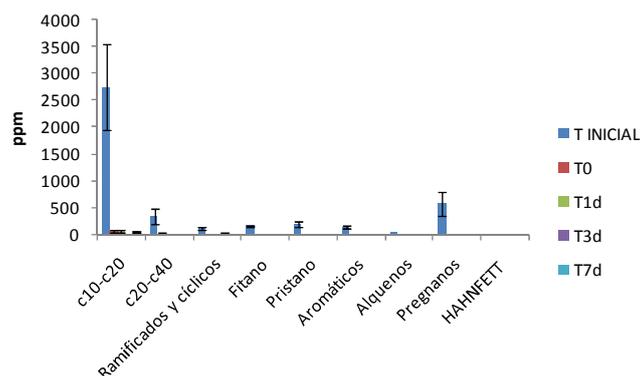


Figura 81. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb®. Ensayo VIII.

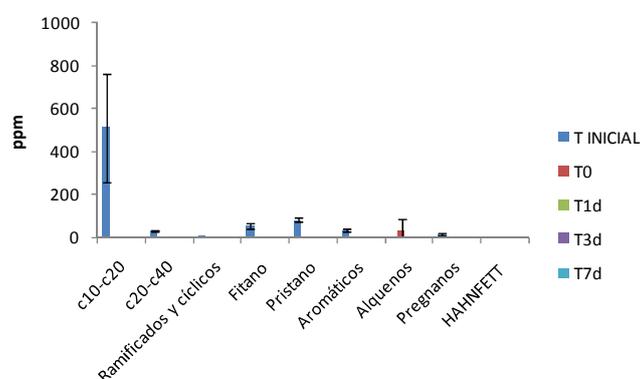


Figura 82. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb®. Ensayo VIII.

En cuanto a los índices de biodegradación, destacar la evolución del índice c18/fitano en el biorreactor de flujo horizontal, que permanece constante e incluso disminuye ligeramente, lo que podría indicar que existe un proceso de biodegradación, aunque no de forma evidente. En el biorreactor de flujo vertical, debido a la elevada tasa de retención/eliminación de los hidrocarburos en agua, no se detectaron fitano ni pristano, por lo que no se pudieron calcular dichos índices.

Tabla 25. Índices de biodegradación en agua empleando el biorreactor de flujo horizontal (ND - No Detectado). Ensayo VIII.

INDICADORES	Agua				
	T inicial	T0	T1d	T3d	T7d
Relación Pristano/Fitano	0,9±0,3	ND	1,25±0,01	ND	ND
Relación C17/Pristano	1,2±0,1	ND	0,89±0,01	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,0±0,2	1,0±0,3	0,9±0,1	ND	0,9±0,1

Tabla 26. Índices de biodegradación en agua empleando el biorreactor de flujo vertical (ND - No Detectado). Ensayo VIII.

INDICADORES	Agua				
	T inicial	T0	T1d	T3d	T7d
Relación Pristano/Fitano	1,30±0,01	ND	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	1,06±0,01	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,29±0,35	ND	ND	ND	ND

En cuanto a la retención de hidrocarburos, en el biorreactor de flujo horizontal se cuantificaron 447,23 mg/L agua tratada, empleando 300g de corcho hidrófobo, y en el biorreactor de flujo vertical 64,40 mg/L agua tratada empleando 20g de corcho.

En el caso del biorreactor de flujo horizontal, la figura 83 muestra el % de absorción de hidrocarburos de cada uno de los soportes absorbentes Corksorb® 01025. Por su parte la figura 84 muestra las fracciones absorbidas por el sistema y la tabla 27 el % de absorción de las distintas fracciones por cada uno de los soportes. En ambas figuras y en la tabla se observa una mayor absorción en el primer soporte, ya que debido a sus dimensiones “bloquea” el flujo de entrada y se produce la mayor parte de la retención de hidrocarburos en el mismo.

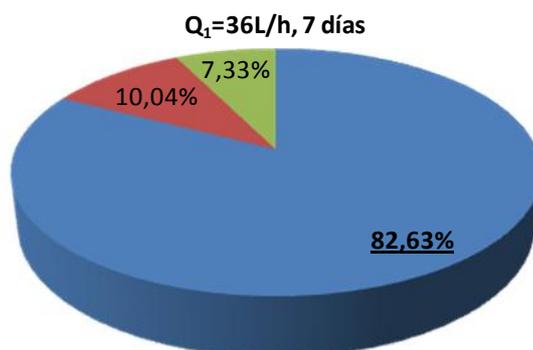


Figura 83. Porcentaje de absorción de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes (azul Corcho Corksorb®1, rojo Corcho Corksorb®2, verde Corcho Corksorb®3) transcurridos los 7 días de ensayo, en el transcurso del Ensayo VIII (Q₁=36L/h) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb®. Ensayo VIII.

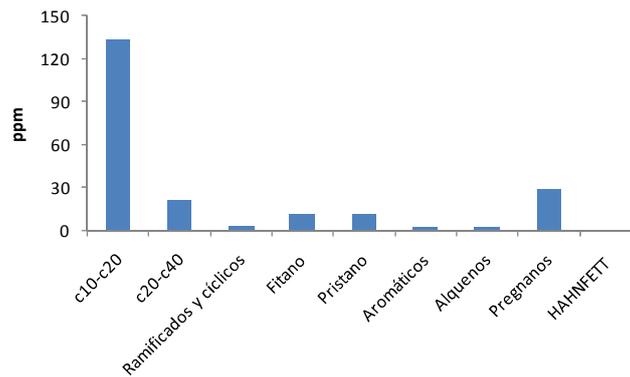


Figura 84. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas a los soportes (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb®. Ensayo VIII.

Tabla 27. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb® (ND - No Detectado). Ensayo VIII.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Corcho Corksorb®1	% Corcho Corksorb®2	% Corcho Corksorb®3
c10-c20	133,338	85,26%	8,58%	6,17%
c20-c40	20,869	79,51%	17,89%	2,61%
Ramificados y cíclicos	2,801	79,47%	3,57%	16,96%
Fitano	10,956	76,63%	8,61%	14,76%
Pristano	11,251	88,86%	11,14%	0,00%
Aromáticos	1,892	100,00%	0,00%	0,00%
Alquenos	1,814	0,00%	100,00%	0,00%
Pregnanos	28,600	67,00%	9,14%	23,86%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND

En el caso del biorreactor de flujo vertical la concentración de las fracciones absorbidas al material absorbente se muestran en la figura 85.

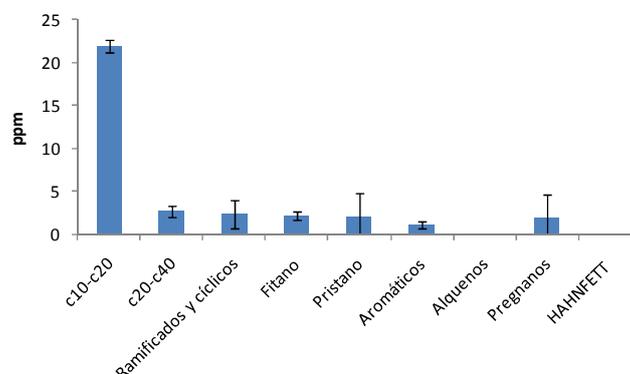


Figura 85. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_2=18\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb®. Ensayo VIII.

b) Fase de biorremediación

Tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se extrajo el material absorbente y se alojaron durante 8 meses los soportes absorbentes del biorreactor de flujo horizontal y el absorbente del biorreactor de flujo vertical en un vaso de precipitado.

Durante la fase de biorremediación se cuantificó el nº de microorganismos adheridos a los soportes al finalizar el ensayo y transcurridos 1 y 4 meses en la fase de biorremediación (Figura 86). En todos los casos se detectó un incremento en la concentración de microorganismos, excepto en el soporte procedente del biorreactor de flujo vertical, donde la población microbiana se mantuvo en valores de Log UFC similares a los alcanzados al finalizar la fase de ensayo, alrededor de 7,5-8,0 Log (UFC/ml).

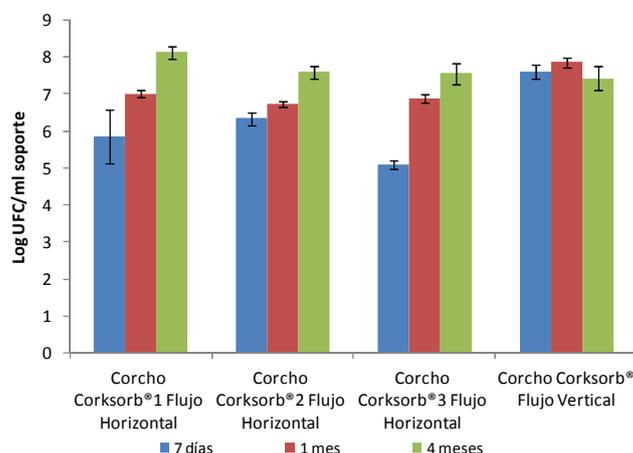


Figura 86. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado adheridos a los soportes Corcho Corksorb® (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en los biorreactores de flujo horizontal y vertical, al finalizar el ensayo VIII (7 días) y transcurridos 1 y 4 meses en la fase de biorremediación. Ensayo VIII.

Respecto a los hidrocarburos absorbidos al soporte Corcho Corksorb®, se cuantificó la concentración de hidrocarburos totales (TPH) durante los 8 meses de la fase de biorremediación empleando el biorreactor de flujo horizontal; si comparamos los resultados por gravimetría de las muestras a tiempo 7 días (final del ensayo) con los de la fase de biorremediación, se demostró que se produjo una biorremediación eficaz de los hidrocarburos absorbidos únicamente en el soporte 1 del biorreactor de flujo horizontal (Figuras 87 y 88).

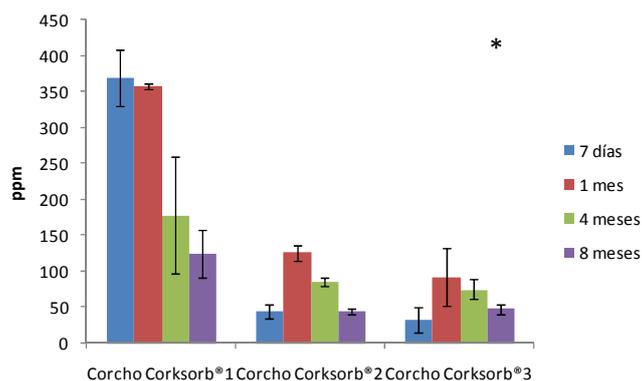


Figura 87. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb® al final de la fase de tratamiento (7 días) y transcurridos 1, 4 y 8 meses de la fase de biorremediación. Ensayo VIII. (*) Existen diferencias significativas entre los hidrocarburos absorbidos al soporte 1 y los absorbidos al soporte 2, así como entre los absorbidos al soporte 1 y al soporte 3.

Transcurridos 8 meses desde el final del ensayo, en el biorreactor de flujo vertical no se observó un proceso de biorremediación eficaz (Figura 88), ya que el contenido en hidrocarburos no fue inferior al correspondiente al final del ensayo.

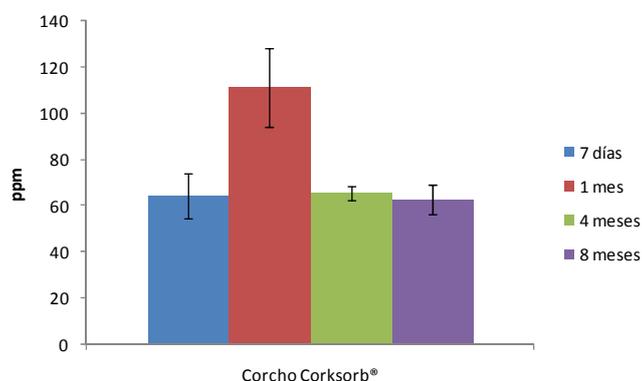


Figura 88. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb® al final de la fase de tratamiento (7 días) y transcurridos 1, 4 y 8 meses de la fase de biorremediación. Ensayo VIII.

En cuanto a los resultados por cromatografía, en primer lugar destacar que en el caso del biorreactor de flujo horizontal en el primer soporte, que es donde al finalizar la fase de tratamiento se produjo la mayor parte de la retención de hidrocarburos, se produjo una biodegradación eficaz únicamente de las fracciones c10-c20, c20-c40 y aromáticos (Figura 89).

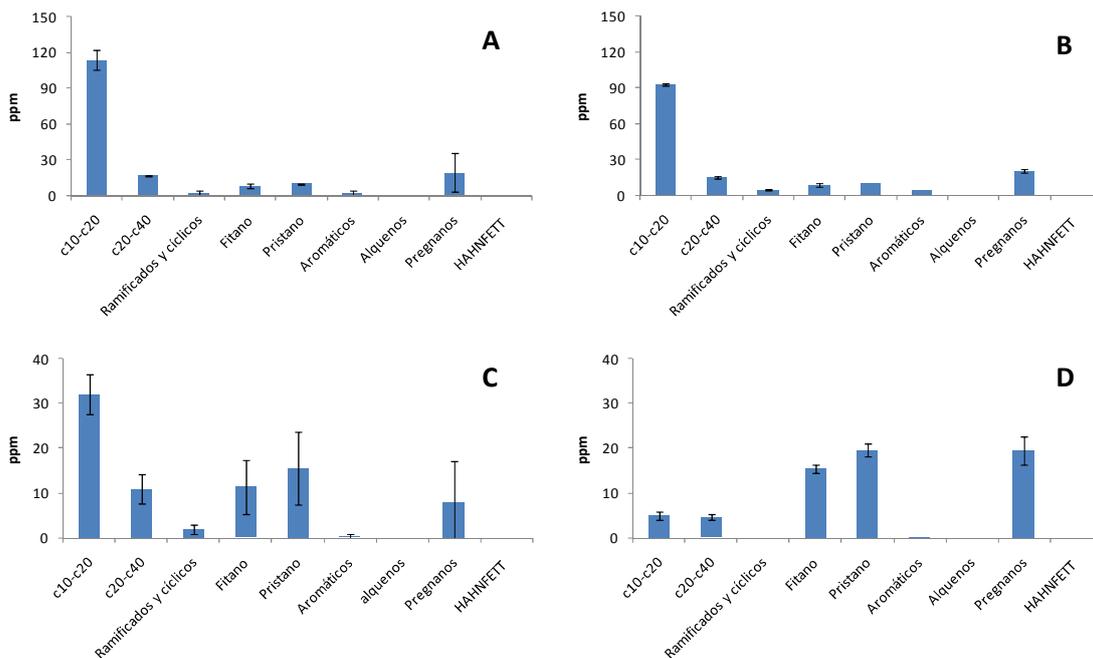


Figura 89. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Corcho Corksorb®1 (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días (A) en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb®, y transcurridos 1 mes (B), 4 meses (C) y 8 meses (D) en la fase de biorremediación. Ensayo VIII.

El indicador c17/pristano en el soporte Corcho Corksorb®1 se mantuvo relativamente estable hasta los 4 meses, a partir del cual descendió hasta no detectar heptadecano en el octavo mes, lo que indica la posible existencia de un proceso de biodegradación durante esos meses. Por su parte el índice c18/fitano si descendió considerablemente desde el final del ensayo hasta el 4 mes, lo cual respalda la existencia de dicho proceso de biodegradación (Tabla 28).

Tabla 28. Índices de biodegradación en el soporte Corcho Corksorb®1 transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando tres soportes Corcho Corksorb®, y transcurridos 1 mes, 4 meses y 8 meses en la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo VIII.

INDICADORES	Corcho Corksorb®1			
	7 días	1 mes	4 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	1,2±0,3	1,1±0,2	1,4±0,1	1,27±0,01
Relación C17/Pristano	0,9±0,1	0,82±0,01	0,86±0,01	ND
Relación C18/Fitano	1,3±0,3	1,1±0,2	0,78±0,4	ND

Finalmente en el caso del biorreactor de flujo vertical, se observó que se produjo la biodegradación de las fracciones c10-c20, c20-c40 e hidrocarburos aromáticos (Figura 90).

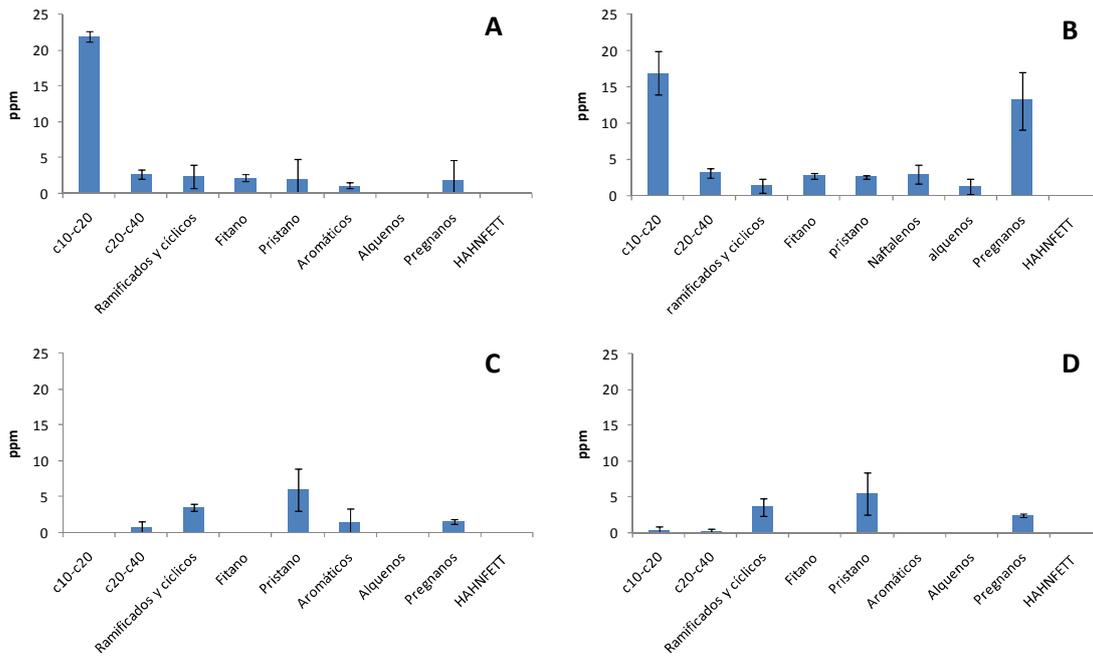


Figura 90. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Corcho Corksorb® (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días (A) en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Corcho Corksorb®, y transcurridos 1 mes (B), 4 meses (C) y 8 meses (D) en la fase de biorremediación. Ensayo VIII.

En el soporte Corcho Corksorb® empleado en el biorreactor de flujo vertical los tres indicadores de biodegradación mostraron un descenso considerable transcurrido el primer mes evidenciando un proceso de biodegradación (Tabla 29).

Tabla 29. Índices de biodegradación en el soporte Corcho Corksorb® transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo VIII ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical, y transcurridos 1 mes 4 meses y 8 meses en la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo VIII.

INDICADORES	Corcho Corksorb®			
	7 días	1 mes	4 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	1,56±0,01	0,9±0,1	ND	ND
Relación C17/Pristano	0,68±0,01	0,6±0,1	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,1±0,2	0,86±0,01	ND	ND

4.2.5 Ensayo IX.

a) Fase de tratamiento

El ensayo IX, tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se realizó empleando ambos biorreactores (de flujo horizontal y vertical) y como material absorbente Cordón Sentec®. En el biorreactor de flujo horizontal se colocaron seis soportes con un contenido de 60g de fibra de polipropileno, equidistantes entre ellos y que se denominaron 1, 2 y 3 en función de su posición desde la entrada de caudal, y A o B en función de estar situados a la derecha (en el lateral donde se situaba la entrada de flujo) o a la izquierda. En el biorreactor de flujo vertical se alojaron 40g de dicho material absorbente en el interior de la columna.

En el análisis microbiológico se observó una concentración de microorganismos adheridos superior a la concentración en suspensión en el biorreactor de flujo horizontal y similar en el biorreactor de flujo vertical, y además una población adherida al Cordón Sentec® similar en ambos biorreactores (Figura 91). También destacar que en los seis soportes absorbentes del biorreactor horizontal la concentración microbiana adherida presentó valores similares de Log (UFC/ml).

