

UNIVERSIDAD DE GRANADA
INSTITUTO DEL AGUA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



Biorremediación
en Habitats contaminados con hidrocarburos.
Estudio de los parámetros Indicadores de la viabilidad
de los procesos de biorremediación.

Tesis Doctoral
Gloria Andrea Silva Castro

Universidad de Granada 2011

UNIVERSIDAD DE GRANADA
INSTITUTO DEL AGUA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**Memoria presentada por la Ingeniera Química Dña. *Gloria Andrea Silva Castro*
para aspirar al grado Doctor por la Universidad de Granada**

VºBº los Directores:

Fdo. Dña. Concepción Calvo Sainz
Catedrática de Universidad
Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

Fdo. D. Jesús González López
Catedrático de Universidad
Dpto. de Microbiología
Universidad de Granada

La Doctoranda

Fdo. *Gloria Andrea Silva Castro*

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Gloria Andrea Silva Castro
D.L.: GR 1148-2012
ISBN: 9788469510469

Durante esta tesis doctoral se han realizado las siguientes publicaciones:

Artículos

I. Uad, G.A. Silva-Castro, C. Pozo; J. González-López; C. Calvo. 2010. Biodegradative potential and Characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediments and fuel extracted at 4000 m depth (Prestige Wreck). International Biodeterioration and Biodegradation. 64: 511-518.

C., Calvo, M. Manzanera; G.A. Silva-Castro; I. Uad; J. González-López. 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of the Total Environment. 407: 3634-3640.

C. Calvo, G.A. Silva-Castro; I. Uad; C. Garcia Fandiño; J. Laguna; J. González-López. 2008. Efficiency of the EPS emulsifier produced by Ochrobactrum anthropi in different hydrocarbons bioremediation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1493-1501.

Capítulos de Libro

C. Calvo, G.A. Silva-Castro, I. Uad, M. Manzanera, C. Perucha, J. Laguna, J. González-López J. 2010. Biostimulation combined treatments for remediation of diesel contaminated soil. In: Environmental Toxicology III. (Eds V. Popov and C.A. Brebbia) ISBN: 978-1-84564-438-3. WITpress. Southampton. UK.

C. Calvo, G.A. Silva-Castro; I. Uad; J. González-López. 2008. When can surfactants enhance hydrocarbons biodegradation in oil biotreatments?. Environmental Toxicology II (Eds A.G. Kungolos, C.A. Brebbia, M. Zamorano) ISBN: 978-1-84564-114-6. WITpress. Southampton. UK.

CONTENIDO

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	9
I.1. BIORREMEDIACIÓN	10
I.1.1. Factores físico-químicos	12
I.1.2. Características físico-químicos de los hidrocarburos (TPH).....	15
I.1.3. Factores biológicos.....	20
I.2. DEGRADACIÓN MICROBIANA	21
I.2.1. Degradación aeróbica de hidrocarburos alifáticos	23
I.2.2. Degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos.....	24
I.2.3. Degradación anaeróbica de hidrocarburos	26
I.3. TECNOLOGÍAS UTILIZADAS EN LA ELIMINACIÓN DE HIDROCARBUROS	27
I.3.1. Atenuación natural.....	28
I.3.2. Técnicas de Biorremediación	28
I.3.2.1. Biopilas	30
I.3.2.2. Compostaje.....	31
I.3.2.3. Land-Farming	31
I.3.2.4. Biorreactores	32
I.3.2.5. Bioventing: Air sparging.....	32
I.3.2.6. Fitorremediación	33
I.3.3. Tecnologías Físicas	33
I.3.3.1. Extracción con solventes.....	33
I.3.3.2. Incineración	33
I.3.3.3. Desorción térmica.....	34
I.3.4. Tecnologías químicas	34
I.3.4.1. Oxidación química	34
I.3.4.2. Fotocatálisis.....	34
I.3.4.3. Remediación electrocinética.....	35
I.3.5. Integración de tecnologías.....	35
I.3.5.1. Tratamiento físico-químico.....	35
I.3.5.2. Tratamiento físico-biológico.....	36
I.3.5.3. Tratamiento biológico-químico.....	36
II. OBJETIVOS.....	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
III.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES DE INICIO	46
III.1.1. Suelos.....	46
III.1.2. Contaminante	47

III.1.3.	Productos para la biorremediación.....	47
III.2.	ESTUDIO DE INDICADORES DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN	48
III.2.1.	Ensayos en matraces. PRIMERA FASE.....	48
III.2.2.	Ensayos en microcosmos edáficos. SEGUNDA FASE	51
III.3.	ENSAYOS EN PLANTA PILOTO. TERCERA FASE.....	53
III.4.	ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	56
III.4.1.	Análisis microbiológicos y biológicos	56
III.4.1.1.	Recuento Total de Bacterias Heterótrofas y degradadoras de hidrocarburo	56
III.4.1.2.	Actividad deshidrogenasa	56
III.4.1.3.	Producción de CO ₂	57
III.4.2.	Análisis de Biodiversidad.....	57
III.4.3.	Análisis físico-químicos.....	62
III.4.3.1.	Humedad	62
III.4.3.2.	TPH.....	62
III.4.3.3.	Fracción de hidrocarburos y biomarcadores	63
III.4.4.	Análisis estadístico	63
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
IV.1.	ENSAYOS DE BIOTRATABILIDAD EN MATRACES. FASE I.....	68
IV.1.1.	Evolución de los parámetros microbiológicos durante el tratamiento	68
IV.1.2.	Degradación de Hidrocarburos.....	82
IV.1.3.	Interdependencia entre los parametros biológicos y químicos.....	85
IV.2.	ENSAYO EN MICROCOSMOS EDÁFICOS. (FASE II).....	87
IV.2.1.	Evolución de los parámetros microbiológicos y biológicos	87
IV.2.2.	Comportamiento de los parámetros químicos.....	91
IV.2.3.	Relación entre los resultados obtenidos en los estudios de biotratabilidad.....	94
IV.3.	ENSAYO EN PLANTA PILOTO (FASE III).....	97
IV.3.1.	Resultados de los parámetros microbiológicos	97
IV.3.2.	Comportamiento de los parametros químicos.....	105
IV.3.3.	Relación paramentros biológicos y químicos con los tratamientos utilizados.....	110
IV.3.4.	Análisis de la biodiversidad en la planta piloto con los disitintos tratamientos	117
IV.3.4.1.	Estudio de las poblaciones microbianas	123
IV.3.5.	Influencia de los tratamientos de bioestimulación sobre la diversidad microbiana.	126
V.	CONCLUSIONES.....	139
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS		
PUBLICACIONES		

ABREVIATURAS

Koc: coeficiente de adsorción en el suelo

Kd: el coeficiente de distribución

foc: coeficiente de distribución de carbono orgánico

Kow: coeficiente de reparto

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (Polycyclic aromatic hydrocarbons)

TPH: Hidrocarburos totales del petróleo

UFC: Unidades formadores de colonias

Z.sup: Zona superficial

ZNS: Zona no saturada

ZS: Zona saturada

TPF: Trifenil formazán

TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis

Pr: Pristano 2,6,10,14-tetrametilpentadecano

Fi: Fitano 2,6,10,14-tetrametilhexadecano

n-C₁₇ : Heptadecano

n-C₁₈ : Octadecano

IDM: Impacto en la Diversidad Microbiana

RESUMEN

La biorremediación es una tecnología que estimula la actividad microbiana y en consecuencia acelera el proceso natural de degradación de un compuesto contaminante. Las prácticas vigentes de extracción, procesamiento, almacenamiento, transporte y distribución de hidrocarburos del petróleo han causado y causan daños al suelo, agua y al aire prácticamente en todos los sitios de nuestro planeta. A esto se suma los inevitables derrames accidentales, tanto pequeños como de gran escala. Por estas razones la aplicación de un proceso de biorremediación podría ser una técnica viable frecuente, sencilla y económica.

Un proceso de biorremediación exitoso requiere optimizar el tipo de fuente de nutrientes a utilizar, la concentración a la que se adiciona y su permanencia en el sistema y por otro lado, la influencia de estos tratamientos en los microorganismos autóctonos del hábitat a tratar. Para ello este proyecto pretende generar una base amplia de conocimientos que permita evaluar los factores físico-químicos y biológicos implicados en el biotratamiento suelos, decidir la idoneidad del tratamiento y, de ser adecuado, definir como llevarlo a cabo.

En una primera etapa de ensayos a escala de laboratorio se valoraron la influencia del tipo de contaminante y de su concentración, así como el comportamiento de suelos contaminados en su origen en la cinética de biodegradación de los hidrocarburos, tras el tratamiento con distintos agentes bioestimulantes. Seguidamente en una segunda etapa se seleccionaron las condiciones más representativas de una biorremediación efectiva, en una serie de microcosmos edáficos más próximos a la realidad.

Tras la evaluación de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se seleccionaron las condiciones óptimas de diseño y construcción de un sistema a escala de planta piloto, al objeto de evaluar en una situación comparable con una biorremediación real, la biotratabilidad de un suelo contaminado con un determinado tipo de hidrocarburos. Finalmente se ha realizado el estudio de la diversidad microbiana de los tratamientos aplicados en la planta piloto par ver su influencia en la comunidad bacteriana.

The background of the page is a brown, textured surface, possibly a piece of paper or fabric, with a mottled appearance. Overlaid on this background are several white, hand-drawn geometric shapes, primarily hexagons and pentagons, some of which are interconnected to form a network-like structure. The lines are thin and slightly irregular, suggesting they were drawn with a marker or fine pen.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos, por derrames de hidrocarburos del petróleo y sus derivados es uno de los problemas medioambientales más importantes en la actualidad. Los hidrocarburos son altamente tóxicos constituyendo un mayor riesgo potencial para la salud, cuanto mayor sea su resistencia a la degradación [Alexander, 1999].

En el caso del suelo, la contaminación por hidrocarburos provoca la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica y diversidad poblacional de la fauna y la biota microbiana, y la contaminación de aguas subterráneas y superficiales. En las plantas, los hidrocarburos pueden dañar las membranas celulares, reducir el transporte metabólico y la velocidad de respiración, así como reducir tanto el intercambio de gases y agua a nivel radicular como la absorción de nutrientes. Además de este impacto ambiental negativo, la contaminación con hidrocarburos genera un importante impacto de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado [Chaineau et al. 1997].

En general, el origen de la contaminación puede estar asociado a los tanques de almacenamiento debido al deterioro y perforación de los mismos, a desperfectos en el casco de los petroleros o al transporte de los productos por rotura de oleoductos, accidentes de camiones cisterna, encallado de los buques, incendios o colisiones [Atlas et al. 1995].

La ejecución de las actividades de remediación plantea retos importantes en el ámbito de las políticas públicas. El cambio de percepción de la opinión pública y de los medios de comunicación es un factor importante y por lo tanto es necesaria una comunicación eficaz sobre las intenciones, expectativas y las decisiones. Por ello el conocimiento de los factores que afectan el proceso de biorremediación, y el establecimiento de indicadores que permitan vincular las características específicas de la zona a tratar y la metodología de biorremediación eficaz basada en el conocimiento científico, dotará al gestor público de herramientas válidas para la toma de decisiones y al mismo tiempo ayudará a una mejor información del público en general. La degradación de hidrocarburos por la microbiota autóctona o atenuación natural puede incrementarse mediante la adición de distintos tipos de productos

denominados agentes bioestimulantes y que según las características del contaminante y de la zona a descontaminar tienen distintas propiedades, así pueden utilizarse nutrientes inorgánicos, surfactantes, oxidantes químicos etc. No obstante la primera actuación ante un derrame o contaminación por un crudo debe ser la caracterización específica de la zona contaminada, las características del contaminante, el nivel de contaminación y la determinación de los parámetros que permitan un buen control de la técnica de biorremediación en experimentos controlados. Existen fuertes evidencias que demuestran que hay una respuesta “específica de sitio” a los tratamientos de remediación de forma que determinadas intervenciones producen un importante efecto sobre un determinado ecosistema; mientras no ejerce ningún efecto en otros.

El tiempo que transcurre desde que se produce la contaminación hasta su detección, es esencial para definir la forma de actuar. Entre las técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un emplazamiento con hidrocarburo, cabe mencionar el uso de los procesos naturales de degradación biológica que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y que se pueden realizar con un bajo coste. Los tratamientos de biorrecuperación de sistemas contaminados con derivados del petróleo son posibles gracias a la biodegradabilidad de los hidrocarburos que lo componen y al hecho de que los microorganismos degradadores pueden ser enriquecidos en la mayoría de los ambientes o sistemas. El incremento de la microbiota y de su actividad acelera la degradación, razón por la cual un procedimiento que incremente el número de microorganismos autóctonos y su actividad debe considerarse como una herramienta útil para realizar un proceso de biorrecuperación [Atlas et al. 1992].

1.1. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una biotecnología que estimula la actividad microbiana y en consecuencia acelera el proceso natural de degradación del compuesto contaminante. Puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización, es decir, que el compuesto se transforme en CO₂, H₂O y otras formas inorgánicas, una biotransformación o transformación parcial, una humidificación de residuos o agentes contaminantes, o una alteración del estado redox de los metales. Por tanto, se refiere a la transformación química de los contaminantes mediante el uso de

microorganismos que satisfacen sus requerimientos nutricionales y energéticos contribuyendo a la desintoxicación del ambiente por mineralización o co-metabolismo [EPA 2003]. Es una técnica desarrollada entre los años 80 y 90, la cual ha sido aplicada en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Los tratamientos biológicos de degradación en suelos pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son optimizadas [Álvarez et al. 2001].

La vía aeróbica es la estrategia más efectiva para la biorremediación. Los pasos iniciales en el catabolismo de los hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por bacterias y hongos supone la oxidación del sustrato por oxigenasas para lo que se requiere oxígeno molecular. Por lo tanto, son necesarias condiciones aeróbicas para esta ruta de degradación de los hidrocarburos por los microorganismos.

La vía anaeróbica es un proceso metabólico generador de energía en el cual se origina la oxidación del sustrato por la transferencia de los electrones a un aceptor exógeno de electrones distinto del oxígeno. Los aceptores finales de electrones son: nitratos, nitritos, sulfatos, carbonatos y compuestos orgánicos. En la tabla I.1 se muestran las posibles reacciones y su factor de utilización que relaciona la cantidad de sustrato necesaria para producir un gramo de los aceptores finales.

Tabla I.1. Reacciones de degradación aerobia y anaerobia.

DEGRADACIÓN AEROBIA	
Reacción	Factor de utilización
Sustrato + O₂ → CO₂ + H₂O + biomasa	3,14 g BTEX /g O ₂
DEGRADACIÓN ANAEROBIA	
Sustrato + NO₃⁻ + H⁺ → CO₂ + 2N₂ + H₂O + biomasa	4,9 g BTEX /g NO ₃ ⁻
Sustrato + Fe(OH)₃ + H⁺ → CO₂ + Fe²⁺ + H₂O + biomasa	21,8 g BTEX /g Fe ²⁺
Sustrato + SO₄²⁻ + H⁺ → CO₂ + HS⁻ + H₂O + biomasa	4,7 g BTEX /g SO ₄ ²⁻
Sustrato → CH₃COOH → CH₄ + CO₂ + biomasa	0,78 g BTEX /g CH ₄

I.1.1. FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS

Para que las bacterias puedan eliminar de forma eficaz, las sustancias químicas de un ecosistema contaminado, éste debe tener unas condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de la actividad microbiana. Esas condiciones óptimas permitirán que las bacterias crezcan, se multipliquen, y asimilen las sustancias químicas. Cuando las condiciones no son las adecuadas, las bacterias crecen lentamente, mueren, o incluso pueden originar sustancias químicas más tóxicas [Higuera *et al.* 1991]. Es así como la concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por factores fisicoquímicos y biológicos [Maroto *et al.* 2001; Martínez *et al.* 2005]. A continuación se describen algunos de estos factores.

Contenido de Humedad: Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Por otra parte, un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. En general, el suelo debe estar húmedo, pero no excesivamente mojado ni encharcado. El rango de humedad deseable está entre el 40 y el 85 % de la capacidad de campo del suelo o entre el 12 y el 30 % en peso [Menn *et al.* 2000].

pH del suelo: Afecta significativamente a la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo, el pH también afecta directamente a la solubilidad del fósforo y al transporte de diferentes sustratos en el suelo [Admón *et al.* 2001].

Aceptores de electrones: la oxidación biológica de la materia orgánica en los procesos respiratorios requiere de la presencia de aceptores de electrones, que preferentemente es el oxígeno. La disponibilidad de oxígeno en el suelo depende de la tasa de consumo del mismo por los microorganismos, el tipo de suelo, su saturación en agua y la presencia de otros sustratos utilizables que provoquen el agotamiento del oxígeno. Es común que en una zona contaminada intervengan varios aceptores de electrones según transcurre espacial y temporalmente el proceso, por consiguiente los hidrocarburos también se degradarán por vías

anaeróbicas pero a tasas muy inferiores a la degradación aeróbica. [Maroto et al. 2001]

Concentración de nutrientes: Los microorganismos necesitan nutrientes inorgánicos, principalmente nitrógeno y fósforo para mantener el crecimiento celular y la biodegradación. En algunos casos estos nutrientes se encuentran en cantidades suficientes en el suelo de forma natural pero en otros casos es necesario aportarlos para mantener las poblaciones bacterianas. Sin embargo, cantidades excesivas de ciertos nutrientes, como por ejemplo fósforo y sulfato, pueden afectar negativamente al metabolismo microbiano. La relación óptima carbono: nitrógeno: fósforo, está entre 100:10 :1. [King et al. 1998].

Cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes inorgánicos se suelen producir un incremento en la relación carbono: nitrógeno C:N y/o carbono: fósforo C:P, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano. Es bien conocido que la disponibilidad de nitrógeno y fósforo limita la degradación microbiana de hidrocarburos. De esta manera, el ajuste de estas proporciones mediante la adición de los nutrientes en forma de fertilizantes estimulará la biodegradación [Swannell et al. 1996].

Una aproximación conservadora de la cantidad de nitrógeno y fósforo necesario para la óptima degradación de los productos del petróleo puede calcularse asumiendo que la masa total de hidrocarburos en el suelo representa la masa total de carbono disponible para la biodegradación. Esta simplificación es válida debido a que el contenido en carbono de los hidrocarburos del petróleo es en general aproximadamente del 90 % en peso.

Temperatura: La temperatura es un parámetro fundamental a considerar en la biorremediación, la actividad microbiana del suelo disminuye a temperaturas por debajo de 10°C y suele cesar por debajo de 5°C. La actividad microbiana de la mayoría de las bacterias implicadas en la biodegradación de petróleo también disminuye a temperaturas por encima de 45°C. Por otra parte, tanto la biodisponibilidad como la solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos dependen de la temperatura. Un incremento de temperatura provoca un descenso

de la viscosidad y, por tanto, afecta el grado de dispersión y al aumento de las tasas de difusión de los compuestos orgánicos. Además, las bajas temperaturas impiden la volatilización de alcanos de cadena corta ($< C_{10}$), por lo que aumenta su solubilidad en la fase acuosa y su toxicidad, lo cual puede ralentizar el proceso de degradación [Delille et al. 2004]

Textura o granulometría del suelo: La textura del suelo afecta la oxigenación, distribución de nutrientes y contenido de humedad debido a la permeabilidad de los suelos, razón por la cual puede ser uno de los factores que puede determinar la efectividad de un biotratamiento. La baja permeabilidad o la variación de la permeabilidad en diferentes capas del suelo, pueden afectar a los procesos de biorremediación. No existe una textura idónea para la biorremediación por lo que, salvo que el suelo sea extremadamente arcilloso o extremadamente arenoso, no es un parámetro que descarte la posibilidad de realizar un procedimiento de biorremediación, aunque obviamente sí condiciona el tipo de tratamiento.

Una textura más arenosa favorece la oxigenación, facilita la biodisponibilidad de los contaminantes, el movimiento de tierras y la obtención de muestras representativas. Por el contrario, requiere un riego más abundante y frecuente ya que retiene menos la humedad, y más aplicaciones de nutrientes que podrían perderse por la lixiviación y escorrentía. Las texturas finas con alto contenido en arcillas son problemáticas debido a que este tipo de suelo pueda permanecer con un contenido de agua excesivo durante largos periodos de tiempo después de producirse una precipitación, también presentan una deficiente aireación. La homogeneidad del suelo puede afectar al uso de las tecnologías tales como la extracción con vapor y la biodegradación.

Por otro lado cuando en un suelo existen capas de arcilla y arena se pueden originar canales preferenciales que dificultan el proceso de la biorremediación. La heterogeneidad en un suelo y en los contaminantes puede determinar ciertas dificultades en los tratamientos de biodegradación produciendo que las tasas de eliminación sean inadecuadas [Dragun et al. 1998].

Las condiciones óptimas para la degradación de contaminantes se resumen en la siguiente tabla [Vidali. 2011]

Tabla I.2. Condiciones optimas de los parámetros físico químicas que afectan en un proceso de degradación

PARÁMETROS	CONDICIONES REQUERIDAS PARA LA ACTIVIDAD MICROBIANA	VALORES ÓPTIMOS PARA LA DEGRADACIÓN
Humedad del suelo	25-28 % de la capacidad de campo	20 -80 %
pH del suelo	5,5 – 8,8	6,5 – 8,0
Contenido de nutrientes	Nitrógeno y fósforo para el crecimiento microbiano	C:N:P = 100:10:1
Temperatura (°C)	15-45	20-30

I.1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS HIDROCARBUROS (TPH)

El petróleo es un combustible natural compuesto de varios tipos de hidrocarburos que contienen básicamente, un 84-87% de carbono, 11-14% de hidrogeno, 0-8% de azufre y de un 0-4% de oxigeno y/o nitrógeno. Estas moléculas forman cadenas de átomos de carbono largas o cortas dando origen a diferentes tipos de hidrocarburos que se dividen y purifican en distintas fracciones. La composición de las fracciones químicas del petróleo se muestra en la siguiente tabla (Tabla I.3).

Tabla I.3. Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.

FRACCIÓN	COMPOSICIÓN
Saturados	n-alcanos, alcanos de cadena ramificada e isoprenoides, cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos
Aromáticos	Hidrocarburos mono aromáticos, di aromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas.
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, acidos grasos, fenoles polihidratados.

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en familias que poseen el mismo tipo de enlace, obteniendo el siguiente esquema (Figura I.1).

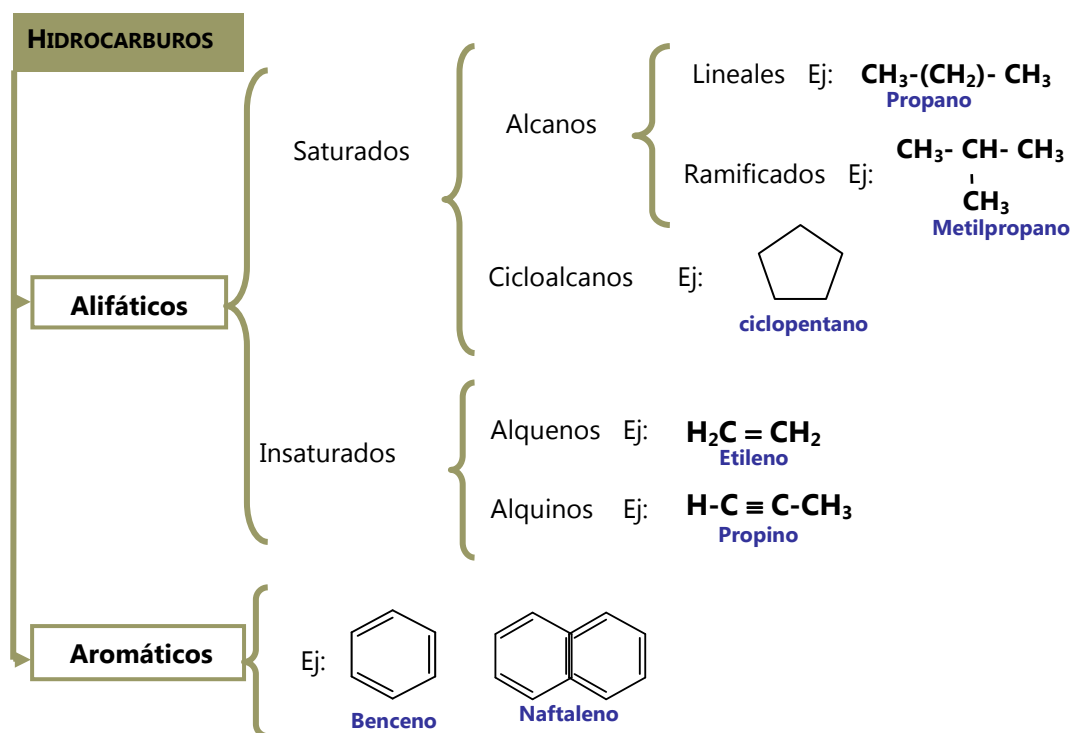


Figura I.1. Esquema de la clasificación de los hidrocarburos

Los factores más importantes a tener en cuenta en la caracterización de un hidrocarburo y que pueden influir en su tasa de degradación son: la estructura química, volatilidad, densidad, viscosidad, solubilidad, polaridad, toxicidad, dispersión y difusión.

La estructura química:

La estructura de la cadena carbonada y el peso molecular está directamente relacionada con el tiempo de degradación. Al respecto se ha observado que los componentes saturados del crudo (alcanos y cicloalcanos) y, particularmente, los alcanos de cadenas intermedias ($\text{C}_{10}\text{-C}_{20}$) se degradan fácilmente. Los alcanos de cadena corta son más volátiles, mientras que los de cadena larga ($\text{C}_{20}\text{-C}_{40}$) son sólidos hidrófobos difíciles de degradar por su baja solubilidad y biodisponibilidad. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos se degradan muy lentamente, posiblemente por su baja solubilidad, su naturaleza inhibitoria y la elevada energía de resonancia de sus estructuras [Sugiura et al. 1997]. Por otra parte, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) suelen estar vinculados con metales pesados, hidrocarburos clorados y otros compuestos tóxicos. Estos productos citotóxicos, carcinogénicos y

mutagénicos son un riesgo para la salud y presentan, además, un gran interés medioambiental [Déziel *et al.* 1996]. Los HAP constituyen una importante fracción de los hidrocarburos del petróleo y están considerados entre los principales contaminantes en medios acuáticos y suelos [Calvo *et al.* 2004].

Volatilidad: Los productos del petróleo generalmente tienen una importante fracción volátil, como es el caso de las gasolinas. La volatilización es el proceso en el cual un contaminante se difunde desde la fase líquida a la fase gaseosa. La velocidad de este proceso en el suelo está en función de su concentración, presión de vapor y solubilidad. La humedad, la temperatura, la porosidad y el contenido de materia orgánica y arcillas del suelo igualmente influirán en la volatilización del compuesto ó, de lo contrario, en su retención en las fases sólida ó líquida del suelo. En términos generales se podría resumir respecto a la volatilidad que para los compuestos orgánicos, como es el caso de los hidrocarburos:

- Un compuesto químico con una presión de vapor baja, alta capacidad de adsorción o alta solubilidad en agua es menos propenso a volatilizarse (principalmente compuestos orgánicos de alto peso molecular). Un compuesto químico con una presión de vapor alta, baja capacidad de adsorción o baja solubilidad en agua es más propenso a volatilizarse.[FRTF. 2005].

Densidad: La densidad de los hidrocarburos determina la tendencia de los mismos a acumularse de forma preferente en la zona saturada o en la no saturada. En general, los hidrocarburos del petróleo tienen densidades entre 0.75 y 0.99 g/cm³, lo cual hace que los hidrocarburos tiendan a permanecer sobre el nivel freático siempre que no sean solubles. Este factor debe ser por tanto considerado a la hora de elaborar un proyecto en un hábitat impactado por hidrocarburos [API 1996, Mercer *et al.* 1990].

Viscosidad: Este parámetro es una medida de la resistencia interna de una sustancia a fluir en otra. Los materiales altamente viscosos no fluyen rápidamente, mientras que los más livianos y menos viscosos, como el agua, pueden desplazarse más fácilmente. La viscosidad de un fluido tiende a decrecer conforme aumenta la temperatura a la que está expuesto. La viscosidad constituye una propiedad significativa del contaminante, ya que determina, en parte, su percolación en el

suelo. Los hidrocarburos de baja viscosidad son transportados a través del suelo y la zona no saturada con mayor facilidad que los de mayor viscosidad. Desde el punto de vista de la biorremediación, los hidrocarburos menos viscosos y por tanto más fácilmente movilizables, son generalmente más fácilmente recuperables de la zona no saturada que aquellos más viscosos [King et al. 1998].

Solubilidad: Representa la concentración máxima de un compuesto que se puede disolver en agua en condiciones de equilibrio. Desde el punto de vista de la biorremediación, es la característica más importante, dado que de ésta va a depender la movilidad, la estabilidad, la acumulación, y la concentración presente en el ambiente. La solubilidad de los hidrocarburos en el medio ambiente varía de acuerdo con sus características químicas y físicas; la solubilidad influye de manera determinante en su transporte hacia zonas profundas.

Un contaminante químico altamente soluble en agua es propenso a ser biodegradado y metabolizado por los microorganismos del suelo. Un contaminante químico poco soluble en agua tiene más probabilidad de ser inmovilizado mediante adsorción, por lo que será, más acumulativo, más persistente en los compartimentos ambientales, y poco o ligeramente propenso a biodegradarse. La solubilidad en agua del compuesto químico se ha relacionado con el coeficiente de adsorción del suelo y/o sedimento, mediante el coeficiente de reparto Kow [FRTR, 2005].

La Kow, es una medida de la hidrofobicidad de un compuesto y se define como la relación entre la concentración de un compuesto químico en la fase octanol y la concentración del mismo compuesto en la fase acuosa en un sistema de dos fases octanol/agua. El significado físico de la Kow es la tendencia de un compuesto químico a distribuirse entre una fase orgánica y una fase acuosa y proporciona una estimación de la posible distribución del contaminante entre el suelo (materia orgánica) y el agua [Finizio et al. 2001; USGS. 2005].

Kow < 500 => Bajo. Son indicativos de alta solubilidad en agua, alto potencial de movilidad, poca tendencia a la bioacumulación o acumulación y probable alta biodegradabilidad.

Kow > 1000 => Alto. Son indicativos de baja solubilidad y movilidad, lo que puede determinar bioacumulación o acumulación, persistencia y tendencia a ser adsorbido en el suelo y probable baja biodegradación.

Polaridad: los hidrocarburos son moléculas no polares, en el caso de los hidrocarburos alifáticos, y no polares o muy débilmente polares, en el caso de los aromáticos. Esta característica hace que tengan poca afinidad por el agua; cuanto más apolares sean los hidrocarburos, más difíciles serán de biodegradar.

Dispersión y difusión, la dispersión de los contaminantes es debida, fundamentalmente, a la percolación del agua, mientras que la difusión de estos contaminantes sólo interviene en el transporte para distancias muy pequeñas. Las principales diferencias entre la biodegradación del petróleo en ecosistemas acuáticos y terrestres tras un derrame o vertido, están relacionadas con el movimiento, la distribución del petróleo y la presencia de materia particulada, cada una de las cuales afecta a la naturaleza fisicoquímica del petróleo y aumenta su susceptibilidad a la degradación microbiana [Riser-Roberts. 1998].

Adsorción: Otro factor que influye en la biodegradación de un hidrocarburo es el coeficiente de adsorción en el suelo (Koc). La adsorción de un compuesto se incrementa con el aumento del contenido de materia orgánica, contenido en arcilla [Lewis et al. 1994]. Así, un suelo poroso rico en arcilla o suelos con gran cantidad de compuestos orgánicos naturales como turba o ácidos húmicos tendrán mayor tendencia a retener hidrocarburos que un suelo arenoso. Por otro lado, la retención de los hidrocarburos policíclicos aromáticos será mayor para aquellos de 4 ó 5 cinco anillos que para los monoaromáticos. Y estos serán a su vez más retenidos que los compuestos más polares como los fenoles o los éteres carburantes [Vandecasteele et al. 2005].

Se ha establecido una relación empírica entre el coeficiente de distribución (Kd), la fracción de carbono orgánica en el suelo (foc) y el coeficiente de distribución de carbono orgánico (Koc)

$$Kd = (foc)(Koc)$$

Esta relación es importante debido a la dificultad para medir directamente el coeficiente de distribución mientras que la fracción de carbono orgánica en el suelo

(**foc**) puede ser medido o estimado y los valores de de distribución de carbono orgánico (Koc) se encuentran disponibles en la literatura para muchos compuestos derivados de los hidrocarburos.

Concentración del contaminante: La concentración del contaminante en el suelo puede afectar directa o indirectamente a la actividad biológica de los microorganismos. En términos generales, los compuestos que se encuentran en el suelo a altas concentraciones pueden ejercer un efecto tóxico para los microorganismos pudiendo inhibir su multiplicación y su actividad biológica [Admón *et al.* 2001]. De manera similar concentraciones excesivamente bajas de hidrocarburos pueden igualmente limitar la biodegradación por suponer una fuente de carbono insuficiente para mantener el crecimiento microbiano [Leahy *et al.* 1990].

I.1.3. FACTORES BIOLÓGICOS

La biorrecuperación de suelos contaminados con derivados del petróleo es posible gracias a la biodegradabilidad de los hidrocarburos que lo componen y al hecho de que los microorganismos degradadores pueden ser enriquecidos en la mayoría de los ambientes o sistemas contaminados. Así, para que la biorremediación pueda considerarse una opción viable, la zona contaminada debe contener microorganismos capaces de degradar el contaminante y debe ser posible crear las condiciones necesarias para mantener un buen nivel de degradación.

Los microorganismos denominados autóctonos, son aquellos que se encuentran formando parte del ecosistema afectado. Para que exista un proceso de degradación en algunos casos hay que estimular su crecimiento, creando condiciones óptimas de temperatura, oxigenación y contenidos de nutrientes. Sin embargo en ocasiones, el número de microorganismos o cuando en el ecosistema no está presente la actividad biológica para degradar la contaminación, se pueden adicionar microorganismos de otra procedencia cuya eficacia haya sido probada. En este caso se habla de microorganismos exógenos.

Cuando se produce una contaminación con hidrocarburos, algunas especies microbianas disminuyen debido a la toxicidad, otras no sufren efectos apreciables y otras experimentan un incremento en su desarrollo, al ser capaces, de metabolizar el carbono orgánico de la fracción contaminante por su constitución enzimática específica. En general, se puede decir que la presencia de contaminantes disminuye la diversidad taxonómica y aumenta la

diversidad metabólica de la microbiota autóctona. Algunos autores han descrito incrementos de hasta 3000 veces de la población microbiana de un suelo tras un derrame de carburante. Por otro lado es importante tener en cuenta para posibles actuaciones de biorremediación, que mientras en un suelo normal el factor limitante del crecimiento de la microbiota suele ser el carbono orgánico, en los suelos contaminados por hidrocarburos, la falta de oxígeno o de otros nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo, necesarios para el metabolismo microbiano, se convierten en el factor limitante para una eficaz biorremediación del suelo contaminado [Margesin et al. 1997; Tan et al. 1990].

La población bacteriana natural en el suelo expresada en unidades formadores de colonias (UFC) por gramo de suelo suele situarse en valores comprendidos entre 10^4 a 10^7 UFC/g. Recuentos bacterianos por debajo de 10^3 indican presencia de concentraciones tóxicas de compuestos orgánicos o inorgánicos y es un dato importante a considerar a la hora de valorar la posibilidad de biorrecuperación de un suelo contaminado. En general, el suelo contiene una gran diversidad microbiana en la que se incluyen bacterias, algas, hongos, protozoos. De estos organismos las bacterias son el grupo más numeroso y bioquímicamente activo, especialmente en niveles bajos de oxígeno [Alexander et al. 1994].

1.2. DEGRADACIÓN MICROBIANA

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo están presentes en la naturaleza y se ha demostrado que la degradación de estos hidrocarburos es llevada a cabo por la acción de grupos microbianos con diferente capacidad degradadora debido a la alta complejidad de los productos derivados del petróleo [Kanaly et al. 2000; Foght et al. 1990]. Se podría afirmar que en casi todos los ambientes existen, aunque en baja cantidad, microorganismos capaces de degradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas al emplearlos como fuente de carbono y esta es una de las posibles causas del incremento de la biomasa microbiana después de un tiempo de exposición al contaminante [Parrish et al. 2005].

El grado en que bacterias, hongos filamentosos y levaduras participan en la biorremediación de hidrocarburos ha sido objeto de numerosos estudios y es una función del ecosistema y las condiciones medioambientales locales. Por otro lado, algas y protozoos son una parte importante de la población microbiana tanto en ecosistemas acuáticos como

terrestres. Sin embargo, el grado de participación en la degradación de hidrocarburos es muy desconocido y no se ha llegado a demostrar que los protozoos utilicen dichos compuestos [Bossert *et al.* 1984]. Las bacterias son más empleadas que los hongos y levaduras en la degradación de hidrocarburos, diversos estudios permiten establecer una lista de 160 géneros microbianos donde se encuentran las especies más utilizadas en procesos de biorremediación, entre ellos cabe destacar *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Rhodotorula* y *Candida* [Rahman *et al.* 2002].

En los suelos contaminados dominan las comunidades microbianas capaces de sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente utilizando el contaminante para su crecimiento. Las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de los hidrocarburos, cambiando su estructura a una que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir en las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que serían reprimidos. La diversidad de especies presentes en el suelo puede ser indicador de los efectos de la contaminación y en particular la aparición de microorganismos resistentes a ésta [Van Beelen *et al.* 1997].

Así, Kamukai-Nakamura *et al.* [1996] demostraron que especies del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, aisladas con frecuencia de suelos contaminados con hidrocarburos, son capaces de mostrar una importante actividad degradadora de hidrocarburos. Dichos autores han demostrado como la degradación de hidrocarburos aromáticos por *Pseudomonas* depende en algunos casos de los metabolitos producidos por la degradación de los alcanos por *Acinetobacter* [Kamukai-Nakamura *et al.* 1996]. En este sentido, algunas cepas de *Acinetobacter* además de degradar un gran número de alcanos producen bioemulgentes que facilitan la biodisponibilidad de los hidrocarburos [Ron *et al.* 2002]. Se puede pensar en consecuencia, que estos microorganismos son útiles para la construcción de consorcio microbianos empleados como inoculantes en las técnicas de bioaumentación. Otro género habitual es *Sphingomonas*, en el cual parece ser que la capacidad de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) es una característica general en estos microorganismos [Barkay *et al.* 1999]. En otro estudio, Leys *et al.* [2004] investigaron la presencia de estos microorganismos en suelos con distintas concentraciones de hidrocarburos encontrándose que a mayor concentración de TPH menor era su diversidad de esta especie. Otros microorganismos que disminuyen en su diversidad en función de la concentración de los

hidrocarburos son las micobacterias. Así, aun siendo degradadoras de hidrocarburos policíclicos (HAP), la presencia del contaminante origina una selección y posterior enriquecimiento de los clones mejor adaptados [Cheung et al. 2001].

Por otro lado, Yuste et al. [2000] pusieron de manifiesto que las bacterias aisladas de zonas contaminadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Weeksella sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Xylella fastidiosa* y *Rhodococcus sp.*, son especies frecuentes en suelos, aunque pueden presentar algunas características diferenciales, como la resistencia al vanadio, que es, probablemente, una adaptación a la presencia del contaminante [Yuste et al. 2000].

La biodegradación de una mezcla de hidrocarburos de una zona contaminada con petróleo depende de la especificidad metabólica de los microorganismos presentes en la zona y de la regulación de la misma en presencia de diferentes sustratos. Es difícil dilucidar el mecanismo de degradación de hidrocarburos en medios complejos, ya que contienen mezclas de sustratos y de comunidades microbianas. En el suelo, a menudo los microorganismos se encuentran en consorcios que abarcan algunas especies, que tienen relaciones sintrópicas y espaciales [Baldwin et al. 2000].

I.2.1. DEGRADACIÓN AERÓBICA DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS

Los componentes del petróleo y sus derivados no se biodegradan todos con la misma facilidad y además, algunas veces puede que no se degraden completamente, sino que sólo se transformen en productos intermedios, que pueden ser menos, igual o más contaminantes que el compuesto original [Peters et al 2005]. En general cuanto más compleja es la estructura molecular, más difícil será de degradar y también más lenta será la biorremediación. En este sentido, los compuestos de altos pesos moleculares y ramificados serán más difíciles de biodegradar que los de bajo peso molecular y no ramificados [Atlas et al. 1981].

Los hidrocarburos alifáticos como norma general, decir que cuanto más insaturada sea la cadena carbonada (más dobles y triples enlaces) más difícil o lenta será su degradación. De igual manera, los alcanos de cadena larga son más resistentes a la biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta. Cuando estos hidrocarburos alcanzan un peso molecular superior a 500 son difícilmente utilizables como fuente de carbono para el crecimiento microbiano. De igual manera, también la presencia de ramificaciones reduce la

tasa de biodegradación porque los átomos de carbonos terciarios y cuaternarios interfieren con los mecanismos de degradación o lo bloquean totalmente.

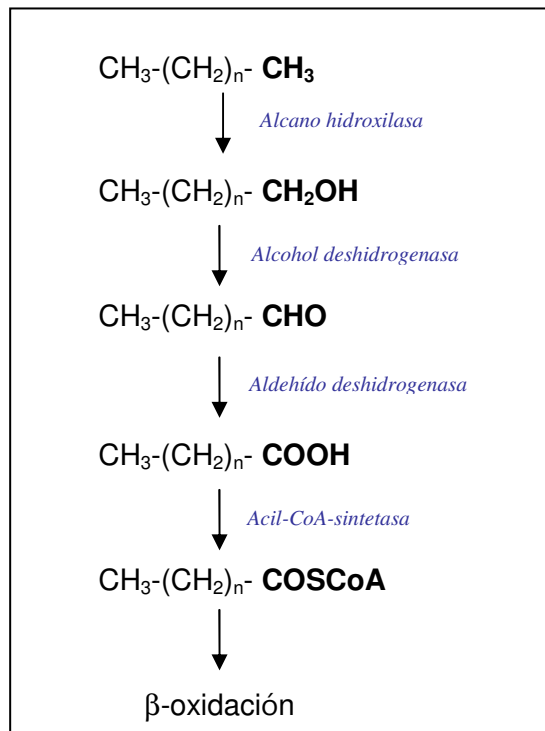


Figura I.2. Mecanismo de degradación de hidrocarburos alifáticos.

Los microorganismos que degradan alcanos lo realizan mediante una oxidación progresiva de uno de los grupos metilo terminal en ácidos grasos, utilizando la enzima alcanohidroxilasa que incorpora un grupo alcohol en dicho carbono. Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo hidroxilo que es una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas este grupo alcohol se oxida hasta grupo aldehído y finalmente carboxílico. Así se obtiene una molécula similar a un ácido graso que puede ser degradado a acetil-CoA por β -oxidación. Este proceso de oxidación también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que también se procesarán por β -oxidación [Atlas et al. 1981]. Ver figura I.2.

I.2.2. DEGRADACIÓN AERÓBICA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS.

En el caso de los hidrocarburos aromáticos, el principal problema para degradarlos es la ruptura del anillo aromático debido a su peculiar estructura en la que los electrones de los orbitales π están compartidos entre todos los carbonos del anillo. Los microorganismos que

utilizan compuestos aromáticos como fuente de carbono, desestabilizan dicha estructura electrónica y rompen el anillo en un proceso que consiste en introducir uno o dos grupos OH mediante una enzima monooxigenasa o dioxigenasa, específica para cada molécula de hidrocarburo. La acción de esta enzima origina la pérdida de aromaticidad del compuesto y hace posible la posterior utilización del carbono contenido en su estructura cíclica. Ver Figura I.3.

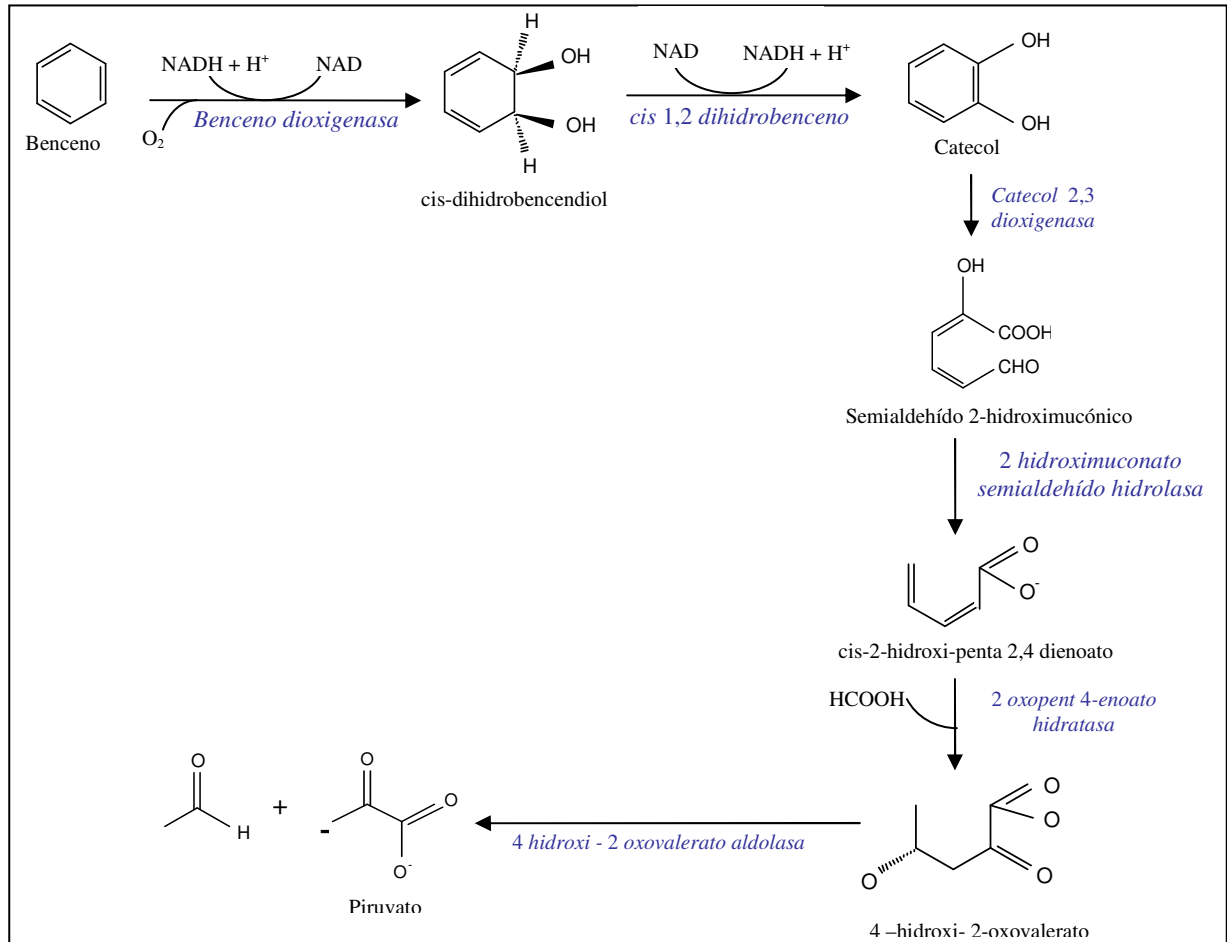


Figura I.3. Ruta de degradación (vía catecol) de compuestos aromáticos.

Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermedios del ciclo de Krebs. Es decir, la gran variedad de compuestos aromáticos que se pueden encontrar son modificados y convertidos en catecol o ácido protocatéuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico), a partir de estas dos moléculas en las que convergen la mayoría de los compuestos se puede llevar a cabo la rotura del anillo mediante enzimas específicas [Smith et al. 1990].

I.2.3. DEGRADACIÓN ANAERÓBICA DE HIDROCARBUROS

La degradación anaeróbica requiere de otras estrategias en la oxidación inicial utilizando aceptores finales de electrones distintos del oxígeno, disminuyendo la velocidad de asimilación de los hidrocarburos, por lo tanto el mecanismo anaeróbico es un proceso más lento que el aeróbico.

El mecanismo que se plantea para la degradación de alcanos, implica la adición de una molécula de fumarato, de modo que se forma un diácido. Una vez activado el alcano, una serie de oxidaciones, deshidrataciones e hidrataciones permite a dichas bacterias utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono y de energía, que probablemente es metabolizado por la vía de oxidación de los ácidos grasos (figura I.4)

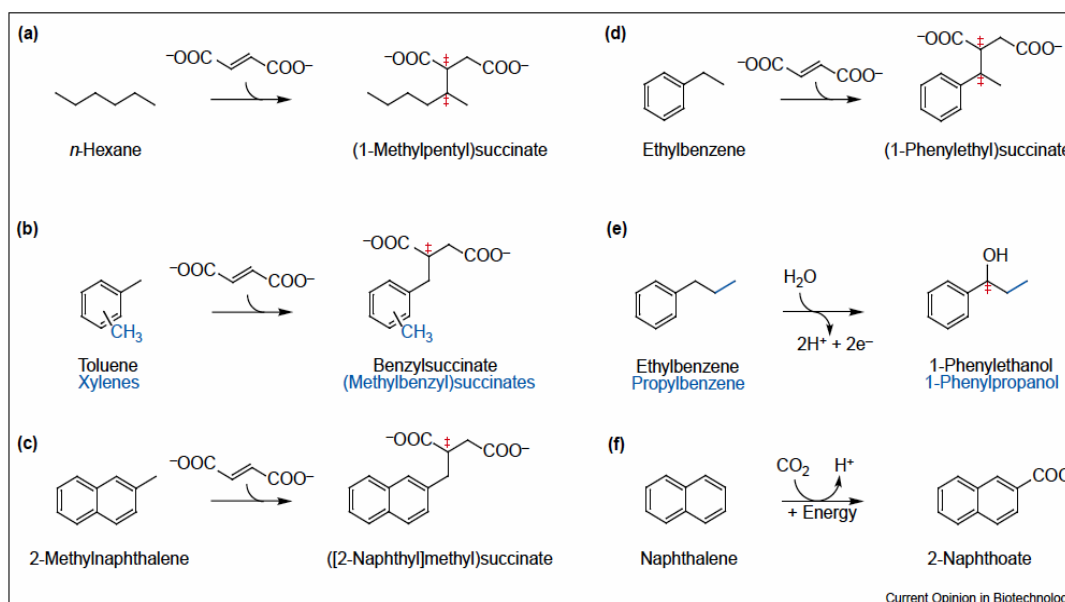


Figura I.4. Ruta de degradación anaeróbica de hidrocarburos saturados y aromáticos.[Widdel et al. 2001]

Con respecto a la degradación de compuestos aromáticos, las rutas mejor caracterizadas implican diversas bacterias sulfatorreductoras y desnitrificantes en la degradación del tolueno [Cervantes et al. 2001]. La degradación anaeróbica tiene lugar en tres etapas. En la primera de ellas, el sustrato ha de ser activado implicando carboxilaciones, hidroxilaciones anaerobias o formaciones de tioésteres del correspondiente ácido aromático con el acetil-CoA. La segunda etapa implica el ataque enzimático mediante reductasas de los intermediarios activos. Finalmente, los compuestos no cíclicos son convertidos en metabolitos centrales mediante

vías metabólicas convencionales, y probablemente generan acetil-CoA y CO₂ [Parés et al. 1997]

1.3. TECNOLOGÍAS UTILIZADAS EN LA ELIMINACIÓN DE HIDROCARBUROS

Como ya se ha indicado, la contaminación con hidrocarburos implica un riesgo humano y ecológico, la exposición a este tipo de contaminación puede generar mutaciones y efectos carcinogénicos, por esta razón y las mencionadas anteriormente, se han investigado e implementado diferentes tecnologías en la remediación de suelos. Estas tecnologías pueden ser de tipo *in-situ* o *ex-situ*.

Los tratamientos *in situ* son los que permiten tratar el suelo en el lugar de la contaminación sin excavar ni transportar. Se requieren generalmente períodos largos de tiempo y no hay certeza sobre la uniformidad del tratamiento debido a la variabilidad en las características del suelo, por esto la eficacia del proceso es más difícil de verificar [FRTR 2005].

En el tratamiento *ex situ*, el suelo es transportado a una planta de procesamiento donde se aplica el tratamiento adecuado, requiere generalmente períodos más cortos que el tratamiento *in situ*, y hay más certeza sobre la uniformidad del tratamiento debido a la capacidad de homogeneizar y de mezclar continuamente el suelo. Sin embargo, el tratamiento *ex situ* requiere la excavación de suelos, transporte, entre otros procesos, y supone costes más elevados [Casal et al. 2004; Adams et al. 1999]. La tabla I.4 muestra una posible clasificación de las diferentes tecnologías de remediación.

Tabla I.4. Clasificación de las tecnologías de remediación.

CLASIFICACIÓN	TECNOLOGÍA	TIPO
Biológica	Atenuación natural	<i>In situ</i>
	Biorremediación	<i>in situ</i> y/o <i>ex situ</i>
	Bioventing	<i>in situ</i>
	Fitorremediación	<i>In situ</i>
Físico-químico	Extracción con solvente	<i>ex situ</i>
	Incineración	<i>In situ</i> y/o <i>ex situ</i>
	Desorción térmica	<i>ex situ</i>
Química	Oxidación química	<i>In situ</i> y/o <i>ex situ</i>
	Degradación fotocatalítica	<i>In situ</i>
	Degradación electrocinética	<i>In situ</i>

A continuación se describen las tecnologías en los procesos de remediación teniendo en cuenta la clasificación de la tabla anterior.

I.3.1. ATENUACIÓN NATURAL

La atenuación natural también llamada **remediación intrínseca** está englobada dentro de las técnicas de remediación *in situ* de muy bajo coste. Su característica principal es la utilización de los procesos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación. Es un proceso natural de limpieza al que se llega cuando los mecanismos de auto-remediación son activados en un suelo contaminado.

Los mecanismos de la atenuación natural suponen una serie de procesos físicos, químicos y/o biológicos que, bajo condiciones favorables, actúan sin intervención externa para reducir la masa, toxicidad, movilidad, biodisponibilidad, volumen o concentración del contaminante en suelos o aguas subterráneas. Estos mecanismos pueden ser clasificados como destructivos o no destructivos. Los **mecanismos destructivos** son principalmente químicos y biológicos, e incluyen biodegradación, oxidación abiótica, transformación, hidrólisis, destrucción UV (sólo en la superficie), estabilización y mineralización. Los **mecanismos no destructivos** son mayoritariamente físicos, e incluyen adsorción, dilución, difusión, dispersión y volatilización [Basel 2002]. Los mecanismos no destructivos excepto la volatilización, e incluyendo la biodegradación, también controlan el transporte de contaminantes por el medio subterráneo [Schirmer et al. 2004].

I.3.2. TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN

El objetivo de las técnicas de recuperación biológica, es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima detoxificación. La tecnología específica empleada en cada caso depende del tipo de microorganismos, de las condiciones de la zona contaminada, de la naturaleza y cantidad de contaminante. Distintos microorganismos degradan diferentes tipos de compuestos y sobreviven en diferentes condiciones.

Las herramientas que se utilizan en la biorremediación para optimizar la tasa de degradación son la bioestimulación y el bioaumentación. La **bioestimulación** consiste en modificar los factores limitantes del crecimiento de los microorganismos y de la degradación del contaminante. Los factores que usualmente limitan la eficacia del proceso son la

disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y fósforo, el contenido de agua, oxígeno y biodisponibilidad del contaminante. Por otra parte, el **bioaumento** es la inoculación de microorganismos degradadores al hábitat contaminado, que generalmente son microorganismos autóctonos del ecosistema [Vandecasteele et al. 2005; King et al. 1998].

La llegada a un suelo del hidrocarburo contaminante supone un aporte fundamentalmente de carbono orgánico. Este hecho origina un incremento de la relación carbono / nitrógeno que hace que en la mayoría de los ecosistemas contaminados el nitrógeno sea uno de los factores limitantes del crecimiento microbiano y en consecuencia del proceso de biorremediación. Por ello es frecuente la aplicación en los procesos de biorremediación de fertilizantes que mejoren las características nutricionales del suelo y estimulen la actividad de la microbiota degradadora.

En líneas generales podemos considerar tres tipos de fertilizantes.

a. **Fertilizantes de liberación lenta (FLL):** Se trata de productos granulados de fácil aplicación por siembra manual, con formulaciones que presentan ausencia de carbono, bajas cantidades de potasio y relaciones nitrógeno: fósforo inferiores a 10:1. Al tratarse de productos de liberación lenta, se pueden programar sucesivas aplicaciones en función del tiempo de liberación indicado por el fabricante. Cada reaplicación requeriría un cálculo previo del carbono y del nitrógeno remanente. Por precio y rendimiento son productos adecuados para tratamientos de biotratabilidad *In Situ* [Xu et al. 2005].

b. **Fertilizantes oleofílicos:** Productos líquidos específicos para biorremediación. Parece que ofrecen un rendimiento aceptable a largo plazo (más de seis meses) y una mayor eficiencia frente a compuestos aromáticos. Tienen el inconveniente de la dificultad de mantener estable la mezcla con agua, lo que dificulta su aplicación sobre el terreno; el precio, dependiendo de la cantidad de producto requerida, puede ser una limitación muy importante [Santas et al. 2000].

c. **Otras posibilidades:** En algunos trabajos se han utilizado fertilizantes agrícolas genéricos de liberación inmediata; que presentan ventajas frente a los FLL al hacer disponibles inmediatamente los nutrientes, pero pueden requerir múltiples aplicaciones por las pérdidas por lixiviación con el riesgo de contaminación del freático.

