

**Universidad de Granada
Departamento de Química Analítica**

“Profesor Fermín Capitán García”



**PROGRAMA OFICIAL EN DOCTORADO
EN QUIMÍA**

**COMPORTAMIENTO DE CONTAMINANTES
ORGÁNICOS EN SUELOS AGRÍCOLAS.
ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE
COMPOSTAJE Y ENMENDADO DE SUELOS**

**Julio César Benítez Villalba
Granada, 2013**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Julio César Benítez Villalba
D.L.: GR 894-2014
ISBN: 978-84-9028-941-9

**COMPORTAMIENTO DE CONTAMINANTES
ORGÁNICOS EN SUELOS AGRÍCOLAS.
ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE
COMPOSTAJE Y ENMENDADO DE SUELOS**

por

JULIO CÉSAR BENÍTEZ VILLALBA

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Química por
la Universidad de Granada**

**Fdo. Dr. José Luís Vílchez Quero
Catedrático del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada**

**VISADA en Granada a 08 de
Noviembre de 2013**

**Fdo. Dr. Alberto Zafra Gómez
Profesor Titular del Departamento de
Química Analítica de la Universidad de
Granada**

**Julio César Benítez Villalba
Licenciado en Química**

**Fdo. Dra. María José Belén Juárez Jiménez
Profesora Contratada Doctora del
Departamento de Microbiología de la
Universidad de Granada**

El doctorando Julio César Benítez Villalba y los directores de la tesis José Luís Vílchez Quero, Alberto Zafra Gómez y María José Belén Juárez Jiménez, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 08 de Noviembre de 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: José Luís Vílchez Quero

Fdo.: Julio César Benítez Villalba

Director/es de la Tesis

Fdo.: Alberto Zafra Gómez

Director/es de la Tesis

Fdo.: María José Belén Juárez Jiménez

A mis padres, Julio y Esther
A mi esposa Aurora Mabel
A mi hijo Julio César
A mis hermanos, Gustavo y Rodrigo
A mi sobrina y ahijada Karina

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, los doctores José Luis Vílchez Quero, Alberto Zafra Gómez y María José Belén Juárez Jiménez, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral acogiéndome en este grupo de investigación, por su confianza depositada en mí y su ayuda a la hora de realizar este trabajo, su constante dedicación, orientación, apoyo e interés que me han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral.

Al Dr. Alberto Navalón Montón y el Dr. Oscar Ballesteros García, por estar pendientes en todo momento del avance de mi trabajo, demostrando así un gran interés por esta Tesis.

Al Dr. Francisco Javier Camino Sánchez, cuyos conocimientos me han guiado y ayudado en todo momento, estando ahí siempre cuando lo he necesitado, gracias por esta gran predisposición.

A la Dra. Noemí Dorival García por su gran aporte en el desarrollo de esta tesis, sus ayudas constantes y por todo lo que me ha enseñado. Al Dr. Samuel Cantarero por su predisposición siempre que lo necesitaba para cualquier consulta o duda, por su apoyo y su buena onda. Al Dr. Bartolomé Oliver, por su compañerismo y gran ayuda durante los muestreos durante el tratamiento de campo en la Huerta de Santa María.

A mis compañeros de laboratorio Antonio, Fernando, Esther, Inmaculada, Carolina, Rocío, Sonia, Ana y Arno, por estar ahí siempre brindándome su apoyo y ánimo.

A mi esposa Aurora Mabel gracias por todo lo que hiciste y dejaste por mí para poder realizar esta Tesis, por darme tu apoyo y ánimos todos los días

desde que comenzó este proyecto en mi vida, estoy muy feliz por alcanzar esta meta profesional a tu lado. Gracias por tu comprensión, por tu amor y por ser tal y como eres, porque eres la persona que más directamente has sufrido las consecuencias de este trabajo.

A mi hijo Julio César. Eres lo mejor que me ha pasado en la vida y viniste a este mundo para darme fuerzas, ganas y ese último empujón para terminar este trabajo.

A mis padres Julio César y Delia Esther por sus apoyos constantes, sus orientaciones y por iluminar mi camino y darme las pautas para poder realizarme en mis estudios y en mi vida. Agradezco los sabios consejos en los momentos exactos para no dejarme caer y enfrentar los momentos difíciles y sobre todo, por el amor tan grande que me dieron durante toda mi vida.

A mis hermanos Gustavo Adolfo y Rodrigo Daniel, mi sobrinita y ahijada Karina Abigaíl por sus preocupaciones constantes, apoyo invaluable durante la realización de esta Tesis, siempre estaré con ustedes cuando me necesiten, gracias por todo.

A mi familia entera y a todos mis amigos, los que están en la distancia y los que estuvieron cerca durante este tiempo. Siempre he sentido vuestro apoyo constante y la confianza que tuvieron en mí cada uno de ustedes.

Al Lic. Edgar Sánchez (Gary), Director de Relaciones Internacionales de la Universidad Nacional de Asunción (Paraguay), una gran persona y amigo, así como a la Licenciada María Celeste Coronel que desde el comienzo de la postulación de mi beca Erasmus Mundus me ayudaron con todos los trámites necesarios y me guiaron correctamente siempre.

RESUMEN

La sociedad actual depende en gran medida de numerosas sustancias químicas, empleadas en las múltiples actividades de la vida cotidiana. Sin embargo, su uso masivo y a veces descontrolado, se está convirtiendo en una gran preocupación para los diferentes estamentos sociales, debido a su posible impacto medioambiental, ya que en la actualidad, no existe una legislación clara y específica para muchos de estos compuestos, especialmente en relación a las concentraciones presentes en el medio ambiente. Dentro de este grupo de contaminantes, que en la actualidad han sido denominados “emergentes”, se incluye una vasta variedad de productos farmacéuticos, antimicrobianos y numerosos compuestos químicos con actividad como disruptores endocrinos.

Hasta hace poco tiempo, estas sustancias no eran tomadas muy en consideración como contaminantes potenciales, ya que se encontraban en el medio ambiente en muy pequeñas concentraciones (del orden de los ng L^{-1} o los $\mu\text{g L}^{-1}$); sin embargo, actualmente se tienen evidencias de que aun a estos niveles, pueden causar daños en el ser humano y en los ecosistemas en general, en algunos casos de forma irreversible; se sospecha que determinados compuestos con actividad biológica tales como los disruptores endocrinos presentan efectos que podrían extenderse a sucesivas generaciones.

Muchos de estos compuestos pueden tener como destino final las aguas residuales urbanas e industriales, pudiendo ser degradados y eliminados durante el tratamiento de las mismas la EDAR. Sin embargo, está demostrado que los procedimientos de depuración no son completamente efectivos, ya que estas sustancias permanecen en los

efluentes tratados, pudiendo reingresar al medio ambiente convirtiéndose en un serio peligro para los ecosistemas.

Por otro lado, muchas de estas sustancias presentan propiedades fisicoquímicas que favorecen y promueven su adsorción a los fangos de desecho, presentándose en concentraciones que van desde ng kg^{-1} hasta porcentajes altos. Así, una importante cantidad de estos contaminantes permanece en el medio ambiente, siendo éste el punto de partida para su ingreso en los ecosistemas terrestres, ya que los fangos de desecho tratados o compostados, se utilizan como fertilizantes en el enmendado de suelos agrícolas, con objeto de reciclar nutrientes, enriquecer los suelos, e incrementar la fertilidad vegetal.

En la actualidad se piensa, aunque no se cuenta aún con evidencia suficiente, que la presencia de estas sustancias en este tipo de ambientes puede representar un riesgo para la salud humana y los ecosistemas, ya que al encontrarse adsorbidos, los microorganismos del suelo no pueden biodegradarlos satisfactoriamente, convirtiéndose en bioacumulables, persistentes y tóxicos; existiendo la posibilidad de ser transferidos a las cosechas, y de ingresar en la cadena alimentaria de los seres vivos.

Generalmente, los lodos son sometidos a tratamientos de compostaje, ya que es un tratamiento de bajo costo que presenta numerosas ventajas tales como la desinfección de los fangos, la eliminación por vía microbiana de algunos contaminantes, y la obtención de un sustrato rico en materia orgánica y nutrientes apto para el enmendado de suelos agrícolas. Además, se trata de un proceso ambientalmente más favorable en comparación con otros como la incineración o la acumulación en vertederos. Actualmente, se conoce muy poco acerca de la capacidad que tiene este proceso en la eliminación definitiva de estos contaminantes emergentes. Tampoco se tienen evidencias de qué parámetros o factores favorecen la degradación

de estas sustancias durante este proceso. Por otro lado, se desconoce de manera exacta el efecto que produce el enmendado de los suelos con fango o compost sobre los contaminantes presentes, así como el riesgo real al que están expuestos los seres humanos, ya que estas sustancias pueden transferirse, por ejemplo, a las aguas subterráneas.

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo un estudio profundo de la presencia y el comportamiento de determinados contaminantes emergentes en diferentes matrices de carácter medioambiental, concretamente lodo de depuradora, compost obtenido a partir de este lodo y suelos agrícolas enmendados con dicho compost. Los contaminantes seleccionados incluyen disruptores endocrinos (parabenos, benzofenonas y bisfenol A) y dos antimicrobianos (triclosán y triclocarbán).

Por un lado, se han desarrollado y validado metodologías de buenas características analíticas para la determinación de los contaminantes seleccionados en las matrices objeto de estudio. Para ello, se ha hecho uso de la cromatografía de líquidos de ultra resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas tándem (MS/MS, QqQ), previa extracción de los contaminantes a partir de las muestras mediante ultrasonidos (USE), extracción presurizada con disolventes (PLE) y extracción QuEChERS.

Por otro lado, se ha llevado a cabo un estudio de campo con el objetivo final de determinar la evolución que siguen los contaminantes seleccionados, una vez aplicados a los suelos de labor a través del proceso de enmendado de suelos con compost procedentes de lodos EDAR contaminados. Se ha tratado de determinar el destino final de dichos contaminantes químicos (adsorción, lixiviación y/o biodegradación). Estos estudios de comportamiento medioambiental se han realizado en el suelo agrícola de la Vega de Granada y han permitido, conocer los distintos fenómenos que rigen dicho comportamiento para cada compuesto.

De forma complementaria, se ha llevado a cabo un profundo estudio del comportamiento microbiano de los suelos agrícolas limpios y enmendados con compost contaminado con los diferentes compuestos seleccionados. Se ha estudiado la capacidad de degradar a dichos contaminantes que tienen determinados microorganismos presentes en los medios naturales estudiados. Se han realizado numerosos estudios para determinar las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos y conseguir así su identificación. Se han estudiado por último las actividades enzimáticas de una serie de microorganismos seleccionados y la capacidad de los mismos para utilizar los compuestos objeto de estudio como fuente de carbono y energía.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	1
OBJETO DE LA TESIS	7
INTRODUCCIÓN.	13
1. Contaminación del Agua	15
1.1. El Agua	15
1.2. Contaminación de las Aguas	17
1.3. Contaminantes Emergentes. Presencia en las Aguas	20
2. Proceso de Depuración del Agua. Generación de Fangos y Compostaje	22
2.1. Descripción de una Estación Depuradora de Aguas Residuales ...	22
2.1.1. <i>Tratamiento Primario</i>	24
2.1.2. <i>Tratamiento Secundario</i>	25
2.1.3. <i>Tratamiento Terciario</i>	26
2.1.4. <i>Tratamiento de Fangos</i>	27
2.2. Importancia de los Lodos de Depuradora como Residuo	27
2.3. Compostaje de Lodos de Depuradora.....	28
3. Presencia de Contaminantes Orgánicos en el Suelo	33
3.1. El Suelo	33
3.2. Dinámica de los Compuestos Orgánicos en el Suelo	34
3.2.1. <i>Adsorción – Desorción</i>	36

3.2.2. Lixiviación.....	37
3.2.3. Volatilización.....	37
3.2.4. Escorrentía.....	37
3.2.5. Difusión.....	37
3.2.6. Adsorción por Plantas y Organismos.....	38
3.2.7. Degradación.....	38
4. Microbiología del Suelo.....	40
4.1. Microorganismos en el Suelo. El Ecosistema Edáfico.....	40
4.2. Contaminación del Suelo. Impacto Sobre la Comunidad Microbiana.....	43
5. La Vega de Granada.....	46
5.1. Antecedentes Históricos.....	46
5.2. Características Físicas y Socioeconómicas de la Vega de Granada.....	46
5.3. Calidad de las Aguas Subterráneas en la Vega de Granada.....	47
6. Contaminantes Estudiados. Disruptores Endocrinos.....	50
6.1. Generalidades.....	50
6.2. Efectos de Disruptores Endocrinos Químicos en los Organismos	52
6.3. Clasificación de los Disruptores Endocrinos Químicos.....	55
6.4. Mecanismos de Acción de los Disruptores Endocrinos Químicos	56
6.5. Compuestos Seleccionados.....	58
6.5.1. Bisfenol A (BFA).....	58
6.5.2. Parabenos (PBs).....	59
6.5.3. Benzofenonas (BPs).....	60
6.5.4. Triclosán (TCS) y Triclocarbán (TCB).....	61

CAPÍTULO I. MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. Reactivos y Disolventes Empleados.....	67
2. Material de Laboratorio	69
3. Instrumentación	71
4. Programas Informáticos.....	73
5. Tratamiento Estadístico de los Datos Analíticos.....	74
5.1. Métodos Univariantes.....	74
5.2. Métodos Multivariantes.....	75
5.2.1. <i>Diseño Estadístico de Experimentos</i>	76
5.2.2. <i>Idoneidad del Modelo</i>	80
6. Calibración y Parámetros Analíticos del Método.....	82
6.1. Rechazo de Valores Anómalos	83
6.2. Función de Calibración	84
6.3. Parámetros de Calidad del Método Analítico	85
6.3.1. <i>Evaluación de la Exactitud</i>	85
6.3.2. <i>Rango Dinámico Lineal y Linealidad</i>	88
6.3.3. <i>Sensibilidad o Resolución Analítica</i>	89
7. Comparación Estadística de Métodos Analíticos	91

CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS MEDIANTE UPLC-MS/MS. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES..... 93

- 1. Espectrometría de Masas en Tándem. Descripción y Modos de Trabajo 93**
- 2. Optimización de Variables del Espectrómetro de Masas 98**
- 3. Optimización de las Variables del Proceso Cromatográfico 109**
 - 3.1. Selección de la Fase Estacionaria 109
 - 3.2. Estudio de la Composición de la Fase Móvil 111
 - 3.3. Optimización del Gradiente 114
 - 3.4. Influencia de la Temperatura de la Columna..... 116
 - 3.5. Estudio del Flujo y del Volumen de Inyección..... 116
 - 3.6. Resumen de las Condiciones Óptimas de Trabajo 117

CAPÍTULO III. TRATAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN MEDIANTE ULTRASONIDOS 135

- 1. Descripción de la Técnica de Extracción 124**
 - 1.1. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)..... 124
 - 1.2. Toma y Preparación de las Muestras Estudiadas..... 128
- 2. Selección y Optimización de las Variables del Proceso de Extracción 129**
 - 2.1. Selección de Disolvente de Extracción..... 130