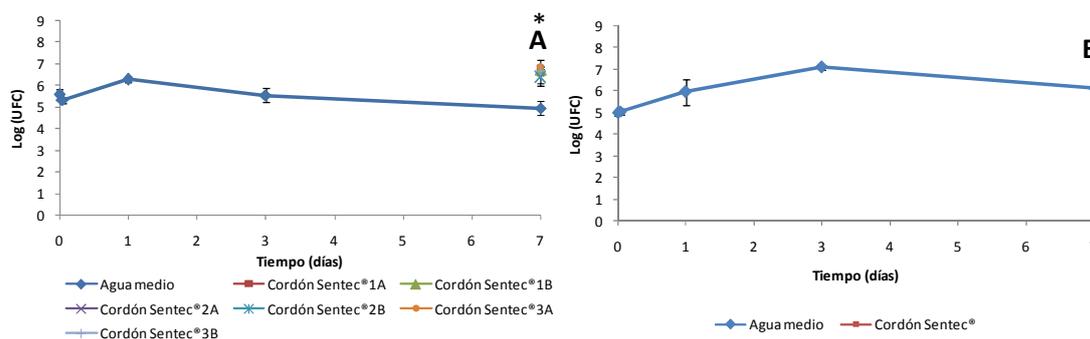


Figura 91. Evolución del número de microorganismos en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y valor final de los mismos adheridos a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)), procedentes de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en el biorreactor de flujo horizontal (A) y en el biorreactor de flujo vertical (B) empleando corcho Cordón Sentec®. Ensayo IX. (*) Existen diferencias significativas entre la población en suspensión y la adherida a los soportes.

En cuanto al análisis de hidrocarburos en agua, en la figura 92A se observa que se redujo el contenido inicial en un 85,5%, de forma que en este caso también quedó constatada la elevada capacidad de eliminación de hidrocarburos del sistema y de absorción del soporte Cordón Sentec® (Figuras 92A y 92B). Hay que destacar que esta eliminación tuvo lugar a tiempo 0 (tras un ciclo de recirculación), pero también destacar que en esta configuración (flujo horizontal) parte de los hidrocarburos se soltaron del soporte transcurridos los 7 días del ensayo (Figura 92B), como ocurrió en el ensayo anterior.

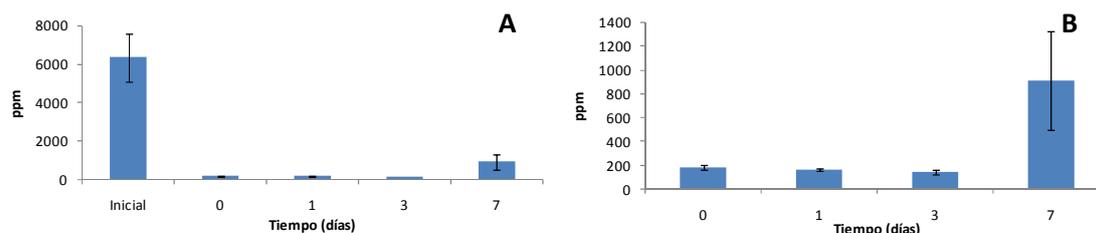


Figura 92. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo IX empleando el biorreactor de flujo horizontal con seis soportes Cordón Sentec® ($Q_1=36L/h$). Ensayo IX.

En el caso del biorreactor de flujo vertical se observa que se redujo el contenido de hidrocarburos en agua en un 94,5% tras 7 días de tratamiento y que los hidrocarburos que quedaron retenidos no se desprendieron (Figura 93).

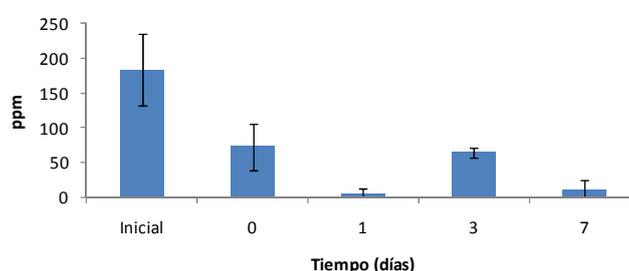


Figura 93. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo IX empleando el biorreactor de flujo vertical con el soporte Cordón Sentec® ($Q_2=18L/h$). Ensayo IX.

Los resultados de cromatografía de gases/espectrometría de masas confirmaron las afirmaciones realizadas con los resultados de gravimetría. En el caso del biorreactor de flujo horizontal, se observó un descenso considerable de todas las fracciones de hidrocarburos a partir del primer ciclo de recirculación, aunque es cierto que a los 7 días se detectó una concentración de dichas fracciones debido al “desprendimiento” de los hidrocarburos de los soportes Cordón Sentec® (Figura 94). En el biorreactor de flujo vertical no se detectó ninguna fracción excepto en “tiempo inicial”, por lo que en este aspecto nuevamente queda constatada la elevada capacidad de absorción del soporte Cordón Sentec® y la eficacia del sistema de flujo vertical (Figura 95). Debido a esta reducción en el caso del flujo vertical, al igual que en el ensayo VIII no fue posible analizar la evolución en el ensayo de ningún índice de biodegradación, mientras que en el caso del flujo horizontal el índice c18/fitano no evidenció una degradación eficaz (Tablas 30 y 31).

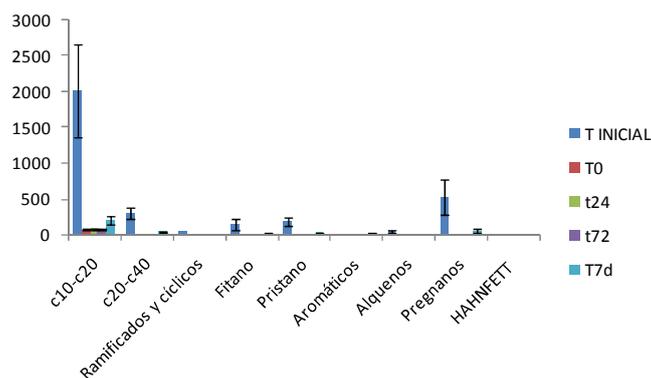


Figura 94. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec®. Ensayo IX.

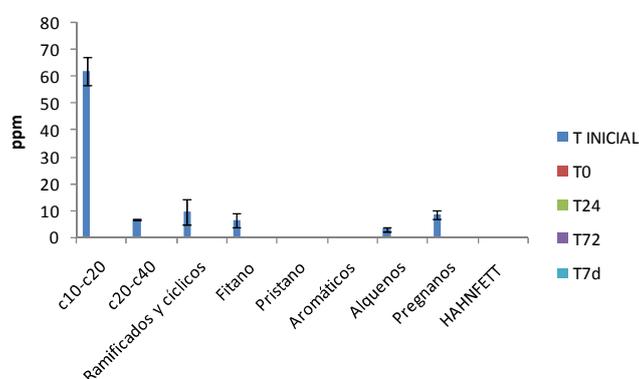


Figura 95. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Cordón Sentec®. Ensayo IX.

Tabla 30. Índices de biodegradación en agua empleando el biorreactor de flujo horizontal (ND - No Detectado). Ensayo IX.

INDICADORES	Agua				
	T inicial	T0	T1d	T3d	T7d
Relación Pristano/Fitano	1,2±0,2	ND	ND	ND	1,2±0,1
Relación C17/Pristano	0,91±0,03	ND	ND	ND	1,4±0,1
Relación C18/Fitano	1,4±0,2	1,0±0,2	0,9±0,1	0,9±0,2	1,5±0,1

Tabla 31. Índices de biodegradación en agua empleando el biorreactor de flujo vertical (ND - No Detectado). Ensayo IX.

INDICADORES	Agua				
	T inicial	T0	T1d	T3d	T7d
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	ND	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,7±0,3	ND	ND	ND	ND

En cuanto a la retención de hidrocarburos, en el biorreactor de flujo horizontal se cuantificaron 418,60 mg/L agua tratada, empleando 360g de fibra de polipropileno, y en el biorreactor de flujo vertical 109,40 mg/L agua tratada empleando 40g del material absorbente.

En el caso del biorreactor de flujo horizontal, la figura 96 muestra el % de absorción de cada uno de los soportes absorbentes Cordón Sentec®; la figura 97 muestra las fracciones absorbidas por el sistema y la tabla 32 el % de absorción de las distintas fracciones por cada uno de los soportes, observándose una mayor retención en las posiciones centrales al igual que en el ensayo VIII.

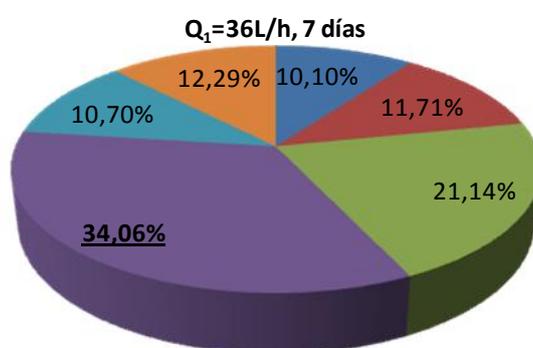


Figura 96. Porcentaje de absorción de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes (azul Cordón Sentec®1A, rojo Cordón Sentec®1B, verde Cordón Sentec®2A, morado Cordón Sentec®2B, celeste Cordón Sentec®3A, naranja Cordón Sentec®3B) transcurridos los 7 días de ensayo, en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec®. Ensayo IX.

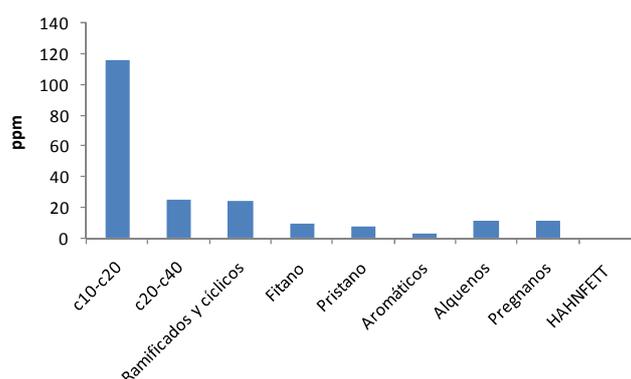


Figura 97. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas a los soportes (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec®. Ensayo IX.

Tabla 32. Concentración de las distintas fracciones absorbidas (mg/L agua tratada) y porcentaje de absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos en cada uno de los soportes absorbentes transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec® (ND - No Detectado). Ensayo IX.

FRACCIONES	mg/L absorbidos	% Cordón Sentec®1A	% Cordón Sentec®1B	% Cordón Sentec®2A	% Cordón Sentec®2B	% Cordón Sentec®3A	% Cordón Sentec®3B
c10-c20	115,628	2,79%	17,08%	18,28%	34,83%	13,39%	13,62%
c20-c40	24,558	6,67%	13,30%	7,79%	44,23%	16,95%	11,06%
Ramificados y cíclicos	24,167	38,27%	15,63%	15,57%	19,47%	9,25%	1,82%
Fitano	9,411	0,00%	24,50%	17,91%	23,87%	17,60%	16,13%
Pristano	7,088	0,00%	0,00%	30,87%	44,56%	0,00%	24,57%
Aromáticos	3,004	0,00%	0,00%	1,55%	98,45%	0,00%	0,00%
Alquenos	11,398	0,00%	40,80%	3,47%	30,61%	15,73%	9,40%
Pregnanos	10,671	0,00%	0,00%	24,69%	50,74%	5,12%	19,46%
HAHNFETT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

En el caso del biorreactor de flujo vertical la concentración de las fracciones absorbidas al material absorbente se muestran en la figura 98.

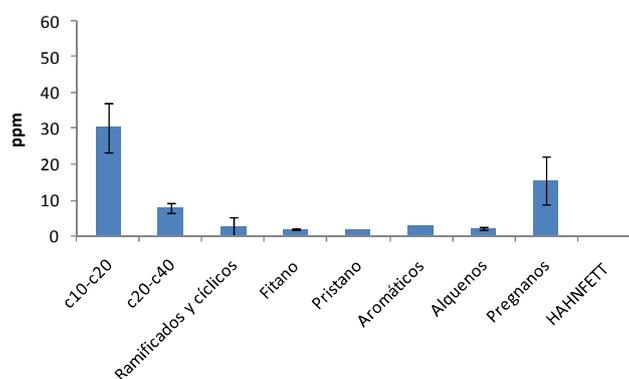


Figura 98. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo IX ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Cordón Sentec®. Ensayo IX.

b) Fase de biorremediación

Tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se extrajo el material absorbente de ambos biorreactores y se alojó durante 8 meses en un vaso de precipitado.

Durante la fase de biorremediación se cuantificó el n° de microorganismos adheridos al soporte al finalizar el ensayo y transcurridos 1 y 4 meses en la fase de biorremediación (Figura 99). En todos los soportes instalados en el biorreactor de flujo horizontal se observó que la concentración microbiana se mantuvo relativamente constante, con valores entre 6 y 7 Log (UFC/ml). En el caso del biorreactor de flujo vertical, sí se constató un incremento considerable de la concentración microbiana al Cordón Sentec® durante la fase de biorremediación alcanzando un valor próximo a 8,1 Log (UFC/ml).

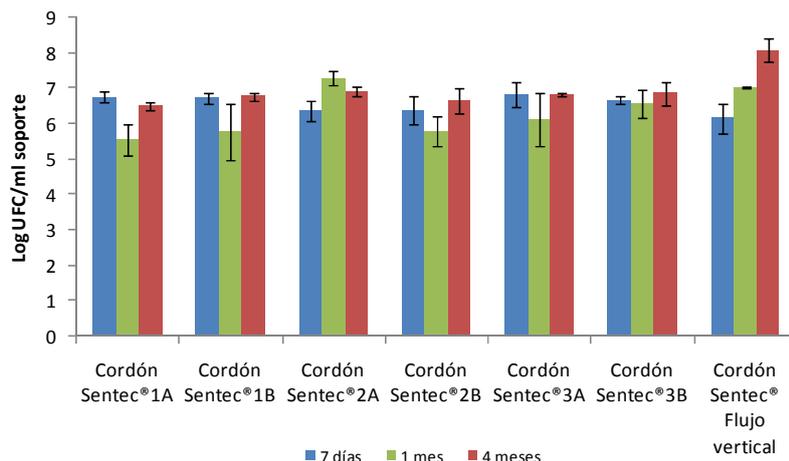


Figura 99. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado adheridos a los soportes Cordón Sentec® (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en los biorreactores de flujo horizontal y vertical, al finalizar el ensayo VIII (7 días) y transcurridos 1 y 4 meses en la fase de biorremediación. Ensayo IX.

Respecto a los hidrocarburos absorbidos al soporte Cordón Sentec®, se cuantificó la concentración de hidrocarburos totales (TPH) durante los 4 primeros meses de la fase de biorremediación empleando el biorreactor de flujo horizontal. Observando los resultados procedentes del estudio por gravimetría, se observa una biodegradación en los soportes que retuvieron mayor cantidad al final del ensayo IX (Cordón Sentec® 2A y 2B), mientras que en el resto no se observó tal proceso ya que la concentración inicial no era muy elevada (Figura 100). Resaltar que, tal y como se observa en la figura 102, a los 8 meses solo se estudió el soporte 2A ya que por cromatografía a los 4 meses solo se detectaron hidrocarburos en dicho soporte, por lo que no se cuantificaron los TPH del resto de soportes absorbentes.

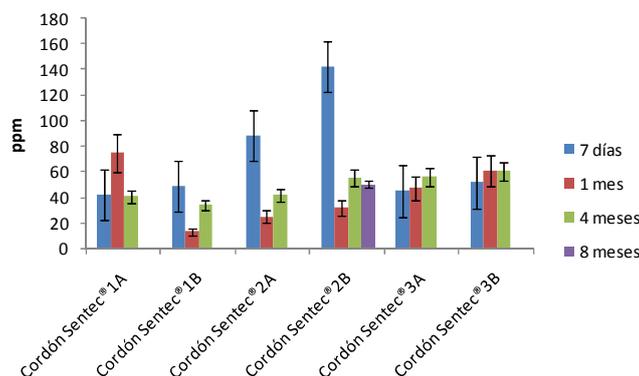


Figura 100. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec® al final de la fase de tratamiento (7 días) y transcurridos 1, 4 y 8 meses de la fase de biorremediación. Ensayo IX.

En el caso del biorreactor de flujo vertical, transcurridos 8 meses desde el final del ensayo no se observó un proceso de biorremediación eficaz (Figura 101), ya que no se produjo un descenso considerable del contenido en hidrocarburos totales retenidos al final del ensayo IX.

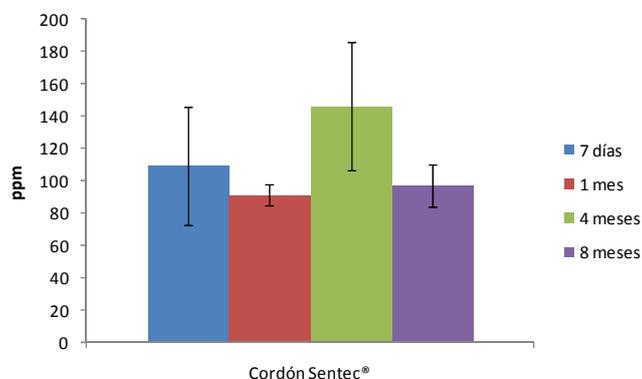


Figura 101. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Cordón Sentec® al final de la fase de tratamiento (7 días) y transcurridos 1, 4 y 8 meses de la fase de biorremediación. Ensayo IX.

En cuanto a los resultados por cromatografía, al igual que en el ensayo VIII, se analizó la evolución del contenido en hidrocarburos en la fase de biodegradación de aquellos soportes donde se produjo la retención de la mayor parte de los hidrocarburos en la fase de tratamiento. De este modo, en el soporte Cordón Sentec®2A se produjo una biodegradación eficaz a partir de los 4 primeros meses (Figura 102) y en el soporte Cordón Sentec®2B donde al finalizar la fase de tratamiento se produjo la mayor parte de la retención de hidrocarburos empleando el biorreactor de flujo horizontal, se produjo una biodegradación eficaz de todas las fracciones de hidrocarburos entre el primer y el cuarto mes (Figura 103).

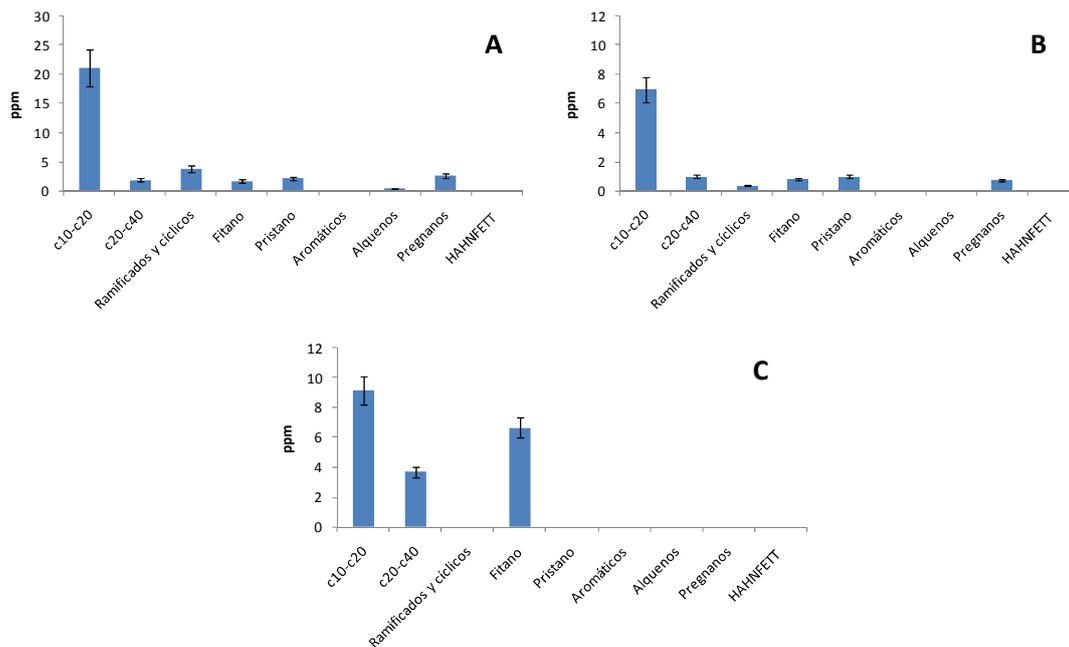


Figura 102. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Cordón Sentec®2A (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días (A) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec®, y transcurridos 1 mes (B) y 4 meses (C) en la fase de biorremediación. Ensayo IX.