Otro factor importante en los procesos de biorremediación es la biodisponibilidad de los contaminantes. Los hidrocarburos por su carácter hidrofóbico son poco solubles en agua y

en consecuencia poseen una baja biodisponibilidad. Por ello, es frecuente el uso de surfactantes o biosurfactantes que facilitan la emulsión del hidrocarburo al mismo tiempo que favorecen la liberación de los mismos de la matriz del suelo haciendo que sean más accesibles a los microorganismos. También se ha demostrado que el uso de surfactantes es especialmente útil para la biorremediación de suelos en los que predomina el contenido arcilloso [Calvo et al. 2008]

Los surfactantes tienen una amplia diversidad de estructura química y molecular. La molécula de surfactante es anfipática, está constituida por una parte hidrófila y una parte hidrófoba; esta última disminuye la solubilidad en agua de estas moléculas, mientras la parte polar, frecuentemente ionizable, realiza el efecto contrario, y de esta forma puede actuar como molécula intermediaria entre fases inmiscibles, tal es el caso de las interfases petróleo/agua o aire/agua [Liu et al. 1995; Desai et al. 1997].

Se ha demostrado que los surfactantes estimulan el crecimiento microbiano y aceleran la biorremediación debido a que ayudan a dispersar los hidrocarburos en los diferentes medios e incrementan el área de contacto superficial necesario para el crecimiento microbiano [Mulligan et al. 2001]. En general, los surfactantes son vertidos directamente sobre el suelo o aplicados mediante spray. La cantidad de solución que se utiliza depende de la cantidad de hidrocarburos que se estimen presentes en el suelo. El empleo de surfactantes en la biorremediación *in situ* puede llegar a ser una tecnología costosa, por lo que debe estar avalada por una alta eficiencia del proceso en sí mismo [Calvo et al. 2004].

1.3.2.1. Biopilas

La técnica de biopilas es un tratamiento de biorrecuperación de tipo “*ex-situ*” en condiciones no saturadas, que consiste en la formación de pilas de material biodegradable de dimensiones variables, formadas por suelo contaminado en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, mediante tubos perforados de aireación conectadas a una soplante. En tierras excesivamente arcillosas puede ser conveniente añadir algún material estructurante (virutas de madera, paja seca, etc.) e incluso materia orgánica (compost). Al no requerir laboreo, como en el land-farming, y no estar limitado a las medidas del arado, puede admitir un mayor volumen de tierra en la misma superficie [Pope et al. 1993; FRTR 2005].

I.3.2.2. Compostaje

Es una técnica “*ex-situ*” en la que el suelo contaminado se somete a un proceso biológico controlado por el cual los contaminantes orgánicos son transformados en subproductos inocuos por los microorganismos bajo condiciones aerobias. El proceso de compostaje puede dividirse en cuatro períodos atendiendo a la evolución de la temperatura [FRTR. 2005]:

- **Mesófilo:** La materia orgánica está a temperatura ambiente y los microorganismos mesófilos se multiplican rápidamente. Como consecuencia de la actividad metabólica, la temperatura se eleva y se producen ácidos orgánicos que conllevan a que el pH disminuya.
- **Termófilo:** Cuando se alcanza una temperatura de 40°C, los microorganismos termófilos actúan transformando el nitrógeno en amoníaco y el pH del medio se hace alcalino. A los 60°C estos hongos termófilos desaparecen y aparecen los actinomicetos. Estos microorganismos son los encargados de descomponer ceras, proteínas y hemicelulosas.
- **Enfriamiento:** Cuando la temperatura es menor de 60°C, reaparecen los hongos termófilos que reinvasen el mantillo y descomponen la celulosa. Al bajar de 40°C los mesófilos también reinician su actividad y el pH del medio desciende ligeramente.
- **Maduración:** Es un periodo que requiere meses a temperatura ambiente, durante los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización del humus.

I.3.2.3. Land-Farming

El land-farming es una técnica “*ex situ*” que consiste en provocar la oxidación biológica de los contaminantes, por medio de la población microbiana autóctona que se encuentra en el suelo; teniendo lugar, por tanto, la incorporación controlada de los residuos al suelo. Las condiciones controladas normalmente incluyen:

- Contenido de agua (generalmente la irrigación o rociado).
- Aireación (labrando el suelo con una frecuencia predeterminada, el suelo es mezclado y aireado).
- pH (el pH neutro se mantiene agregando piedra caliza, abono cálcico, etc.).

El land-farming ha sido la técnica más utilizada para tratar zonas contaminadas con los hidrocarburos del petróleo. El uso de la biorremediación sobre el suelo se limita

generalmente a hidrocarburos más pesados. En general, cuanto más alto es el peso molecular y mayor número de anillos aromáticos, más lenta es la tasa de degradación.

I.3.2.4. Biorreactores

Los biorreactores son equipos que aceleran la descomposición de los contaminantes estimulando la acción biológica de los microorganismos y por consiguiente el proceso natural de degradación. Es la técnica más adecuada para casos en que los peligros potenciales de lixiviados y emisiones de gases sean importantes. Permite la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación. Una ventaja de los biorreactores es la posibilidad de utilizar microorganismos aerobios, anaerobios o una combinación de ellos dependiendo del contaminante que se quiera degradar [Riser et al. 1998].

I.3.2.5. Bioventing: Air sparging

La técnica del bioventing es un tratamiento de biorrecuperación de tipo "*in situ*", consistente en la aireación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno (aire) a través de pozos de inyección. Debido a la aireación del suelo se favorece la degradación de los hidrocarburos por dos vías:

- por volatilización, facilitando la migración de la fase volátil de los contaminantes,
- por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se estimula la actividad bacteriana [FRTR 2005]

Los sistemas de bioventing no deben usarse cuando se encuentra producto libre, ya que su volatilización *in situ* puede originar la migración de estos productos y originar una contaminación de zonas periféricas. Así mismo, tampoco deben usarse estas tecnologías cuando la contaminación del agua subterránea esté localizada en un acuífero confinado.

En general el sistema bioventing es más efectivo sobre constituyentes de gran volatilidad y baja solubilidad y para suelos con alta permeabilidad. No obstante las características del suelo determinarán las zonas preferenciales para la extracción de gases en las zonas no saturadas. Así, suelos estratificados o con alta heterogeneidad suelen crear grandes barreras para estos sistemas [EPA 1992].

I.3.2.6. Fitorremediación

La fitorremediación es una técnica *in situ* que utiliza las plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos, etc. Las ventajas que ofrece la fitorremediación frente a otros procesos son el bajo coste y la rapidez con que pueden llevarse a cabo ciertos procesos de degradación. Los mecanismos de la fitorremediación incluyen la rizodegradación que se lleva a cabo en el suelo que rodea la raíz, la fitoextracción donde los contaminantes son captados por las raíces y posteriormente son acumulados hacia el tallo y hojas [Vidali et al. 2001].

I.3.3. TECNOLOGÍAS FÍSICAS

I.3.3.1. Extracción con solventes

Esta técnica se basa en utilizar solventes para separar y/o disolver contaminantes orgánicos y así removerlos del suelo. Este tipo de proceso "*in situ*" requiere de un tratamiento posterior para eliminar o destruir los contaminados del líquido de extracción. Los solventes pueden alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo disminuyendo la porosidad y reduciendo la movilidad de los contaminantes. Se requiere tratar previamente los suelos con alto contenido de materia orgánica y también es necesario el tratamiento de los vapores generados [Silva et al. 2005].

I.3.3.2. Incineración

Los procesos de incineración *in situ* y/o *ex situ*, tiene como finalidad volatilizar y quemar compuestos orgánicos en presencia de oxígeno con temperaturas de operación que van desde los 870°C a los 1200°C. La eficiencia de la remoción y la destrucción de los incineradores operados adecuadamente es de un 99%; sin embargo los gases de combustión generalmente requieren de tratamiento adicional. Existen diferentes tipos de incineradores, lecho circulante, lecho fluidizado y tambor rotatorio [Van Deuren et al. 1997].

I.3.3.3. Desorción térmica

Los tratamientos térmicos ofrecen tiempos rápidos de limpieza, pero generalmente los costes son elevados. La desorción térmica consiste en calentar el suelo con el fin de vaporizar los contaminantes y los gases producidos se dirigen hasta un sistema de tratamiento. Este es un proceso de separación físico no destructivo, que puede clasificarse según la temperatura de operación: desorción térmica de alta temperatura donde se utiliza el rango de 320°C a 560°C y desorción térmica de baja temperatura con valores entre 90°C y 320°C [Renoldi *et al.* 2003].

I.3.4. TECNOLOGÍAS QUÍMICAS

I.3.4.1. Oxidación química

La oxidación directa de contaminantes orgánicos en suelos involucra un gran número de reacciones donde el principal agente responsable de la oxidación es el radical hidroxilo OH·. Este radical libre se forma por la descomposición catalítica de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno en un medio ácido, el ozono y el permanganato de potasio. El poder de oxidación de este radical es únicamente superado por el flúor [Franz-Georg *et al.* 2000].

El agente oxidante más utilizado es el peróxido de hidrógeno que catalizado por el Fe²⁺ forma los radicales libres OH·, esta reacción se conoce como reacción y/o proceso Fenton.



La reacción de Fenton, a través de la generación de radicales OH·, puede transformar los compuestos orgánicos residuales de difícil degradación por procesos aeróbicos bióticos, en otros más simples y más biodisponibles para los microorganismos. La reacción de Fenton modificada utiliza como catalizador Fe³⁺ y un compuesto quelante a un pH neutro, además de los minerales de hierro que se encuentran en forma natural en los suelos [Flotron *et al.* 2005].

I.3.4.2. Fotocatálisis

La degradación por fotocatálisis "*in situ*", se trata de un proceso fotocatalítico promovido por energía con una longitud de onda que sea capaz de excitar a un catalizador (semiconductor), generalmente un óxido metálico en el cual se desarrollan reacciones de

óxido-reducción, esta generación de radicales libres muy reactivos promueven el proceso de mineralización de los compuestos orgánicos [Zhang *et al.* 2008].

I.3.4.3. Remediación electrocinética

La remediación electrocinética es de tipo “*in situ*”, que aprovecha las propiedades conductivas del suelo, con el uso de un campo eléctrico que permite remover los compuestos orgánicos. Implica la aplicación de una baja intensidad de corriente eléctrica a través de electrodos colocados en el lugar de la contaminación. Los compuestos orgánicos con carga positiva migran hacia el cátodo, mientras que los aniones se mueven hacia el ánodo. Esta tecnología se puede utilizar para contaminantes orgánicos polares y metales pesados [Paillat *et al.* 2000].

I.3.5. INTEGRACIÓN DE TECNOLOGÍAS

Cada una de las tecnologías de remediación mencionadas anteriormente tiene sus ventajas y desventajas. Para hacer frente a estas limitaciones y aumentar la eficiencia en la remoción de los hidrocarburos se plantean varias combinaciones entre los tratamientos físicos, químicos y biológicos que pueden ser utilizados como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados [Gan *et al.* 2009].

I.3.5.1. Tratamiento físico-químico

Algunos investigadores han indicado que una extracción con solvente (etanol) antes de la oxidación química mejora el proceso de oxidación de los PHA en suelos contaminados [Lundstedt *et al.* 2006]. El pre-tratamiento con etanol ayuda a la desorción de los contaminantes de la matriz del suelo especialmente los contaminados por antraceno, benceno y pireno. En otro trabajo similar, fueron utilizados aceites vegetales como pre-tratamiento de la oxidación aumentando la eficiencia del tratamiento de Fenton, sugiriendo que el aceite vegetal solubiliza los HAP logrando que sean más susceptibles a los radicales libres [Bogan *et al.* 2003].

Otro tratamiento novedoso, combina la tecnología electrocinética y la oxidación química. En este método, los oxidantes químicos se canalizan en el compartimiento del ánodo y en los pozos de inyección en la celda electrocinética para inducir al mismo tiempo las reacciones de

oxidación directamente en la tierra contaminada. Se ha demostrado que la electrocinética y la posterior oxidación con persulfato, aumenta el porcentaje de reducción en la eliminación de HAP (35%) con respecto a la electrocinética en un 24% o la oxidación con persulfato en un 12%, aunque la electrocinética no mejora el rendimiento con la oxidación del fenton.

I.3.5.2. Tratamiento físico-biológico

En el uso de disolventes (acetona y etanol) para aumentar la biodisponibilidad [Lee et al. 2001], los suelos se mezclan con el solvente durante 24 horas, este se deja evaporar en condiciones normales de ventilación y luego dicho disolvente es transferido a un reactor de biodegradación a una temperatura de 21°C. El pre-tratamiento de los suelos con el disolvente obtuvo como resultado aproximadamente el 90% de los HAP degradados durante 17 días, esto puede ser debido a que el disolvente residual que se mantuvo después de la evaporación puede haber sido utilizado como sustrato de crecimiento que conduce a una mayor población microbiana ayudando a la posterior degradación de HAP de 4 - 5 anillos, como benzo (a) pireno.

I.3.5.3. Tratamiento biológico-químico

Los procesos biológicos han sido tradicionalmente considerados incompatibles con la oxidación química a causa de la excesiva muerte y/o inactivación de los microorganismos nativos por reacciones con el radical hidroxilo. No obstante, estudios recientes sugieren que el uso de ozono como oxidación química después de un tratamiento biológico mejora la eliminación de HAP. Se ha demostrado que después del tratamiento biológico con 3 horas de ozonización se ha aumentado en un 90% la eliminación de HAP de bajo peso molecular y los HAP más pesados de 4 a 5 anillos después de 13 horas de ozonización [Derudi et al. 2007].

También se ha estudiado el uso de remediación biológica como un segundo paso después de la oxidación química. Por ejemplo, se ha demostrado que el pre-tratamiento con Fenton seguido de biorremediación es eficaz en la eliminación de PHA [Kulik et al. 2006], en este sentido se ha demostrado que la oxidación de fenton ayuda a la biodegradación de PHA de 2 y 3 anillos en un 98% y entre 70% y 85% de los HAP de 4 a 5 anillos [Nam et al. 2001].

Las reacciones con Fenton modificado son más compatibles con las reacciones microbianas que el químico Fenton convencional debido a que su pH es cercano al neutro,

de modo que la oxidación química no reduce la cantidad de degradadores de hidrocarburos tal como se esperaría de un tratamiento químico tradicional [Ndjou'ou et al. 2006].

Sintetizando, para desarrollar un proceso de biorremediación eficaz es necesario el establecimiento de un sistema de evaluación y de un protocolo de actuación que debe considerar las siguientes etapas: (1) estudios básicos de laboratorio; (2) estudios en microcosmos y (3) evaluación del tratamiento en sistemas de mayor escala ya sea planta piloto o instalaciones *in situ*. [Viñas et al. 2001 y 2005]. Siguiendo las etapas mencionadas, esta investigación pretende evaluar la eficacia en la combinación de diferentes tratamientos de biorremediación.

The background of the page is a brown, textured surface, possibly a piece of paper or fabric, with several white, hand-drawn geometric shapes scattered across it. These shapes include various polygons such as hexagons, pentagons, and octagons, some of which are interconnected to form a network-like structure. The overall appearance is that of a technical drawing or a map on a textured background.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Los procesos biológicos implicados en un tratamiento de biorremediación son muy complejos y en ocasiones difíciles de explicar debido sobre todo a la interrelación de múltiples factores. Así, parámetros como textura, humedad y aireación condicionan la disponibilidad del contaminante debido a su influencia en los procesos de adsorción/desorción. Estos cambios influyen en la actividad biológica, en la selección de poblaciones microbianas específicas y en la activación de rutas de degradación específicas de las fracciones de hidrocarburos más disponibles.

En este contexto, y como objetivo principal de esta investigación, se pretende *evaluar los factores físico-químicos y biológicos implicados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aplicando fertilizante NPK asociado a diferentes agentes bioestimulantes como tratamientos combinados en la degradación de hidrocarburos.*

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. *Evaluar la eficacia de la combinación de un fertilizante inorgánico N/P/K con un surfactante comercial IVEY®, un agente estructurante de naturaleza orgánica (BIOREM), un co-sustrato (ETANOL) y una oxidación química (FENTON) realizada como pre-tratamiento a la adición del fertilizante.* Estos ensayos se realizarán en dos fases, la primera etapa a escala de laboratorio, seguidamente de una segunda fase con las condiciones más eficaces en una serie de microcosmos edáficos más próximos a la realidad.

2. *Desarrollar un sistema experimental a escala de planta piloto que permita evaluar la degradación de hidrocarburos, mediante la determinación de los cambios de los parámetros físico-químicos y biológicos del suelo en una situación comparable con una biorremediación real.* Esto permitirá conocer la eficiencia de los tratamientos seleccionados en las etapas previas con diferentes porcentajes de humedad como principal parámetro ambiental.

3. *Estudiar el efecto de la contaminación de los hidrocarburos y de los tratamientos combinados empleados en la planta piloto sobre la diversidad microbiana, mediante la técnica TGGE.* Esto permitirá conocer la estructura de las comunidades bacterianas presentes en los suelos contaminados con hidrocarburos y cómo cambian cuando son expuestos a diferentes tratamientos de bioestimulación.

Estos objetivos han sido desarrollados en el ámbito del proyecto de investigación titulado "BIOTRATABILIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS" Exp. N°: 579/2006/3-1.2 y Exp. N°: 487/2007/2-01.1. Proyecto financiado por el Ministerio del Medio ambiente.

The background of the page is a textured, brownish surface, possibly a piece of paper or fabric, with a mottled appearance. Overlaid on this background are several faint, white, geometric patterns that resemble a honeycomb or crystalline structure. These patterns are composed of interconnected lines forming various polygons, primarily hexagons and pentagons. The patterns are scattered across the page, with some appearing more prominent than others. The overall effect is a subtle, decorative background.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se muestra el esquema de las etapas o fases utilizadas en este estudio con el fin de evaluar diferentes tratamientos de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos.

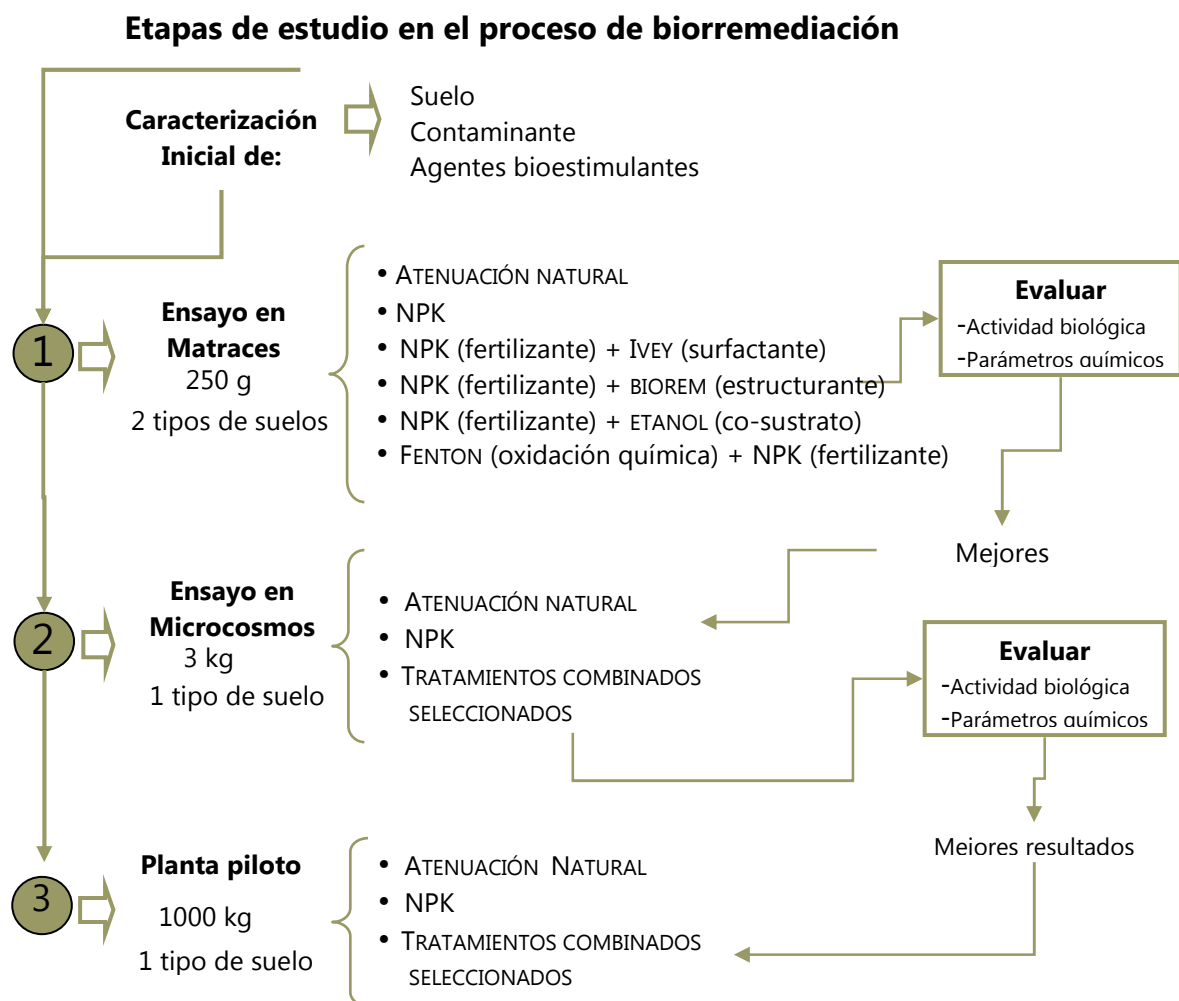


Figura III.1. Esquema del escalado de un proceso de biorremediación.

En los siguientes apartados se describen las etapas o fases del proceso de escalado que se utilizaron como metodología para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo. El primer apartado muestra la caracterización de los materiales de inicio, el segundo apartado el estudio de los indicadores de un proceso de biorremediación donde se incluyeron los

ensayos en matraces (**fase 1**) y microcosmos edáficos (**fase 2**), el tercer apartado describe los ensayos a nivel de planta piloto (**fase 3**) y por último, un cuarto apartado, en el que se detallan los análisis de laboratorio que se realizaron para evaluar cada una de las etapas anteriormente mencionadas.

III.1. CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES DE INICIO: SUELOS, CONTAMINANTE, PRODUCTOS

Previamente a las fases de experimentación en el laboratorio y de los ensayos en la planta piloto se llevó a cabo una caracterización físico-química de los suelos, contaminante y productos para la biorremediación.

III.1.1. SUELOS

En este estudio se utilizaron tres tipos de suelos. **Suelo I**, es un suelo arcilloso cuya composición fue de 80% de arcilla y 20% de arena proveniente de la cantera del Padul (Granada). **El Suelo II** es un suelo franco arcilloso suministrado por la empresa AG ambiental (Madrid) que corresponde a un suelo contaminado en su origen con una mezcla compleja de diesel y fuel. **El Suelo III**, es un suelo arenoso también procedente de la cantera del Padul (Granada). En la siguiente tabla se muestran algunas propiedades físico-químicas de los suelos mencionados.

Tabla III.1. Propiedades químicas y físicas de los suelos

SUELO	TEXTURA [%] ¹		COT ² [%]	NITRÓGENO ³ [mg/kg]	FÓSFORO ⁴ [mg/kg]
	Arcilla	Arena			
I	77	15	0.89	215.5	432.1
II	36	33	1.67	577.5	299.3
III	3	77	0.27	1111	40.66

Datos suministrados por la empresa AG-Ambiental

¹ Granulometría. Fraccionamiento en tamices;

² COT: Carbono orgánico total determinado por pérdida por calcinación.

³ Nitrógeno total: Suma de NTK, nitratos y nitritos; ⁴ Fósforo: Digestión ácida.

III.1.2. CONTAMINANTE

El diesel, es una mezcla de hidrocarburos que se obtiene por destilación fraccionada del petróleo entre 250 y 350°C a presión atmosférica. Está compuesto por aproximadamente un 75% de hidrocarburos saturados, principalmente parafinas lineales, iso y cíclicos y de un 25% de hidrocarburos aromáticos incluyendo naftalenos y alquilbencenos. EL diesel es un líquido de color blancuzco o verdoso de aspecto algo aceitoso, cuya densidad es de 850 kg/m³ a 15,5°C. Es utilizado principalmente como combustible en motores diesel y en calefacción [Olson *et al.* 1999].

III.1.3. PRODUCTOS PARA LA BIORREMEDIACIÓN

- **Fertilizante inorgánico (Agroblem S.L.) NPK 18:7:17.** Fue el fertilizante utilizado en los ensayos experimentales realizados en este trabajo. Se trata de un fertilizante inorgánico cuya composición es de un 18% de nitrógeno total (1.2% de nitrato (NO₃), 3.1% a de amonio (NH₃), y 13.7% de urea (CO(NH₂)₂) un 8% de óxido de fósforo (P₂O₅), 2% de óxido de magnesio (MgO), 19% de sulfito de potasio (K₂SO₃) y 0,5% de hierro (Fe). La cantidad de NPK que se utilizó en los ensayos fue de 0,3g/Kg de suelo, de acuerdo con experiencias previas realizadas en nuestro laboratorio [Calvo *et al.* 2004].

- **Surfactante IVEY SOL®:** Es un surfactante no iónico que actúa a nivel molecular facilitando la solubilidad del hidrocarburo en el medio acuoso, también disminuye la tensión superficial del agua, aumentando la permeabilidad en los suelos. Las concentraciones de surfactante que se aplicaron fueron de 0.052 ml/kg de suelo y 5.2 ml/kg de suelo [Calvo *et al.* 2008].

- **BIOREM:** Es un fertilizante orgánico compuesto con 31,5% de carbono orgánico total, 3% de nitrógeno, 0,06% de fósforo y un 1% de potasio. Este producto fue suministrado por AG-Ambiental S.L..

- **ETANOL:** Corresponde a alcohol etílico, cuya densidad es 0,810 g/cm³. Se emplearon dos concentraciones de ETANOL: 2,0 y 20g/Kg de suelo.

- **Reactivo FENTON:** Es una combinación de peróxido de hidrógeno y el metal Fe⁺² suministrado por óxidos de hierro presentes en el suelo o agregado en forma de sales, a presión atmosférica y temperatura entre 20°C y 40°C [EPA 1999]. La concentración aplicada

fue de 13 g de agua oxigenada por 1 g de TPH presente en el suelo, la concentración de Fe^{+2} fue superior a 50 mg/kg y el pH del suelo se mantuvo entre 3-5.

III.2. ESTUDIO DE INDICADORES DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Para evaluar la eficacia de los distintos tratamientos de biorremediación incluidos en este estudio, se diseñaron dos tipos de microcosmos: el primero, en matraces erlenmeyer que constituyeron una primera fase de ensayos donde se valoraron la influencia del tipo de suelo, tipo de contaminante y efecto de la concentración de los productos bioestimulantes incluidos en este estudio. El segundo, microcosmos edáficos que corresponde a la segunda fase del escalado, donde se seleccionaron las condiciones más eficaces según los resultados obtenidos en la fase 1.

III.2.1. ENSAYOS EN MATRACES. PRIMERA FASE

En el siguiente esquema se representa la primera fase respecto a las etapas del proceso de escalado.

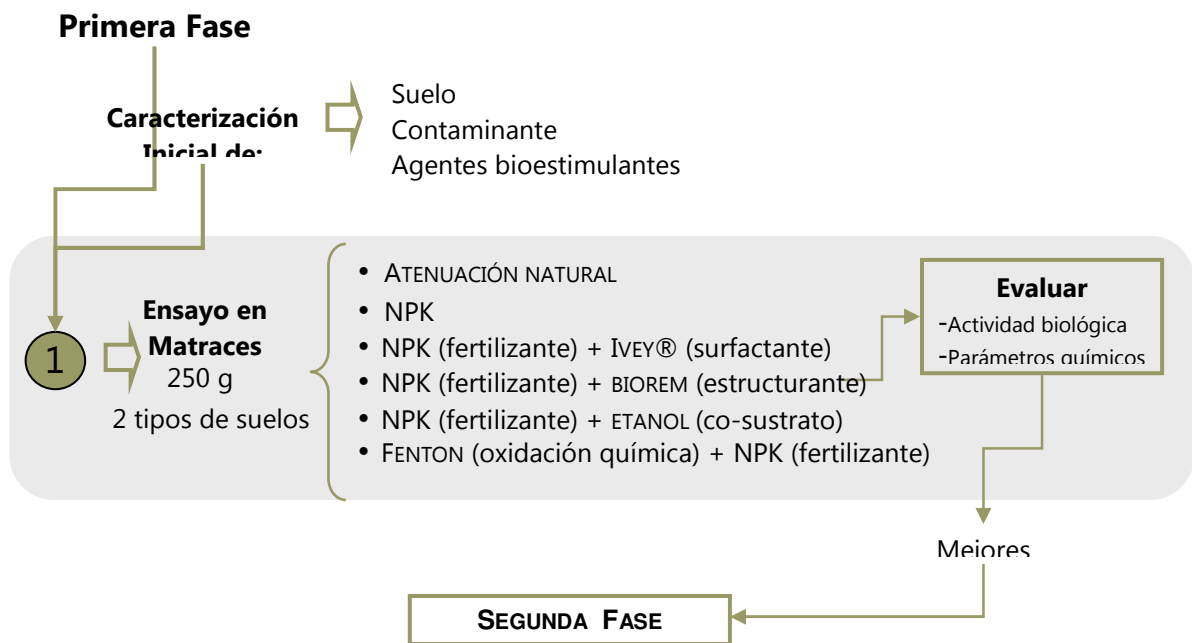


Figura III.2. Diagrama de los ensayos de biotratabilidad en matraces Erlenmeyer. Primera fase del escalado

Los estudios a escala de laboratorio de la primera fase, se llevaron a cabo utilizando erlenmeyer de 500 ml de capacidad que contenían 250 g suelo. En estos ensayos se utilizaron dos tipos de suelo: el **suelo I arcilloso**, al cual se le adicionó diesel a una concentración de 20.000 mg/kg y el **suelo II franco arcilloso** el cual estaba contaminado en su origen con una concentración de hidrocarburos aproximadamente de 9000 mg/kg. Los experimentos fueron preparados con el fertilizante NPK como agente bioestimulante principal a una concentración de 0,3 g/kg de suelo, mezclándolo con los otros agentes como el surfactante, BIOREM, ETANOL y el pre-tratamiento FENTON.

A continuación se describen los microcosmos ensayados:

- ↪ Atenuación natural: suelo contaminado sin adición de agentes bioestimulantes.
- ↪ Tratamiento con NPK: suelo adicionado con 0,3g de fertilizante *NPK*/Kg de suelo.
- ↪ Tratamiento combinado de NPK + IVEY®

En este tratamiento se estudió el efecto del surfactante a dos concentraciones diferentes, una la óptima recomendada por el fabricante 5,2 ml/kg de suelo y otra 10 veces inferior.

- ‡ NPK + IVEY® 1: Suelo adicionado con fertilizante NPK (0,3g/ Kg suelo) y surfactante IVEY® con 0,52 ml/Kg de suelo.
- ‡ NPK + IVEY® 2: Suelo adicionado con fertilizante NPK (0,3g/ Kg suelo) y surfactante IVEY® con 5,2 ml/Kg de suelo.

- ↪ Tratamiento combinado de NPK + BIOREM

La concentración del BIOREM se determinó mediante un ensayo previo con los dos tipos de suelo. Este ensayo consistió en mezclar pequeñas cantidades de BIOREM con el suelo hasta no apreciar saturación por hidrocarburos y que el suelo no manchara al tocarlo. Los ensayos se realizaron a dos concentraciones: la concentración obtenida en el ensayo previo (BIOREM 2) y la décima parte de la misma (BIOREM 1).

- ‡ NPK + BIOREM 1: suelo adicionado con fertilizante NPK (0,3g/ Kg suelo) y 8 g de BIOREM/kg de suelo en el caso del suelo I y 5 g de BIOREM/Kg de suelo en el caso del suelo II.
- ‡ NPK + BIOREM 2: suelo adicionado con fertilizante NPK (0,3g/ Kg suelo) y 80 g de BIOREM/kg de suelo para el suelo I y 50 g de BIOREM/Kg de suelo para el suelo II.

↪ Tratamiento combinado de NPK + ETANOL

Al igual que en los tratamientos anteriores el etanol se adicionó a dos concentraciones, la óptima (2%) y 10 veces inferior (0,2%)

♦ NPK+ETANOL 0,2: suelo adicionado con fertilizante NPK (0,3g/kg suelo) y 0,2% p/p de ETANOL.

♦ NPK + ETANOL 2 : suelo adicionado con fertilizante NPK (0,3g/kg suelo) y 2 % p/p de ETANOL

↪ Reactivo FENTON, adición de NPK.

El reactivo Fenton se utilizó como pretratamiento de oxidación avanzada directa de los hidrocarburos. Este proceso requiere una combinación de peróxido de hidrógeno y del metal Fe^{+2} en condiciones ácidas.

Inicialmente se adicionó ácido sulfúrico para que los suelos tuvieran un pH ácido inferior a 5. Se verificó que la concentración de Fe^{+2} en los dos tipos de suelo era superior a 50 mg/kg. Se adicionó la cantidad requerida de H_2O_2 , y se dejó actuar durante 48 horas. Transcurridas estas 48 horas se adicionó el fertilizante NPK como tratamiento. Las cantidades necesarias de peróxido de hidrógeno se calcularon teniendo como referencia que por cada gramo de TPH presentes en el suelo se recomienda adicionar 13 g de peróxido de hidrógeno. (Concentración recomendada por AG Ambiental. S.L.)

♦ FENTON 1: la oxidación química se llevó a cabo con 2,87ml (3,25g) de H_2O_2 para el suelo I y de 1,15ml (1,3g) de H_2O_2 para el suelo II. Transcurridas las 48 horas se mezcló con 0,3 g de fertilizante/Kg suelo.

♦ FENTON 2: Se utilizaron 28,7ml (32,5g) de H_2O_2 para el suelo I y de 11,5ml (13g) de H_2O_2 para el suelo II en la oxidación química. Después de las 48 horas se mezcló el suelo con 0,3 g de fertilizante/Kg suelo.

En la Tabla III.2 se muestra el resumen de los tratamientos realizados en erlenmeyer con 250 g de suelo.

Tabla III.2. Diseño de experimentos en matraces erlenmeyer

TRATAMIENTO	FERTILIZANTE NPK [G/KG DE SUELO]	SURFACTANTE IVEY® [ML/KG DE SUELO]	BIOREM [G/KG DE SUELO]	ETANOL [P/P]	FENTON [ML]
At. Natural	----	----	----	----	----
NPK	0,3	----	----	----	----
NPK + Surfactante IVEY®	0,3	0.052	----	----	----
		5.2	----	----	----
NPK + BIOREM	0,3	----	S.I: 8 S.II: 5	----	----
		----	S.I: 80 S.II: 50	----	----
NPK + ETANOL	0,3	----	----	2	----
		----	----	0,2	----
FENTON + NPK	0,3	----	----	----	S.I: 2,9 S.II:1,15
		----	----	----	S.I: 29 S.II:11,5

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para poder realizar el análisis estadístico de los resultados. Transcurridos 0, 7 y 15 días de incubación se procedió a las siguientes determinaciones: análisis de la microbiota heterótrofa y degradadora de hidrocarburos, determinación de la actividad biológica, análisis de TPH y fracciones de hidrocarburos.

III.2.2. ENSAYOS EN MICROCOSMOS EDÁFICOS. SEGUNDA FASE

En el siguiente esquema se ubica la segunda fase respecto a las etapas del proceso de escalado.



Figura III.3. Diagrama de los ensayos de biotratabilidad en microcosmos edáficos. II Fase del proyecto.

En esta segunda fase de los ensayos a escala de laboratorio, los estudios se realizaron en recipientes de vidrios abiertos de 22 cm de diámetro por 10cm de altura y un drenaje en la parte inferior. Estos microcosmos fueron denominados microcosmos edáficos. Se construyeron con 1,5 kg de grava colocada en la parte inferior de los mismos para facilitar el drenaje y 3 kg de suelo (figura III.4).

En esta etapa, se utilizó el **suelo II contaminado en su origen**, por lo que no se le añadió contaminante en el laboratorio. Como agentes bioestimulantes se utilizaron los anteriormente descritos; NPK, surfactante IVEY®, BIOREM, ETANOL y reactivo FENTON con las concentraciones que mejores resultados produjeron en los experimentos de la fase I.



Figura III.4. Fotografía de los microcosmos utilizados en la fase II.

Los microcosmos se incubaron a temperatura ambiente durante 21 días. Por otro lado y para mantener un nivel de humedad entre un 15 y 20 %, se adicionó medio litro de agua al inicio de los experimentos y se regó con 100 ml de agua con una frecuencia semanal.

Los ensayos diseñados en esta etapa fueron los siguientes:

- ↪ Atenuación natural: suelo contaminado sin adición de agentes bioestimulantes.
- ↪ Tratamiento con NPK: suelo adicionado con 0,3g de fertilizante *NPK* por Kg suelo.
- ↪ Tratamiento combinado de NPK + IVEY®: se adicionó 0,3 g fertilizante *NPK*/ kg de suelo y 52 µl de surfactante IVEY® / kg de suelo.
- ↪ Tratamiento combinado de NPK + BIOREM: Se utilizó la concentración de 5 g/kg de suelo de BIOREM y el fertilizante *NPK* (0,3 g/kg).

- ↳ Tratamiento combinado de NPK + ETANOL: microcosmos adicionado de fertilizante NPK (0.3g/ Kg suelo) y ETANOL al 2% en peso respecto al suelo, es decir 6.2ml de ETANOL.
- ↳ Reactivo FENTON, adición de NPK e inoculación de microbiota autóctona: En estos microcosmos se utilizó 1,15 ml de H₂O₂ y fertilizante NPK (0.3g/ Kg suelo).

Al igual que en la primera fase, los ensayos se realizaron por triplicado con el propósito de poder realizar un análisis estadístico de los resultados. El muestreo se realizó transcurridos 0, 4, 7, 14 y 21 días de incubación y se procedió a las siguientes determinaciones: recuento de la microbiota heterótrofa y degradadora de hidrocarburos, determinación de la actividad biológica, TPH y fracciones de hidrocarburos.

III.3. ENSAYOS EN PLANTA PILOTO. TERCERA FASE

En el siguiente esquema se ubica la tercera fase respecto a las etapas de escalado.

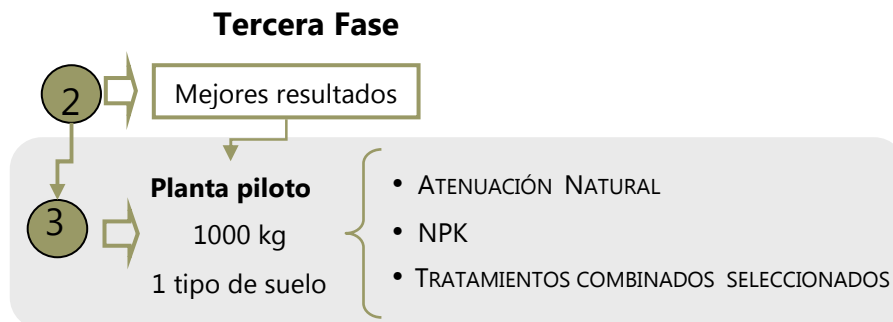


Figura III.5. Tercera fase del proceso de escalado. Ensayos en planta piloto

En una tercera fase de este estudio se realizó el escalado del proceso a nivel de planta piloto. Esta planta piloto consistió en un contenedor de plástico (polietileno) de dimensiones de 1,5m de largo, 1,5m de ancho y 1m de alto con volumen total de 1m³ y un sistema de circulación de agua. Este tanque contenía aproximadamente 1.500 kg del suelo III (suelo arenoso) contaminado con 20.000 mg/kg de diesel, en la parte inferior del tanque se colocó una capa de 20 cm de espesor de grava que servía para drenaje del suelo experimental.

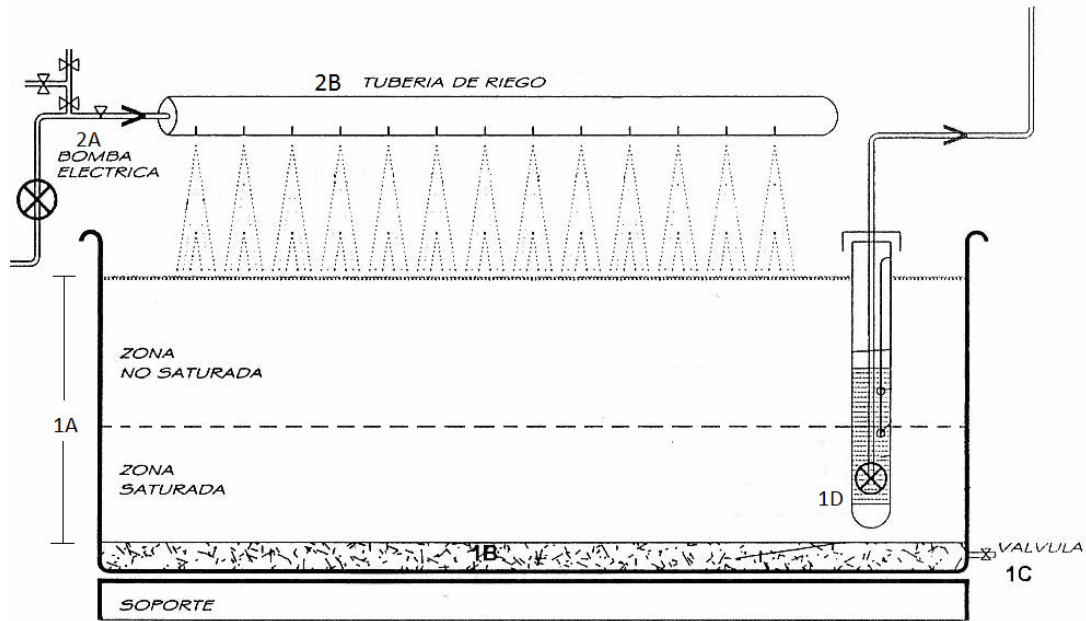


Figura III.6. Esquema de la planta piloto. 1A: Suelo contaminado. 1B: capa de drenaje. 1C: Válvula de drenaje. 1D: piezómetro. 2A: bomba eléctrica de suministro. 2B: tubería de riego.

La planta piloto (Figura III.6) fue diseñada para estudiar los diferentes tratamientos de biorremediación en tres zonas de estudio con diferentes porcentajes de humedad en cada una de ellas: la zona saturada (ZS) ubicada en la parte inferior con un porcentaje superior al 30%, la zona no saturada (ZNS) ubicada en la parte intermedia con porcentajes entre el 25 y 30% de humedad y la zona superficial (ZSup), en contacto con el ambiente con un porcentaje inferior al 20%. Para lograr los niveles de humedad adecuados se instaló un sistema de suministro de agua que consistió en un piezómetro (1D), con un testigo de forma fraccionada con dos sensores de nivel eléctricos que accionaban la bomba eléctrica de suministro de agua (2A) cuando el nivel de agua estaba por debajo de la altura establecida y la desactivaban cuando el agua llegaba a su nivel. La bomba eléctrica bombea el agua a través de un sistema de tuberías de riego (2B) ubicada en la parte superior del tanque.

Las muestras de suelo se tomaron en las tres zonas de saturación mencionadas utilizando un equipo manual, que permitía extraer muestras de suelo a la altura deseada. El muestreo de la planta piloto se llevó a cabo en 4 puntos distribuidos al azar (P1, P2, P3 y P4); en cada uno de estos puntos se extrajo aproximadamente 300 g de suelo de las zonas establecidas (zona superficial, zona no saturada y zona saturada). Las 4 muestras correspondientes a la misma zona de saturación (misma altura) se mezclaron para tomar, posteriormente, una

muestra integrada por cada zona de saturación sobre la cual se realizaron los análisis correspondientes. Asimismo, en la parte inferior del sistema se colocó una válvula de toma de muestras para el muestreo del lixiviado. Los muestreos se realizaron a los 0, 4, 7, 14, 21 y 30 días.

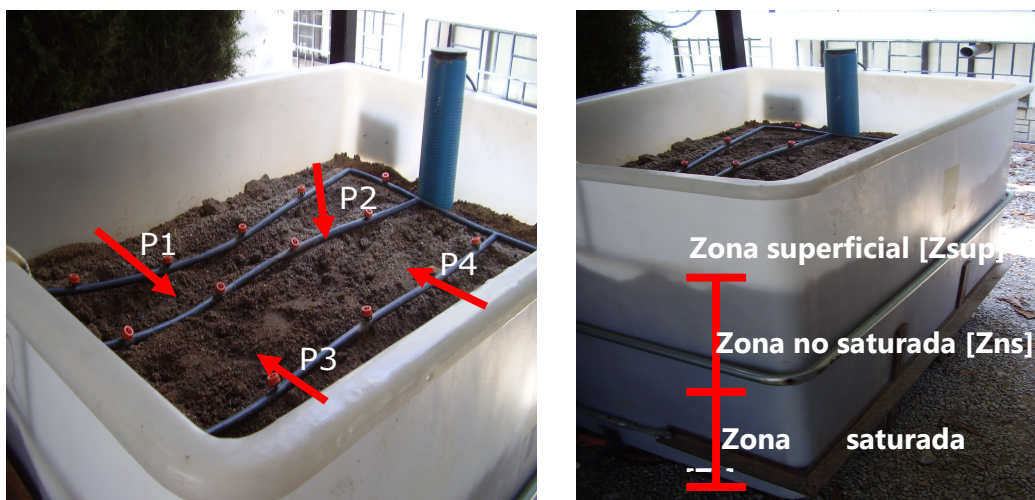


Figura III.7. Fotos de la planta piloto donde se muestran los 4 puntos de muestreo y las 3 zonas de saturación.

Los tratamientos aplicados en la planta piloto fueron: ATENUACIÓN NATURAL; Surfactante IVEY®; la combinación del fertilizante NPK y surfactante IVEY®; y el tratamiento con reactivo FENTON previo al tratamiento con fertilizante NPK. Cada uno de estos ensayos duró 28 días.

- ↪ ATENUACIÓN NATURAL: Para este ensayo, se mantuvo el suelo contaminado dentro del tanque durante el periodo de tiempo establecido sin la adición de ningún agente bioestimulante. Únicamente se procedió a un riego periódico del suelo para mantener las condiciones de humedad en cada una de las zonas establecidas en la planta piloto.
- ↪ Surfactante IVEY SOL®: surfactante no iónico, se aplicó con una concentración de 0.052 ml/kg de suelo [Calvo et al. 2008].
- ↪ Tratamiento combinado de Fertilizante (NPK) + surfactante IVEY®: La cantidad de NPK que se utilizó fue de 0.3g/Kg de suelo, combinado con el surfactante IVEY SOL® en una concentración de 0.052ml/kg de suelo [Calvo et al. 2008].
- ↪ Pre-tratamiento FENTON combinado con fertilizante inorgánico (NPK): se adicionaron 500g de sal de Mohr y se dejó reposar 24 horas. Trascorridas las 24 horas, se vertió

progresivamente agua oxigenada (un total de 40 litros) en un proceso que duró 5 días. La planta piloto se dejó estabilizar durante 3 días para realizar los muestreos pertinentes [Neyens *et al.* 2003].

III.4. ANÁLISIS DE LABORATORIO

III.4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS

III.4.1.1. Recuento Total de Bacterias Heterótrofas y degradadoras de hidrocarburo

El recuento de microorganismos heterótrofos totales se realizó mediante la técnica de siembra en placas de 0,1 ml de diluciones seriadas (1/10). La primera dilución se realizó suspendiendo 1 g de muestra en 9 ml de solución salina estéril. La incubación se realizó durante 24 horas a 30°C, realizándose posteriormente el recuento de todas las colonias que habían crecido. Como medio de cultivo se utilizó TSB 1/10, Oxoid®, (Trypticase Soja) adicionado de 14 g de Agar (Difco) como agente solidificante [Calvo *et al.* 2004].

La estimación de la microbiota potencialmente degradadora de hidrocarburos se llevo a cabo mediante la técnica de recuento en placa descrita anteriormente, utilizando el mismo medio de cultivo TSB 1/10, adicionado de diesel al 0.1 % de concentración y Agar 14g/l (Difco) [Calvo *et al.* 2004].

III.4.1.2. Actividad deshidrogenasa

Las deshidrogenasas son enzimas intracelulares que están ligadas a la oxidación de la materia orgánica y por lo tanto a la biomasa activa. Para determinar esta actividad, se tomaron 6 g de muestra seca mezclada con 0,06g de carbonato cálcico (CaCO₃), se añadió 2,5 ml de agua destilada y 1 ml de la solución al 1% de 2,3,5-Trifeniltetrazolín, esta mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió 20 ml de metanol, se agito y se filtro el sobrenadante, este proceso de realizo las veces necesarias hasta un volumen de 100 ml. Se midió la producción de trifenil formazán (TPF) de color rojo por espectrofotometría a un $\lambda = 600$ nm. [Namkoong *et al.* 2002].

III.4.1.3. Producción de CO₂

La producción de CO₂ se relaciona con la actividad metabólica de la muestra en el momento del análisis, se determinó midiendo la cantidad de CO₂ producida por día, mediante cromatografía de gases con un detector de conductividad térmica (cromatógrafo Varian 3600). Las muestras de suelo se colocaron en viales estériles sellados a los cuales se les midió la cantidad (área bajo la curva) de CO₂ inicial y la producida después de 24 horas de incubación a 28°C. El porcentaje de producción de CO₂ se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% CO_2 = \frac{\text{área final} \times 0,03\%}{\text{área inicial}} \quad \text{Donde: } 0,03 \text{ es el porcentaje de CO}_2 \text{ presente en el aire.}$$

III.4.2. ANÁLISIS DE BIODIVERSIDAD

La diversidad microbiana se determinó mediante técnicas moleculares independientes de cultivo utilizando la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (PCR-TGGE), para ello se realizó la extracción de ADN, la amplificación del gen codificante del ADNr 16S y la región hipervariable V3 y posteriormente se realizó la TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*). A los resultados de las muestra se les realizó el análisis cluster de los patrones de bandas para construir dendrogramas que correlacionan la diversidad de los tratamientos estudiados.

- **Extracción de ADN bacteriano:** Se utilizaron los siguientes kits comerciales para la extracción del ADN bacteriano total de las muestras:

- a. PowerSoil™ DNA Isolation Kit, MoBio Laboratorios, Inc. para 1g de muestra,
- b. PowerMax™ DNA Isolation Kit, MoBio Laboratorios, Inc, para 10g de muestra;
- c. Fast ID Genomic DNA extraction Kit, Genetic ID NA, Inc. para 1g de muestra.

En el caso de las muestras de suelo control (suelo sin contaminar) y el suelo tratado con reactivo FENTON se utilizó el protocolo de *Hurt et al.* [2001] debido a la incapacidad de los kits comerciales para extraer el ADN de estas muestras.

- d. EL Protocolo de *Hurt et al.* [2001] consistió en pesar 2g de muestra de suelo con 2g de arena estéril, se añadió 1ml de solución desnaturante (Tris-HCl 100mM [pH=8], sodio EDTA 100mM [pH=8], fosfato de sodio 100mM [pH=8], 1,5M NaCl y CTAB 1%), se congeló con nitrógeno líquido y se trituró hasta la descongelación.

Posteriormente se añadió 9ml de solución tampón de extracción de ADN (Tris-HCl 100mM [pH=7], fosfato de sodio 100mM [pH=7], sodio EDTA 100mM [pH=8], 1,5M NaCl, CTAB 1% y SDS 2%.) se incubó a 65°C con agitación manual suave cada 10 minutos, transcurridos 30 minutos se centrifugó a 1800xg durante 10 minutos, el sobrenadante se recogió en un tubo de centrifuga limpio preenfriado sobre hielo que contenía 20ml de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se centrifugó a 1800xg durante 20 minutos. Se recuperó la fase acuosa (la más superficial) y se mezcló con 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente durante 30 minutos, esta mezcla se centrifugó a 16000xg durante 20 minutos. El precipitado se resuspende en 200µl de agua calidad Milli-Q filtrada y esterilizada.

Tras la purificación y concentración del ADN extraído, se realizó una comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se conservaron las muestras a -20°C.

- **Amplificación por PCR del gen codificante del ARN ribosómico 16s (ADNr 16s):** Las muestras de ADN se sometieron a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando una estrategia anidada que consistió en dos reacciones consecutivas de amplificación [Nicolaisen et al. 2002].

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen de 50 µl, a partir de 4 µl de ADN bacteriano total. Las reacciones se efectuaron utilizando MBL-Taq DNA Polimerasa (Dominion mbl, 5U/ µl). En cada mezcla de reacción se aplicaron: 5µl de buffer 10x, 5µl de MgCl₂ 25mM, 1µl de PCR Nucleotide Mix (Roche) 10mM que contiene cada uno de los dinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 µl de albúmina 10mg/ml (BSA), 2,5µl de DMSO, 0,2µl de cada uno de los cebadores universales (fD1 y rD1) 100µM (SIGMA) previamente descritos en bibliografía [Weisburg et al. 1991] y cuya secuencia se muestra en la Tabla III.3., 0,2µl de enzima Taq Polimerasa 5U/µl, y agua calidad Milli-Q esterilizada y filtrada por 0,2µm de diámetro de poro hasta 50 µl (32,9µl).

Tabla III.3. Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada.

CEBADOR	SECUENCIA (DE 5' A 3')
fD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
rD1	CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC

- **Separación de los distintos fragmentos de los genes ADNr 16s mediante TGGE:** La técnica de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), se llevó a cabo en un sistema TGGE MAXI (Whatman Biometra), que permite obtener perfiles de la composición de las comunidades bacterianas en distintas muestras y realizar su estudio comparativo.

Para la realización de la TGGE se prepararon geles al 6% de acrilamida, en un matraz de 250 ml de capacidad, se añadió 24 g de urea (calidad bioquímica, SIGMA U-5378), 13ml de agua Milli-Q, 10ml de formamida desionizada (SIGMA F-9037), 1 ml de TAE 50X y 1 ml de glicerol (SIGMA G-9012). Se calentó a 50°C y se agitó hasta disolución de la mezcla.

Una vez disuelto todo, se añadió 7,5ml de acrilamida/bisacrilamida (SIGMA A-7168) al 40% (proporción 37,5/1) y se filtró por 0,22 µm toda la mezcla. El filtrado se sometió a sonicación durante 15 minutos para desgasificar la disolución. Una vez fría la disolución, se añadió el agente polimerizante, el cual estaba constituido por la mezcla de 25 µl de TEMED (SIGMA T-7024) y 250 µl de una disolución de persulfato de amonio (SIGMA A-3678) preparada pesando 0,1 g y disolviéndolos en 1 ml de agua Milli-Q.

La mezcla se vertió entre los cristales que actúan como molde del gel evitando la formación de burbujas y se dejó polimerizar. Transcurridas 8 horas se desmoldó el gel, y se colocó sobre el aparato de TGGE. En cada pocillo del gel se cargó con 5 µl de muestra mezclada con 1,5 µl de buffer de carga (5X). Se conectaron los electrodos, se eligió el gradiente de temperatura y se dejaron correr las muestras a través del gel durante 18 horas.

Se utilizaron 2 programas con diferentes gradientes de temperaturas que optimizaron la separación de muestras según los cebadores específicos para grupos bacterianos concretos. Estos programas se describen en las siguientes tablas:

Tabla III.5. Primer programa de gradiente de temperatura

	MIGRACIÓN INICIA DE LAS MUESTRAS	ESTABLECIMIENTO DEL GRADIENTE DE TEMPERATURA	SEPARACIÓN DE MUESTRAS
Temperatura inicial de gradiente: L0	20°C	43°C	43°C
Temperatura final de gradiente: L10	20°C	63°C	63°C
Voltaje	300 V	0 V	125 V
Duración	18 min	10 min	18 h

Tabla III.6. Segundo programa de gradiente de temperatura

	MIGRACIÓN INICIA DE LAS MUESTRAS	ESTABLECIMIENTO DEL GRADIENTE DE TEMPERATURA	SEPARACIÓN DE MUESTRAS
Temperatura inicial de gradiente: L0	20°C	43°C	43°C
Temperatura final de gradiente: L10	20°C	53°C	53°C
Voltaje	300 V	0 V	125 V
Duración	18 min	10 min	18 h

Terminado este proceso, se retiró el gel y fue deshidratado con 500 ml de una mezcla de etanol (40%), ácido acético (5%) y agua Milli-Q, durante 4 horas, posteriormente se realizaron 4 lavados de 45 minutos cada uno con 500ml de agua Milli-Q en agitación suave.

Los geles se tiñeron siguiendo un protocolo de tinción de plata para aumentar la sensibilidad de la detección, empleando el kit Gelcode Color Silver Staín (Pierce, USA). Para conservar el gel este se colocó en una mezcla de glicerol (5%) y agua Milli-Q, durante 10 minutos en agitación suave, y se dejó secar al aire.

El análisis de clusters, de los patrones de bandas obtenidos mediante TGGE, se llevó a cabo con el programa Gel Compar II vs.5.101 [*Applied Maths, Bélgica*]. Los patrones de bandas se compararon utilizando un índice de similitud dependiente de la asignación de bandas, basado en el coeficiente de correlación de Dice. Este coeficiente relaciona el número de bandas presentes en cada carril con el número de bandas comunes entre los carriles.

Los dendrogramas que relacionan la similitud de los distintos perfiles de bandas de las muestras se construyeron mediante el método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*). Para la evaluación de la fiabilidad del dendrograma, se utilizó el método del coeficiente de correlación cofenética, que expresa la consistencia de un cluster calculando la correlación entre similitudes del dendrograma y la matriz de distancia por pares. Es un método estadístico que evalúa la fiabilidad de las ramificaciones que refleja el dendrograma [*Sokal et al. 1962*].

Reamplificación de las bandas separadas mediante TGGE: Las bandas individuales visualizadas en los geles mediante tinción de plata se punzaron en su parte central con una punta de pipeta estéril, y el fragmento así extraído se suspendió en 10 µl de agua bidestilada grado PCR, en tubos de 0,2 ml para PCR. Partiendo de estos fragmentos como molde, se

efectuó la reamplificación de cada banda individual mediante PCR, siguiendo el mismo procedimiento ya descritos.