2.2. Optimización del Tiempo y Volumen de Extracción	132
2.3. Ciclos de Extracción.....	141
2.4. Procedimiento Final de Extracción mediante Ultrasonido	142
3. Calibración. Parámetros Analíticos y Validación del Método.....	143
3.1. Establecimiento del Modelo de Calibración	143
3.2. Evaluación del Efecto Matriz.....	143
3.3. Límites de Detección y Cuantificación	155
3.4. Rango Dinámico Lineal y Linealidad.....	156
3.5. Sensibilidad Analítica.....	156
3.6. Exactitud del Método: Precisión y Veracidad	157
CAPÍTULO IV. TRATAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN MEDIANTE LÍQUIDOS PRESURIZADOS.....	163
1. Descripción de la Técnica de Extracción	165
2. Selección y Optimización de las Variables del Proceso de Extracción	169
2.1. Optimización de las Variables Mediante Extracción Presurizada .	169
2.2. Procedimiento Final de Extracción mediante PLE.....	180
3. Calibración. Parámetros Analíticos y Validación del Método.....	181
3.1. Establecimiento del Modelo de Calibración	181
3.2. Evaluación del Efecto Matriz.....	182
3.3. Límites de Detección y Cuantificación	194

3.4. Rango Dinámico Lineal y Linealidad	195
3.5. Sensibilidad Analítica.....	195
3.6. Exactitud del Método: Precisión y Veracidad	196

CAPITULO V. TRATAMIENTO DE MUESTRA. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LIMPIEZA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE QuEChERS..... 201

1. Descripción de la Técnica de QuEChERS..... 203

2. Selección y Optimización de las Variables del Proceso de Extracción 205

2.1. Optimización de las Variables de Extracción..... 206

2.2. Procedimiento Final de Extracción con QuEChERS 215

3. Calibración. Parámetros Analíticos y Validación del Método..... 217

3.1. Establecimiento del Modelo de Calibración 217

3.2. Evaluación del efecto Matriz..... 217

3.3. Límites de Detección y Cuantificación 229

3.4. Rango Dinámico Lineal y Linealidad..... 230

3.5. Sensibilidad Analítica..... 230

3.6. Exactitud del Método: Precisión y veracidad..... 231

CAPÍTULO VI. APLICACIÓN EN CAMPO. ESTUDIO QUÍMICO.. 237

1. Caracterización del Suelo, Agua y Compost Empleados..... 240

1.1. Estudio del Suelo Agrícola	240
1.1.1. <i>Propiedades Físicas del Suelo</i>	241
1.1.2. <i>Propiedades Químicas del Suelo</i>	243
1.2. Estudio del Compost	247
1.2.1. <i>Propiedades Físicas del Compost</i>	247
1.2.2. <i>Propiedades Químicas del Compost</i>	248
1.3. Estudio del Agua de Pozo	251
2. Experiencia de Campo.....	254
2.1. Descripción de las Parcelas Experimentales	254
2.2. Descripción de la Metodología Experimental	257
2.2.1. <i>Tratamiento o Dopado con los Analitos</i>	257
2.2.2. <i>Toma de Muestra y Riego Sucesivo</i>	258
2.2.3. <i>Pretratamiento de Muestra</i>	259
2.2.4. <i>Análisis</i>	260
2.2.5. <i>Evolución de los Parámetros Ambientales</i>	261
3. Análisis de los Disruptores Endocrinos Seleccionados	263
3.1. Determinación de la Concentración de Analito (Parcela 1).....	263
3.2. Cinéticas de Desaparición de los Compuestos en el Suelo (Parcela 1).....	268
3.3. Determinación de la Concentración de Analito (Parcela 2).....	281
3.4. Cinéticas de Desaparición de los Compuestos en Suelos Enmendados con Compost (Parcela 2)	287
4. Comparación del Comportamiento de los Contaminantes en Suelo y en Suelo Enmendado con Compost	297

CAPÍTULO VII. APLICACIÓN EN CAMPO. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	301
1. Ensayos Microbiológicos	303
1.1. Recuento de la Microbiota a Diferentes Profundidades en Suelo Agrícola y en Suelo Enmendado con Compost, en Presencia de Diferentes Compuestos en las Parcelas Experimentales	303
1.1.1. <i>Metodología: Descripción del Ensayo. Tratamiento de Campo</i>	303
2. Estudios de la Temperatura y Humedad Relativa	305
3. Tratamiento de las Muestras Procedentes de las Parcelas para el Ensayo Microbiológico	307
3.1. Resultados de Recuento de la Microbiota a Diferentes Profundidades de Suelos Tratados con los Analitos	308
3.1.1. <i>Muestras de Suelo Tratado con Metilparabeno</i>	308
3.1.2. <i>Muestras de Suelo Tratado con Butilparabeno</i>	310
3.1.3. <i>Muestras de Suelo Tratado con Bezofenona 3</i>	312
3.1.4. <i>Muestras de Suelo Tratado con Bisfenol A</i>	314
3.1.5. <i>Muestras de Suelo Tratado con Triclosán</i>	317
3.1.6. <i>Muestras de Suelo Tratado con Triclocarbán</i>	319
3.2. Recuento de la Microbiota a Diferentes Profundidades en Suelos Tratados con Compost y con Diferentes Analitos	321
3.2.1. <i>Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Metilparabeno</i>	321

3.2.2. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Butilparabeno	323
3.2.3 Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Benzofenona 3	325
3.2.4. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Bisfenol A	327
3.2.5. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Triclosán.....	329
3.2.6. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Triclocarbán	321
4. Caracterización Morfológica de los Microorganismos Aislados y Seleccionados a Partir de las Diferentes Parcelas Estudiada.....	334
4.1. Introducción	334
4.2. Resultados	335
5. Caracterización Bioquímica de los Microorganismos.....	338
5.1. API 50 CH. Utilización de Carbohidratos como Fuente de C/E	338
5.1.1. Microorganismos Seleccionados.....	341
5.1.2. Preparación de las Galerías API 50 CH.....	341
5.1.3. Inoculación de las Galerías API 50 CH	341
5.1.4. Resultados.....	342
5.2. API ZYM: Determinación de Actividades Enzimáticas.....	358
5.2.1. Microorganismos Seleccionados.....	363
5.2.2. Preparación de las Galerías API ZYM	364
5.2.3. Inoculación de las Galerías	364
5.2.4. Lectura de los Resultados	364
5.2.5. Resultados.....	366
5.2.6. Conclusión	372

6. Cinéticas de Crecimiento de Microorganismos Procedentes de las Parcelas Experimentales en Presencia de Diferentes Compuestos. Estudio de Degradación	373
6.1. Metodología	373
6.2. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Metilparabeno como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto	375
6.2.1. <i>Cinéticas de Crecimiento Microbiano</i>	375
6.2.2. <i>Degradación de MPB en Presencia de Diferentes Microorganismos</i>	382
6.3. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Butilparabeno como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto	383
6.3.1. <i>Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Butilparabeno</i>	383
6.3.2. <i>Degradación de BPB en Presencia de Diferentes Microorganismos</i>	391
6.4. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Benzofenona 3 como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto	392
6.4.1. <i>Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Benzofenona 3</i>	392
6.4.2. <i>Degradación de BP-3 en Presencia de Diferentes Microorganismos</i>	400
6.5. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Bisfenol A como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto	401
6.5.1. <i>Cinéticas de Crecimiento Microbianas en Presencia de Bisfenol A</i>	401
6.5.2. <i>Degradación de BFA en Presencia de Diferentes Microorganismos</i>	409

6.6. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Triclocarbán como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto .	410
6.6.1. <i>Cinéticas de Crecimiento Microbianas en Presencia de Triclocarbán</i>	410
6.6.2. <i>Degradación de TCB en Presencia de Diferentes Microorganismos</i>	416
7. Discusión	418
7.1. Recuento de la Microbiota Presente a Diferentes Profundidades de Suelos y Suelos Enmendados con Compost, Tratados con Diferentes Compuestos en las Parcelas Experimentales	419
7.2. Degradación de los Compuestos Utilizando Microorganismos Aislados de las Parcelas Experimentales	424
CONCLUSIONES	427
PUBLICACIÓN	433

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

a	Ordenada en el origen
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMC	Ácido meclofenámico
ANOVA	Análisis de varianza
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API 50 CH	Sistema estandarizado del metabolismo de hidratos de carbono
API ZYM	Sistema de detección de actividades enzimáticas
ARN	Ácido ribonucleico
ASE	Extracción acelerada con disolventes
b	Pendiente de la función de calibrado
BBD	Diseño Box-Behnken
BFA	Bisfenol A
BFA-d ₁₆	Bisfenol A-d ₁₆
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
BP-1	Benzofenona 1
BP-2	Benzofenona 2
BP-3	Benzofenona 3
BP-6	Benzofenona 6
BP-8	Benzofenona 8
BPB	Butilparabeno
BP-d ₁₀	Benzofenona-d ₁₀
BPs	Benzofenonas
C ₀	Concentración inicial
CAS	Número de registro para compuestos químicos
CCD	Diseño compuesto central
CE	Energía de colisión
CE	Comunidad Europea (antigua CEE)
CEE	Comunidad Económica Europea
CID	Disociación inducida por colisión
CREDO	Investigación sobre las alteraciones endocrinas
CV	Voltaje del cono
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
DM	Matriz Doehlert
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva

EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDCs	Disruptores Endocrinos Químicos
EEUU	Estados Unidos
EPB	Etilparabeno
EPB- ¹³ C ₆	Etilparabeno- ¹³ C ₆
ESI	Ionización por electrospray
EU	Unión Europea
F _{cal}	El valor de F de Snedecor calculado
F _{tab}	El valor de F de Snedecor tabulado
g	Gramos
GBC	Carbón negro grafitizado (Carbón activado)
ISO	Organización Internacional de Normalización
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LC	Cromatografía líquida
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
M.O.	Materia Orgánica
m/z	Relación masa/carga
MAE	Extracción asistida con microondas
MBR	Biorreactores de membrana
MeOH	Metanol
min.	Minutos
mL	Mililitros
MPB	Metilparabeno
MRM	Monitorización de múltiples reacciones por compuesto
MS	Detector de espectrometría de masas
MS ⁿ	Espectrometría de Masas multietapa
n	Grados de libertad
OCIs	Plaguicidas organoclorados
4-OHBP	4-hidroxibenzofenona
P1	Parcela 1
P2	Parcela 2
PBCs	Bifenilos policlorados
PBs	Parabenos
PCDDs	Dibenzodioxinas policloradas

Ph-PB	Fenilparabeno
PLE	Extracción presurizada con disolventes
PPB	Propilparabeno
PSA	Amina primaria/secundaria
Q1	Primer cuadrupolo
q2	Celda de colisión
Q3	Tercer cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro
r.p.m.	Rotaciones por minutos
R ²	Coefficiente de determinación de la función del calibrado
RSD	Desviación estándar relativa
%R	Porcentaje de recuperación
S _a	Desviación estándar de la ordenada en el origen
S _{analítica}	Sensibilidad analítica
S _b	Desviación estándar de la pendiente
SLE	Extracción sólido-líquido
S _{y/x}	Desviación estándar de la regresión
t _{1/2}	Tiempo de vida media
t _{cal}	El valor de t de Student tabulado
TCB	Triclocarbán
TCS	Triclosán
TSA	Agar Trypticosa Soja
TSB	Caldo Trypticosa Soja
TSS	Total de sólidos en suspensión
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficacia
USE	Extracción asistida por ultrasonidos
UV	Ultravioleta
Vis.	Visible

OBJETO DE LA TESIS

Una de las mejores alternativas, desde un punto de vista ambiental, para la eliminación de los lodos de desecho de EDAR urbanas es el reciclado a través de su uso en agricultura en el enmendado de suelos como abono, bien de forma directa (después de un tratamiento simple) o tras ser sometidos a un proceso adecuado de compostaje. Sin embargo estos lodos, pueden representar una de las principales rutas por la que numerosos contaminantes orgánicos potencialmente peligrosos reingresan al medio ambiente.

En este sentido, existen numerosos aspectos que requieren especial atención para que puedan ser aplicados con suficiente garantía. En primer lugar, es necesario conocer con exactitud la magnitud de su contaminación química, por la posible presencia de numerosas sustancias químicas de origen antropogénico, así como la variabilidad espacial y temporal de su distribución. En segundo lugar, se desconocen las condiciones de operación óptimas para su eliminación total durante los procesos de compostaje y su evolución en los suelos agrícolas una vez enmendados con dicho material. En tercer lugar, se desconocen los diferentes mecanismos a través de los cuales pueden ser eliminados definitivamente, y las rutas posibles de reingreso y/o permanencia en el medio ambiente, y mucho menos los factores que pueden promover y/o estimular los procesos biológicos a nivel del suelo, que son los que al fin y al cabo pueden asegurar la eliminación definitiva de estas sustancias.

Este campo de investigación es de suma trascendencia económica, social y ambiental y la profundización en su estudio constituye el objeto de esta Tesis Doctoral, pues por una parte, el conocimiento y control de la calidad y evolución del compost en relación a los posibles contaminantes emergentes que puede incorporar, facilitará su uso como enmendante de suelos en agricultura, y por otra, en un futuro cercano permitirá el

desarrollo de una legislación con una base científica apropiada, hasta ahora inexistente, para la salvaguarda del medioambiente.

Los contaminantes emergentes objeto de esta Tesis Doctoral se han seleccionado de acuerdo a su presencia, puesta de manifiesto en ensayos previos realizados con lodos de EDAR procedentes de diferentes ciudades de nuestro país y distintas muestras de compost comercial, también procedente de EDAR urbanas. Así entre los contaminantes seleccionados se incluyen disruptores endocrinos de tres familias diferentes (bisfenol A, benzofenonas y parabenos) y antimicrobianos (TCS y TCB). Los métodos propuestos, una vez validados, han sido aplicados al estudio de la evolución de los contaminantes durante los procesos de compostaje y posterior enmendado de suelos agrícolas. Además, se ha realizado un estudio del comportamiento de la microbiota en los suelos tratados. También se estudia la capacidad degradativa de algunos microorganismos aislados de los mismos suelos enmendados. La investigación realizada ha permitido proponer una metodología de trabajo para el control medioambiental de los contaminantes orgánicos en el enmendado de suelos agrícolas.

El objetivo principal de la Tesis Doctoral es por tanto, el estudio del comportamiento y evolución de contaminantes orgánicos en suelos agrícolas enmendados y no enmendados con compost procedente de lodos de depuradoras urbanas. Para ello se ha desarrollado y validado previamente metodología analítica de calidad que ha permitido la identificación y determinación de los contaminantes seleccionados en las distintas matrices medioambientales de interés, como lodo de depuradora, compost obtenido a partir de dicho lodo y suelo agrícola y así poder establecer posteriormente su comportamiento tanto químico como microbiológico.

Para la consecución de este objetivo central se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollo y validación de metodología analítica de buenas características para la detección y cuantificación de los compuestos de objeto de estudio: parabenos, benzofenonas, bisfenol A, triclosán y triclocarbán, en lodo de EDAR, lodo de EDAR compostado y suelo agrícola. La técnica seleccionada ha sido la cromatografía de líquidos con detector de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS (QqQ)).
2. Caracterización fisicoquímica de las matrices involucradas en el estudio de campo: suelo agrícola, compost y agua de pozo.
3. Estudio de lixiviación/degradación de los contaminantes en suelo agrícola enmendado con compost, procedente de una parcela agrícola experimental, situada en la Vega de Granada.
4. Estudio del comportamiento de la microbiota de los suelos durante los ensayos de lixiviación con los contaminantes anteriormente seleccionados.