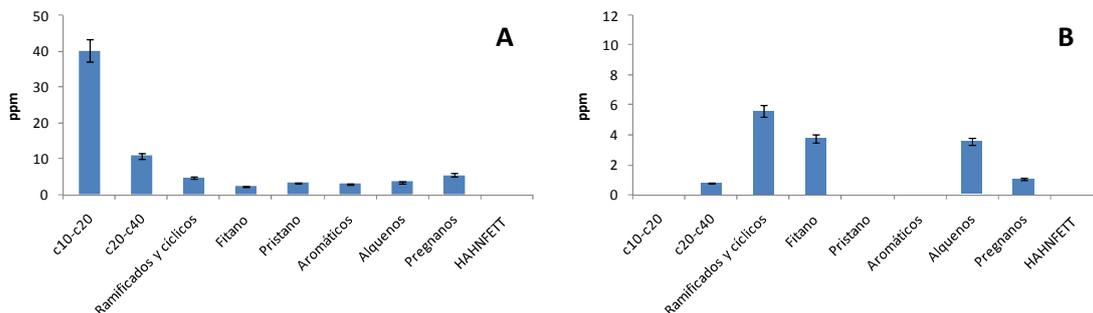


Figura 103. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Cordón Sentec®2B (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días (A) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36L/h$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Cordón Sentec®, y transcurridos 1 mes (B) en la fase de biorremediación. Ensayo IX.

Tras 8 meses de biodegradación, no se detectó ninguna fracción de hidrocarburos en el soporte Cordón Sentec®2A, al igual que tras 4 meses en el soporte Cordón Sentec®2B.

En lo referente a los índices de biodegradación asociados a ambos soportes, en el caso del soporte 2A, el índice c18/fitano muestra claramente la existencia de una biodegradación; en el caso del soporte 2B, este mismo índice no puede ser detectado debido a que no se detecta la presencia de octadecano transcurrido un mes, mientras que sí se detecta fitano, lo que es indicativo de una degradación bacteriana (Tablas 33 y 34).

Tabla 33. Índices de biodegradación en el soporte Cordón Sentec®2A transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Corcho Corksorb®, y transcurridos 1 mes, 4 meses y 8 meses en la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo IX.

INDICADORES	Cordón Sentec®2A			
	7 días	1 mes	4 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	1,3±0,1	1,2±0,2	ND	ND
Relación C17/Pristano	0,8±0,1	0,7±0,1	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,3±0,2	0,9±0,1	0,43±0,01	ND

Tabla 34. Índices de biodegradación en el soporte Cordón Sentec®2B transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo IX ($Q_1=36\text{L/h}$) en el biorreactor de flujo horizontal empleando seis soportes Corcho Corksorb®, y transcurridos 1 mes, 4 meses y 8 meses en la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo IX.

INDICADORES	Cordón Sentec®2B			
	7 días	1 mes	4 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	1,4±0,1	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	1,5±0,2	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,5±0,1	ND	ND	ND

Finalmente en el caso del biorreactor de flujo vertical, se observó que durante los 4 primeros meses no hubo evidencia de degradación de las distintas fracciones de hidrocarburos (Figura 104). Sin embargo transcurridos 8 meses no se detectaron fracciones por cromatografía de gases/espectrometría de masas, por lo que estos resultados sí evidencian un proceso de biorremediación.

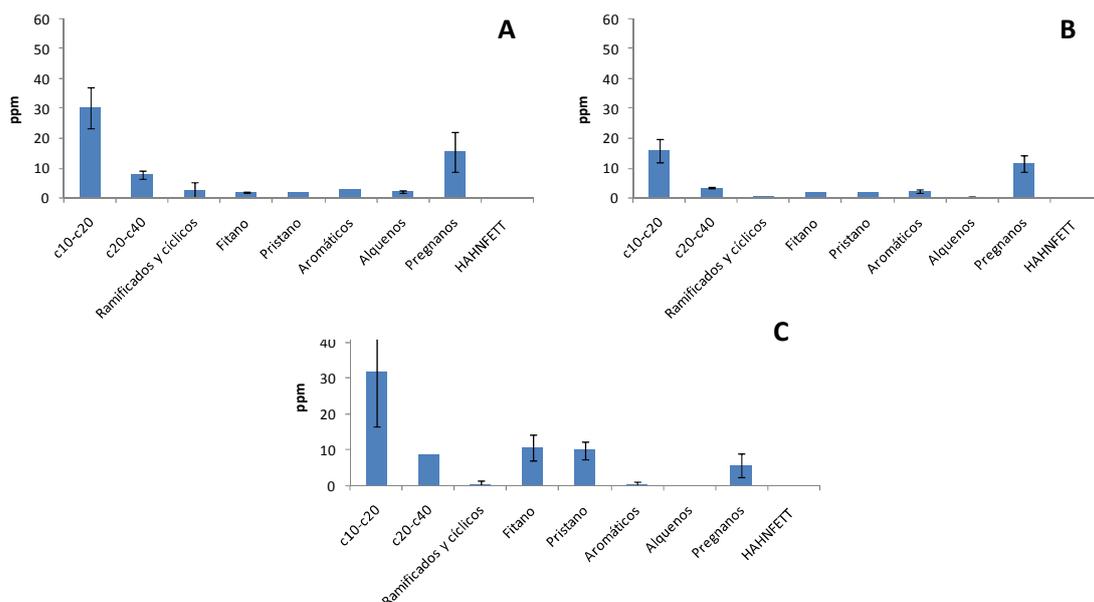


Figura 104. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Cordón Sentec® (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días (A) en el transcurso del Ensayo IX ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Cordón Sentec®, y transcurridos 1 mes (B) y 4 meses (C) en la fase de biorremediación. Ensayo IX.

Tabla 35. Índices de biodegradación en el soporte Cordón Sentec® transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo IX ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical, y transcurridos 1 mes 4 meses y 8 meses en la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo IX.

INDICADORES	Cordón Sentec®			
	7 días	1 mes	4 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	1,2±0,1	1,18±0,02	0,9±0,1	ND
Relación C17/Pristano	1,3±0,1	0,9±0,2	1,1±0,2	ND
Relación C18/Fitano	1,4±0,2	1,1±0,2	0,7±0,3	ND

La tabla 35 muestra un descenso evidente del índice c18/fitano, lo cual vuelve a mostrar la acción degradadora por parte de la población microbiana adherida al soporte Cordón Sentec®.

Por tanto los resultados del ensayo IX sugieren de nuevo la configuración de flujo vertical como la mejor opción en cuanto a una absorción de hidrocarburos combinada con una buena adherencia microbiana. Sin embargo, los resultados gravimétricos indican que en el soporte absorbente Cordón Sentec® no se produce un proceso de biorremediación eficaz.

4.2.6 Ensayo X.

a) Fase de tratamiento

El ensayo X, tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se realizó empleando el biorreactor de flujo vertical y alojando en su interior una unidad de material absorbente Paño Sentec® (36g).

En el análisis microbiológico se observó, al igual que en los ensayos anteriores realizados en biorreactor de flujo vertical, una concentración microbiana adherida al soporte absorbente próxima a la concentración microbiana en suspensión en el agua contaminada a tratar (Figura 105).

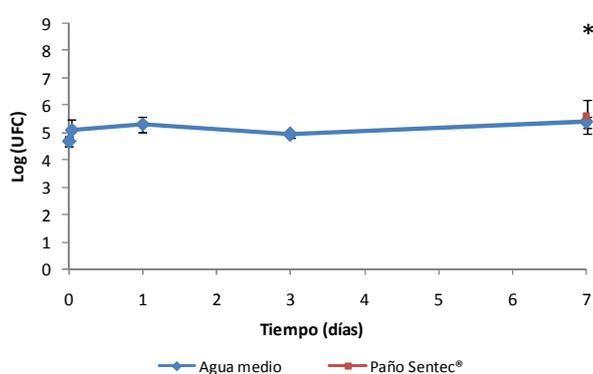


Figura 105. Evolución del número de microorganismos en suspensión (expresado en Log (UFC/ml agua)) y valor final de los mismos adheridos a los soportes (expresado en Log (UFC/ml soporte)), procedentes de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado en el biorreactor de flujo vertical empleando Paño Sentec®. Ensayo X. (*) Existen diferencias significativas entre la población en suspensión y la adherida al soporte.

Respecto al análisis de hidrocarburos en la fase de tratamiento, en el transcurso del ensayo se redujo el contenido en hidrocarburos en un 92,6%, y la mayor parte de la eliminación tuvo lugar durante la primera recirculación (tiempo 0), tal y como muestra la Figura 106 donde quedan representados los resultados por gravimetría. Además, la configuración del biorreactor de flujo vertical permitió que los hidrocarburos permaneciesen absorbidos sin desprenderse, como en ensayos anteriores. Los resultados de cromatografía de gases/espectrometría de masas confirman estas afirmaciones. Se demuestra que la reducción de las diferentes fracciones de hidrocarburos fue prácticamente total, ya que el equipo de cromatografía no detectó ninguna de ellas a lo largo del ensayo (Figura 107).

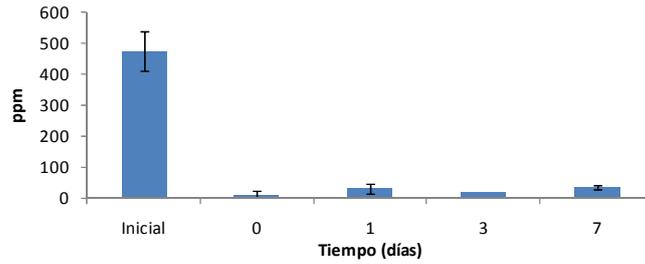


Figura 106. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo X empleando el biorreactor de flujo vertical con el soporte Paño Sentec® ($Q_2=18L/h$). Ensayo X.

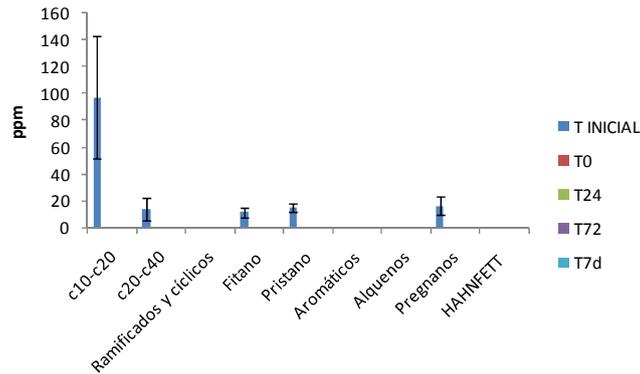


Figura 107. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del Ensayo X ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec®. Ensayo X.

En cuanto a la retención de hidrocarburos en el soporte absorbente Paño Sentec®, en el biorreactor de flujo vertical se cuantificaron 53,18 mg/L agua tratada, empleando 36g. de fibra de polipropileno. Las concentraciones de las fracciones absorbidas al material absorbente se muestran en la figura 108.

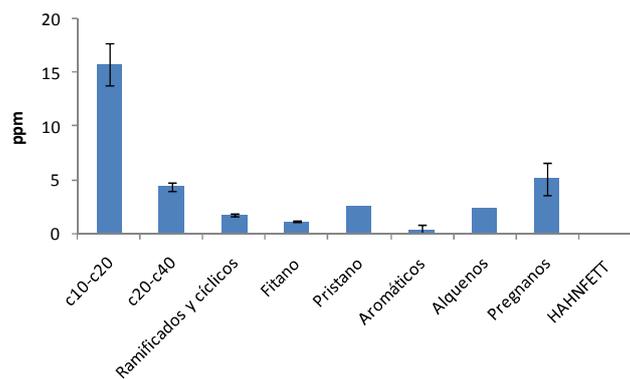


Figura 108. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo X ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec®. Ensayo X.

Tabla 36. Índices de biodegradación en agua empleando el biorreactor de flujo vertical (ND - No Detectado). Ensayo X.

INDICADORES	Agua				
	T inicial	T0	T1d	T3d	T7d
Relación Pristano/Fitano	1,3±0,2	ND	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	0,7±0,1	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,1±0,1	ND	ND	ND	ND

b) Fase de biorremediación

Tal y como se describe en el apartado “2.5. Ensayos de absorción y biodegradación de hidrocarburos”, se extrajo el material absorbente del biorreactor de flujo vertical y se alojó durante 5 meses en un vaso de precipitado.

Durante la fase de biorremediación se cuantificó el n° de microorganismos adheridos al soporte (Figura 109), observándose un valor ligeramente superior a la concentración existente a los 7 días del ensayo transcurridos los 5 meses, lo que sugiere que los microorganismos que se habían adherido durante la fase de tratamiento formaban una biopelícula estable y tolerante a elevadas concentraciones de hidrocarburos.

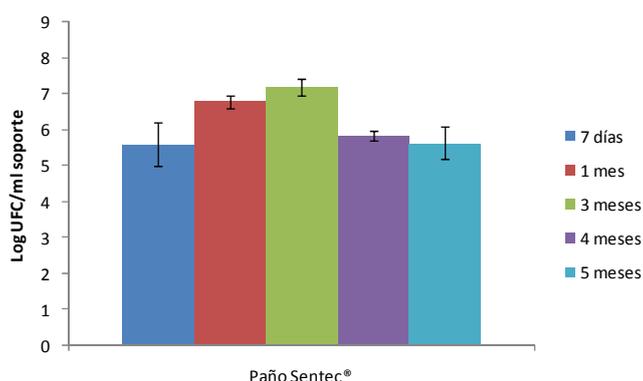


Figura 109. Evolución del número de microorganismos de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado adheridos al soporte Paño Sentec® (expresado en Log (UFC/ml soporte)) en el biorreactor de flujo vertical, al finalizar el ensayo X (7 días) y transcurridos 1, 3, 4 y 5 meses en la fase de biorremediación. Ensayo X.

Los resultados procedentes del estudio por gravimetría y por cromatografía de gases/espectrometría de masas evidenciaron la existencia de un proceso de biorremediación de hidrocarburos por parte de los microorganismos adheridos al soporte Paño Sentec®, lográndose una biodegradación superior al 70% en eliminación de TPH (Figura 110).

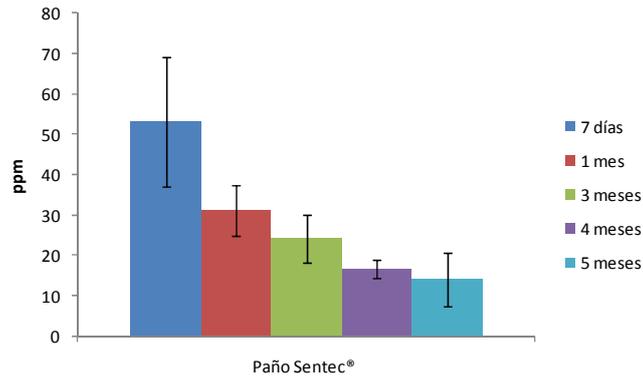


Figura 110. Concentración de hidrocarburos absorbidos a los soportes (mg/L agua tratada) en el transcurso del Ensayo X ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec® al final de la fase de tratamiento (7 días) y transcurridos 1, 4 y 6 meses de la fase de biorremediación. Ensayo VIII.

En lo que respecta a la degradación de las fracciones, destacar que transcurrido un mes se produjo la degradación de alcanos lineales (c10-20 y c20-40), y en menor medida, de los hidrocarburos ramificados y alquenos entre otros. Por el contrario los hidrocarburos aromáticos, pristano y fitano se mantiene en valores similares (Figura 111). Transcurridos dos meses del ensayo de biorremediación, y en los sucesivos análisis posteriores, las concentraciones de las distintas fracciones de hidrocarburos no fueron detectadas por el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas, por lo que se considera que se produjo una degradación biológica prácticamente total de todas las fracciones.

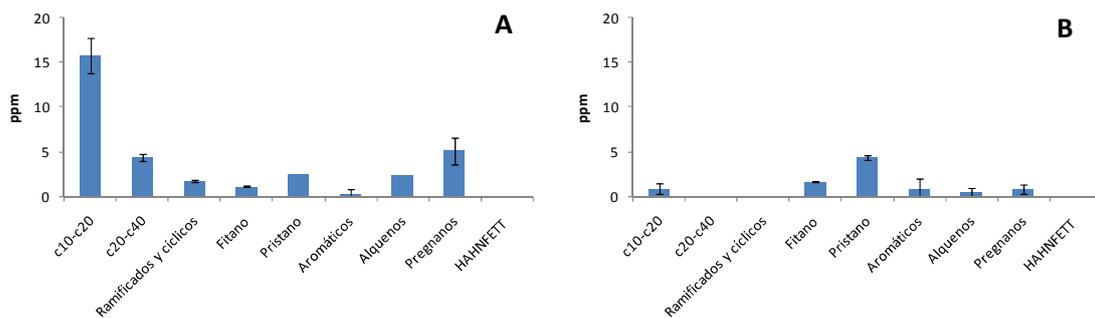


Figura 111. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Paño Sentec® (mg/L agua tratada) transcurridos 7 días (A) en el transcurso del Ensayo X ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec®, y transcurrido 1 mes (B) en la fase de biorremediación. Ensayo X.

Tabla 37. Índices de biodegradación en el soporte Paño Sentec® transcurridos 7 días en el transcurso del Ensayo X ($Q_2=18L/h$) en el biorreactor de flujo vertical, y transcurridos 1 mes 4 meses y 8 meses en la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo X

INDICADORES	Paño Sentec®			
	7 días	1 mes	4 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	2,0±0,4	2,61±0,03	ND	ND
Relación C17/Pristano	0,7±0,1	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,3±0,3	0,43±0,1	ND	ND

La tabla 37 muestra la existencia de un proceso de degradación microbiana a través de la disminución del índice c18/fitano.

Todos estos resultados muestran que el sistema de flujo vertical presenta una gran eficacia en el tratamiento de aguas contaminada con hidrocarburos y que el material absorbente Paño Sentec® permite el desarrollo de un proceso de biorremediación eficaz. Dichas afirmaciones se desarrollarán más detalladamente en el capítulo de Discusión.

4.3 Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Tal y como se expone en el apartado “2.6. Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos”, estos ensayos fueron realizados con el fin de encontrar una serie de cepas bacterianas candidatas a formar parte de un consorcio microbiano degradador de hidrocarburos.

Para ello a partir de las placas de cultivo de la fase de biodegradación de los ensayos VIII, IX y X, se aislaron una serie de cepas, aquellas que se encontraron con mayor frecuencia, y se procedió a su identificación: *Brevibacterium casei*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Citricoccus zhacaiensis*, *Gulosibacter molinativorax*, *Kocuria gwangalliensis*, *Micrococcus aloeverae*, *Microbacterium paraoxydans*, *Microbacterium phyllosphaerae* y *Microbacterium sp.*

Una vez identificadas, se procedió a realizar ensayos de biodegradabilidad con las 5 cepas más frecuentemente encontradas: *Brevundimonas diminuta*, *Citricoccus zhacaiensis*, *Gulosibacter molinativorax*, *Kocuria gwangalliensis* y *Micrococcus aloeverae*. Previamente se ensayó el control negativo solamente con diesel y se observó una degradación del mismo de un 25% en el medio de cultivo BH.

Los ensayos con las cepas mostraron un comportamiento muy diferentes entre ellas, tanto en cuanto a crecimiento microbiano como a degradación de hidrocarburos. Respecto al crecimiento en presencia de diésel, *Brevundimonas diminuta* fue la única que mostró un crecimiento a lo largo del ensayo tanto en presencia de diésel como en ausencia del mismo (Figura 112).

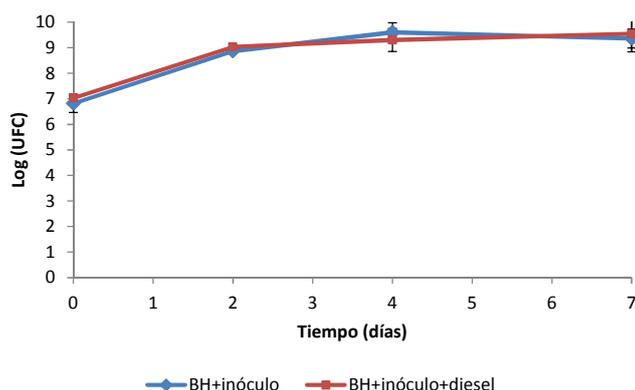


Figura 112. Evolución del número de microorganismos de *Brevundimonas diminuta* en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) en presencia y ausencia de diésel. Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Por su parte, *Citricoccus zhacaiensis* y *Micrococcus aloeverae* mostraron un comportamiento similar en ambos casos, no se vieron afectadas por la presencia de diésel en ningún sentido, pero no mostraron un crecimiento durante el transcurso del ensayo (Figura 113).