Los productos de PCR reamplificados fueron purificadas mediante el kit de extracción Quiaex II (Quiagen), y el ADN fue resuspendido en un volumen final de 20 µl de agua MilliQ estéril. Los productos así purificados fueron secuenciados, empleando como cebadores los mismos utilizados para su reamplificación.

Análisis informático de las secuencias: Los datos de secuencia de ADN obtenidos fueron analizados y traducidos a secuencia de proteína (en el caso del gen amoA) con los programas informáticos de libre distribución Chromas v. 1.51. y Generunner v. 3.0.5. Para el alineamiento y la comparación de las secuencias de ADN o proteína de los distintos fragmentos obtenidos, se emplearon las herramientas de biocomputación WU-BLAST-n y WU-BLAST-x, v. 2.0 todas disponibles en el servidor web del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk). El programa Clustal X v. 1.8 fue utilizado para la generación de alineamientos de las secuencias.

III.4.3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

III.4.3.1. Humedad

La humedad de un suelo se define como la cantidad de agua que existe en un suelo, referida en porcentaje (% p/p). Para ello se secaron las muestras de suelo, a 105°C durante 24 horas, en viales de vidrio previamente tarados. El porcentaje de humedad se determinó por gravimetría.

III.4.3.2. TPH

El análisis de hidrocarburos totales (TPH) se determinó por gravimetría según la norma EPA 8015. La extracción se realizó con 25g de suelo en matraces de 250 ml con 50 ml de hexano/acetona (1:1), los matraces se agitaron a 100 rpm durante 5 minutos (agitador modelo P Selecta Rotavit), después se sometieron al ultrasonido durante 5 minutos (modelo P Selecta Ultrasons). La solución se filtró a través de papel de celulosa, recogiendo el filtrado en un nuevo matraz (250 ml), se añadió 0,1 g sodio-sulfato-anhídrido, se filtró (papel de celulosa) en un balón previamente pesado. Los balones se llevaron al rotavapor, a 90 rpm (modelo Laborota 4000 efficient -Heidolph-) y una vez eliminado el disolvente, se procedió a

pesar los balones nuevamente. La diferencia de pesado corresponde a la concentración de TPH.

III.4.3.3. Fracción de hidrocarburos y biomarcadores

La mezcla de hidrocarburos extraídos según se ha descrito en el apartado anterior, se disolvió en cloroformo para su determinación por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Cada muestra se analizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie II, 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 5972 en modo SCAN (barrido), los resultados obtenidos se compararon con un sistema de datos HP Chemstation que posee un librería Wiley 275 con aproximadamente 270.000 espectros de masa (EPA. 1996).

III.4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales se sometieron a tratamiento estadístico, empleando el programa SPSS14.0 para MS-Windows, Canoco 4,5 y Primer 6. El tratamiento consistió en:

- ↳ Cálculo de la media y desviación estándar de los parámetros microbiológicos y químicos a partir de los valores obtenidos en cada medición de las muestras por triplicado.
- ↳ Análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía o multifactorial con interacción según la naturaleza de cada experimento.
- ↳ Test de Tukey entre medias y test de rango múltiple (*t-Student*) para determinar la influencia por separado de los factores de variación en los análisis multifactoriales.
- ↳ Análisis multiparamétrico utilizando métodos de ordenación canónica para determinar la influencia de los tratamientos en los diferentes parámetros de evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biodegradación es la manera natural de reciclar los residuos por descomposición de la materia orgánica y/o inorgánica por medio de los organismos vivos [Gan et al 2009]. La biorremediación es una tecnología que estimula la actividad microbiana y, en consecuencia, acelera el proceso natural de degradación de un compuesto contaminante. El uso abundante y ubicuo del petróleo y sus derivados hacen que sea fácil encontrar terrenos contaminados por hidrocarburos casi en cualquier lugar, con concentraciones muy variadas, lo que podría hacer de la biorremediación además de una técnica sencilla y económica, una técnica útil.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la contaminación por hidrocarburos supone un aumento en la concentración de carbono orgánico y en consecuencia un incremento en la relación C/N que limita el crecimiento y en consecuencia la actividad microbiana. Por ello, la aplicación de fertilizantes nitrogenados es una de las herramientas más eficaces para lograr la biorremediación de un suelo contaminado por hidrocarburos [Xu et al. 2005]. Igualmente, debido a la naturaleza hidrofóbica de estos contaminantes la adición de surfactantes que aumenten la biodisponibilidad suele ser en ocasiones de gran utilidad para acelerar el proceso de biorremediación [Calvo et al. 2009; Li et al 2009]. Sin embargo, en general la eficacia de estos tratamientos no es suficiente para recuperar totalmente el suelo contaminado, por lo que es aconsejable el uso de tratamientos combinados en los que se utilicen distintos bioestimulantes con diferentes mecanismos de acción. En este proyecto se ha estudiado la eficacia de la asociación de distintos tratamientos combinados con un fertilizante inorgánico N/P/K (nitrógeno, fósforo y potasio). Se han diseñado 4 tipo de tratamientos, así se ha combinado el fertilizante con un surfactante (Surfactante IVEY), con un agente estructurante de naturaleza orgánica (BIOREM), con un co-sustrato ETANOL y con una oxidación química realizada como tratamiento previo a la adición del fertilizante.

Para evaluar la eficacia de los tratamientos y establecer las mejores condiciones de aplicabilidad se han realizado ensayos de biotratabilidad a escala de laboratorio y ensayos a escala de planta piloto. Se han tenido en cuenta como puntos de análisis la evolución de los parámetros biológicos (microorganismos heterótrofos, bacterias degradadoras, actividad deshidrogenada y producción de CO₂.) y el comportamiento de los parámetros químicos

(hidrocarburos totales, fracciones de hidrocarburos y biomarcadores). Como ultimo apartado se describen los resultados obtenidos en los estudios de biodiversidad microbiana realizados en la planta piloto.

IV.1. ENSAYOS DE BIOTRATABILIDAD EN MATRACES. FASE I

Como se ha mencionado anteriormente, la viabilidad del proceso de biorremediación necesita de ensayos en microcosmos que direccionan la extrapolación de los resultados en laboratorio a ensayos a escala real. En consecuencia, los estudios en microcosmos constituyen un estadio intermedio ineludible en un correcto planteamiento, no sólo en procesos de biorremediación, sino en cualquier tecnología ambiental [Viñas *et al.* 2005].

La primera fase de los ensayos realizados, se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 500 ml a los que se adicionaron 250 g de suelo. Estos estudios se diseñaron para comparar la eficacia de los tratamientos combinados utilizando distintas dosis de agentes bioestimulantes en dos suelos diferentes. El suelo I es un suelo franco-arcilloso contaminado con 20.000 mg/kg de diesel en el laboratorio, y el suelo II es un suelo de textura arcillosa que fue suministrado por la empresa AG Ambiental ¹, que procede de terrenos contaminados con hidrocarburos.

Los parámetros de evaluación se presentan en dos apartados: los parámetros microbiológicos y los parámetros químicos. Posteriormente con todos los resultados obtenidos se determinó cuales tratamientos serían los estudiados en la segunda fase del estudio.

IV.1.1. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DURANTE EL TRATAMIENTO

Como parámetros microbiológicos se determinó la evolución de la microbiota total heterótrofa y microbiota degradadora, la actividad deshidrogenasa y la producción de CO₂.

¹ AG Ambiental, empresa participante en este proyecto.

En primer lugar, el crecimiento de los microorganismos heterótrofos y degradadores se utilizó como herramienta de seguimiento de los microorganismos activos en el proceso de biorremediación relacionándolos con la degradación de los hidrocarburos.

Las figuras IV1-4 muestran el recuento microbiano (aerobios totales y degradadores) en cada uno de los ensayos realizados con el suelo I. En todos los casos se han comparado los resultados de los tratamientos combinados, con el control (suelo I sin contaminar), la ATENUACIÓN NATURAL, (suelo contaminado sin adición de ningún estimulante) y tratamiento simple con fertilizante NPK. Se realizó un análisis de comparaciones multivariante utilizando el estadístico Tukey con un grado de significancia de 0,05 para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

El suelo I supone una contaminación reciente, por lo que las poblaciones microbianas autóctonas deben adaptarse a la presencia del contaminante y a la adición de los bioestimulantes. Al comparar el experimento control con los demás tratamientos estudiados, puede observarse como la adición del diesel originó, en general, una estimulación de la población microbiana al final de tiempo de incubación (Figura IV.1). Esto se confirma al obtener un estadístico Tukey inferior al 0.000 que indica que existe diferencia significativa entre en control y los demás tratamientos.

Por otra parte, se observó que la ATENUACIÓN NATURAL y el tratamiento con fertilizante NPK estimuló el crecimiento microbiano originando un aumento de más de 1 logaritmo en el número de microorganismos heterótrofos, a partir de los 7 días de incubación, y se obtuvieron diferencias significativas con los tratamientos respecto al Control ($p=0.000$), NPK+BIOREM 1 ($p=0.000$), NPK+ETANOL 1 ($p=0.029$), NPK+IVEY 1 ($p=0.019$) y NPK+IVEY 2 ($p=0.045$) para los dos casos.

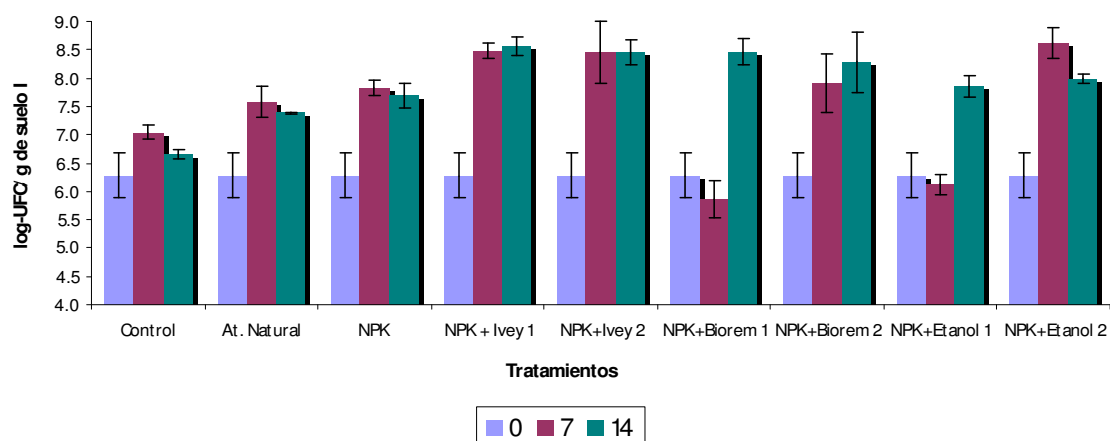


Figura IV.1. Recuento de la microbiota total heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. *Control*, *ATENUACIÓN NATURAL*, *NPK*, *NPK+IVEY 1*, *NPK+IVEY 2*, *NPK+BIOREM 1* y *NPK+BIOREM 2* *NPK+ETANOL 1* y *NPK+ETANOL 2*.

Con respecto a la influencia de los tratamientos combinados, la adición del surfactante IVEY (a ambas concentraciones) produjo un incremento de aproximadamente dos órdenes de magnitud, con valores promedio finales entre 8 y 8,6 log UFC/g. El comportamiento frente al BIOREM y al ETANOL dependió de la concentración empleada. Así tanto el BIOREM 1 como el ETANOL 1 estimularon el crecimiento microbiano al final del periodo de incubación, alcanzando valores similares al resto de los tratamientos. Estos cuatro tratamientos combinados obtuvieron diferencias significativas inferiores a 0.05 entre ellos (Figura IV.1).

El recuento de la microbiota potencialmente degradadora (microbiota degradadora), considerada como aquellos microorganismos capaces de crecer en un medio de cultivo sólido adicionado con 1% de diesel se muestra en la figura I.V.2. Los resultados variaron desde 5,3 log UFC/g como valor inicial a valores comprendidos entre 7,5 a 8 log UFC/g al final del periodo de incubación.

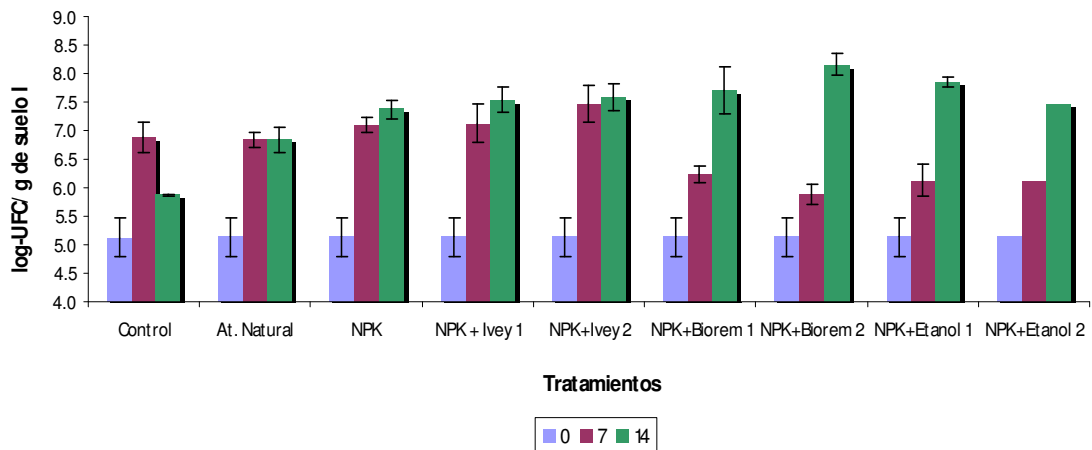


Figura IV.2. Recuento de la microbiota degradadora en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. *Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY 1, NPK+IVEY 2, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2 NPK+ETANOL 1 y NPK+ETANOL 2.*

El recuento inicial de la microbiota degradadora en el suelo I fue un logaritmo inferior a los microorganismos heterótrofos, valores que al final del tratamiento se incrementaron hasta magnitudes cercanos a 7. Tras 14 días de tratamiento, existen diferencias estadísticamente significativas (Tukey<0,05) entre el control ($p=0.000$) y todos los tratamientos incluido la ATENUACIÓN NATURAL($p=0.000$). Estos resultados corroboran los expuestos por [Spain et al. 1983] que demuestran, que la llegada del contaminante a un ecosistema, produce el enriquecimiento de la población degradadora.

Por otro lado, al comparar los distintos tratamientos se observó que **la combinación del fertilizante y el surfactante fue la única opción que aceleró dicha estimulación ya que los máximos pudieron detectarse a partir de los 7 días de incubación.** Este tratamiento combinado fue el único que obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,000$) en el análisis comparativo multivariable con respecto a los demás tratamientos.

Otro de los tratamientos combinados que se estudiaron en este trabajo fue la combinación de una oxidación química como pretratamiento, en este caso el REACTIVO FENTON, y un posterior tratamiento con fertilizante NPK, de forma que la oxidación química originaría la ruptura de las moléculas complejas dando lugar a compuestos más sencillos y en consecuencia más fácilmente asimilables por los microorganismos. [Ferrarse et al, 2008].

En estos ensayos, se aplicó el reactivo Fenton como pre-tratamiento y se emplearon dos concentraciones de agente oxidante (H_2O_2), FENTON 1 (2,9ml/g de suelo I; 1,2 ml/g de suelo II) y FENTON 2 (29ml/g de suelo I; 12 ml/g de suelo II). La evolución de la microbiota total heterótrofa y degradadora se muestra en las figuras IV.3 y 4. Ha y que aclarar que la barra con el término previo muestra el resultados del recuento microbiano antes de la acidificación y de la adición del agua oxigenada. Trascurridos unas 48 horas se adiciona el fertilizante NPK, este momento se consideró el tiempo 0.

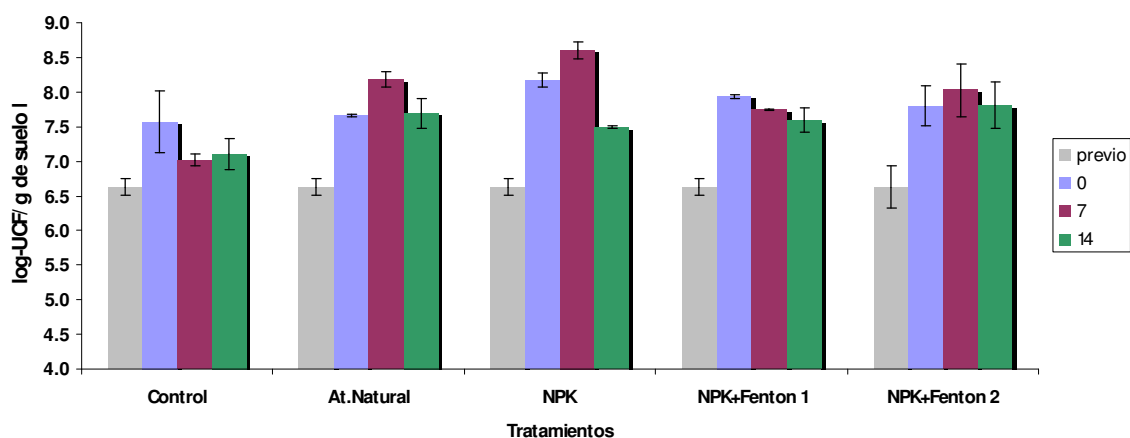


Figura IV.3. Recuento de la microbiota heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+NPK, FENTON 2+NPK.

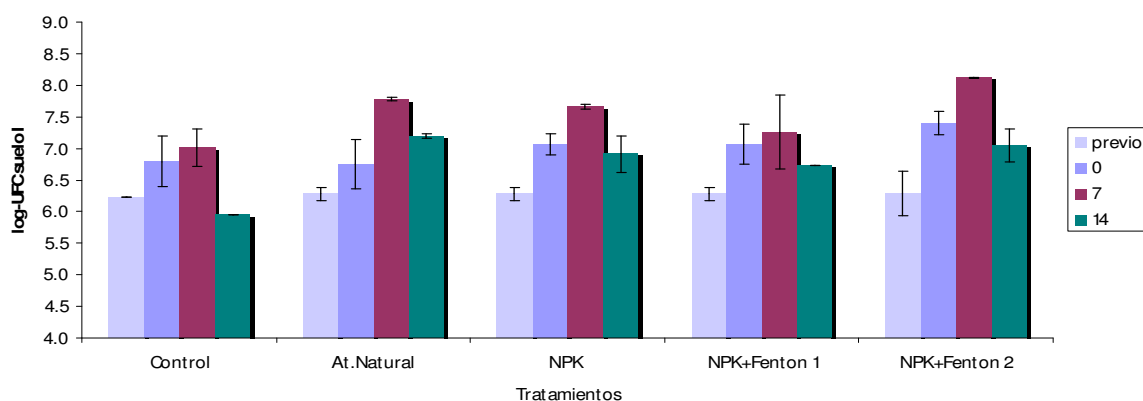


Figura IV.4. Recuento de la microbiota degradadora (b) en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+NPK, FENTON 2+NPK.

El tratamiento con FENTON 1, no mostró diferencias significativas con respecto al control ($p=0,261$), ni con respecto a la ATENUACIÓN NATURAL ($p=0,983$) ni al tratamiento con NPK ($p=0,939$) en el crecimiento de los microorganismos heterótrofos y degradadores después de las 48 horas del pre-tratamiento.

Por otro lado las figuras Iv.5-8. Muestran los resultados obtenidos en el suelo II con respecto al recuento de la microbiota heterótrofa y degradadora,

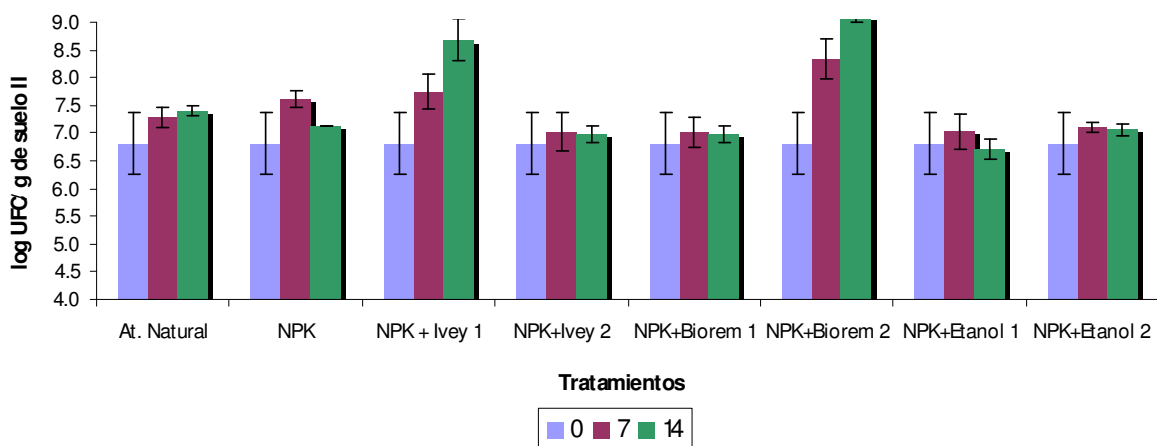


Figura IV.5. Recuento de la microbiota total heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo II contaminado en su origen** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY 1 y NPK+IVEY 2, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2, NPK+ETANOL 1 y NPK+ETANOL 2.

El suelo II mostró valores iniciales más altos de microbiota que el suelo I, correspondiendo a 6,7 log UFC/g de bacterias heterótrofas y de 6,2 log UFC/g para bacterias degradadoras. Al igual que en el suelo I, se realizó un análisis comparativo multivariante para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos y principalmente con la ATENUACIÓN NATURAL y la aplicación del fertilizante NPK como único bioestimulante. El análisis comparativo indicó que existen diferencias significativas entre la ATENUACIÓN NATURAL y los tratamientos NPK+IVEY 1 ($p=0.000$), NPK+BIOREM 2 ($p=0.000$).

En la grafica se puede observar que el número de bacterias heterótrofas y degradadoras fue estimulado únicamente por las dosis bajas de NPK+IVEY1 con un aumento en el número

de bacterias heterótrofas de 6,8 log-UFC/g a 8,7 log-UFC/g y de un valor de 6,2 log-UFC/g a 8 log-UFC/g en los microorganismos degradadores (figura IV.5-6).

Con respecto a la influencia de tratamiento de NPK+BIOREM 2, se observó un incremento de 2 log de UFC en la microbiota heterótrofa con respecto a la ATENUACIÓN NATURAL a los 14 días de tratamiento, los microorganismos potencialmente degradadores mostraron un aumento durante los primeros 7 días con un valor de 8,2 log UFC/g. Sin embargo, al final del tratamiento los valores fueron iguales que los de la ATENUACIÓN NATURAL y el NPK (figura IV.5-6).

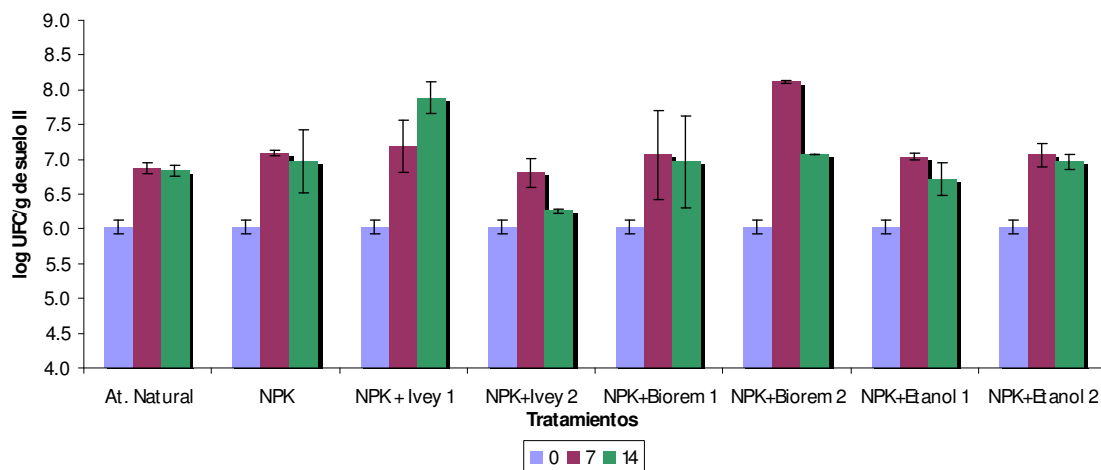


Figura IV.6. Recuento de la microbiota degradadora en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo II contaminado en su origen** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2.

La evolución de la microbiota heterótrofa y degradadora de los tratamientos con FENTON se muestran en las figuras IV 7-8.

En estas graficas se puede observar que la adición de reactivo Fenton 2 origino un aumento en 1 logaritmo el número de microorganismos heterótrofos, a diferencia que el Fenton 1 donde no se observó una diferencia significativa con respecto a los otros tratamientos estudiados. (Figura IV.7)

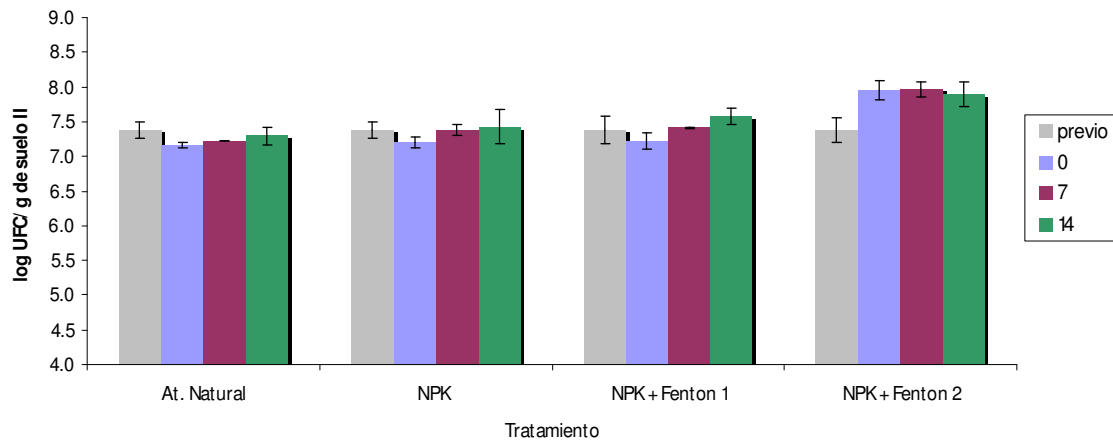


Figura IV.7. Recuento de la microbiota total heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo II contaminado en su origen** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+ NPK, FENTON 2+ NPK.

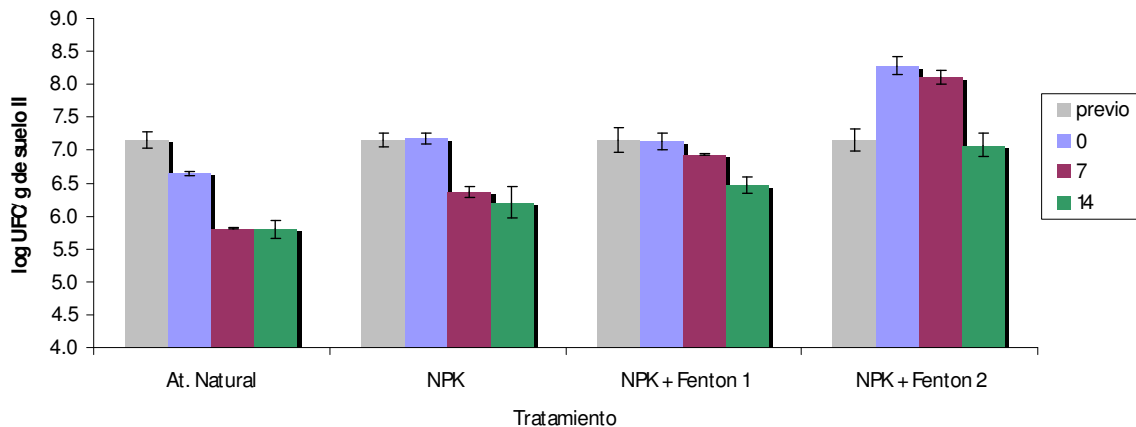


Figura IV.8. Recuento de la microbiota degradadora en los ensayos en matraces erlenmeyer con **suelo II contaminado en su origen** sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+ NPK, FENTON 2+ NPK.

En el pretratamiento Fenton 2, los microorganismos degradadores alcanzaron un valor de 8,4 log-UFC/g, siendo el único tratamiento donde se observó un incremento en la microbiota degradadora ($p=0.000$) Estos resultados se ilustran en la Figura IV.8.

El estudio de la microbiota heterótrofa y degradadora puso de manifiesto que ambos tipos de suelos contienen poblaciones microbianas capaces de soportar un proceso de

biorremediación y que ninguno de los tratamientos aplicados inhibe el crecimiento microbiano. Esto indica que no hay efectos tóxicos para los microorganismos.

Asimismo, los resultados obtenidos demostraron que la respuesta microbiana al tratamiento de biorremediación depende del tipo de suelo, del tipo de contaminante y del tiempo transcurrido desde que tuvo lugar la contaminación. En este sentido y como se ha comentado con anterioridad, los microcosmos construidos con el suelo I fueron contaminados en el laboratorio con la adición de diesel (20.000 mg/kg) por lo que la microbiota tiene que experimentar un proceso de adaptación conducente a un enriquecimiento de microorganismos degradadores. Ello explica el menor crecimiento observado en los microcosmos de atenuación natural, y el efecto positivo en el crecimiento de la microbiota con los tratamientos combinados.

Sin embargo, los microcosmos realizados con el suelo II, contenían un suelo ya contaminado en el que la microbiota ya había experimentado el proceso de adaptación. Ello explica los valores elevados del nº de microorganismos y de la actividad biológica en los experimentos de atenuación natural y el hecho de que sólo dos de los tratamientos aplicados tuvieran una estimulación con respecto al recuento de la microbiota presente en el suelo II.

Estos resultados corroboran los publicados por *paissé et al. [2010]*, donde señalan la capacidad de la microbiota para adaptarse a las nuevas condiciones nutricionales después de una contaminación con hidrocarburo llevando a cabo un proceso de biorremediación natural.

Con respecto a la combinación de los procesos biológicos y la oxidación química, los resultados obtenidos con el tratamiento FENTON antes de un proceso de biorremediación no reducen la población microbiana heterótrofa ni la degradadora, tal como cabría esperar de un tratamiento químico [*Ndjou'ou et al. 2006*]. Estos resultados sugieren que la oxidación química de los hidrocarburos producida por el tratamiento FENTON bajo las condiciones experimentales ensayadas en este estudio puede ser compatible con la oxidación biológica facilitando la disponibilidad de los hidrocarburos en moléculas más fácilmente degradables [*watt et al. 2000*].

La actividad deshidrogenasa se puede relacionar con la actividad degradadora (oxidativa) de cualquier compuesto, en este caso de los hidrocarburos. Dicha actividad está relacionada con la composición del contaminante, la complejidad de sus moléculas y la disponibilidad

para realizar su oxidación, por ello en este estudio se ha seleccionado la actividad deshidrogenasa como indicador de la actividad biológica y potencial indicador de la actividad degradadora de la microbiota autóctona del suelo.

Por otro lado, para conocer el efecto de la contaminación sobre dicha actividad enzimática y valorar el efecto de los tratamientos de biorremediación se han establecido tres índices, $ID_{i24h/n}$ y $ID_{f14d/n}$, $ID_{f14d/i24h}$

$$ID_{i24h/n} = \frac{\text{Valor de la deshidrogenasa al inicio del proceso}}{\text{Valor de la deshidrogenasa del suelo no contaminado}}$$

$$ID_{f14d/n} = \frac{\text{Valor de la deshidrogenasa al final del proceso}}{\text{Valor de la deshidrogenasa del suelo no contaminado}}$$

$$ID_{f14d/i24h} = \frac{\text{Valor de la deshidrogenasa al final del proceso}}{\text{Valor de la deshidrogenasa al inicio del proceso de biorremediación}}$$

La tabla IV.1 muestra los valores de estos índices para los suelos I y II y para todos los tratamientos estudiados en este apartado. D_n corresponde al valor de la deshidrogenasa del suelo I sin contaminar que fue de 29,9 TPF/g. En este ensayo no fue posible obtener este valor para el suelo II ya que era un suelo real contaminado en su origen, por tanto los valores del índice $ID_{f/n}$ para el suelo II son valores teóricos obtenidos considerando la deshidrogenasa del suelo I no contaminado.

En el suelo I, al comparar la actividad deshidrogenasa al inicio y final de los tratamientos se pudo observar que sólo en los microcosmos en los que se aplicó el tratamiento combinado NPK y BIOREM 2 hubo un aumento significativo (P Tukey <0.05) variando desde un valor inicial de 73,3 TPF/g a 443,6 TPF/g a los 14 días, obteniendo un $ID_{f14d/n}$ de 14,84. Este aumento en la actividad metabólica coincide con el crecimiento en la microbiota heterótrofa y degradadora. En el caso del tratamiento combinado NPK más surfactante IVEY® (a las dos

concentraciones utilizadas), hubo pequeñas variaciones entre el final y el inicio de los tratamientos.

Tabla IV.1. Índice de la actividad deshidrogenasa en los suelo I y Suelo II.

TRATAMIENTO	SUELO I			SUELO II		
	ID _{i24h/n} D _n =29,9	ID _{f14d/n} D _n =29,9	ID _{f14d/i24h}	ID _{i24h/n} D _n =29,9	ID _{f14d/n} D _n =29,9	ID _{f14d/i24h}
Control		2,5			3,0	
AT. NATURAL	2,46	0,40	0,16	3,01	2,32	0,77
NPK	2,46	0,44	0,18	14,37*	10,07	0,70
NPK+ IVEY 1	1,89	2,47	1,31	13,75*	12,43	0,90
NPK+ IVEY 2	2,42	2,10	0,87	13,27*	3,13	0,23
NPK+ BIOREM 1	2,46	0,82	0,33	0,46	2,5	5,5
NPK+ BIOREM 2	2,46	14,84*	6,02	0,48	13,45	27,94
NPK+ ETANOL 1	2,46	0,39	0,16	0,15	1,90	12,93
NPK+ ETANOL 2	2,46	0,22	0,09	0,73	2,32	3,17
FENTON 1+NPK	3,48	2,41	0,69	3,72	2,39	0,64
FENTON 2+NPK	0,55	1,76	3,20	3,58	4,23	1,13

*la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos.

En el suelo I, al comparar la actividad deshidrogenasa al inicio y final de los tratamientos se pudo observar que sólo en los microcosmos en los que se aplicó el tratamiento combinado NPK y BIOREM 2 hubo un aumento significativo (P Tukey <0.05) variando desde un valor inicial de 73,3 TPF/g a 443,6 TPF/g a los 14 días, obteniendo un ID_{f14d/n} de 14,84. Este aumento en la actividad metabólica coincide con el crecimiento en la microbiota heterótrofa y degradadora. En el caso del tratamiento combinado NPK más surfactante IVEY® (a las dos concentraciones utilizadas), hubo pequeñas variaciones entre el final y el inicio de los tratamientos.

Por otro lado, la adición de ETANOL como co-sustrato supuso una disminución importante de la actividad deshidrogenasa obteniéndose valores de 11,5 TPF/g y 6,5 TPF/g según la concentración de ETANOL utilizada. Sin embargo, en ambos casos se observó un incremento significativo del número de microorganismos y un aumento de la producción de CO₂. Este

comportamiento sugiere que la población microbiana está utilizando el ETANOL como sustrato fácilmente metabolizable.

Respecto al comportamiento de los microcosmos tratados con reactivo FENTON se producía un aumento de la actividad deshidrogenasa que disminuía tras la adición de fertilizante NPK, resultados opuestos a los obtenidos con dosis más elevadas de reactivo FENTON, donde se obtuvieron los valores más bajos de actividad deshidrogenasa tras la adición del agente oxidante. Estos hechos parecen indicar que a dosis bajas se produce una oxidación parcial de los hidrocarburos que estimula la actividad oxidativa microbiana. Por el contrario, a dosis más elevadas se produciría una inhibición inicial de la microbiota. Ambos hechos parecen coincidir con los recuentos de microorganismos totales a tiempo inicial.

Los resultados observados en el suelo II mostraron, en general, valores elevados de actividad deshidrogenasa, con una diferencia significativa en los tratamientos NPK, NPK+IVEY I y NPK+IVEY II alcanzando valores de 429,7 TPF/g, 411,1 TPF/g y 396,9 TPF/g respectivamente. Por otro lado, resaltar que la actividad deshidrogenasa fue muy superior a la presentada por el suelo I. En particular, el tratamiento de NPK+BIOREM 2 obtuvo resultados similares en ambos suelos incrementando su actividad en aproximadamente 350 unidades de TPF/g.

En resumen, la actividad deshidrogenasa mostró una significativa actividad biológica en los microcosmos contruidos con el suelo contaminado en su origen, corroborando que las poblaciones microbianas predominantes, son poblaciones adaptadas a la presencia de hidrocarburos. También los ensayos con microcosmos realizados en esta investigación mostraron la influencia de la adición del BIOREM como agente estructurante con el objetivo de incrementar la porosidad y la difusión de oxígeno del suelo y por consiguiente su actividad biológica. Esto se puede corroborar con lo descrito por *Rhykerd et al [1999]* donde llegaron a la conclusión de que los agentes estructurantes y el volteo mejoran la biorremediación, probablemente debido a la reducción del tamaño de los agregados saturados del petróleo, que aumenta la exposición de los hidrocarburos incrementando la actividad biológica. [*Vasudevan et al. 2001*].

Balba et al [1998] señalan que la actividad deshidrogenasa depende de todas las actividades metabólicas de los microorganismos del suelo, lo que podría explicar las fluctuaciones en los valores obtenidos de esta enzima en los tratamientos estudiados,

también concluyen que la variación de estos valores en diferentes tipos de suelos no siempre refleja el número total de microorganismos viables. Esto parece explicar las diferencias obtenidas entre las densidades de microorganismos heterótrofos y los bajos valores de las enzimas deshidrogenasa. Además, muchos factores inhiben la actividad de la deshidrogenasa del suelo como nitrato, nitrito y cloruro férrico. Estos iones pueden actuar como una alternativa de receptores de electrones.

Los ensayos respirométricos ha sido otro de los parámetros utilizado para evaluar la actividad metabólica de la población microbiana. En este sentido, *Margesin et al.* [2000] demostraron que los bajos niveles de CO₂ podrían estar directamente relacionados con una baja concentración de hidrocarburos. Asimismo, estos autores reafirman la utilidad de medir este parámetro que depende principalmente de la concentración y composición de los hidrocarburos, como de otros factores como la edad de la contaminación, las características físico-químicas del suelo, la textura, pH, contenido de humedad, etc. Estos resultados se muestran en la tabla IV.2

Tabla IV.2. Producción de CO₂ a las 24h de incubación en el suelo I y suelo II.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE PRODUCCIÓN DE CO ₂	
	Suelo I <i>T</i> _{0 días} : 0,05±0,008	Suelo II <i>t</i> _{0 días} : 0,14±0,01
AT. NATURAL	0,03±0,001	0,16±0,03
NPK	0,18±0,034	0,21±0,03
NPK+ IVEY 1	0,07±0,010	0,17±0,03
NPK+ IVEY 2	0,10±0,011	0,13±0,00
NPK+ BIOREM 1	0,05±0,034	0,21±0,04
NPK+ BIOREM 2	0,99±0,185*	0,47±0,06*
NPK+ ETANOL 1	1,83±0,186*	0,18±0,02
NPK+ ETANOL 2	0,56±0,126*	0,19±0,02
FENTON 1+NPK	0,04±0,007	0,16±0,01
FENTON 2+NPK	0,05±0,003	0,16±0,01

*la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos.

En el suelo II se observó que únicamente el tratamiento de NPK+BIOREM 2 aumenta la cantidad de CO₂ desde un valor de 0.14% a un valor final de 0.47%, (P Tukey =0,001) este tratamiento también incrementa la producción de CO₂ en el suelo I. Los demás tratamientos mantienen la cantidad de CO₂ entre 0,14 y 0,20%.

Los tratamientos que utilizan ETANOL como co-substrato para el proceso de degradación aumentaron la actividad respiratoria en el suelo I como precursores de la biodegradación, sin embargo esto no ocurre en el suelos II que ya llevan un proceso natural de degradación, donde los valores de CO₂ se mantienen constantes (Tabla IV.2). Este incremento en la producción de CO₂ en el suelo con una contaminación reciente obteniendo valores de 1,83% y 0,565 en los tratamientos NPK+ETANOL 1 y NPK+ETANOL 2 respectivamente (p Tukey=0,000; 0,004), puede ser debido a que el ETANOL actúa como co-sustrato al ser fácilmente asimilable, incrementando la microbiota del suelo y en consecuencia el potencial a la biodegradación de los componentes del contaminante. Comportamiento de los parámetros químicos

IV.1.1.1. Humedad

La humedad es uno de los parámetros importantes en el ecosistema edáfico. Se ha demostrado que en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, es necesario que la humedad alcance valores superiores al 20% para que la actividad microbiana sea óptima [Rhykerd et al. 1999]. Este factor es de suma importancia sobre todo en zonas de climas áridos o semiáridos, por ello durante todos los ensayos se ha realizado un seguimiento periódico del porcentaje de humedad [Calvo et al, 2009]. Los datos obtenidos en estos ensayos se muestran en la tabla IV.3 para los dos suelos estudiados.

Tabla IV.3. Porcentaje de humedad en el suelo I y suelo II.

TRATAMIENTOS	PORCENTAJE DE HUMEDAD			
	Suelo I		Suelo II	
	T ₀ días	t ₁₄ días	T ₀ días	t ₁₄ días
AT. NATURAL	24,75 ± 0,5	22,51±2,3	24,8±0,0	24,4±0,1
NPK	27,24±1,2	21,04±2,2	25,9±1,0	19,0±1,7
NPK+ IVEY 1	24,71±0,5	23,76±0,4	34,2±0,8	33,5±1,0
NPK+ IVEY 2	24,81±0,1	24,49±0,5	35,1±0,4	33,9±0,8
NPK+ BIOREM 1	23,29±3,5	20,51±0,1	28,2±0,6	27,8±0,1
NPK+ BIOREM 2	27,97±0,3	28,13±1,4	25,7±0,3	22,0±0,8
NPK+ ETANOL 1	26,78±0,4	18,85±0,5	23,3±0,2	25,9±1,6
NPK+ ETANOL 2	27,18±2,5	19,74±3,5	29,8±0,1	24,6±2,2
FENTON 1+NPK	34,32±0,1	29,87±1,6	30,7±0,2	41,4±0,1
FENTON 2 +NPK	36,99±1,1	33,89±0,8	34,6±0,5	38,4±2,6

Los datos obtenidos muestran que los porcentajes de humedad estuvieron dentro del rango óptimo para el proceso de biorremediación (20-80%), indicando que la adición de los

diferentes tratamientos mantenía un nivel de humedad en ambos tipos de suelos. Sin embargo, el análisis estadístico univariante de la humedad mostró que hay diferencias significativas entre los valores iniciales y finales en el suelo I, a diferencia del suelo II donde no se encontraron diferencias significativas. (Tabla IV.3)

IV.1.2. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos usualmente degradan primero a los hidrocarburos lineales, luego los alcanos ramificados, aromáticos y a los isoprenos como el Pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) y Fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano) considerados biomarcadores por sus bajas velocidades de degradación respecto a sus homólogos no ramificados [Balba et al. 1998].

El rendimiento de la degradación de hidrocarburos fue evaluado mediante la determinación gravimétrica de hidrocarburos totales TPH, y el análisis cromatográfico de los alcanos lineales, alcanos ramificados y los biomarcadores (Pristano y Fitano) presentes en el suelo al inicio y final del tratamiento, para estimar el porcentaje de degradación y los índices de eficacia de cada tratamiento con respecto a la ATENUACIÓN NATURAL. Estos índices se han establecido determinando el cociente entre el porcentaje de degradación de los tratamientos con respecto a la ATENUACIÓN NATURAL.

La figura IV.9. muestra los porcentajes de eliminación de TPH y la tabla IV.4. los porcentajes de degradación de las fracciones de hidrocarburo y los índices de eficacia obtenidos en el suelo I.

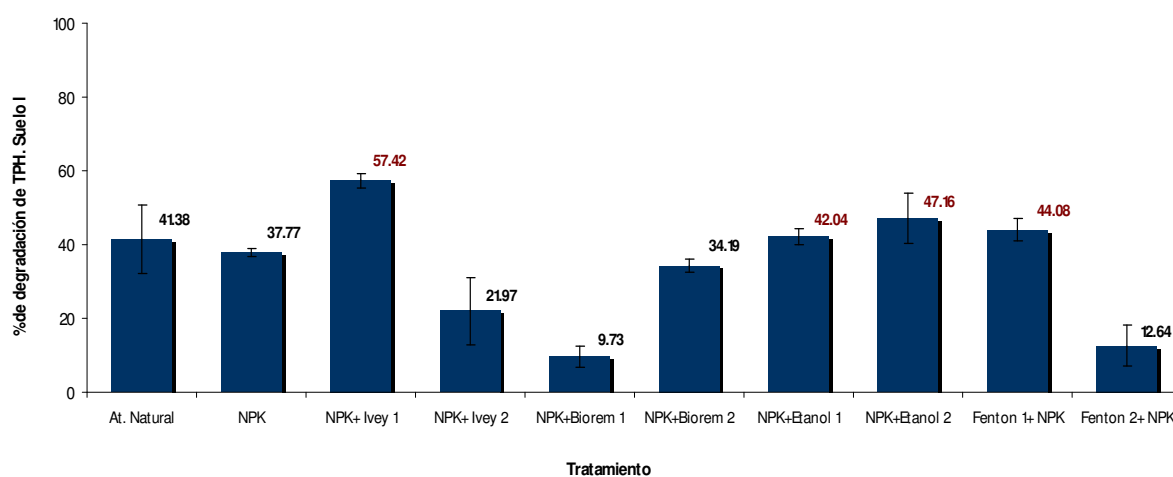


Figura IV.9. Porcentaje de degradación de Hidrocarburos totales TPH obtenidos a los 14 días de tratamiento en el suelo I.

Cabe indicar que la ATENUACIÓN NATURAL con el suelo I, obtuvo elevados porcentajes de eliminación de hidrocarburos, tanto en términos de TPH como en las distintas fracciones analizadas, lo que sugiere que la estimulación de la microbiota degradadora originada por la contaminación ha permitido, en las condiciones experimentales ensayadas, obtener una tasa de degradación natural elevada.

Al realizar el análisis multivariante comparando la ATENUACIÓN NATURAL con los demás tratamientos no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de degradación de TPH obtenidos en estos ensayos. Sin embargo, hay que destacar que el tratamiento combinado de NPK+IVEY 1 obtuvo el mayor porcentaje de degradación de TPH siendo este un 57%. Con respecto a la degradación de las fracciones de hidrocarburos se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de degradación de alcanos en los tratamientos con NPK+IVEY 1 (p Tukey=0,000) y NPK+IVEY 2 (P Tukey=0,005)

Tabla IV.4. Porcentajes e índices de correlación de la degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos en el suelo I después de los tratamientos.

TRATAMIENTO	ALCANOS		ALCANOS RAMIFICADOS		FITANO	
	%	Ic	%	Ic	%	Ic
AT. NATURAL	64,0±1,29	1,0	63,8±2,05	1,0	80,0±1,67	1,0
NPK	36,5±1,09	0,5	66,5±0,57	1,0	66,8±0,57	0,8
NPK+ IVEY 1	84,7±0,73*	1,3	71,1±1,33	1,1	46,0±2,48	0,6
NPK+ IVEY 2	73,1±3,18*	1,1	7,9±10,90	0,1	ND	
NPK+ BIOREM 1	6,9±0,61	0,1	37,3±0,41	0,6	25,3±0,49	0,3
NPK+ BIOREM 2	42,7±0,07	0,7	64,1±0,04	1,0	54,3±0,06	0,7
NPK+ ETANOL 1	41,6±0,22	0,6	92,6±0,03*	1,4	69,7±0,12	0,9
NPK+ ETANOL 2	48,9±0,66	0,8	41,6±0,75	0,6	49,6±0,65	0,6
FENTON 1+NPK	41,8±3,25	0,6	47,9±2,91	0,7	43,5±3,16	0,5
FENTON 2+NPK	1,1±0,21	0,1	ND		21,4±0,17	0,3

Ic: Índice de correlación de degradación calculado con la expresión: [% de degradación de tratamiento / % de degradación de la Atenuación Natural]

*diferencia significativa a nivel de 0,05, con diferencia de medias negativa utilizando el estadístico tukey.

En general, la adición del surfactante o agentes tensoactivos mejoran los procesos de biorremediación, ya que facilitan su disolución en la fase acuosa y su desorción de la matriz del suelo o incluso su emulsificación, todo ello se traduce en un aumento de la

biodisponibilidad de estos contaminantes de forma que son más fácilmente asimilables por los microorganismos [Singh *et al.* 2007].

En el suelo II (figura IV.10 y Tabla IV 5) los resultados mostraron que el proceso de ATENUACIÓN NATURAL tenía un bajo rendimiento en la eliminación de hidrocarburos, probablemente debido al agotamiento de sus propiedades nutricionales, debido al prolongado periodo de contaminación. Este hecho parece confirmarse con los resultados obtenidos, puesto que la mayoría de los tratamientos aplicados tiene diferencias significativas (p Tukey < 0,05), superando los porcentajes de eliminación de TPH obtenidos en la ATENUACIÓN NATURAL, excepto los tratamiento NPK+BIOREM 2 y el FENTON 1 + NPK. Los tratamientos NPK y NPK asociado al surfactante IVEY® fueron los más eficaces en términos de TPH. Además es interesante destacar que la eliminación fue superior a la del suelo I, excepto para los ensayos en la ATENUACIÓN NATURAL.

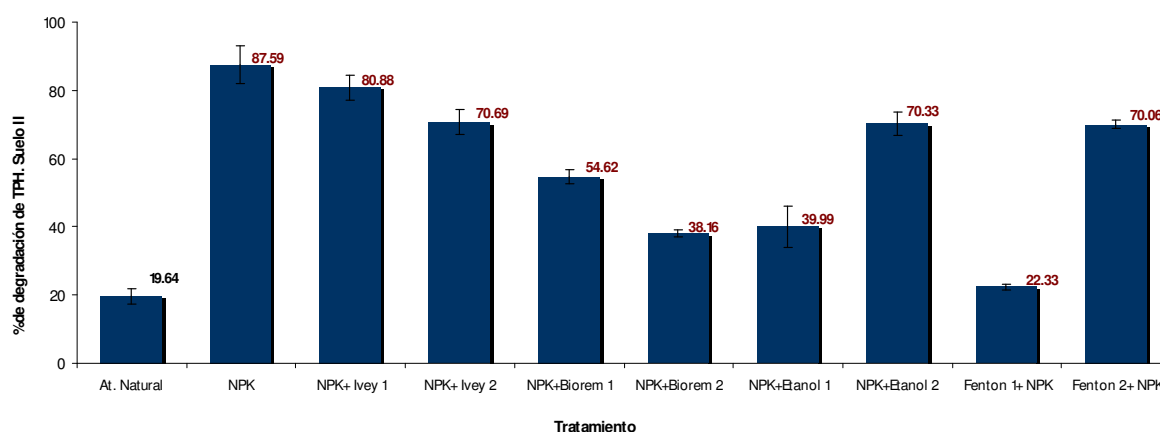


Figura IV.10. Porcentaje de degradación de Hidrocarburos totales TPH obtenidos a los 14 días de tratamiento en el suelo I

Los porcentajes de degradación de las distintas fracciones de hidrocarburos para el suelo II se muestran en la tabla IV.5. Como puede observarse, los valores obtenidos superan el 85% en todas las fracciones estudiadas para el tratamiento con NPK y solo fue superado por el tratamiento NPK+IVEY 1 en la eliminación de alcanos.

Tabla IV.5. Porcentajes y índices de correlación de la degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos en el suelo II después de los tratamientos.

TRATAMIENTOS	ALCANOS		ALCANOS RAMIFICADOS		FITANO	
	%	Ic	%	Ic	%	Ic
AT. NATURAL	25,9±0,20	1	39,9±0,16	1	40,0±0,16	1
NPK	87,8±0,54*	3,4	88,9±0,66*	2,2	91,4±1,05*	2,3
NPK+ IVEY 1	94,1±1,14*	3,5	72,9±5,20*	1,8	73,7±5,06*	1,8
NPK+ IVEY 2	64,6±4,48*	2,5	74,6±3,20*	1,9	78,5±2,72*	1,9
NPK+ BIOREM 1	67,1±0,16*	2,6	56,5±0,21	1,4	62,1±0,18	1,5
NPK+ BIOREM 2	22,6±1,39	0,7	60,6±0,70*	1,5	90,4±0,17*	2,3
NPK+ ETANOL 1	3,7±0,09	0,1	41,9±0,05	1,1	49,6±0,05	1,2
NPK+ ETANOL 2	74,2±0,30*	2,9	75,9±0,28*	1,9	78,4±0,25*	2,0
FENTON 1+ NPK	25,7±0,00	1,0	37,4±0,23	0,9	9,3±0,0	0,2
FENTON 2+ NPK	25,8±0,44	1,0	48,0±5,95	1,2	70,5±0,18*	1,7

Ic: Índice de correlación de degradación calculado con la expresión: [% de degradación de tratamiento / % de degradación de la Atenuación Natural]

*diferencia significativa a nivel de 0,05, con diferencia de medias negativa.

La adición de otros sustratos como ETANOL o BIOREM parece competir como sustrato más fácilmente metabolizables, lo que explicaría su menor rendimiento frente al tratamiento con NPK. Por otro lado, el suelo II parece poseer una microbiota formada por un número elevado de microorganismo degradadores fácilmente estimulables. Varios autores [Toledo et al. 2007; Calvo et al. 2009] han demostrado la capacidad de los microorganismos degradadores de hidrocarburos en producir biosurfactantes o bioemulgentes cuando crecen en presencia de hidrocarburos.

IV.1.3. INTERDEPENDENCIA ENTRE LOS PARAMETROS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS

Los resultados de los ensayos de tratabilidad en matraces obtenidos en esta primera fase, se analizaron mediante un escalonamiento multidimensional que es una técnica multivariante de interdependencia que permitió visualizar como se agrupaban los diferentes tratamientos teniendo como variables dependientes los parámetros biológicos y químicos al final del tratamiento. De este análisis se obtiene la representación de la correlación de las variables en dos dimensiones (Figura I.V.11).

En el diagrama del análisis multivariante, se puede observar que existen tres grupos de tratamientos con diferencias significativas entre ellos. El tratamiento NPK+ETANOL 1, se aleja de los dos grupos claramente formados, este tratamiento se diferencia de los demás por los altos porcentaje de degradación de alcanos ramificados (90%) y producción de CO₂ (1,83%).

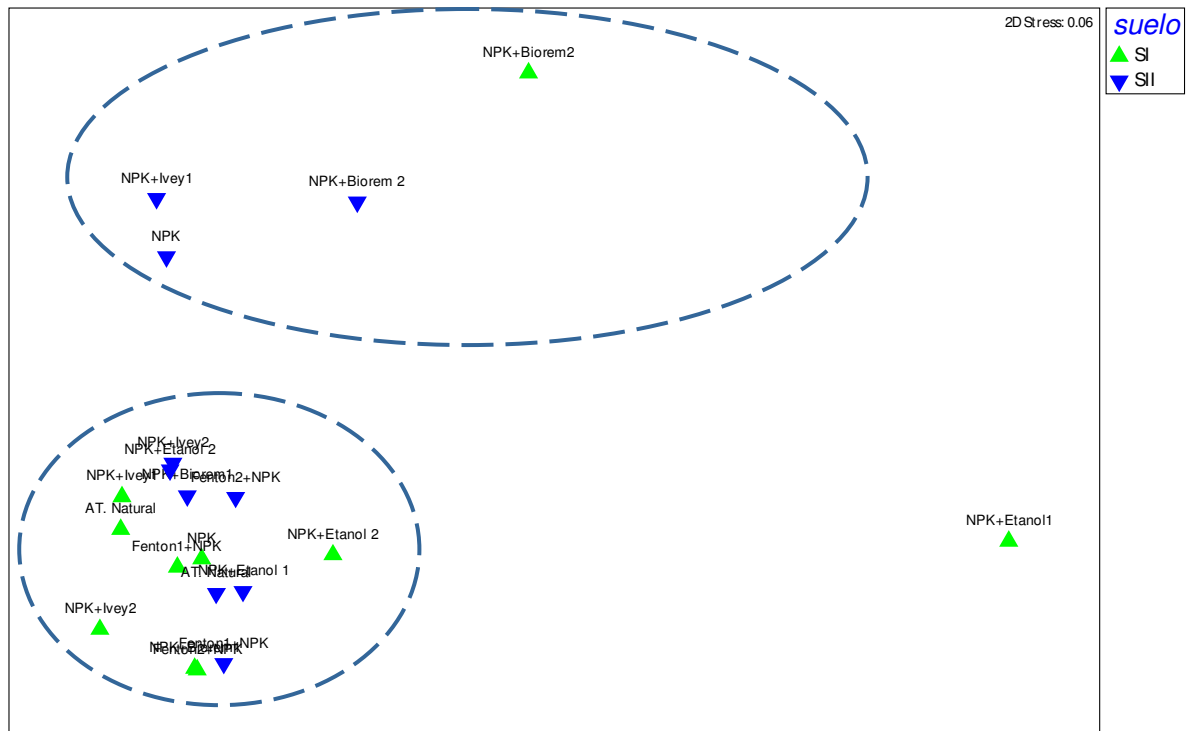


Figura IV.11. Gráfica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante un análisis de escalonamiento multidimensional.