INTRODUCCIÓN

1. Contaminación del Agua

1.1. El Agua

“No hay vida sin agua. Es un tesoro indispensable para toda actividad humana”
(Artículo 1. Carta Europea del Agua, 1968)

El agua es el compuesto químico más importante para la existencia de la vida en nuestro planeta. Más del 70 % de la superficie terrestre está compuesta por la hidrosfera de cuya existencia ha dependido y depende la vida, así como la morfología de nuestro planeta. El agua es el medio biológico en que se desarrolla la vida, alojando en su seno una gran variedad de ecosistemas, capaz de sustentar múltiples especies.



Figura 1. El agua en la naturaleza

El agua, además, interviene en una de las reacciones químicas más importantes que tiene lugar en la superficie terrestre, la fotosíntesis. Por otro lado, el agua es un compuesto químico imprescindible en cualquier

actividad antropogénica, siendo, además versátil, lo que la convierte en uno de los recursos esenciales de la naturaleza. De hecho, es el recurso natural más abundante del planeta y determina las condiciones socio-económicas en las que se desarrolla la vida de los pueblos. Se estima que el volumen de agua en el mundo es aproximadamente de 1.385 millones de km³, de ella el 97.3 % es agua de mares y océanos, el 2.7 % restante es agua dulce y de ésta, el 2.04 % esta almacenada en forma de hielo en los casquetes polares y en los glaciares; es de destacar que una cantidad no superior al 0.7 % del agua total que existe en la tierra, representa el porcentaje de agua directamente aprovechable por el hombre, y corresponde al agua superficial y subterránea¹.

Este bajo porcentaje de agua dulce nos indica que es un bien escaso que, por desgracia, se contamina con extraordinaria facilidad, ya sea por causas naturales o debido a actividades antropogénicas y dada su gran capacidad disolvente, es capaz de disolver y transportar una gran cantidad de sustancias.

Afortunadamente, el agua se mueve de unas zonas naturales a otras mediante un ciclo natural, conocido con el nombre de Ciclo Hídrico o Ciclo del Agua, asegurando el continuo abastecimiento de agua y convirtiéndola en un recurso renovable.

El agua en la naturaleza no es pura, ya que, en su recorrido a través del Ciclo Hídrico, adquiere una determinada riqueza en sales minerales. En su desplazamiento por los diferentes ecosistemas, además de modificar su composición en compuestos inorgánicos, se va enriqueciendo en compuestos volátiles, orgánicos, materia orgánica y microorganismos. El

¹ Orozco Barrenetxea, C., Pérez Serrano, A., González Delgado, M.N., Rodríguez Vida F.J., Alfayate Blanco J.M. Contaminación Ambiental. *Una Visión Desde la Química*, Thomson, Madrid (2002).

agua natural, por lo tanto, llevará una gran cantidad de especies químicas en disolución, así como, en suspensión o en estado coloidal. Algunas especies químicas son necesarias para los seres vivos y otras, en cambio, no lo son, e incluso pueden ser tóxicas.

1.2. Contaminación de las Aguas

“Contaminar el agua es atentar contra la vida humana y de la de todos los seres vivos que de ella dependen” (Artículo 3. Carta Europea del Agua, 1968)

La contaminación del agua es definida por algunos organismos internacionales.

La Carta Europea del Agua, Consejo de Europa (1968), la define como *“Una modificación, generalmente provocada por el hombre, de la calidad del agua, haciendo impropia o peligrosa para el consumo humano, industria, agricultura, la pesca y las actividades recreativas, así como para los animales domésticos y la vida natural”*

Según la C.E.E. de las Naciones Unidas (1961), *“El agua está contaminada cuando se ve alterada en su composición o estado, directa o indirectamente, como consecuencia de la actividad humana, de tal modo que quede menos apta para uno o todos los usos a que se ve destinada, para los que sería apta en su calidad natural”*.

En ambas definiciones, merece la pena destacar que al hablar de la contaminación se hace referencia a una alteración la calidad o composición natural del agua, que se considera "contaminación" la provocada por actividades humanas y que la contaminación es función del uso o destino de la misma.



Figura 2. Contaminación de los recursos hídricos

La contaminación del agua pueden clasificarse de acuerdo a:

- **La naturaleza física, química o biológica.** Color, compuestos químicos disueltos, bionutrientes y microorganismos presentes.
- **El origen de los contaminantes.** Urbano, agrario o derivado de la industria química o farmacéutica.
- **Los efectos sobre los seres vivos y/o medioambiente.** Efectos tóxicos o bioacumulativos (cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, etc.), efectos de carácter ecológico y de carácter mixto tóxico-ecológico.

En la antigüedad, los únicos contaminantes considerados tóxicos y peligrosos del agua eran las bacterias y los virus que causaban enfermedades tales como el cólera. Hoy día, los tratamientos de las aguas han eliminado la transmisión de enfermedades. Sin embargo, en muchas zonas del planeta, el agua sigue contaminada y su consumo constituye la causa de enfermedades y epidemias.

Las causas de la contaminación son múltiples, si bien cabe destacar, entre otras, el elevado nivel tecnológico de los países industrializados y el desplazamiento de la población hacia zonas urbanas². El control de la contaminación del agua comenzó con la aprobación por el Congreso de los Estados Unidos de la enmienda de 1972 a la "*Federal Water Pollution Control Act*", que estableció un sistema nacional de descarga y eliminación de contaminantes. Las enmiendas de 1977 y 1987, "*Clean Water Act*" y "*Water Quality Act*", completan la regulación norteamericana. La tendencia en Europa y, por tanto en España, es reducir el vertido con tratamientos de aguas residuales y emplear sistemas avanzados de tratamiento de aguas "in situ".

Entre las principales sustancias contaminantes, y cuya emisión está limitada, de acuerdo a la citada ley 16/2002, se encuentran:

- Compuestos órgano-halogenados o sustancias que los generen en el medio acuático.
- Sustancias cancerígenas o mutagénicas que pueden afectar a la reproducción de organismos vivos en el medio acuático.
- Sustancias orgánicas tóxicas, persistentes y bioacumulables.
- Cianuros.
- Biocidas y productos fitosanitarios.
- Sustancias capaces de alterar el balance de oxígeno en el medio.

² Central Intelligence Agency. The World Factbook (2008).
<https://www.cia.gov/library/publications/the-word-facbook/index.html>

1.3. Contaminantes Emergentes. Presencia en las Aguas

“El agua no es inagotable. Es necesario conservarla, controlarla y, si es posible, aumentar su calidad” (Artículo 2. Carta Europea del Agua, 1968)

El crecimiento de la economía mundial y el desplazamiento de la población a las ciudades, ha creado nuevos hábitos de vida, que tienen como consecuencia la aparición de nuevos contaminantes, de los que se desconocen los efectos potenciales a medio o largo plazo, y sobre los que no existe regulación legal que determine las concentraciones máximas admisibles de los mismos en el medioambiente³⁻⁶. Estos contaminantes están presentes en las aguas desde hace décadas, pero es en la actualidad, cuando se han comenzado a reconocer como contaminantes peligrosos^{7,8}. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, permite determinar concentraciones de compuestos a nivel ultratrazas ($\mu\text{g-ng L}^{-1}$), en matrices complejas como son las medioambientales⁹⁻¹¹.

³ Cunningham, V.L., Buzby, M., Hutchinson T., Mastrocco F., Parke N., Roden, N. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 3456-3465.

⁴ Calamari, D. Assessment of persistence and bioaccumulating chemicals in the aquatic Environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37 (1995) 1-12.

⁵ Richardson, M.L., Bowron, J.M. The fate of pharmaceutical chemical in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37 (1985) 1-12.

⁶ Doughton, C.G., Ternes, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the Environment: Agents of subtle change. *Environmental Health Perspectives* 107 (1999) 907-938.

⁷ Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76 (2006) 122-159.

⁸ Jemba, P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environment* 63 (2006) 113-130.

⁹ Petrovic, M., Hernando, M.D., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A Review. *Journal of Chromatography A* 1067 (2005) 1-14.

¹⁰ Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386 (2006) 973-985.

¹¹ Temes, T., Joss, A. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: the micropollutant challenge for urban water management. *Water* 21 (2006) 121-148.

El desarrollo de nuevos métodos analíticos ha permitido detectar y cuantificar, en torno a 3.000 compuestos químicos, con actividad biológica, presentes en el medioambiente¹². El análisis de estos contaminantes en diferentes compartimentos medioambientales, está permitiendo explicar su comportamiento y las rutas seguidas en el medio ambiente¹¹.

La presencia de contaminantes en las aguas puede ser debida a actividades humanas de higiene personal, residuos de la industria, residuos hospitalarios, lixiviados de vertederos, etc. Anualmente, se liberan al agua miles de toneladas de estos productos, estimándose en unos 6 millones el número de sustancias disponibles comercialmente y cuyo su uso se está incrementando en un 3-4 % en peso cada año¹³.

Por todo lo dicho, la nueva preocupación medioambiental y de salud pública ha sugerido a la comunidad científica, que se debe hacer gran esfuerzo para investigar este problema e intentar paliar en la medida de lo posible sus efectos^{6,14-16}. Una de las principales formas de combatir esta contaminación hídrica es la depuración de las aguas.

¹² Drewes, J.L., Heberer, T., Rauch, T., Reddersen, K. Fate of pharmaceuticals during ground water recharge. *Ground Water Monitoring and Remediation* 23 (2003) 64-72.

¹³ Kummerer, K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (2003) 5-7.

¹⁴ Khetan, S.K., Collins, T.J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chemical Reviews* 107 (2007) 2319-2364.

¹⁵ Kummerer, K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (2004) 311-320.

¹⁶ Bush, K. Antimicrobial agents. *Current Opinion in Chemical Biology* 1 (1997) 162-169.

2. Proceso de Depuración del Agua. Generación de Fangos y Compostaje

Cuando un producto de desecho se incorpora al agua, el líquido resultante recibe el nombre de agua residual. El problema se genera cuando estas aguas contaminadas son vertidas directamente a los cauces naturales de agua (ríos, lagos, etc.) sin ningún tratamiento previo, contaminándolos de una forma notable.

Es por tanto necesario introducir en el ciclo del agua procesos de depuración para que las sociedades continúen avanzando y mejorando, sin agotar los recursos naturales existentes; para ello se ha promulgado la *Teoría del Desarrollo Sostenible*, basada en la necesidad de reciclaje, reutilización, la búsqueda de energías alternativas, etc. Si a todo esto le sumamos la importancia del agua y la certeza de que los recursos de agua dulce no son inagotables nos damos cuenta de la importancia de la depuración del agua para poder conservar los recursos existentes y contribuir a que la sociedad siga creciendo económicamente a la vez que se aseguren los recursos para las generaciones futuras.

En la actualidad, son numerosas las Estaciones Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) distribuidas a lo largo del mundo para conseguir la depuración de las aguas contaminadas.

2.1. Descripción de una Estación Depuradora de Aguas Residuales

Una EDAR tiene dos líneas principales de trabajo; la línea de agua, donde se realiza el tratamiento de depuración de las aguas residuales y una línea de fangos donde se tratan los lodos de desecho, para convertirlos en

materia prima para la producción de fertilizantes para suelos agrícolas, combustible u otros productos con valor añadido¹⁷. Algunas depuradoras también tienen una línea de gas, donde se produce biogás que sirve como fuente de energía para procesos que ocurren en la EDARs, logrando autoabastecerse y conseguir un ahorro energético.

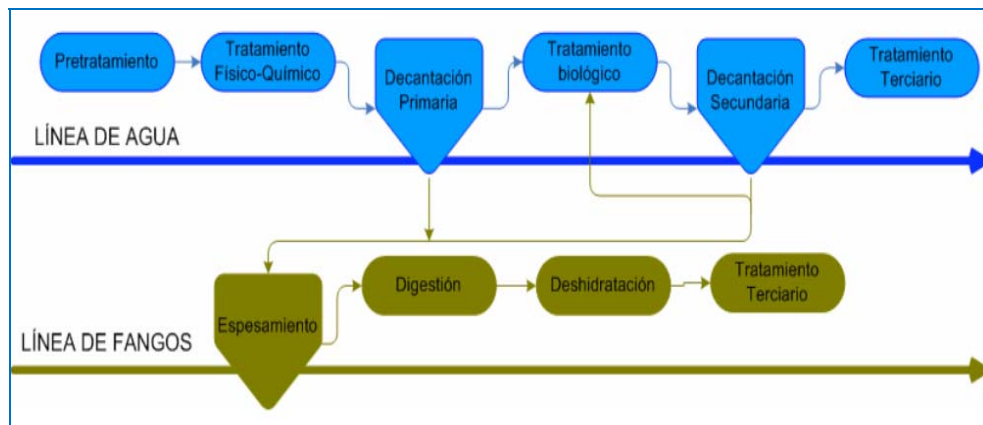


Figura 3. Esquema de las líneas principales de trabajo en las EDARs

Una EDAR puede estar equipada con etapas de tratamiento primario, secundario y terciario. El tratamiento primario o tratamiento físico, incluye la eliminación de objetos de gran tamaño, sólidos flotantes y sólidos en suspensión tanto finos como gruesos. Este tratamiento puede eliminar las grasas. El tratamiento secundario consiste en un proceso biológico que separa los efluentes de los fangos de desecho que contienen a los microorganismos y a los contaminantes residuales que fueron degradados durante el proceso. El tratamiento terciario elimina los contaminantes no degradados por el tratamiento secundario, especialmente compuestos de nitrógeno y fósforo, e incluye tratamientos físicos y/o químicos. Durante

¹⁷ Productos de valor añadido ("Value-added products", VAPs) incluyen a biopesticidas u otros agentes para control biológico, enzimas industriales, bioplásticos y otros biopolímeros, que se pueden utilizar fangos de desecho los cuales han recibido tratamiento adecuado.

este tratamiento se eliminan también microorganismos, tales como los patógenos y los virus, mediante procedimientos de desinfección¹⁸.

2.1.1. Tratamiento Primario

Se trata de un proceso mecánico automático llevado a cabo en dos etapas. Una primera de eliminación de contaminantes gruesos y una segunda de sedimentación.

En la primera etapa, se eliminan objetos grandes como latas, restos de frutas, ramas, hojas, etc. A continuación, se eliminan las arenas para evitar un daño posterior de la maquinaria que tratará el agua. Estos procesos transcurren por gravedad y aireación. Al final del tratamiento mecánico, muchas plantas cuentan con una etapa de sedimentación, donde el agua pasa a través de tanques grandes (llamados clarificadores primarios o decantadores primarios). La función de este tanque de sedimentación es eliminar las partículas en suspensión (entre el 40-60 %)¹⁹. Dado que en la composición de dichas partículas hay materia orgánica, su eliminación lleva asociada una reducción de la DBO (demanda bioquímica de oxígeno) de entrada en aproximadamente un 35 %. El flujo lento del agua permite que las partículas suspendidas sedimenten, y que los aceites y las grasas de la superficie también sean retirados.