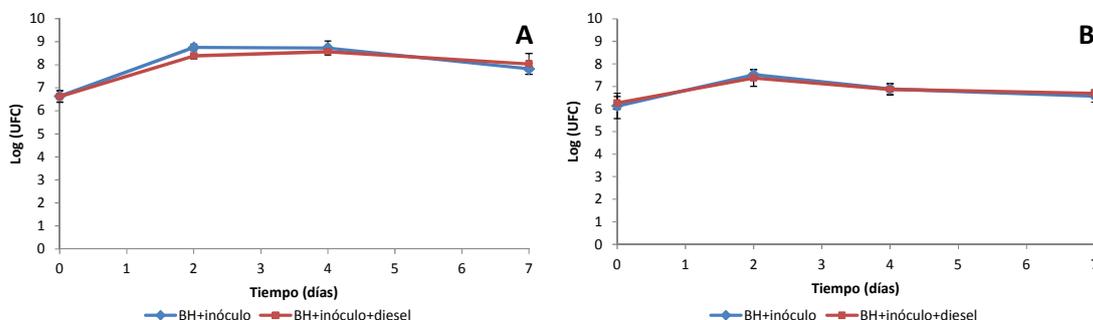


Figura 113. Evolución del número de microorganismos de *Citricoccus zhacaiensis* (A) y *Micrococcus aloeverae* (B) en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) en presencia y ausencia de diésel. Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Finalmente, la concentración de microorganismos de *Gulosibacter molinativorax* y *Kocuria gwangalliensis* fue inferior en los casos en los que había presencia de diésel en el medio de cultivo, y por tanto la presencia de hidrocarburos influyó negativamente en su crecimiento (Figura 114).

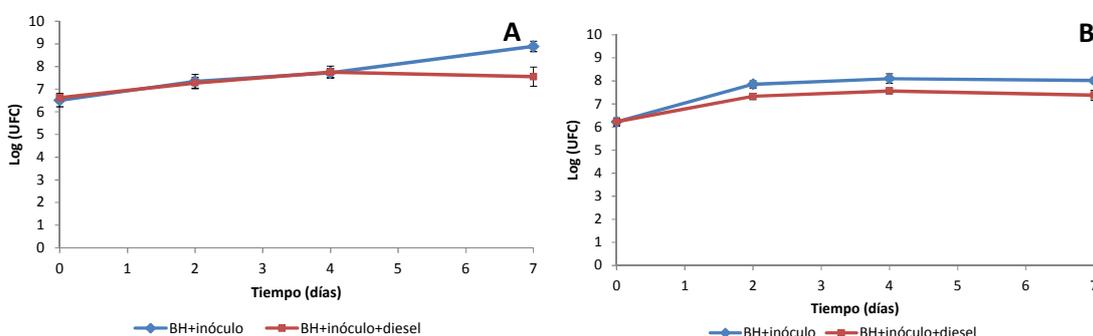


Figura 114. Evolución del número de microorganismos de *Gulosibacter molinativorax* (A) y *Kocuria gwangalliensis* (B) en suspensión (expresado en Log (UFC/ml medio)) en presencia y ausencia de diésel. Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Por otro lado, la concentración de hidrocarburos totales TPH por gravimetría al final de cada uno de los ensayos determinó que a excepción de la cepa *Kocuria gwangalliensis*, en todos los casos se redujo dicha concentración transcurridos los 7 días de ensayos (Figura 115). Sin embargo, considerando que el diésel empleado sufre una degradación en medio BH transcurridos 7 días de un 25% (control), la única cepa que podríamos considerar verdaderamente como degradadora sería nuevamente *Brevundimonas diminuta*, y en menor medida *Gulosibacter molinativorax* y *Micrococcus aloeverae*.

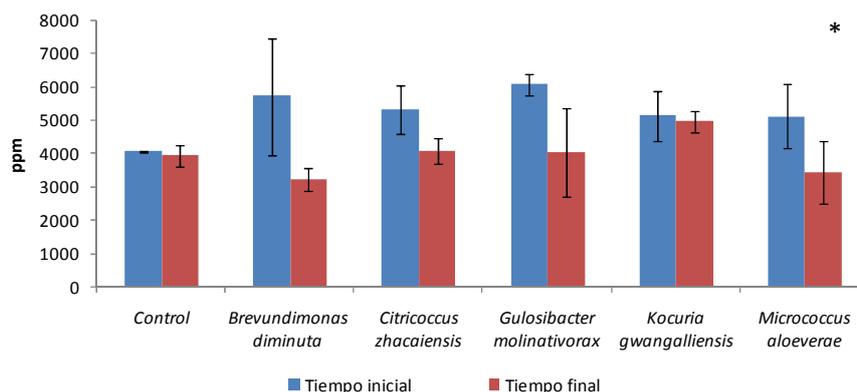


Figura 115. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) al inicio y al final de los distintos ensayos adicionando diesel sin inóculo (control) e inoculando las cepas *Brevundimonas diminuta*, *Citricoccus zhacaiensis*, *Gulosibacter molinativorax*, *Kocuria gwangalliensis* y *Micrococcus aloe verae*. Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos. (*) Existen diferencias significativas entre las reducciones de TPH en cada uno de los casos.

En cuanto a las fracciones de hidrocarburos al inicio y final de los ensayos, la mayor parte de las fracciones apenas sufren degradación alguna con el paso del tiempo en medio BH (Figura 116) y únicamente *Brevundimonas diminuta* degrada las fracciones de hidrocarburos presentes en el medio de cultivo (Figuras 117-119).

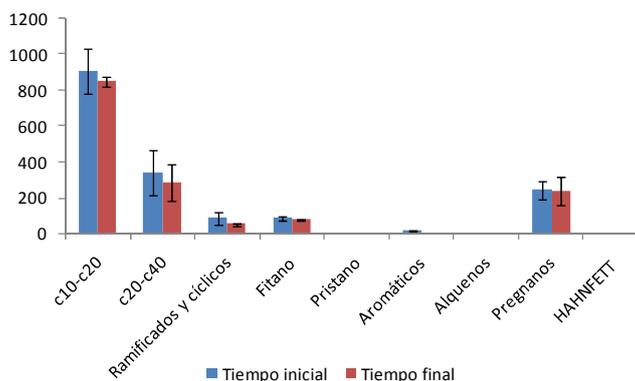


Figura 116 Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) al inicio y al final del ensayo sin inóculo (control). Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

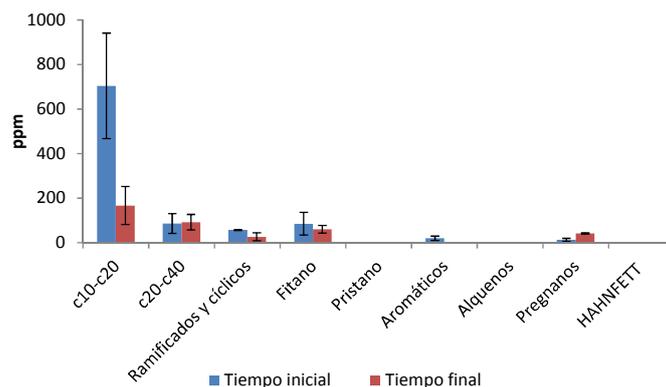


Figura 117. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) al inicio y al final del ensayo empleando *Brevundimonas diminuta*. Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

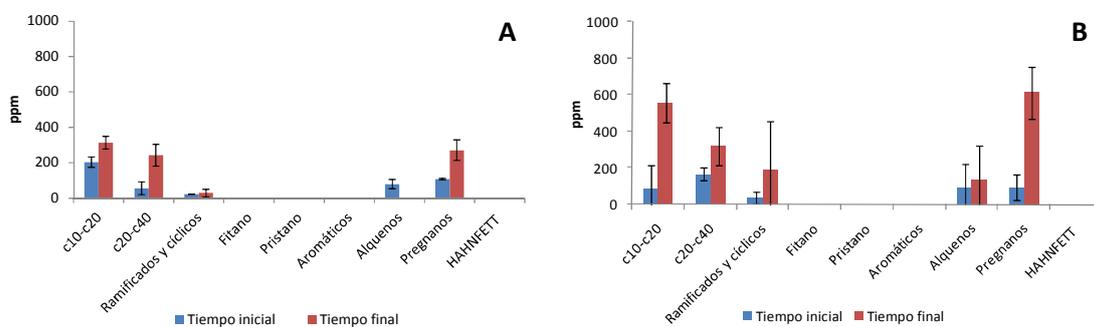


Figura 118. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) al inicio y al final del ensayo empleando *Citricoccus zhacaiensis* (A) y *Micrococcus aloeverae* (B). Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

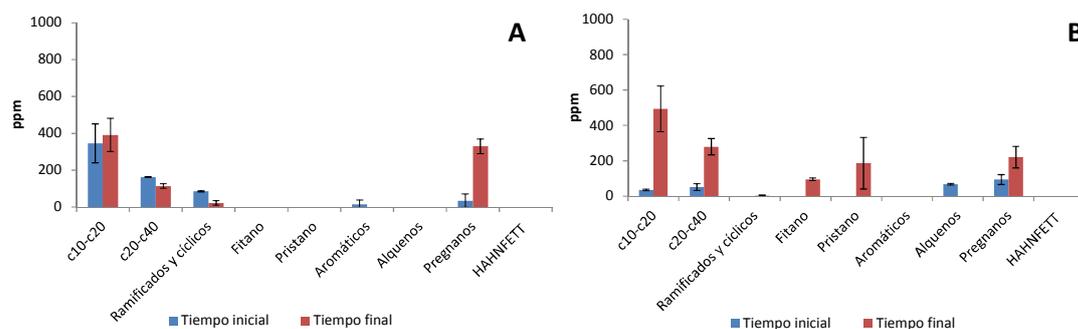


Figura 119. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) al inicio y al final del ensayo empleando *Gulosibacter molinivorax* (A) y *Kocuria gwangalliensis* (B). Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Finalmente, se estudiaron los índices de biodegradación en cada uno de los ensayos de biodegradabilidad. En el caso de *Citricoccus zhacaiensis*, *Gulosibacter molinativorax* y *Micrococcus aloeverae* no pudieron calcularse ya que durante el ensayo ni fitano ni pristano fueron detectados por cromatografía de gases. En el caso de *Kocuria gwangalliensis* al inicio tampoco se detectó, por lo que no fue relevante el estudio de los mismos. Sin embargo, sí se pudo comparar el índice de biodegradación c18/fitano en ausencia de inóculo (control) e inoculando *Brevundimonas diminuta*, disminuyendo dicho índice en éste último caso mientras que en el ensayo sin bacteria se mantuvo estable, lo cual demuestra la degradación realizada por dicha bacteria en el ensayo.

Tabla 38. Índices de biodegradación en ausencia de inóculo (control) e inoculando *Brevundimonas diminuta* (ND - No Detectado). Búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos.

INDICADORES	Control		Brevundimonas diminuta	
	Tiempo Inicial	Tiempo Final	Tiempo Inicial	Tiempo Final
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	1,8±0,2	1,9±0,1	2,6±0,5	2,0±1,0

Por tanto, a la vista de los resultados mostrados, *Brevundimonas diminuta* parece ser la única cepa que podría formar parte de un consorcio degradador de hidrocarburos en las condiciones de ensayo planteadas.

4.4 Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical

a) Fase de tratamiento

Este ensayo, tal y como se describe en el apartado “2.7. Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical”, se realizó con objeto de determinar la eficacia del material absorbente Paño Sentec®, empleando para ello el reactor de flujo vertical, para tratar aguas contaminadas con hidrocarburos. La duración de esta fase de tratamiento fue de un mes, considerando ensayos analíticas y tratamiento de resultados.

Esta fase se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se trató una cantidad de 20 L de agua contaminada con hidrocarburos con una concentración de TPH de 16.013,33 mg/L obteniendo una concentración de hidrocarburos a la salida de 820,00 mg/L sin necesidad de realizar ninguna recirculación. No obstante, teniendo en cuenta los resultados por gravimetría se obtuvieron *a posteriori*, en el ensayo se establecieron 8 ciclos de recirculación, tras los cuales la concentración del agua tratada fue de 33,33 mg/L. Los resultados por cromatografía de gases/espectrometría de masas demostraron también la eficacia del sistema tras el primer ciclo (Figuras 120 y 121).

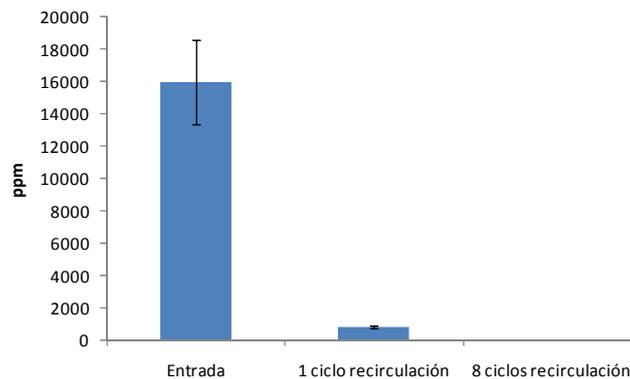


Figura 120. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso de la primera etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” empleando el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec® ($Q_2=18L/h$). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

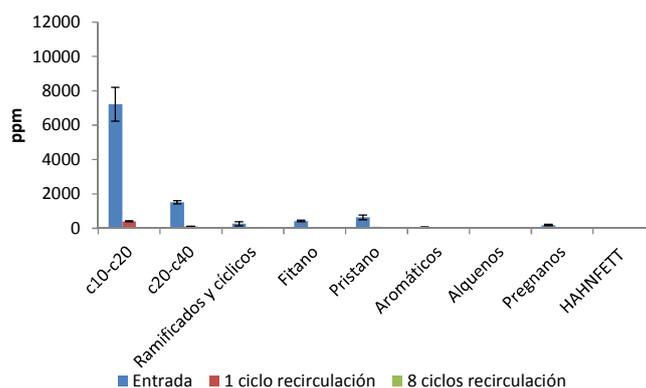


Figura 121. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso de la primera etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” empleando el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec® ($Q_2=18L/h$). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

Los índices de biodegradación no evidenciaron la existencia de un proceso de biodegradación ya que no descendieron los índices analizados hasta los 8 ciclos donde ninguna fracción fue detectada. Bien es cierto que el tiempo de ensayo fue muy breve.

Tabla 39. Índices de biodegradación en agua en la primera etapa (ND - No Detectado). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

INDICADORES	Primera etapa		
	Entrada	1 ciclo recirculación	8 ciclos recirculación
Relación Pristano/Fitano	1,4±0,1	1,5±0,2	ND
Relación C17/Pristano	2,1±0,2	2,2±0,1	ND
Relación C18/Fitano	2,3±0,1	2,2±0,1	ND

En la segunda etapa, se empleó el mismo soporte que en la primera etapa y se trataron 22L de agua con una concentración de hidrocarburos de 83.396,67 mg/L. En esta segunda fase se estableció nuevamente un circuito de circulación cerrado y tras los 8 ciclos de recirculación la concentración de hidrocarburos descendió hasta 126,7 mg/L. Se decidió duplicar el número de recirculaciones (16 ciclos), después de los cuales los hidrocarburos habían sido retirados del agua pasando a una concentración de 93,3 mg/L. Por último, y para asegurarnos de que la concentración de hidrocarburos no aumentase de nuevo se recirculó otros 4 ciclos (20 ciclos) tras los cuales se obtuvo una concentración de hidrocarburos en el agua 45,0 mg/L. En este caso la concentración de las fracciones tras los 8 ciclos de recirculación fue prácticamente indetectable por el equipo (Figuras 122 y 123).

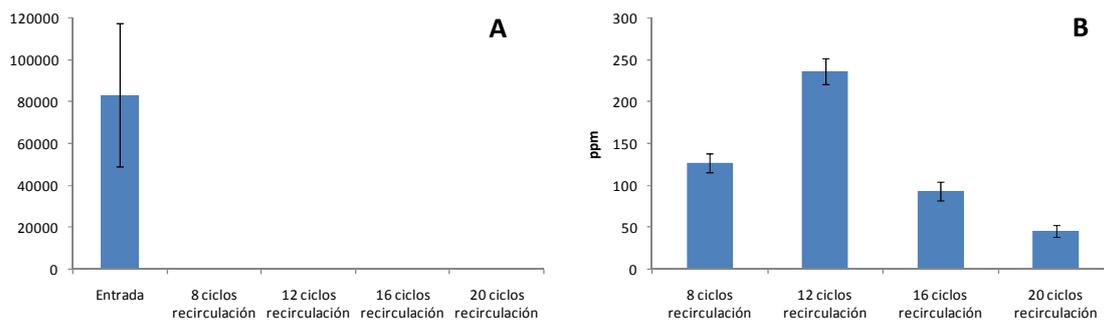


Figura 122. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso de la segunda etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” (A) y durante las distintas muestras tomadas a la salida (B) empleando el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec® ($Q_2=18L/h$). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

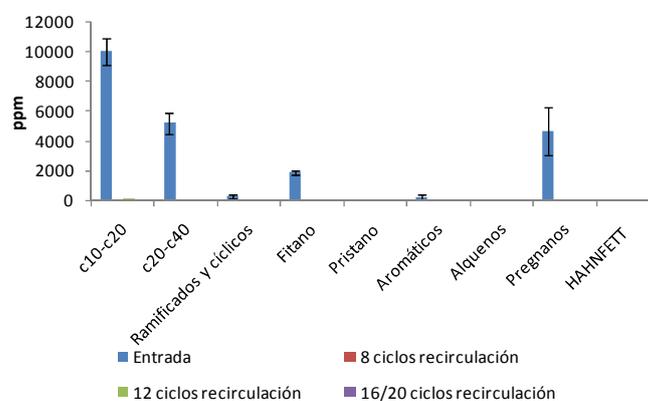


Figura 123. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso de la segunda etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” empleando el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec® ($Q_2=18L/h$). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

En la segunda etapa tampoco se observa un proceso de biodegradación, solamente de retención física, a la vista de la evolución de los indicadores (Tabla 40).

Tabla 40. Índices de biodegradación en agua en la primera etapa (ND - No Detectado). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

INDICADORES	Segunda etapa			
	Entrada	8 ciclos recirculación	12 ciclos recirculación	16/20 ciclos recirculación
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	1,1±0,1	ND
Relación C17/Pristano	ND	ND	2,2±0,03	ND
Relación C18/Fitano	3,5±0,1	ND	1,9±0,1	ND

b) Fase de biorremediación

Tras esto se estudió la degradación de los hidrocarburos absorbidos en el soporte. Resaltar que parte de los hidrocarburos que había presente en agua fueron degradados por la población bacteriana, así como los absorbidos en los hidrocarburos, teniendo en cuenta que la duración de la fase de tratamiento fue de aproximadamente un mes. En cuanto al contenido en hidrocarburos totales, TPH, analizado por gravimetría, se observa un descenso acusado durante los 5 primeros meses, tras los cuales la disminución del contenido de hidrocarburos absorbidos comienza a ralentizarse tal y como representa la asíntota de la figura 124.

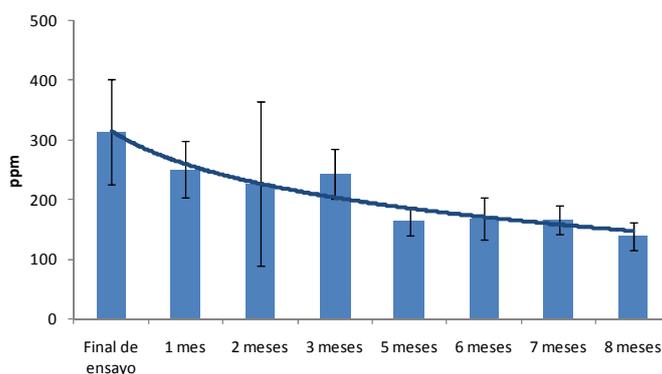


Figura 124. Concentración de hidrocarburos absorbidos al soporte (mg/L agua tratada) al finalizar la segunda etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” empleando el biorreactor de flujo vertical empleando el soporte Paño Sentec® ($Q_2=18L/h$) y transcurridos 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8 meses de la fase de biorremediación. Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

En cuanto a las distintas fracciones de hidrocarburos al finalizar, las fracción c10-c20 incrementó su concentración en los tres primeros meses y a partir del quinto volvió a su valor inicial llegado el octavo mes, mientras que c20-c40 mantuvo su valor hasta el quinto mes que comenzó a descender. La concentración de ramificados y cíclicos descendió hasta concentraciones no detectables a partir del quinto mes, al igual que los alquenos a partir del primer mes. Los pregnanos también incrementaron su concentración en los primeros tres meses y a partir del quinto descendió su concentración hasta valores iniciales (Figuras 125 y 126).