Un segundo grupo donde se agrupan la mayoría de los tratamientos estudiados, no tienen una diferencia significativa entre ellos ya que este grupo de tratamientos están relacionados con las variables biológicas y químicas estudiadas. Por otro lado, los tratamientos que obtuvieron mejores resultados en la degradación de hidrocarburos y se ubican en la parte superior de la grafica, estos tratamientos fueron NPK; NPK+IVEY 1 y NPK+BIOREM 2.

Este análisis multidimensional reitera las conclusiones previas de los resultados descritos en cada uno de los suelos estudiados en los apartados anteriores; con respecto al suelo I. La combinación del fertilizante mas surfactante IVEY® a la concentración de 0.052 ml/kg de suelo podría ser una opción útil para tratamientos de un suelo arcilloso con una contaminación reciente, de igual manera este tratamiento y el NPK obtuvieron los mejores resultados en la remediación de un suelo con un proceso de degradación avanzada.

IV.2. ENSAYO EN MICROCOSMOS EDÁFICOS. (FASE II)

En la fase I anteriormente descrita se estudió la eficacia de los tratamientos de biorremediación analizando 2 concentraciones diferentes de agente bioestimulante, la óptima recomendada por la bibliografía o por el fabricante y una 10 veces inferior. El objetivo fue determinar si dosis inferiores podrían ser igualmente eficaces lo que supondría una reducción de los costos a la hora de una aplicación real del proceso de biorremediación.

Para el diseño de los microcosmos edáficos correspondientes a la fase II de este estudio, se aplicaron las concentraciones más eficaces para cada uno de los productos utilizados y se seleccionó el suelo II, contaminado en su origen por aproximarse más a un modelo real. Los tratamientos seleccionados a partir de los resultados obtenidos del análisis de escalonamiento multidimensional de la fase I, fueron NPK; NPK+IVEY 1; NPK+BIOREM 2 y NPK+ ETANOL 1.

Con respecto a los tratamientos combinados con una oxidación química y la adición del fertilizante, al no obtener una diferencia significativa entre las dos concentraciones de reactivo Fenton utilizado, se escogió la de menor cantidad (FENTON 1 + NPK). Con estos tratamientos se realizaron los ensayos de tratabilidad en microcosmos edáficos con 3 kg de suelo contaminado en su origen (Fase II).

IV.2.1. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS

La cuantificación de la población microbiana heterótrofa y degradadora se muestra en la figura IV.12 a-b. La población heterótrofa inicial fue del orden de 7,2 log-UFC /g de suelo y la degradadora presentó un valor inicial de 6,8 log-UFC/g de suelo. Estos elevados valores muestran una de las características ya mencionadas del suelo II, con una microbiota ya adaptada a la contaminación con hidrocarburos.

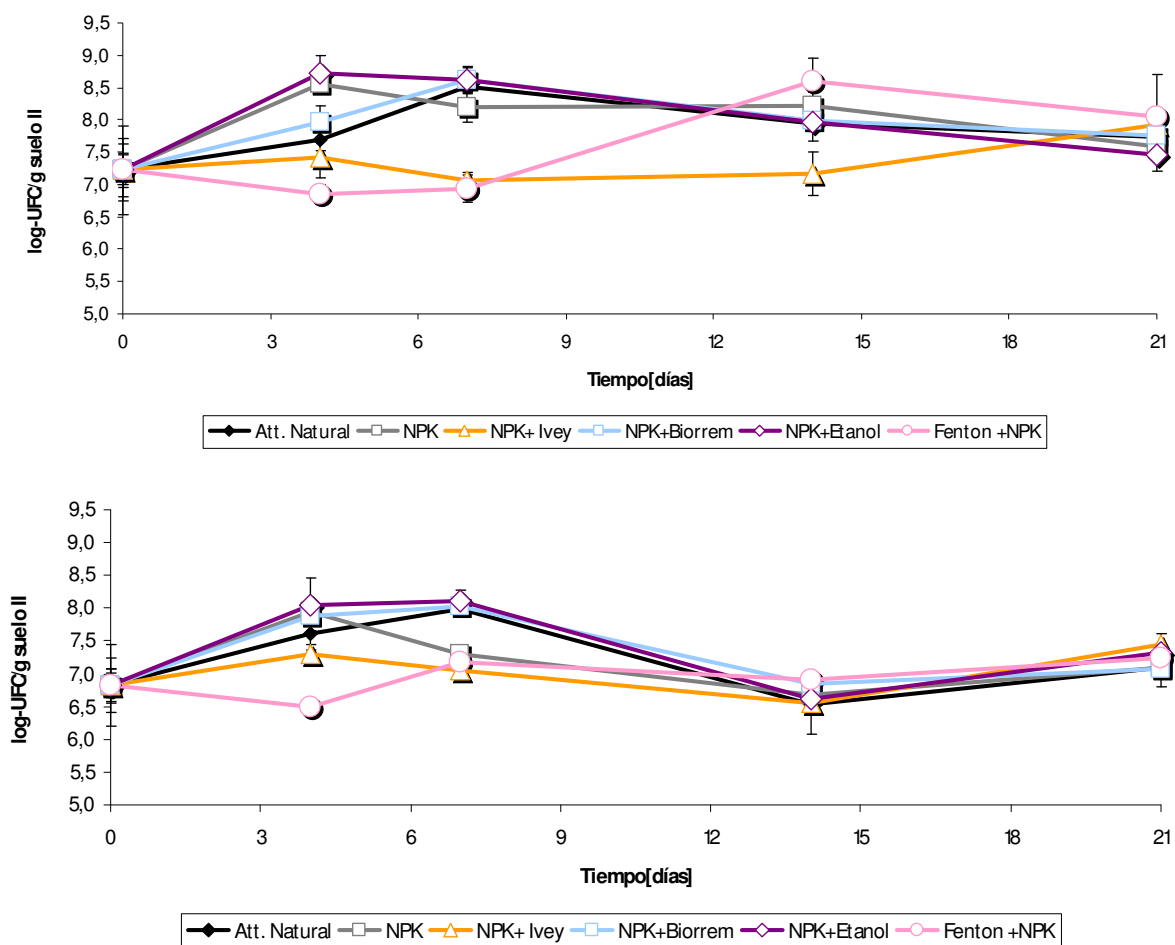


Figura IV.12. Evolución de la microbiota total heterótrofa (a) y microbiota degradadora (b) en los ensayos de microcosmos edáficos con suelo II sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. *ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY; NPK+BIOREM; NPK+ETANOL Y FENTON+NPK.*

Los tratamientos atenuación natural, NPK, NPK+BIOREM y NPK+ETANOL, presentaron un comportamiento similar durante los 21 días de tratamiento, con un incremento de la población heterótrofa y degradadora durante los primeros siete días de incubación alcanzando valores superiores de 8,5 log-UFC/g para los microorganismos heterótrofos y superiores a 7,2 log-UFC/g para los microorganismos degradadores. Por el contrario, la microbiota heterótrofa y degradadora en el tratamiento FENTON+NPK, empieza su recuperación después de los siete días de la adición de NPK obteniendo su máximo valor (8,6 log-UFC/g) a los 14 días de incubación para la microbiota heterótrofa. Sin embargo, la microbiota degradadora obtuvo su máximo valor a los siete días (7,1 log-UFC/g).

Por otro lado, en el tratamiento NPK+IVEY® la población heterótrofa y degradadora se mantiene durante todo el tratamiento en valores comprendidos entre 7,3 y 7,8 log-UFC/g y 6,8 y 7,2 log-UFC/g respectivamente.

Según las investigaciones llevadas a cabo por *Alexander et al. [1999]*, las poblaciones microbianas de un suelo contaminado experimentan un proceso de adaptación y selección encaminado a favorecer la metabolización del contaminante, de forma que sea transformado con mayor rapidez que la materia orgánica del suelo. Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, la bioestimulación de la población microbiana autóctona, puede acelerar con mayor eficacia el proceso de biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando los compuestos no sean recalcitrantes [*Alexander et al. 1999*].

Al igual que para los microcosmos realizados en erlenmeyes, la actividad deshidrogenasa se ha utilizado como indicador de la actividad biológica presente en el suelo. Como se ha comentado dicha actividad está relacionada con la oxidación biológica de los compuestos orgánicos mediante procesos de deshidrogenación y se estima que es dependiente del estado metabólico de los microorganismos [*Nannipieri et al. 1990*]. La medida de esta actividad se muestra en la tabla IV.6. expresada como índices de la actividad deshidrogenasa ID.

Tabla IV.6. Índice de la actividad deshidrogenasa en el suelo II. Ensayos de microcosmos edáficos.

TRATAMIENTO	DESHIDROGENASA		
	ID _{i24h/n}	ID _{21d/n}	ID _{21d/24h}
ATT. NATURAL	1,18	1,14	0,97
NPK	1,05	2,00	1,90
NPK+ IVEY®	1,37	1,29	0,94
NPK+ BIOREM	1,36	3,15*	2,31*
NPK+ ETANOL	1,43	2,54	1,77
FENTON + NPK	1,85	2,71	1,47

*la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos.

Como se puede observar, los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL y NPK+IVEY® muestran valores similares en los índices que relacionan los valores al inicio ($ID_{24h/n}$) y final ($ID_{21d/n}$) del tratamiento con respecto al suelo no contaminado. Cuando se compara el valor al inicial y final del tratamiento ($ID_{21h/24h}$) se obtiene valores de relación cercano a 1. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la primera fase de este estudio para los microcosmos tratados con NPK+IVEY.

Por otro lado, los tratamientos con NPK, NPK+BIOREM y NPK+ETANOL supusieron un aumento en el valor de la actividad deshidrogenasa al final del tratamiento obteniendo un $ID_{21d/n}$ de 2,0; 3,15 y 2,54 respectivamente. Estos resultados sugieren, que estos tratamientos y/o los agentes bioestimulantes BIOREM y ETANOL aumentan la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el suelo durante los 21 días de tratamiento, sin embargo, solo el tratamiento NPK+BIOREM tiene un diferencia significativa con respecto a la AT. NATURAL ($p=0,003$). En el caso del tratamiento FENTON+NPK produce un aumento de la actividad deshidrogenasa al inicio del proceso, pero disminuye con la adición del tratamiento obteniendo un índice $ID_{21d/24h}$ de 1,47, este índice es inferior al obtenido al inicio del tratamiento.

Estos resultados concuerdan con los descritos por *Margensin et al. [2000]* quienes plantean que la actividad deshidrogenasa incrementaría su valor inmediatamente después de la contaminación y disminuiría con la bajada de la concentración de los hidrocarburos.

Por último, en lo que se refiere a la producción de CO_2 (tabla IV.7) indicar valores relativamente elevados al principio de los tratamientos; excepto para los microcosmos con NPK + IVEY

Tabla IV.7. Producción de CO_2 al inicio y final de los tratamientos en el suelo II.

TRATAMIENTOS	SUELO II	
	T ₀ días	T ₂₁ días
AT. NATURAL	0,12±0,004	0,10±0,02
NPK	0,15±0,02	0,12±0,02
NPK+ IVEY	0,06±0,0004	0,18±0,06
NPK+ BIOREM	0,24±0,03	0,31±0,05*
NPK+ ETANOL	0,10±0,005	0,15±0,03
FENTON +NPK	0,100±0,05	0,36±0,09*

* la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos a los 21 días de incubación.

Trascurridos los 21 días de incubación, en los tratamientos NPK+BIOREM y FENTON+NPK se observó un incremento en la producción de CO₂ con respecto al tiempo inicial con una diferencia significativa de $p=0,045$ y $p=0,017$ respectivamente. Es importante destacar, que los valores finales de producción de CO₂ de los tratamientos NPK+IVEY, NPK+BIOREM y FENTON+NPK son superiores que el valor de CO₂ producido en la atenuación natural.

IV.2.2. COMPORTAMIENTO DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS

En la tabla IV.8 se muestran los valores del porcentaje de humedad al inicio y al final de los tratamientos. Los valores iniciales están comprendidos entre el 32% y 41% de humedad, aunque trascurridos los 21 días de tratamiento estos valores disminuyen no se encontraron diferencia significativas. Al ser la humedad uno de los factores importantes en los procesos de biorremediación, los resultados de los tratamientos aplicados tiene un valor óptimo de humedad al final del tratamiento que se encuentra aproximadamente a un 80% de la capacidad de campo de un suelo arcilloso (33 - 50 %).

Tabla IV.8. Porcentaje de humedad en el suelo II.

TRATAMIENTOS	PORCENTAJE DE HUMEDAD	
	t 0 días	t 21 días
ATT. NATURAL	36,7 ± 0,4	29,7 ± 0,9
NPK	33,1 ± 2,0	30,3 ± 0,4
NPK+IVEY®	32,4 ± 3,0	28,1 ± 1,3
NPK+BIOREM	41,2 ± 0,4	35,0 ± 0,7
NPK+ETANOL	37,8 ± 0,9	31,2 ± 1,0
FENTON+NPK	31,3 ± 2,2	24,6 ± 0,4

En la tabla IV.8 se muestra el porcentaje de degradación y el índice de correlación que se obtuvieron en los ensayos de microcosmos edáficos. Los tratamientos NPK; NPK+BIOREM obtuvieron un porcentaje de degradación superior a la ATENUACIÓN NATURAL. Los tratamientos NPK+IVEY y FENTON+NPK mostraron diferencias significativas con respecto a la ATENUACIÓN NATURAL ($p= 0,000$ y $p=0,003$) con los mayores porcentajes de degradación de TPH. El tratamiento combinado de NPK+IVEY con un valor del 70% y un índice de un 8,1 y el tratamiento NPK+BIOREM con un porcentaje del 39,7%

Tabla IV.9. Porcentaje de degradación de hidrocarburos totales (TPH) al final del tratamiento.

TRATAMIENTOS	TPH	
	% de degradación	Ic
ATT. NATURAL	9.9	1
NPK	22.01	2,27
NPK+IVEY®	70,1*	8,1
NPK+BIOREM	26.8	2,70
NPK+ETANOL	5.5	0,5
FENTON+NPK	39,7*	4,0

*la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos a los 21 días de incubación.

La concentración de los alcanos lineales y ramificados se muestra en la figura IV.13, como puede observarse los alcanos ramificados no muestran variaciones significativas entre los tratamientos estudiados. Por el contrario, los alcanos lineales muestran diferencias entre los tratamientos NPK ($p= 0,020$); NPK+Ivey ($p= 0,000$); Fenton+NPK ($p= 0,000$) y pueden indicar los bioestimulantes que favorecieron el proceso de biodegradación.

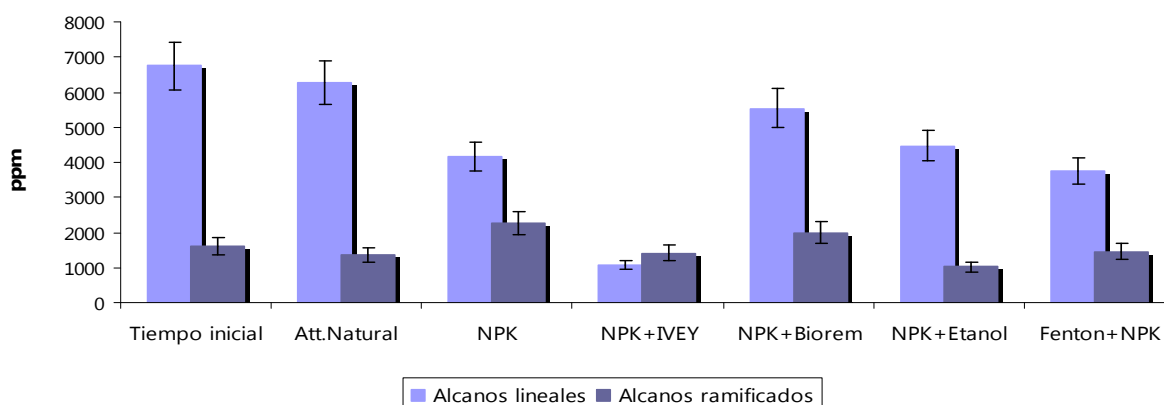


Figura IV.13. Concentración en mg/kg de alcanos lineales y ramificados en el suelo II

Los porcentajes de degradación de TPH mostraron que el mejor tratamiento fue la combinación entre NPK+IVEY. Estos resultados coincidieron con la disminución de aproximadamente 6000 mg/kg en la concentración final de los alcanos lineales. Los tratamientos NPK, y FENTON+NPK, disminuyeron la cantidad de alcanos lineales en un 41%, y 48%, respectivamente.

Otro parámetro químico que indica la existencia de procesos de biodegradación y susceptibilidad de los hidrocarburos remanentes a la biodegradación es el contenido de Pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano), Fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano) e hidrocarburos de 17 y 18 carbonos. La relación entre los hidrocarburos n-C₁₇/Pristano; (nC₁₇/Pr) y n-C₁₈/Fitano; (nC₁₈/Fi) da idea del avance de la biodegradación. A medida que disminuyen las relaciones nC₁₇/Pr y nC₁₈/Fi hay una tendencia creciente de la actividad de degradación [Balba et al. 1998]. Las bacterias atacan primero a los hidrocarburos insaturados, a continuación con menor eficiencia a los aromáticos y finalmente a los hidrocarburos ramificados isoprenos, es decir los considerados biomarcadores [Calíbrese et al. 1993].

En la tabla IV.9 se muestra la relación entre heptadecano n-C₁₇ y Pristano; (nC₁₇/Pr). Con excepción de la ATENUACIÓN NATURAL y el tratamiento con NPK, los demás tratamientos (NPK+IVEY; NPK+BIOREM; NPK+ETANOL; FENTON+NPK) disminuyeron el índice con respecto al obtenido en el tiempo inicial. Los valores más bajos se obtuvieron con los tratamientos NPK+IVEY (0,51) y FENTON+NPK (0,30).

Tabla IV.10. Relación entre heptadecano n-C₁₇ y Pristano; (nC₁₇/Pr).

TRATAMIENTOS	nC17/PR
Inicial	1,14
ATT. NATURAL	1,51
NPK	1,45
NPK+IVEY®	<u>0,51</u>
NPK+BIOREM	0,83
NPK+ETANOL	0,79
FENTON+NPK	<u>0,30</u>

Con estos resultados se puede observar la influencia del surfactante IVEY® en el proceso de biorremediación probablemente debido a que aumenta la solubilidad de los compuestos pocos solubles como lo son los isoprenos, aumentando así su biodisponibilidad en el proceso de degradación. Los surfactantes incrementan la solubilización acuosa de los compuestos de baja solubilidad en varios órdenes de magnitud, disminuyen la tensión superficial del medio acuoso y además cambian la afinidad célula-hidrocarburo, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular [Barkay et al. 1999].

Por otra parte, el reactivo FENTON ayuda a la oxidación de moléculas más complejas facilitando su degradación ya sea por la formación de grupos OH en los carbonos terminales de las cadenas de hidrocarburos o por su rompimiento en cadenas más pequeñas facilitando su biodisponibilidad como fuente de materia orgánica [Mater et al. 2007].

En resumen se puede destacar, que la adición de fuentes de N y P inorgánicos ha tenido un efecto positivo con un incremento de las poblaciones microbianas y de la tasa de degradación con respecto a la atenuación natural. La adición del surfactante IVEY y del pre-tratamiento FENTON ha aumentado la eficiencia en el proceso de degradación con tasas de degradación superiores, demostrando que, la combinación de distintos tipos de agentes bioestimulantes puede aumentar la capacidad biodegradativa de los microorganismos.

IV.2.3. RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ESTUDIOS DE BIOTRATABILIDAD. FASE I Y FASE II.

Los resultados obtenidos en los tratamientos seleccionados en la fase 1 y en la fase 2, se analizaron mediante un análisis no métrico multidimensional, con el fin de comparar si los resultados obtenidos con 250 gramos de suelo se reproducen con 3 kg del mismo tipo de suelo. La figura IV.14-a muestra la distribución de los resultados de los matraces seleccionados en la fase 1, y la figura IV.14-b los tratamientos con los resultados obtenidos en la fase 2. Los círculos señala el porcentaje de degradación de hidrocarburos totales (TPH).

Como se puede observar los resultados de los matraces muestran más diversidad que los obtenidos en los microcosmos edáficos. Sin embargo en ambas fases los resultados tienden a agruparse de forma similar. Los tratamientos NPK+IVEY, NPK y fenton+NPK se agrupan mostrando los resultados más altos en la degradación de TPH, y se unen al tratamiento NPK+Biorem para formar un grupo con resultados similares en los matraces. En los microcosmos edáficos se observa que el NPK, el NPK+BIOREM y el FENTON+NPK se agrupan indicando que los resultados de estos tratamientos es muy similar, a diferencia de los resultados que se obtuvieron en los matraces, el tratamiento NPK+IVEY se diferencia significativamente de los otros tratamientos.

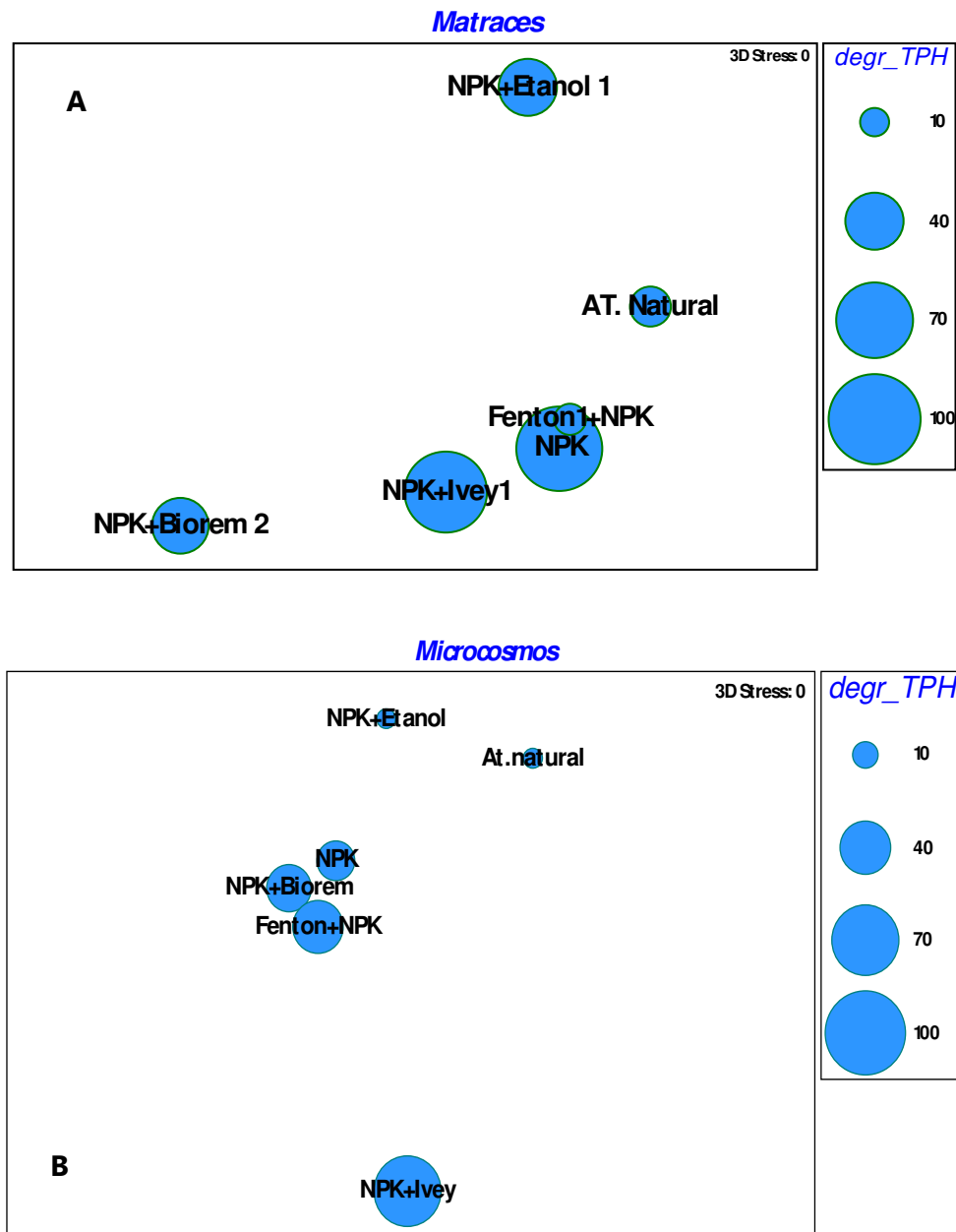


Figura IV.14. Graficas obtenidas del análisis multidimensional no métrico. (A) análisis de los resultados obtenidos en los ensayos en la fase 1. (B) análisis de los resultados obtenidos en los ensayos en la fase 2.

Por otro lado, los resultados obtenidos tanto en la fase 1 como en la fase 2 de la ATENUACIÓN NATURAL, y el NPK+ETANOL se distribuyen de forma similar, estos tratamientos se unen por tener los resultados más bajos tanto en los parámetros biológicos como en los parámetros químicos. Al no obtener resultados significativos con la combinación entre NPK+Etanol, este tratamiento no se ensayara a escala de planta piloto.

Con estos resultados podemos concluir que el tratamiento que más contribuye al aumento en la velocidad de degradación de los hidrocarburos en las condiciones ensayadas es la combinación entre el fertilizante NPK y el surfactante IVEY obteniendo porcentajes de degradación superiores al 50 % en todos los casos ensayados. Vale la pena destacar también que este tratamiento mantuvo las condiciones óptimas para la degradación como la humedad del suelo, la biodisponibilidad de los hidrocarburos con la adición del surfactante y el equilibrio entre los nutrientes con la adición de fertilizante. Por todo lo anteriormente mencionado este es una de los tratamientos que se aplicó a gran escala.

Otro de los tratamientos que esta dentro de grupos con buenos resultados es la combinación del fertilizante NPK con el BIOREM. Este tratamiento incrementa la actividad biológica del suelo, pero los porcentajes de degradación no son elevados como en los tratamientos NPK y NPK+IVEY, esto puede ocurrir debido a que los componentes del BIOREM son más asimilables para los microorganismos que los hidrocarburos presentes en el suelo. Esta podría ser una de las razones por las cuales el suelo presenta una actividad biológica elevada y un bajo porcentaje de degradación. Por otra parte la aplicación de este tratamiento requiere de un mezclado homogéneo entre el suelo, y en el caso del NPK y el BIOREM, esta forma de aplicación no se ajusta a las condiciones de diseño de la planta piloto, razón por la cual este tratamiento no se ensaya en la tercera fase del estudio. Mencionar que el Bioirem se podría utilizar como estructurante en tratamientos ex situ como el lanfarming o compostaje.

Por último, los resultados obtenidos con el tratamiento FENTON+NPK en esta segunda fase del estudio con un 40% de degradación de TPH y la disminución de la relación del C17/pristano, orientó el planteamiento que el FENTON como pre-tratamiento químico es una posible opción en la remediación de compuestos difícilmente degradables. Por otro lado al adicionar el agua oxigenada como agente oxidante, podría acelerar el proceso de degradación en lugares o habita con baja cantidad de oxígeno disuelto. Por estas razones y el hecho que este tipo de tratamientos combinados no han sido muy estudiados en suelos, este tratamiento se estudio a escala de planta piloto.

En función de este análisis realizado se seleccionaron LA ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY, FENTON+NPK como tratamientos que según estos resultados se podrán utilizar en las ensayos a escala piloto.

IV.3. ENSAYO EN PLANTA PILOTO (FASE III)

Los resultados en los ensayos de biotratabilidad (etapa 1 y 2) demostraron que los tratamientos NPK, NPK+IVEY y FENTON+NPK originaban una estimulación en la actividad biológica y un elevado porcentaje de eliminación de hidrocarburos. Por esta razón se seleccionaron estos tratamientos para ser aplicados en un modelo experimental a mayor escala. Así, como se ha descrito en el apartado de material y métodos (apartado III) se diseñó y construyó una planta piloto donde se evaluó la eficacia de estos tratamientos en la biorremediación de un suelo contaminado con diesel y el efecto que dichos tratamientos ejercía sobre la biodiversidad microbiana.

Por otro lado, el diseño de la planta ha permitido, en base al contenido en humedad, diferenciar tres zonas: zona superficial, zona no saturada y zona saturada. . La zona superficial (**Zsup**) es una capa de aproximadamente 10 cm de altura en la parte superior de la planta piloto, el suelo estaba en contacto con el aire y la humedad se encontraba entre el 10 y el 15% durante los ensayos. La zona no saturada (**Zns**) es la capa intermedia de aproximadamente 35 cm de altura, el porcentaje de humedad en esta zona tenía un rango entre 20 y 30%. Y por último la zona saturada (**Zs**) ubicada en la parte inferior del contenedor con una altura aproximada de 25 cm, el rango de humedad se mantuvo superior a 35% durante el ensayo. Estas características van a originar diferencias en las poblaciones microbianas predominantes que probablemente influyan en la respuesta del ecosistema a los tratamientos. Por ello, en este apartado se ha realizado un análisis de cada una de las zonas de forma individualizada, para a continuación valorar las discrepancias y similitudes.

Los resultados de los parámetros microbiológicos y químicos obtenidos en el ensayo de la planta piloto se describen y se discuten teniendo en cuenta el tratamiento aplicado y la zona de estudio.

IV.3.1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

En un sistema complejo como es el suelo, los microorganismos autóctonos poseen una elevada biodiversidad inducida en gran medida por la diversidad de las condiciones medioambientales, las cuales van a determinar la distribución de la microbiota. Esta microbiota compleja, en conjunto, posee las capacidades enzimáticas necesarias para degradar hidrocarburos.

La evolución de la microbiota total heterótrofa y degradadora se muestra en las figuras IV.15 y IV.16, distribuidas por zonas; Superficial [Zsup], no saturada [Zns] y saturada [Zs] para los ensayos con fertilizante NPK, surfactante IVEY, tratamiento combinado NPK + IVEY y para la ATENUACIÓN NATURAL.

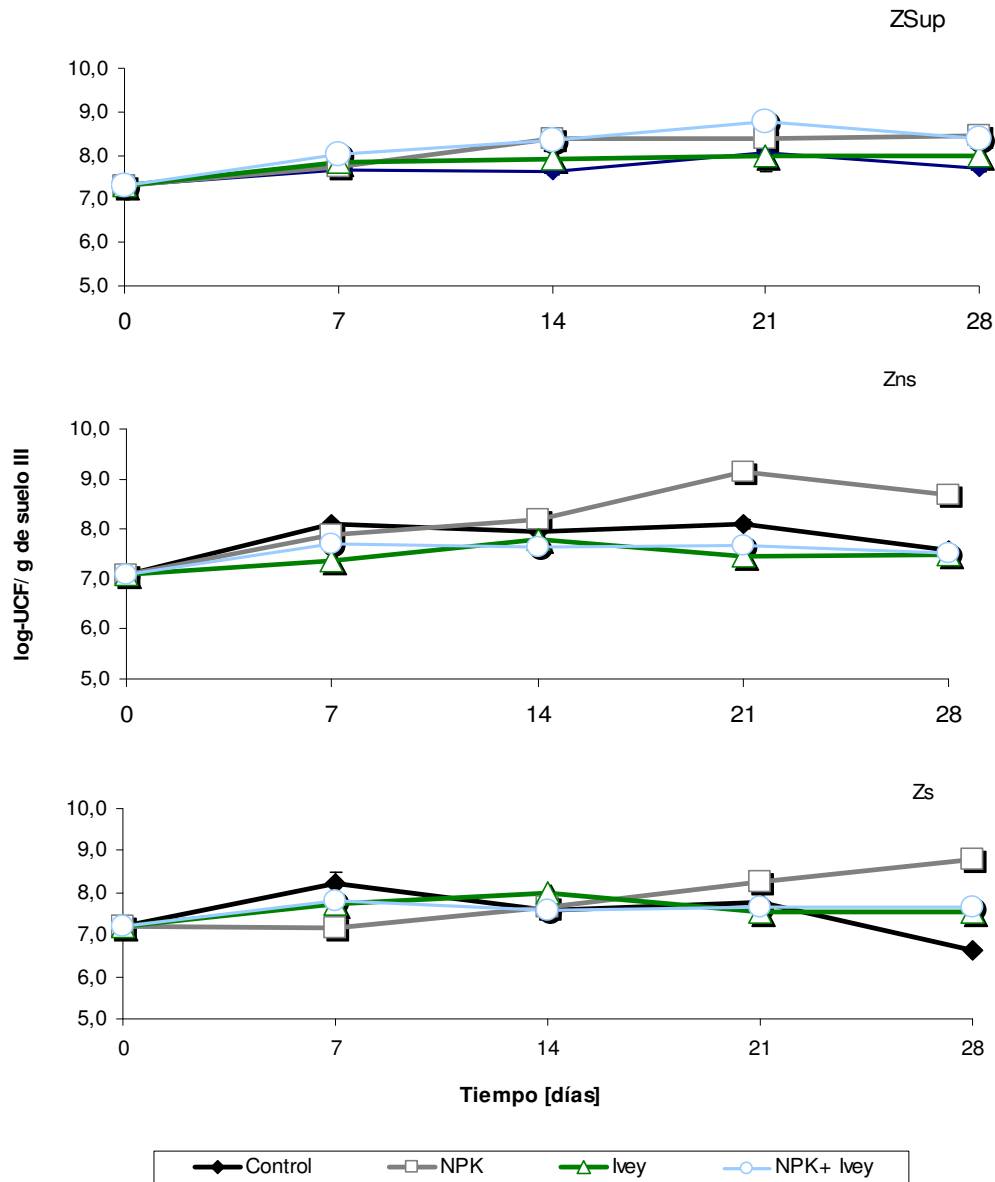


Figura IV.15. Evolución de la microbiota total heterótrofa en las zonas superficial (Zsup), no saturada (Zns), saturada (Zs) de la planta piloto con el suelo III contaminado con diesel sometida a distintos tratamientos de biorremediación, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, IVEY, NPK+IVEY Y FENTON+NPK.

Destacar que en todos los ensayos se detectó al inicio de los tratamientos, un número similar de microorganismos tanto heterótrofos como degradadores, indicando que las tres zonas consideradas podrían tener una actividad biológica similar. Por ello y para facilitar el

estudio comparativo, se ha tomado como punto de referencia de inicio, la medida de todos los datos obtenidos a tiempo inicial, en cada una de las zonas. La zona superficial tiene un valor inicial de 7,3 log-UFC/ g de suelo, la zona no saturada de 7,1 log-UFC/ g de suelo y la zona saturada es de 7,2 log-UFC/ g de suelo para las bacterias heterótrofas. Los valores iniciales de la microbiota degradadora en la zona superficial fue de 6,9 log-UFC/g de suelo, de 7,0 log-UFC en la zona no saturada y de 7,20 log-UFC/g de suelo.

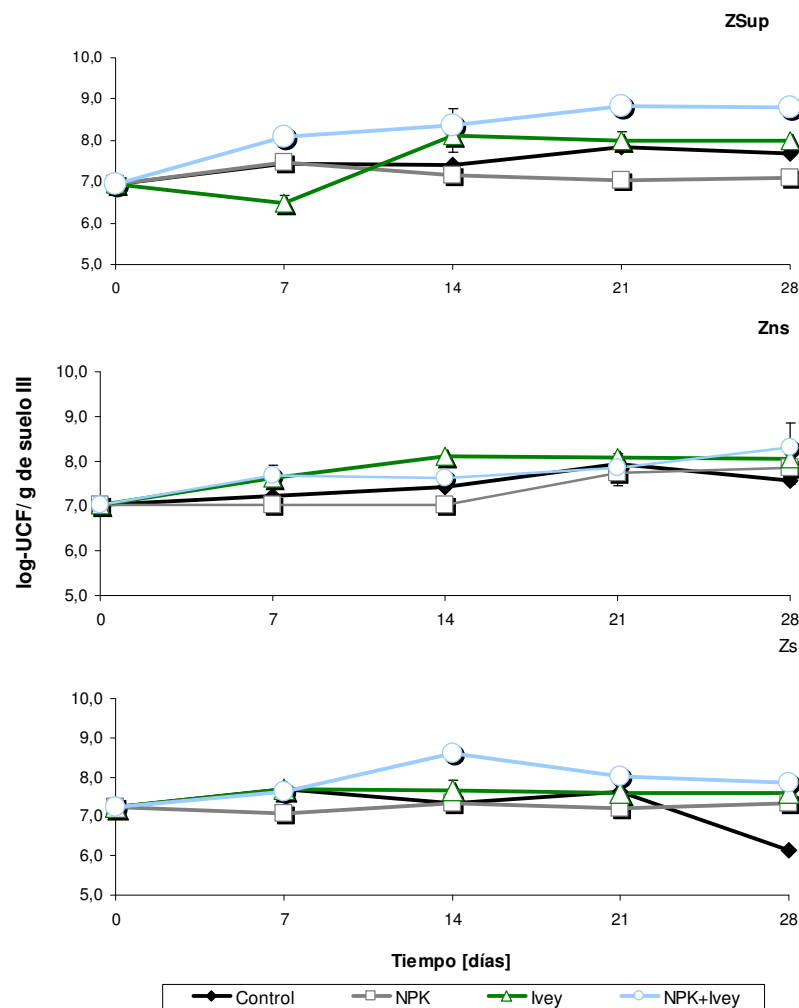


Figura IV.16. Evolución de la microbiota degradadora en las zonas superficial (Zsup), no saturada (Zns), saturada (Zs) de la planta piloto con el suelo III contaminado con diesel sometida a distintos tratamientos de biorremediación, Atenuación natural, NPK, Ivey, NPK+Ivey y Fenton+NPK.

Como puede observarse en las figuras IV.15 y IV.16, en la zona superficial no hubo diferencias significativas respecto al control, en la evolución de las bacterias heterótrofas,

mientras que sí se observó un incremento en la población degradadora cuando se aplicó el tratamiento combinando fertilizante más surfactante. Respecto a las zonas saturadas y no saturadas, solo se detectó un incremento de bacterias heterótrofas en los ensayos con fertilizante NPK y al final del tratamiento (21-28 días).

Con respecto al pre-tratamiento Fenton (Figura IV.17), según indica la bibliografía [Kulik *et al.* 2006], para que la oxidación se realice, es necesario acidificar el suelo a un pH inferior a 5. Este proceso en la planta piloto no se pudo lograr debido a la fuerte acción tamponadora del suelo, por esta razón, se aplicó la reacción de Fenton modificada descrita por Nam *et al.* [2001] para la cual no era necesario la acidificación del suelo.

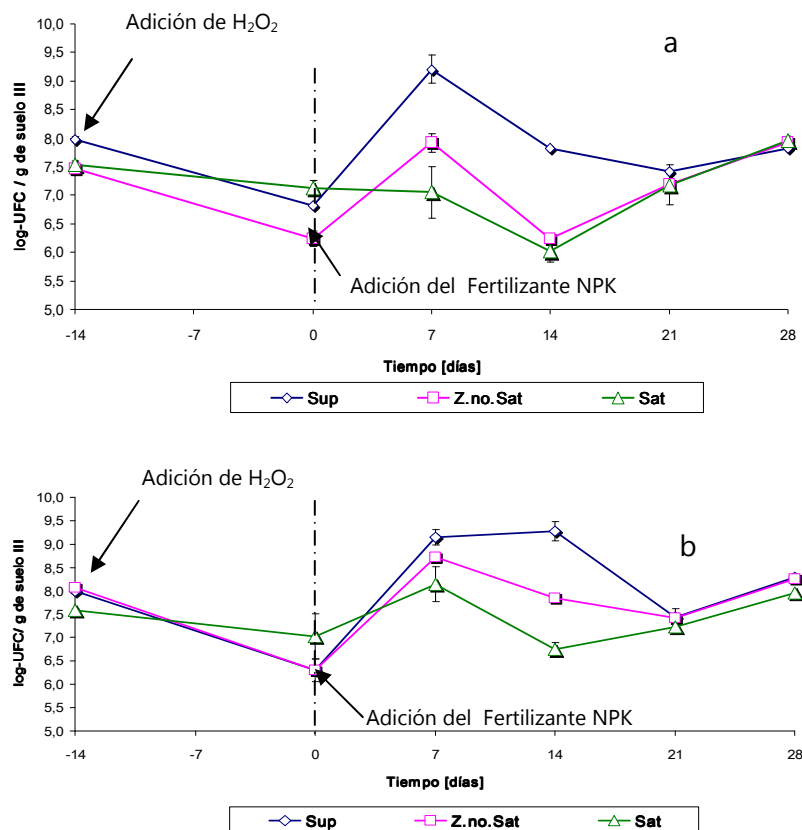


Figura IV.17. Evolución de la microbiota heterótrofa (a) y degradadora (b) en las zonas superficial (Zsup), no saturada (Zns), saturada (Zs) de la planta piloto con el suelo III contaminado con diesel sometida al tratamientos Fenton+NPK.

Para realizar el tratamiento Fenton, se procedió a adicionar 40 l de H₂O₂ de forma gradual durante un periodo de 14 días con el objeto de evitar un calentamiento excesivo en la planta. En este proceso tiene lugar una reacción exergónica que si no se controla puede ser peligrosa. Por otro lado esta forma de proceder, permite que el suelo pueda distribuir el agua evitando encharcamiento. Trascurridos estos 14 días se procedió a adicionar el fertilizante NPK, ya que como se ha comentado con anterioridad se ha empleado el reactivo Fenton como pre-tratamiento.

La adición del fertilizante originó una estimulación de la población microbiana en las tres zonas, siendo más acusada en la zona superficial y para la microbiota degradadora. (Figura IV.17)

Destacar asimismo, que al final de los ensayos (28 días de tratamiento) las tres zonas alcanzaron valores similares para ambas poblaciones microbianas. Con estos resultados podemos decir que la oxidación química pudo haber producido cambios de estructura en los compuestos químico o oxidando parcialmente los hidrocarburos obteniendo compuestos orgánicos que no afectaron el crecimiento microbiano [Watts *et al.* 2000].

Como se ha comentado, es importante conocer la actividad bioquímica del suelo para ver el papel que desempeñan las enzimas en los procesos de degradación. La actividad deshidrogenasa es un reflejo de las actividades oxidativas de la microbiota del suelo, es una enzima intracelular que esta asociada a los microorganismos proliferantes y es la encargada de la oxidación biológica de los compuestos orgánicos mediante el proceso de deshidrogenación. En la tabla IV.11 se muestran los índices de la actividad deshidrogenasa que relaciona el valor al inicio del tratamiento con el valor obtenido en los diferentes días de muestreo $ID_{f/i24 h}$

Tabla IV.11. Índice de la actividad deshidrogenasa en las diferentes zonas de estudio de la planta piloto durante los tratamientos aplicados.

DESHIDROGENASA [TPF / g DE SUELO III DIA⁻¹]			
	ID _{f 7d/i24 h}	ID _{f 14d/i24 h}	ID _{f 28 d/i24 h}
ATENUACIÓN NATURAL			
Zona superficial	0.99	0.35	1.59
Zona no saturada	1.30	0.19	0.71
Zona saturada	1.09	0.16	0.18
NPK			
Zona superficial	0.85	0.65	0.92
Zona no saturada	0.64	0.49	0.64
Zona saturada	2.05*	1.45	2.71*
NPK+IVEY			
Zona superficial	10.56*	0.30	3.05*
Zona no saturada	8.14*	4.34*	5.87*
Zona saturada	3.71*	2.27*	3.09*
IVEY			
Zona superficial	1.69	4.05	3.53*
Zona no saturada	1.31	2.47*	0.99
Zona saturada	2.37*	2.53*	0.63
FENTON+NPK			
Zona superficial	0.31	2.17*	0.49
Zona no saturada	2.17*	1.54	0.82
Zona saturada	1.01	1.03	1.05

*la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos.

A esto se agrega que los procesos de mineralización de la materia orgánica también se rigen en gran medida por las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, por esta razón existe una alta correlación entre la actividad deshidrogenasa y la respiración basal de los microorganismos involucrados en los procesos de degradación de la materia orgánica en este caso los hidrocarburos. Los valores obtenidos en la producción de CO₂ durante los tratamientos aplicados en la planta piloto en las diferentes zonas de estudio se muestran en la tabla IV.12

Tabla IV.12. Producción de de CO₂ al inicio y final de los tratamientos en el suelo II.

PRODUCCIÓN DE CO₂ [%]				
	0 días	7 días	14 días	28 días
ATENUACIÓN NATURAL				
Zona superficial	0.424±0.04	0.255±0.04	0.189±0.03	0.204±0.06
Zona no saturada	0.299±0.04	0.158±0.02	0.200±0.02	0.221±0.07
Zona saturada	0.426±0.03	0.238±0.04	0.173±0.02	0.358±0.04
NPK				
Zona superficial	0.030±0.001	0.047±0.01	0.110±0.01	0.157±0.001
Zona no saturada	0.070±0.02	0.123±0.03	0.183±0.02	0.240±0.01
Zona saturada	0.045±0.01	0.080±0.02	0.223±0.03	0.383±0.01
NPK+IVEY				
Zona superficial	0.163±0.01	0.122±0.02	0.110±0.03*	0.259±0.03*
Zona no saturada	0.221±0.02	0.123±0.03	0.156±0.001	0.255±0.01
Zona saturada	0.226±0.05	0.091±0.01	0.144±0.02	0.312±0.05
IVEY				
Zona superficial	0.074±0.01	0.224±0.01	0.254±0.07*	0.325±0.07*
Zona no saturada	0.339±0.06	0.227±0.06*	0.341±0.10	0.582±0.09*
Zona saturada	0.373±0.01	0.225±0.03	0.199±0.02*	0.510±0.03*
FENTON+NPK				
Zona superficial	0.088±0.01	0.020±0.01	0.026±0.01	0.046±0.01
Zona no saturada	0.044±0.02	0.014±0.01	0.031±0.01	0.047±0.01
Zona saturada	0.088±0.01	0.020±0.001	0.023±0.001	0.042±0.001

*la diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05 entre la Atenuación Natural y los demás tratamientos.

Los resultados de la Atenuación natural sugiere que en el momento de la incorporación del diesel en el suelo (día 0) se presentó el mayor valor de la actividad deshidrogenasa y del porcentaje de CO₂ durante el tratamiento, lo que sugiere que la incorporación del diesel activa la biomasa microbiana autóctona del suelo y por lo tanto su actividad biológica. Indicando de nuevo que el mayor cambio en un ecosistema lo introduce la llegada del contaminante.

En lo que respecta a la actividad deshidrogenasa se observó una disminución de dicha actividad en las tres zonas. En la zona saturada este valor bajó a 61 TPF/g de suelo día⁻¹ y se mantuvo hasta el final del tratamiento, por el contrario en la zona no saturada (Zns) aumentó su valor hasta 153,9 TPF/g de suelo día⁻¹ y en la zona superficial el aumento fue hasta 466 TPF/g de suelo día⁻¹. En la producción de CO₂ el comportamiento fue similar en las tres zonas.

Los resultados obtenidos de la actividad deshidrogenasa con el tratamiento NPK, estuvieron en un rango de 50 y 250 TPF/ g de suelo III-día durante los 28 días de tratamiento. En las tres zonas de estudio de la planta piloto, la cantidad de CO₂ producido por la adición del fertilizante NPK aumento durante los 28 días de tratamiento indicando un proceso de respiración que es una medida directa de un proceso de mineralización.

Para el tratamiento IVEY, el comportamiento de estos dos parámetros en la zona superficial, no saturada y saturada es similar. Al iniciar el tratamiento el valor de la deshidrogenasa es bajo pero aumenta durante los primeros siete días, posteriormente disminuye hasta los 14 días y un ligero aumento hasta el final del tratamiento. Por el contrario la producción de CO₂ inicia con valores superiores a 0,2% disminuyendo durante los 7 días y después tiene un ligero aumento hasta el final del tratamiento.

En este tratamiento se puede ver que aunque se adicione el surfactante como tratamiento para aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos para ser metabolizados por los microorganismos, las variaciones en las actividades biológicas se pueden deber a la degradación del mismo surfactante y no de los hidrocarburos, esto se puede corroborar con los resultados negativos de la degradación de las fracciones de hidrocarburos durante el tratamiento que se mostrarán en el siguiente apartado.

Los parámetros biológicos del tratamiento con NPK+IVEY muestran que en la zona superficial hay un incremento de la actividad deshidrogenasa durante los 21 días de tratamiento obteniendo un valor de 743 TPF/g de suelo III-día siendo este el valor máximo determinado en todos los tratamientos. La producción de CO₂ en esta zona es gradual durante todo el tratamiento partiendo de un valor de 0,1% al inicio del tratamiento y de 0,3% al final.

En la zona no saturada la cantidad de CO₂ producida es elevada y continua, obteniendo un valor final de 0.6%.La actividad deshidrogenasa tiene un comportamiento similar al de la zona superficial, es decir un aumento durante los primeros 21 días y un descenso al final del tratamiento. Así, en la zona no saturada el valor máximo obtenido fue un 46% inferior.

En la zona saturada el aumento en la actividad deshidrogenasa es menor que en las otras dos zonas, aunque de forma similar, el máximo valor se obtiene a los 21 días de tratamiento (316 TPF/g de suelo III-días) y disminuye al final del tratamiento. Por otro lado la producción

de CO₂ disminuye durante los 14 primeros días, aumentando la producción a los 21 días con un valor cercano a 0.6%. No obstante, este valor disminuye ligeramente.

Los valores de la actividad deshidrogenasa con el tratamiento FENTON+NPK en la zona superficial oscilan entre 20 y 60 TPF/g de suelo III-día, estos valores son los mas bajos detectados en los cinco tratamientos estudiados. Lo mismo ocurre con los porcentajes de CO₂ teniendo como valor inicial un 0,08% y un valor final de 0.05%.

En la zona no saturada la producción de CO₂ disminuye durante los primeros siete días y aumento hasta un valor de 0,08% a los 21 días de tratamiento, este valor decrece hasta un 0,05%. Por el contrario la actividad deshidrogenasa aumenta durante los primeros siete días llegando a un valor de 107 TPF/g de suelo III-día, este valor disminuye hasta el final del tratamiento obteniendo un valor final de 40,5 TPF/g de suelo III-día.

La actividad deshidrogenasa en la zona saturada con el tratamiento Fenton+NPK se mantiene constante durante todo el tratamiento con valores entre 42 y 50 TPF/g de suelo III-día. En esta zona, el valor inicial de CO₂ es de 0,08% disminuyendo hasta un 0,03% durante los 14 días de tratamiento, este porcentaje aumenta hasta un 0,04% a los 28 días de tratamiento.

IV.3.2. COMPORTAMIENTO DE LOS PARAMETROS QUÍMICOS

Al igual que en la fase I y II se determinó el contenido en hidrocarburos por cromatografía de gases/espectrometría de masas. Estas determinaciones se realizaron al inicio y final de los tratamientos, cuantificándose las fracciones alifáticas (alcanos lineales y alcanos ramificados) y aromáticas (derivados del naftaleno) y el ratio entre el alcano n-C18 y el biomarcados fitano. Las figuras IV.18-20 muestran el porcentaje de hidrocarburos degradados en el suelo después del tratamiento y las tablas IV.13-15 los índices C18/fi.

Los resultados obtenidos mostraron que en la zona superficial tras el tratamiento con NPK se producía la eliminación del 100% de los alcanos lineales y los naftalenos, siendo el tratamiento más efectivo en la eliminación de hidrocarburos en esta zona superficial.. El FENTON+NPK redujo en un 53% los alcanos lineales, en un 60% los alcanos ramificados y un 100% de naftalenos al final del tratamiento. Ambos tratamientos eliminaron un mayor porcentaje de hidrocarburos que los cuantificados en la atenuación natural. Hay que destacar

que la atenuación natural eliminó un 82% de naftalenos, un 52% de alcanos ramificados y un 39% de alcanos lineales, si bien la relación C18/fi al final del ensayo no fue indicativa de un proceso de biorremediación eficaz (fig IV.18).

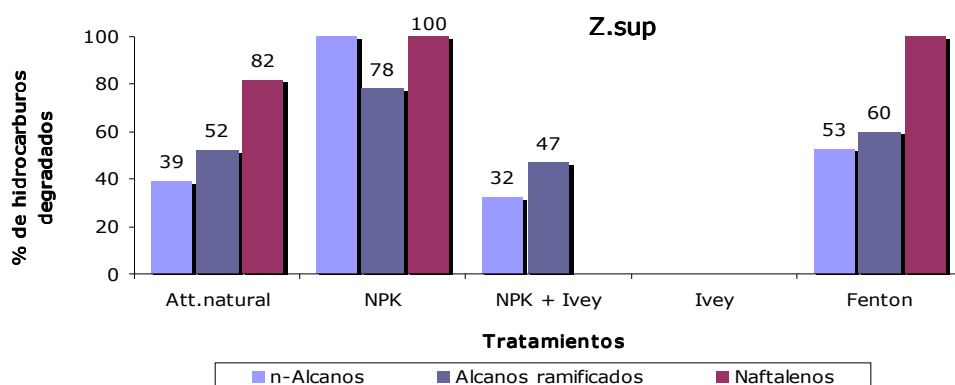


Figura IV.18. Porcentaje de hidrocarburos eliminados en el suelo III al final de los tratamientos en la zona superficial (Z.sup)

Estos resultados se corresponden con los obtenidos para el índice C18/fi (tabla IV.13), ya que los tratamientos con mejores porcentajes de degradación presentaron disminución en el valor del c18/fi. El tratamiento NPK tiene un índice de cero, debido a la eliminación del 100% del alcano lineal C18. El tratamiento Fenton+NPK disminuye este valor de un 2,39 a un 1,49. Por otro lado, indicar que aunque los porcentajes de degradación en el tratamiento NPK+Ivey no son los más elevados, la disminución del índice C18/fi, sí fue considerable (de 1,60 a 0,71).

Tabla IV.13. Índice de biodegradación C18/fi en la zona superficial (Zsup.)

TIEMPO [DIAS]	ATT. NATURAL	NPK	NPK+IVEY	IVEY	FENTON+NPK
0	1.88	1.23	1.60	1.86	2.39
28	1.84	0,0	0.71	2.39	1.49

Los rendimientos más bajos se obtuvieron con los tratamientos IVEY, y NPK+IVEY. El tratamiento IVEY no redujo la concentración de ninguna de las fracciones de hidrocarburos,

por otro lado, el tratamiento NPK+IVEY obtuvo porcentajes bajos en las fracciones de alcanos lineales y alcanos ramificados, no se detectandose, una reducción en los naftalenos.

El bajo rendimiento de la aplicación del surfactante IVEY puede ser debido al bajo porcentaje de humedad presente en esta zona, los surfactante son moléculas que requieren de una adecuada cantidad de agua para que la alta formación de puentes de hidrogeno entre el hidrocarburo y el surfactante disminuya la hidrofobicidad del hidrocarburo con la pared celular de los microorganismos [Stelmack *et al.* 1999].

Los porcentajes de degradación observados en la zona no saturada, muestran comportamientos diferentes con cada uno de los tratamientos ensayados (Figura IV.19). La ATENUACIÓN NATURAL tiene porcentajes de degradación de un 78% en alcanos ramificados y de un 49% en naftalenos, demostrando al igual que en la zona superficial, que la atenuación natural si las condiciones son las adecuadas, es una alternativa en la degradación de hidrocarburos.

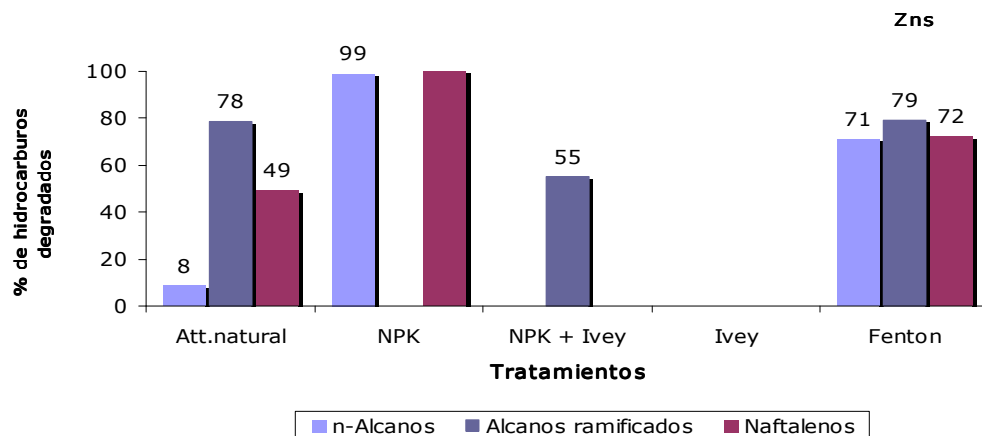


Figura IV.19. Porcentaje de hidrocarburo eliminados en el suelo III al final de los tratamientos en la zona no saturada (Zns)

Al igual que en la zona superficial los porcentajes más altos de degradación se obtuvieron con los tratamientos NPK y el FENTON+NPK y los más bajos con el IVEY y NPK+IVEY. El tratamiento con NPK obtuvo un 99% y un 100% en alcanos lineales y naftalenos respectivamente, por el contrario los alcanos ramificados no disminuyeron. La combinación entre el pretratamiento fenton y la adición de fertilizante NPK disminuyó de forma similar las fracciones de hidrocarburos obteniendo porcentajes de 71% en alcanos lineales, 79 en alcanos ramificados y un 72 % en naftalenos.

Tabla IV.14. Índice de biodegradación C18/fi en la zona no saturada (Zns)

TIEMPO [DIAS]	ATT.NATURAL	NPK	NPK+IVEY	IVEY	FENTON+NPK
0	2.09	1.33	2.04	1.63	2.67
28	2.77	ND	2.78	2.67	ND

Al igual que en la zona superficial el surfactante Ivey como tratamiento único no mostró porcentajes de degradación en esta zona de la planta piloto. Con la combinación del NPK+IVEY la degradación se observó en los alcanos ramificados con un 55%.