En resumen, el objetivo del tratamiento primario es producir un líquido más homogéneo, que pueda ser tratado biológicamente, y un fango que también pueda ser tratado posteriormente. En algunos casos, el tratamiento primario incluye un tratamiento químico.

¹⁸ Spellman, F.R. Handbook of water and wastewater plant operations. *CRC Press, 2nd Ed., Boca Raton* (2009) 825-826.

¹⁹ Cheremisinoff, N.P. Handbook of water and wastewater technologies. *Butterworth-Heinemann, Boston* (2002) 645-654.

2.1.2. Tratamiento Secundario

Este tratamiento está diseñado para separar y degradar la materia orgánica remanente (azúcares, grasas, compuestos orgánicos de cadena corta, etc.) a través de procesos biológicos. Los microorganismos emplean los desechos orgánicos como fuente de carbono y energía, convirtiendo la mayor parte de la materia orgánica en compuestos estables de baja energía¹⁹. Los procesos biológicos aeróbicos suelen ser más eficientes que los anaeróbicos, y por tanto, son los más utilizados. Esta etapa de tratamiento biológico es básica para el éxito en la eliminación de microcontaminantes orgánicos en la EDAR.

Hay diferentes diseños para procesos biológicos aeróbicos como el de fangos activos, los biorreactores de membrana (MBR), y tratamiento de película fija o suspendida. El tratamiento más habitual, es el convencional de fangos activos. En este proceso se emplea un fango biológico rico en microorganismos, combinado con el suministro de aire u oxígeno para reducir el contenido de materia orgánica del desecho^{18,19}. Bajo condiciones ideales, se producen procesos de nitrificación, en los que el ion amonio es convertido a nitrato y posteriormente a nitrógeno gaseoso. Esto ocurre comúnmente en el tanque de aireación. Los microorganismos crecen y se reproducen usando la materia orgánica como fuente de carbono y energía, a la vez que la acción de la aireación facilita los procesos de agregación. Estos sólidos biológicos o fangos son muy sedimentables en el clarificador secundario donde son separados del agua residual tratada. Una fracción de fango es devuelta a la cabeza del sistema de aireación (del 40 % al 60 % del flujo de agua residual), mientras que el resto se convierte en desecho¹⁹. Este fango activo es eliminado del proceso para mantener el equilibrio entre biomasa producida y materia orgánica suministrada. El tratamiento secundario debe producir un efluente con no más de 30 mg L⁻¹ de DBO y 30 mg L⁻¹ de TSS¹⁸.

2.1.3. Tratamiento Terciario

El tratamiento terciario suele ser un proceso químico y constituye la etapa final del proceso que tiene por objeto incrementar la calidad del efluente, antes de que reingrese en el medio ambiente. En una planta de tratamiento se puede usar más de un tipo de tratamiento terciario, coagulación/floculación, carbón activo, cloración, ozonización, radiación UV, ósmosis inversa o pantanos artificiales (Wetlands), son ejemplos de estos procesos. Normalmente, también se lleva a cabo un tratamiento de filtración con arena al final del tratamiento terciario, con objeto de eliminar la materia suspendida. Estos tratamientos ayudan, además, a disminuir las descargas de contaminantes orgánicos, aunque esto repercute en un aumento del coste del proceso por el incremento en el consumo de energía y en las emisiones de CO₂.

2.1.4. Tratamiento de Fangos

Durante los procesos de decantación primaria (fangos primarios) y en el reactor biológico (fangos secundarios) se genera un material con un elevado contenido en agua (superior al 95 %). Es por tanto necesario un tratamiento que permita reducir su volumen y facilitar su manejo y posterior transporte. Este tratamiento consta de las varias etapas: 1) espesamiento, 2) estabilización, 3) acondicionamiento, y 4) desaguado²⁰.

2.2. Importancia de los Lodos de Depuradora como Residuo

En la Unión Europea la implantación de la Directiva 91/271/EEC de 1991 sobre el tratamiento de residuos urbanos por parte de los Estados

²⁰ McFarland, M. Biosolids Engineering. *McGraw Hill Professional Engineering, New York* (2001) 800-801.

Miembros, ha hecho incrementar la cantidad de lodos que se generan con la depuración de aguas residuales.

Son numerosos los destinos de estos lodos EDAR una vez terminado el proceso de depuración. Algunas EDARs envían los fangos a **tratamientos de compostaje**, donde el fango es tratado bajo condiciones aeróbicas para producir un compost con aproximadamente un 50 % de sólidos. Otras EDAR, someten el material obtenido a procesos de secado con calor, generando un material con un 95 % de sólidos que es usado como fertilizante o combustible. Por lo que se refiere a la utilización en agricultura, siete Estados Miembros (Bélgica, Dinamarca, España, Francia, Irlanda, Reino Unido y Hungría) señalan que el 50 % o más de los lodos que generan son aplicados sobre el suelo como biofertilizante. Este hecho ha abierto controversias en parte de la población por los posibles efectos no descritos sobre la salud humana o animal.

No es ninguna novedad que los lodos resultantes de la depuración de aguas residuales se hayan aplicado en agricultura. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el suelo es un enorme receptor de residuos orgánicos, que puede transformar o inmovilizar compuestos químicos, e incluso de transportarlos. El uso indiscriminado de lodos en agricultura puede llevar a la alteración de sus características, a la contaminación de las aguas subterráneas, de ciertos cultivos o de entrar en la cadena trófica.

La Tesis Doctoral que se presenta, se centra en la evaluación de las posibilidades de reutilización de lodos EDAR en el enmendado de suelos agrícolas, a través del estudio de la evolución química de diversos contaminantes desde su llegada a los lodos, su paso por los diferentes tratamientos que reciben antes de ser aplicados a los suelos, y las diferentes transformaciones que experimentan a partir de aquí.

2.3. Compostaje de Lodos de Depuradora

El proceso de compostaje consiste en la descomposición biológica de la materia orgánica bajo condiciones aeróbicas controladas para formar un producto final estable rico en nutrientes asimilables y, por lo tanto, de excelentes características para el enmendado de suelos agrícolas. El proceso es realizado por microorganismos, cuya dinámica poblacional varía de manera temporal y espacial y, generalmente, involucra el desarrollo de temperaturas termofílicas como resultado del calor producido.

El proceso (**figura 4**) se inicia con la ruptura mecánica de los materiales en partículas más pequeñas. Los residuos son mezclados con material de naturaleza vegetal (serrín, alpeorujo, restos de poda, etc.) que, además de mejorar el proceso, absorben el olor, ajustan la relación C/N, ayudan a mantener la humedad constante y a incrementar la porosidad y la aireación. A

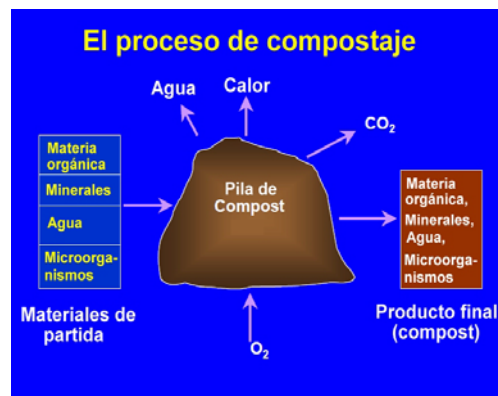


Figura 4. Esquema del proceso de compostaje

continuación, el material a compostar se coloca en pilas y cada cierto intervalo de tiempo es volteado para provocar un alto grado de mezcla y mantener así los niveles de O₂ y humedad. Las pilas son recubiertas por una lámina de GORETEX que facilita el intercambio de gases, y los minimiza olores. Durante el proceso, se inyecta aire para facilitar la biodegradación. Un proceso de compostaje bajo aireación consta de dos etapas:

- Durante la **primera etapa de desinfección (fase activa)**, se emplea una aireación vigorosa para estimular la acción de los microorganismos. Esta etapa la llevan a cabo microorganismos mesófilos que han

colonizado el material. La energía liberada durante el proceso de respiración microbiana, eleva la temperatura hasta valores en torno a los 70°C, lo que facilita el desarrollo de microorganismos termófilos y la disminución de los mesófilos. Esta fase termofílica es un requerimiento de la mayoría de los estándares de compostaje, ya que cumple uno de los objetivos principales del proceso, que es la destrucción de microorganismos patógenos y la producción de un material que no sea recolonizable por éstos. Esta etapa se caracteriza por un elevado consumo de oxígeno y la liberación de una gran cantidad de energía. Tras la etapa termofílica, se hace necesaria una fase de biodegradación secundaria a 45-55°C que derive en la biotransformación de los productos generados.

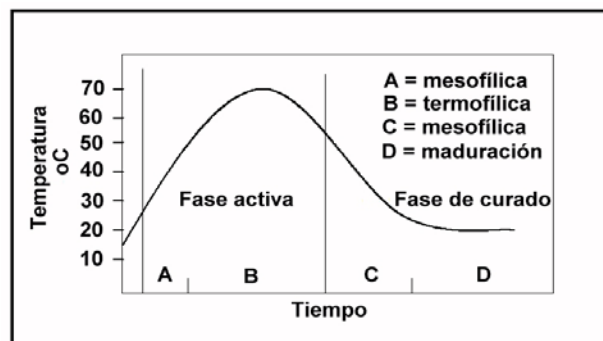


Figura 5. El proceso de compostaje.
Cambios en la temperatura (Rynk, 1992)

- La **segunda etapa (fase de curado)** es la maduración del compost. En ésta se produce la conversión de NH_4^+ en NO_3^- y la pérdida de compuestos volátiles fitotóxicos. Se estabiliza además la comunidad microbiana. En esta etapa, colonizan el compost bacterias, hongos y actinomicetos mesófilos, produciéndose la biodegradación y biotransformación de las sustancias húmicas y la lignina. Esta última etapa es vital si el compost va a ser empleado como fertilizante en suelos agrícolas, ya que mejora las características físico-químicas

del producto terminado. En esta fase, debido a la menor actividad microbiana desarrollada, no requiere demasiada aireación ni una gran frecuencia de volteo, pudiendo durar hasta un año.



Figura 6. Compost en fase de maduración (izquierda) y producto final (derecha)

La principal desventaja para el uso de lodos compostados es su alto contenido en metales pesados y contaminantes orgánicos procedentes principalmente de la actividad industrial; no obstante, actualmente son reducidos e incluso eliminados mediante diversos tratamientos.^{21,22}

En relación a los contaminantes orgánicos, a lo largo de los años se ha desarrollado una extensa investigación enfocada principalmente a los grupos de contaminantes prioritarios y persistentes (COPs) regulados por la legislación, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), dioxinas, pesticidas, bifenilos policlorados (PBCs), di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), nonilfenol, nonilfenol etoxilados y dibenzodioxinas policloradas (PCDDs). Se han reducido los niveles permitidos en los lodos de forma notable en la mayoría de los países industrializados.

²¹ US EPA, Federal Register 64 (1999) 72045-72062

²² Kinney, C. A., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Burkhardt, M. R., Werner, S. L., Cahill, J. D., Jorgensen, G. R. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7207-7215.

En los últimos años se ha generado una nueva preocupación en relación a un grupo más extenso de compuestos orgánicos, los llamados **“contaminantes emergentes”**, de los que se conoce muy poco sobre su persistencia, evolución en aguas y en suelos agrícolas, su comportamiento durante los procesos de depurado de aguas residuales, mecanismos de degradación, transferencia a la cadena trófica, y efectos adversos sobre los ecosistemas y la salud humana. Esta evidencia justifica el temor de algunos países, con respecto al reciclado de los lodos de desecho en agricultura, especialmente a nivel de la industria alimentaria. El control de estas sustancias se ha ido desarrollando a medida que avanza el conocimiento científico sobre ellas. En la actualidad, la Comisión Europea continúa promoviendo programas de vigilancia y regulación²³.

A pesar del apoyo internacional para el reciclado de lodos y su uso en suelos agrícolas, la aceptación de esta práctica en diferentes naciones europeas ha creado un gran recelo, de tal modo que países como Suiza han rehusado aceptar estas prácticas en base a que la UE sólo regula un determinado grupo de contaminantes orgánicos cuya toxicidad y peligrosidad viene siendo demostrada desde hace años.

Por otro lado, en relación a los compuestos orgánicos legislados, debido a la falta de evidencia científica concluyente, sobre todo a nivel ecotoxicológico y de la transferencia a la cadena alimenticia, no existe un acuerdo claro entre países en relación a los límites permitidos en los lodos, de tal modo que la Comisión Europea plantea diferentes opiniones sobre qué compuestos deben ser regulados y qué valores límite deben legislarse en las Directivas²⁴.

²³ European Commission. *Working document sludge and biowaste* (2010) 1-8.

²⁴ Kinney, C.A., Furlong, E., Zaugg, S., Burkhardt, M., Werner, S., Cahill, S., Jorgensen, G. *Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land Application. Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7207-7215.

Esta problemática muestra la necesidad de investigación científica, a nivel químico, biológico, microbiológico, toxicológico y ecológico, con objeto de completar la información ya existente en relación a los contaminantes orgánicos regulados, incluyendo los “contaminantes emergentes”. En la actualidad hay 50 millones de sustancias químicas descritas, de las cuales 143.000 están registradas en la “European Chemicals Agency” para su uso industrial²⁵. Se deben identificar los compuestos prioritarios en función de las consecuencias potenciales sobre los ecosistemas, para así establecer sus implicaciones ambientales.

En esta Tesis Doctoral se han seleccionado para su estudio desde un punto de vista químico analítico, una serie de compuestos orgánicos que presentan actividad como disruptores endocrinos y que habitualmente se encuentran en las aguas residuales, en los lodos de depuradora y en los compost derivados de estos.

²⁵ Toussant, M. *Chemical and Engineering News* 87 (2009) 3-5.

3. Presencia de Contaminantes Orgánicos en el Suelo

3.1. El Suelo

El suelo es un importante recurso natural que hay que preservar y, si es posible, incrementar en su calidad. Se trata de una entidad natural, dinámica y viva que juega un papel fundamental en la reserva de agua para plantas y microorganismos, y en la purificación de la misma a través de la percolación del agua a su través. La calidad del suelo es definida como la capacidad de funcionar en un ecosistema manteniendo la productividad biológica, la calidad ambiental y promoviendo la salud de plantas, animales y humanos. El suelo tiende a mantener un equilibrio que se desarrolla naturalmente, sin embargo, este equilibrio puede alterarse fácilmente, especialmente por la intervención humana.

El suelo actúa como una barrera protectora de las aguas subterráneas impidiendo la llegada de contaminantes a las mismas. Esto da una idea de la estrecha relación que existe entre suelo y agua, de tal manera que al afectarse uno se afecta el otro.

Se podría definir contaminación de un suelo, desde el punto de vista ecológico, como la presencia de sustancias en cantidad suficiente y con ciertas características para poder causar efectos indeseables en el ser humano, la vegetación, los animales, etc. Muchas de las actividades en las que se sustenta el desarrollo en una sociedad llevan implícita liberación de contaminantes al suelo; actividades industriales, explotaciones mineras, agricultura y vertidos de residuos son algunas de las más importantes. Debido a la capacidad degradativa y amortiguadora del suelo en un principio se daba por hecho que el medio ambiente se encargaba de

eliminar estos compuestos; por ello, durante mucho tiempo, no se ha prestado suficiente atención al destino de los residuos generados.