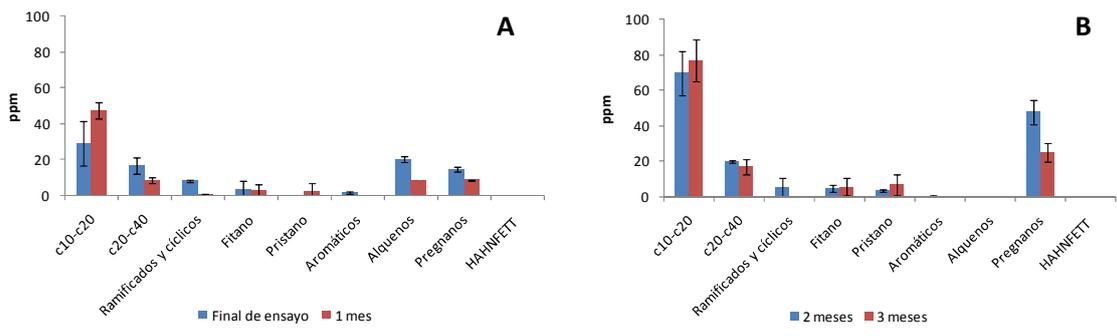


Figura 125. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte (mg/L agua tratada) al finalizar la segunda etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” empleando el biorreactor de flujo vertical con el soporte Paño Sentec® (Q₂=18L/h) y transcurridos 1 (A), 2 y 3 meses (B) de la fase de biorremediación. Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

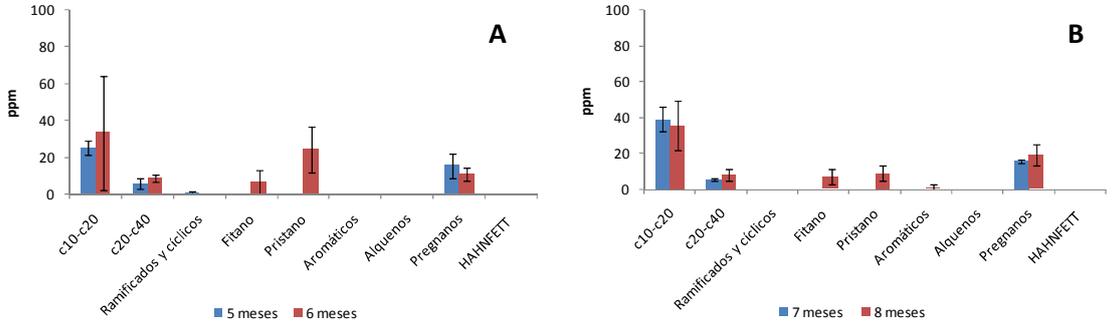


Figura 126. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte (mg/L agua tratada) transcurridos 5, 6 (A), 7 y 8 meses (B) de la fase de biorremediación. Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

En lo referente a los índices de biodegradación, a partir del quinto mes se observó un descenso tanto del índice pristano fitano, como del c18/fitano. Destacar que en los análisis realizados en el quinto y séptimo mes no fueron detectados ni fitano ni pristano, por lo que los índices no pudieron ser calculados.

Tabla 41. Índices de biodegradación en el soporte Paño Sentec® al finalizar la segunda etapa del “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” y transcurridos 1 - 8 meses de la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical.

INDICADORES	Paño Sentec®			
	Final Ensayo	1 mes	2 meses	3 meses
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	0,9±0,3	2,6±1,8
Relación C17/Pristano	ND	ND	2,7±1,3	ND
Relación C18/Fitano	ND	2,2±0,4	2,6±1,4	4,7±2,3

INDICADORES	Paño Sentec®			
	5 meses	6 meses	7 meses	8 meses
Relación Pristano/Fitano	ND	2,1±1,6	ND	1,3±0,1
Relación C17/Pristano	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	ND	1,7±0,8	ND	1,3±0,4

Por tanto, en este “Ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical” se testó que con el material absorbente Paño Sentec® (36g) se pudieron tratar dos volúmenes de más de 20 L de agua contaminada con hidrocarburos con una carga superior a 16.000 y 83.000 mg TPH/L agua; tras esto en el propio soporte se produjo una biodegradación de los hidrocarburos absorbidos por parte de la microbiota autóctona de dicho agua.

4.5 Ensayos a escala planta piloto

a) Fase de tratamiento

Estos ensayos, tal y como se describe en el apartado “2.8. Ensayos a escala de planta piloto”, se realizaron en la planta piloto ubicada en las instalaciones de la empresa CLH en Motril consistente en 4 biorreactores de flujo vertical por los cuales se recirculó el agua a tratar y en cuyo interior se alojó una unidad del material absorbente Rollo Sentec®.

El principal ensayo realizado en la planta piloto se llevó a cabo en los 4 biorreactores. Inicialmente, en base a los resultados obtenidos en los ensayos de absorción y biodegradación, se plantearon 8 ciclos de recirculación; no obstante se realizó otro muestreo con un mayor número de ciclos. Así, en los biorreactores nº 1 y 2 ($Q_1=180\text{L/h}$, sin/con adición de oxígeno) se tomó una muestra a los 8 ciclos y otra a los 18; en el caso de los biorreactores nº 3 y 4 ($Q_2=780\text{L/h}$, sin/con adición de oxígeno), se tomó muestra a los 8 y a los 54 ciclos de recirculación.

En cuanto a la evolución en el contenido en TPH, en los biorreactores nº 1 y 2 la concentración a la entrada fue de 86.530ppm y se observó un descenso considerable de dicha concentración tras los 8 ciclos de recirculación, alcanzándose una concentración de $25.933,33$ y $9.196,67$ ppm respectivamente (descenso de un 70% y un 90%). Tras 18 ciclos, la concentración se situó en $1.813,33$ y 950 ppm respectivamente (descenso de un 98% y 99%) (Figura 127).

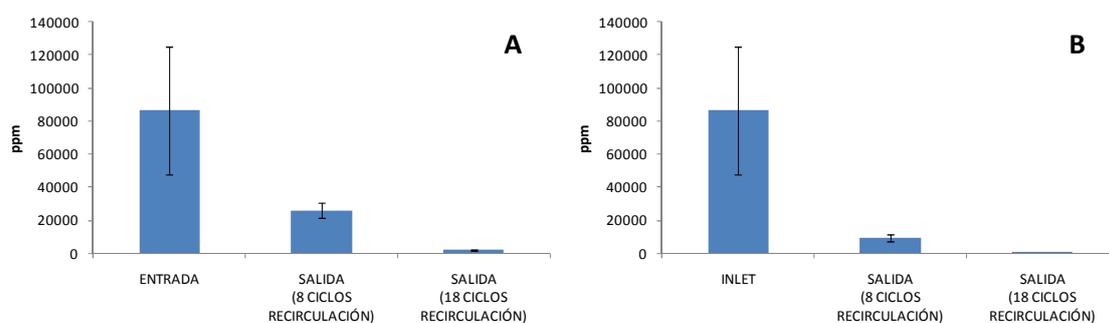


Figura 127. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del ensayo en planta piloto empleando el biorreactor nº 1 (A)/ nº 2 (B) de flujo vertical empleando el soporte Rollo Sentec® ($Q_1=180\text{L/h}$). Ensayos a escala planta piloto.

En cuanto a las fracciones de hidrocarburos, en ambos casos el descenso de las mismas fue más que evidente tras 8 ciclos de recirculación, y mucho más acusado tras 18 ciclos (Figura 128). En los biorreactores en los que se operó a caudal $Q_1=180\text{L/h}$, la eliminación de hidrocarburos en los que respecta a TPH y a las distintas fracciones fue ligeramente más eficaz con adición de oxígeno, en el biorreactor nº2.

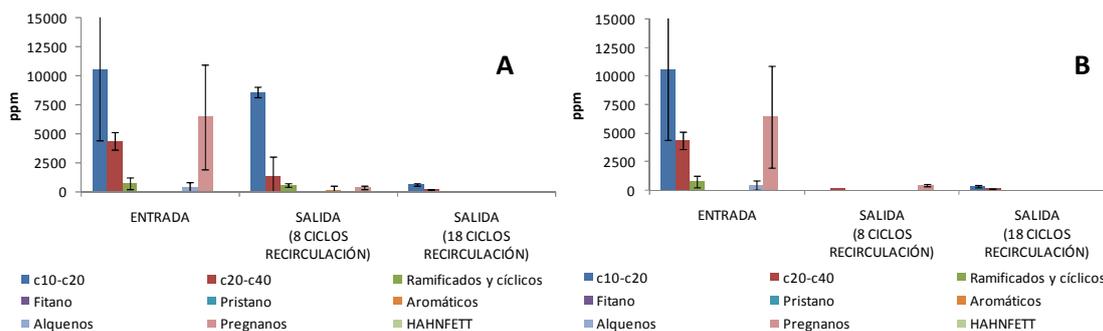


Figura 128. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del ensayo en planta piloto empleando el biorreactor n° 1 (A)/ n° 2 (B) de flujo vertical empleando el soporte Rollo Sentec® ($Q_1=180\text{L/h}$). Ensayos a escala planta piloto.

En los biorreactores a caudal elevado (biorreactores n°3 y 4) la concentración a la entrada fue de 69.077,67 ppm, y tras 8 ciclos de recirculación el descenso en TPH fue cercano al 92% y 97% con una concentración de 5.226,67 y 1.606,67 ppm. Tras 54 ciclos de recirculación la concentración del agua fue de 920,00 y 1.293,33 ppm, suponiendo un descenso del 99% y 98% (Figura 129).

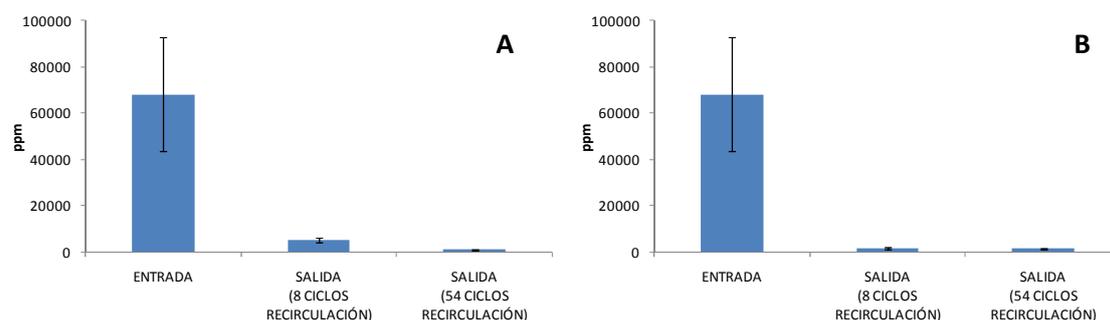


Figura 129. Concentración de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del ensayo en planta piloto empleando el biorreactor n° 3 (A)/ n° 4 (B) de flujo vertical empleando el soporte Rollo Sentec® ($Q_2=780\text{L/h}$). Ensayos a escala planta piloto.

En el caso del caudal elevado ($Q_2=780\text{L/h}$) se obtuvieron resultados similares con y sin adición de oxígeno (Figura 130).

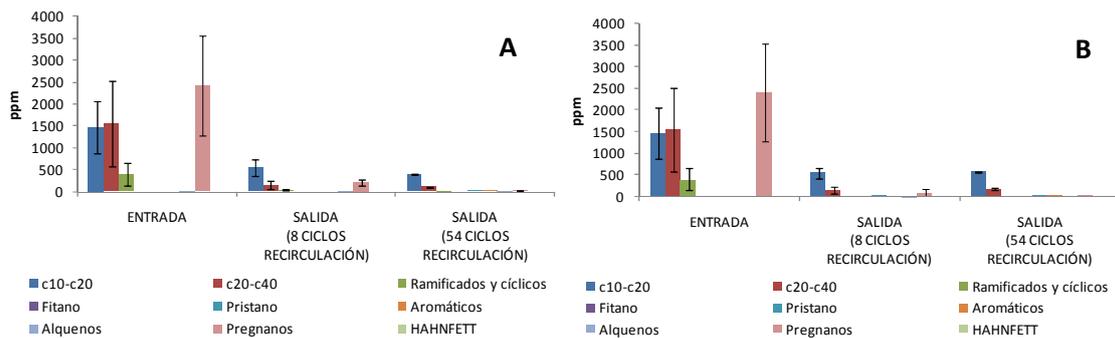


Figura 130. Evolución de la concentración de las fracciones de hidrocarburos en agua (mg/L) en el transcurso del ensayo en planta piloto empleando el biorreactor n° 3 (A)/ n° 4 (B) de flujo vertical empleando el soporte Rollo Sentec® ($Q_2=780\text{L/h}$). Ensayos a escala planta piloto.

b) Fase de biorremediación

Tras finalizar la fase de tratamiento, se extrajeron los soportes absorbentes Rollo Sentec® para dar paso a la fase de biorremediación. Dicho estudio se realizó para cada material absorbente, tanto en lo que se refiere a TPH como a las fracciones de hidrocarburos. También se calcularon los índices de biodegradación, y la no presencia de pristano en ninguno de los soportes (a excepción del soporte del biorreactor 1 a los 5 meses y del biorreactor 2 a los 4 y 5 meses) hizo que solo se considerase el índice c18/fitano.

En el material absorbente extraído del biorreactor 1, en el que la recirculación se realizó a caudal $Q_1=180\text{L/h}$, el análisis por gravimetría (TPH) y el índice de biodegradación c18/fitano mostraron que se produjo una ligera degradación de los hidrocarburos absorbidos. Bien es cierto que no hubo una reducción evidente de las fracciones de hidrocarburos transcurridos los 5 meses de la fase de biorremediación (Figuras 131-132; tabla 42).

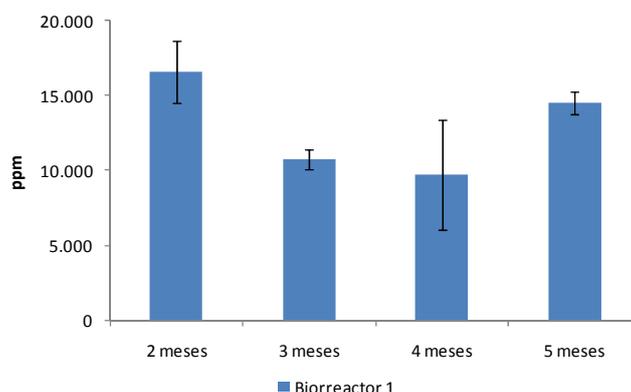


Figura 131. Concentración de hidrocarburos absorbidos al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor n°1 ($Q_1=180\text{L/h}$ sin adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

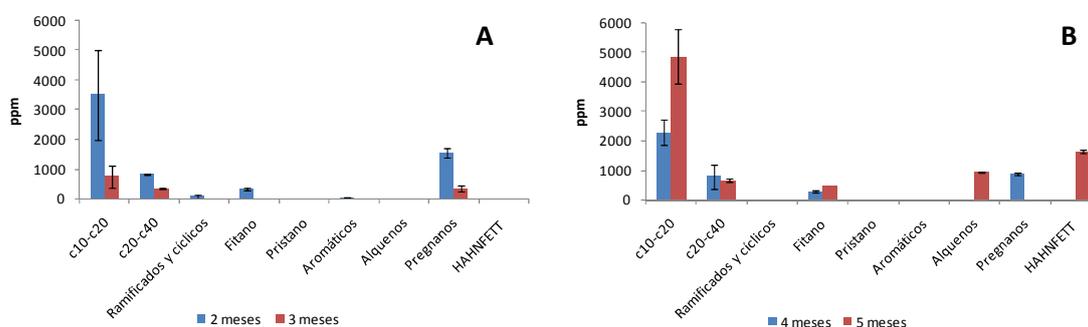


Figura 132. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor n°1 ($Q_1=180\text{L/h}$ sin adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

Tabla 42. Índices de biodegradación en el soporte Rollo Sentec® empleado en el biorreactor n°1 ($Q_1=180\text{L/h}$ sin adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo a escala planta piloto.

INDICADORES	Rollo Sentec®			
	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	ND	0,6±0,2
Relación C17/Pristano	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	2,0±0,2	ND	1,96±0,05	1,6±0,1

En el material absorbente extraído del biorreactor 2, en este caso con aireación, tanto el contenido en TPH como de fracciones se vieron reducidos al final de la fase de biorremediación, y la evolución del índice c18/fitano mostro una de forma moderada un degradación microbiana (Figura 133-134; tabla 43).

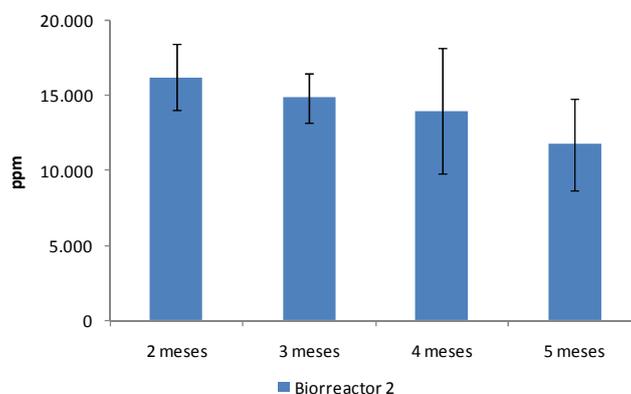


Figura 133. Concentración de hidrocarburos absorbidos al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor n°2 ($Q_1=180L/h$ con adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

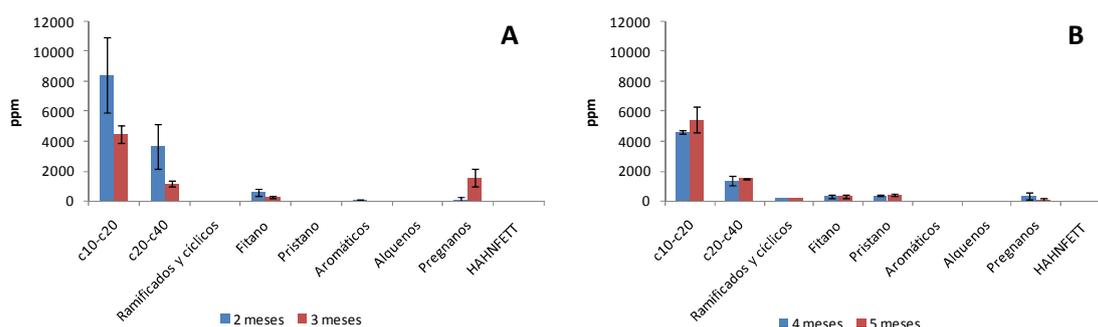


Figura 134. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor n°2 ($Q_1=180L/h$ con adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

Tabla 43. Índices de biodegradación en el soporte Rollo Sentec® empleado en el biorreactor n°2 ($Q_1=180L/h$ con adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo a escala planta piloto.

INDICADORES	Rollo Sentec®			
	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	1,2±0,1	1,1±0,2
Relación C17/Pristano	ND	ND	1,9±0,1	1,9±0,1
Relación C18/Fitano	2,3±0,5	2,6±0,7	2,0±0,2	1,88±0,04

Por su parte, en el biorreactor con caudal de trabajo $Q_2=780\text{L/h}$ sin aireación, el biorreactor 3, también se apreció una degradación de hidrocarburos en cuanto a TPH y al índice c18/fitano, aunque las fracción c10-c20 aumentó su concentración de forma considerable (Figuras 135-136; tabla 44).