En los tratamientos NPK y Fenton+NPK los índices de c18/fi no se determinaron (ND) debido a que no se detectaron los compuestos C18 (octadecano) en el cromatograma trascurridos los 28 días de tratamiento. En general estos resultados, podrían indicar un elevado grado de biorrecuperación de la zona no saturada cuando se aplican los tratamientos mencionados.

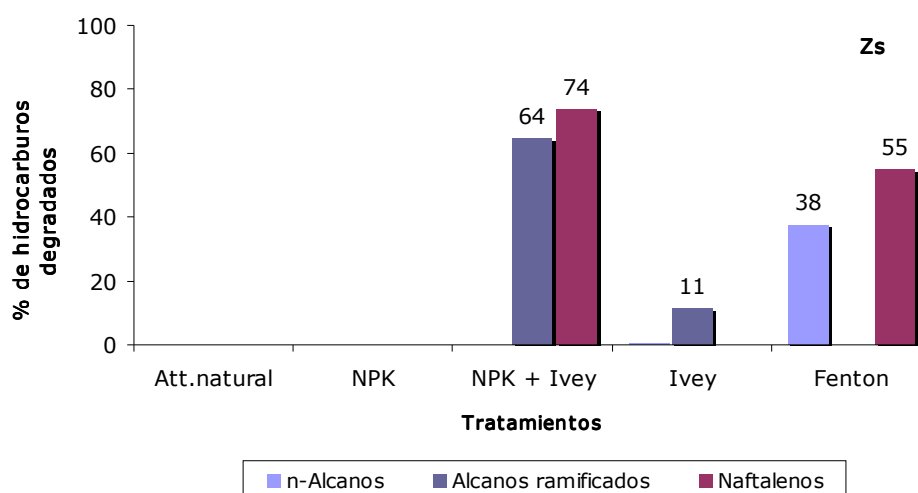


Figura IV.20. Porcentaje de hidrocarburo eliminados en el suelo III al final de los tratamientos en la zona saturada (Zs)

En la zona saturada (figura IV.20), se observa que solo los tratamientos NPK+IVEY y FENTON+NPK originaron una reducción importante de las diferentes fracciones de hidrocarburos. En concreto, los resultados de porcentaje de degradación fueron del 64% en alcanos ramificados y del 74% en naftalenos con el tratamiento NPK+IVEY, mientras que para el tratamiento con FENTON+NPK fueron de un 38% de n-alcanos y de un 55% para los naftalenos.

Tabla IV.15. Índice de biodegradación C18/fi en la zona saturada (Zs)

TIEMPO [DIAS]	ATT.NATURAL	NPK	NPK+IVEY	IVEY	FENTON+IVEY
0	1.02	0.77	1.84	2.36	4.00
28	0.92	0.66	ND	4.00	1.10

En la zona saturada, la proporción entre un hidrocarburo de degradación fácil (octano) con un compuesto que se degrada más lentamente (fitano) disminuye significativamente en los tratamientos NPK+IVEY y FENTON+NPK siendo estos los tratamientos con elevados porcentajes de degradación.

Con estos resultados se podría decir que, con condiciones de saturación de agua la adición de nutrientes en forma de fertilizante NPK no es suficiente para aumentar la eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos. Mientras que si la adición del fertilizante NPK se realiza combinándolo con el surfactante IVEY, la eficiencia en el proceso de biodegradación aumenta significativamente con respecto a la atenuación natural y al fertilizante NPK como único bioestimulante. Como se ha indicado anteriormente, la adición de un surfactante como agente bioestimulante tiene el objetivo de aumentar la biodisponibilidad del contaminante, en este caso, no solo han aumentado la biodisponibilidad de los hidrocarburos sino que a su vez ha facilitado la difusión de los nutrientes (nitrógeno N; Fósforo P, y potasio K) a través de todo el perfil del suelo en la planta piloto y por esta razón aumentar la concentración de estos elementos y proporcionar una apta relación entre el carbono/nitrógeno para los microorganismos.

En cuanto al tratamiento con FENTON+NPK los resultados obtenidos pueden ser debidos a la acción oxidante de la reacción con agua oxigenada produciendo compuestos más degradables y aumentando la disponibilidad de oxígeno.

Los resultados obtenidos en los ensayos de la planta piloto mostraron que en las condiciones experimentales de las zonas superficial y no saturada, la asociación de un surfactante a un tratamiento con fertilizante NPK no supone una mayor eficacia en el proceso de biorremediación. Sin embargo, en las condiciones de la zona saturada, la combinación de un surfactante al tratamiento con fertilizante fue la mejor opción, incrementando sobre todo el porcentaje de degradación de naftalenos y de alcanos ramificados.

Como ya se ha mencionado anteriormente la aplicación de un surfactante en los procesos de biorremediación requieren de una humedad elevada para que las micelas entre las cadenas hidrofobicas de los hidrocarburos y las de los surfactantes sean fácilmente captadas por las paredes de los microorganismos degradadores. Es importante resaltar que el surfactante como único tratamiento no es suficiente para la degradación en las condiciones experimentales ensayadas y el tipo de suelo seleccionado, por consiguiente la adición de los nutrientes es de gran importancia en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en zonas con un porcentaje de humedad superior al 30%.

Para finalizar la evaluación de la capacidad y eficiencia de los tratamiento utilizados en la tercera fase de estudio a escala de planta piloto se utilizó un método de análisis multivariable que permitió establecer la relación existente entre las variables biológicas y químicas con los tratamientos estudiados.

IV.3.3. RELACIÓN ENTRE LOS PARAMENTROS BIOLOGICOS Y QUIMICOS CON LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS.

Para explicar las posibles relaciones entre los tratamientos aplicados en la planta piloto con los resultados de los parámetros biológicos y químicos, se utilizó un análisis multivariable de redundancia (RDA) que permitió explicar el comportamiento general de los resultados obtenidos en la planta piloto utilizando más de una variable independiente

Los resultados que se obtuvieron con el análisis de redundancia son: tablas de significancia de las variables ambientales, factores de inflación que indican la correlación entre las variables ambientales, el porcentaje de variación de los tratamientos y del sistema, y el grafico triplot donde se visualiza la distribución en dos dimensiones de los resultados obtenidos.

En un primer análisis se compararon los tratamientos aplicados (ATENUACIÓN NATURAL; NPK; NPK+IVEY; IVEY; FENTON+NPK) en las tres zonas de estudio (Z.sup; Zns; Zs) con las variables biológicas y químicas. El grafico triplot se muestra en la figura IV.21.

En el análisis general de los resultados obtenidos en la planta piloto ($p=0.0120$), el primer eje (horizontal) describe un 14,1% de la variabilidad entre los tratamientos aplicados y las zonas en la planta piloto explicables mediante las variables biológicas y químicas analizadas y un 36,4% de variabilidad de todo el sistema. La variable química que más se ve influenciada por los tratamientos es la concentración de los alcanos totales.

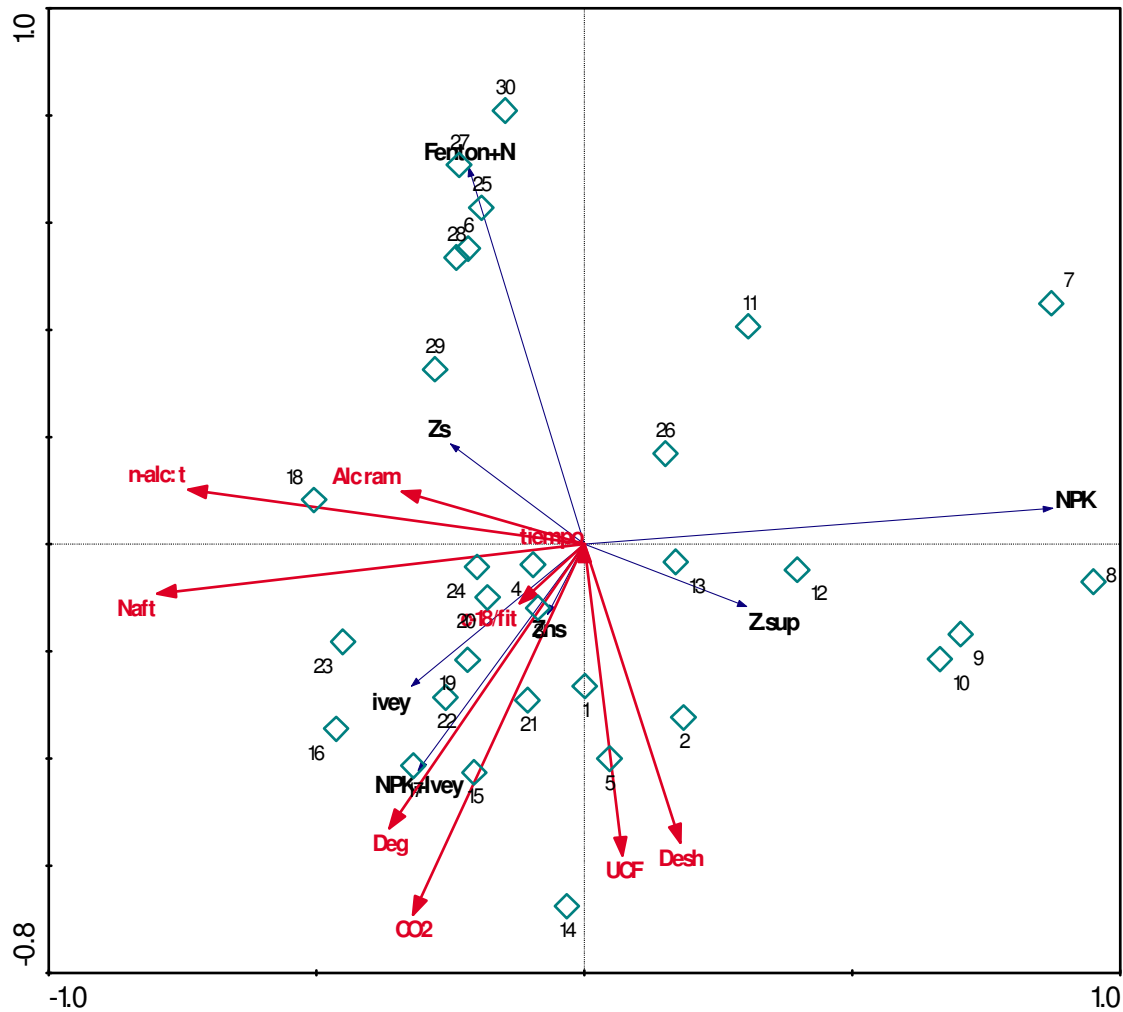


Figura IV.21. Gráfica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos y las zonas de estudio en la planta piloto.

El segundo eje (vertical) muestra un 23,6% de variabilidad de los tratamientos y las zonas en la planta piloto explicables mediante las variables analizadas y un 60,7% de variabilidad en todo el sistema. En este eje se puede observar que la variable biológica más determinante es el recuento de los microorganismos heterótrofos (UFC).

Es importante destacar que según los análisis estadísticos realizados (test de Monte Carlo²) la concentración de naftaleno ($p=0.09$) y la producción de CO_2 ($p=0.07$) son las variables que menos cambios significativos tienen durante los 28 días de tratamiento.

² Test de Monte Carlo: se basa en el cómputo de algoritmos con repeticiones al azar de las variables para calcular los resultados.

Por otro lado, como ya se ha demostrado con los resultados descritos anteriormente, se puede observar que los tratamientos aplicados y la zona superficial, no saturada y saturada, influyen de forma diferente las variables analizadas, ubicándose en cuadrantes diferentes del diagrama. Por esta razón se realizaron análisis en cada una de las zonas de la planta piloto.

El análisis de redundancia de zona superficial ($p=0,006$) indica que en el eje horizontal se describe un 32,9% de variabilidad tanto para la influencia de los tratamientos sobre las variables biológicas y químicas, y la variabilidad de todo el sistema. En el eje vertical se describe un 34,2% de la variabilidad del sistema y de la influencia de los tratamientos (Figura IV.22.).

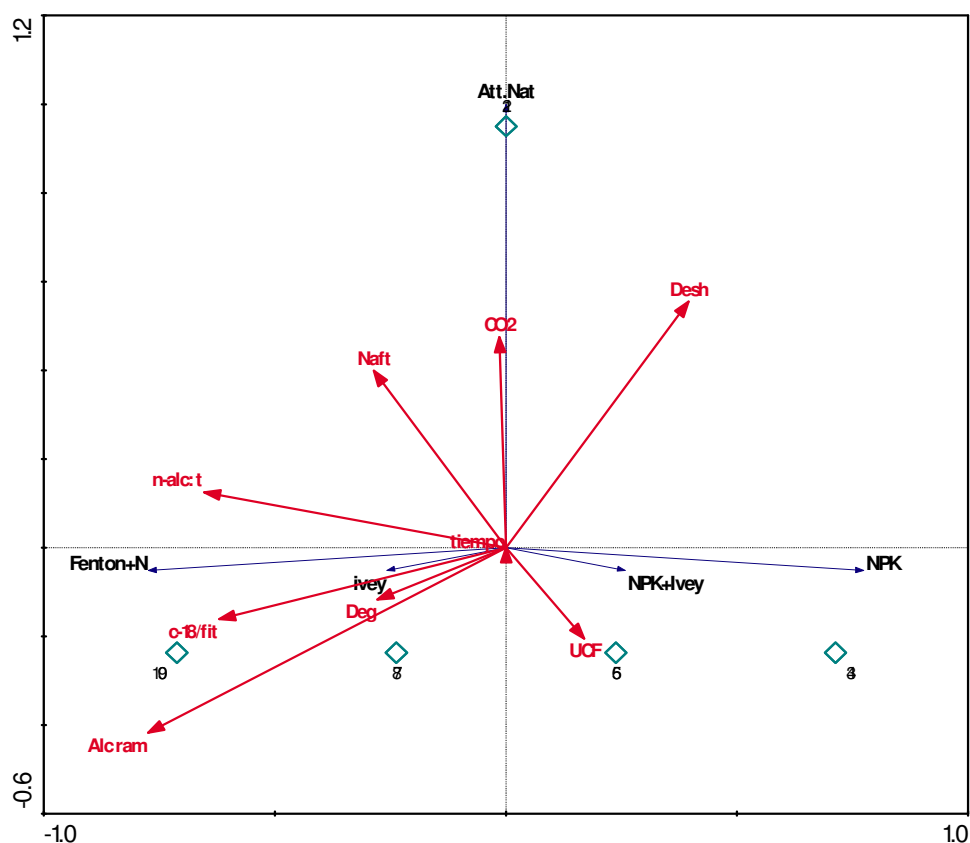


Figura IV.22. Gráfica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos en la zona superficial.

Es importante resaltar que en la zona superficial no se obtuvieron diferencias significativas en la mayoría de las variables analizadas, lo que puede indicar que los tratamientos principalmente la ATENUACIÓN NATURAL, el NPK y FENTON+NPK tienen una influencia similar en la degradación de naftalenos y alcanos ramificados, como también en el recuento de heterótrofos y degradadores, además de tener influencia similar en la actividad deshidrogenasa.

En la zona no saturada, el eje horizontal muestra el 32,9% de variabilidad de los tratamientos explicable mediante las variables biológicas y químicas. La variable más determinante en este eje fue el recuento de heterótrofos ($p=0.0017$). Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.23. En el eje vertical los parámetros que más variaron entre los tratamientos aplicados fueron la degradación de alcanos ramificados ($p=0,05$) y la relación C-18/Fi (0,05).

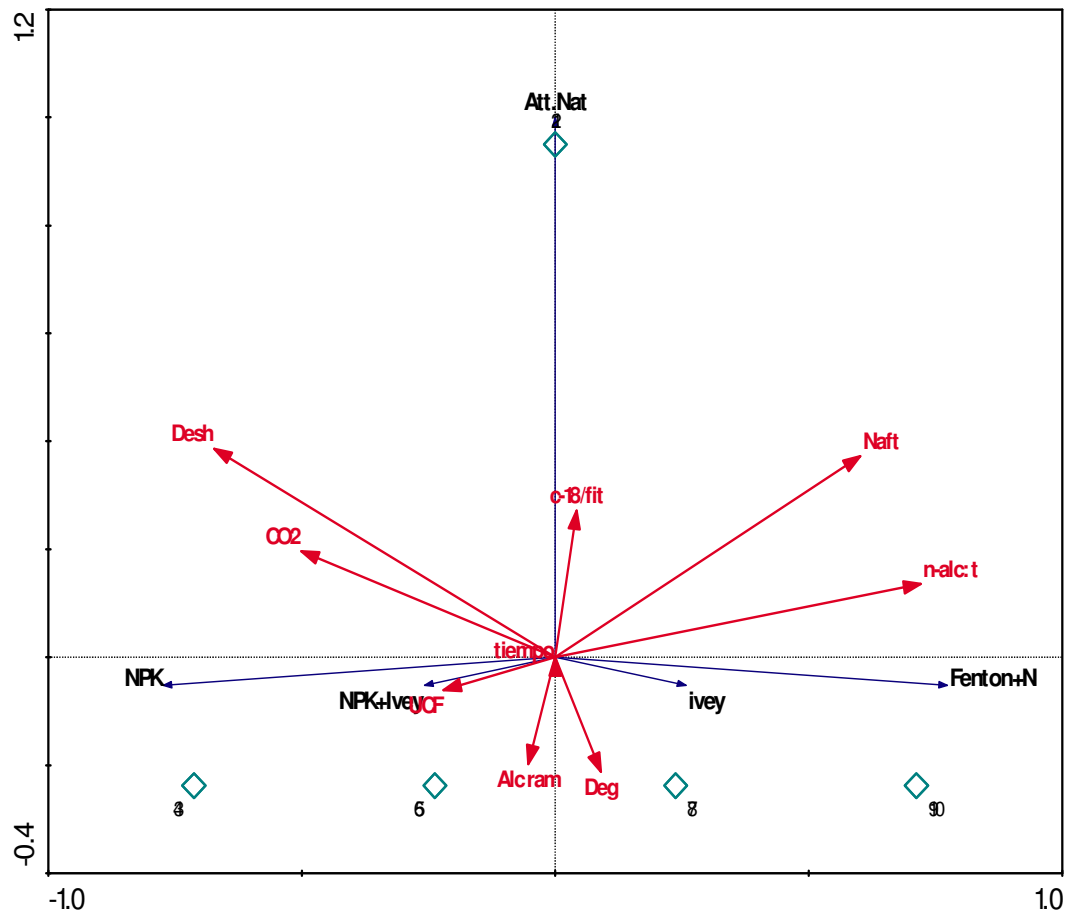


Figura IV.23. Grafica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos en la zona no saturada

Estos resultados y los porcentajes de degradación descritos anteriormente, indicarían que la degradación de los alcanos lineales y de naftalenos es similar en los tratamientos NPK y NPK+FENTON. Mientras que la degradación de los alcanos ramificados se ve influenciada por el tratamientos NPK+IVEY con un porcentaje de humedad entre un 25-35%.

Los resultados del análisis de redundancia ($p=0,002$) de la zona saturada se muestran en la figura IV.24. Al igual que en las dos zonas anteriores el eje vertical describe un 32,9% de la variabilidad de los tratamientos explicable mediante los parámetros biológicos y químicos y el eje vertical describe un 34,2%.

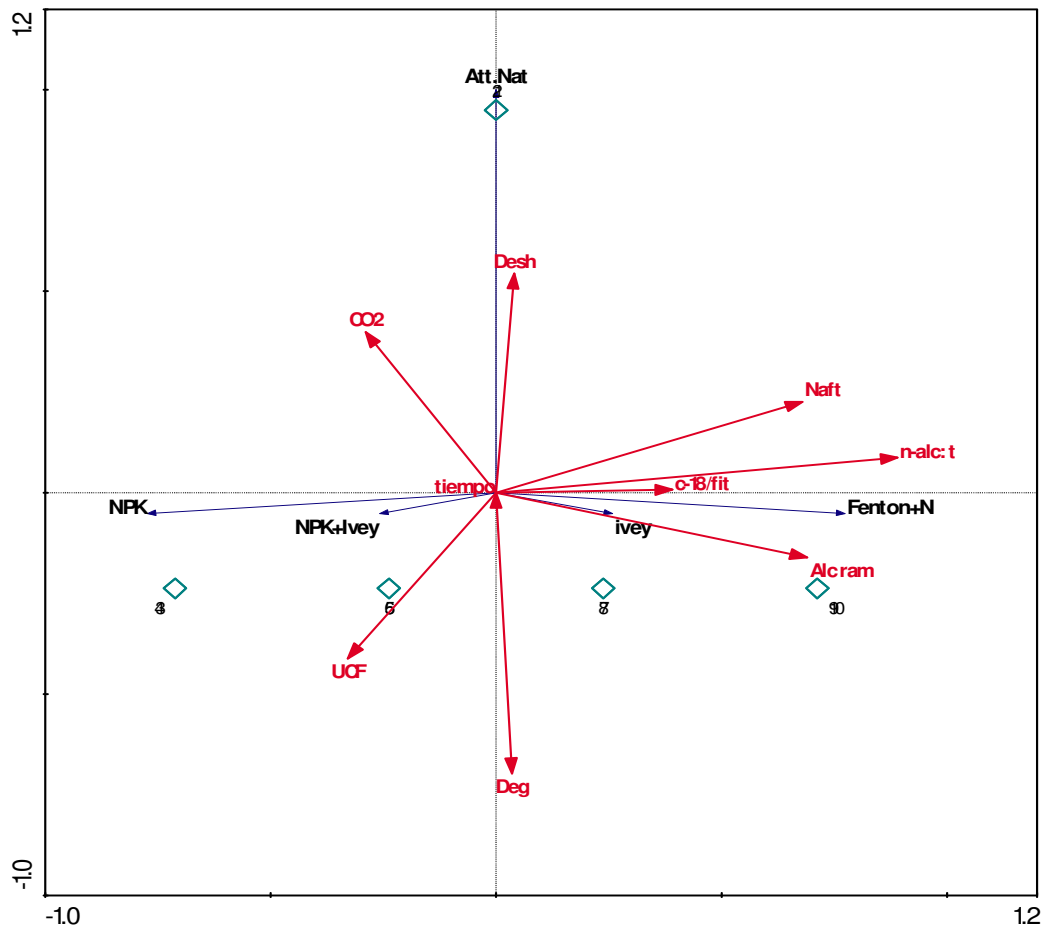


Figura IV.24. Grafica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos en la zona saturada.

En la zona saturada, las variables que más se ven influenciadas por los tratamientos estudiados son el índice C18/Fi ($p=0,02$) y la actividad deshidrogenasa ($p=0,02$) en el eje horizontal y en el eje vertical respectivamente.

El principal resultado que se obtiene a partir de los análisis de redundancia es que tanto el índice de C18/Fi como el recuento de microorganismos son los parámetros que se ven influenciados en todas las zonas de la planta piloto por los tratamientos aplicados. Estos parámetros servirían como indicadores biológicos y químicos de los procesos de biodegradación. Este resultado principal corrobora la teoría descrita por Wang et al. [2003] que señala que los biomarcadores fitano y pristano y sus respectivos alcanos lineales indican los procesos de biodegradación de los hidrocarburos ligeros en periodos cortos de tiempo.

Es importante destacar que los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL, NPK y FENTON+NPK originaron en la zona superficial y zona no saturada una disminución de todas las fracciones de hidrocarburos analizadas y de igual manera estimularon la actividad biológica del suelo.. Sin embargo en la zona saturada los resultados muestra una mayor influencia de los

tratamientos NPK+IVEY y FENTON+ NPK en la disminución de las cantidades de hidrocarburos presentes.

Por lo tanto se puede concluir que, en una zona aireada con porcentajes de humedad inferiores a un 15%, y diesel como contaminante, el mejor tratamiento es la aplicación de fertilizante NPK. Aunque la ATENUACIÓN NATURAL y el pretratamiento FENTON seguido de la adición de NPK también tienen unos elevados porcentajes de degradación.

En humedades entre los 20 y 30% el tratamiento FENTON+NPK es el que mejor resultados obtuvo con porcentajes superiores al 70% en las tres fracciones de hidrocarburos estudiadas. En segundo lugar el tratamiento NPK degrada los alcanos lineales y naftalenos con porcentajes superiores al 90%, pero no se detectó degradación de los alcanos ramificados.

En este sentido, como ya se ha mencionado la aplicación de bioestimulantes, en este caso del fertilizante NPK mejora los niveles de remoción natural de los hidrocarburos en suelos contaminados [Nikolopoulou et al. 2009]. Sin embargo la eficiencia de este tipo de tratamientos Según De Domenico et al. [2004] alcanza niveles de un 80%, planteando que el porcentaje restante no se degrada por dos razones principalmente. En primer lugar, que los microorganismos presentes en el suelo no tengan el potencial catabólico para degradar estos compuestos. En segundo lugar, la biodisponibilidad de los hidrocarburo restantes. En este caso, la adición del NPK en la zona no satura no estimuló la degradación de los alcanos ramificados. Por el contrario, la oxidación que se realizó con el pretratamiento Fenton ayudó a la disponibilidad de los compuestos ramificados siendo el único tratamiento que degrada este tipo de hidrocarburo en estas condiciones de estudio.

En las zonas con humedades superiores a un 35% el tratamiento NPK+IVEY fue el que obtuvo los mejores resultados. Es importante aclarar que el rendimiento del tratamiento NPK+IVEY fue alto en condiciones elevadas de humedad. Una de las propiedades de los surfactantes es aumentar la biodisponibilidad del hidrocarburo, probablemente esta capacidad se vea incrementada por el mayor porcentaje de humedad. Numerosos autores (Li et al. 2009; Rodríguez et al. 2008) han diseñado distintas estrategias de biorremediación basadas en el uso de surfactantes para la eliminación de hidrocarburos y han puesto de manifiesto la diversidad de resultados dependiendo de las condiciones medioambientales de la zona a tratar y del tipo de contaminante [Li et al. 2009; Rodríguez et al. 2008]

Como uno de los resultados más concluyente en los ensayos en planta piloto, se puede indicar que las condiciones ambientales influyen en el tipo de tratamiento que debe ser seleccionado para la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos. Sin embargo, en condiciones de humedad elevada el tratamiento óptimo es la combinación de nutrientes (fertilizante NPK) con surfactante (IVEY). En condiciones de bajo porcentaje de humedad el fertilizante NPK sería el más adecuado. Mientras que el pretratamiento FENTON seguido de un tratamiento biológico se podría usarse en perfiles de suelo con diferentes humedades obteniendo altos porcentajes de degradación entre un 50 y 70%.

Para la obtención de todos los resultados y las conclusiones anteriormente mencionadas, fue necesaria la realización de un proceso de escalado con tres fases. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.25.

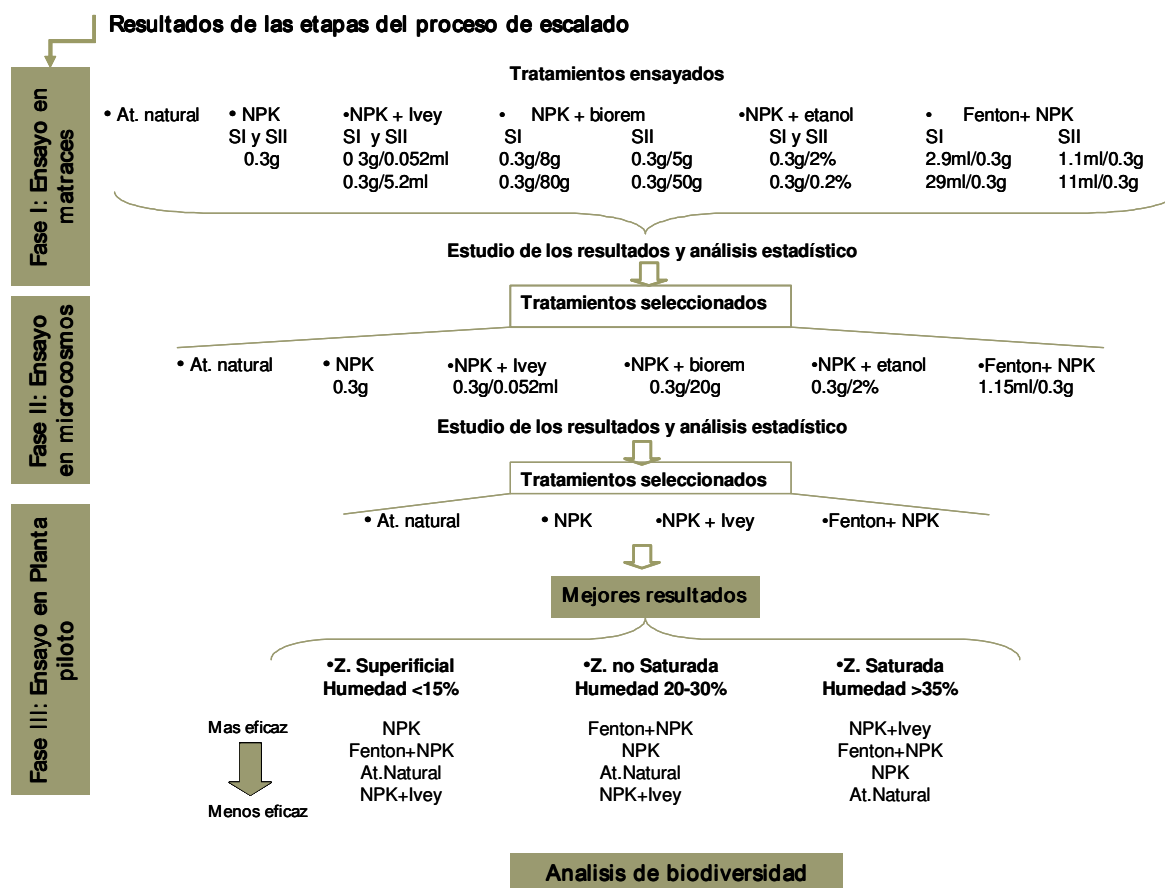


Figura IV.25. Diagrama de resultados de las tres etapas del estudio.

DIVERSIDAD MICROBIANA. ESTUDIOS EN PLANTA PILOTO

La biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos es posible debido a la biodegradabilidad del contaminante y al hecho de que los microorganismos degradadores pueden ser enriquecidos en la mayoría de los ambientes o ecosistemas. Las comunidades bacterianas del suelo y los procesos mediados por ellas son críticos para el funcionamiento del ecosistema.

Así los suelos constituyen un tipo de ecosistema en el que la diversidad de microorganismos se hace especialmente evidente debido a sus especiales características y su estabilidad. Los aportes de materia orgánica e inorgánica que el suelo recibe, en términos de abundancia, mantienen una inmensa cantidad de microorganismos que apenas aún se están comenzando a descubrir. En la actualidad, los estudios de biotratabilidad de ecosistemas contaminados se apoyan en las técnicas moleculares para monitorizar el efecto de la contaminación sobre las poblaciones microbianas, para identificar nuevas cepas degradadoras, así como para evaluar el efecto de los tratamientos de remediación sobre la microbiota autóctona.

En este sentido, técnicas como la electrofóresis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) empleada en este estudio resultan de especial utilidad para poder establecer la importancia de la diversidad microbiana (total o correspondiente a determinados grupos funcionales), con rigor científico, así como la dinámica característica de sus poblaciones en el suelo [Van Verseveld *et al.* 2004]. En este estudio se comparó el efecto de los tratamientos aplicados en la planta piloto sobre la diversidad microbiana, mediante la técnica TGGE. Evaluando el efecto de la contaminación, del perfil del suelo, del tipo de tratamiento aplicado y del tiempo transcurrido sobre las poblaciones microbianas autóctonas.

IV.3.4. ANÁLISIS DE LA BIODIVERSIDAD EN LA PLANTA PILOTO CON LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS

En el primer apartado se muestran los resultados que se obtuvieron al realizarse la electroforesis bajo un gradiente lineal de temperaturas para el total de las muestras (Fig 26-27).

Estos resultados muestran diferencias en las poblaciones microbianas obtenidas a partir de suelos con diferentes tratamientos (surfactante, surfactante más fertilizante, y tratamiento

Fenton previo al tratamiento con fertilizante) que tuvieron una marcada influencia sobre la biodiversidad bacteriana, así como de suelos sometidos a atenuación natural. Dichos efectos dependían de las condiciones de la zona muestreada y se ven reflejados en los distintos patrones de bandas obtenidos, los cuales indican cambios en la población microbiana original (control).

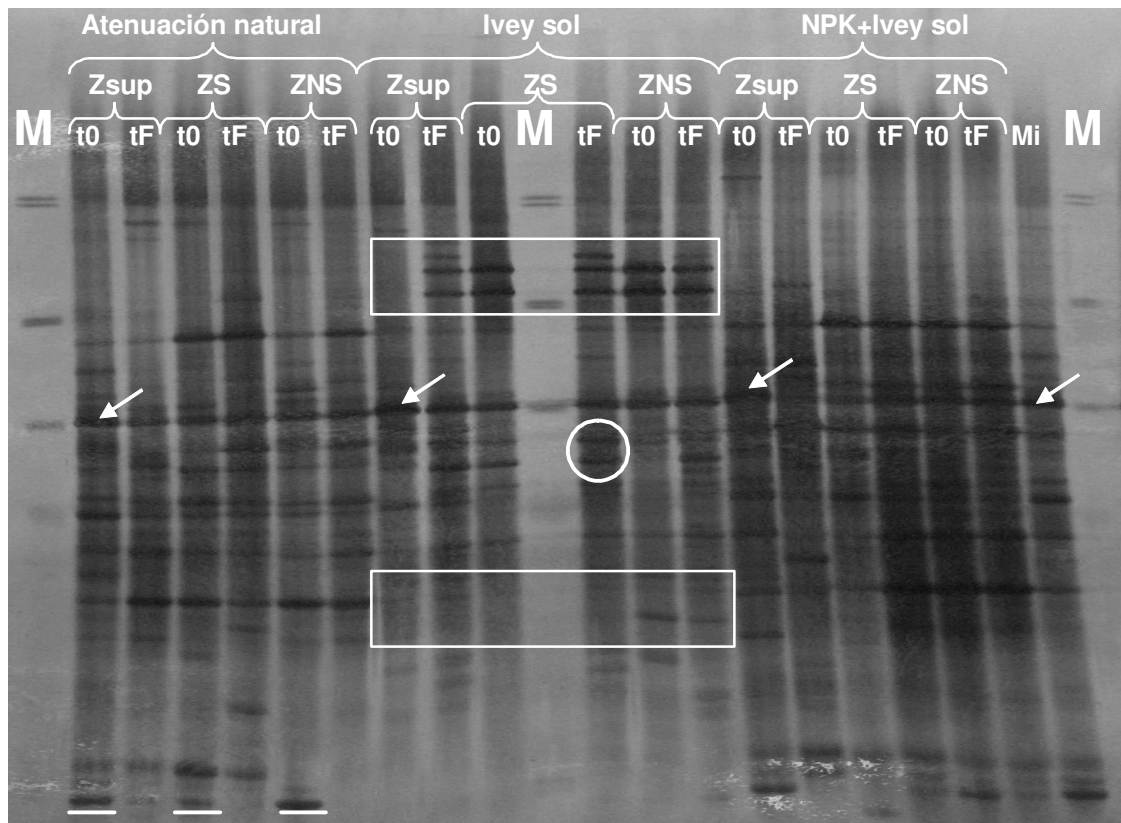


Figura IV.26. Análisis de biodiversidad (TGGE) en suelos con los biotratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY.

El patrón de biodiversidad de la figura IV.26 presenta bandas que se repiten a lo largo de todo el gel con diferentes intensidades en todas las muestras, independientemente de la zona de estudio o del tratamiento utilizado, un ejemplo de este tipo de bandas se señala en la figura mediante flechas. Las líneas blancas muestran algunas de las bandas que sólo aparecen a tiempo inicial (t0), y desaparecen en las muestras a tiempo final (tf) en el ensayo con ATENUACIÓN NATURAL, sugiriendo que la adición de diesel originó la desaparición de algunas de las bandas.

Puede observarse también que el tratamiento con el surfactante IVEY fue el que originó los cambios más importantes en la diversidad de las poblaciones microbianas, puesto que desaparecieron bandas que eran relativamente constantes en el resto de ensayos y aparecieron otras que no están presentes en ninguno de los otros tratamientos (rectángulos y círculo blancos).

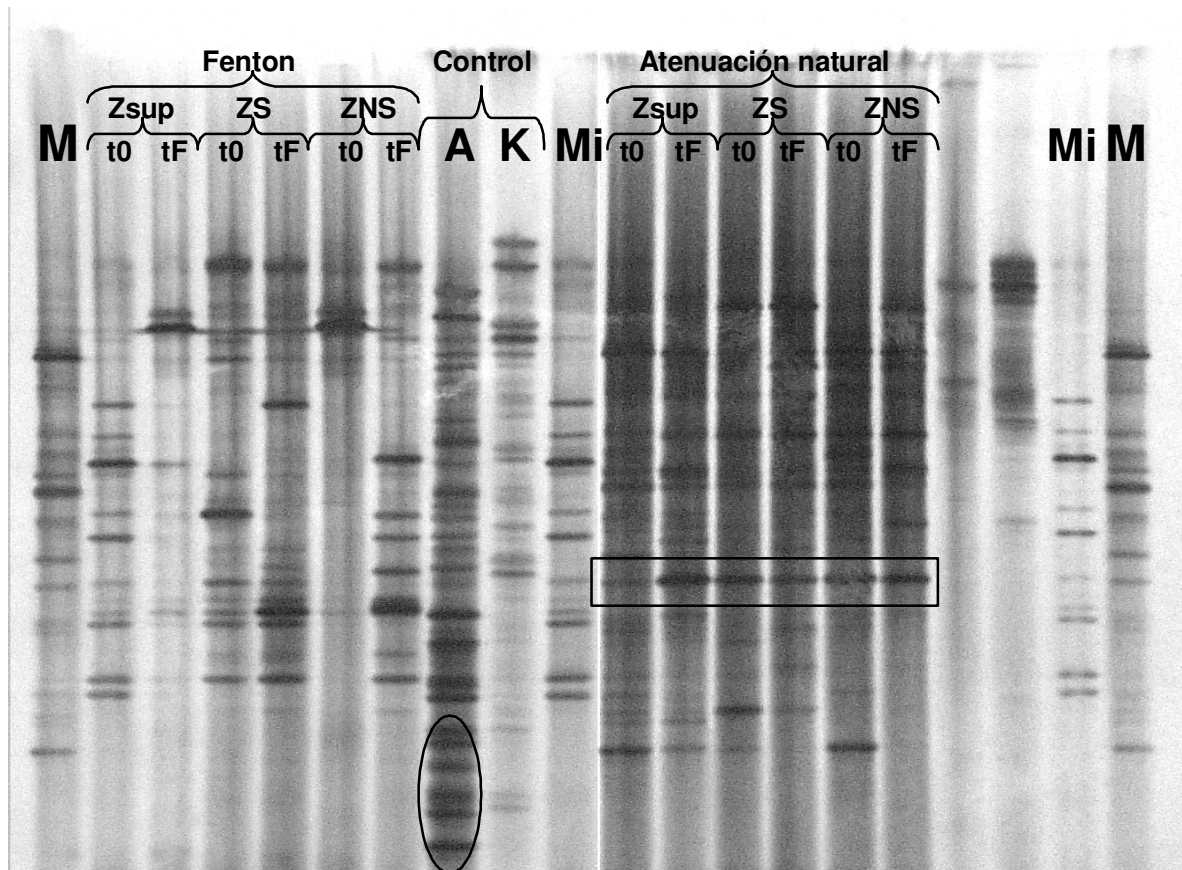


Figura IV.27. Análisis de biodiversidad (TGGE) en suelos con los biotratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY.

En el gel que se muestra en la Figura IV.27 se compara el comportamiento de la atenuación natural y el tratamiento con reactivo Fenton combinado con NPK, observándose grandes cambios en la biodiversidad respecto a las muestras control A y K (suelo sin contaminar). Este TGGE se caracteriza por presentar un patrón de bandas complejo con elementos que no se repiten en todas las muestras a lo largo del gel, a excepción de las marcadas mediante un rectángulo negro, que sólo se repiten en las muestras pertenecientes al ensayo de atenuación natural.

Cabe destacar que las muestras control *A* y *K*, pertenecientes a suelo sin contaminar, presentan un gran número de bandas (óvalo negro) que desaparecen en el resto de muestras de atenuación natural y de tratamiento Fenton

Los perfiles de bandas mostrados en las figuras IV.28-29 fueron analizados con el programa Gel Compar II v. 5.101 (Applied Maths, Bélgica), mediante el análisis de cluster utilizando un índice de similitud independiente de la asignación de bandas, basado en el coeficiente de correlación de Pearson. Dicho coeficiente analiza las curvas de intensidad de las muestras, dando información sobre la abundancia relativa de cada una de las bandas, y se considera un método objetivo para la comparación de perfiles de comunidades microbianas complejas [Van Verseveld *et al.* 2004].

Se obtuvieron dos dendrograma, el primero para el TGGE con los biotratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY que se muestra en la Figura IV.28 y el segundo para FENTON+NPK, Control y ATENUACIÓN NATURAL, figura IV.34.

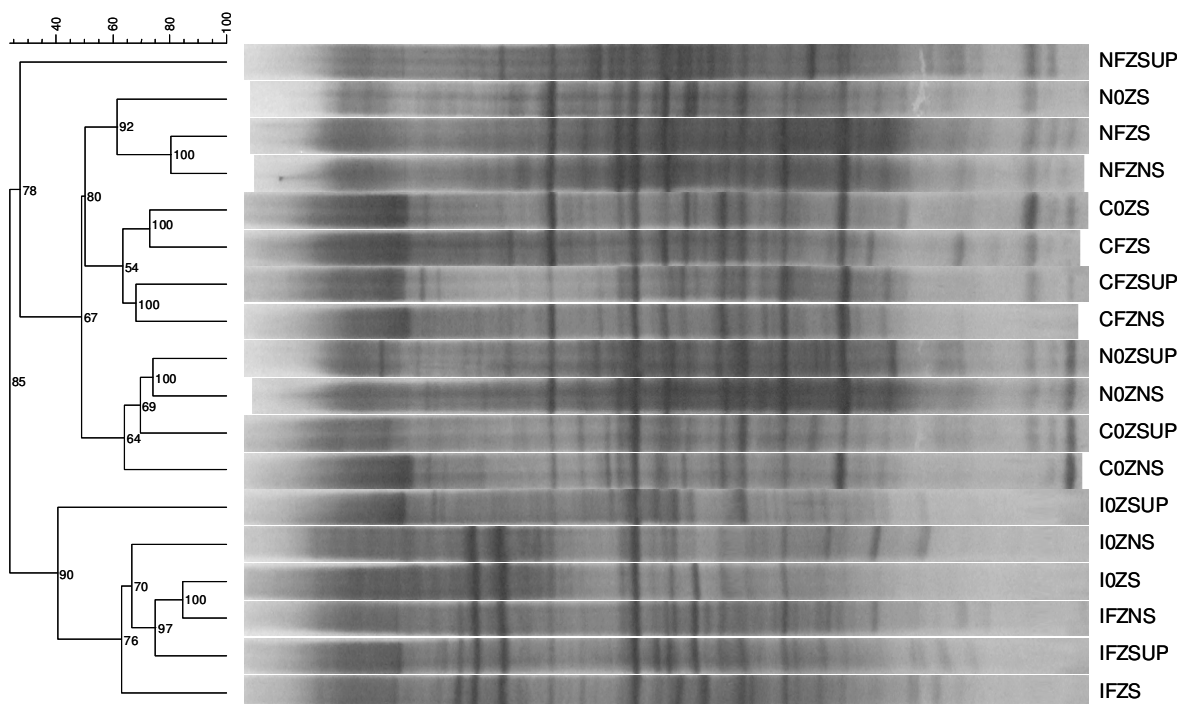


Figura IV.28. Dendrograma de las muestras de los tratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY. **N**= tratamiento NPK + IVEY ; **I**= tratamiento IVEY; **C**= ensayo de ATENUACIÓN NATURAL; **ZSUP**= zona superficial; **ZNS**= zona no saturada; **ZS**= zona saturada; **0**= tiempo inicial ; **F**= tiempo final

Las muestras pertenecientes a los ensayos de ATENUACIÓN NATURAL y tratamiento NPK+IVEY se agruparon en dos clusters diferentes, de manera que la mayoría de las muestras de tiempo inicial de ambos tratamientos se agruparon en un cluster con un 65% de similitud y un índice de correlación cofenética de más de 64%, y la mayoría de las muestras de tiempo final de ambos tratamientos se agruparon en otro cluster diferente con un 50% de similitud y un índice de correlación cofenética de 80%. Las diferencias entre tiempo inicial y final indican que estos tratamientos producen cambios en la biodiversidad a lo largo del tiempo y que son mayores a los debidos a la variabilidad intrínseca de las muestras, aunque dichos cambios son similares en ambos ensayos (ATENUACIÓN NATURAL y NPK+IVEY) y no implican diferencias significativas entre ellos.

Por otro lado, se observa que las muestras pertenecientes al ensayo con tratamiento IVEY se agruparon en un mismo cluster, separadas del resto de muestras aunque con similitud baja (40-65%) e índices de correlación cofenética que oscilan entre 70-100% dentro del cluster. La similitud con las muestras de los otros ensayos es de 35% con un índice de correlación cofenética de 85%, lo cual es indicativo de que dicho tratamiento introduce cambios en la diversidad microbiana del suelo.

En la Figura IV.29 se aprecian diferencias entre las muestras control A y K (suelo sin contaminar) y el resto de las muestras analizadas en el gel. Las muestras A y K se separan del resto de los clusters con un grado de similitud menor al 30% y un índice de correlación cofenética que oscila entre 86% y 100%, lo cual indica que la contaminación con diesel introduce grandes cambios en las poblaciones microbianas naturales del suelo.

Estos resultados mostraron la influencia que ejerce la contaminación con 10000 g/kg de diesel sobre la microbiota autóctona de un suelo arenoso, comparando el perfil de bandas obtenidos entre las muestras control del suelo arenoso [A y K] utilizado en este estudio, con las muestra de Atenuación natural.

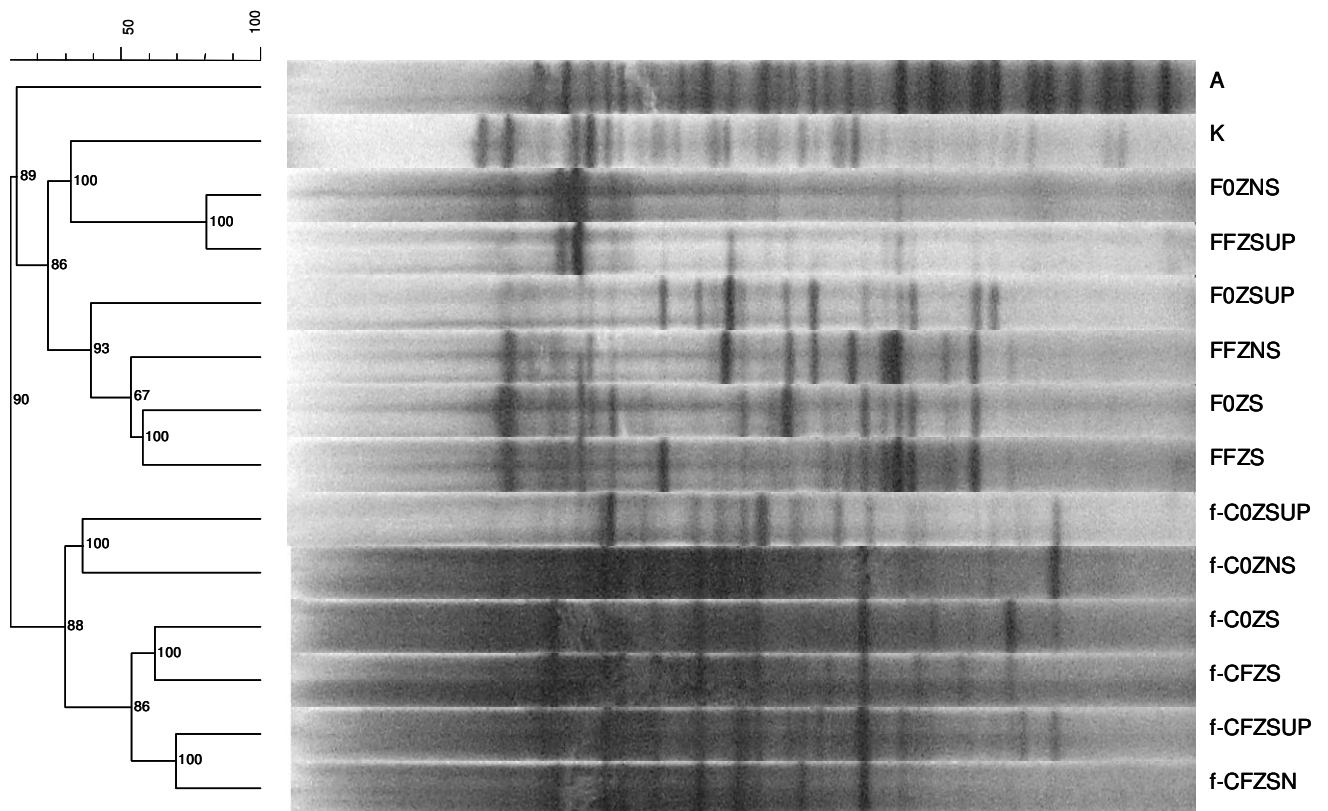


Figura IV.29. Dendrograma de las muestras de los tratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, FENTON+NPK, Control. **A**= control arena comercial (suelo sin contaminar); **K**= control arena de cantera igual a la del resto de ensayos (sin contaminar); **F**= tratamiento Fenton previo al tratamiento NPK; **f-C**= ensayo de Atenuación natural; **ZSUP**= zona superficial; **ZNS**= zona no saturada; **ZS**= zona saturada; **O**= tiempo inicial ; **F**= tiempo final

Estas muestras, *A* y *K*, presentaron un 10% de similitud con las muestras de Atenuación Natural, lo cual indica que la contaminación con diesel introdujo un 65% más de variación en las poblaciones microbianas naturales del suelo teniendo en cuenta que, además, la variabilidad intrínseca del suelo era de 25% en la zona superficial y de 15% en las zonas saturada y no saturada.

Este hecho pudo ser debido al efecto del contaminante, el cual originó la desaparición de algunas poblaciones, para luego dar paso al crecimiento de los microorganismos degradadores y/o tolerantes al contaminante. Según Païssé *et al.* [2010], los procesos de adaptación de la microbiota en respuesta a la contaminación con hidrocarburos ocurren dentro de pocas horas después de la contaminación. Estos procesos de adaptación conducen a un aumento significativo del número de bacterias degradadoras de hidrocarburos y a la gran abundancia de poblaciones metabólicamente activas.

Según *Spain et al [1980]* las comunidades microbianas que toleran la contaminación con hidrocarburos inician un proceso de "adaptación" que puede deberse a: 1º) inducción y/o inhibición de enzimas específicas; 2º) cambios genéticos que dan lugar a nuevas capacidades metabólicas; y 3ª) enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar el compuesto o compuestos de interés. Determinados estudios han mostrado que el número de microorganismos y su proporción en la comunidad heterotrófica aumenta con la exposición al petróleo y otros contaminantes hidrocarbonados y que los niveles de microorganismos degradadores generalmente reflejan el grado de contaminación del ecosistema [*Leahy et al. 1990*].

Los resultados obtenidos también mostraron que todos los biotratamientos modificaban apreciablemente el patrón de bandas respecto al control de suelo sin contaminar (A y K). Sobre todo, los tratamientos IVEY y reactivo FENTON+NPK, fueron los que produjeron mayores modificaciones del patrón de bandas, mostrando una biodiversidad superior a la intrínseca al suelo. Con todo lo expuesto se puede indicar, que desde la fase inicial se establece una especialización o diferenciación de la microbiota a lo largo del perfil del suelo, condicionado por las características del mismo. En general, la exposición previa de una comunidad microbiana a los hidrocarburos influye de forma importante en la eficacia del proceso de biodegradación [*Wolicka et al. 2009*].

IV.3.4.1. Estudio de las poblaciones microbianas

Los resultados obtenidos en los estudios de biodiversidad muestran diferencias relacionadas con los distintos tratamientos aplicados. Así como se ha comentado con anterioridad algunas bandas parecían estables para algunos tratamientos, mientras que en otras ocasiones se observó la aparición de poblaciones al final de los ensayos. Con objeto de hacer una primera aproximación se extrajeron algunas bandas para su posterior purificación y secuenciación.

De los geles de TGGE se realizó la extracción, purificación, reamplificación y secuenciación de un total de 19 bandas, de las cuales 6 se obtuvieron del gel de los tratamientos de Ivey y NPK+Ivey y 11 del gel del tratamiento Fenton+NPK. Estas bandas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.16

Tabla IV.16. Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región v3 del ADNr 16s, aproximadamente 200bp) de los poblaciones integrantes de la planta piloto de los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL, IVEY, IVEY+NPK Y FENTON + NPK, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.

	IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA 16S	% DE IDENTIDAD	GRUPO
AI1	FJ172037 <i>Maribacter dokdonensis</i>	100	Flavobacteria
AI2	FN679105 Uncultured <i>Rhodofera</i> sp.	93	Betaproteobacteria
AI3	GU255472 uncultured <i>Acidovorax</i> sp.	97	Betaproteobacteria
AI4	GU217778 Uncultured <i>Xanthomonas</i> sp.	92	Gammaproteobacteria
AI5	FN868361 Uncultured <i>Acidovorax</i> sp.	98	Betaproteobacteria
AI9	HQ009852 <i>Blastochloris viridis</i>	91	Alphaproteobacteria
AF2	GU377078 <i>Bacillus</i> sp.	96	Firmicutes
AF3	AY372899 <i>Actinobacterium</i>	83	Actinobacteria
AF4	HM468087 <i>Alcaligenes</i> sp.	99	Betaproteobacteria
AF5	EU249991 <i>Massilia</i> sp.	84	Betaproteobacteria
AF6	GU586301 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	92	Betaproteobacteria
AF7	EU734657 <i>Pusillimonas</i> sp.	93	Betaproteobacteria
AF8	X92415 <i>Alcaligenes</i> sp	91	Betaproteobacteria
AF9	FN868370 Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	98	Gammaproteobacteria
AF11	GU245920 Uncultured <i>Clostridium</i> sp.	87	Firmicutes
AF12	FJ773395 <i>Balneimonas</i> sp.	90	Alphaproteobacteria
AF13	AY307857 Uncultured <i>actinobacterium</i>	97	Actinobacteria
AF14	FJ377401 <i>Limnobacter</i> sp.	92	Betaproteobacteria
AF15	EU878154 Uncultured <i>Candidatus Aquiluna</i> sp.	96	Actinobacteria

En resumen, 10 de las bandas secuenciadas pertenecieron al subgrupo de las betaproteobacteria, 3 a las Actinobacteria, 2 del subgrupo Gammaproteobacteria, alphaproteobacteria y firmicutes y una al grupo Flavobacteria.

Las secuencias obtenidas se representan en el árbol filogenético que se muestra en la figura IV.30, elaborado a partir de un alineamiento múltiple mediante el método *Neighbour-Joining*, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los microorganismos más similares depositados en la base de datos.

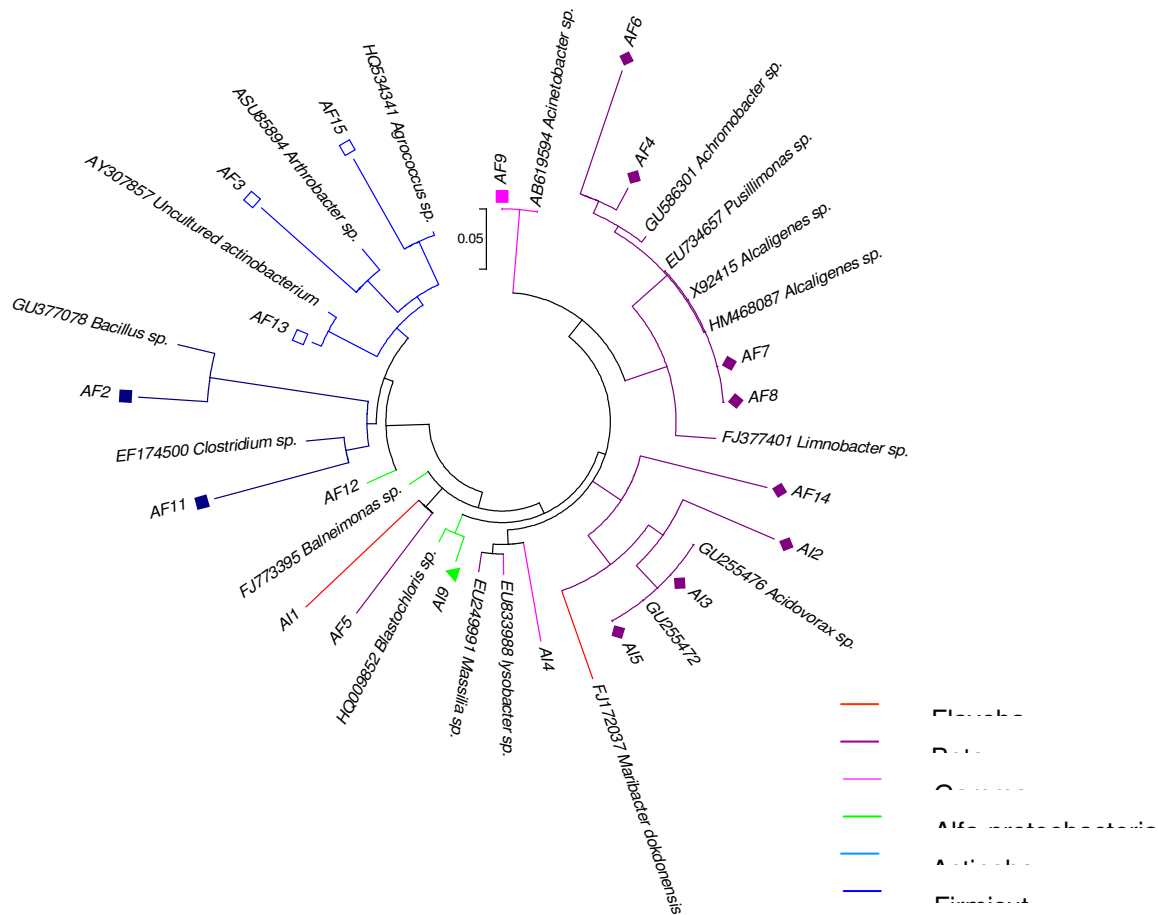


Figura IV.30. Árbol filogenético de las bandas extraídas de la planta piloto

A partir de la secuenciación de las bandas seleccionadas del TGGE, se han identificado 13 géneros diferentes. Con respecto a las bandas extraídas de los tratamientos Ivey e Ivey+NPK, estas secuencias se agruparon en clusters muy cercanos entre ellas, próximos a géneros como: *Rhodofera*, *Acidovorax*, *Xanthomonas* y *Blastochloris*. Por otro lado las secuencias de las bandas extraídas correspondientes al tratamiento Fenton+NPK se agruparon en dos cluster diferentes asociándose a los géneros *Bacillus*, *Actinobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Pusillimonas*, *Limnobacter*. En resumen, las secuencias identificadas se relacionan con géneros conocidos por su potencial degradador de hidrocarburos como es el caso de *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Achromobacter* o *Pseudomonas* [Van Hamme et al. 2000 y 2003].