La recuperación de suelos afectados por presencia de contaminantes requiere un conocimiento profundo de las características del mismo y de los contaminantes presentes, con el objetivo final de seleccionar las técnicas de recuperación más adecuadas^{26,27}.

3.2. Dinámica de los Contaminantes Orgánicos en el Suelo

La presencia de contaminantes orgánicos en el suelo puede tener diferentes orígenes. Una vez en el suelo, estas sustancias se ven afectadas por distintos procesos que determinan su dinámica y destino final. Estos procesos, que pueden ser de tipo físico, químico y biológico, se pueden dividir en dos grupos.

- A. Procesos de transferencia o transporte.** Los compuestos se desplazan de un lugar a otro dentro de un mismo medio sin experimentar cambio en su estructura y, por tanto, siguen siendo potencialmente contaminantes. Los principales son adsorción-desorción, volatilización, lixiviación, escurrimiento, absorción y difusión.
- B. Procesos de transformación.** El compuesto se transforma o degrada dando nuevos compuestos que pueden ser de igual, menor o mayor toxicidad. Los principales son la degradación química, biodegradación y fotodegradación.

²⁶ Tesis Doctoral - Adsorción, persistencia y movilidad de compuestos orgánicos polares contaminantes de suelo. Miguel Real Ojeda - Sevilla, Diciembre de 2009.

²⁷ Tesis Doctoral - Estudio del comportamiento del Hexaclorociclohexano en el sistema Suelo-Planta para su aplicación en Técnicas de Fitocorrección - Fdo. Roberto Calvelo Pereira Santiago de Compostela, Mayo 2008.

Tabla 1. Dinámica de los contaminantes orgánicos en el suelo

Proceso	
Transferencia o transporte	Adsorción-desorción
	Volatilización
	Lixiviación
	Escorrentía
	Absorción
	Difusión
	Transformación o degradación
Biodegradación	
Fotodegradación	

Estos procesos están relacionados entre sí, ocurriendo de forma simultánea y siendo el resultado la suma de todos ellos. El más relevante es la adsorción, la cual determina la concentración final de contaminante que queda en el suelo.

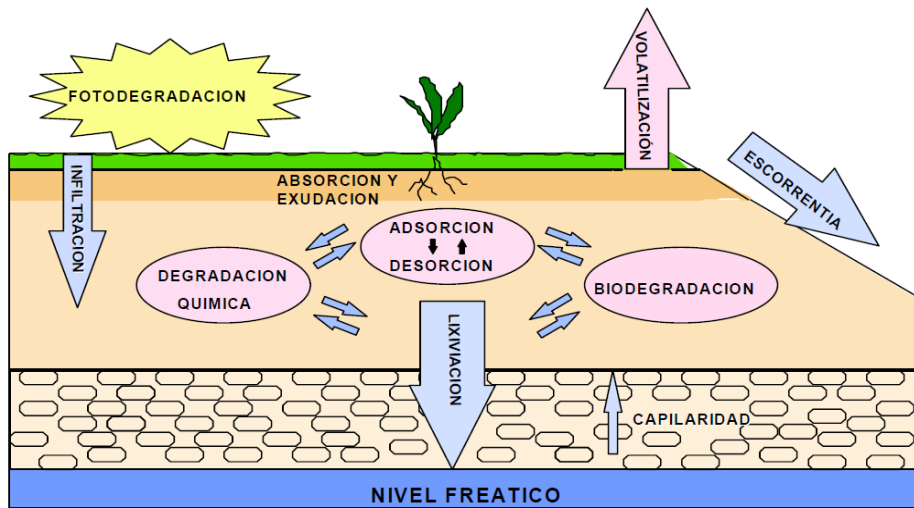


Figura 7. Interrelación entre los procesos que determinan la dinámica de los contaminantes orgánicos

3.2.1. Adsorción - Desorción

La adsorción se define como el paso de un compuesto desde la fase acuosa del suelo (o en casos de extrema aridez desde la fase gaseosa) a la superficie de las partículas sólidas sin producir cambios en la composición de éstas, siendo la desorción el proceso inverso. La desorción puede ser total, en cuyo caso se habla de adsorción reversible, o parcial, cuando una parte del adsorbato se une de manera irreversible. Se trata de procesos dinámicos que se dan continuamente de forma simultánea, siendo el resultado final la suma de ambos procesos²⁷. En el caso del suelo la adsorción se suele dar en la interface líquido-sólido, donde el adsorbente sería el propio suelo y las moléculas orgánicas actuarían de adsorbato. Las interacciones adsorbente-adsorbato pueden ser químicas y/o físicas siendo las más habituales las fuerzas de Van de Waals, el enlace de hidrógeno, la transferencia de carga, el enlace iónico, el cambio de ligando y las interacciones hidrofóbicas.

La adsorción es uno de los procesos más importantes de todos los que se pueden dar en el suelo ya que condiciona la cantidad de sustancia que queda libre y sobre la que van a actuar los demás procesos. Es un proceso clave que controla el transporte, la transformación química y los procesos biológicos.

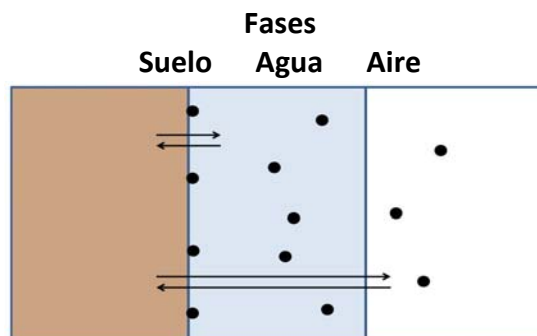


Figura 8. Dinámica de los compuestos entre las distintas fases del suelo

3.2.2. Lixiviación

Es el proceso de transporte a lo largo del perfil del suelo debido a la influencia del agua. Los principales factores que afectan a la lixiviación son la adsorción por los coloides del suelo, las características fisicoquímicas del contaminante y del suelo y la intensidad de agua de lluvia o riego²⁷.

3.2.3. Volatilización

Es el paso del compuesto al estado gaseoso. La difusión de los compuestos volátiles depende la presión de vapor de la sustancia o de su estructura química y de características propias del suelo como su porosidad, la humedad, el contenido de materia orgánica, la degradación biológica y química, la capacidad de adsorción del suelo, y de los flujos de agua a través del suelo²⁷.

3.2.4. Escorrentía

Se define como el desplazamiento del agua por la superficie debido a la fuerza de la gravedad. De acuerdo con la teoría de Horton, se produce cuando la precipitación o el riego superan la tasa de infiltración del suelo. Los factores principales implicados en el proceso son las características del suelo, del compuesto químico y las condiciones climáticas.

3.2.5. Difusión

Es el fenómeno por el cual un contaminante se desplaza de un punto a otro dentro de una misma fase. Según la ley de Fick, la densidad de corriente de partícula es proporcional al gradiente de concentración.

$$J = -D \frac{\delta n}{\delta x}$$

Siendo **J** el flujo de masas, **δn** el gradiente de concentración y **δx** la distancia de difusión. La constante de proporcionalidad **D** se denomina coeficiente de difusión y es característico tanto del soluto como del medio.

Los factores que afectan a la difusión son la solubilidad, la presión de vapor del contaminante, la temperatura, el contenido de humedad y la porosidad del suelo.

3.2.6. Adsorción por Plantas y Organismos

Muchas sustancias son absorbidas por plantas, insectos, nematodos, etc., pudiendo degradarse o quedarse asociados a residuos de plantas y organismos. Esta puede ser una vía natural de eliminar la contaminación.

3.2.7. Degradación

La degradación de un compuesto en el suelo, es la transformación que se produce en su estructura al interactuar con los componentes bióticos y abióticos presentes en el mismo, capaces de modificar en profundidad sus características físico-químicas y acción biológica. Este fenómeno da lugar a la aparición de nuevos compuestos que no necesariamente han de ser menos tóxicos que las sustancias originales. Cuando el producto de degradación es menos tóxico que la sustancia original se trata de una inactivación o detoxificación. Por el contrario, si el producto resulta más tóxico que la sustancia original, se produce una activación. Los productos de degradación suelen ser más polares y solubles en agua que los compuestos de partida y, por ello, suelen tener mayor capacidad para lixiviar y llegar a contaminar aguas subterráneas. La degradación puede ser

parcial o total, llegando en casos extremos a la generación de compuestos inorgánicos (mineralización) como agua, CO₂, haluros, amonio, fosfato, etc. Los procesos de degradación se dividen en tres tipos: fotodegradación, degradación química y degradación biológica.

- A. La **fotodegradación** se produce por efecto de la luz solar sobre el compuesto. Existen dos tipos de fotodegradación: la directa, donde la degradación del compuesto se produce tras la absorción de la luz por parte del compuesto, y la indirecta en la cual otra especie absorbe la luz e inicia reacciones de degradación del compuesto. En el suelo, este tipo de degradación es importante a nivel superficial, ya que los rayos ultravioleta no tienen capacidad para penetrar en profundidad.

- B. La **degradación química**, puede producirse por diferentes vías, entre las que destacan la hidrólisis e hidratación, la oxidación y reducción, la hidroxilación, la desalquilación y las rupturas de anillos. Puede ocurrir tanto en disolución como catalizada por la superficie de los coloides del suelo. Los factores más importantes de los que depende la degradación química son el pH, el potencial redox del suelo, la temperatura, la composición de la disolución y la composición de la fracción coloidal del suelo.

- C. La **degradación biológica**, se produce por la acción continua de los microorganismos sobre los compuestos orgánicos y es posiblemente el mecanismo de descomposición más importante en el suelo. Los microorganismos pueden transformar compuestos orgánicos en otros menos tóxicos y/o retenerlos en la matriz y, por tanto, reducir su biodisponibilidad²⁷.

4. Microbiología del Suelo

4.1. Microorganismos en el Suelo. El Ecosistema Edáfico

El ecosistema edáfico se caracteriza por presentar una gran riqueza microbiana, de manera que la misma definición de suelo queda incompleta si en ella no se considera la actividad de los microorganismos. Las bacterias son los organismos que mayor riqueza en biodiversidad presentan ya que incluyen un gran número de especies. Son numerosos los estudios sobre la microbiota del suelo, describiéndose la biodiversidad microbiana como necesaria para que un suelo funcione de manera óptima²⁸.

El suelo es generalmente un hábitat favorable para la proliferación de virus, bacterias, hongos, algas o protozoos. Típicamente en los hábitats del suelo se encuentran entre 10^8 a 10^{10} bacterias por gramo de suelo²⁹. El 70 % de la totalidad de bacterias aisladas de suelos son Gram positivas y corresponden al género *Arthrobacter*, siendo la mayoría de la microbiota restante especies de *Bacillus* y *Micrococcus*. Por otro lado, entre las bacterias Gram negativas se describen especies del género *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. Otros géneros también presentes son *Agrobacterium* y *Alcaligenes*. En la tabla se reflejan algunas de las bacterias más representativas de un suelo tipo.

²⁸ Stewart, W.D.E. The importance to sustainable agriculture of biodiversity among invertebrates and microorganisms. In: D L, Hawksworth (Ed). *The biodiversity of microorganism and invertebrates: Its role in sustainable agriculture*. Redwood Press, Melksham, U.K. (1991) 3-5.

²⁹ Atlas, R.M. and Bartha, R. Microbial ecology, fundamentals and applications. Ed. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park California (2001) 535-536.

Tabla 2. Composición de bacterias en el suelo³⁰

ESPECIE	ABUNDANCIA RELATIVA (%)
<i>Arthrobacter</i>	5-60
<i>Bacillus</i>	7-67
<i>Pseudomonas</i>	3-15
<i>Agrobacterium</i>	1-20
<i>Alcaligenes</i>	1-20
<i>Flavobacterium</i>	1-20
<i>Micrococcus</i>	2-12
<i>Staphylococcus</i>	2-10
<i>Xanthomonas</i>	<5
<i>Mycobacterium</i>	<5

En cualquier caso, la diversidad microbiana del suelo depende sobre todo de la capacidad para metabolizar las distintas fuentes de carbono, de la disponibilidad de macro y micro nutrientes, del contenido de agua, del pH y del tamaño de las partículas. La complejidad del ecosistema del suelo y las particularidades inherentes a los microorganismos, han propiciado una visión tradicional del mundo microbiano edáfico como si se tratara de una “caja negra”, de la cual se intuía una importante función ecológica, aunque sin precisar exactamente el perfil microbiológico responsable de este comportamiento. Es, por tanto, la gran biodiversidad microbiológica uno de los factores que va a definir las características del suelo.

Los microorganismos desempeñan funciones de gran relevancia en los procesos de edafogénesis, como son los ciclos bioquímicos de elementos tales como el carbono, el nitrógeno, el oxígeno, el hidrógeno, el azufre, el fósforo, el hierro y diferentes elementos metálicos; además, actúan en los procesos de degradación de compuestos xenobióticos, en la fertilidad del suelo y en la producción primaria del ecosistema.

³⁰ Nogales, B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistema*. N°2 (2005)11-16.

En la "Cumbre de la Tierra" celebrada en Rio de Janeiro en 1998 se presentaron diversas razones por las que se debe proteger la biodiversidad del suelo. La primera es el importante papel que desempeñan los microorganismos del suelo en el mantenimiento de los procesos biológicos y edáficos; estos procesos son una base esencial para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Otra razón es la utilidad que pueden presentar los microorganismos del suelo en biotecnología, por ejemplo, para mejorar la fijación del N₂ atmosférico, para su uso en la biorremediación de suelos contaminados, o en la producción de posibles compuestos farmacológicos. Es por ello que, actualmente, se le presta una atención especial a los microorganismos presentes en el suelo, como protagonistas biológicos en la conformación de los múltiples ecosistemas edáficos.

Los microorganismos del suelo no se distribuyen al azar, sino que siguen patrones especiales de agregación. Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos³¹. Se ha demostrado que la distribución espacial de las bacterias edáficas está muy estructurada, y que esta heterogeneidad desempeña un papel básico en la funcionalidad ecológica del suelo, condicionando la composición, la abundancia y la diversidad de las comunidades microbianas. Además, se ha observado que esta biodiversidad está asociada al tamaño de las partículas, aumentando al disminuir el tamaño de las mismas. Por otro lado, la biodiversidad microbiana también dependerá de las prácticas agrícolas, del tipo de plantas y de los tratamientos que se realicen en el suelo³²⁻³⁴.

³¹ Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44 (2003) 203-215.

³² Sessistsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H., Kandeler, E. Microbial population structure in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 4215-4224.

Por último y en relación a los métodos de determinación de las poblaciones bacterianas cultivables, tradicionalmente se han utilizado las técnicas de recuento en placa. Un método sencillo para la evaluación de la biodiversidad funcional de una comunidad microbiana se basa en la capacidad de utilización de diferentes sustratos como fuente de carbono y energía. El análisis del número de sustratos utilizables por una comunidad se ha utilizado en el estudio comparativo de comunidades de diferentes hábitat del suelo.