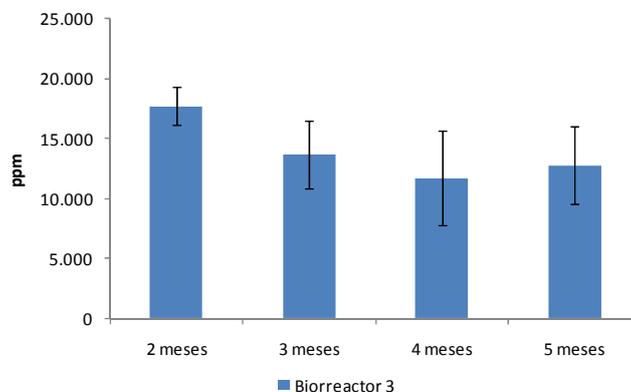


Figura 135. Concentración de hidrocarburos absorbidos al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor n°3 ($Q_2=780\text{L/h}$ sin adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

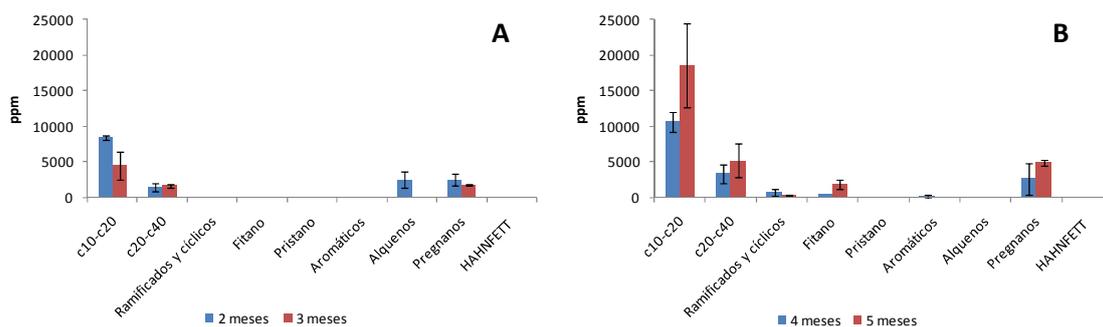


Figura 136. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor n°3 ($Q_2=780\text{L/h}$ sin adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

Tabla 44. Índices de biodegradación en el soporte Rollo Sentec® empleado en el biorreactor n°3 ($Q_2=780\text{L/h}$ sin adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación (ND - No Detectado). Ensayo a escala planta piloto.

INDICADORES	Rollo Sentec®			
	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	ND	ND	2,8±1,3	1,8±0,6

Por último, en el biorreactor 4 en el que sí se empleó aireación adicional, no se observó que se produjese una degradación microbiana, al menos tras 5 meses de biodegradación de los materiales absorbentes. Será necesario analizar tanto el contenido en TPH y fracciones en una fase más avanzada del proceso, así como el estudio del índice c18/fitano. (Figuras 137-138; tabla 45).

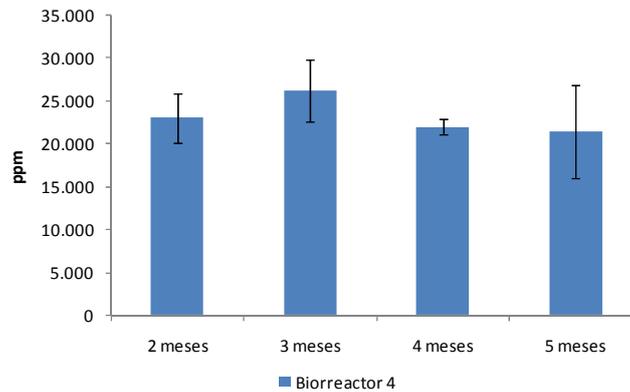


Figura 137. Concentración de hidrocarburos absorbidos al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor nº4 ($Q_2=780\text{L/h}$ con adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

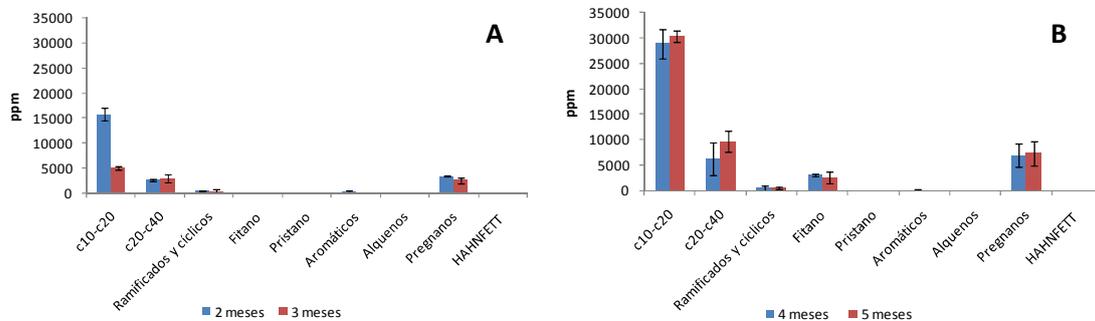


Figura 138. Concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos absorbidas al soporte Rollo Sentec® (mg/L agua tratada) empleado en el biorreactor nº4 ($Q_2=780\text{L/h}$ con adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación. Ensayo a escala planta piloto.

Tabla 45. Índices de biodegradación en el soporte Rollo Sentec® empleado en el biorreactor n°4 (Q2=780L/h con adición de oxígeno) en la fase de tratamiento del “Ensayo a escala planta piloto”, transcurridos 2, 3, 4 y 5 meses de la fase de biorremediación (ND - No Detectado).
Ensayo a escala planta piloto.

INDICADORES	Rollo Sentec®			
	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
Relación Pristano/Fitano	ND	ND	ND	ND
Relación C17/Pristano	ND	ND	ND	ND
Relación C18/Fitano	ND	ND	1,6±0,2	1,7±0,3

A la vista de los resultados expuestos, se puede afirmar que en dos de los cuatro soportes empleados en el escalado a planta piloto sí se evidenció la existencia de un proceso de degradación bacteriana, mientras que en dos de ellos no se aprecia. Esto puede deberse a la cantidad de factores implicados en la obtención de los resultados, por lo que es conveniente continuar el estudio en fases más avanzadas del proceso de biodegradación.

5. Discusión

Como ya se ha descrito a lo largo de este manuscrito, la finalidad de esta investigación fue el tratamiento de aguas con hidrocarburos combinando la retención de hidrocarburos por absorción y la biodegradación de los mismos mediante la acción de la microbiota autóctona adherida a los soportes absorbentes empleados.

Existen autores que han descrito que ante un derrame la primera medida es el uso de métodos físicos y químicos, pero que la biorremediación es un método eficaz y económico para la eliminación de hidrocarburos en aguas (Bao et al., 2014)

Como ya hemos visto, los resultados de los ensayos de adherencia mostraron que la población microbiana presente en el agua tiende a adherirse a los materiales absorbentes seleccionados con valores de Log(UFC/ml) muy próximos a los valores correspondientes a la población en suspensión, e incluso en ocasiones superiores como en el caso de los ensayos IVA y IVB empleando el soporte Paño Sentec®; la adherencia microbiana es la fase inicial de la formación de una biopelícula y cualquier superficie hidratada es propensa a que se produzca una adhesión microbiana sobre ellas (Bakker et al., 2003; Vanysacker et al., 2013).

Los dos primeros ensayos se realizaron con la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18. En primer lugar, el ensayo I se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo rico en nutrientes (medio LB) (Sezonov et al., 2007) en el que *Pseudoalteromonas elyakovii* creció de forma óptima. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad de los soportes seleccionados para formar una biopelícula estable. Por otro lado al realizar el ensayo II en un medio de cultivo más limitado en nutrientes (medio BH) (Deziel et al., 1996), que se aproxima más a las características del agua a tratar se comprobó que la eficacia de alguno de los soportes era menor; así, en el ensayo II se constató que el corcho hidrófilo no era un buen candidato como material en el que se produce una adherencia microbiana, a la vista de los resultados en este ensayo II, con una población microbiana adherida inferior a 4 Log (UFC/ml soporte). Sin embargo los materiales absorbentes CorkSorb® 01025, Paño Sentec® y Cordón Sentec® si mostraron una buena adhesión microbiana con valores de alrededor de 6-7 Log (UFC/ml soporte). En estudios anteriores ya quedó demostrada la capacidad de adherencia y degradadora de dicha cepa (Uad, 2012; Rodríguez-Calvo et al., 2017).

Por este motivo se seleccionaron dos de ellos para los ensayos en los que se empleó agua procedente del emplazamiento contaminado, CorkSorb® 01025 y Paño Sentec® (uno de corcho y uno de fibra de polipropileno), y se estudió la adhesión de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado. Así, en los ensayos III y IV se observaron algunas diferencias de comportamiento entre ambos materiales

absorbentes, fundamentalmente una mayor población microbiana adherida al Paño Sentec® en líneas generales, y una mayor duración de dicha adherencia en detrimento del soporte CorkSorb® 01025, donde se produjo un desprendimiento de la microbiota adherida a lo largo de los ensayos; a pesar de ello, en líneas generales ambos mostraron un buen comportamiento en cuanto a adhesión microbiana, tal y como habían destacado algunos autores con anterioridad. Albareda et al., (2008) y Ferreira and Castro (2005), afirmaron que el corcho era un buen material para ser empleado como soporte para formular inóculos de algunas bacterias; esta adhesión también fue evidenciada por Bartowsky and Henschke (2008) que demostraron el deterioro del corcho de botellas de vino debido a la adhesión bacteriana. Por su parte Zhou et al., (2013), Jurecska et al., (2013) y Krivorot et al., (2011) destacaron a la fibra de polipropileno como un material propenso a la formación de una biopelícula en su estructura.

Además, se observó que a medida que aumentaba la concentración de hidrocarburos, la población microbiana se veía incrementada y la duración de dicha adherencia era mayor, produciéndose el desprendimiento en una fase más prolongada del ensayo.

La adhesión microbiana, tanto de la microbiota presente en el agua contaminada como por parte de la cepa *Pseudoalteromonas elyakovii* W18 quedó reflejada en las imágenes de microscopía electrónica SEM, técnica empleada por numerosos autores para el estudio y observación de biopelículas (González-Ramírez et al., 2016; Jurecska et al., 2013; Vyas et al., 2016).

Una vez constatada la adhesión microbiana, se procedió a estudiar la absorción de hidrocarburos en los materiales absorbentes que habían mostrado buena adhesión microbiana a su superficie. Para ello se emplearon dos configuraciones de biorreactores: de flujo horizontal y vertical.

En cuanto a las dos configuraciones, en el biorreactor de flujo horizontal se detectó que tanto la absorción como la adhesión microbiana fueron diferentes en función de la posición en la que se colocase el material absorbente, debido a que las dimensiones del biorreactor permitieron caminos preferenciales del agua. Así, en el caso de los paños Sentec®, empleando un caudal de 36 L/h la mayor retención se produjo en aquellos ubicados en las posiciones centrales, ya que el flujo entrante por la parte inferior desembocaba en esta zona; también se constató que un mayor caudal favorecía la adhesión microbiana y la absorción de hidrocarburos en los materiales absorbentes empleados, reduciéndose el contenido de hidrocarburos totales en agua de forma considerable (reducciones de TPH superiores al 90%). También destacar

que los resultados obtenidos en el ensayo VII realizado en el biorreactor de flujo horizontal no fueron satisfactorios.

Del mismo modo ocurrió en el ensayo en el que se emplearon unidades de Cordón Sentec®, produciéndose una absorción mayoritaria en las posiciones centrales. En el caso de las almohadas de corcho CorkSorb® 01025, debido a sus dimensiones gran parte de los hidrocarburos quedaron absorbidos en el que estaba colocado en la posición 1, justo a la entrada del agua a tratar, ya que “taponaba” la entrada y todo el flujo pasaba por dicho absorbente.

En el caso de del corcho CorkSorb® 01025 (Ensayo VIII), cada gramo de absorbente retuvo un promedio 1,49 mg TPH por litro de agua tratada en el biorreactor horizontal, con una reducción del contenido en agua del 98,5%; empleando un flujo vertical la retención superó en más de dos veces la obtenida en la configuración anterior, con una retención de 3,22 mg TPH por litro de agua tratada y una con una reducción de la concentración en agua del 97,5%. Bien es cierto que considerando el primer soporte del reactor de flujo horizontal, la retención fue de 3,69 mg TPH por litro de agua tratada, del orden del de reactor de flujo vertical. También destacar que en el ensayo VII empleando el biorreactor de flujo vertical, la retención de cada gramo de soporte CorkSorb® 01025 se situó por encima de los 10 mg TPH por litro de agua tratada

Del mismo modo, empleando como material absorbente Cordón Sentec® (Ensayo IX) la retención de cada gramo de soporte fue de 1,16 mg TPH por litro de agua tratada en el biorreactor horizontal (reducción del 85,5% TPH en agua) y de 2,73 mg TPH por litro de agua tratada en el biorreactor vertical (reducción del 94,5% TPH en agua). Nuevamente, considerando la unidad de soporte con mayor retención, ésta fue de 2,38 mg TPH por litro de agua tratada, del orden de la obtenida en el biorreactor de flujo vertical.

Por último, en los ensayos en los que se empleó el soporte Paño Sentec® la absorción en cada gramo de soporte en los biorreactores de flujo horizontal al finalizar cada uno de los ensayos fue de 0,31 (Ensayo V (1)), 0,61 (Ensayo V (2)), 3,53 (Ensayo VI), y 1,23 (Ensayo VII) mg TPH por litro de agua tratada, en los que en el ensayo V solamente a caudal elevado Q_2 se produjo una reducción, de un 53,8%, y en los ensayos VI y VII se redujo en un 91,4% y 91,9% respectivamente el contenido de TPH en agua. En el caso del biorreactor de flujo vertical la retención se situó en 1,47 mg TPH por litro de agua tratada, con una retención del 92,6%. Si consideramos de forma aislada los soportes en los que se produjo una mayor absorción, en el ensayo V la absorción en el último soporte fue de 0,36 ($Q_1=18L/h$) y 0,70 ($Q_2=36L/h$), en el ensayo

VI fue de 10,09 en la posición central, y en el ensayo VII fue de 1,74 mg TPH por litro de agua tratada en la última posición (absorción por gramo de soporte). Se observa que la retención en el ensayo VI fue la mayor, pero también es cierto que la cantidad de material absorbente fue muy elevada, 6 unidades de Paño Sentec®, que ocupaban casi todo el biorreactor, por lo que guarda cierta similitud con la configuración en flujo vertical.

Estos resultados sugieren que una optimización en el diseño del biorreactor de flujo horizontal podría aumentar su eficacia. En un estudio similar, en el que se trató el agua contaminada mediante barreras reactivas permeables, se señala que hay que considerar los flujos preferenciales del agua para lograr una retención/absorción efectiva (Obiri-Nyarko et al., 2014). Por ello estos estudios serán objeto de futuras investigaciones.

Por el contrario, el biorreactor de flujo vertical, en el que el material absorbente ocupaba todo el área de flujo, ya sea CorkSorb® 01025, Cordón Sentec® o Paño Sentec®, demostró ser una configuración más eficaz, tanto en lo que se refiere a adhesión microbiana como en lo que se refiere a retención de hidrocarburos. El hecho de que al recircular el agua en sentido ascendente, ésta atravesaba en su totalidad el material absorbente hizo que se obtuviesen tasas de retención similares o ligeramente superiores a las obtenidas en el reactor de flujo horizontal y de forma más homogénea.

Respecto a los materiales absorbentes empleados, tanto en bibliografía (Bazargan et al., 2014) como en información proporcionada por el fabricante la absorción del producto comercial Corksorb® 01025 se sitúa respectivamente entorno 10-8g de contaminante por cada gramo de absorbente, muy superior a lo obtenido en los ensayos realizados, que se situó alrededor de 0,1-0,2 g de contaminante por cada gramo de absorbente en el caso del primer soporte del biorreactor de flujo horizontal y en el instalado en el biorreactor de flujo vertical.

En cuanto a los materiales absorbentes de la casa comercial Sentec® S.L., no se encontró bibliografía que mencionase dichos productos comerciales; respecto a la información suministrada por el fabricante, la absorción la sitúan en más de 15 veces el peso de material absorbente tanto para Paño Sentec® como para Cordón Sentec®.

Bayat et al. (2005) indicaron que la fibra de polipropileno tiene una capacidad de absorción de 7-9 veces su peso en función del tipo de fluido y contaminante, similar a la encontrada en el caso del corcho granulado y muy superior a lo obtenido en los ensayos realizados.

El hecho de que la cantidad de hidrocarburos absorbida en los materiales empleados en los ensayos V-X, o al menos la detectada al muestrear/extraer el soporte absorbente, estuviese por debajo de la capacidad teórica de absorción de dichos materiales sugiere que desde que se produce la absorción hasta que se analizan los soportes se produce una degradación de los mismos.

Además de los resultados por gravimetría de hidrocarburos totales, el análisis de las distintas fracciones de hidrocarburos por cromatografía de gases y espectrometría de masas, permitió constatar como mejor opción la configuración diseñada de flujo vertical.

En los ensayos en los que se utilizó Paño Sentec®, empleando una configuración de flujo horizontal fueron necesarias que transcurriesen entre 24 y 72h en el ensayo para conseguir niveles no detectables de todas las fracciones de hidrocarburos; empleando CorkSorb® 01025 y Cordón Sentec® no se consiguió reducir las fracciones de hidrocarburos a niveles no detectables transcurridos 7 días de ensayo. Sin embargo con los tres soportes absorbentes en el biorreactor de flujo vertical, transcurrido únicamente un solo ciclo de recirculación (t_0) no se detectó fracción alguna de hidrocarburos, lo cual evidenció el buen funcionamiento y el alto grado de eficacia de dicha configuración.

También hay que destacar, como se ha mencionado en el capítulo de resultados, que se observó que en los ensayos realizados empleando la configuración de flujo horizontal se produjeron episodios de desprendimiento de parte de los hidrocarburos, observándose tanto en los resultados de TPH como de las fracciones que aparecían en agua concentraciones ligeramente superiores a las de tiempos anteriores del ensayo en cuestión. Este fenómeno no se ha observado en ningún ensayo realizado en el biorreactor de flujo vertical. Con vistas a futuros ensayos con una mayor duración y a escalas mayores (planta piloto, planta industrial...), no sería deseable que se produjera este desprendimiento de hidrocarburos una vez retenidos en el material absorbente.

Considerando la absorción desigual, el hecho de que los soportes no alcanzaron su capacidad máxima de absorción, y el desprendimiento de hidrocarburos sería interesante profundizar en la optimización de la tecnología de flujo horizontal. Respecto a la tecnología de flujo vertical, diversos autores han certificado la eficacia de la tecnología de filtros sumergidos para el tratamiento de aguas contaminadas de diversa índole (Gómez et al., 2000; Gómez-Villalba et al., 2006; Moreno et al., 2005). A pesar de que se podría incrementar la capacidad de absorción de TPH, esta

configuración demostró una indiscutible eficacia en términos de absorción de hidrocarburos.

En cuanto a la adhesión microbiana, en primer lugar destacar que en los biorreactores de flujo horizontal en los ensayos VIII y IX donde se emplearon como absorbentes el CorkSorb® 01025 y Cordón Sentec® respectivamente, la adhesión microbiana en las distintas unidades de material absorbente dentro del mismo reactor fue similar a pesar de una mayor absorción en determinados soportes. En los ensayos V-VII en los que fue el Paño Sentec® el material absorbente empleado, se evidenció la relación entre la absorción y la adhesión. En los ensayos V (con ambos caudales) y VII donde la absorción de hidrocarburos a los distintos soporte fue similar (aunque ligeramente superior en los soportes de las posiciones centrales), la adhesión microbiana también fue similar. En cambio en el ensayo VI transcurridas 24h hubo una absorción mayoritaria en la unidad de soporte central y en ella se detectó una mayor población microbiana adherida. Al finalizar el ensayo la población microbiana adherida a cada uno de los soportes fue similar, observándose un crecimiento de la población microbiana adherida al soporte Paño Sentec®2 desde las 24h de ensayo hasta transcurridas 48h, soporte en el cual la retención de hidrocarburos fue mayoritaria en dichas 48h (47,54%).

160

Por otro lado, si comparamos la adhesión microbiana producida en una configuración de biorreactor y en otra empleando el mismo material absorbente, en el ensayo VIII (CorkSorb® 01025) debido a una mayor concentración de hidrocarburos retenidos en el biorreactor de flujo vertical por gramo de soporte, la población microbiana adherida fue bastante superior en esta configuración, más de 1 Log (UFC/ml soporte) superior, y del mismo orden que en el ensayo VII en el que también se empleó dicho soporte en el biorreactor de flujo vertical.

En el ensayo IX (Cordón Sentec®) la población microbiana sí fue superior en el biorreactor horizontal a pesar de que la concentración de hidrocarburos absorbidos en el biorreactor de flujo vertical fue bastante superior en éste.