Por otro lado y con objeto de realizar un estudio más detallado del efecto de los tratamientos de biorremediación se han analizado los cambios en la biodiversidad microbiana en las tres zonas de estudio, realizando dos tipos de análisis, el primero un análisis de cluster utilizando el marcaje de bandas y el coeficiente de Dice, obteniendo los dendrogramas y las matrices de similitud entre ellos. El segundo análisis consistió en una representación de la organización funcional de la distribución de especies, que nos mostró la relación entre la estructura de la comunidad microbiana y su funcionalidad [Marzorati et al. 2008]. Estos resultados se exponen en el siguiente apartado.

IV.3.5. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS DE BIOESTIMULACIÓN SOBRE LA DIVERSIDAD MICROBIANA

Para conocer el efecto de los tratamientos de bioestimulación sobre la microbiota y determinar la diferencia entre ellos. Se comparó la muestra del suelo contaminado inicial [C0] y las muestras de los tratamientos del tiempo final [Cf] en cada una de las zonas de estudio. Como se describió en el apartado de material y métodos, se realizaron dos gels con diferentes gradientes de temperatura, razón por la cual los resultados obtenidos en cada gel se describen y se analizan por separado.

Los dendrogramas obtenidos relacionan la similitud de los distintos perfiles de bandas de las muestras estudiadas utilizando la asignación de bandas, basándose en el **coeficiente de correlación de Dice**. Este coeficiente relaciona el número de bandas presentes en cada carril con el número de bandas comunes entre los carriles. En estos dendrogramas se observan las bandas marcadas de color rojo y la intensidad de las mismas con la línea de picos de color amarillo, de igual manera se muestra la matriz de similitud con el coeficiente de correlación de Dice.

Para abordar la relación entre la funcionalidad y la estructura de la comunidad microbiana en las condiciones físico-químicas establecidas (porcentaje de humedad, presencia de oxígeno, etc) en la zona superficial, no saturada y saturada, se realizaron curvas de uniformidad que se construyeron relacionando la intensidad de las bandas obtenidas en cada carril de los perfiles de la TGGE con el número de bandas. En el eje X se representa el número de bandas acumulado y sus respectivas intensidades acumuladas en el eje Y.

Las curvas de uniformidad de los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL, IVEY Y NPK+IVEY en la zona superficial muestran una baja uniformidad de la estructura en la comunidad estudiada (Figura IV-32.). El tratamiento IVEY mantiene la organización funcional de la población microbiana durante los días del tratamiento, obteniendo el mismo porcentaje de uniformidad que el tiempo inicial un 40%. Por otro lado, los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL y NPK+IVEY modifican la organización a un 50% la organización funcionalidad de la estructura microbiana. Estos valores en la organización funcional [Fo] muestran un balance medio de la comunidad microbiana, lo que significa que en la zona superficial, las especies mas dominantes están presentes en una elevada concentración y el 80% de las especies restantes tiene una intensidad baja pero no se ven afectadas por las condiciones ambientales preservando la funcionalidad del sistema.

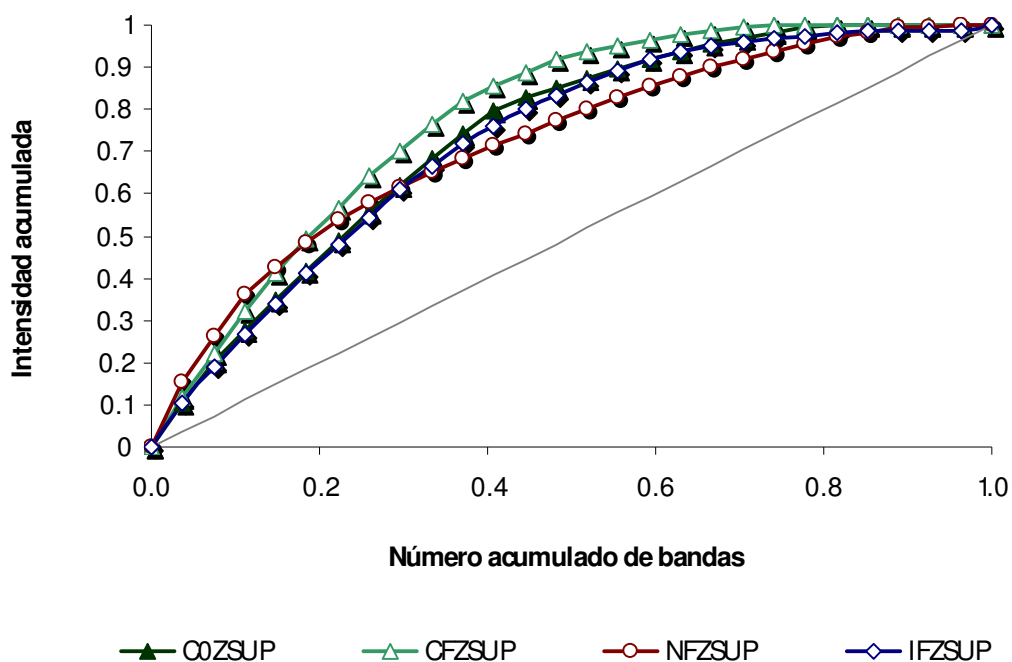


Figura IV.32. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona superficial. [C0Zsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZsup] tiempo final Ivey; [NfZsup] tiempo final NPK+Ivey.

Como se observa en el dendrograma de la figura VI.33 que se obtuvo con el pre-tratamiento FENTON, la diferencia de éste con la muestra inicial y la ATENUACIÓN NATURAL es clara. Se observa una disminución en la biodiversidad del suelo tratado con una oxidación química previa a la bioestimulación, el porcentaje de similitud es de un 68,8% con el suelo contaminado sin tratar y de un 71% con la ATENUACIÓN NATURAL.

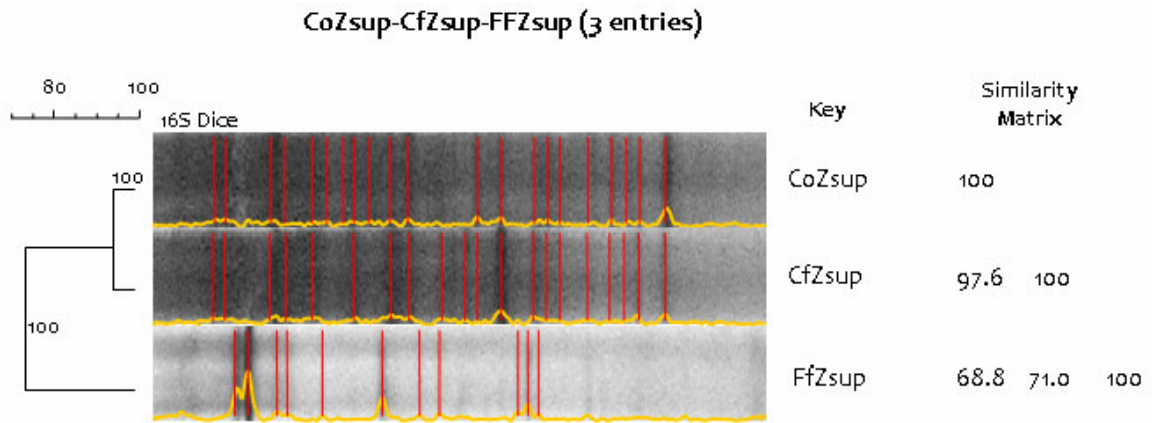


Figura IV.33. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona superficial. [CoZsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZsup] tiempo final FENTON+NPK, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.

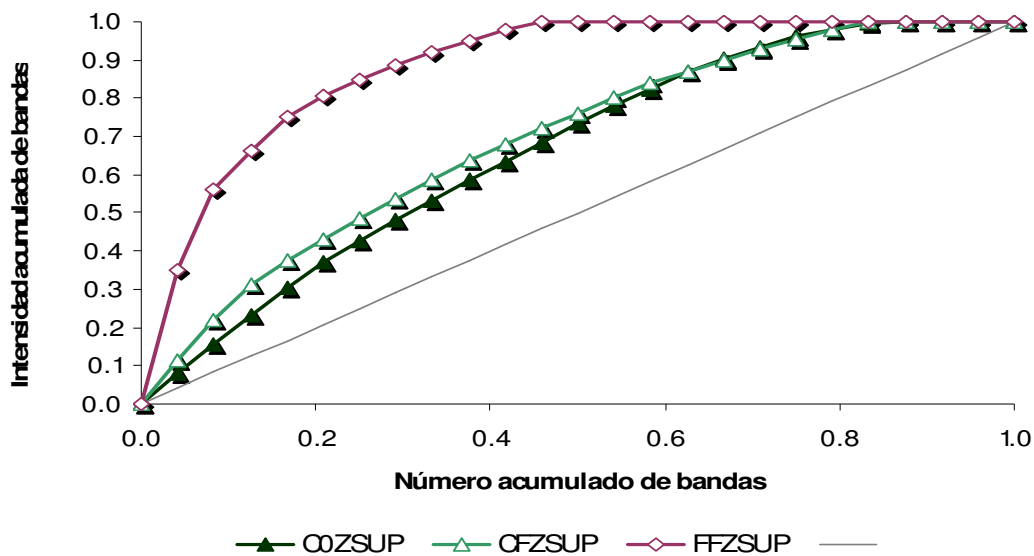


Figura IV.34. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona superficial [CoZsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZsup] tiempo final FENTON+NPK.

La diferencia que se obtuvo en los resultados del análisis de cluster entre el pretratamiento FENTO y LA ATENUACIÓN NATURAL se corroboran con las curvas de uniformidad que se muestran en la figura IV.34. Como se puede observar el tratamiento FENTON+NPK tiene una organización funcional F_o de un 80%, lo que indica una comunidad especializada

en la cual una pequeña cantidad de especies son las dominantes y todas las demás están presentes en pequeñas cantidades.

Los resultados de los análisis de cluster y de la organización funcional obtenidos en la zona no saturada se muestran en las figuras IV.35-38.

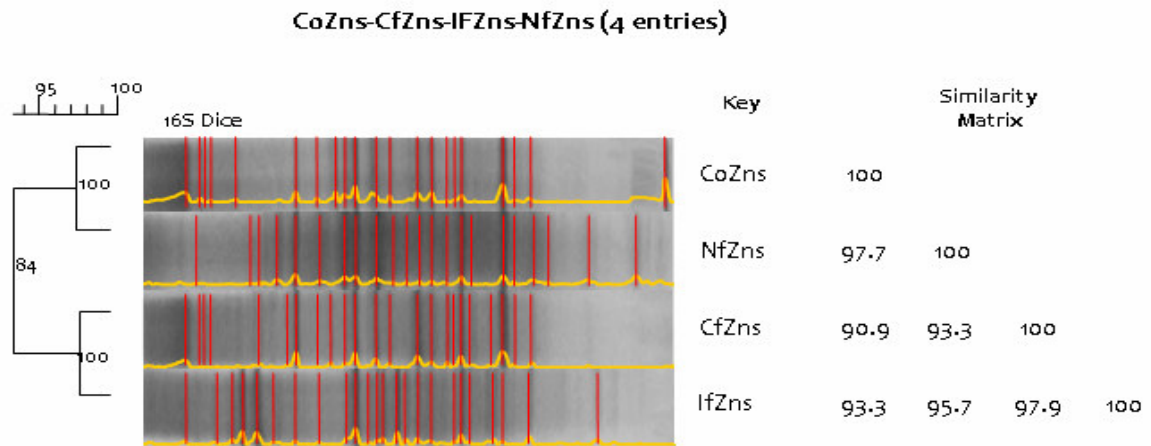


Figura IV.35. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona no saturada. [CoZns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZns] tiempo final Ivey®; [NfZns] tiempo final NPK+Ivey®. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.

El dendrograma de la figura IV.35 nos muestran elevados porcentajes de similitud entre los perfiles de bandas correspondientes a los diferentes tratamientos analizados, los porcentajes oscilaban entre el 90.9 y un 97.9% con respecto a la ATENUACIÓN NATURAL. La similitud en el perfil de bandas se ve reflejada en el análisis de funcionalidad de la población microbiana. Como se puede observar en la figura IV.36 los tratamientos de ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY conservan la funcionalidad de la estructura microbiana, obteniendo valores de Fo entre un 40 y 55% porcentajes que indican una flexibilidad de las especies presentes durante el tratamiento.

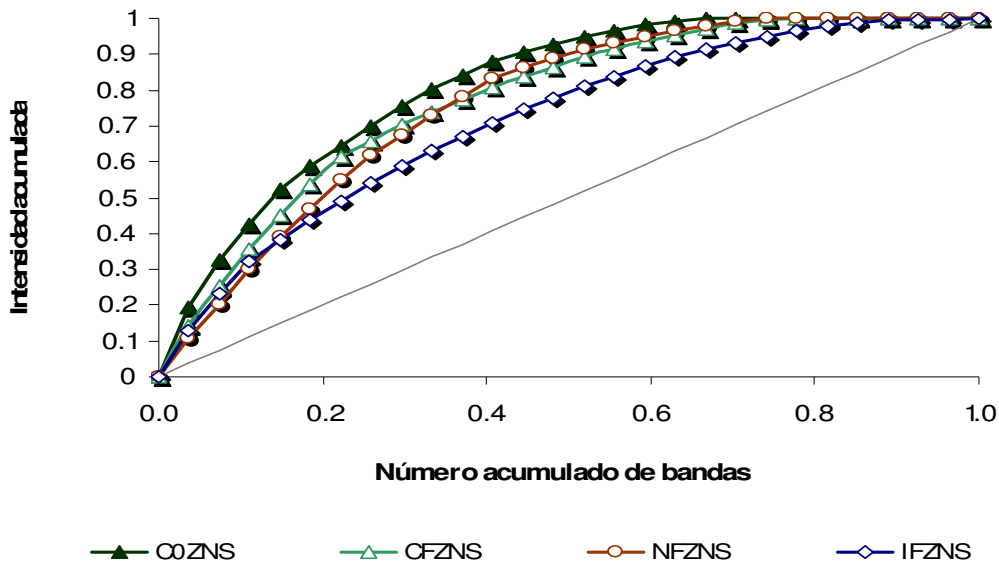


Figura IV.36. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona no saturada. [COZns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZns] tiempo final Ivey; [NfZns] tiempo final NPK+Ivey.

Con respecto al tratamiento FENTON+NPK en la zona no saturada se obtuvo el dendrograma que se muestra en la figura IV.37, donde se pudo determinar que el pre-tratamiento FENTON tiene un 90,9% de similitud con el suelo contaminado al inicio del tratamiento. Al igual que los demás tratamientos analizados anteriormente, el Fenton+NPK conserva la organización funcional de la estructura microbiana trascurrido los 28 días de tratamiento (figura IV.38). Las condiciones en la zona no satura permite que la comunidad microbiana presente una estructura bien definida en términos de dominancia de las especies.

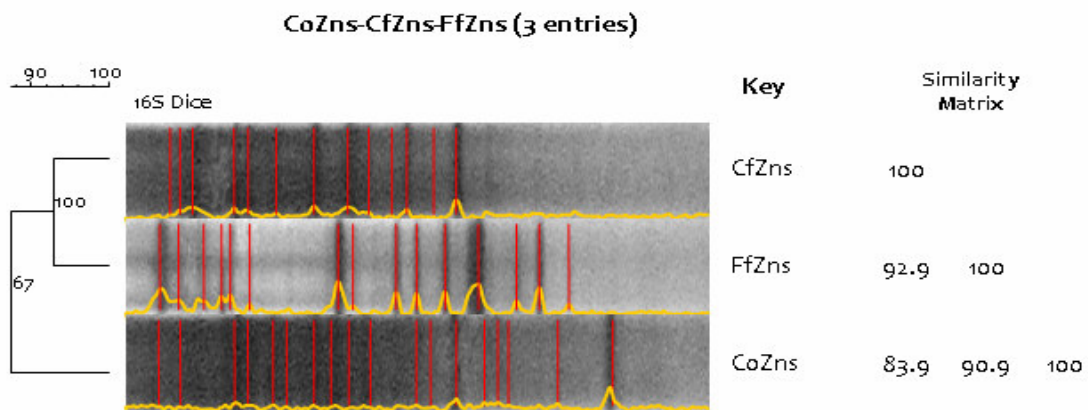


Figura IV.37. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona no saturada. [COZns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZns] tiempo final FENTON+NPK. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.

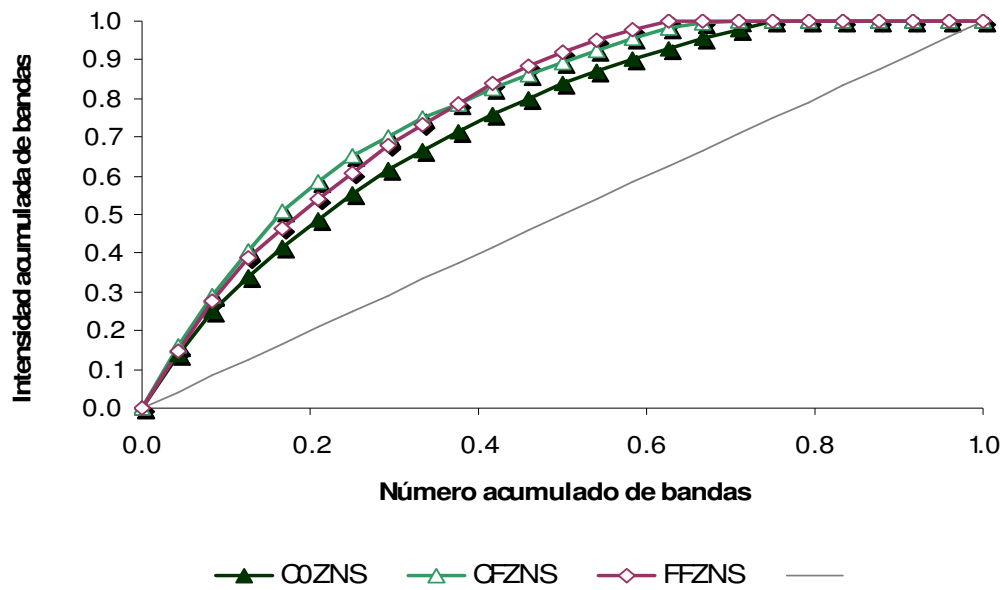


Figura IV.38. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona no saturada. [COZns] tiempo inicial; [CFZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FFZns] tiempo final FENTON+NPK.

Para finalizar, los resultados obtenidos en la zona saturada se muestran en las figuras IV.39-42. El tratamiento del fertilizante NPK más surfactante IVEY tiene un perfil de bandas similar al suelo contaminado sin tratar y a la ATENUACIÓN NATURAL con un 95,7% y un 93,3 % de similitud respectivamente. Al igual que en la zona superficial, el tratamiento que más influye en el perfil de bandas de la biodiversidad es la adición del surfactante IVEY con porcentajes de similitud de un 87,5 % con el suelo contaminado sin tratar, un 89,4% con la ATENUACIÓN NATURAL y de un 92% con la adición del fertilizante NPK más el surfactante IVEY®. (Figura IV.39)

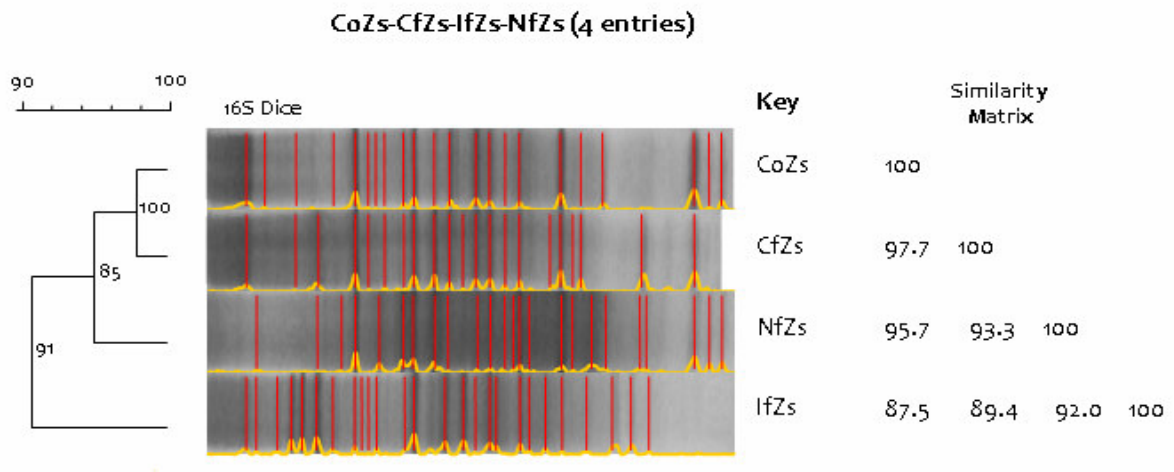


Figura IV.39. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona saturada. [CoZs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZs] tiempo final Ivey®; [NfZs] tiempo final NPK+Ivey®. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice

Con respecto a la organización funcional, se puede observar que la estructura microbiana es similar en los tratamientos estudiados con valor de Fo entre un 40 y 50%. Estos resultados son análogos a los encontrados en las zona superficial y no saturada, con lo que podemos decir que los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY no modifican la uniformidad de la comunidad bacteriana trascurridos los 28 días de tratamiento (figura IV.40).

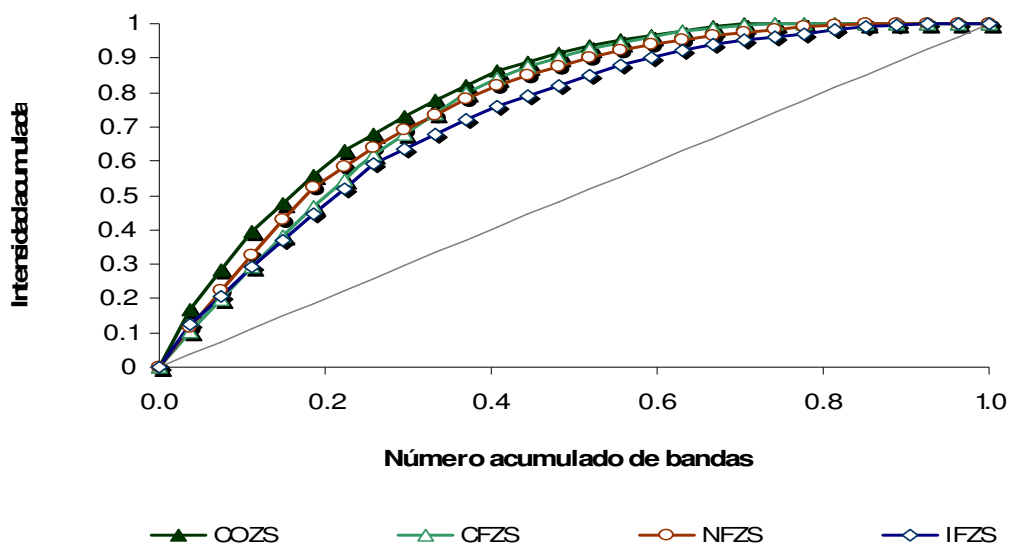


Figura IV.40. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona saturada. [CoZs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZs] tiempo final Ivey; [NfZs] tiempo final NPK+Ivey.

La figura IV.41 muestra la comparación del pre-tratamiento FENTON con el suelo contaminado sin tratar y la ATENUACIÓN NATURAL. Como ya se había mencionado anteriormente, el pre-tratamiento FENTON es el que más influencia tiene en la biodiversidad del suelo en la zona saturada con un porcentaje de similitud del 86,7% con el suelo inicial y un 94% con la ATENUACIÓN NATURAL. Estos resultados se corroboran con los resultados obtenidos en el análisis de funcionalidad que se muestran en la figura IV.42, donde las curvas de uniformidad del tiempo inicial y el tratamiento fenton+NPK se desvían de la diagonal de 45° indicando una baja uniformidad de la comunidad microbiana.

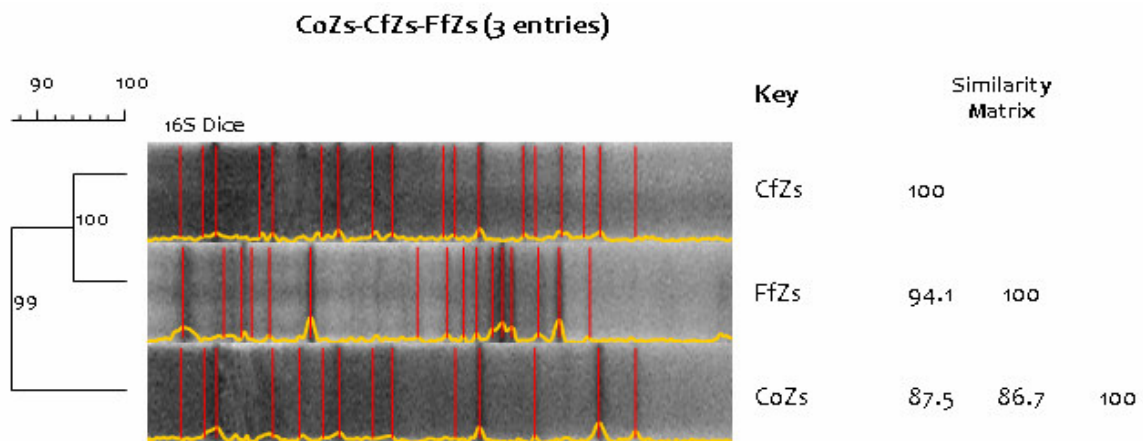


Figura IV.41. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona saturada. [CoZs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZs] tiempo final FENTON +NPK. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice

La aplicación del fertilizante NPK más el surfactante IVEY introduce pocos cambios en la biodiversidad microbiana, obteniendo porcentajes de similitud en la zona saturada de un 97,9%, en la zona no saturada de un 97,8% y en la zona superficial de un 93,1% entre el tiempo inicial y final. Estos resultados son similares a los obtenidos por *Piao et al.* [2008] que compararon la diversidad y estructura de la comunidad de actinobacterias en suelos tratados o no con estiércol y fertilizantes NPK durante 25 años. En los resultados no observaron diferencias entre las comunidades de bacterias analizadas por DGGE del ADNr 16S con cebadores generales entre los suelos tratados, no tratados y con diferentes cantidades de fertilizantes.

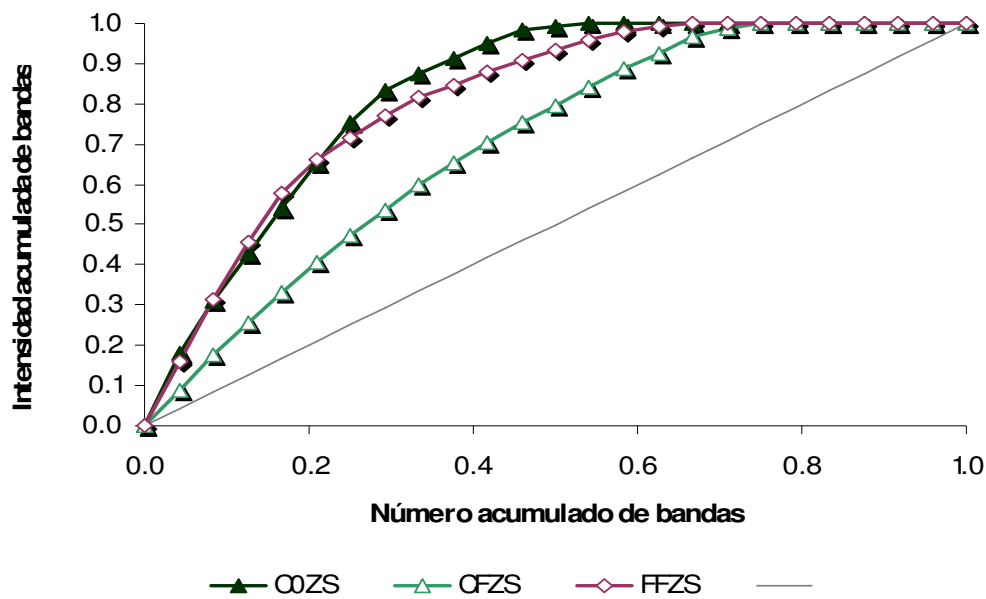


Figura IV.42. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona saturada. [C0Zs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZs] tiempo final FENTON +NPK.

En estudios anteriores *Calvo et al. [2010]* mostraron que los tratamientos con fertilizante NPK, combinados o no con surfactante IVEY®, estimulaban la microbiota heterótrofa y degradadora en suelos. En este caso se podría concluir que el perfil de diversidad microbiana de este tratamiento no varía a nivel de género, pero se podría esperar que al realizar un estudio más específico de grupos bacterianos se encontrarían diferencias más significativas.

Sin embargo, el surfactante como único agente bioestimulante es el tratamiento que más variaciones produce al final del tratamiento en todas las zonas de la planta piloto, dando lugar a la aparición de bandas de bajo G+C y a la desaparición de algunas bandas de alto G+C. Esto puede indicar el efecto que tienen los surfactantes en la biodisponibilidad de los nutrientes para favorecer el crecimiento y la actividad de los microorganismos presentes, pero no necesariamente indica que sea el tratamiento con un mayor porcentaje de degradación. Como ya se ha mencionado anteriormente en el estudio realizado por *Röling et al. [2004]* no se encontró relación entre los perfiles filogenéticos y los porcentajes de degradación de los tratamientos estudiados, ellos proponen realizar estudios más específicos para determinar posibles cambios estructurales.

Como uno de los resultado más concluyente de los ensayos en planta piloto se puede indicar que el tratamiento con reactivo FENTON a baja concentración produjo grandes cambios en la biodiversidad del suelo, quedando reflejado este hecho en la obtención de un patrón de bandas muy diferente a los obtenidos con el resto de biotratamientos y a los Fo más altos encontrados. Esta disminución en el número de bandas se puede explicar debido al fuerte tratamiento químico al que son expuestos los microorganismos del suelo. Inicialmente se adiciona ácido sulfúrico para bajar el pH y después se adiciona peróxido de hidrógeno para llevar a cabo el rompimiento de las moléculas de hidrocarburo por medio de una oxidación química. *Valderrama et al. [2009]* investigaron la factibilidad del uso de la oxidación Fenton para eliminar los hidrocarburos aromáticos policíclicos adsorbidos por un suelo contaminado con aceite de creosota y concluyeron que la máxima eficacia obtenida fue la integración de un tratamiento químico (reactivo FENTON) y biológico, teniendo en cuenta las proporciones adecuadas en los reactivos que se adicionan en los suelos para evitar problemas ambientales.

A su vez, los resultados obtenidos en la degradación de hidrocarburo, mostraron que el reactivo FENTON degradaba las moléculas más complejas de hidrocarburos facilitando la actuación de la microbiota degradadora. Con lo expuesto anteriormente se puede decir que la población microbiana encontrada tras el pre-tratamiento FENTON resiste condiciones extremas de oxido-reducción constituyendo una estructura microbiana específica para estas condiciones ambientales, y sugiere que el tratamiento con reactivo FENTON puede ser una alternativa eficaz para incluir en los procesos de biorremediación.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, así como la bibliografía consultada, ponemos de manifiesto las siguientes conclusiones.

1. La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aplicando fertilizante NPK asociado a diferentes agentes bioestimulantes como tratamientos combinados en la degradación de hidrocarburos incrementan su eficacia mostrando cambios significativos en los factores físicos –químicos y biológicos estudiados.
2. La información obtenida en la primera fase de los ensayos de biotratabilidad, permitió decidir, en un corto intervalo de tiempo, los tratamientos factibles y apropiados para la biorremediación de suelos. Indicando que el fertilizante NPK, NPK+ Ivey, NPK+Biorem y Fenton+NPK en la menor concentración ensayada estimulaba la microbiota bacteriana, de igual forma se obtuvieron porcentajes de degradación de hidrocarburos elevados.
3. En los ensayos de microcosmos edáficos (segunda fase) se constató que la adición de fuentes de N y P inorgánicos ha tenido un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y la tasa de degradación con respecto a la atenuación natural, sin embargo la adición del surfactante IVEY® y del PRE-TRATAMIENTO FENTON ha aumentado la eficiencia en el proceso de degradación de los hidrocarburos en suelos con un alto nivel de degradación.
4. Las condiciones experimentales a escala piloto permitieron establecer diferentes condiciones ambientales apropiadas para aumentar la eficiencia de los tratamientos combinados de biorremediación.
 - a) En condiciones de humedades inferiores a 15% de humedad y un suelo expuesto a las diferentes condiciones ambientales el mejor tratamiento es el fertilizante NPK.
 - b) El tratamiento combinado NPK+Ivey facilitó la degradación de los hidrocarburos más complejos con humedades superiores a las un 30%.

- c) El pre-tratamiento con reactivo Fenton a baja concentración estimula la biodegradación de todas las fracciones de hidrocarburos, siendo su efecto más notable en las condiciones de humedad superiores al 20%. La aplicación de este tratamiento combinado es innovadora, ya que según nuestros datos no hay descrito el uso de oxidación química seguido de la adición de nutrientes para el tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos.
5. Los estudios de biodiversidad realizados con los tratamientos aplicados en la planta piloto demuestran que la comunidad de bacterias presentan una alta diversidad, dominada por bacterias pertenecientes a las clases β -proteobacterias y α -proteobacterias
6. Los estudios basados en la técnica de TGGE demuestran que los tratamientos de Atenuación natural, NPK, NPK+Ivey, Ivey y fenton+NPK se ven afectadas por los cambios en las condiciones ambientales generadas por las tres zonas de estudio. Sin embargo el tratamiento Fenton+NPK muestra las variaciones mas significativas obteniendo una población microbiana mas especializada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams-Schroeder, R.H., Domínguez-Rodríguez, V.I., García-Hernández, L. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra* 17: 165.
- Admon, S., Green, M., Avnimelech, Y. 2001. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. *Journal Bioremediation*.5: 193-209.
- Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego. CA.
- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and Biodeterioration*. Academia Press, London (USA).
- Álvarez, L., Faidella, L., Gómez, A., Ramírez, S., Utrera, P., Vergara, E., Rieradevall, J. 2001. Situación actual de las plantas de compostaje que tratan la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales en Cataluña. *Residuos* 52: 84-86.
- API. 1996. *A Guide to the Assessment and Remediation of Underground Petroleum Releases*. API Publication, Washington D.C. USA.
- Atlas, R., Cerniglia, C.1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Bioescience* 45:332-338.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*. 12: 287-338.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R. 1998. Bioremediation of-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological Methods* 32: 155-164.
- Baldwin, B.R., Mesarch M.B., Nies L. 2000. Broad substrate specificity of naphthalene- and biphenyl-utilizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:748-753
- Barkay, T., M. Hines, M.,Bonzongo, J.C., Scott, K.,Kringelum, P.,Lyons, W.B., Warwick, J.J.,Faganeli, J. Molecular Analysis of a Mercury Contaminated Aquatic Ecosystem. 1999. 99th Annual Meeting American Society for Microbiology. Chicago.
- Basel, A. 2002. Natural Attenuation: How Is Mother Nature Aiding Us to Cleanse Our Environmental Sins?, *Practice Periodical Of Hazardous, Toxic, And Radioactive Waste Management*. 6 (3) 139-140.
- Bogan, B.W., Trbovic, V. 2003. Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin, and soil porosity. *Journal Hazardous Material*. B100 285-300.
- Bossert I., Bartha R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems, p. 434-476. In R.M. Atlas (ed.) *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York.
- Calvo C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A. Uad, I., González-López, J.. 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Science of the Total Environmental*,
- Calvo C., Toledo F. L., González-López J. 2004. Surfactante activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology* 109: 255-262.
- Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., García Fandiño, C., Laguna, J., González-López, J. 2008. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrumk anthropi* in different hydrocarbons bioremediation assays. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 1493-1501.
- Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., Perucha, C., Laguna, J., Toledo, F.L., González-López, J. 2008. When can surfactants enhance hydrocarbon biodegradation in oil biotreatment? In: Popov, V., Brebbia, C.A. *Environmental Toxicology II*.
- Calvo C., Silva-Castro G.A., Uad I., Manzanera M., Perucha C., Laguna J., González-López J. 2010. Biostimulation combined treatments for remediation of diesel contaminated soil. *Environmental Toxicology III*: 169-178
- Calabrese, E., Kostecki, P. 1993. *Principles and practices for petroleum contaminated soils*. Lewis publishers. U.S.
- Casal, I., García, J.L., Guisan, J.M., Martínez-Zapater, J.M., Rojo, F. 2004. Biotecnología en pocas palabras. *Biotecnología y medioambiente* 23.

- Cervantes, F., Dijkma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G., Field, J. 2001. Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinines and humus as terminal electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10):4471-4478.
- Chaîneau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J., 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality* 26, 1478-1483.
- Cheung, P. Y., B. K. Kinkle, B.K. 2001. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2222-2229.
- De Domenico, M., Lo Giudice, A., Michaud, L., Saitta, M., Bruni, V. 2004. Diesel oil and PCB-degrading psychrotrophic bacterial isolated from Antarctic seawaters. *Polar research*, 23:141-146.
- Delille, D., Coulon, F., Pelletier, E. 2004. Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. *Cold Regions Science and Technology* 40: 61-70.
- Derudi, M., Venturini, G., Lombardi, G., Nano, G., Rota, R. 2007. Biodegradation combined with ozone for the remediation of contaminated soils, *European Journal of Soil Biology*. 43: 297-303.
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 47-64.
- Déziel E, Paquette G, Villemur R, Lépine F, Bisailon JG. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology* 62:1908-1912
- Dragun, J. 1998. *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*. 2nd Edition. Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA.
- EPA 1992. Filter anisters: A new method for recovering free product. EPA-510-8-92-002
- EPA. 1996. Nonhalogenated organics using GC/FID; Revision 2. EPA-8015B;
- EPA. US Peroxide. Reference Library Peroxide Applications. 1999. "SOIL TREATMENT in-situ chemical oxidation of contaminated soil using hydrogen peroxide". URL: <http://www.h2o2.com/applications/hazardouswaste/soil.html>
- EPA. 2003. Report of Bioavailability of Chemical Waste with Respect to the Potential for Soil Bioremediation. Washington D.C. United States
- Ferrarese, E., Andreottola, G., Oprea, L.A. 2008. Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation, *Journal Hazardous. Material*. 152: 128-139.
- Finizio A., Guardo, A.D. 2001. Estimating temperature dependence of solubility and octanol-water partition coefficient for organic compounds using RP-HPLC. *Chemosphere*. 45:1063-70.
- Flotron, V., Delteil, C., Padellec, Y., Camel, V. 2005. Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process, *Chemosphere*. 59:1427-1437.
- Foght J. M.; Westlake D. W. S. 1990. Expression of dibenzothiophene- degradative genes in two *Pseudomonas* species. *Canadian journal of microbiology*. 36: 718-724.
- Franz-Georg, S., Tamás, M. 2000. Removal of organic and inorganic pollutants from groundwater using permeable reactive barriers. Part 1. Treatment processes for pollutants. *Land Contamination & Reclamation*. 8: 103-116.
- FRTR Federal Remediation Technologies Roundtable. 2005. "Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide", Versión 4.0.
- Gan, S., Lau, E.V., Ng, H.K. 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. 172: 532-549.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 160: 1-15.
- Higuera, P. 1991. Restauración y remediación de suelos III: Suelos y aguas subterráneas. Disponible en: <http://www.uclm.es/users/higuera/mam/MAM10.htm#Biorreme10>
- Hurt, R. A., X. Qiu, Y. Roh, A. V. Palumbo, J. M. Teidje, and J. Zhou. 2001. Simultaneous Recovery of RNA and DNA from Soils and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4495-4503.
- Kanaly R. A.; Harayama S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology* 182: 2059-2067.

- King R.B., Long G.M. and Sheldon J.K. 1998. Practical Environmental Bioremediation. The Field Guide. Lewis Publishers Boca Ratón. USA.
- Kamukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., Tanaka, H., Harayama, S. 1996. Construction of bacterial consortes that degrade arabian light crude oil. *Journal of fermentation and bioengineering*. 82(6):570-574.
- Kulik, N., A. Goi, A., M. Trapido, M., T. Tuhkanen, T., Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management*. 78 (2006) 382–391.
- Leahy J. G., Colwell R. R. 1990. Microbial degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiology Reviews* 54: 305-315.
- Lee, P.H., Ong, S.K., Golchin, J., Nelson, G.L. Use of solvents to enhance PAH biodegradation of coal tar-contaminated soils, *Water Research*. 35 (16) (2001) 3941–3949.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E., Springael, D. 2004. Occurrence and Phylogenetic Diversity of Sphingomonas Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1944-1955.
- Lewis, T.E., Crockett, A.B., Siegrist R.L. 1994. Soil samples and analysis for volatile organic compounds. *Environmental Monitoring and Assessment* 30: 213-246.
- Li, J.L., chen, B.H. 2009. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Materials*, 2:76-94.
- Liu, Z., Jacobson, A.M., Luthy, R.G. 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous non ionic surfactants systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:145-151.
- Lundstedt, S., Persson, Y., Oberg, L. 2006. Transformation of PAHs during ethanol- Fenton treatment of an aged gasworks' soil, *Chemosphere*. 65: 1288–1294.
- Mater, L., Rosa, E.V.C., Berto, A.X.R., Corrêa, Schiwingel, P.R., Radetski, C.M. 2007. A simple methodology to evaluate influence of H₂O₂ and Fe²⁺ concentrations on the mineralization and biodegradability of organic compounds in water and soil contaminated with petroleum. *Journal of Hazardous Materials* 149, 379-386.
- Margesin, R., Schinner, S. 1997. Effect of temperature on oil degradation by a psychotrophic yeast in liquid culture and soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 24: 243-249.
- Margesin, R., Walder, G., Schinner, F. 2000. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and plicyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activity and microbial properties of soil, *Acta Biotechnologica*. 20; 313-333
- Maroto, M., Rigel, J. M. 2001 Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa. Div. Protección Ambiental de Suelos*.
- Martinez, Alonso M., Gaju N. 2005. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. Disponible en: http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=122&Id_Categoria=2&tipo=portada
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. 2009. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*. 10(6): 1575-1581
- Menn, F-M., J. P. Easter y G. S. Sayler. 2000. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. 425-439
- Mercer, J.V., Cohen R.M.1990. A review of immiscible fluids in the subsurface: Properties, models, characterization, and remediation. *Journal Contaminant Hydrology*. 6: 107-163.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60, 371-380.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.

- Namkoong, W., Hwang, E., Park, J., Choi, J. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution* 119:23-31
- Nam, K., Rodriguez, W., Kukor, J.J. 2001. Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere*. 45 (1): 11–20.
- Nannipieri, P., Grego, S., Cercanti, B. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bullag, J.M., Stotzky, G. (Eds.). *Soil Biochemistry*, vol. 6. Marcel Dekker, New York: 293-355.
- Ndjou'ou A., Cassidy D. 2006. Surfactant production accompanying the modified Fenton oxidation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 65: 1610-1615.
- Neyens, E., Baeyens, J. 2003. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*. B98: 33-50.
- Nicolaisen, M.H., N.B. Ramsing. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 50:189-203.
- Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N. 2009. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal chemical technology & Biotechnology*.84:802-807.
- Olson, J., Mills, G., Herbert, B., Morris, P. 1999. Biodegradation rates of separated diesel components. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11):2448-2453.
- Paillat, T; Moreau, E; Grimaud, P. O. y Touchard, G. 2000. Electrokinetic phenomena in porous media applied to soil decontamination. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 7: 693-704.
- Païssé, S., Goñi-Urriza., Coulon, F., Duran, R. 2010. How a bacterial community originating from a contaminated coastal sediment responds to an oil input. *Environmental Microbiology*. 60: 394-405.
- Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P. 2005. Assessment of contaminant liability during phytoremediation of polycyclic aromatic impacted soil. *Environmental Pollution* 137:187-197.
- Parés, R., Juárez Gimenez, A. 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté. España.
- Peters, K.K., Walters, C.C., Moldowan, J.M. 2005. *The Biomarker Guide, 2nd Edition. II. Biomarkers and Isotopes in Petroleum Exploration and Earth History*", Cambridge University Press, Cambridge.
- Piao, Z., Yang, L., Zhao, L., S. Yin. 2008. Actinobacterial community structure in soils receiving long-term organic and inorganic amendments. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:526-530.
- Pope, D.F. Matthews, J.E. 1993. *Bioremediation Using the Land Treatment Concept*. EPA Report EPA-600-R-93-164.
- Rahman K.S.M., Banat J.M., Thahira J., Thayumanavan T., Lakshmanaperumalsamy P. 2002. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology* 81: 25-32.
- Renoldi, F., Lietti, L., Saponaro, S., Bonomo, L., Forzatti, P. Thermal desorption of a PAH Contaminated soil: a case study, in: C.A. Brebbia (Ed.), *Ecosystems and Sustainable Development IV Volume 2*, WIT Press, UK, 2003, pp. 1123–1132.
- Riser-Roberts E. 1998. *Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, Physical, and Chemical Processes*. Lewis Publishers, N. W., Boca Raton, Florida.
- Rodríguez, S., Bishop, P.L. 2008. Enhancing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effects of nonionic surfactant addition on biofilm function and structure. *Journal of Environmental Engineering*. 134:505-512
- Ron E. Z., Rosenberg E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 249-252.
- Röling, W., Milner, M.G., Jones, M.J., Fratepietro, F., Swannell R., Daniel F., Head, M.I. 2004. Bacterial Community Dynamics and Hydrocarbon Degradation during a Field-Scale Evaluation of Bioremediation on a Mudflat Beach Contaminated with Buried Oil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 2603-2613.
- Santas, R., Santas, Ph., 2000. Effects of wave action on the bioremediation of crude oil saturated hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin* 40, 434–439.
- Schirmer M., Butler B.J. 2004. Transport behaviour and natural attenuation of organic contaminants at spill sites. *Toxicology* 205:173–179

- Silva, A., Delerue-Matos, C., Fiuza, A. 2005. Use of solvent extraction to remediate soils contaminated with hydrocarbons. *Journal Hazardous Material*. B124:224–229.
- Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*. 25:99-121
- Smith, C. L., Condemine, G. 1990. New approaches for physical mapping of small genomes. *Journal of Bacteriology*. 172:1167-1 172.
- Sokal, R.R., F.J. Rohlf. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.
- Spain J. C., Pritchard P. H., Bourquin A. W. 1980. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 40: 726-734.
- Spain, J. C., Van Veld P. A. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 428-435.
- Stelmack, P., Gray, M., Pickard, M. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1):163-168.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S. 1997. Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. *Environmental & Science Technology*. 31:45-51.
- Swannell, R.P.J., Lee, K. y McDonagh, M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiology Review*. 60: 342-365.
- Tan, C.K. Gómez, G. Ríos, Y. Guentzel, M.N. Hudson, J. 1990. Degradation of diesel fuel with in situ microorganisms. *Superfound 90. Proceedings of the 11 National Conferences*. 776-779.
- Toledo FL, González Lopez J, Calvo C. 2007. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresource Technology* 99(17):8470–8475.
- US Geological Survey (USGS). 2005. Coefficient O/W. Toxic Substances Hydrology Program. US Department of the Interior, Valderrama, C. Alessandri, R. Aunola, T., Cortina, J.L., Gamsans, X., Tuhkanen, T. 2009. Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 166: 594-602.
- Van Beelen, P.V., Doelman, P., 1997. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere*. 34: 455-499.
- Van Hamme, J. D., J. A. Odumeru y O. P. Ward. 2000. Community dynamics of mixed bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. *Canadian Journal of Microbiology*. 46:441-450
- Van Hamme, J. D., A. Singh y O. P. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 67:503-549.
- Vandecasteele J.P. 2005. *Microbiologie Petrolière. Concepts, Implications environnementales et Applications Industrielles*. IFP Publications. Paris.
- Van Deuren, J., Wang, Z. y Ledbetter, J. 1997. Remediation technologies screening matrix and reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Van Verseveld, H.W., Röhling, W.F.M. 2004. Cluster analysis and statistical comparison of molecular community profile data, p. 1-24. En Kowalchuk, G.A., De Bruijn, F.J., Head, J., H., Akkermans, A.D.L., y van Elsas, J.D. (eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual* 2nd Ed., vol. 1.7.4.
- Vasudevan, N., Rajaram, P. 2001. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. *Environmental international*. 26: 409-411.
- Vidali M. 2001. Biorremediación. An overview. *Pure and Applied Chemistry*. 73: 1163-1172
- Viñas, M., Sabaté, J., Grifoll, M., Solanas, A. M., Vázquez, V., Gandarillas, C., Vázquez, A. 2001. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. *Residuos* 59: 78-82.
- Viñas, M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: Caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis Doctoral: Universitat de Barcelona
- Wang, Z., Fingas, M.F. 2003. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*. 47: 423-452.

- Watts, R.J. 2000. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions, *Journal of Hazardous Materials*. B76 : 73-89
- Widdel, F., Rabus, R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 259-276.
- Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N. 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 286–293.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173,697–703.
- Wolicka D. 2008. Biodegradation- The natural method for liquidation environmental polluted by petroleum products. *Oil and Gas Institute, Prace*, 150: 675-680.
- Xu, R., Ching ,Y.L., Giak Lim, Y., Philip Obbard, J. 2005. Use of slow-release fertilizer and biopolymers for stimulating hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 101-110.
- Yuste L.; Corbellá M. E.; Turiégano M. J.; Karlson U.; Puyet A.; Rojo F. 2000. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS microbiology ecology* 32: 69-75
- Zhang, L., Li, P., Gong, Z., Li, X., 2008. Photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on soil surfaces using TiO₂ under UV light, *Journal Hazardous Material*. 158: 478–484.

LISTA DE TABLAS

Tabla I.1.	Reacciones de degradación aerobia y anaerobia.....	11
Tabla I.2.	Condiciones optimas de los parámetros físico químicas que afectan en un proceso de degradación.....	15
Tabla I.3.	Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.....	15
Tabla I.4.	Clasificación de las tecnologías de remediación.	27
Tabla III.1.	Propiedades químicas y físicas de los suelos	46
Tabla III.2.	Diseño de experimentos en matraces erlenmeyer.....	51
Tabla III.3.	Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada.	58
Tabla III.4.	Secuencia de los cebadores empleados en la reacción de PCR anidada.	59
Tabla III.5.	Primer programa de gradiente de temperatura	60
Tabla III.6.	Segundo programa de gradiente de temperatura	61
Tabla IV.1.	Índice de la actividad deshidrogenasa en los suelo I y Suelo II.....	78
Tabla IV.2.	Producción de CO ₂ a las 24h de incubación en el suelo I y suelo II.	80
Tabla IV.3.	Porcentaje de humedad en el suelo I y suelo II.	81
Tabla IV.4.	Porcentajes e índices de correlación de la degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos en el suelo I después de los tratamientos.	83
Tabla IV.5.	Porcentajes y índices de correlación de la degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos en el suelo II después de los tratamientos.....	84
Tabla IV.6.	Índice de la actividad deshidrogenasa en el suelo II. Ensayos de microcosmos edáficos.	89
Tabla IV.7.	Producción de de CO ₂ al inicio y final de los tratamientos en el suelo II.	90
Tabla IV.8.	Porcentaje de humedad en el suelo II.	91
Tabla IV.9.	Porcentaje de degradación de hidrocarburos totales (TPH) al final del tratamiento.	92
Tabla IV.10.	Relación entre heptadecano n-C ₁₇ y Pristano; (nC ₁₇ /Pr).	93

Tabla IV.11.	Índice de la actividad deshidrogenasa en las diferentes zonas de estudio de la planta piloto durante los tratamientos aplicados.	102
Tabla IV.12.	Producción de de CO ₂ al inicio y final de los tratamientos en el suelo II.	103
Tabla IV.13.	Índice de biodegradación C18/fi en la zona superficial (Zsup.).....	106
Tabla IV.14.	Índice de biodegradación C18/fi en la zona no saturada (Zns).....	108
Tabla IV.15.	Índice de biodegradación C18/fi en la zona saturada (Zs).....	109
Tabla IV.16.	Comparación de la secuencia de las bandas de TGGE (región v3 del ADNr 16s, aprox. 200bp) de los poblaciones integrantes de la planta piloto de los tratamientos ATENUACIÓN NATURAL, IVEY, IVEY+NPK Y FENTON +NPK, con las secuencias depositadas en la base de datos EMBL.	124

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1.	Esquema de la clasificación de los hidrocarburos.....	16
Figura I.2.	Mecanismo de reacción en la degradación de hidrocarburos alifáticos.....	24
Figura I.3.	Ruta de degradación (vía catecol) de compuestos aromáticos.....	25
Figura I.4.	Ruta de degradación anaeróbica de hidrocarburos saturados y aromáticos.	26
Figura III.1.	Esquema del proceso de escalado de un proceso de biorremediación.....	45
Figura III.2.	Diagrama de los ensayos de biotratabilidad en matraces Erlenmeyer. Primera fase del proceso de escalado	48
Figura III.3.	Diagrama de los ensayos de biotratabilidad en microcosmos edáficos. II Fase del proyecto.....	51
Figura III.4.	Fotografía de los microcosmos utilizados en la fase II.....	52
Figura III.5.	Tercera fase del proceso de escalado. Ensayos en planta piloto	53
Figura III.6.	Esquema de la planta piloto. 1A: Suelo contaminado. 1B: capa de drenaje. 1C: Válvula de drenaje. 1D: Niveles eléctricos. 1E: piezómetro. 2A: bomba eléctrica de suministro. 2B: tubería de riego.....	54
Figura III.7.	Fotos de la planta piloto donde se muestran los 4 puntos de muestreo y las 3 zonas de saturación.....	55
Figura IV.1.	Recuento de la microbiota total heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. <i>Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY 1, NPK+IVEY 2, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2 NPK+ETANOL 1 y NPK+ETANOL 2.</i>	70
Figura IV.2.	Recuento de la microbiota degradadora en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. <i>Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY 1, NPK+IVEY 2, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2 NPK+ETANOL 1 y NPK+ETANOL 2.</i>	71
Figura IV.3.	Recuento de la microbiota heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. <i>Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+NPK, FENTON 2+NPK....</i>	72

Figura IV.4.	Recuento de la microbiota degradadora (b) en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo I contaminado con 20.000 mg/kg de diesel sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. Control, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+NPK, FENTON 2+NPK.	72
Figura IV.5.	Recuento de la microbiota total heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo II contaminado en su origen sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY 1 y NPK+IVEY 2, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2, NPK+ETANOL 1 y NPK+ETANOL 2.....	73
Figura IV.6.	Recuento de la microbiota degradadora en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo II contaminado en su origen sometidos a distintos tratamientos de biorremediación, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+BIOREM 1 y NPK+BIOREM 2.	74
Figura IV.7.	Recuento de la microbiota total heterótrofa en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo II contaminado en su origen sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+ NPK, FENTON 2+ NPK.	75
Figura IV.8.	Recuento de la microbiota degradadora en los ensayos en matraces erlenmeyer con suelo II contaminado en su origen sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, FENTON 1+ NPK, FENTON 2+ NPK.	75
Figura IV.9.	Porcentaje de degradación de Hidrocarburos totales TPH obtenidos a los 14 días de tratamiento en el suelo I.....	82
Figura IV.10.	Porcentaje de degradación de Hidrocarburos totales TPH obtenidos a los 14 días de tratamiento en el suelo I.....	84
Figura IV.11.	Grafica en dos dimensiones de la correlación obtenida mediante un análisis de escalonamiento multidimensional.....	86
Figura IV.12.	Evolución de la microbiota total heterótrofa (a) y microbiota degradadora (b) en los ensayos de microcosmos edáficos con suelo II sometidos a distintos tratamientos de biorremediación. ATENUACIÓN NATURAL, NPK, NPK+IVEY; NPK+BIOREM; NPK+ETANOL Y FENTON+NPK.....	88
Figura IV.13.	Concentración en mg/kg de alcanos lineales y ramificados en el suelo II.....	92
Figura IV.14.	Graficas obtenidas del análisis multidimensional no métrico. (A) análisis de los resultados obtenidos en los ensayos en la fase 1. (B) análisis de los resultados obtenidos en los ensayos en la fase 2.	95

Figura IV.15.	Evolución de la microbiota total heterótrofa en las zonas superficial (Zsup), no saturada (Zns), saturada (Zs) de la planta piloto con el suelo III contaminado con diesel sometida a distintos tratamientos de biorremediación, ATENUACIÓN NATURAL, NPK, IVEY, NPK+IVEY Y FENTON+NPK.....	98
Figura IV.16.	Evolución de la microbiota degradadora en las zonas superficial (Zsup), no saturada (Zns), saturada (Zs) de la planta piloto con el suelo III contaminado con diesel sometida a distintos tratamientos de biorremediación, Atenuación natural, NPK, Ivey, NPK+Ivey y Fenton+NPK.....	99
Figura IV.17.	a; Evolución de la microbiota heterótrofa y b; degradadora en las zonas superficial (Zsup), no saturada (Zns), saturada (Zs) de la planta piloto con el suelo III contaminado con diesel sometida al tratamientos Fenton+NPK.....	100
Figura IV.18.	Porcentaje de hidrocarburos eliminados en el suelo III al final de los tratamientos en la zona superficial (Z.sup)	106
Figura IV.19.	Porcentaje de hidrocarburo eliminados en el suelo III al final de los tratamientos en la zona no saturada (Zns).....	107
Figura IV.20.	Porcentaje de hidrocarburo eliminados en el suelo III al final de los tratamientos en la zona saturada (Zs).....	108
Figura IV.21.	Grafica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos y las zonas de estudio en la planta piloto.....	111
Figura IV.22.	Grafica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos en la zona superficial.	112
Figura IV.23.	Grafica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos en la zona no saturada.....	113
Figura IV.24.	Grafica Triplot del análisis de redundancia (RDA) para los tratamientos en la zona saturada.....	114
Figura IV.25.	Diagrama de resultados de las tres etapas del estudio.....	116
Figura IV.26.	TGGE del análisis de biodiversidad en suelos con los biotratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY.....	118
Figura IV.27.	TGGE del análisis de biodiversidad en suelos con los biotratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY.....	119
Figura IV.28.	Dendrograma de las muestras de los tratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, IVEY y NPK+IVEY. N= tratamiento NPK + IVEY ; I= tratamiento IVEY; C= ensayo de ATENUACIÓN	

	NATURAL; ZSUP= zona superficial; ZNS= zona no saturada; ZS= zona saturada; 0= tiempo inicial ; F= tiempo final.....	120
Figura IV.29.	Dendrograma de las muestras de los tratamientos: ATENUACIÓN NATURAL, FENTON+NPK, Control. A= control arena comercial (suelo sin contaminar); K= control arena de cantera igual a la del resto de ensayos (sin contaminar); F= tratamiento Fenton previo al tratamiento NPK; f-C= ensayo de Atenuación natural; ZSUP= zona superficial; ZNS= zona no saturada; ZS= zona saturada; 0= tiempo inicial ; F= tiempo final.....	122
Figura IV.30.	Árbol filogenético de las bandas extraídas de la planta piloto.....	125
Figura IV.31.	Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona superficial. [C0Zsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZsup] tiempo final Ivey®; [NfZsup] tiempo final NPK+Ivey®. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.....	127
Figura IV.32.	Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona superficial. [C0Zsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZsup] tiempo final Ivey; [NfZsup] tiempo final NPK+Ivey.	128
Figura IV.33.	Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona superficial. [C0Zsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZsup] tiempo final FENTON+NPK, aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.	129
Figura IV.34.	Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona superficial [C0Zsup] tiempo inicial; [CfZsup] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZsup] tiempo final FENTON+NPK.	129
Figura IV.35.	Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona no saturada. [C0Zns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZns] tiempo final Ivey®; [NfZns] tiempo final NPK+Ivey®. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.....	130
Figura IV.36.	Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona no saturada. [C0Zns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZns] tiempo final Ivey; [NfZns] tiempo final NPK+Ivey.	131
Figura IV.37.	Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona no saturada. [C0Zns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZns] tiempo final FENTON+NPK. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.....	131

- Figura IV.38. Curvas de normalidad de los tratamientos en la zona no saturada. [C0Zns] tiempo inicial; [CfZns] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZns] tiempo final FENTON+NPK.....132
- Figura IV.39. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona saturada. [C0Zs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZs] tiempo final Ivey®; [NfZs] tiempo final NPK+Ivey®. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.....133
- Figura IV.40. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona saturada. [C0Zs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [IfZs] tiempo final Ivey; [NfZs] tiempo final NPK+Ivey.133
- Figura IV.41. Dendrograma obtenido del análisis de los perfiles de bandas del TGGE al final de los tratamientos en la zona saturada. [C0Zs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZs] tiempo final FENTON +NPK. aplicando el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice134
- Figura IV.42. Curvas de uniformidad de los tratamientos en la zona saturada. [C0Zs] tiempo inicial; [CfZs] tiempo final ATENUACIÓN NATURAL; [FfZs] tiempo final FENTON +NPK.....135



ANEXOS



Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck)

I. Uad, G.A. Silva-Castro, C. Pozo, J. González-López, C. Calvo*

Environmental Microbiology Group, Department of Microbiology, Institute of Water Research, University of Granada, Ramón y Cajal no 4, Edificio Fray Luis de Granada, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2010

Received in revised form

26 May 2010

Accepted 1 June 2010

Available online 8 July 2010

Keywords:

Bioemulsifiers

Hydrocarbon-degrading marine bacteria

Biodegradation

Bacillus

Brevibacterium

Pseudomonas

Halomonas

ABSTRACT

Seawater, sediments and fuel samples extracted from a small area of the Prestige wreck (4000 m deep) were studied to check the microbial activity of the area, the occurrence of indigenous hydrocarbon-degrading bacteria and the presence of bacteria able to produce bioemulsifiers. Twenty-one strains with the capacity to degrade hydrocarbons and/or produce useful bioemulsifiers were selected. Phylogenetic affiliation of these isolates placed them in the genus *Bacillus* (8 strains), *Pseudomonas* (3 strains), *Halomonas* (4 strains), *Pseudoalteromonas* (1 strain), *Brevibacterium* (2 strains), and *Marinobacter* (1 strain) and 2 strains were identified as marine bacterium. Hydrocarbon degradation was established by determining the amount of alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by GC/MS analyses. In this study, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Brevibacterium* strains were the most efficient hydrocarbon-degrading marine bacteria. In contrast, *Halomonas* strains produced the highest amount of efficient biopolymers with emulsifying activity. The yield, chemical composition and functional properties of these bioemulsifiers were affected by the incubation time required for production. In addition, supplementation of the hydrocarbon culture medium with bioemulsifiers (S22-BE, S24-BE and AD2-BE) clearly stimulated the growth of strains S25, S28 and S29 and enhanced the ability of these strains to biodegrade alkanes, alkenes and aromatic compounds.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine environments are frequently contaminated with hydrocarbons as a result of industrial activity (Oren, 2000; Margesin and Schinner, 2001). Contamination of these habitats constitutes a serious environmental problem mainly due to the high toxicity exhibited by some petroleum compounds. Thus, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are prevalent in many fuel mixtures, exhibit toxic, mutagenic and/or carcinogenic properties. They are listed by the US Environmental Protection Agency as priority pollutants (Sudip et al., 2002; Zeinali et al., 2008).