4.2. Contaminación del Suelo. Impacto sobre la Comunidad Microbiana

A pesar de haber sido considerado tradicionalmente como un recurso ilimitado y renovable, el suelo constituye un sistema evidentemente frágil y limitado. A los problemas de pérdida de suelo por erosión derivados de usos inadecuados y/o especulativos se les une la degradación paulatina del mismo por acumulación de sustancias contaminantes procedentes de la agricultura y de la industria. Actualmente, el suelo como ecosistema presenta elevadas tasas de degradación por acción humana, que contrastan con los ritmos extremadamente lentos de regeneración.

En el caso concreto de los suelos de labor, las prácticas agrícolas inadecuadas, el uso indiscriminado de fertilizantes, pesticidas y otros fitosanitarios, el abandono de terrenos y el mal manejo de los recursos vegetales inciden de forma negativa tanto sobre la cantidad como la calidad del recurso edáfico. En particular, la comunidad microbiana se

³³ Girvan, M.S., Bullimore, J., A.S., Pretty, J.N., Osborn, A.M. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 2692-2701.

³⁴ Buckley, D.H., and Schmidt, T.M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology* 5 (2003) 441-452.

afecta tanto en su composición y la densidad de sus poblaciones como en su biodiversidad y función.

La metodología empleada para evaluar el nivel de contaminación de un suelo, se ha basado tradicionalmente en la aplicación de diferentes análisis físico-químicos. Hoy en día, el uso de indicadores biológicos constituye una herramienta ventajosa y se basan en el estudio de la composición y riqueza de las comunidades biológicas o bien en la presencia y/o densidad una especie determinada³⁵.

En este sentido, la evaluación del efecto que producen los contaminantes del suelo en los microorganismos naturales presentes en él ha recibido una especial atención en los últimos años³⁶. En las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados predominan aquellas bacterias que pueden soportar la toxicidad presente en el ambiente, siendo capaces de utilizar el contaminante para crecer; en este sentido el contaminante induce una ruptura en el equilibrio ecológico del sistema y, como consecuencia, en todo su funcionamiento³⁷.

Se ha demostrado que las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de diferentes contaminantes tales como los derivados del petróleo. Estos microorganismos son capaces de modificar la estructura y composición de los contaminantes con objeto de poder sobrevivir y adaptarse a las nuevas condiciones nutricionales en detrimento de otras especies que son reprimidas. Por tanto, parece claro

³⁵ Duelli, P., Obrist, M. Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98 (1998) 87-98.

³⁶ Abbonazi, Cachada, A., Tiziana, C., Guerra., Raccagni, M., Lacondini, A. Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation comparison with microtox assay. *Chemosphere* 53 (2003) 889-897.

³⁷ Vann Beelen, P., Doelman, P. Significance and application of microbial toxicity test in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 4 (1997) 455-499.

que la composición de la comunidad microbiana y la diversidad de especies presentes en el suelo puede constituir un importante indicador de contaminación, y que cuanto más impactado se encuentre un suelo menor será su biodiversidad microbiana³⁸.

En los estudios de contaminación no basta con detectar la presencia de contaminantes, sino que además se han de definir los máximos niveles admisibles y los posibles factores que puedan influir en la respuesta del suelo frente a los agentes contaminantes, entre ellos la biodisponibilidad del contaminante y su carga crítica. La primera variable corresponde a la capacidad de asimilación del contaminante por los organismos y, en consecuencia, a la posibilidad de causar algún efecto. Por su parte, la carga crítica representa la cantidad máxima de un determinado compuesto que puede ser aportado a un suelo sin que se produzcan efectos nocivos.

En este sentido, el trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral, se ha centrado en el estudio de la posible influencia determinados contaminantes químicos (PBs, BPs, TCS, TCB y BFA) presentes en el medioambiente por efecto de la actividad del ser humano sobre la biodiversidad del suelo.

³⁸ Duarte, G., Soares, A., Seldin, L., Araujo, W., Van Elsas, J. Analyses of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soil and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (DZS) genes. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 1052-1062.

5. La Vega de Granada

5.1. Antecedentes Históricos

Hace miles de años, la Vega de Granada, era una densa zona boscosa, donde se practicaba la caza, y con extensas zonas de marjales inundadas. La mayor transformación física deriva de la aparición de la agricultura y la ganadería.

Durante la época musulmana se diseñó probablemente el actual sistema de regadío por acequias, que riegan casi toda la Vega de Granada y que derivan de los principales cursos de agua superficial. Son numerosos los estudios acerca de las obras hidráulicas de la época romana e incluso de la época prerromana.

Hasta la segunda mitad del siglo XX, no se produjeron cambios significativos en la explotación del acuífero. Estos cambios supusieron la creación de pozos de gran diámetro a lo largo del cauce del río Genil. En años posteriores se construyeron pozos en la parte baja de la Vega, de los que se conservan en la actualidad más de un millar. A partir de los años 60 la agricultura de la Vega de Granada sufrió un gran empuje, realizándose grandes sondeos, y profundizando en alguno de los ya existentes³⁹.

5.2. Características Físicas y Socioeconómicas de la Vega de Granada

El área de la Vega de Granada corresponde a una vasta llanura de aluvión que se extiende en ambas márgenes del río Genil, entre las

³⁹ Castillo, A. Estudio hidroquímico del acuífero de la Vega de Granada. *Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada. España* (1986) 658.

poblaciones de Cenes de la Vega, al Este, y de Láchar al Oeste. Los materiales que la forman son los depósitos de aluviales del río Genil y de sus afluentes de cabecera, los ríos Dílar, Monachil, Darro, Cubillas y Velillos³⁹. Sus dimensiones son de 22 km de longitud (en sentido este-oeste) por unos 8 km de anchura, con espesores superiores a 250 m en el sector central. El acuífero detrítico cuenta con unos recursos hídricos de 18.000 hm³ ha⁻¹ y unas reservas explotables de 1.000 hm³. La explotación neta no alcanza el 50 % de los recursos renovables y el excedente escapa del sistema a través de emergencias. La pluviometría y temperaturas medias anuales son de 450 mm y 15°C, respectivamente⁴⁰.

En la actualidad, se concentran en ella una treintena de poblaciones, incluida Granada capital, con una población estable de aproximadamente 500.000 habitantes, de los que alrededor de 40.000 dependen del abastecimiento de aguas subterráneas, y existe una intensa explotación agrícola que abarca una superficie de regadío de más de 15.000 ha. Los cultivos más extendidos corresponden a cereal, choperas, hortalizas, maíz y tabaco. Esta zona corresponde al 95 % de la superficie del acuífero, y en ella el espesor no saturado es inferior a 25 m.

5.3. Calidad de las Aguas Subterráneas en la Vega de Granada

Las aguas del acuífero proceden en más de un 70 % de la infiltración de escorrentías del deshielo de Sierra Nevada, hecho que condiciona que los sectores de mejor calidad se localicen en la cabecera del acuífero (área Sur-oriental) y bajo la cabecera del río Genil. Existen focos salinos puntuales y de contaminación por nitratos⁴¹, ésta última debido al empleo de

⁴⁰ Castillo, A. El embalse subterráneo de la Vega de Granada, uno de los más importantes de Andalucía. *Tierra y Tecnología* 9 (1995) 37-42.

⁴¹ Acuña, M.J. Contaminación por plaguicidas organoclorados en la Vega de Granada. *Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada. España* (1981) 380.

fertilizantes agrícolas. Las aguas más salinas se localizan en los sectores de Sierra Elvira-Alitaje, Romilla-Láchar y Maracena-Pulianas.

En cuanto a la contaminación de esta zona, la que más destaca se debe a la presencia de plaguicidas. En estudios realizados en la década de los 80 ya se describían contaminaciones por plaguicidas organoclorados (OCIs). En 1983, Agustín⁴² detectó importantes contaminaciones debido a esta familia de plaguicidas en las aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada. Los OCIs presentan una elevada persistencia y hoy en día su uso se halla muy restringido o, incluso, prohibido.

En un estudio realizado en aguas de la zona saturada del acuífero entre los años 1993 y 1994⁴³, sólo se encontraron 10 contaminaciones cercanas o superiores al nivel establecido por la Unión Europea ($0.1 \mu\text{g L}^{-1}$)⁴⁴, siendo la contaminación más importante por su extensión, la debida al captano. También se describieron contaminaciones puntuales y esporádicas por herbicidas como la triazina, durante los meses de verano. Por tanto, la ausencia de contaminaciones por estos plaguicidas, hace resaltar el poder de depuración de la franja no saturada.

Sin embargo hay que tener en cuenta que la contaminación del acuífero depende de factores externos, no controlables, como el aporte hídrico que recibe el acuífero y de la cantidad de riego que se aplique en las

⁴² Agustín C. Contaminación por plaguicidas en aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada. *Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada. España (1983) 378.*

⁴³ De la Colina C. Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas en aguas. *Aplicación al acuífero de la Vega de Granada. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada. España (1996) 303.*

⁴⁴ Steenhuis, T.S., Staubitz, W., Andreini, M.S., Surface, J., Richard, T.L., Paulsen, R., Pickering, N.B., Herman, J.R., Georhring, L.D. Preferential movement of pesticides and traces in agricultural soils. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering* 116 (1990) 50-66.

prácticas agrícolas. El riesgo de contaminación puede ser mayor en estos casos, por lo que los estudios de prevención son importantes para conservar la calidad de las aguas de este acuífero del que, como ya se ha mencionado, se abastece un número importante de habitantes. En el siguiente esquema, se indican los factores que pueden alterar el transporte de contaminante en el suelo, según Flury⁴⁵.

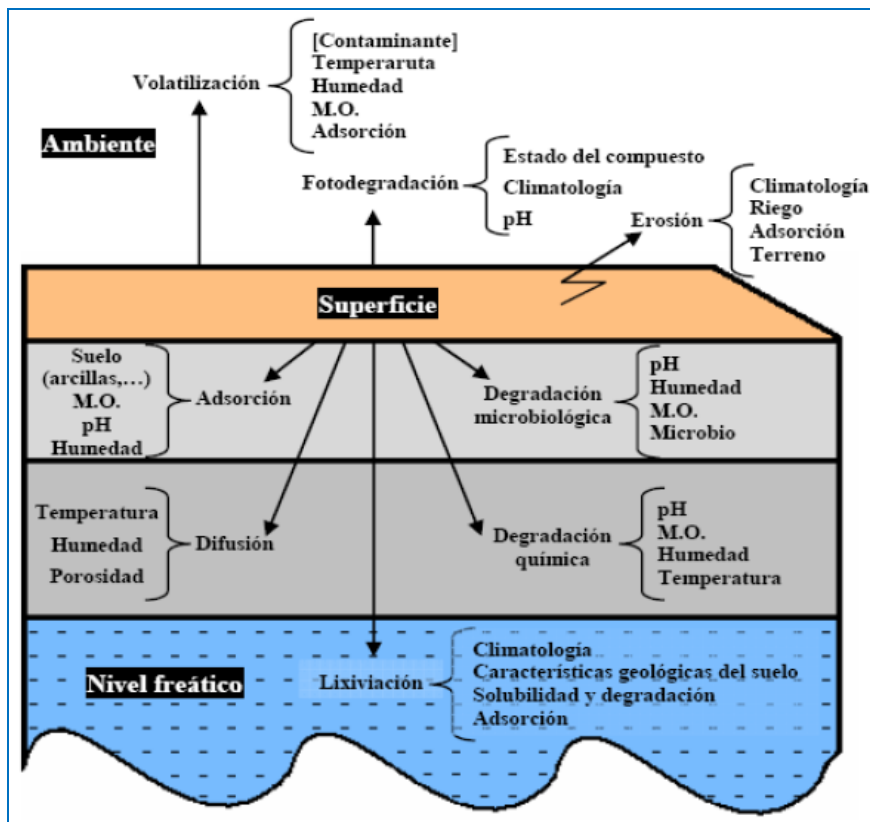


Figura 9. Procesos que afectan al transporte de contaminantes en el suelo

⁴⁵ Flury, M. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. A review. *Journal of Environmental Quality* 25 (1996) 25-45.

6. Contaminantes Estudiados. Disruptores Endocrinos

6.1. Generalidades

A partir de los años 80 se comenzó a evidenciar la aparición de una serie de efectos adversos sobre la salud de los organismos vivos, en relación a una serie de compuestos químicos. La atención se dirigió hacia lo que actualmente han sido definidos como disruptores endocrinos químicos (“Endocrine Disrupting Chemical”, EDCs).

Durante los años 80, Colborn describió los efectos negativos sobre la salud de los animales en los Grandes Lagos⁴⁶, llegando a la conclusión que se producían alteraciones en la tasa de reproducción, a nivel de tiroides, cambios de conducta y problemas en el metabolismo de estos animales. Se pudo determinar que estos efectos se encontraban relacionados con las alteraciones observadas en el sistema endocrino tanto en los individuos adultos como en su progenie.

La Organización Mundial de la Salud, en 1996, define disruptor endocrino como *“una sustancia exógena o mezcla que altera las funciones del sistema endocrino y causa en consecuencia efectos adversos sobre la salud, en un organismo intacto, o en su progenie, o en (sub)poblaciones”*. Durante este mismo año, se publicó el Informe Weybridge a partir de *“European Workshop: On the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife”*, concluyendo que era necesario conocer qué

⁴⁶ Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P. Our stolen future. *Penguin Books, New York* (1996) 335-336.

sustancias podían tener actividad y qué tipo de precauciones se debían tomar para reducir o eliminar la exposición a ellas⁴⁷.

Hasta ese momento, se desconocía que muchos de los compuestos químicos que usamos diariamente tenían potencial como disruptores endocrinos químicos. Por este motivo, en 1999, la Comisión del Consejo y el Parlamento Europeo acordaron profundizar en el conocimiento acerca de estos compuestos, creando, en 2001, el “*Research Cluster into Endocrine Disruption*” (CREDO). Posteriormente, la Comisión Europea publicó una lista de sustancias prioritarias para su posterior evaluación en relación a su papel como disruptores endocrinos (COM 1999)⁴⁸. Esta lista que contenía 553 sustancias fue concluida un año después. De todas estas sustancias, 66 ya habían sido probadas en organismos intactos, y 52 presentaban potencialidad como EDCs en ensayos in vitro^{49,50}.

La influencia de los EDCs sobre el sistema endocrino forma parte de un proceso complejo y por lo tanto la evaluación de EDCs potenciales no es sencilla. Una de las dificultades es que estos compuestos pueden utilizar diferentes rutas para provocar efectos adversos sobre el sistema endocrino. En conclusión, es difícil predecir la actividad estrogénica basándose solamente en la estructura química. Los EDCs pertenecen a una gran variedad de familias químicas y por tanto, poseen propiedades

⁴⁷ European Commission. European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. *Report Eur 17549, Environment and Climate Research Programme, DG XII. Weybridge* (1996) 1-125.

⁴⁸ COM. 706 final, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Community Strategy for Endocrine Disruptors. *A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife* (1999).

⁴⁹ COM. 262 final, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Community Strategy for Endocrine Disruptors. *A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Bruxelles* (2001) 1-55.