En el ensayo X la población microbiana adherida al soporte Paño Sentec® se situó en torno a 5,6 Log (UFC/ml soporte) en el biorreactor de flujo vertical, similar a la encontrada en los soportes instalados en el biorreactor de flujo horizontal a pesar de que en esta algún ensayo de esta configuración la concentración de hidrocarburos inicial era superior y en otros inferior.

Por tanto estos ensayos sugieren por lo general una relación directa entre la absorción de hidrocarburos y la adhesión microbiana.

En 2006 Mel Rosenberg hizo una revisión del método MATH, test de adhesión microbiana a hidrocarburos promovido por él y colaboradores 25 años atrás; dichos autores dieron por confirmada la adherencia de bacterias, degradadoras de hidrocarburos o no, a dichos compuestos (Rosenberg, 2006; Rosenberg et al., 1980). Otros autores hicieron referencia a dicho método y confirmaron dicha adherencia (Abarian et al., 2016; Pruthi and Cameotra, 1997). Por tanto, debido a que los materiales seleccionados mostraron una tendencia a la adhesión microbiana, a la adhesión microbiana a hidrocarburos, y a que la forma de vida microbiana más extendida es la biopelícula (Costerton et al., 1995), ante una mayor absorción de hidrocarburos es lógico que haya una mayor adhesión bacteriana.

En lo que se refiere a la degradación microbiana, la disminución de los índices de biodegradación c17/pristano y c18/fitano indican un proceso de biodegradación ya que las bacterias atacan antes a los alcanos lineales (c17-pristano y c18-fitano) que a los isoprenos pristano y fitano, por lo que el hecho de la reducción del valor de la relación entre ellos es indicativo de la acción microbiana (Asif et al., 2009; Shelton et al., 2016). En la mayoría de los casos se hizo el seguimiento del índice c-18/fitano, que es el índice más ampliamente utilizado (Ortega Romero, 2012).

En los ensayos V, VI y VII, en los que solamente se llevó a cabo la fase de tratamiento, los índices de biodegradación fueron los que reflejaron la existencia o no de un proceso de biorremediación. A lo largo de los ensayos los índices de biodegradación en agua no pudieron determinarse fundamentalmente por la elevada absorción de las distintas fracciones de hidrocarburos; se presupone que se combina un proceso de retención física con uno de biodegradación en agua, pero no se pudo constatar en estos ensayos. En cambio en los soportes debido a la absorción a los mismos sí se pudo calcular, y el índice c18/fitano se redujo en un 40% aproximadamente en los ensayos V ($Q_{12}=36\text{L/h}$) y VI; en el biorreactor 1 a caudal $Q_{11}=18\text{ L/h}$ en el ensayo V no se redujo dicho índice a lo largo del ensayo. Como ya se ha señalado, los resultados del ensayo VII en la configuración de flujo horizontal no fueron satisfactorios, y los índices de biodegradación no disminuyeron.

Respecto a los ensayos VIII, IX y X, en la fase de biodegradación se observó, en líneas generales, que la población microbiana se mantuvo estable e incluso en algunos casos hubo un ligero incremento de la misma coincidiendo con un descenso en la concentración de TPH absorbidos a alguno de los soportes. En los soportes CorkSorb® 01025 empleados en el ensayo VIII se produjo un incremento de la población microbiana adherida al material absorbente en el caso del biorreactor horizontal, manteniéndose estable en el caso del biorreactor vertical; bien es cierto que

hay que tener en cuenta que al finalizar los ensayos, la población en este último al finalizar la fase de tratamiento era de entre 7,5-8 Log (UFC/ml), valor que alcanzó la población microbiana adheridas en el biorreactor de flujo horizontal tras 4 meses de tratamiento. Este crecimiento microbiano solamente se vio acompañado de una reducción del contenido en TPH en el caso del soporte corcho CorkSorb®1 del biorreactor horizontal, que es donde se produjo la retención mayoritaria (82,63%). En éste se produjo una reducción considerable de la fracción de c10-c20 (que a su vez era la que en mayor concentración se encontraba), incrementó la concentración de fitano y pristano, mientras que el resto se mantuvo constante. En los otros dos soportes no se observó degradación de ninguna fracción, aunque la concentración de las mismas era muy baja ya que en estos elementos la retención fue minoritaria. En el caso del reactor de flujo vertical, aunque en líneas generales la concentración de TPH no experimentó una disminución, la fracción mayoritaria, c10-c20, sí lo hizo.

En cuanto al soporte Cordón Sentec®, empleado en el ensayo IX, en los soportes del biorreactor de flujo horizontal se mantiene prácticamente estable, mientras que en el soporte instalado en el biorreactor de flujo vertical la población adherida creció durante los 4 primeros meses de la fase de biorremediación. En los soportes en los que se produjo una absorción mayoritaria nuevamente el contenido de hidrocarburos absorbidos se vio reducida la concentración de TPH absorbidos (los soportes situados en las posiciones centrales 2A y 2B). En cuanto a las fracciones, en todos ellos en el 4º mes de la fase de biorremediación la concentración de las mismas no fue detectable a excepción del soporte Cordón Sentec®2A, donde hubo que esperar al 8º mes, donde tampoco se detectaron fracciones de hidrocarburos absorbidas en el mismo. En el caso del soporte instalado en el biorreactor de flujo vertical también se observó que entre el 4º y el 8º mes de biodegradación la concentración de las fracciones se vio reducida hasta concentraciones no detectables.

Finalmente en el caso del Paño Sentec® el número de microorganismos adheridos no se vio incrementado durante los 5 meses que duró la fase de biorremediación, pero tanto la concentración de TPH como la de las fracciones disminuyó considerablemente. La degradación de los TPH se situó por encima de un 73%, y las fracciones transcurrido el primer mes se situaron en concentraciones suficientemente bajas como para no ser detectables por el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas.

En estos ensayos se observa que en líneas generales se produce un descenso de la concentración de los hidrocarburos totales o TPH adheridos a los soportes absorbentes unido a una estabilidad microbiana o un ligero crecimiento microbiano.

La propia definición de biorremediación dada por algunos autores (Kensa, 1970; Singh et al., 2014; Vidali, 2001) indica que la degradación de las sustancias contaminantes implica la promoción del crecimiento microbiano, concretamente de la microbiota autóctona del emplazamiento contaminado. Los resultados de distintos ensayos reforzaron dicha afirmación, mostrando elevadas densidades de poblaciones microbianas en presencia de crudo e hidrocarburos (Azizan et al., 2016; Crisafi et al., 2016).

A partir de los resultados obtenidos se podría afirmar que únicamente se puede constatar una degradación del contenido de hidrocarburos totales por parte de la microbiota adherida cuando este alcanza valores superiores a 100ppm al finalizar la fase de tratamiento del ensayo en cuestión; debido fundamentalmente al error asociado a los resultados de los análisis gravimétricos. Debido a ello, dicha afirmación se podría aplicar al estudio de la degradación de las distintas fracciones, analizadas por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Además se observa que en el soporte Corksorb® 01025, material absorbente consistente en corcho granulado, se produce únicamente la degradación de los alcanos lineales (c10-c20 y c20-c40) y aromáticos al final de la fase de biodegradación (8 meses) Sin embargo, en el soporte Cordón Sentec®, material absorbente consistente en fibra de polipropileno, se produce una degradación de todas las fracciones de hidrocarburos absorbidas a las unidades de material absorbente instaladas tanto en el biorreactor de flujo horizontal como en el de flujo vertical transcurridos 8 meses de biodegradación. En el caso del otro material absorbente compuesto de fibra de polipropileno, el Paño Sentec®, también se observa como ya se ha comentado que las concentraciones de las distintas fracciones de hidrocarburos disminuyeron hasta concentraciones no detectables transcurrido el primer mes de biodegradación.

En la fase de biodegradación, los alcanos lineales reducen su concentración y/o se degradan originando alcanos lineales de cadena más corta o a hidrocarburos ramificados (Abbasian et al., 2015). A su vez, los hidrocarburos aromáticos pasan a catecol y tras diferentes etapas de degradación originan ácidos (piruvato, anión de ácido pirúvico), los cuales fueron detectados en gran medida durante la fase de biodegradación (Juhász and Naidu, 2000). También es cierto que los alcanos son considerados por muchos autores como los hidrocarburos más fácilmente biodegradables (Admon et al., 2001; Leahy and Colwell, 1990; Mishra et al., 2001; Silva-Castro et al., 2016).

En estos ensayos VIII, IX y X, como ya se ha comentado en el apartado “3.2 Ensayos de absorción y biodegradación”, la retención no fue del todo eficaz en los biorreactores de flujo horizontal empleando corcho CorkSorb® y cordón Sentec® y no desaparecieron del agua la mayor parte de las fracciones en agua en la fase de tratamiento, y en este caso sí se pudieron calcular los diferentes índices de biodegradación, pero ninguno de ellos experimentó un descenso que demostrase la existencia de un proceso de biorremediación; por su parte en el biorreactor de flujo vertical la absorción de las distintas fracciones al material absorbente instalado en cada ensayo fue tal que no se detectaron en el agua transcurrido el primer ciclo de recirculación, por lo que no pudieron calcularse los índices mencionados.

En cambio los índices asociados al soporte si fueron calculados y analizados. En el ensayo VIII, (Corcho CorkSorb®) en los ambos reactores los tres índices experimentaron un descenso, en el caso del biorreactor de flujo horizontal descendió hasta el 8º mes, donde no se detectó octadecano ni heptadecano, mientras que la degradación de estos compuestos hasta concentraciones no detectables en el biorreactor de flujo vertical se produjo en el cuarto mes, por lo que la biodegradación fue más eficaz en este último caso. En el ensayo IX (Cordón Sentec®) el descenso de los índices de biodegradación sí fue más acusada en los soportes del biorreactor de flujo horizontal que en el instalado en el de flujo vertical. En el ensayo X, el heptadecano fue degradado hasta concentraciones no detectables en el primer mes, mientras que el octadecano lo hizo en el cuarto, descendiendo de forma evidente el índice c18/fitano desde el final del ensayo hasta dicho cuarto mes.

Considerando los resultados analizados, al finalizar los ensayos de absorción y biodegradación la opción que se consideró más eficaz para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos fue el biorreactor de flujo vertical empleando como material absorbente el soporte Paño Sentec®, teniendo en cuenta la reducción en el contenido en TPH y de fracciones tanto por absorción como debido a la degradación, la evolución de los índices de biodegradación, así como por la facilidad para el manejo y extracción del soporte absorbente.

Por este motivo se realizó el ensayo de eficacia del sistema seleccionado, tratando un mayor volumen de agua con una elevada carga de contaminante. En este ensayo la eliminación de hidrocarburos en agua se situó en ratios superiores al 99% tras 8 ciclos de recirculación, lo que evidenció la degradación de los mismos por parte de la microbiota presente en el agua. Además también se produjo una absorción de hidrocarburos en el soporte Paño Sentec®, los cuales sufrieron un proceso de biodegradación, la cual comenzó a ralentizarse a partir del 5º-6º mes; el hecho de que

la degradación se vaya ralentizando se ha observado en otros trabajos de investigación (Frutos et al., 2012). La evolución de la concentración de las distintas fracciones de hidrocarburos nuevamente reflejó dicho proceso de degradación microbiana. Todo ello demuestra la eficacia del sistema biorreactor de flujo vertical empleando como material absorbente el material absorbente Paño Sentec®. Esta eficacia fue el motivo del diseño de la instalación a escala de planta piloto.

En cuanto a los ensayos de “búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos”, a partir de los resultados obtenidos cabe destacar la cepa *Brevundimonas diminuta* como la única candidata entre las estudiadas a formar parte de un hipotético consorcio microbiano degradador de hidrocarburos. Empleando dicha cepa se redujo el contenido en TPH, así como de la fracción mayoritaria, los alcanos lineales c10-c20. Además mostró un buen crecimiento en las condiciones en las que se realizó el ensayo (Medio BH, 7 días, 140rpm y 30°C).

El resto de cepas no mostraron un buen crecimiento ni degradaron de forma eficaz los hidrocarburos presentes en el medio de cultivo, a pesar de ser bacterias aisladas a partir de soporte absorbentes contaminados con hidrocarburos. Sería interesante estudiar, en futuras investigaciones, si dichas bacterias de forma conjunta serían capaces de degradar hidrocarburos, ya que de forma aislada no fueron capaces, a excepción de *Brevundimonas diminuta* y en las condiciones de ensayo. En diversas publicaciones el investigador Yi-tang Chang destacó la capacidad degradadora de esta cepa (Chang et al., 2015, 2007, 2014)

También se podría ensayar la degradación de dichas cepas, por separado o de forma conjunta, modificando las condiciones de ensayo; entre dichas modificaciones también se plantea la encapsulación de dichas cepas como técnica para la supervivencia e inoculación efectiva en emplazamientos contaminados concretos.

Finalmente, los resultados obtenidos en la planta piloto no hicieron otra cosa que respaldar los resultados obtenidos y ya comentados en los ensayos a escala de laboratorio. La eficacia de la fase de tratamiento y de la configuración de flujo vertical empleando como material absorbente el “Rollo Sentec®” se puso de manifiesto de nuevo con reducciones del contenido de TPH en agua del 98%; cabe recordar que el soporte “Rollo Sentec®” es un soporte de fibra de polipropileno exactamente igual que el “Paño Sentec®” pero de mayores dimensiones y con forma de “rollo” en vez de rectangular.

En cuanto a la fase de biodegradación, en los absorbentes extraídos de los biorreactores 2 y 3 la existencia de un proceso de degradación biológica fue evidente, debido a la disminución de TPH y fracciones, así como por la evolución del índice c18/fitano. En el caso de los materiales extraídos de los biorreactores 1 y 4 dicha evidencia no fue tal, quizás por algún error a la hora de muestrear o simplemente hay que esperar a un tiempo más avanzado de la fase de biodegradación para poder constatar el hecho de que exista una biodegradación de los hidrocarburos absorbidos por parte de la microbiota adherida.

Por tanto, se puede afirmar que la tecnología desarrollada es un sistema eficaz para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos combinando la absorción y biodegradación de los mismos. No obstante será necesario optimizar diversos aspectos, ya mencionados con anterioridad a lo largo de este capítulo.

6. Conclusiones

1. Los materiales absorbentes seleccionados CorkSorb® 01025, Paño Sentec® y Cordón Sentec® mostraron una buena adherencia microbiana tanto por parte de la cepa preseleccionada *Pseudoalteromonas elyakovii* como por parte de la microbiota autóctona del agua contaminada.
2. La configuración de flujo horizontal mostró una desigual absorción de hidrocarburos debido a la existencia de canales preferenciales del agua provocados por el diseño de dicho biorreactor. En futuras investigaciones sería interesante rediseñar dicha configuración.
3. La configuración de biorreactor de flujo vertical empleando como material absorbente en su interior los materiales absorbentes mencionados mostró una mayor eficiencia en cuanto a eliminación de hidrocarburos, con tasas de reducción de TPH superiores al 90%, una eliminación de todas las fracciones de hidrocarburos transcurrido un solo ciclo de recirculación y sin que se produzca un desprendimiento de los mismos una vez absorbidos a los soportes.
4. La tecnología consistente en el biorreactor de flujo vertical empleando Paño Sentec® fue la que mostró resultados más satisfactorios, tanto en la fase de tratamiento en la que se obtuvo una reducción de TPH superior al 92% y una eliminación de todas las fracciones de hidrocarburos, como en la fase de biodegradación donde hubo una degradación de los hidrocarburos absorbidos hasta tal punto que transcurridos dos meses no se detectó ninguna fracción de hidrocarburos por cromatografía de gases/espectrometría de masas; la disminución del valor del índice c18/fitano evidenció este proceso de degradación microbiana.
5. El ensayo de eficacia del sistema de flujo vertical demostró la eficacia del proceso para tratar aguas contaminadas con hidrocarburos.
6. La cepa *Brevundimonas diminuta* fue la única entre las seleccionadas que mostró una capacidad de degradación de hidrocarburos por sí sola en las condiciones ensayadas. En futuras investigaciones sería interesante estudiar la capacidad de degradación de las cepas seleccionadas conjuntamente, al objeto de desarrollar consorcios
7. Los ensayos en planta piloto se desarrollaron de forma eficaz, obteniendo altos porcentajes de eliminación de hidrocarburos en agua. En cuanto a la

biodegradación de los hidrocarburos absorbidos, en dos de ellos se evidenció la existencia de un proceso de degradación microbiana, mientras que en otros dos no. En fases más avanzadas del proceso de biodegradación se verificará la biodegradación de los hidrocarburos retenidos.

8. La tecnología desarrollada es un sistema eficaz para el tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos combinando la absorción y biodegradación de los mismos

1. The selected sorbent materials CorkSorb® 01025, Pad Sentec® and Barrier Sentec® displayed good microbial adherence/adhesion both with the pre-selected strain, *Pseudoalteromonas elyakovii*, and with the autochthonous microbiota in the polluted water.
2. The horizontal flow setting displayed unequal absorption of hydrocarbons due to the existence of preferential water canals resulting from the design of said bioreactor. In future research, it would be interesting to redesign said setting.
3. The bioreactor vertical flow setting, using the above-mentioned materials inside as the absorbent material, displayed greater efficiency in the elimination of hydrocarbons, with a TPH reduction ratio above 90%, an elimination of all the hydrocarbons fractions after only one recirculation cycle and without detachment of these ones from the absorbent surface.
4. The technology consisting of the vertical flow bioreactor using Pad Sentec® showed the most satisfactory results, in the treatment phase in which a TPH reduction of more than 92% was achieved and elimination of all hydrocarbon fractions, as well as in the biodegradation phase in which there was degradation of the absorbed hydrocarbons to such an extent that after two months no fractions of hydrocarbons were detected with gas chromatography/mass spectrometry; the value decrease in the c18/fitano index was evidence of this microbial degradation proces.
5. The vertical flow system effectiveness assay showed the effectiveness of the process in treating hydrocarbon polluted waters.
6. The strain *Brevundimonas diminuta* was the only one amongst those selected that displayed hydrocarbons degradability by itself in the test conditions. In future research, it would be interesting to study the degradability of the selected strains together, with the aim of developing microbial consortia.
7. The pilot plant trials were carried out effectively, obtaining high percentages of hydrocarbon elimination in water. Regarding biodegradation of absorbed hydrocarbons, the existence of a microbial degradation process was reported in two carriers, while in the other two it was not. In more advanced phases of the bioremediation process the biodegradation of retained hydrocarbons will be verified.

8. The developed technology is an effective system for the treatment of hydrocarbon polluted waters, combining both absorption and biodegradation techniques.

7. Bibliografía

Abarian, M., Hassanshahian, M., and Badoei-Dalfard, A. (2016). Isolation, Screening, and Characterization of Naphthalene-Degrading Bacteria from Zarand Mine, Iran. *Polycycl. Aromat. Compd.* 1–10.

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., and Naidu, R. (2015). A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176, 670–699.

Abbasian, F., Lockington, R., Palanisami, T., Megharaj, M., and Naidu, R. (2016). Multiwall carbon nanotubes increase the microbial community in crude oil contaminated fresh water sediments. *Sci. Total Environ.* 539, 370–380.

Admon, S., Green, M., and Avnimelech, Y. (2001). Biodegradation Kinetics of Hydrocarbons in Soil during Land Treatment of Oily Sludge. *Bioremediation J.* 5, 193–209.

Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., and Temprano, F.J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2771–2779.

Al-Kharusi, S., Abed, R.M.M., and Dobretsov, S. (2016). Changes in respiration activities and bacterial communities in a bioaugmented oil-polluted soil in response to the addition of acyl homoserine lactones. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 107, 165–173.

Al-Majed, A.A., Adebayo, A.R., and Hossain, M.E. (2012). A novel sustainable oil spill control technology. *J Environ Manage.* 113, 213–227.

Asif, M., Grice, K., and Fazeelat, T. (2009). Assessment of petroleum biodegradation using stable hydrogen isotopes of individual saturated hydrocarbon and polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in oils from the Upper Indus Basin, Pakistan. *Org. Geochem.* 40, 301–311.

Atlas, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 180–209.

Avandeeva, O.P., Barenboim, G.M., Borisov, V.M., Saveka, A.Y., Stepanovskaya, I.A., and Khristoforov, O.B. (2014). A toxicity estimation system for individual hydrocarbons in the monitoring loop of emergency oil spills on water bodies. *Autom. Remote Control* 75, 2023–2033.