Remediation processes include treating petroleum pollutants with hydrocarbon-degrading microorganisms that are generally ubiquitous in nature and are able to use different types of hydrocarbons as a carbon and energy source (Liu et al., 2009). Some

indigenous bacteria from contaminated ecosystems also produce biosurfactants. Biosurfactants produced by hydrocarbon-degrading bacteria can emulsify hydrocarbon–water mixtures, which enables them to grow on the oil droplets. Emulsification properties have also been demonstrated to enhance hydrocarbon degradation in the environment, making such bacteria potential tools for oil spill pollution-control (Krepsky et al., 2007).

In 2002, the Prestige accident polluted thousands of kilometres of coastline and more than one thousand beaches on the Spanish and French coast. This accident represents one of the largest environmental catastrophes to have occurred in European waters. The breakage of the Prestige tanker and its sinking at a depth of 3850 m led to the spillage of large quantities of fuel oil for several months afterwards. Repsol YPF was appointed by the Spanish Government to recover the fuel oil remaining in the wreck, via the “Prestige wreck fuel recovery project” (Del Corral et al., 2005). The final phase of this project was bioremediation for the remaining Prestige fuel oil, during which Repsol YPF planned to enhance the natural process of bioremediation in order to neutralize the oil remaining after extraction, which was coating the internal walls of

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248 021/243 093; fax: +34 958 243 094.
E-mail address: ccalvo@ugr.es (C. Calvo).

the tank (Hernán et al., 2005). Experiments to evaluate the viability of bioremediation of the remaining Prestige fuel were conducted at the Institute of Water Research of the University of Granada by our research group (Environmental Microbiology). These studies were developed in three phases: the first one included characterization of the native microbiota to establish the presence of active bacteria at the site; in the second stage, bioremediation tests were carried out in controlled conditions to assess the ability of indigenous bacteria to biodegrade the Prestige fuel; and in the third phase different stimulation systems were studied to select the most adequate nutrient conditions to accelerate the biodegradation process. In the current study we have characterized 21 bacterial strains isolated during the first stage of the above-mentioned research, and we describe their hydrocarbon-degrading capabilities as well as the characteristics of bioemulsifiers synthesized by some of these bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites and bacterial strains

Seawater and sediment samples were taken by Repsol YPF from the surroundings of the Prestige wreck at 4000 m of depth along with samples of fuel from a fuel container from the wreck. These samples were sent to our laboratory to be preserved and analysed.

The 21 bacterial strains included in this study were selected from 133 strains isolated from the above-mentioned sediment, seawater and fuel samples, due to their capacity to grow on the surface of Prestige fuel agar plates.

Strains were maintained on MY solid medium slopes (Moraine and Rogovin, 1966) supplemented with 3% (w/v) NaCl at 4 °C and routinely streaked on agar plates from tubes every two months to control purity and viability. Selected bacteria were also preserved by freezing cell suspensions at –80 °C in MY broth to which 80% (v/v) glycerol was added.

2.2. Identification of strains

PCR amplification, sequencing and phylogenetic analysis of 16S rDNA from active bacterial isolates were carried out as previously described by Weisburg et al. (1991). The full length of each amplification product was sequenced using universal primers fD₁, rD₁, fD₂ and rD₂. A fresh cultured colony of each strain grown on MY agar medium supplemented with 3% salt was lysed by the addition of 20 µl of a mixture of NaOH–2N and SDS–5% (w/v) and then boiling for 15 min at 95 °C. The lysates were adjusted to 200 µl with sterile bidistilled water and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min in a tabletop centrifuge. Cleared lysates (4 µl) were used as a template for amplification. The PCR reactions were set up by adding the lysate to 10× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Germany), 20 pmol of each primer and 1 U of Taq polymerase (Genecraft, Germany). The final volume of the reaction tubes was adjusted to 50 µl (Vinueza et al., 1998). Reactions were run in a BIOER XP cyler. The PCR products were purified with a Quick cleaner extraction kit (MBL) according to the manufacturer's instructions. Each sequence was then used as a query in a BLASTn search (Pearson and Lipman, 1988) and further aligned to the most similar orthologous sequences retrieved from the database using the program Clustal X (Thompson et al., 1994). Alignments were checked manually, corrected and then analysed using the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) according to the model of Jukes–Cantor distances. A phylogenetic tree was constructed using the MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software (Kumar et al., 2004).

2.3. Growth on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) solid media

To evaluate the growth of isolated strains on naphthalene, phenanthrene, anthracene and pyrene, aliquots of each bacterial culture were spread on solid minimal medium amended with 1% (w/v) of PAHs. The composition per litre of M9 medium was as follows: 10× M9 solution (100 ml), A9 solution (“Goodies”) (2.5 ml), MgSO₄ 1 M (1 ml) and ferric ammonium citrate 6% (w/v) (1 ml) (April et al., 1991).

The 10× M9 solution was composed of g L⁻¹: 70 Na₂HPO₄ × 7H₂O, 30 KH₂PO₄, 10 NH₄Cl and 5 NaCl. The A9 (“Goodies”) solution was composed of (mg L⁻¹): 300 H₂BO₃, 50 ZnCl₂, 30 MnCl₂ × 4H₂O, 200 CoCl₂, 10 CuCl₂ × 2H₂O, 20 NiCl₂ × 6H₂O, 30 NaMoO₄ × 2H₂O. Inoculated agar plates were incubated at 28 °C for 48 h.

2.4. Production and characterization of bioemulsifiers

EPS biopolymer production with bioemulsifier activity from isolated bacterial strains was tested according to the method previously reported by Calvo et al. (2002). To collect the extracellular polysaccharides (EPS), isolated strains were grown in MY broth medium (Moraine and Rogovin, 1966) with 3% salt, for 7, 15, 21 and 30 days under agitation (100 rpm) at 28 °C. Cultures were centrifuged at 9000 rpm in a Beckman Avanti-J25 refrigerated centrifuge at 4 °C for 45 min. Supernatants were precipitated with cold ethanol. The biopolymer precipitated from the supernatant was dissolved in distilled water, dialyzed against distilled water, lyophilized and weighed. The protein and carbohydrate content of the biopolymer obtained was determined by colorimetric analyses following the methodology proposed by Bradford (1976) and Dubois et al. (1956), respectively.

2.5. Emulsification measurement

The emulsification activity of the biopolymer was detected by a modified version of the procedure described by Cooper and Goldenberg (1987). Test tubes (105 × 15 mm) were amended with 3 ml of exopolymer diluted in distilled water (0.5%, w/v) and 3 ml of a hydrophobic substrate (n-octane, xylene, toluene, light mineral oil, heavy mineral oil, diesel or Prestige fuel oil). Then, the tubes were shaken vigorously to ensure homogeneity and left to stand for 24 h. Emulsification activity was defined as the height of the emulsion layer divided by the total height and expressed as a percentage.

2.6. Growth in Prestige fuel oil liquid media

Growth in oil media was determined in 250 ml Erlenmeyer flasks containing marine synthetic medium (marine broth Difco®) amended with 0.1% (v/v) Prestige fuel oil. These flasks were inoculated with 1 ml of an overnight culture and incubated at 28 °C with gentle agitation (100 rpm) for 28 days. Viable cells were counted using the dilution-plate technique on Marine Agar medium (Difco). The inoculated agar plates (three replicates) were incubated at 28 °C for 48 h. The Prestige fuel oil used was obtained from the Prestige wreck and was provided by Repsol YPF.

In addition, to evaluate the effect of different bioemulsifiers (BE) on bacterial growth, Prestige fuel oil culture media were supplemented with 0.05% of bioemulsifier S22-BE, S24-BE and AD2-BE. Bioemulsifiers S22-BE and S24-BE were isolated during this investigation (Table 3), and AD2-BE was previously isolated in our laboratory (Calvo et al., 2008).

2.7. TPH, n-alkanes and PAH determinations

Total petroleum hydrocarbons were extracted from bacterial cultures with a mixture of hexane:acetone 1:1 (v/v) and determined using a modified version of the gravimetric analysis procedure described by Aguilera-Vazquez et al. (2001). Analysis of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons was carried out using a Hewlett–Packard 6890 GC system equipped with an HP-5-MS-capillary column (30 × 0.32 mm I.D.). Helium (1.6 ml/min) was utilized as the carrier gas. N-alkanes and PAH were detected using a mass detector 5872 (Hewlett–Packard) and the Wiley 275 library.

3. Results and discussion

Microbial biodegradation is known to be an efficient process in the decontamination of oil-polluted environments. Common steps in establishing *in situ* bioremediation processes include the search for hydrocarbon-degrading indigenous microorganisms and the optimization of conditions promoting biodegradation *in situ* by indigenous microbiota.

In order to determine the viability of biodegradation of the remaining fuel adhering to the tank walls and the top of the Prestige wreck and identify the best process for accelerating the natural biodegradation of fuel, samples of fuel from the Prestige tank container, and samples of seawater and sediments extracted by Repsol YPF from the area were sent to our laboratory to be conserved and analysed. The study of these samples demonstrated that the area around the wreck had an active and diverse microbiota (data not shown). More than 300 colonies were picked from the agar surface

layer and cultured on Prestige fuel agar plates with the objective of recovering indigenous microorganisms able to degrade Prestige fuel.

In this step, 133 bacterial strains were selected according to their ability to grow on the surface of Prestige fuel agar plates and their ability to produce mucous colonies. In a second step, these microorganisms were grown in Prestige fuel liquid media and analysed for bioemulsifier production. The results obtained led us to select 21 bacterial strains for further identification and characterization. Three of these were obtained from fuel samples, 11 from seawater samples and 7 from sediment samples.

With regards to the phylogenetic results, the strategy used to sequence the 16S rDNA gene of each strain produced a continuous stretch of nucleotides representing >95% of the primary 16S rDNA sequence. The similarity values were obtained after pair-wise alignment of 16S rDNA sequences of studied strains and EMBL database sequences, and the sequences giving the highest scores were retrieved to construct the phylogenetic tree.

Phylogenetic identification showed affiliation of the selected strains obtained from deep seawater, fuel and sediment samples to three bacterial phylogenetic branches: the γ -subdivisions of Proteobacteria, Firmicutes and the gram-positive branch (high G + C content Actinobacteria) (Fig. 1).

The majority of the isolated strains (8 strains) belonged to the genus *Bacillus*; W1 was identified as *Bacillus thuringiensis*, with 98% sequence identity. The other 7 strains (W15, W16, F17, F20, S22, S25 and S27) were identified as *Bacillus pumilus* and the sequence homology ranged from 96 to 100%. Strains F2 and S28 were affiliated to *Brevibacterium casei* and *Brevibacterium sanguinis*, respectively, with 99% sequence homology. Strain W3 was identified as *Halomonas alkantarctica* and W4 was identified as *Halomonas*



Fig. 1. Phylogenetic relationship based on 16S rDNA sequences of 21 selected marine strains.

Table 1
Identity and 16S rDNA gene sequence affiliation of 21 bacterial strains to their closest phylogenetic neighbours.

Strain number	Next relative by Gen Bank alignment (AN, Organism) ^a	(%) Identity
W1	CP000485 <i>Bacillus thuringiensis</i>	98
F2	EU086802 <i>Brevibacterium casei</i>	99
W3	AJ564880 <i>Halomonas alkantarctica</i>	98
W4	AJ294347 <i>Halomonas variabilis</i>	98
W5	AF359545 Marine bacterium	99
W7	AF359545 Marine bacterium	99
W8	AJ294359 <i>Marinobacter</i> spp.	98
W10	AJ294347 <i>Halomonas variabilis</i>	97
W12	EU864257 <i>Halomonas</i> spp.	97
W15	AY741720 <i>Bacillus pumilus</i>	97
W16	EU869282 <i>Bacillus pumilus</i>	99
F17	EU874254 <i>Bacillus pumilus</i>	98
W18	DQ665792 <i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	99
F20	EU660365 <i>Bacillus pumilus</i>	96
S21	AF268968 <i>Pseudomonas brennerii</i>	98
S22	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	99
S24	AF268029 <i>Pseudomonas grimontii</i>	100
S25	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	100
S27	EU221329 <i>Bacillus pumilus</i>	99
S28	AJ564859 <i>Brevibacterium sanguinis</i>	99
S29	AF268968 <i>Pseudomonas brennerii</i>	99

^a AN:Accession number.

variabilis, the sequence identity of both being 98%. W10 was identified as *H. variabilis* and W12 was identified as *Halomonas* spp. with 97% sequence identity. W8 was identified as *Marinobacter* spp. with 98% sequence identity. S21 and S29 were identified as *Pseudomonas brennerii* with 98% and 99% sequence identity, respectively. W18 was identified as *Pseudoalteromonas elyakovii* with 99% sequence identity. Finally, S24 was affiliated with *Pseudomonas grimontii* with 100% sequence identity. Only W5 and W7 were affiliated to marine bacteria with 99% sequence identity. The different bacterial genera identified in this study are shown in Table 1. The direct isolation method is often used to isolate the dominant members in a microbial community. *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Brevibacterium* are frequently isolated from hydrocarbon-contaminated environments and many strains belonging to

Table 3
Yield of biopolymers synthesized by isolated strains after different periods of production at 3% salt concentration.

Strain	Yield (g l ⁻¹) ^a			
	3% (w/v) salinity			
	7 Days	15 Days	21 Days	30 Days
W1	0.5 ± 0.12	0.8 ± 0.13	1.08 ± 0.23	1.69 ± 0.15
F2	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.63 ± 0.02	1.04 ± 0.01
W3	1.15 ± 0.15	0.82 ± 0.14	1.13 ± 0.24	1.49 ± 0.33
W4	0.65 ± 0.13	0.74 ± 0.15	0.84 ± 0.13	3.08 ± 0.15
W5	0.3 ± 0.12	0.31 ± 0.25	1.43 ± 0.25	1.32 ± 0.35
W7	0.42 ± 0.13	0.75 ± 0.14	1.78 ± 0.18	0.28 ± 0.14
W8	0.36 ± 0.1	0.35 ± 0.1	1.27 ± 0.16	0.76 ± 0.16
W10	0.2 ± 0.03	1.68 ± 0.09	0.8 ± 0.1	3 ± 0.26
W12	0.59 ± 0.19	0.88 ± 0.16	2.44 ± 0.23	0.82 ± 0.1
W15	1.05 ± 0.12	0.61 ± 0.1	0.84 ± 0.14	0.6 ± 0.14
W16	0.65 ± 0.14	0.81 ± 0.26	0.76 ± 0.31	0.85 ± 0.16
F17	0.22 ± 0.1	0.2 ± 0.14	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.12
W18	0.1 ± 0.11	0.72 ± 0.01	4.24 ± 0.12	0.25 ± 0.21
F20	0.70 ± 0.16	0.81 ± 0.14	0.42 ± 0.11	0.27 ± 0.11
S21	2.71 ± 0.3	0.88 ± 0.16	1.03 ± 0.15	0.39 ± 0.11
S22	2.28 ± 0.98	0.74 ± 0.23	0.21 ± 0.1	0.22 ± 0.23
S24	2.13 ± 0.22	0.51 ± 0.14	0.1 ± 0.2	0.22 ± 0.25
S27	0.24 ± 0.23	0.17 ± 0.12	0.28 ± 0.34	0.36 ± 0.13

^a Grams of EPS per litre of culture medium. Each value is the mean of three determinations.

these genera have been demonstrated to be efficient hydrocarbon degraders (Stapleton et al., 2000; Zhuang et al., 2002; Pavitrans et al., 2004).

In this investigation, we also studied the capacity of selected strains to grow in the presence of various PAHs (naphthalene, phenanthrene, anthracene and pyrene) as the sole carbon and energy source; the results are depicted in Table 2. Eighteen strains grew well on naphthalene media, 14 of them on phenanthrene and pyrene and 12 on anthracene media. It was noted that 18 of the 21 studied strains were able to use more than three PAHs. Prestige oil is classified as fuel oil No 6, containing 50% aromatic hydrocarbons (PAH), 22% saturated hydrocarbons and 28% resins and asphaltenes (Laffon et al., 2006). Some of the PAH contained in Prestige oil (naphthalene, anthracene and pyrene) have been catalogued by the IARC as possible or probable human carcinogens and are part of the

Table 2
Characterization of bacterial strains isolated from seawater, sediments and fuel samples.

Strains	Source	Bioemulsifiers	Growth on PAH solid media			
			Naphthalene	Phenanthrene	Anthracene	Pyrene
<i>Bacillus thuringiensis</i> W1	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Brevibacterium casei</i> F2	Prestige fuel	+	+	+	+	+
<i>Halomonas alkantarctica</i> W3	Seawater	+	+	–	+	+
<i>Halomonas variabilis</i> W4	Seawater	+	+	–	+	+
Marine bacterium W5	Seawater	+	+	+	+	+
Marine bacterium W7	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Marinobacter</i> spp. W8	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Halomonas variabilis</i> W10	Seawater	+	+	+	–	+
<i>Halomonas</i> spp. W12	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> W15	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> W16	Seawater	+	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> F17	Prestige fuel	+	+	+	+	+
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> W18	Seawater	+	+	+	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> F20	Prestige fuel	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas brennerii</i> S21	Sediment BC1	+	+	–	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> S22	Sediment BC1	+	+	+	–	–
<i>Pseudomonas grimontii</i> S24	Sediment BC4	+	+	–	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> S25	Sediment BC4	–	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> S27	Sediment 200146	+	+	–	–	+
<i>Brevibacterium sanguinis</i> S28	Sediment 200146	–	+	+	+	+
<i>Pseudomonas brennerii</i> S29	Sediment BC1	–	+	+	+	+

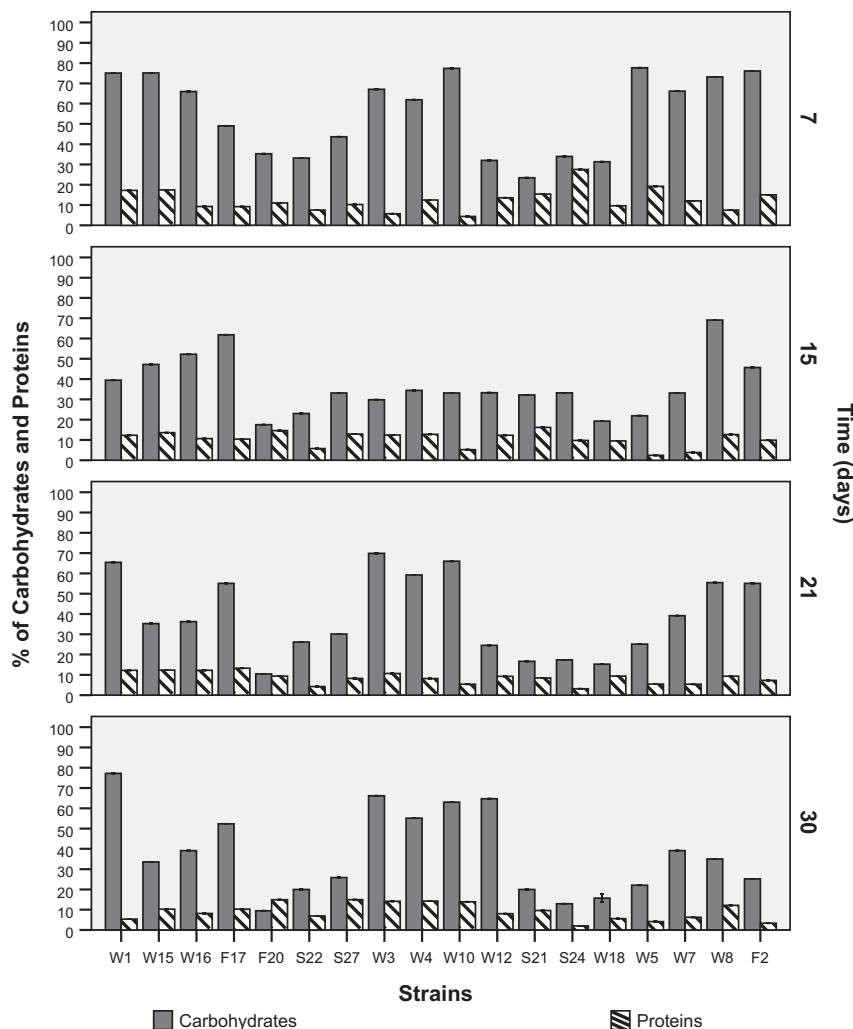


Fig. 2. Carbohydrate and protein composition of biopolymers synthesized by isolated strains at different incubation times in MY medium at 3% (w/v) salt concentration. Error bars represent one standard deviation.

Table 4
Stability of emulsifying activity of bioemulsifiers (0.5% w/v) with various hydrophobic substrates.

BE	Hydrophobic substrates						
	Xylene	Toluene	Octane	Heavy oil	Light oil	Prestige fuel	Diesel
W1-BE	43.3 ^a ± 2.89 ^a	65.8 ± 2.3	66.6 ± 2.8	0	0	71.6 ± 1.1	16.5 ± 1.25
F2-BE	56 ± 1.25	34 ± 2.25	0	0	0	60 ± 1.25	0
W3-BE	56.3 ± 1.25	56.9 ± 0.6	8.1 ± 0.6	45 ± 0.2	25 ± 0.28	33.7 ± 1.2	66.6 ± 0.34
W4-BE	73.7 ± 1.25	73.7 ± 1.2	76.2 ± 1.2	73.7 ± 1.2	73.7 ± 1.2	53.7 ± 1.2	73.7 ± 1.25
W5-BE	0	0	0	0	0	34 ± 1.75	0
W7-BE	76 ± 1.25	74 ± 1.75	73 ± 2.25	0	0	34 ± 1.25	44 ± 0.74
W8-BE	76 ± 1.25	74 ± 1.75	6 ± 0.55	0	0	59 ± 2.75	11 ± 1.25
W10-BE	51.2 ± 1.25	61.2 ± 1.2	61.2 ± 1.2	61.2 ± 1.2	63.7 ± 1.2	50 ± 2.5	51.2 ± 1.25
W12-BE	34 ± 1.5	55 ± 2.5	43.4 ± 0.9	42.2 ± 2.2	23.7 ± 0.9	47.5 ± 2.5	25.1 ± 0.6
W15-BE	0	61 ± 1.25	42 ± 2.25	0	4 ± 0.99	76 ± 1.25	13 ± 1.12
W16-BE	45 ± 1.25	65 ± 1.25	55 ± 1.75	0	0	67 ± 2.25	17 ± 0.87
F17-BE	66 ± 1.75	74 ± 1.25	11 ±	0	59 ± 2.25	49 ± 1.25	26 ± 1.75
W18-BE	0	50 ± 1.2	25 ± 0.7	0	0	0	0
F20-BE	50 ± 0.75	50 ± 0.7	50 ± 0.7	0	0	0	0
S21-BE	0	25 ± 0.2	0	0	0	95 ± 1.2	50 ± 0.7
S22-BE	50 ± 0.75	50 ± 0.7	0	0	0	100 ± 0.2	25 ± 0.7
S24-BE	50 ± 0.75	25 ± 0.2	25 ± 0.25	0	0	73.3 ± 0.2	25 ± 0.7
S27-BE	25 ± 0.25	50 ± 1.2	0	0	0	25 ± 0.25	0

^aValues are mean ± standard error of three replicates. BE: Bioemulsifier.

^a Results are expressed as percentages of total height occupied by the emulsion; values are means of three determinations.

16 PAH designated by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) as primary contaminants (IARC, 1989; USEPA, 2000). Our study showed that all isolated strains grew on naphthalene, 81% of them on phenanthrene, 76% on anthracene and 81% on pyrene. In addition, 62% of strains were able to grow on the four PAH tested and 24% were capable of using three of them.

It is well known that microorganisms growing on hydrocarbons frequently produce biopolymers with emulsifying activity. This property is considered to be a biological strategy to facilitate the availability of hydrophobic compounds (Toledo et al., 2008). These can stimulate the growth of hydrocarbon-degrading bacteria and improve their ability to utilize these substances. These biopolymers can either be low molecular weight polymers such as glycolipids (Rosenberg and Ron, 1999) or high molecular weight polymers such as alasan (Navon-Venezia et al., 1995). We found that 18 isolates were able to produce an exopolymer with emulsifying activity, with 3% (w/v) salt being the most suitable concentration for bioemulsifier (BE) production.

It is well known that the culture conditions of biopolymer production generally modify both the yield and chemical composition of the polymer obtained (Sutherland, 2001; Toledo et al., 2008). In this study, the chemical composition in terms of carbohydrates and proteins and the amount of biopolymer synthesized varied not only with the incubation time for production (Fig. 2) but also with the selected strain (Table 3). Thus, the highest amount of BE produced by strain W4 after 30 days of incubation was 3.08 g/l, while strains S21, S22 and S24 showed the highest production rate after 7 days of culture. Also, as mentioned earlier, the BE recovered after shorter incubation times had a higher percentage of carbohydrates than proteins; however some strains of *Halomonas* (W3, W4 and W10) produced a high amount of biopolymer with more than 70% of carbohydrates and only 10% of proteins at 30 days.

The growth of microorganisms on oil hydrocarbons has often been related to their capacity to produce polymers with surfactant or emulsifying activity. However, the synthesis of exopolysaccharides (EPS) with surfactant and emulsifying activity is not always a consequence of microbial growth in hydrocarbons; for example *Halomonas eurihalina* produces the maximal EPS yield in media with glucose as the carbon and energy source and these biopolymers efficiently emulsify oil hydrocarbons (Calvo et al., 1998, 2002, 2009; Martinez-Checa et al., 2002). Our results showed that 85.7% (18 out of 21) of isolates produced exopolymers with emulsifying activity (BE), all were synthesized with glucose as the carbon source, and they were mainly composed of carbohydrates and proteins.

The BE-producing strains belonged to the genus *Bacillus*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter* and *Pseudomonas*. Several authors have reported that strains isolated from marine environments belong to these genera and have the capacity to produce efficient bioemulsifiers (Calvo et al., 2002; Zhuang et al., 2002; Maneerat and Phetrong, 2007; Das et al., 2008).

Our results have demonstrated that the BE produced by strains W1 (*B. thuringiensis*), W3 (*H. alkantarctica*), W4 and W10 (*H. variabilis*), W5 and W7 (marine bacterium), W8 (*Marinobacter*), W12 (*Halomonas* sp.), W15, W16 and F17 (*B. pumilus*) contain substantial amounts of carbohydrates and proteins (Fig. 2). Toledo et al. (2008) reported that bioemulsifiers of high molecular weight, which are produced by a large number of bacteria, are highly efficient as emulsifiers, exhibiting considerable substrate specificity. Toluene, xylene, n-octane, mineral oil (heavy and light) diesel and Prestige fuel oil were used to evaluate the emulsifying capacity of BE produced by bacterial strains isolated in this research. Our data showed that all the BE assayed produced stable emulsions with the majority of hydrocarbons tested (Table 4), especially exopolymers synthesized by *Halomonas* strains W3, W4, W10 and W12. Previous reports have

demonstrated the ability of species of *Halomonas* to produce exopolymers with emulsifying activity (Calvo et al., 1998, 2002; Martinez-Checa et al., 2002).

Prestige fuel was one of the more easily emulsified substrates, with remarkably stable emulsions formed by the BE synthesized by *P. brennerii* S21, *B. pumilus* S22 and *P. grimontii* S24. For this reason S21-BE, S22-BE and S24-BE were added to Prestige fuel liquid medium to determine if these polymers would enhance the biodegradation of Prestige oil hydrocarbons.

To evaluate the bioremediation of Prestige fuel by indigenous bacteria, the isolated strains were grown in liquid media amended with Prestige fuel as the sole carbon and energy source. The results showed that the majority of strains were able to grow and degrade fuel hydrocarbons. Moreover, it was observed that the biodegradation capacity was generally enhanced by the addition of bioemulsifiers. Fig. 3 shows the behaviour of *B. pumilus* S25, *B. sanguinis* S28 and *P. brennerii* S29, the most efficient degrading bacteria.

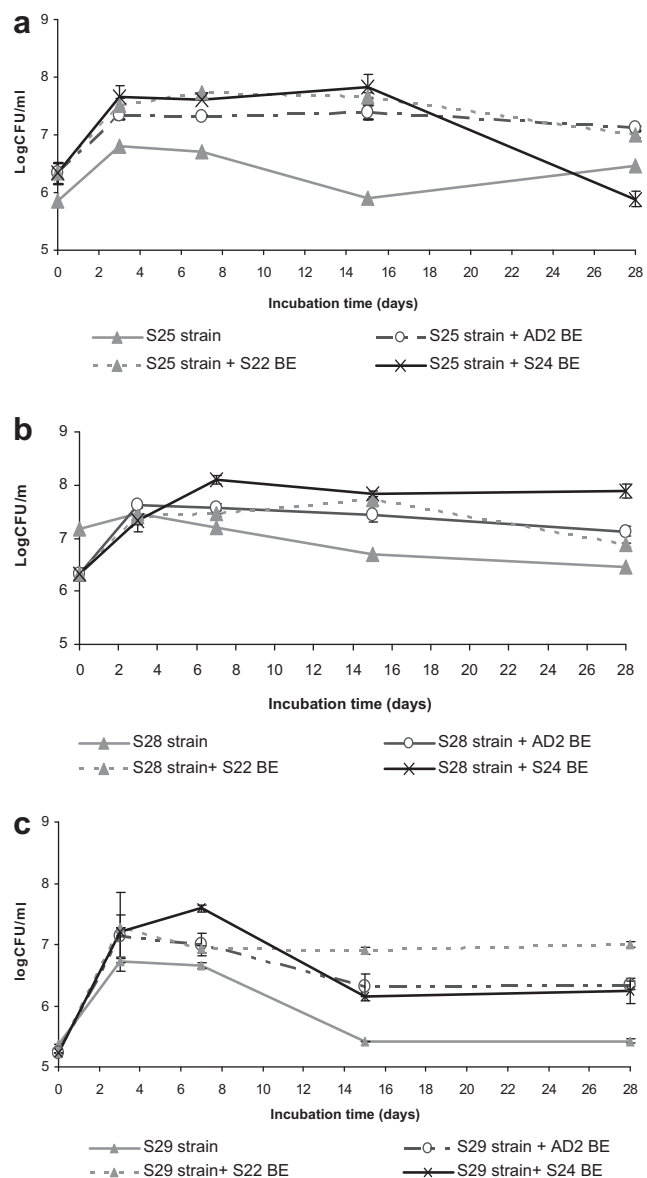


Fig. 3. Cell growth of strains S25, S28 and S29 combined with AD2-EPS, S22-EPS and S24-EPS and in un-combined condition (control) in synthetic marine liquid medium amended with 0.1% (v/v) Prestige fuel oil as the sole source of carbon and energy. Error bars represent one standard deviation.

The growth curves of these strains cultured in Prestige fuel liquid medium showed that the addition of efficient bioemulsifiers, such as S22-BE, S24-BE and AD2-BE, successfully enhanced their growth. Also, as can be seen in Fig. 4, the hydrocarbon removal capacity was enhanced in culture when BE were added. In this context, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Brevibacterium* have frequently been found at sites polluted by petroleum and petroleum derivatives, suggesting that these genera effectively metabolize hydrocarbon molecules and that they are an effective agent for the degradation of hydrocarbons (Zhuang et al., 2002; Pavitran et al., 2004; Calvo et al., 2004; Vieira et al., 2007).

In summary, the biodegradation of petroleum and other hydrocarbons in the environment is a complex process, the quantitative

and qualitative aspects of which depend on the nature and amount of the oil or hydrocarbons present, the ambient and seasonal environmental conditions, and the composition of the autochthonous microbial community. The present work has shown that indigenous bacteria isolated from the deep sea ocean are capable of growing on and degrading hydrocarbons, particularly *B. pumilus* S25, *B. sanguinis* S28 and *P. brennerii* S29, which were able to remove high percentages of different hydrocarbons fractions of Prestige fuel, suggesting that bioremediation of Prestige fuel remaining in the container of the wreck would be carried out by indigenous microorganisms. Furthermore, this study has established the remarkable ability of isolated microorganisms to synthesize biopolymers with emulsifying activity, which increases the bioavailability of the hydrocarbons in order to use them as a carbon and energy source. For example, strains W3, W4 and W10 of *Halomonas* were efficient bioemulsifier-producing bacteria with potential application in industry. Thus, the BE produced by *Halomonas* strains could potentially be used in biotechnology applications within extreme environmental conditions, such as the bioremediation of oil pollution within soil and marine environments.

Acknowledgements

This work was supported by the Technological Centre of Repsol YPF (CTR), and by a grant from the Spanish Environmental Ministry (MMA.A4872007/20-01.1). Additional partial support came from the Spanish Agency of International Cooperation (A.E.C.I.).

References

- April, M.A., Back, M., Ramos, J.L., 1991. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J. Biol. Chem.* 266, 15832–15838.
- Aguilera-Vazquez, L., Soto-Cruz, N.O., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M.A., 2001. Model system for composting hydrocarbon contaminated soil by using water activity and porosity as response variables. *Chem. Eng. J.* 81, 197–202.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Mota, A., Quesada, E., 1998. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 20, 205–209.
- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J., Quesada, E., 2002. Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* 60, 347–351.
- Calvo, C., Toledo, F.L., González-López, J., 2004. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *J. Biotechnol.* 109, 255–262.
- Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., García-Fandiño, C., Laguna, J., González-López, J., 2008. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 35, 1493–1501.
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-Lopez, J., 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future prospects. Sci. Total Environ.* 407, 3634–3640.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microb.* 53, 224–229.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide bio-surfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1675–1684.
- Del Corral, A., Morro, A., Luppi, A., Daly, R., 2005. Prestige fuel-oil confinement and recovery alternative. *Offshore Technology Conference, OTC 17560 Houston, TX, U.S.A., 2–5 May 2005.*
- Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28, 350–355.
- Hernán, R., Del Corral, A., Brerenguer, C., Páez, R., Sparrowe, J., Morro, J., 2005. The prestige wreck fuel recovery project. *Offshore Technology Conference OTC-17534 Houston, TX, U.S.A., 2–5 May 2005.*
- I.A.R.C., 1989. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: *Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting*, vol. 47, Lyon, pp. 237–261.

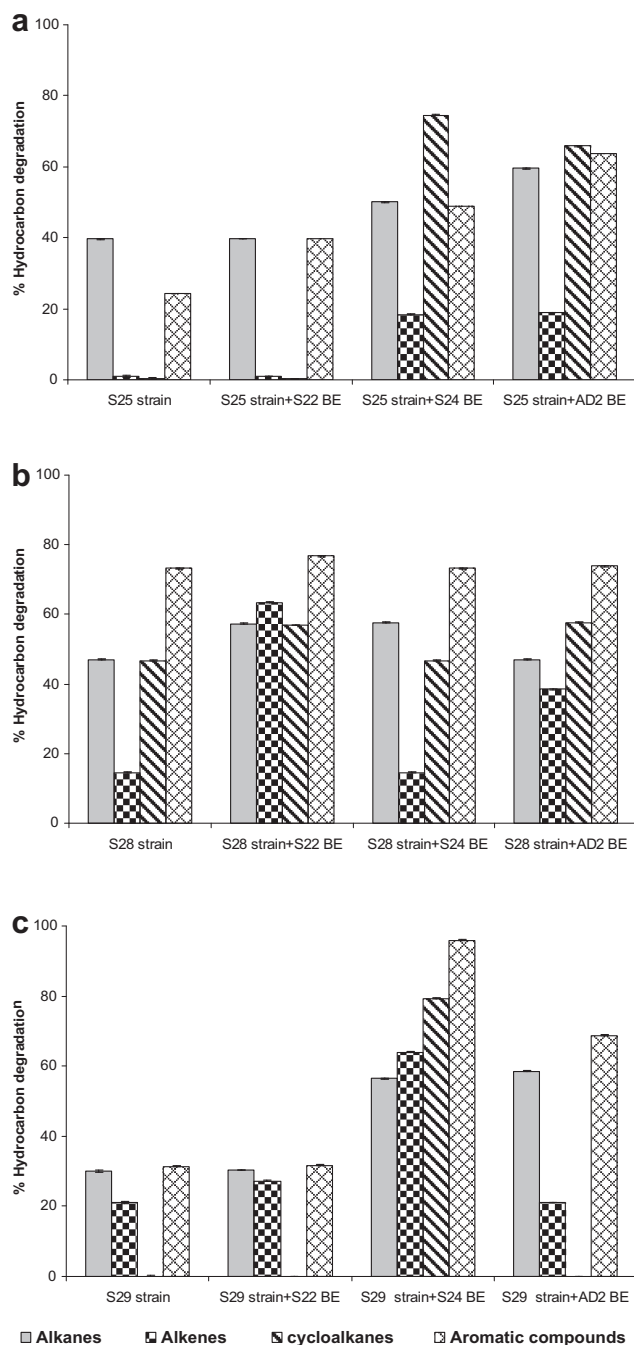


Fig. 4. Efficiency of hydrocarbon removal after 28 days of inoculation with strains S25 (a), S28 (b) and S29 (c) in marine liquid medium amended with 0.1% (v/v) Prestige fuel oil.

- Krepesky, N., Da Silva, F.S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C., 2007. Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. *Braz. J. Biol.* 67, 117–124.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA. molecular evolutionary genetics analysis, version 1.2. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Laffon, B., Rábade, T., Pásaro, E., Méndez, J., 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environ. Int.* 32, 342–348.
- Liu, C.W., Chang, W.N., Liu, H.S., 2009. Bioremediation of n-alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline concentrations and sea water. *Biochem. Eng. J.* 45, 69–75.
- Maneerat, S., Phetrong, K., 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *J. Sci. Technol.* 29, 781–791.
- Margesin, R., Schinner, F., 2001. Bioremediation (natural attenuation and bio-stimulation) of diesel oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microb.* 67, 3127–3133.
- Martinez-Checa, F., Toledo, F.L., Vilchez, R., Quesada, E., Calvo, C., 2002. Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifiers H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* 58, 358–363.
- Moraine, R.A., Rogovin, P., 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 8, 511–524.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosemberg, E., 1995. Alsan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radio-resistens*. *Appl. Environ. Microb.* 61, 3240–3244.
- Oren, A., 2000. Estimation of the contribution of the halobacteria to the bacterial biomass and activity in solar salterns by the use of bile salts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 41–48.
- Pavitrans, S., Balasubramanian, S., Kumar, P., Bisen, P.S., 2004. Emulsification and utilization of high-speed diesel by a *Brevibacterium* species isolated from hydraulic oil. *World J. Microb. Biot.* 20, 811–816.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Science, United States of America* 85, pp. 2444–2448.
- Rosenberg, E., Ron, E.Z., 1999. High and low molecular mass microbial surfactant. *Appl. Microbiol. Biot.* 52, 154–162.
- Saitou, M., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 5, 406–425.
- Sudip, K.S., Om, V.S., Rakesh, K.J., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243–248.
- Sutherland, I.W., 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 663–674.
- Stapleton, R.D., Bright, N.G., Saylor, G.S., 2000. Catabolic of genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb. Ecol.* 39, 211–221.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Toledo, F.L., González-López, J., Calvo, C., 2008. Production of bioemulsifiers by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresour. Technol.* 99, 8470–8775.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2000. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in industrial and municipal wastewater EPA-600/4-00-025. Environmental Monitoring. Systems Laboratory, Cincinnati.
- Vieira, P.A., Vieira, R.B., de França, F.P., Cardoso, V.L., 2007. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *J. Hazard. Mater.* 140, 52–59.
- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J., Werner, D., 1998. Genotypic characterisation of *Bradyrhizobium* strains modulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers. Repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microb.* 64, 2096–2104.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Zeinali, M., Vossoughli, M., Ardestani, S.K., 2008. Naphthalene metabolism in *Nocardia otidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere* 72, 905–909.
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Tay, S.T.L., 2002. *Bacillus naphhtovorans* sp. nov. from oil contaminated tropical marine sediments and its role in naphthalene biodegradation. *Appl. Microbiol. Biot.* 58, 547–553.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Review

Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects

C. Calvo*, M. Manzanera, G.A. Silva-Castro, I. Uad, J. González-López

Environmental Microbiological Research Group, Department of Microbiology, Institute of Water Research, University of Granada, C/ Ramón y Cajal no. 4. 18071, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2008

Received in revised form 7 July 2008

Accepted 8 July 2008

Available online 22 August 2008

Keywords:

Bioemulsifier

Biodegradation

Hydrocarbon

Bioremediation

ABSTRACT

Biodegradation is one of the primary mechanisms for elimination of petroleum and other hydrocarbon pollutants from the environment. It is considered an environmentally acceptable way of eliminating oils and fuel because the majority of hydrocarbons in crude oils and refined products are biodegradable. Petroleum hydrocarbon compounds bind to soil components and are difficult to remove and degrade. Bioemulsifiers can emulsify hydrocarbons enhancing their water solubility and increasing the displacement of oily substances from soil particles. For these reasons, inclusion of bioemulsifiers in a bioremediation treatment of a hydrocarbon polluted environment could be really advantageous.

There is a useful diversity of bioemulsifiers due to the wide variety of producer microorganisms. Also their chemical compositions and functional properties can be strongly influenced by environmental conditions.

The effectiveness of the bioemulsifiers as biostimulating agent in oil bioremediation processes has been demonstrated by several authors in different experimental assays. For example, they have shown to be really efficient in combination with other products frequently used in oil bioremediation such as they are inorganic fertilizer (NPK) and oleophilic fertilizer (i.e. S200C). On the other hand, the bioemulsifiers have shown to be more efficient in the treatment of soil with high percentage of clay. Finally, it has been proved their efficacy in other biotechnological processes such as *in situ* treatment and biopiles. This paper reviews literature concerning the application of bioemulsifiers in the bioremediation of soil polluted with hydrocarbons, and summarizes aspects of the current knowledge about their industrial application in bioremediation processes.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	3635
2. Chemical composition	3635
3. Use of biosurfactant in oil bioremediation	3636
4. Future prospects.	3638

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248021/243874; fax: +34 958 243094.
E-mail address: ccalvo@ugr.es (C. Calvo).

Acknowledgments	3639
References	3639

1. Introduction

Bioremediation involves the acceleration of natural biodegradation processes in contaminated environments. It usually consists of the application of nitrogenous and phosphorous fertilizers, adjusting the pH and water content, and is often accompanied with the addition of bacteria. Besides, when the pollutants have poor water solubility, addition of emulsifiers and surface-active agents enhances the biodegradation rate by increasing the bioavailability of the pollutant.

Biological treatment techniques fall into two categories, biostimulation and bioaugmentation. Biostimulation refers to the addition of specific nutrients to a waste situation with the hope that the correct, naturally indigenous microbes were present in sufficient numbers and types to break down the waste effectively. This assumes that every organism needed to accomplish the desired treatment results is present. But how can we be certain that these organisms present are the most suitable to degrade all the materials present? And, if the naturally occurring organisms present were truly effective in achieving complete waste (i.e. hydrocarbons) breakdown, then why are there problems at sites?

An alternative approach is to use bioaugmentation, which is the scientific approach to achieve controlled, predictable, and programmed biodegradation. Bioaugmentation involves the addition of specifically formulated microorganisms to a waste situation. It is done in conjunction with the development and monitoring of an ideal growth environment, in which these selected bacteria can live and work.

Hydrocarbons are hydrophobic compounds with low water solubility, thus microorganisms have developed several mechanisms to increase the bioavailability of these compounds in order to use them as carbon and energy source. Therefore one of the major factors limiting the degradation of hydrocarbons such as *n*-alkanes is their low availability to the microbial cells. Microorganisms employ several strategies to enhance availability of those hydrophobic pollutants, such as biofilm formation and biosurfactant production (Bognolo, 1999; Christofi and Ivshina, 2002).

In this sense, growth of microorganisms on oil hydrocarbons has often been related to their capacity of producing polymers with surfactant activity named biosurfactant. These biopolymers can either be low molecular weight polymers such as glycolipids (Guerra-Santos et al., 1986; Rosenberg and Ron, 1999) and lipopeptide (Javaheri et al., 1985; Wilkinson and Galbraith, 1975) or high molecular weight polymers such as emulsan (Zuckerberg et al., 1979), alasin (Navon-Venezia et al., 1995) or biodispersan (Rosenberg et al., 1988).

The first description of a biotechnological application of bioemulsifiers in hydrocarbon bioremediation processes reported by Itoh and Suzuki (1972) showed that a rhamnolipid producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* stimulated the growth of this microorganism when grown in hydrocarbon culture media. Similar results have been described for microorganisms such as

Corynebacterium (MacDonald et al., 1981) *Candida* (Kawashima et al., 1983) or *Rhodococcus* (Martin et al., 1991). However, the synthesis of exopolysaccharides (EPS) with surfactant and emulsifying activity is not always consequence of microbial growth in hydrocarbons, for example the synthesis of EPS with emulsifying activity by strains of *Halomonas eurihalina* is not a consequence of their growth on hydrophobic substances since maximal EPS yields are obtained when cultured in media with glucose as sole carbon source (Calvo et al., 1998; Martínez-Checa et al., 2002, 2007).

The main objective of this article was to review the basic concept of the application of bioemulsifiers as biostimulating in oil bioremediation processes, with particular emphasis on the current knowledge of its importance in biological treatment techniques.

2. Chemical composition

Microbial bioemulsifiers are produced by a wide variety of diverse microorganisms and have very different chemical structures and surface properties. Table 1 shows some example of bioemulsifiers and the producing microorganisms. Microorganisms are capable of making two different types of bioemulsifiers, one type consists of low molecular weight molecules that efficiently lower surface tension and interfacial tension, the other type consists of high molecular weight polymers that bind tightly to surfaces. Within the first group it is worth mentioning the rhamnolipids (see below) produced by *Pseudomonas* species, composed of two molecules of rhamnose and two molecules of 3-hydroxyacides. Also remarkable are the trehalolipids produced by several species of *Rhodococcus*, *Arthrobacter* and *Mycobacterium* composed of trehalose, non hydroxylated fatty acid and mycolic acids and the sophorolipids produced by *Candida* and *Torulopsis*, in which sophorose is combined with long-chain hydroxyacid. The second group of biopolymers with high molecular weight consists of highly efficient emulsifiers that work at low concentration, exhibiting considerable substrate specificity. Among other molecules, this group is composed of polysaccharides, proteins, lipopolysaccharides, lipoproteins or complex mixture of these biopolymers (Banat et al., 2000; Sutherland, 2001). Biopolymers containing polysaccharides, polysaccharides attached to lipids; or polysaccharides attached to proteins have been described as efficient emulsifying agents of numerous hydrocarbon compounds (Plaza et al., 2005; Iyer et al., 2006; Ashtaputre and Shah, 1995; Calvo et al., 2002; Toledo et al., in press). These high molecular weight microbial bioemulsifiers are synthesized by a wide variety of microorganisms. Examples of both types of polymers are depicted in Fig. 1.

Summarizing, according to their chemical structure, bioemulsifiers may be classified into the following main groups:

1. The glycolipids, in which carbohydrates such as sophorose, trehalose or rhamnose are attached to a long-chain aliphatic

Table 1 – Some of the most important bioemulsifiers and their producing microorganisms (Calvo et al., 2004).

Biosurfactant	Producing microorganisms
Glycolipids	Rhamnolipids Trehalolipids
Lipopeptides and lipoproteins	Sphorolipids Peptide–lipid Viscosin Surfactin
Polymeric surfactants	Phospholipids RAG-1 emulsan BD4 emulsan Alasan Biodispersan Liposan Protein complex Thermophilic emulsifier Acetylheteropolysaccharide Food emulsifier Sulfated polysaccharide
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413 <i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Mycobacterium thermoautotrophium</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Halomonas eurihalina</i>

acid or lipopeptide. For example, the rhamnolipids synthesized by *P. aeruginosa* consist of one or two sugar moieties joined to one or two caprylic acid moieties via a glycosidic linkage (Rosenberg and Ron, 1999; Lang and Wullbrandt, 1999).

2. Amino-acid containing bioemulsifiers like surfactin produced by *Bacillus subtilis* composed of seven amino-acid ring structure coupled to one molecule of 3-hydroxy-13-methyl tetradecanoic acid.
3. Polysaccharide–lipid complexes. For example, the emulsan synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 is an extracellular heteropolysaccharide polyanionic complex (Rosenberg et al., 1979).
4. Protein-like substances such as liposan produced by *Candida lipolytica* composed of protein and carbohydrates.

The high diversity of biosurfactant produced by numerous microorganisms is noteworthy (Rosenberg and Ron, 1999). In this sense the chemical nature of a biosurfactant/bioemulsifier plays an important role in its function. However, the chemical composition and emulsifying activity of the biosurfactant depend not only on the producer strain but also on the culture conditions. Thus, the nature of the carbon and nitrogen sources, C:N ratio, nutritional limitations and physical parameters (i.e. temperature, aeration and pH) influence not only the amount but also the types of polymer produced. This play an important role on the yield and structure of microbial bioemulsifiers, changing the substrate often alters the structure of the product, thus altering their properties.

For example, we have studied the influence of the addition of hydrocarbons and other oil related substances to culture media in the chemical composition and in the emulsifying activity of the exopolysaccharides (EPS) synthesized by strains of *H. eurihalina*, *Alcaligenes faecalis*, *B. subtilis*, or *Ochrobactrum anthropi* (Calvo et al., 1998; Martínez-Checa et al., 2002, 2007; Toledo et al., in press). Our results demonstrated that the amount of carbohydrates and proteins of the biopolymer obtained was strongly influenced by the hydrophobic sub-

stance added to culture media. These changes in EPS composition originated noticeable modifications in the emulsifying activity. Thus, it could be suggested that the chemical composition of biopolymers produced dependent of the different hydrophobic compounds added to culture media (Table 2). Moreover, these differences in composition result in differences in emulsifying activity (Table 3).

Sutherland (2001) reported that the content of some chemical groups attached to the carbohydrates structures could vary widely depending on the growth and nutrient conditions. In this sense, we have demonstrated that in the bioemulsifier produced by *H. eurihalina* strain H96, the ratio of uronic acid and sulphate content increased when biopolymer was synthesized with hydrocarbon compounds and that the different chemical structures of the bioemulsifiers were translated into different functional properties (Calvo et al., 1998). In summary biosurfactant, being complex organic molecules with a broad range of functional properties that includes emulsification and de-emulsification, phase separation, wetting, foaming, solubilization, corrosion inhibition and reduction of viscosity. These properties have received considerable attention in recent years for the potential application of biosurfactant for bioremediation processes, particularly for bioremediation of oil-contaminated sites.