⁵⁰ BKH. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption - preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. *European Commission DG ENV, Delft* (2000) 26-29.

fisicoquímicas muy diferentes. Sin embargo, la estructura del anillo aromático, en la mayor parte de los casos, el anillo fenólico, parece ser una subestructura común de los compuestos con actividad estrogénica (con algunas excepciones: progesterona, sitosterol o mirex), aunque, la presencia de grupos fenólicos no implica necesariamente que la sustancia tenga propiedades estrogénicas⁵¹.

6.2. Efectos de los Disruptores Endocrinos Químicos en los Organismos

Uno de los primeros efectos observados de los EDCs, que causó alarma, fue el paulatino adelgazamiento de la cáscara del huevo de los peces. Se demostró que este efecto, observado en diferentes países, era causado por la presencia de los insecticidas DDT y DDE⁵². Posteriormente, se descubrieron otros efectos en todos los niveles taxonómicos de organismos tanto vertebrados (mamíferos, reptiles, anfibios y peces) como en invertebrados (moluscos, crustáceos, insectos y nematodos).

Según la literatura científica, los efectos de los EDCs sobre los organismos vivos son múltiples. Los más alarmantes están relacionados con el sistema reproductivo, ya que la reproducción, de la que depende la sobrevivencia de las especies, puede verse amenazada. Un ejemplo, es el desarrollo anómalo de los órganos reproductivos que conduce a la adquisición de características genéticas y fenotípicas masculinas y femeninas de manera simultánea y en grado variable. Este efecto se ha observado ya en peces gonocorísticos (especies con diferenciación sexual

⁵¹ Frang, H., Tong, W.D., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S, Xie, Q., Dial, S.L., Moland, C.L., Sheehan, D.M. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology* 14 (2001) 280-294.

⁵² King, K.A., Zaun, B.J., Schotborgh, H.M., Hurt, C. DDE-induced eggshell thinning in white-faced ibis: A continuing problem in the western United States. *Southwestern Naturalist* 48 (2003) 356-364.

genética)⁵³. También se ha observado la reducción del éxito reproductivo debido a problemas de desarrollo en las generaciones siguientes⁵⁴, cambios en la expresión de las características sexuales secundarias⁵⁵, o incluso problemas de comportamiento que conducen a la disminución en las actividades de cortejo. En lugares como el lago Apopka (Florida)⁵⁶, el Sur de California⁵⁷ y otras zonas del mundo⁵⁸, se han observado, anomalías en la “ratio” sexual y una importante disminución del nivel de testosterona de los machos.

En los seres humanos, existen numerosos indicios que ponen de manifiesto el carácter xenobiótico de los EDCs. Son muchos los efectos observados en diferentes áreas del planeta. Así, en Taiwán los elevados niveles de PCBs que ingirió la población a través de aceites contaminados, dio como resultado la aparición de desórdenes importantes en la descendencia de las madres expuestas a dichas sustancias⁵⁹.

⁵³ Liney, K.E., Jobling, S., Shears, J.A., Simpson, P., Tyler, C.R. Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives* 113 (2005) 1299-1307.

⁵⁴ Gray, M.A., Teather, K.L., Metcalfe, C.D. Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (1999) 2587-2594.

⁵⁵ Parrott, J.L., Wood, C.S., Boutot, P., Dunn, S. Changes in growth and secondary sex characteristics of fathead minnows exposed to bleached sulfite mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (2003) 2908-2915.

⁵⁶ Clark, D.R. Dicofol (Kelthane) as an environmental contaminant. *U.S. Fish and Wildlife Technical Report* (1990) 1-37.

⁵⁷ Fox G.A. Epidemiological and pathobiological evidence of contaminant-induced alterations in sexual development in free-living wildlife. Chemical-induced alterations in sexual and functional development. *The Wildlife/human connection* 23 (1992) 147-158.

⁵⁸ Jobling, J.P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 27 (1993) 361-372.

⁵⁹ Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hung, K.L., Shih, L.Y., Taylor, J.S., Wu, Y.C., Yang, D., Ragan, N.B., Hsu, C.C. Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants. *Science* 241 (1988) 334-336.

También se sospecha que muchas enfermedades son causadas por EDCs. Por ejemplo, se piensa que el cáncer de mama está relacionado con la exposición a EDCs clorados⁶⁰. Otro efecto que, en los últimos años se está relacionando con dicha exposición, es la llegada temprana de la menstruación⁶¹ y en los hombres, el aumento de la incidencia de desórdenes sexuales como la criptorquidia y baja calidad espermática^{62,63}.

Los EDCs no sólo afectan a los animales, las plantas también pueden sufrir sus efectos. Las leguminosas viven en simbiosis con una bacteria del suelo del género *Rhizobium*. La comunicación funciona vía fitoestrógenos⁶⁴, de forma que los EDCs pueden interferir en esta comunicación bacteria-planta afectando a la simbiosis. Este hecho ha sido probado en estudios que han evaluado la comunicación simbiótica entre la planta leguminosa alfalfa y la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, responsable de la fijación de nitrógeno, en presencia de BFA⁶⁵⁻⁶⁷.

⁶⁰ Muñoz-De-Toro, M., Durando, M., Beldomenico, P.M., Beldomenico, H.R., Kass, L., Garcia, S.R., Luque, E.H. Estrogenic microenvironment generated by organochlorine residues in adipose mammary tissue modulates biomarker expression in ER alpha-positive breast carcinomas. *Breast Cancer Research* 8 (2006) 1-9.

⁶¹ Ouyang, F., Perry, M.J., Venners, S.A, Chen, C., Wang, B., Yang, F., Fang, Z., Zang, T., Wang, L., Xu, X., Wang, X., Serum, D.D.T., age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. *Occupational and Environmental Medicine* 62 (2005) 878-884.

⁶² Bay, K., Asklund, C., Skakkebaek, N.E., Andersson, A.M. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 20 (2006) 77-90.

⁶³ Saradha, B., Mathur, P.P. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21 (2006) 34-41.

⁶⁴ Gyorgypal, Z., Kondorosi, A. Homology of the ligand-binding regions of Rhizobium symbiotic regulatory protein NodD and vertebrate nuclear receptors. *Molecular and General Genetics* 226 (1991) 337-340.

⁶⁵ Fox, J.E. Non-traditional targets of endocrine disrupting chemicals: *The roots of hormone signaling*. *Integrative and Comparative Biology* 45 (2005) 179-188.

⁶⁶ Fox, J.E. Chemical communication threatened by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 112 (2004) 648-653.

⁶⁷ Fox, J.E., Starcevic, M., Jones, P.E, Burow, M.E., McLachlan, J.A. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation is disrupted by endocrine disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 112 (2004) 272-677.

Además, la elevada persistencia de estos contaminantes puede incrementar el peligro de bioacumulación⁶⁸. Por ejemplo, se han encontrado en la biota niveles de filtros UV orgánicos, utilizados en dermatología para prevenir problemas en la piel, en cantidades comparables a los PCBs⁶⁹. Se ha determinado que algunos filtros como el octocrileno y el canfor 4-metilbenzilideno pueden acumularse en animales en cantidades en el rango de los mg kg⁻¹.

Pese a todas estas evidencias, las opiniones en relación a los efectos de los EDCs son contradictorias, algunos autores consideran que no hay evidencia de estos efectos sobre la salud de los seres vivos⁷⁰, y otros autores defienden que sí hay evidencia clara para establecer conexiones entre la exposición a estos compuestos y los efectos observados⁷¹.

6.3. Clasificación de los Disruptores Endocrinos Químicos

Aunque realizar una clasificación de los EDCs no es sencilla por tratarse de sustancias que no están definidas por una estructura o unas propiedades químicas comunes, sí se pueden distinguir diferentes grupos en función de sus efectos biológicos. En principio, en una primera clasificación se pueden dividir en dos grandes grupos, de acuerdo a su origen; naturales y antropogénicos o sintéticos. En la presente Memoria, se han estudiado los últimos.

⁶⁸ Paterson, G., Metcalfe, C.D. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74 (2008) 125-130.

⁶⁹ Diaz-Cruz, M.S., Llorca, M., Barceló, D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites, and disinfection by-products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 873-887.

⁷⁰ Mathiessen, P. Is Endocrine disruption a significant ecological issue? *Ecotoxicology* 9 (2000) 21-24.

⁷¹ Dickerson, S.M., Gore, A.C. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life-cycle. *Reviews in Endocrine and Metcalfe CD Disorders* 8 (2007) 143-159.

Los EDCs antropogénicos incluyen a fármacos y productos de cuidado personal, así como compuestos químicos industriales sintetizados con diversos fines, pero que accidentalmente tienen actividad disruptora del sistema endocrino⁷². Actualmente, se sospecha que alrededor de 38.000 sustancias químicas y algunos metales pesados presentan dicha actividad. Además, de acuerdo a la US-EPA, más de 80.000 compuestos químicos necesitan ser evaluados para descartar o confirmar esta actividad⁷³.

6.4. Mecanismos de Acción de los Disruptores Endocrinos Químicos

Las hormonas son un conjunto de moléculas que, junto con el sistema nervioso, coordinan diversas funciones en el organismo. Estos compuestos se producen en células u órganos endocrinos. Del conjunto de hormonas que rigen el funcionamiento de los organismos vivos, destacan tres por su importancia en el desarrollo sexual y reproductivo del individuo:

A. Las *hormonas tiroideas*.

B. Las *hormonas retinoideas*.

C. Las *hormonas esteroideas*.

Los EDCs son capaces de interactuar con los receptores hormonales perturbando la expresión genética. Al unirse al receptor, estimulan e inhiben la transcripción genética de forma similar a como lo hacen las hormonas naturales, o incluso pueden inactivar dicho proceso formando complejos receptor-ligando con conformaciones que anularían la

⁷² Anca Caliman, F., Gavrilescu, M. Pharmaceutical, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A Review. *Clean* 37 (2009) 277-303.

⁷³ Vogel, J.M. Tunnel vision: The regulation of endocrine disruptors. *Policy Sciences* 37 (2004) 277-303.

transcripción. Así pues, el impacto de los EDCs en el metabolismo es una gran importancia: genera interferencias en el transporte de proteínas, alteraciones en la síntesis y biotransformación de las hormonas y efectos tóxicos en gónadas, hipotálamo, pituitaria y glándulas endocrinas.

Un buen número de EDCs se caracterizan por enfocar su mecanismo de acción sobre las hormonas estrogénicas. Algunos compuestos imitan las hormonas esteroideas endógenas y otros actúan como antagonistas. La estrogénicidad medida por receptores clásicos o estrógenos endógenos ocurre cuando se unen al receptor estrogénico α o β , activándolo⁷⁴. Un antagonista clásico, por ejemplo, el fulvestrant, previene la activación por bloqueo del receptor al que se une el esteroide⁷⁵. Sin embargo, existen otras formas de actuación de los EDCs, las principales son:

- A. *Alteración de la biosíntesis de hormonas esteroideas endógenas*⁷⁶.
- B. *Interferencia con el anabolismo de las hormonas*^{77,78}.
- C. *Alteración de los receptores esteroideos de membrana*⁷⁹.
- D. *Alteración del receptor arilhidrocarburo (AhR) o su dupla (SHP)*^{80,81}.

⁷⁴ Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., Vom Saal, F.S. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environmental Health Perspectives* 111 (2003) 994-1006.

⁷⁵ Howell, A. Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13 (2006) 689-706.

⁷⁶ Sanderson, J.T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences* 94 (2006) 3-21.

⁷⁷ Zarn, J.A., Bruschweiler, B.J., Schlatter, J.R. Azole fungicides and aromatase. *Environmental Health Perspectives* 111 (2003) 225-261.

⁷⁸ Sanderson, J.T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences* 94 (2006) 3-12.

⁷⁹ Thomas, P. Rapid, nongenomic steroid actions initiated at the cell surface: lessons from studies with fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 28 (2003) 3-12.

6.5. Compuestos Seleccionados

6.5.1. Bisfenol A (BFA)

Es el disruptor endocrino que más preocupación causa en la actualidad a la comunidad científico-médica debido a que los efectos que produce son los más perniciosos. Es uno de los compuestos químicos más producidos a nivel mundial, utilizándose como materia prima en la industria del plástico. Se usa en la fabricación de las resinas epoxi y los plásticos policarbonato, empleados de forma extensa en la fabricación de pinturas y lacas, la industria del automóvil y aeronáutica, en sistemas eléctricos, en telecomunicaciones, en instalaciones de alumbrado, en conducciones de agua, en la fabricación de equipos ópticos, en fungicidas, retardantes de llama y colorantes, en el envasado de alimentos y aguas, en productos manufacturados como los biberones (recientemente prohibido en España) e incluso en materiales relacionados con la salud humana como prótesis, lentes intraoculares y dispositivos médicos. Su liberación al medio ambiente se produce durante el proceso de fabricación y por transferencia a partir de los productos finales^{82,83}.

En la **figura 10** se muestra su estructura química.

⁸⁰ Seol, W.G., Hanstein, B., Brown, M., Moore, D.D. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (Short heterodimer partner). *Molecular Endocrinology* 12 (1998) 1551-1557.

⁸¹ Navas, J.M., Segner, H. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PHAs in culture rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquatic Toxicology* 51 (2000) 79-92.

⁸² Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin B.S, Soto, A.M. Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews* 30(2009) 75-95.

⁸³ Kang, J., Kondo, F., Katayama, Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226 (2006) 79-89.

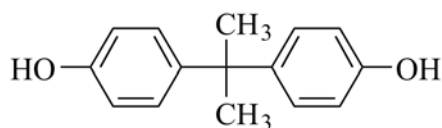


Figura 10. Estructura química del BFA

6.5.2. Parabenos (PBs)

Son los ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico. Se trata de sólidos relativamente solubles en agua e hidrolíticamente estables que presentan mayor carácter hidrofóbico al aumentar el tamaño de su cadena hidrocarbonada⁸⁴. Son activos frente a hongos y levaduras, y contra algunos microorganismos Gram (+) y Gram (-), provocando disrupción en los procesos de transporte de membrana, inhibición de la síntesis de ADN y ARN o uniéndose a sus enzimas. Dada su gran estabilidad, y baja adsorción sobre la superficie de los envoltorios, son muy usados como estabilizantes y conservantes en cosméticos y jabones, e incluso como antimicrobianos en alimentos⁸⁵. También se incorporan en fármacos, supositorios, anestésicos, colirios, píldoras, jarabes e inyectables en concentraciones inferiores al 1 %.

Los más empleados, y por tanto los estudiados en la presente Tesis Doctoral, son el p-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno), el p-hidroxibenzoato de etilo (etilparabeno), el p-hidroxibenzoato de propilo (propilparabeno), el p-hidroxibenzoato de butilo (butilparabeno) y el p-hidroxibenzoato de fenilo (fenilparabeno).

⁸⁴ Núñez, L., Tadeo, J.L., García-Valcárcel, A.I., Turiel, E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1214 (2008) 178-182.

⁸⁵ Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marce, R.M. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 752-764.

La **figura 11** muestra sus estructuras de los PBs seleccionados.