Azizan, N.H., Apun, K.A., Bilung, L.M., Vincent, M., Roslan, H.A., and Husaini, A.A.S.A.A. (2016). Crude oil bioremediation by indigenous bacteria isolated from oily sludge. *J. Teknol.* 78, 61–66.

Bakker, D.P., van der Plaats, A., Verkerke, G.J., Busscher, H.J., and van der Mei, H.C. (2003). Comparison of Velocity Profiles for Different Flow Chamber Designs Used in Studies of Microbial Adhesion to Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6280–6287.

Bao, M., Sun, P., Yang, X., Wang, X., Wang, L., Cao, L., and Li, F. (2014b). Biodegradation of marine surface floating crude oil in a large-scale field simulated experiment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 1948–1956.

Bartowsky, E.J., and Henschke, P.A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine -- a review. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 60–70.

Bayat, A., Aghamiri, S.F., Moheb, A., and Vakili-Nezhaad, G.R. (2005). Oil Spill Cleanup from Sea Water by Sorbent Materials. *Chem. Eng. Technol.* 28, 1525–1528.

Bazargan, A., Hui, C. W., and McKay, G. (2014). Marine residual fuel sorption and desorption kinetics by alkali treated rice husks. *Cellulose* 21(3), 1997-2006.

Beolchini, F., Rocchetti, L., Regoli, F., and Dell'Anno, A. (2010). Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: experimental analysis and kinetic modeling. *J. Hazard. Mater.* 182, 403–407.

Bhatnagar, A. (2012). *Application of Adsorbents for Water Pollution Control*. Bentham Science Publishers, USA.

Broje, V., and Keller, A.A. (2007). Effect of operational parameters on the recovery rate of an oleophilic drum skimmer. *J. Hazard. Mater.* 148, 136–143.

Calderón, K., González-Martínez, A., Gómez-Silván, C., Osorio, F., Rodelas, B., and González-López, J. (2013). Archaeal Diversity in Biofilm Technologies Applied to Treat Urban and Industrial Wastewater: Recent Advances and Future Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 18572–18598.

Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., García Fandiño, C., Laguna, J., and González-López, J. (2008). Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1493–1501.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., and González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Sci. Total Environ.* 407, 3634–3640.

Castro, A., Iglesias, G., Carballo, R., and Fraguera, J.A. (2010). Floating boom performance under waves and currents. *J. Hazard. Mater.* 174, 226–235.

Chandran, P., and Das, N. (2011). Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. *Biodegradation* 22, 1181–1189.

Chang, Y., Chou, H.-L., Chao, H.-P., and Chang, Y.-J. (2015). The influence of sorption on polyaromatic hydrocarbon biodegradation in the presence of modified nonionic surfactant organoclay. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 102, 237–244.

Chang, Y.-T., Lee, J.-F., and Chao, H.-P. (2007). Variability of communities and physiological characteristics between free-living bacteria and attached bacteria during the PAH biodegradation in a soil/water system. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 283–296.

Chang, Y.-T., Hung, C.-H., and Chou, H.-L. (2014). Effects of polyethoxylate lauryl ether (Brij 35) addition on phenanthrene biodegradation in a soil/water system. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 49, 1672–1684.

Chen, Q., Bao, M., Fan, X., Liang, S., and Sun, P. (2013). Rhamnolipids enhance marine oil spill bioremediation in laboratory system. *Mar. Pollut. Bull.* 71, 269–275.

Christofi, N., and Ivshina, I.B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915–929.

Cirer-Costa, J.C. (2015). Tourism and its hypersensitivity to oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* 91, 65–72.

Coll, M., Shannon, L.J., Kleisner, K.M., Juan-Jordá, M.J., Bundy, A., Akoglu, A.G., Banaru, D., Boldt, J.L., Borges, F.J., and Cook, A. (2016). Ecological indicators to capture the effects of fishing on biodiversity and conservation status of marine ecosystems. *Ecol. Indic.* 60, 947-962.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

Crisafi, F., Giuliano, L., Yakimov, M.M., Azzaro, M., and Denaro, R. (2016). Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAH-degrading marine bacterial consortium from Kongsfjorden (Arctic region). *Rend. Fis. Acc. Lincei.* 27, 261–270.

Das, N., and Chandran, P. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, e941810.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.

Dellagnezze, B.M., de Sousa, G.V., Martins, L.L., Domingos, D.F., Limache, E.E.G., de Vasconcellos, S.P., da Cruz, G.F., and de Oliveira, V.M. (2014). Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Mar. Pollut. Bull.* 89, 191–200.

Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., and Bisailon, J. (1996). Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908–1912.

Díaz, M.P., Grigson, S.J., Peppiatt, C.J., and Burgess, J.G. (2000). Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol. N. Y. N* 2, 522–532.

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

EPA. 1996. Nonhalogenated organics using GC/FID; Revision 2. EPA-8015B.

Ferreira, E.M., and Castro, I.V. e (2005). Residues of the Cork Industry as Carriers for the Production of Legume Inoculants. *Silva Lusit.* 13, 159–167.

Frutos, F.J.G., Pérez, R., Escolano, O., Rubio, A., Gimeno, A., Fernandez, M.D., Carbonell, G., Perucha, C., and Laguna, J. (2012). Remediation trials for hydrocarbon-contaminated sludge from a soil washing process: evaluation of bioremediation technologies. *J. Hazard. Mater.* 199–200, 262–271.

Ganesh Kumar, A., Vijayakumar, L., Joshi, G., Magesh Peter, D., Dharani, G., and Kirubakaran, R. (2014). Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresour. Technol.* 170, 556–564.

Gobierno de Canarias. (2005). Uso de absorbentes. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Dirección General del Medio Natural. Disponible en (http://www.gobiernodecanarias.org/dgse/descargas/pecmar/anejo_09/Doc_06%20Absorbentes.pdf).

Gómez, M.A., González-López, J., and Hontoria-García, E. (2000). Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter. *J. Hazard. Mater.* 80, 69–80.

Gómez-Villalba, B., Calvo, C., Vilchez, R., González-López, J., and Rodelas, B. (2006). TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 393–400.

González-Ramírez, A.I., Ramírez-Granillo, A., Medina-Canales, M.G., Rodríguez-Tovar, A.V., and Martínez-Rivera, M.A. (2016). Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC Microbiol.* 16, 243.

Grace Liu, P.-W., Chang, T.C., Whang, L.-M., Kao, C.-H., Pan, P.-T., and Cheng, S.-S. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 1119–1127.

Guibert, L.M., Loviso, C.L., Marcos, M.S., Commendatore, M.G., Dionisi, H.M., and Lozada, M. (2012). Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microb. Ecol.* 64, 605–616.

Guiñez, M., Martínez, L.D., Fernández, L., and Cerutti, S. (2017). Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and fluorescence detection for the determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Microchem. J.* 131, 1–8.

Guo, M., Gong, Z., Allinson, G., Tai, P., Miao, R., Li, X., Jia, C., and Zhuang, J. (2016). Variations in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial and agricultural soils after bioremediation. *Chemosphere* 144, 1513–1520.

Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 63–70.

Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A. (2004). Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 205–214.

Haritash, A.K., and Kaushik, C.P. (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.

Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., and Kariminik, A. (2013). Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Mar. Pollut. Bull.* 73, 300–305.

Hussein, M.S., and Muthanna, J.A. (2016). Fixed bed and batch adsorption of benzene and toluene from aromatic hydrocarbons on 5A molecular sieve zeolite. *Mater. Chem. Phys.* 181, 512–519.

de la Huz, R., Lastra, M., Junoy, J., Castellanos, C., and Viéitez, J.M. (2005). Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: Preliminary study of the “Prestige” oil spill. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 65, 19–29.

ITOPF. (2014). Eliminación de hidrocarburos y desechos. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited. Disponible en (http://www.itopf.com/uploads/translated/TIP9_SPDisposalofOilandDebris.pdf).

Juarez-Jimenez, B., Reboleiro-Rivas, P., Gonzalez-Lopez, J., Pesciaroli, C., Barghini, P., and Fenice, M. (2012). Immobilization of *Delftia tsuruhatensis* in macro-porous cellulose and biodegradation of phenolic compounds in repeated batch process. *J. Biotechnol.* *157*, 148–153.

Juhasz, and Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo a pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *45*, 57–88.

Jung, J., Choi, S., Hong, H., Sung, J.-S., and Park, W. (2014). Effect of red clay on diesel bioremediation and soil bacterial community. *Microb. Ecol.* *68*, 314–323.

Jurecska, L., Barkács, K., Kiss, É., Gyulai, G., Felföldi, T., Tör , B., Kovács, R., and Záray, G. (2013). Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. *Microchem. J.* *107*, 108–114.

Kensa, V.M. (1970). Bioremediation - an overview. *Control Pollut.* *27*, 161–168.

Kleindienst, S., Paul, J.H., and Joye, S.B. (2015). Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 388–396.

Krivorot, M., Kushmaro, A., Oren, Y., and Gilron, J. (2011). Factors affecting biofilm formation and biofouling in membrane distillation of seawater. *J. Membr. Sci.* *376*, 15–24.

Leahy, J.G., and Colwell, R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* *54*, 305–315.

Leyva-Díaz, J.C., González-Martínez, A., González-López, J., Muñío, M.M., and Poyatos, J.M. (2015). Kinetic modeling and microbiological study of two-step nitrification in a membrane bioreactor and hybrid moving bed biofilm reactor–membrane bioreactor for wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* *259*, 692–702.

Liebeg, E.W., and Cutright, T.J. (1999). The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *44*, 55-64.

Liu, Z., Liu, J., Zhu, Q., and Wu, W. (2012). The weathering of oil after the Deepwater Horizon oil spill: insights from the chemical composition of the oil from the sea surface, salt marshes and sediments. *Environ. Res. Lett.* *7*, 035302.

Lv, H., Lin, X., Su, X., and Zhang, Y. (2016). ¹⁴C Isotopes and microbial community structures as evidence for biodegradation in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Environ. Earth Sci.* *75*, 119.

MAPAMA. (2017). Impacto ambiental de los hidrocarburos y recuperación de los ecosistemas. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. Disponible en (http://www.mapama.gob.es/es/costas/temas/proteccion-medio-marino/plan-ribera/contaminacion-marina-accidental/impacto_ambiental.aspx).

Margesin, R., and Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *56*, 650–663.

Martínez-Checa, F. (1999). Características de los EPS producidos por *Halomonas eurihalina* con actividad emulgente sobre hidrocarburos derivados del petróleo. Tesis doctoral, Universidad de Granada.

McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., and Sanni, G.O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.* 8, 10.

McKew, B.A., Coulon, F., Osborn, A.M., Timmis, K.N., and McGenity, T.J. (2007). Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ. Microbiol.* 9, 165–176.

Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., and Lal, B. (2001). Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1675–1681.

Mohajeri L., Aziz, H.A., Isa, M.H., and Zahed, M.A. (2010). A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresour. Technol.* 101, 893-900.

Moreno, B., Gómez, M.A., González-López, J., and Hontoria, E. (2005). Inoculation of a submerged filter for biological denitrification of nitrate polluted groundwater: a comparative study. *J. Hazard. Mater.* 117, 141–147.

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

Muttin, F. Structural analysis of oil-spill containment booms in coastal and estuary waters. *Appl. Ocean Res.* 30, 107–112.

Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Norf, H., and Kalogerakis, N. (2013). Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 37–44.

Nolan, D.P. (2010). Handbook of Fire and Explosion Protection Engineering Principles: for Oil, Gas, Chemical and Related Facilities. William Andrew.

Obiri-Nyarko, F., Grajales-Mesa, S.J., and Malina, G. (2014). An overview of permeable reactive barriers for in situ sustainable groundwater remediation. *Chemosphere* 111, 243–259.

Ortega Romero, M. (2012). Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil. Tesis doctoral, E.T.S.I. Minas, Universidad Politécnica de Madrid.

Pandey, P., Pathak, H., and Dave, S. (2016). Microbial Ecology of Hydrocarbon Degradation in the Soil: A Review. *Res. J. Environ. Toxicol.* 10, 1–15.

Pasumarthi, R., Kumar, V., Chandrasekharan, S., Ganguly, A., Banerjee, M., and Mutnuri, S. (2014). Biodegradation of aliphatic hydrocarbons in the presence of hydroxy cucurbit[6]uril. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 148–154.

Percival, S.L., Malic, S., Cruz, H., and Williams, D.W. (2011). Introduction to Biofilms. In *Biofilms and Veterinary Medicine*, S. Percival, D. Knottenbelt, and C. Cochrane, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 41–68.

Perelo, L.W. (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard. Mater.* 177, 81–89.

Personna, Y.R., Boufadel, M.C., and Zhang, S. (2014). Biodegradation of Dispersed Endicott Oil in Controlled Experiments. *Int. Oil Spill Conf. Proc.* 2014, 1126–1140.

Pintor, A.M.A., Ferreira, C.I.A., Pereira, J.C., Correia, P., Silva, S.P., Vilar, V.J.P., Botelho, C.M.S., and Boaventura, R.A.R. (2012). Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: a review. *Water Res.* 46, 3152–3166.

Pruthi, V., and Cameotra, S.S. (1997). Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnol. Tech.* 11, 671–674.

Radwan, S.S., Al-Hasan, R.H., Salamah, S., and Al-Dabbous, S. (2002). Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50, 55–59.

Ramseur, J.L. (2007). *Oil Spills in U.S. Coastal Waters: Background, Governance, and Issues for Congress*. Congressional Research Service. Disponible en (<https://fas.org/sgp/crs/misc/RL33705.pdf>)

Rekadwad, B.N., and Khobragade, C.N. (2015). A case study on effects of oil spills and tar-ball pollution on beaches of Goa (India). *Mar. Pollut. Bull.* 100, 567–570.

Rodrigues, E.M., Kalks, K.H.M., Fernandes, P.L., and Tótola, M.R. (2015). Bioremediation strategies of hydrocarbons and microbial diversity in the Trindade Island shoreline--Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 517–525.

Rodríguez-Calvo, A., Silva-Castro, G.A., Uad, I., Robledo-Mahón, T., Menéndez, M., González-López, J., and Calvo, C. (2017). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* DOI:10.1016/j.ibiod.2017.03.031

Rodríguez-Chaves, D., Saravia-Arguedas, A., Pacheco-Urpí, O., and Piedra-Marín, G. (2014). Evaluación de los niveles de hidrocarburos en sedimentos marinos, su posible origen y efectos sobre la actividad de acuicultura entre punta morales y costa de pájaros en el golfo de Nicoya. *Rev. Geográfica América Cent.* 2, 113–134.

Rodríguez-Trigo, G., Zock, J.P., and Isidro, I. (2007). Health Effects of Exposure to Oil Spills. *Arch Bronconeumol.* 43(11), 628-635

Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., and Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb. Ecol.* 7, 235–243.

Röling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., and Head, I.M. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5537–5548.

Ros, M., Rodríguez, I., Garcia, C., and Hernandez, M. (2014). Bacterial community in semiarid hydrocarbon contaminated soils treated by aeration and organic amendments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 94, 200–206.

Rosenberg, M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol. Lett.* 262, 129–134.

Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33.

Salleh, A.B., Ghazali, F.M., Zaliha, R.N., Rahman, A., and Basri, M. (2003). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Pollution. *Indian J. Biotechnol.* 2, 411-425.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.

Shelton, J.L., McIntosh, J.C., Warwick, P.D., and McCray, J.E. (2016). Impact of formation water geochemistry and crude oil biodegradation on microbial methanogenesis. *Org. Geochem.* 98, 105–117.

Sherafatmand, M., and Ng, H.Y. (2015). Using sediment microbial fuel cells (SMFCs) for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresour. Technol.* 195, 122–130.

Silva-Castro, G.A., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., and Calvo, C. (2013). Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: assays in a pilot plant. *Sci. Total Environ.* 445–446, 347–355.

Silva-Castro, G.A., Rodriguez-Calvo, A., Laguna, J., González-López, J., and Calvo, C. (2016). Autochthonous microbial responses and hydrocarbons degradation in polluted soil during biostimulating treatments under different soil moisture. Assay in pilot plant. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 108, 91–98.

Singh, R., Singh, P., and Sharma, R. (2014). Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* 4, 1.

Soliman, R.M., El-Gendy, N.S., Deriase, S.F., Farahat, L.A., and Mohamed, A.S. (2014). The Evaluation of Different Bioremediation Processes for Egyptian Oily Sludge Polluted Soil on a Microcosm Level. *Energy Sources Part A: Recovery Util. Environ. Eff.* 36, 231–241.

Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., and Harayama, S. (1996). Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. *Environ. Sci. Technol.* 31, 45-51.

Sutherland, I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol.* 8, 143–213.

Tanase, A.M., Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., and Stoica, I. (2013). Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84, 150-154.

Ten Haven, H.L., Rullkötter, J., De Leeuw, J.W., and Damsté, J.S.S. (1988). Pristane/phytane ratio as environmental indicator. *Nature* 333, 604–604.

Townsend, G.T., Prince, R.C., and Suflita, J.M. (2004). Anaerobic biodegradation of alicyclic constituents of gasoline and natural gas condensate by bacteria from an anoxic aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 129–135.

Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., and de Carvalho, C.C.C.R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22, 231–241.

Uad, I. (2012). Caracterización fisiológica y molecular de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de fondos marinos (del Prestige). Tesis doctoral, Universidad de Granada.

USDA. (2008). Design guide for oil spill prevention and control at substations. United States Department of Agriculture, Rural Development Utilities Programs. BULLETIN 1724E-302. Disponible en (https://www.rd.usda.gov/files/UEP_Bulletin_1724E-302.pdf).

Van Hamme, J.D., Singh, A., and Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 503–549.

Vanysacker, L., Denis, C., Declerck, P., Piasecka, A., and Vankelecom, I.F.J. (2013). Microbial Adhesion and Biofilm Formation on Microfiltration Membranes: A Detailed Characterization Using Model Organisms with Increasing Complexity. *BioMed Res. Int.* 2013.

Varjani, S.J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 223, 277–286.

Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *J. Microbiol. Exp.* 1(3).

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73, 1163–1172.

Vieira, P.A., Vieira, R.B., de França F.P., and Cardoso, V.L. (2007). Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J. Hazard. Mater.* 140 (1-2), 52-59.

Vilar, V., Ferreira, C., Pereira, J., Pintor, A., Botelho, C., Martins, R., Órfão, J., Boaventura, R., Correia, P., and Silva, S. (2012). Utilização de resíduos ou subprodutos de cortiça para a eliminação de óleos e gorduras de águas. Encontro Bras. Sobre Adsorção EBA9 E Congr. Ibero-Am. Sobre Adsorção IBA1.

Vyas, N., Sammons, R.L., Addison, O., Dehghani, H., and Walmsley, A.D. (2016). A quantitative method to measure biofilm removal efficiency from complex biomaterial surfaces using SEM and image analysis. *Sci. Rep.* 6, 32694.

Ward, O., Singh, A., and Van Hamme, J. (2003). Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 260–270.

Wei, Q.F., Mather, R.R., Fotheringham, A.F., and Yang, R.D. (2003). Evaluation of nonwoven polypropylene oil sorbents in marine oil-spill recovery. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 780–783.

Whiteley, C.G., and Lee, D.-J. (2015). Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol. Adv.* 33, 124–141.

Widdel, F., and Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 259–276.

Wu, M., Dick, W., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., and Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Amp Biodegrad.* 107, 158–164.

Yoo, S.-Y., Daud, W.M.A.W., and Lee, M.-G. (2012). Preparation of a biodegradable oil absorber and its biodegradation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 283–288.

Zamani, M.M., Fallahpour, M., Harvani, G.Y., Aghmiuni, S.K., Zamani, M., Tehrani, D.M., and Firrozabadi, G.S. (2014). Recent Proportionate Treatment Methods for Crude Oil Contamination Evaluation of the Tehran Refinery Site Soil. *Thrita* 3.

Zhang, Y., Yang, X., Gu, C., Wang, F., Bian, Y., Song, Y., Wang, D., and Jiang, X. (2016). A novel bioaccessibility prediction method for PAHs in soil: Composite extraction with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and extracellular polymer substances. *Sci. Total Environ.* 569-570, 997-1003.

Zhao, X., Gong, Y., O'Reilly, S.E., and Zhao, D. (2015). Effects of oil dispersant on solubilization, sorption and desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment–seawater systems. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 160-169.

Zhou, D., Hai, R., and Wang, W. (2013). Novel Complex Fiber Biofilm Carrier in an Anaerobic/Anoxic/Oxic Reactor for Sewage Mixture Treatment. *Asian J. Chem.* 25, 6943–6947.