3. Use of biosurfactant in oil bioremediation

The fact that biosurfactants have a biological origin implies a better biocompatibility and good microbial biodegradability; consequently there is large number of potential applications for this type of surfactants. This biological origin is of great interest, especially when there is extensive interference with the environment, for example for tertiary petroleum recovery, for the decontamination of oil-polluted areas, for crop protection and for the cosmetic and pharmaceutical sectors (Banat et al., 2000). It is therefore not surprising that a number of investigations in the laboratory (Banat, 1995; Barkay et al.,

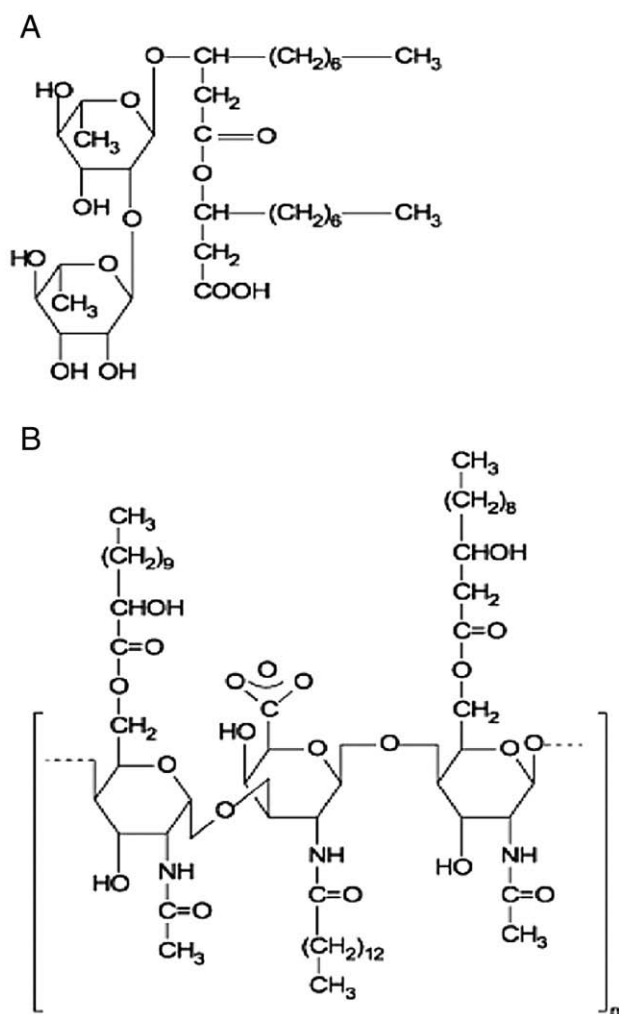


Fig. 1 – Chemical structure of rhamnolipid as low (A) and emulsan as high (B) molecular weight bioemulsifiers.

1999) and in the field have been described on these areas (Christofi and Ivshina, 2002; Kosaric, 2001).

Biodegradation of hydrocarbons in soil can be efficiently enhanced by addition or by in situ production of biosurfactants.

It is generally observed (Kosaric, 2001) that the degradation time and particularly the adaptation time, for microbes are clearly shortened.

The specific assembly of the soil particles, known as soil structure, determines the transfer ability of the soil with regard to water, and nutrients to the bioactive areas. Consequently, presence of biosurfactants in soil may produce a positive effect in form of stimulation of dissolution or desorption rates, solubilization or even emulsification of hydrocarbons. Norman et al. (2002) have clearly showed that rhamnolipids stimulate different processes involved in degradation of organic substrates. The efficiency of the biodegradation process and the specific mechanism of action of rhamnolipid may depend on how the substrate is presented. In this sense, this group showed that rhamnolipid and several other surfactants stimulated the degradation of hexadecane to a greater extent when it was entrapped in matrices with pore-sizes larger than 300 nm rather than in matrix with smaller pore-sizes or in sea sand.

According to Norman et al. (2002) degradation of hydrocarbon can only be enhanced by surfactant when the process is under rate limiting conditions. Another important factor in soil bioremediation is the variety and balance of nutrients in the soil. Addition of nutrients to the soil, in form of nitrogen, phosphorous and if necessary carbon compounds, allows the native microbial population to develop and augment. Thus such addition is translated in an increase of microorganisms capable of metabolising the pollutant, therefore enhancing the biodegradation rate. This principle prompted us to study the effect of addition of the bioemulsifier AD2-EPS in combination with two different nutrient additives: the inorganic NPK fertilizer and the S200C oleophilic commercial product (from IEP Europe) in oil bioremediation process using soil microcosms. Our results showed that addition of AD2-EPS+S200C enhanced hydrocarbon biodegradation over an untreated control or treated soils amended with AD2-EPS, S200C or NPK alone, suggested that AD2-EPS enhanced the solubility and consequently the bioavailability of hydrocarbon compounds to specific oil degrader microorganisms previously stimulated by the S200C product (Calvo et al.; unpublished data). Similar results have been previously reported by other authors (Kosaric, 2001; Providenti et al., 1995).

Table 2 – Yield production and chemical composition of EPS synthesized by *Halomonas eurihalina* strain F2-7 growing in MY medium with glucose, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octane, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil, petrol or crude oil, and in control medium.

	Substrates						
	Glucose ^a	Octane	Xylene	Light oil	Heavy oil	Petrol	Crude oil
Yield production ^b	1.3±0.11	0.76±0.13	1±0.15	1.45±0.11	0.96±0.18	0.58±0.13	0.68±0.13
Chemical composition ^c							
Carbohydrates	36.89±1.35	22.53±1.71	29.62±0.97	27.77±0.81	25.92±1.24	26.81±0.09	28.28±1.11
Proteins	7.27±0.94	2.12±0.31	1.93±0.54	4.18±0.27	6.94±0.73	3.38±0.28	2.10±0.22
Uronic acids	1.32±0.16	3.16±0.21	2.35±0.19	2.17±0.08	2.81±0.05	2.91±0.17	2.57±0.28
Acetyl residues	0.43±0.01	0.94±0.03	1.27±0.23	1.01±0.07	1.57±0.37	1.23±0.21	1.07±0.07
Sulfates	7.15±0.95	14.72±1.18	13.70±1.05	21.73±2.01	15.60±1.16	28.16±1.25	20.66±1.02

^aMY medium with glucose.

^bData are expressed in grams of EPS per liter of culture medium.

^cResults are expressed as percentages of total dry weight of the polymers, values are means of at least three determinations.

Table 3 – Emulsifying activity of EPS V2-7 of *Halomonas eurihalina* on *n*-octane, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil, petrol and crude oil (Martínez-Checa et al., 2007).

EPS-emulsifier	Substrates					
	Octane	Xylene	Light oil ^b	Heavy oil ^b	Petrol	Crude oil
Glucose-EPS	57.58±1.74 ^a	69.23±1.23	61.53±1.46 ^b	57.59±1.94	57.67±0.99	71.15±1.23
Octane-EPS	63.46±1.14	47.11±0.76	30.76±1.21	61.23±2.19	35.41±1.15	88.46±0.85
Xylene-EPS	42.30±1.27	71.15±1.97	28.84±0.44	23±3.16	19.23±1.01	55.76±1.66
Light oil ^b -EPS	60.83±1.81	40.38±1.21	67.30±1.19	48.07±1.26	36.53±0.17	76.92±1.37
Heavy oil ^b -EPS	56.73±2.18	9.61±1.18	35.19±0.29	62.56±1.51	38.17±1.04	65.38±1.25
Petrol-EPS	54.8±0.58	8.65±0.92	33.65±1.12	55.79±2.25	62.50±1.75	75±0.95
Crude-EPS	55.76±1.77	46.15±2.17	33.65±0.99	47.11±1.63	38.46±0.43	75.96±1.44

^aEmulsifying activity was expressed as the percentage of the total height occupied by the emulsion.

^bMineral oil.

Soil hydrocarbon degradation may also be limited by the available water for microbial growth and metabolism. A decrease in moisture content results in a decrease in microbial activity, while rewetting causes a large and rapid increase in activity (Ayotamuno et al., 2006). Generally, optimum activity occurs when the soil moisture is 50–80% of saturation. Experimental assays in our laboratory indicated that addition of surfactant to sandy soil increased retention of soil moisture in the long time.

Bioemulsifiers have been often reported as enhancers of hydrocarbon biodegradation in liquid media, soil slurries and water and soil microcosms (Providenti et al., 1995; Ron and Rosenberg, 2002; McKew et al., 2007). In soil microcosms, treatment of waste crude oil with *Halomonas* bioemulsifiers produced a selective enhancing of indigenous hydrocarbon degrading bacteria suggesting the utility of bioemulsifiers as biostimulating agent of a bioremediation process (Calvo et al., 2002).

In oil-contaminated mud flats, the elimination of polycyclic aromatics from the crude oil Arabian light was due to wave action and to microbial degradation, addition of trehalose lipid biosurfactant stimulated the biodegradation rate caused the completed elimination within six months (Kosaric, 2001). In soil slurry reactors sophorolipids significantly enhanced biodegradation of naphthalene (Norman et al., 2002). On the other hand, results obtained in our laboratory have shown high efficiency of hydrocarbon biodegradation in biopiles assays amended with AD2-EPS bioemulsifier plus activated sludge (Calvo et al. unpublished data). As above-mentioned, the low availability of the hydrocarbons to the cells is one of the major limiting factors for their biodegradation. In this sense, bioavailability can be enhanced by an increase in temperature, a condition favourable for the growth of thermophilic microorganisms, during hydrocarbon degradation (Margesin and Schinner, 2001). Feitkenhauer et al. (2003) summarized several advantages by using thermophilic microorganisms for bioremediation of hydrocarbons over mesophilic organisms. Briefly, elevated temperature can increase the solubility of hydrophobic pollutants, decrease their viscosity, enhance their diffusion, and transfer long-chain *n*-alkanes from solid phase to liquid phase. Combined effect of thermophilic strains and production of emulsifying agents by *Bacillus* strain NG80-2 has been recently described by Wang et al. (2006) with great effect for long-chain *n*-alkanes

degradation. On the other hand, when oil-contaminated soils are subjected to very low temperatures such as those on polar areas, emulsifiers or biosurfactants are of paramount importance because they can counter the increased viscosity and decreased water solubility of the hydrocarbons at lower temperatures (Aislabie et al., 2006).

4. Future prospects

Regardless of the different chemical composition and applications that bioemulsifiers show the main field of research nowadays is focused on the mass production of these compounds to an industrial scale. Currently a deep understanding is needed for optimal production of glycolipids, lipopeptide, emulsan, alasan and biodispersan. In this regard the following studies are of key importance to achieve the desired production yield. With respect to the glycolipids as bioemulsifiers, rhamnolipids are considered as the best studied type of glycolipids. Many research (Lang and Wullbrandt, 1999; Wang et al., 2006) papers have been published showing improved methods for rhamnolipids production. A recent study (Chen et al., 2007) focused on optimization of rhamnolipid production from a *P. aeruginosa* S2 strain in various carbon and nitrogen sources. These authors (Chen et al., 2007) used the relationships between several exploratory variables and one or more response variable (Response Surface methodology, RSM) to identify optimal C and N source in form of optimal concentration of glucose and NH₄NO₃, concluded that the optimal C/N ratio was approximately 11:4 for rhamnolipid production. These results indicated as well that concentrations of MgSO₄ and FeSO₄ were the most significant factors affecting rhamnolipid production in scaling-up production of rhamnolipid in a well-controlled 5 L jar fermentator. Nevertheless changing the media and culture conditions is not the only factor to modify in order to increase the production yield. In this sense, the development and use of overproducing mutant or recombinant strains for enhancing biosurfactant yield have been reported (Al-Gelawi and Al-Makadci, 2007). Also, different backgrounds have been proposed to overcome the complex environmental regulation with respect to rhamnolipid biosynthesis, and to replace the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* with a safe industrial strain. To achieve rhamnolipid production in a heterologous host, *Pseudomonas*

putida was used. To this end *rhlAB* rhamnolipid genes with the *rhlRI* quorum sensing system, were inserted into *P. putida*. In this way a functional rhamnolipid synthetase catalyzed the formation of rhamnolipid in *P. putida* (Cha et al., 2008). However, the industrial application of recombinant hyperproducing strains, has still not been properly tested, despite of the fact that the hyperproducers have been reported to increase yields several folds. This area of bioemulsifiers research is still in its infancy.

With reference to the lipopeptides and in order to increase surface activity, we have to mention that most lipopeptide biosurfactants have been shown to have a structure similar to that of surfactin, the biosurfactant produced by *B. subtilis* (Peypoux et al., 1999).

Recombinants of *B. subtilis* have been developed by expressing foreign gene related to surfactin production, resulting in high production of bioemulsifier (Ohno et al., 1995). Moreover, recombinant strains often give rise to better product characteristics. Thus, surfactin, the lipopeptide bioemulsifier produced by a large multimodular peptide synthetase suffers from the disadvantage of lysing erythrocytes because of its membrane-active property. However, the production of a novel lipohexapeptide after engineering of *B. subtilis* surfactin synthetase reduced toxicity towards erythrocytes and enhanced lyses of *Bacillus licheniformis* cells, making it more suitable to the bioemulsifiers in therapeutic formulations.

For emulsan optimal production, a series of studies has focused on growth conditions, including the effect of ethanol and phosphate on emulsan production by *A. calcoaceticus* RAG-1 using batch-fed fermentators (Choi et al., 1996). Similar studies can be performed for alasin, since this bioemulsifier of *Acinetobacter radioresistant* KA53 consists on a high-mass complex of proteins and polysaccharides. The emulsification ability of alasin depends on the presence of hydrophobic residues in the four loops spanning the transmembrane domains of AlnA protein. Therefore much genetic engineering can be done to improve not only its surface activity but also its yield production.

In the case of biodispersan, Elkeles et al. (1994) found a biodispersan producer strain of *A. calcoaceticus* A2 mutant defective in protein secretion that produced equal, or even higher, levels of this bioemulsifier (Elkeles et al., 1994). The reduction on secreted proteins presented on the extracellular fluid reduced problems in the purification and application of biodispersan.

In general elements, such as nitrogen, iron, and manganese, are reported to affect the yield of biosurfactants, for example, the limitation of nitrogen is reported to enhance biosurfactant production in *P. aeruginosa* strain BS-2 (Dubey and Juwarkar, 2004) and *Ustilago maydis* (Hewald et al., 2005). Similarly, the addition of iron and manganese to the culture medium has been reported to increase the production of biosurfactant by *B. subtilis* (Wie et al., 2003). The ratios of different elements such as C:N, C:P, C:Fe or C:Mg affected biosurfactant production and optimization of these rates has to be achieved to enhance the production yield of the different biosurfactants (Amézcuca-Vega et al., 2007; Chen et al., 2007).

The genetic of the industrial microorganisms is a very important factor affecting the yield of all biotechnological

products. As above indicated, few mutant and recombinant strains with enhanced bioemulsifiers production have been reported (Mukherjee et al., 2006). Thus, future research aiming for high-level production of bioemulsifiers must be focused towards the development of novel recombinant hyperproducer strains.

The potential use of these hyperproducer strains in addition to novel cost-effective bioprocesses throws the real challenges and offers tremendous opportunities for making industrial production of bioemulsifiers a success story.

In conclusion, for an optimal production of biosurfactant several elements, media components, precursors, conformation and genetic background have to be considered. All these factors are of paramount importance and affect the process of biosurfactant production as well as the final quantity and quality of the biosurfactant. Consequently more research needs to be done in this regard in order to increase yield production in combination with the search for new types of bioemulsifiers for its application on hydrocarbon bioremediation processes.

Acknowledgments

This research has been supported by a grant of Ministerio de Medio Ambiente (MMA.A4872007/20-01.1). M. Manzanera was granted by Programa Ramón y Cajal (MEC, Spain and EDRF, European Union).

REFERENCES

- Aislabie J, Saul DJ, Foght JM. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 2006;10:171–9.
- Al-Gelawi MH, Al-Makadci OA. Genetic improvement of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arab Gulf J Sci Res* 2007;25:16–22.
- Amézcuca-Vega C, Poggi-Varaldo HM, Esparza-García F, Ríos-Leal E, Rodríguez-Vázquez R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresour Technol* 2007;98:237–40.
- Ashtaputre AA, Shah AK. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 1995;11:219–22.
- Ayotamuno JM, Kogbara RB, Taleat MO. Bioremediation of a petroleum hydrocarbon polluted agricultural soil at different levels of water application in Port Harcourt, Nigeria. *J Food Agric Environ* 2006;4:214–7.
- Banat IM. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresour Technol* 1995;51:1–12.
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:495–508.
- Barkay T, Navon-Venezia S, Ron E, Rosenberg E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the emulsifier alasin. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2697–702.
- Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf* 1999;152:41–52.
- Calvo C, Martínez-Checa F, Mota A, Quesada E. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of

- the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;20:205–9.
- Calvo C, Martínez-Checa F, Toledo FL, Porcel J, Quesada E. Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;60:347–51.
- Calvo C, Toledo FL, Pozo C, Martínez-Toledo MV, González-López J. Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms. *J Food Agric Environ* 2004;2:238–43.
- Cha M, Lee N, Kimb M, Kimb M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour Technol* 2008;99:2192–9.
- Chen SY, Lu WB, Wei YH, Chen WM, Chang JS. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotechnol Prog* 2007;23:661–6.
- Choi JW, Choi HG, Lee WH. Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *J Biotechnol* 1996;45:217–25.
- Christofi N, Ivshina IB. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol* 2002;93:915–29.
- Dubey K, Juwarkar A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian J Biotechnol* 2004;3:74–81.
- Elkeles A, Rosenberg E, Ron EZ. Production and secretion of the polysaccharide biodispersan of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 in protein secretion mutants. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:4642–5.
- Feitkenhauer H, Muller R, Markl H. Degradation of polycyclic aromatic hydro-carbons and long chain n-alkanes at 60–70 °C *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation* 2003;14:367–72.
- Guerra-Santos LH, Kappeli O, Flechter A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;24:443–8.
- Hewald S, Joseph K, Bölker M. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:3033–40.
- Itoh S, Suzuki T. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agric Biol Chem* 1972;36:2233–5.
- Iyer A, Mody K, Jha B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme Microbiol Technol* 2006;38:220–2.
- Javaheri MJ, Jenneman GE, McClnerney MJ, Knapp RM. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus liqueniformis* JF-2. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:698–700.
- Kawashima H, Nakahara T, Oogaki M, Tabuchi. Extra-cellular production of a mannosyl-erythritol lipid of a mutant of *Candida* sp. Form n-alkanes and tryacylglycerols. *J Ferment Technol* 1983;61:143–8.
- Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol Biotechnol* 2001;39:295–304.
- Lang S, Wullbrandt D. Rhamnolipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:22–32.
- MacDonald CR, Cooper DG, Zajic JE. Surface active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 1981;41:117–23.
- Margesin R, Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments (review). *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:650–63.
- Martin M, Bosch P, Parra JL, Espuny MJ, Virgili A. Structure and bioconversion of trehalose lipids. *Carbohydr Res* 1991;220:93–100.
- Martínez-Checa F, Toledo FL, Vilchez R, Quesada E, Calvo C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H-28 in media containing various hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:358–63.
- Martínez-Checa F, Toledo FL, El Mabrouki K, Quesada E, Calvo C. Characteristics of Bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Biotechnol Resour* 2007;98:3130–5.
- McKew BA, Coulon F, Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Smith CJ, et al. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* 2007;9:1562–71.
- Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 2006;24:509–15.
- Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, et al. A new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3240–4.
- Norman RS, Frontera-Suau R, Morris PJ. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5096–103.
- Ohno A, Ano T, Shoda M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 1995;47:209–14.
- Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:553–63.
- Plaza GA, Ulfing K, Brigmon RL. Surface Active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Pol J Microbiol* 2005;54:161–2.
- Providenti MA, Fleming CA, Lee H, Trevors JT. Effect of addition of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol Ecol* 1995;17:15–26.
- Ron E, Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:249–52.
- Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;52:154–62.
- Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:402–8.
- Rosenberg E, Rubinovitz C, Gottlieb A, Rosenhak S, Ron EZ. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:317–22.
- Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 2001;11:663–74.
- Toledo F.L., González-López, J., and Calvo, C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioemulsifier Bioresource Technology*; in press.
- Wang L, Tang Y, Wang S, Liu RL, Liu MZ, Zhang Y, et al. Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain n-alkanes. *Extremophiles* 2006;10:347–56.
- Wie YH, Wang LF, Changy JS, Kung SS. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *J Biosci Bioeng* 2003;96:174–8.
- Wilkinson SG, Galbraith L. Studies on lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Biochem* 1975;52:331–43.
- Zuckerberg A, Diver A, Peeri Z, Gutnick DL, Rosenberg E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:414–20.

Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays

C. Calvo · G. A. Silva-Castro · I. Uad ·
C. García Fandiño · J. Laguna · J. González-López

Received: 1 April 2008 / Accepted: 30 July 2008 / Published online: 11 September 2008
© Society for Industrial Microbiology 2008

Abstract *Ochrobactrum anthropi* strain AD2 was isolated from the waste water treatment plant of an oil refinery and was identified by analysis of the sequence of the gene encoding 16S rDNA. This bacterium produced exopolysaccharides in glucose nutrient broth media supplemented with various hydrocarbons (*n*-octane, mineral light and heavy oils and crude oils). The exopolysaccharide AD2 (EPS emulsifier) synthesized showed a wide range of emulsifying activity but none of them had surfactant activity. Yield production varied from 0.47 to 0.94 g of EPS l⁻¹ depending on the hydrocarbon added. In the same way, chemical composition and emulsification activity of EPS emulsifier varied with the culture conditions. Efficiency of the EPS emulsifier as biostimulating agent was assayed in soil microcosms and experimental biopiles. The AD2 biopolymer was added alone or combined with commercial products frequently used in oil bioremediation such as inorganic NPK fertilizer and oleophilic fertilizer (S200 C). Also, its efficiency was tested in mixture with activated sludge from an oil refinery. In soil microcosms supplemented with S200 C + EPS emulsifier as combined treatment, indigenous microbial populations as well as hydrocarbon degradation was enhanced when compared with microcosms treated with NPK fertilizer or EPS emulsifier alone. In the same

way EPS emulsifier stimulated the bioremediation effect of S200 C product, increasing the number of bacteria and decreasing the amount of hydrocarbon remained. Finally, similar effects were obtained in biopile assays amended with EPS emulsifier plus activated sludge. Our results suggest that the bioemulsifier EPS emulsifier has interesting properties for its application in environment polluted with oil hydrocarbon compounds and may be useful for bioremediation purposes.

Keywords *Ochrobactrum anthropi* · Bioemulsifier · Biodegradation · Hydrocarbon

Introduction

Microbial biosurfactants and bioemulsifiers are produced by a wide variety of diverse microorganisms and they have different chemical structures and properties [6, 28]. In general, bacteria make low molecular weight molecules that efficiently reduce surface and interfacial tensions such as glycolipids [18, 35] and lipopeptide [22]; [32], and high molecular weight polymers that are efficient emulsifiers such as emulsan [45], alasan [30] or biodispersan [36]. Within the first group, it is worth mentioning the rhamnolipids produced by *Pseudomonas* species, composed of two molecules of rhamnose and two molecules of 3 hydroxyacids. Also remarkable are the trehalolipids produced by several species of *Rhodococcus*, *Arthrobacter* and *Mycobacterium* composed of trehalose, nonhydroxylated fatty acid and mycolic acids and the sophorolipids produced by *Candida* and *Torulopsis*, in which sophorose is combined with long chain hydroxyacid [11, 37]. The high molecular weight biopolymers containing polysaccharides, polysaccharides attached to lipids; or polysaccharides attached to

C. Calvo (✉) · G. A. Silva-Castro · I. Uad · J. González-López
Environmental Microbiological Research Group,
Department of Microbiology, Institute of Water Research,
University of Granada, C/Ramón y Cajal no. 4,
18071 Granada, Spain
e-mail: ccalvo@ugr.es

C. García Fandiño
CTR Repsol YPF, Madrid, Spain

J. Laguna
AG Ambiental, Madrid, Spain

proteins have been described as efficient emulsifying agents of numerous hydrocarbon compounds [4, 10, 20, 28, 33, 40].

Regardless of the different chemical composition and applications that bioemulsifiers show, the main field of research nowadays is focused on the mass production of these compounds on an industrial scale [17]. Many research [25, 42] papers have been published showing improved methods for rhamnolipids production. Recently, the relationships between several exploratory variables and one or more response variable [Response Surface methodology (RSM)] have been used to identify optimal C and N source in order to optimize rhamnolipid production from a *P. aeruginosa* S2 strain [13] and bioemulsifier production by *Candida lipolytica* [2].

The diversity of these compounds results in a broad spectrum of potential applications, being valuable in industries as diverse as agriculture, food industry, leather, textile or paper industries, cosmetic and pharmaceutical industries, etc. However, the largest possible market for biosurfactants and bioemulsifiers could be the oil industry, both for petroleum production and for bioremediation of oil contaminated sites [21, 34].

Biodegradation is one of the primary mechanisms for elimination of petroleum and other hydrocarbon pollutants from the environment [26]. It is considered an environmentally acceptable way of eliminating oils and fuel because the majority of hydrocarbons in crude oils and refined products are biodegradable, and hydrocarbons degrading microbes are ubiquitous [23].

Petroleum hydrocarbon compounds bind to soil components and are difficult to remove and degrade. Bioemulsifiers can emulsify hydrocarbons enhancing their water solubility and increasing the displacement of oily substances from soil particles and thus making them more available to microorganisms [6]. It has been demonstrated that emulsifying agents enhance the degradation process due to better solubilization of hydrocarbon prior to microbial degradation [15]. Addition of compounds able to emulsify hydrocarbons into microscopic droplets increases the surface area exposed to bacteria, this produces a readily available food source that bacteria can assimilate quickly [28, 34]. For these reasons, inclusion of bioemulsifiers in a bioremediation treatment of a hydrocarbon polluted environment could be really advantageous. In this sense, it has been reported [8, 19, 34] that biosurfactant and other natural emulsifying agents are important tools for biotreatment of hydrocarbon polluted environment.

In the present study, we describe the properties, characterization and efficiency of EPS emulsifier produced by *O. anthropi* as biostimulating agent to oil hydrocarbon biodegradation under experimental conditions such as soil microcosms and biopiles.

Materials and methods

Microorganism

Strain AD2 was isolated from an activated sludge plant (wastewater treatment plant of a Repsol YPF oil refinery located in Puertollano, Spain). Sludge samples (10 g) from the aerobic biological reactor were placed in 500-ml Erlenmeyer flask mixed with 100 ml of BH liquid medium and 1 ml of Kirkuk crude oil and incubated at 28 °C for a week. Samples for bacterial isolation (0.1 ml) were plated on BH agar medium [15] with the addition of 0.1% w/v naphthalene, phenanthrene or pyrene. For that purpose, the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) was dissolved in ether and the solution was then spread onto the surface of the medium. Strain AD2 was selected for further studies due to its ability to grow and produce a clear halo on the surface of the BH medium supplemented with 0.1% of PAHs. The strain was long-term maintained in the laboratory by lyophilisation. For this study, stock cultures were grown on TSA (Difco) slants.

Culture media

BH medium used for isolation of hydrocarbon degrading microorganisms is a minimal medium with the following composition (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2; K_2HPO_4 , 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02; $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1; FeCl_3 , 0.05 and agar, 20.

Growth studies of strain AD2 was determined in nutrient broth (NB medium) with the following composition (g/l): glucose, 10; yeast extract, 5; proteose-peptone, 5; and NaCl, 5. Bacteria were cultivated at 32 °C for 5 days under aerobic conditions in a rotatory shaker (150 rpm).

The effect of different hydrocarbons on growth and EPS emulsifier production by strain AD2 was evaluated by addition of octane, toluene, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil or crude oil to glucose NB media at concentration of 1% v/v.

PAHs, octane, toluene xylene, mineral light oil, mineral heavy oil supplied by Sigma Co, were standard for HPLC and gas chromatography ($\geq 99.7\%$ of purity). Crude oil used was Kirkuk crude oil from the refinery of Repsol YPF (Puertollano, Spain).

Taxonomical characterization of strain AD2

Strain AD2 was identified by the analysis of the sequence of the gene encoding 16S rRNA (16S rDNA). Primers fD1 and rD1 [43] were synthesized by Sigma-Genosis (Haverhill, UK) and used to amplify almost the full length of 16S rRNA gene. Freshly cultured colonies of strain AD2 were lysed by the addition of 20 μl of a mixture of NaOH (0.05 M)–SDS (0.25%, w/v) and then boiled for 15 min.

The lysates were adjusted to 200 μ l with sterile bidistilled water and centrifuged at 2,500g for 5 min.

The cleared lysates (4- μ l aliquots) were used as template for identification. PCR was performed adding to the lysates 1 \times PCR buffer (ABI; Perkin Elmer, Norwalk, CT), 1.5 mM MgCl₂ (ABI), 200 μ M dNTPs (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), 20 pmol of each primer, and 1 U of Taq polymerase (ABI). The final volume in the reaction tubes was adjusted to 50 μ l. Reactions were run in a Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, CT). The temperature profile was the one previously described by Vinuesa et al. [41] except for the initial denaturation step, which was extended to 7 min. PCR products were run on 1% agarose gels and bands were purified using a Quiaex II kit (Quiagen, Hilden, Germany). The nucleotide sequence of the purified bands was determined by the deoxy chain terminator method, using the ABI-PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, (Perkin Elmer) and automated sequencer Applied Biosystems ABI capillary system (Perkin Elmer). Sequence data were analyzed using gene Runner 3.05 software, and compared to sequences in the EMBL databank using the free BLASTn [3] online software provide by the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>).

Production and characterization of EPS emulsifier

Production of EPS emulsifier was determined in NB medium. Erlenmeyer flasks (500 ml) containing 100 ml of NB medium were inoculated with 1 ml of an overnight culture, grown in the same medium. After incubation at 32 °C for 5 days under aerobic conditions in a rotatory shaker (150 rpm), the cultures were centrifuged at 36,000g in a Sorval RC-JB refrigerated centrifuge at 4 °C for 60 min. Supernatant obtained were precipitated with cold ethanol. The biopolymer precipitated from the supernatants was dissolved in distilled water, dialysed against distilled water during 24 h lyophilised, and weighed [10]. The EPS obtained were subjected to colorimetric analysis of proteins [9] and total carbohydrates [16].

Emulsification assays and surfactant activity test

Emulsifying activity of biopolymer synthesized by strain AD2 grown in glucose NB liquid media amended or unamended with hydrocarbon compounds was detected by a modified version of the method previously described by Cooper and Goldenberg [12]. Test tubes (105 \times 15 mm) were amended with 3.0 ml of exopolymer diluted in distilled water (0.1%, w/v) and 3 ml of a hydrophobic substrate (*n*-octane, xylene, toluene, mineral light oil, mineral heavy oil or crude oil). Then the tubes were shaken vigorously to homogeneity using a vortex, and left to stand for

24 h. Emulsifying activity was expressed as the percentage of the total height occupied by the emulsion. Surfactant activity was determined by measurement of surface tension with a Krüs K11 digital tensiometer, using a plate method [7]. This property was searched in the bacterial culture and in bioemulsifier distilled water solution.

Microcosm assays

Soil microcosms were constructed with oil polluted soil samples (Table 1) incubated at room temperature in steady conditions for 21 days and weekly tested. The soil samples were obtained from a real contaminated soil; they were supplied by the Company AG Ambiental (Madrid, Spain) in order to perform assays of biotreatability. This soil was franc-clay soil (36% clay, 33% sand and 10% slime); it was polluted by a mixture of diesel and fuel oil at final total hydrocarbon concentration near 10,000 mg/Kg (See Table 1 for values of initial pollution).

Six microcosms (three replicate for each treatment) were constructed in order to evaluate the effect of the EPS emulsifier on hydrocarbon biodegradation. Each microcosm received a specific treatment: (A) NPK fertilizer (0.3 g/Kg of soil), (B) oleophilic compound S200 C (1 ml/Kg of soil), (C) EPS emulsifier (1.5 g/Kg of soil), (D) NPK fertilizer (0.3 g/Kg of soil) + EPS emulsifier (1.5 g/Kg of soil), (E) S200 C (1 ml/Kg of soil) + EPS emulsifier (1.5 g/Kg of soil) and (F) control microcosm without any addition.

The NPK fertilizer (Agroblem S.L) is a inorganic complex fertilizer composed of 18% total nitrogen (nitrate, 1.2%; ammonium, 3.1% and urea 13.7%), 8% of P₂O₅, 2% of MgO, 19% of K₂SO₃ and 0.5% of Fe. S200 C is an oleophilic fertilizer (IEP Europe) which stimulates the indigenous hydrocarbon microorganisms.

Biopile systems

The composting process was determined in biopile systems of 1 m height/1.25 m³ total volumes. The biopiles were

Table 1 Concentration of hydrocarbons (mg of hydrocarbon/kg of soil) in oil polluted soil utilized in microcosms and biopiles assays

Hydrocarbon compound	Polluted soil of microcosms	Polluted soil of biopiles
TPH	8,530 \pm 1438	11,000 \pm 1458
Alkanes	5,726 \pm 572	7,863 \pm 171
Prystane	547 \pm 81	219 \pm 84
Phytane	468 \pm 89	212 \pm 56
Alkenes and alkynes	ND	997 \pm 285
Naphthalenes	263 \pm 45	1,663 \pm 64
Pregnans	ND	45 \pm 25

ND Not detected

constructed with 1,245 Kg of soil, contaminated with 13.05 Kg (14.5 l of Kirkuk crude oil) of hydrocarbons and 300 Kg of straw added as bulking agent. Homogenization of contaminant was carried out by turning over. Four different biopiles (in duplicate) were tested in order to understand the effects of activated sludge and EPS emulsifier on hydrocarbon biodegradation. The treatments assayed were as follows: (A) control biopile, (B) biopile amended with 325 Kg of activated sludge, (C) biopile amended with 325 Kg of activated sludge + 150 g of EPS emulsifier, (D) biopile amended with 150 g of EPS emulsifier. The total amount of EPS emulsifier was added in four doses: 60 g of EPS emulsifier at the beginning of experiment and 30 g after 15, 30 and 45 days of treatment. EPS emulsifier addition was done by irrigation with 1% EPS solution in distilled water. Table 1 shows values of initial pollution.

Enumeration of culturable bacteria in soil

Three replicate samples from each microcosm were withdrawn every week for enumeration of aerobic heterotrophic bacteria. 0.1 ml of serially diluted soil samples were plated in 1/10 diluted Trypticase Soy Agar (TSA, Difco) according to Avidano et al. [5]. Triplicate plates were incubated at 28 °C for 48 h before the colonies were counted.

TPH, *n*-alkanes and PAH determinations

Total petroleum hydrocarbons were extracted from the soil samples with a mixture of hexane: acetone 1:1 (v/v) and determined by gravimetric analysis according to Aguilera-Vázquez et al. [1]. Analysis of *n*-alkanes and polycyclic aromatics hydrocarbons (PAHs) in the soil samples were determined from the extracted fractions above mentioned using a Hewlett–Packard 6890 GC system equipped with a HP-5-MS-capillary column (30 × 0.32 mm I.D.). Helium (1.6 ml/min) was utilized as carrier gas. The determinations were performed using the following temperature program: 40 °C held 1 min isothermal, heating rate 4 °C/min up to 310 °C, final temperature held for 1.5 min. Injector and detector temperatures were 250 °C and 300 °C, respectively. *n*-alkanes and PAH were detected using a mass detector 5872 (Hewlett–Packard) and the library utilized was Wiley 275.

Results

Taxonomical characterization of strain AD2

The initial characterization of strain AD2 revealed that they are Gram negative rods. Percentages similarity values obtained after pair-wise alignment of the sequence of 16S

rDNA versus the EMBL data base demonstrated the affiliation of this strain to the species *Ochrobactrum anthropi* (over 100% ungapped sequence identity). Thus, our results showed that strain AD2 isolated from activated sludge of the wastewater treatment plant of the oil refinery of Repsol YPF should be classified as *O. anthropi*.

Production and characterization of bioemulsifier AD2

In the present study, assays were carried out to know the capacity of *O. anthropi* strain AD2 to produce extracellular biopolymers with biosurfactant or bioemulsifier activities. Our data showed that strain AD2 was able to produce exopolysaccharide growing on glucose NB liquid media and the capacity of this bacterium to grow and produce the EPS emulsifier in the presence of hydrocarbon compounds. Table 2, shows yield production and chemical composition, in terms of carbohydrates and proteins, of the EPS emulsifier synthesized by *O. anthropi* strain AD2 in glucose NB medium and in glucose NB medium added with *n*-octane, xylene, toluene, mineral light and heavy oils and crude oil. Addition of *n*-octane, mineral light oil and mineral heavy oil enhanced the amount of EPS synthesized. In contrast, strain AD2 was unable to grow in presence of xylene and toluene, thus both hydrocarbons seem to be toxic for it. When a preliminary characterization of the exopolymers was performed, it was found that these water soluble substances contain high amounts of proteins and carbohydrates. However, the addition of hydrocarbons (*n*-octane, mineral light oil, mineral heavy oil or crude oil) affected the protein and carbohydrate composition. Thus, *O. anthropi* strain AD2 produced in glucose-crude oil medium extracellular polymers with higher content of protein (32.57%) than polymers synthesized in glucose-mineral light oil (10.77%). In this context, our results show that *O. anthropi* strain AD2 can produce significant amounts of extracellular polymers in the presence of different hydrocarbons although these compounds can affect the chemical composition of the extracellular polymers.

The extracellular biopolymers synthesized in glucose NB medium showed a wide emulsifying activity, crude oil being the substrate most effectively emulsified followed by mineral light oil (Table 3). Thus, we found that all extracellular biopolymers had a noticeable activity on crude oil; however, the specificity of biopolymers was modified by the conditions used for culture of the strain AD2. For example, extracellular biopolymers extracted from media with mineral light oil were most active on toluene. However, mineral light oil and mineral heavy oil were not emulsified by the polymers produced on crude oil. Finally, none of the isolated biopolymers produced by *O. anthropi* showed bio-surfactant activity.

Table 2 Yield production (g/l of culture medium) and chemical composition (percentage of carbohydrates and proteins) of EPS synthesized by *Ochrobactrum anthropi* strain AD2 in glucose NB

media amended with *n*-octane, xylene, toluene, mineral light oil, mineral heavy oil, and crude oil media

Carbon source of EPS culture media production	Yield production (g/l)	Chemical composition	
		Carbohydrates (%)	Proteins (%)
Glucose	0.5 ± 0.1	72.79 ± 3.91	18.3 ± 1.56
Glucose + <i>n</i> -octane	0.71 ± 0.1	60.82 ± 2.39	26.99 ± 1.72
Glucose + xylene	ND	ND	ND
Glucose + toluene	ND	ND	ND
Glucose + mineral light oil	0.65 ± 0.1	78.97 ± 4.38	10.77 ± 0.48
Glucose + mineral heavy oil	0.94 ± 0.1	66.14 ± 2.35	14.35 ± 1.91
Glucose + crude oil	0.47 ± 0.1	64.35 ± 1.26	32.57 ± 3.55

Values are mean ± standard error of three replicates

ND Growth and extracellular polymers production was not detected

Table 3 Emulsifying activity of EPS emulsifier produced by *O anthropi* strain AD2 in glucose media amended or un-amended (control) using *n*-octane, toluene, xylene, mineral light oil, mineral heavy oil and crude oil

Growth medium for EPS emulsifier production	Emulsifying activity using following substrate (%)					
	Octane	Toluene	Xylene	Light oil ^a	Heavy oil ^a	Crude
NB ^a	37.5 ± 2.7	28.8 ± 1.3	22.5 ± 4.6	51.2 ± 2.4	28.8 ± 3	88.7 ± 4.2
NB-octane	38.1 ± 0.6	25 ± 1.3	23.2 ± 2	56.1 ± 1.2	31.1 ± 0.4	95.1 ± 3.3
NB- light oil ^b	8.16 ± 0.2	58.33 ± 3.9	10.42 ± 3.1	14.58 ± 0.7	12.5 ± 0.5	85.41 ± 5.1
NB- heavy oil ^b	0	53.19 ± 2.8	27.66 ± 0.6	32 ± 0.9	0	81.25 ± 7.2
NB- crude EPS	0	31.25 ± 0.3	14.58 ± 0.7	0	0	72.92 ± 1.4

^a Nutrient broth

^b Mineral oil

Microcosm assays

In this study, it has been evaluated the effectiveness of the biopolymer EPS emulsifier as biostimulating agent and its application in bioremediation processes using microcosm and biopile systems. In soil microcosms, EPS emulsifier was applied alone or amended with an inorganic NPK fertilizer or the S200 C biostimulating agent. Figure 1 shows the response of indigenous microbial population in treated and nontreated soil microcosms. In general, no differences

were found among the assays tested, except for the microcosm treated with S200 C + EPS emulsifier. This treatment remarkably enhanced indigenous microbial population (Fig. 1) throughout the incubation period (21 days). On the other hand, GC/SM analyses showed that inoculation of EPS emulsifier enhanced hydrocarbon removal efficiency when compared to un-amended control soils (Fig. 2). Moreover, a significant increase in the elimination of TPH and *n*-alkanes was detected in the soil microcosm soil treated with NPK + EPS emulsifier compared to microcosms treated with inorganic NPK fertilizer alone. In the same way, addition of the EPS emulsifier bioemulsifier also stimulated the hydrocarbon biodegradation rate in microcosms containing S200 C. As it can be seen in Fig. 2, the percentage of hydrocarbon removed in microcosms treated with S200 C + EPS emulsifier was notably higher than in microcosms containing S200 C alone.

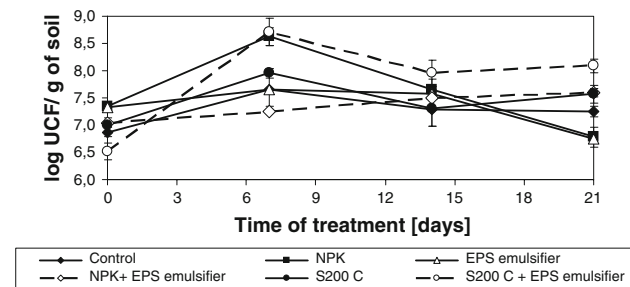


Fig. 1 Total heterotrophic bacteria in soil microcosms amended with NPK fertilizer, EPS emulsifier, S200 C product and un-amended microcosm (control)

Biopile systems

Composting processes have been usefully applied in bioremediation of soil polluted with hydrocarbon. In this context, the composting processes are able to increase the

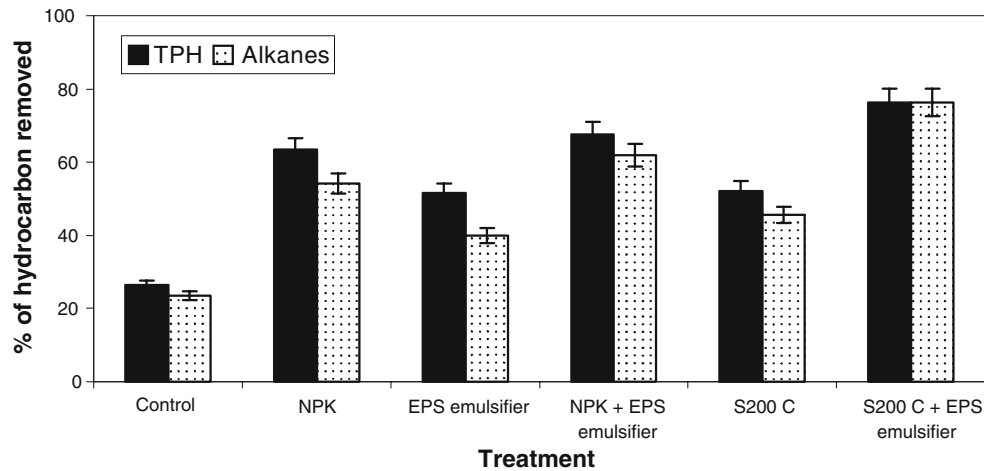


Fig. 2 Efficiency of TPH and *n*-alkanes removing in un-amended soil microcosms (control) or amended soil microcosms with NPK fertilizer, EPS emulsifier and S200 C, after 21 days of treatment

microbial biodegradation activities and consequently enhance the biotransformation of different nutrients such as hydrocarbons. Under this point of view we have studied the effect of the biopolymer EPS emulsifier in the biodegradation of hydrocarbon using composting technology (biopile systems).

We have investigated the effects of the addition of biosurfactant EPS emulsifier and activated sludge on biopile systems for composting of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. Both microbial populations and total hydrocarbon biodegradation (Figs. 3, 4) were enhanced in biopile amended with activated sludge plus biosurfactant compared to biopiles amended with activated sludge, AD2 or un-amended control. Thus, our data showed that the addition of both activated sludge and EPS emulsifier to biopile systems clearly increases the petroleum hydrocarbon biodegradation.

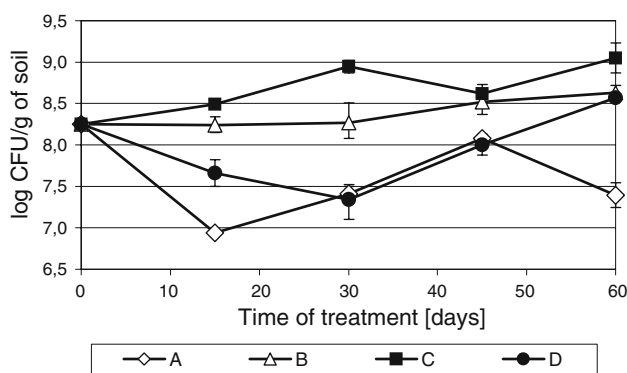


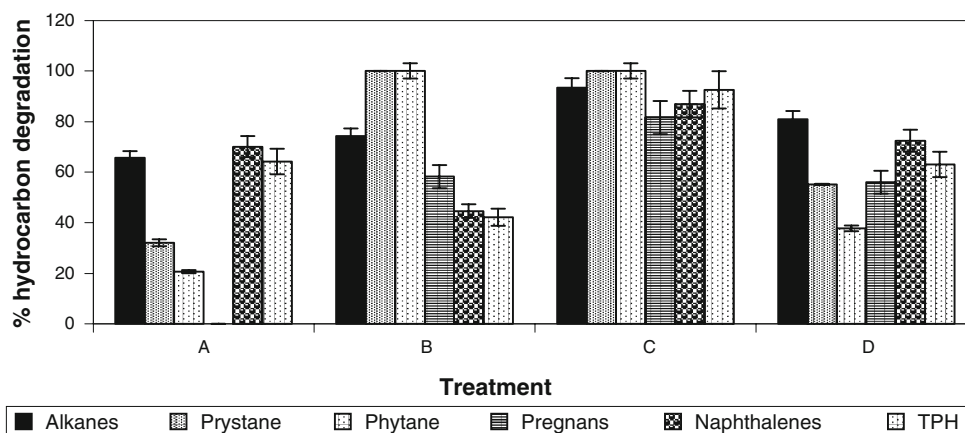
Fig. 3 Evolution of total heterotrophic bacteria in control (un-amended) composting biopiles and composting biopiles amended with activated sludge and EPS emulsifier bioemulsifier, after 60 days of treatment A control, B sludge, C sludge + EPS emulsifier, D EPS emulsifier

Discussion

O. anthropi is a Gram negative bacterium belonging to α Proteobacteria with capacity for bioremediation due to its capability of degrading a high number of pollutants such as organophosphorus pesticides, phenol compounds, and petroleum wastes [31]. Its ability of removing heavy metals by producing high amount of exopolysaccharide has also been described [31]. Studies of the microbial biodiversity during long-term storages of crude oil at different layers of the tank storage, have demonstrated that *Ochrobactrum* spp. were isolated from all the samples collected at each sampling time, suggesting the presence of these microorganisms in a viable state [44]. Similarly, Katsivela et al. [24] have reported that in a 14 months land farming treatment, although microbial diversity was decreased with increased degradation of petroleum hydrocarbons, the genera *Enterobacter* and *Ochrobactrum* were always detected in the land farming treated soil [24].

O. anthropi strain AD2 was isolated in our laboratory from activated sludge of the wastewater treatment plant of an oil refinery and it could be considered as an indigenous crude oil microorganism grown in the refinery oil compounds. This strain was selected among other isolates because it was able to grow in the hydrocarbon culture media and due to its property of producing high amount of exopolymers with emulsifying activity against different hydrocarbon compounds. Thus, *O. anthropi* strain AD2 produces polymers under different culture conditions and in the presence of hydrophobic substances. However, culture medium modifies chemical composition and emulsifying activity of strain AD2 extracellular biopolymers (EPS emulsifier). Most polymers studied here have shown high emulsifying activities. This suggests that *O. anthropi* could produce the emulsifier polymer after being inoculated into

Fig. 4 Efficiency of hydrocarbons removing in control (un-amended) biopile systems, and biopiles systems amended with activated sludge and EPS emulsifier, after 60 days of treatment. *A* control, *B* sludge, *C* sludge + EPS emulsifier, *D* EPS emulsifier, Naphthalene



polluted environmental sites, thus, be useful for in situ bioremediation treatment. The ability of all the polymers studied to emulsify crude oil is also noteworthy, as they are its emulsifying activity comparing to chemical surfactants. Thus, the emulsifying capacity of EPS emulsifier was always higher than that compared to Tween 20, Tween 80 and Triton X100 chemical surfactants [27].

The persistence of hydrocarbons within the ecosystem is due to the low aqueous solubility that limits their availability to hydrocarbon degrading microorganisms; bioemulsifiers can emulsify hydrophobic compounds, form stable emulsion, increase hydrocarbon solubility and consequently enhance the bioavailability in the environment [34]. Thus, they can stimulate the growth of hydrocarbon degrading bacteria, improving their capacity to utilize these compounds [39].

There is a useful diversity of biosurfactants and bioemulsifiers due to the wide variety of producer microorganisms [6]. The EPS emulsifier is an exopolysaccharide which is produced during the stationary phase of growth (after 7 days of incubation). This biopolymer can be included in the high molecular weight exopolymer group [35] and it is able to efficiently emulsify petroleum hydrocarbons, but unable to reduce surface tension.

It has been described that chemical composition and functional properties of exopolymers could be influenced by the nutritional composition of culture media where the bacteria are growing [37]. Thus, yield production, chemical composition and emulsifying activity of the exopolymers depend not only on the producer strain but also on the culture conditions [14, 29]. These chemical modifications could be responsible of the different emulsifying activity detected in the EPS emulsifier according to the growth media where the strain AD2 was cultured.

The effectiveness of EPS emulsifier as a biostimulating agent in oil bioremediation processes was evaluated in the present study using oil contaminated soil microcosms. The EPS emulsifier was applied alone or amended with other biostimulating products such as an inorganic NPK fertilizer

and the S200 C oleophilic commercial product. The primary limiting factors in the microbial degradation of petroleum are nitrogen and phosphorous concentrations. These nutrients are important to cellular production and their supplementation increases the hydrocarbon degradation effectiveness [38]. The results obtained have shown that the application of NPK fertilizer stimulated microbial population at the beginning of the soil treatment (until 7 days of incubation). However, at the end of the soil treatment (21 days) microbial count decreased below un-amended controls. In contrast, combined treatment of NPK and EPS emulsifier enhanced steadily bacterial growth but it was able to maintain higher number of microorganisms at the end of experiments (21 days). This result suggests that EPS emulsifier could be considered as a useful emulsifier that increases the bioavailability of hydrocarbons to bacteria, favoring the use of hydrocarbon as carbon and energy source. This agrees with the highest percentage of hydrocarbons eliminated in microcosms added with inorganic fertilizer and EPS emulsifier.

According to commercial indications, S200 C product selectively stimulates hydrocarbon degrader microorganisms and not other type of bacteria, consequently the specific natural selection of indigenous hydrocarbon degraders promotes a quicker degradation of contaminants. Our experiments have revealed that the addition of S200 C to soil microcosm systems enhanced the percentage of TPH removed compared to un-amended control 52.2% (4,452 ppm eliminated) and 26.3% (2,243 ppm), respectively. However, significant differences in the number of total heterotrophic bacteria were not observed. Finally, when the bioemulsifier EPS emulsifier was added in combination with S200 C, stimulation in microbial growth and oil hydrocarbon biodegradation was detected. Thus, under these experimental conditions, the amount of TPH removed at the end of the treatment (21 days) was near 6,500 ppm (76.3%).

Bioremediation is not a new strategy for oil hydrocarbon removal but in many cases in situ remediation shows a

small rate of degradation. This could be associated with the microorganism's availability to degrade, to low solubility of the contaminant and to specific nutrient limitation. The results obtained suggest that EPS emulsifier usefully enhances the solubility and consequently the bioavailability of hydrocarbon compounds to specific oil degrader microorganisms previously stimulating by the S200 C product. Thus, the use of this combined treatment may be useful for the study of oil hydrocarbon degradation and for bioremediation purposes.

Biopiles are used to reduce the concentration of petroleum constituents in excavated soils through the use of biodegradation. This technology can be performed onsite and involves keeping contaminated soils into piles and stimulating aerobic microbial activity within the soils through the addition of oxygen, minerals, nutrients, and moisture. The enhanced microbial activity results in the breakdown of the petroleum constituents in the soil.

Activated sludges can be considered as an useful source of microorganisms with a wide range of metabolic activities. Our results demonstrated that the addition to biopiles of activated sludge enhanced the bioremediation process; however, this positive effect can be increased by the addition of activated sludge plus biosurfactant EPS emulsifier, suggesting that the application of the composting technology for the bioremediation of oil contaminated soil could be improved with the addition of both products. In conclusion, our results suggest that a combined treatment including bioemulsifiers such as EPS emulsifier could be an efficient tool to improve the yield of hydrocarbons degradation in bioremediation processes.

Acknowledgments This research has been supported by several projects of Ministerio de Educacion y Ciencia (CICYT: REN 200-0384-P4-02) and Ministerio de Medio Ambiente (MMA. A4872007/20-01.1). I Uad was granted by Agencia Española de Cooperación Internacional (A.E.C.I.).

References

- Aguilera-Vázquez L, Soto-Cruz NO, Saucedo-Castañeda G, Gutiérrez-Rojas MA (2001) Model system for composting hydrocarbon contaminated soil by using water activity and porosity as response variables. *Chem Eng J* 81:197–202
- Albuquerque CDC, Filetti AMF, Campos-Takaki GM (2006) Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol* 52:575–583
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Ashtaputre AA, Shah AK (1995) Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 11:219–222
- Avidano L, Gamalero E, Cossa GP, Carraro E (2005) Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Appl Soil Ecol* 30:21–33
- Banat RS, MakkarRS, Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial; surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:495–508
- Barathi S, Vasudevan N (2001) Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ Int* 26:413–416
- Barkay T, Nayon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E (1999) Enhancement of solubilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl Environ Microbiol* 65:2697–2702
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Calvo C, Martínez-Checa F, Toledo FL, Porcel J, Quesada E (2002) Characteristics of bioemulsifiers synthesized in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:347–351
- Calvo C, Toledo FL, Pozo C, Martínez-Toledo MV, González-López J (2004) Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms. *J Food Agric Environ* 2:238–243
- Cooper DJ, Goldenberg BG (1987) Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 54:224–229
- Chen SY, Lu WB, Wei YH, Chen WM, Chang JS (2007) Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Biotech Progr* 23:661–666
- Desai JD, Banat M (1997) Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:47–61
- Déziel E, Paquette G, Villemur R, Lépine F, Bisaillon JG (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 62:1908–1912
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- Fletcher A (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* 10:208–217
- Guerra-Santos LH, Kappeli O, Flechter A (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 24:443–448
- Herman DC, Zhang Y, Miller R (1997) Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Appl Environ Microbiol* 63:3622–3627
- Iyer A, Mody K, Jha B (2006) Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme Microbiol Technol* 38:220–222
- Jacques RJS, Santos EC, Bento FM, Peralba MCR, Pedro A, Selbach EL, Camargo FAO (2005) Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int Biodeterior Biodegradation* 56:143–150
- Javaheri MJ, Jenneman GE, McInnerney MJ, Knapp RM (1985) Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus liqueniformis* JF-2. *Appl Environ Microbiol* 50:698–700
- Kanaly R, Harayama S (2000) Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* 182:2059–2067
- Katsivela E, Moore ERB, Maroukli D, Strömpl C, Pieper D, Kalogerakis N (2005) Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in land farming sites. *Biodegradation* 16:169–180

25. Lang S, Wullbrandt D (1999) Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:22–32
26. Leahy JG, Colwell R (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 54:305–315
27. Martínez-Checa F, Toledo FL, Vilchez R, Quesada E, Calvo C (2002) Yield production, chemical composition and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H28 in media added with several hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:358–363
28. Menezes Bento F, Oliveira Camargo A, Okeke BC, Jr Frankenberg (2005) Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol Res* 160:249–255
29. Mulligan CN, Gibbs BF (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 53:3016–3019
30. Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, Rosenberg E (1995) Alasan a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl Environ Microbiol* 61:3240–3244
31. Ozdemir G, Ozturk T, Ceyhan N, Isler R, Cosar T (2003) Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. *Bioresour Technol* 90:71–74
32. Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553–563
33. Plaza GA, Ulfing K, Brigmon RL (2005) Surface active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Pol J Microbiol* 54:161–162
34. Ron EZ, Rosenberg E (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 13:249–252
35. Rosenberg E, Ron EZ (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biot* 52:154–162
36. Rosenberg E, Rubinovitz C, Gottlieb A, Rosenhak S, Ron EZ (1988) Production of biodispersant by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl Environ Microbiol* 54:317–322
37. Sutherland IW (2001) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 11:663–674
38. Ting YP, Hu HL, Tan HM (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. *Resour Environ Biotechnol* 2:197–218
39. Toledo FL, Calvo C, Rodelas B, González-López J (2006) Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst Appl Microbiol* 29:244–252
40. Toledo FL, González Lopez J, Calvo C (2007) Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioemulsifier Bioresour Technol* 99(17):8470–8475. doi:10.1016-j.biortech.2007.08.055
41. Vinuesa P, Rademaker JLW, De Bruijin FJ, Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S–23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 64:2096–2104
42. Wang L, Tang Y, Wang S, Liu RL, Liu MZ, Zhang Y, Liang FL, Feng L (2006) Isolation and characterization of a novel thermophilic *Bacillus* strain degrading long-chain *n*-alkanes. *Extremophiles* 10:347–356
43. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
44. Yoshida N, Takahashi N, Hiraishi A (2005) Phylogenetic characterization of a polychlorinated dioxin-dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. *Appl Environ Microbiol* 71:4325–4334
45. Zuckerman A, Diver A, Peeri Z, Gutnick DL, Rosenberg E (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl Environ Microbiol* 37:414–420