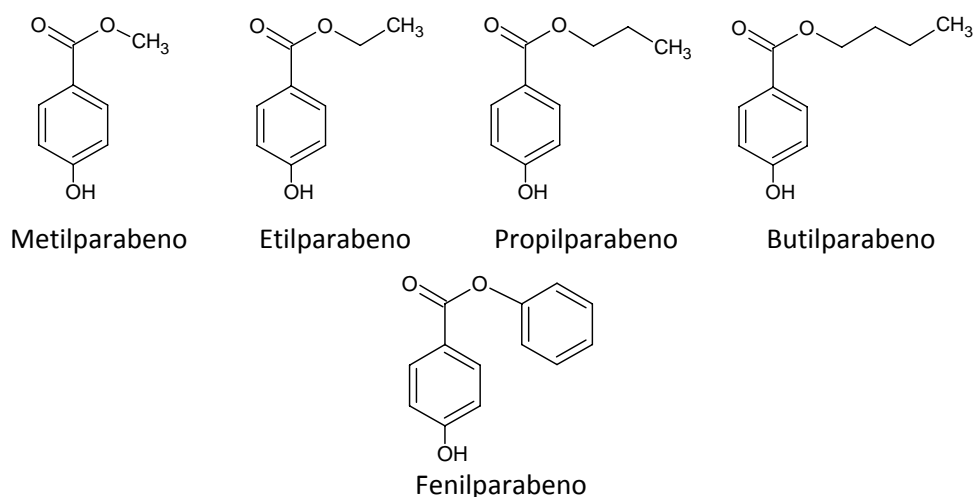


Figura 11. Estructura de los parabenos estudiados

6.5.3. Benzofenonas (BPs)

Son cetonas aromáticas muy usadas en numerosas aplicaciones como fotoquímica orgánica, perfumería y como reactivos en síntesis orgánicas. Se trata de sustancias blancas cristalinas, insolubles en agua y con olor a rosa. Las BPs actúan como filtros para las radiaciones UV ya que son capaces de absorberla (promoviendo sus electrones a un estado excitado) y disiparla en forma de calor. Esto es posible debido a que la benzofenona posee sus estados de singlete y triplete energéticamente muy próximos entre sí. Las BPs se utilizan en productos tales como perfumes y jabones para evitar que la luz ultravioleta degrade el olor y el color de estos productos. También se utilizan como componente de protectores solares y se pueden añadir en los plásticos de embalaje para que estos bloqueen los rayos UV protegiendo el producto.

En la **figura 12**, se muestra la estructura de las BPs más importantes y utilizadas actualmente a nivel comercial.

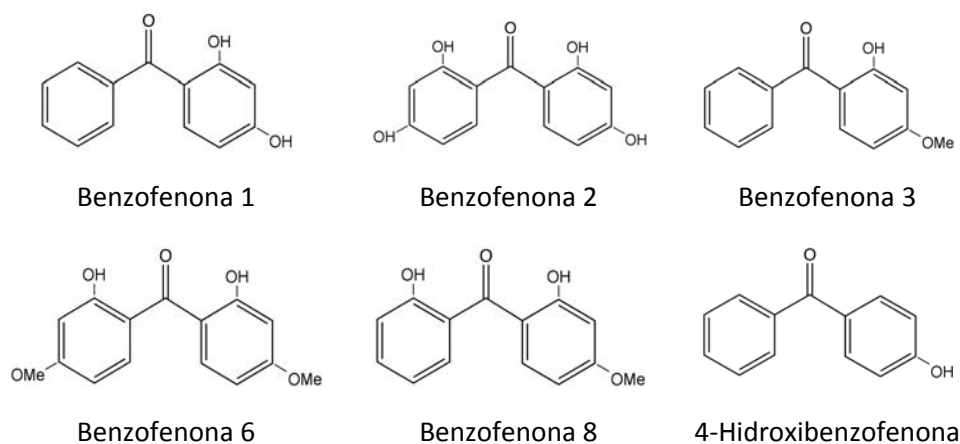


Figura 12. Estructura de las BPs estudiadas

6.5.4. Triclosán (TCS) y Triclocarbán (TCB)

El triclosán, 5-cloro-2-(2,4-dicloro-fenoxi)fenol, se utiliza desde hace más de 40 años como agente antimicrobiano en desodorantes, jabones, cremas y, especialmente, en productos de higiene dental. Es un antiséptico utilizado en productos hospitalarios y productos de consumo (colutorios, desodorantes, dentífricos). Su mecanismo de acción no es muy conocido pero parece que difunde a través de la membrana citoplásmica bacteriana e interfiere su metabolismo lipídico^{86,87}. En las dosis de uso normales actúa como bactericida, y en dosis menores tiene efecto bacteriostático.

La directiva 76/768/CEE⁸⁸ permite su adición a productos de cuidado personal a concentraciones inferiores a 0.3 % (p/p). Recientemente, la Unión Europea ha prohibido su uso en materiales textiles y envoltorios

⁸⁶ Singer, H., Muller, S., Tixier, C. Pillonel L. TCS: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental Science and Technology* 36 (2002) 4998-5004.

⁸⁷ Jones, R., Jampani, H.B., Newman, J.L., Lee, A.S. TCS: A review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control* 28 (2000) 184-196.

⁸⁸ Council of the European communities, Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic product (1976).

plásticos de alimentos, si bien en Estados Unidos se sigue utilizando en fibras de polímeros con estos fines en niveles comprendidos entre el 0.075 y el 0.5 % (p/p)⁸⁹.

Existen dudas sobre los posibles efectos negativos del TCS sobre la salud humana y animal. El estudio llevado a cabo por Veldhoen en 2007 concluye que una dosis reducida de TCS puede actuar como disruptores endocrinos en animales⁹⁰. El hallazgo hace sospechar que podría tener el mismo efecto en los seres humanos⁹¹.

En la **figura 13**, se muestra la estructura química del TCS.

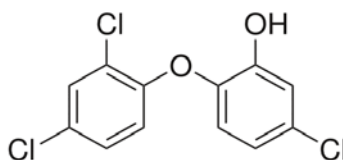


Figura 13. Estructura del TCS

El triclocarbán, N-(4-clorofenil)-N'-(3,4-diclorofenil)urea, se usa desde 1957 como agente antimicrobiano en numerosos productos de cuidado personal, especialmente jabones, a niveles de hasta el 1.5 % (p/p). Desde 1976, la directiva 76/768/CEE88 permite su uso en cosméticos hasta una concentración máxima del 0.2 % (p/p).

⁸⁹ Garcén, J. Boletín intexter (UPC) 120 (2001) 46-49.

⁹⁰ Veldhoen, N., Skirrow R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., Van Aggelen, G., Helbing, C.C. The bactericidal agent TCS modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology* 80 (2006) 217-227.

⁹¹ Veldhoen, N., Skirrow R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., Van Aggelen, G., Helbing, C.C. Corrigendum to "The bactericidal agent TCS modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development". *Aquatic Toxicology* 83 (2007) 648-651.

Resulta efectivo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), actuando como disruptor de los procesos de transporte que tiene lugar en la membrana celular⁹². Su producción en EEUU ronda las 500 toneladas anuales, lo que ha llevado a la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (Environmental Protection Agency, EPA), a catalogarlo como producto químico de gran producción⁹³, a diferencia de la Comisión Europea que lo considera un producto químico de baja producción⁹⁴.

En la **figura 14**, se muestra la estructura química del TCB.

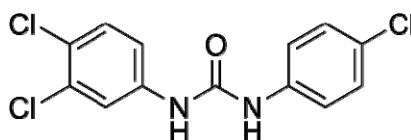


Figura 14. Estructura del TCB

⁹² Scientific committee on consumer products, opinion on triclocarban for other uses than as a preservative (2005) 101-202.

⁹³ TCB consortium, high production volume (HPV) chemical challenge program data availability and screening level assessment for TCB. Report 201-14186A, 2002.

⁹⁴ European Commission, joint research centre, Institute for Health and Consumer Protection, available at: <http://esis.jrc.ec.europa.eu/>, accessed on: December 2011.

CAPÍTULO I

Materiales y Métodos

En este capítulo se describen las disoluciones, reactivos, material de laboratorio, instrumentación y programas informáticos utilizados para la realización de la presente investigación. También, se presentan los tratamientos estadísticos empleados para la calibración y validación de los métodos analíticos desarrollados.

1. Reactivos y Disolventes Empleados

- Patrones. En la **tabla I.1** se muestran los patrones empleados a lo largo del desarrollo de la fase experimental de la presente Tesis Doctoral.

Tabla I.1. Analitos, abreviaturas, marcas comerciales y números CAS

Nombre	Abreviatura	Número CAS	Marca Comercial
Metilparabeno	MPB	99-76-3	ALFA AESAR
Etilparabeno	EPB	120-47-8	ALFA AESAR
Propilparabeno	PPB	94-13-3	ALFA AESAR
Butilparabeno	BPB	94-26-8	ALFA AESAR
Fenilparabeno	Ph-PB	118-55-8	ALFA AESAR
Benzofenona 1	BP-1	131-56-6	SIGMA-ALDRICH
Benzofenona 2	BP-2	131-55-5	SIGMA-ALDRICH
Benzofenona 3	BP-3	131-57-7	SIGMA-ALDRICH
4-Hidroxibenzofenona	4-OHBP	1137-42-4	SIGMA-ALDRICH
Benzofenona 6	BP-6	131-54-4	ALFA AESAR
Benzofenona 8	BP-8	131-53-3	SIGMA-ALDRICH
Bisfenol A	BFA	80-05-7	SIGMA-ALDRICH
BFA deuterado	BFA-d ₁₆	96210-87-6	ISOTEC
Triclosán	TCS	3380-34-5	SIGMA-ALDRICH
Triclocarbán	TCB	101-20-2	SIGMA-ALDRICH
Ácido meclofenámico	AMC	61-68-7	SIGMA-ALDRICH
Etilparabeno-ring- ¹³ C ₆	EPB- ¹³ C ₆	-----	SIGMA-ALDRICH
Benzofenona d- ₁₀	BP-d ₁₀	22583-75-1	SIGMA-ALDRICH

- Metanol grado gradiente (Hipersolv) y LC-MS (Fluka).
- Agua mili-Q y agua grado LC-MS (Fluka).
- Acetonitrilo LC-MS (Fluka).
- Amoniaco aditivo para LC-MS (Fluka).
- Acetato amónico (J.T. Baker).
- Etanol grado gradiente (Fluka).
- PSA (amina primaria/secundaria) (Scharlab).
- Carbón activado (Scharlab).
- Cloruro de sodio (Panreac).
- Sulfato de sodio (J.T. Baker).
- Ácido fórmico (Sigma-Aldrich).
- C18 granel (SCHARLAB).
- TSA (Oxoid).
- TSB (Difco).
- Aceite de parafina.

2. Material de Laboratorio

Para el desarrollo de todo el trabajo experimental, se utilizaron los siguientes materiales de laboratorio:

- Matraces aforados clase A, de diferentes volúmenes.
- Pipetas graduadas y aforadas clase A de diferentes capacidades.
- Viales de vidrio para inyección cromatografía de 2 y 1.5 mL.
- Tapones de rosca y capsula para viales cromatográficos.
- Tubos de centrifuga de 100 mL de capacidad.
- Encapsulador y descapsulador para viales cromatográficos.
- Micropipetas de 250 y 1000 μ L.
- Botellas de vidrio ámbar de 500 mL para muestreo.
- Botellas de vidrio graduadas de 1 L Pyrex®.
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL y 1 L.
- Frascos estériles para recolección de muestras 50 y 100 mL.

- Placas Petri de plástico.
- Mechero Bunsen.
- Nevera capaz de alcanzar y mantener una temperatura de 4.0 ± 1.0 °C.
- Autoclave.
- Estufa capaz de alcanzar y mantener una temperatura entre 35-37 °C.
- API ZYM (sistema de detección de actividades enzimáticas).
- API 50 CH (sistema estandarizado del metabolismo de hidratos de carbono).

La limpieza y mantenimiento de todo material empleado a lo largo del trabajo experimental se realizó con mezcla crómica o HNO₃ al 50 % (v/v) y enjuagando posteriormente con abundante agua desionizada antes de su utilización.

3. Instrumentación

Los instrumentos empleados para la realización de la parte experimental fueron:

- Cromatógrafo Waters Acquity UPLCTM acoplado a espectrómetro de masas triple cuadrupolo Waters H-Class-Xevo TQSTM. Provisto de:
 - Bomba: Quaternary Solvent Manager. Acquity UPLC H Class. Waters.
 - Inyector: Sample Manager-FTN. Acquity UPLC. Waters.
 - Detector: Xevo TQ-S. Waters.
- Espectrómetro de masas con fuente de ionización por antorcha de plasma y filtro de iones por cuadrupolo ICP-MS NEXION 300D.
- Adsorción atómica PERKIN ELMER (Analyst 100).
- Sonda de ultrasonidos Digital Sonifier S450D (BRANSON) provista de:
 - Convertidor tipo 102.
 - Resonador estándar de 12.7 mm de diámetro.
 - Punta enroscable de 12.7 mm de diámetro.
 - Punta enroscable de 12.7 mm de diámetro.
 - Sonda de temperatura.
 - Micropunta enroscable de diámetro final 3 mm.

-
- Equipo de extracción mediante líquidos presurizados, Dionex, Modelo ASE 200.
 - Balanzas analíticas Mettler PJ360 Delta Range y Mettler AE 163 y AND GX-400
 - pH-metro digital CRISON. Modelo Micro-pH 2000 y pH-metro digital CRISON, modelo pH/mV-meter digit 501, provistos de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.
 - Estufa de secado HEAREUS de 50-300°C.
 - Baño de ultrasonido SELECTA de 1000 mL de capacidad.
 - Tamices metálicos MECÁNICA CIENTÍFICA, de distinto tamaño de malla (mallas nº 5, nº 1 y nº 30-ASTM).
 - Barrena de toma muestras en suelo, EDELMAN, con diámetro de 7 cm y longitud de 120 cm.
 - Centrífuga Hettich Zentrifugen, Universal 32.
 - Armario frigorífico COMERSA, UNIC 300.
 - Placa agitadora–calefactora SELECTA AGIMATIC-N.
 - Bomba de vacío Vacuubrand CVC2.
 - Microscopio Olympus.

4. Programas Informáticos

- Software MassLynx V.4.1 SCN.803 Programa de gestión y tratamiento de los datos obtenidos con el cromatógrafo Waters Acquity UPLC™ H-Class-Xevo TQS™.
- Paquete Microsoft® Office: Word®, Excel® y PowerPoint® 2007.
- Software de tratamiento estadístico Statgraphic Plus, versión 5.0.

5. Tratamiento Estadístico de los Datos Analíticos

5.1. Métodos Univariantes

La forma tradicional para elaborar la optimización de alguna variable en la experimentación química, se basa en el método univariante (uno a la vez), es decir, se fundamenta en el estudio del problema a través de la modificación de las variables una a una, variándose los niveles de una variable (factor) mientras las demás permanecen fijas. Una vez terminada la optimización para esa variable, se procede a repetir el procedimiento con la siguiente y así sucesivamente. La forma de proceder es la siguiente:

- Selección de variables influyentes.
- Elección de una de ella.
- Fijación del resto de variables en un valor determinado.
- Modificación de la variable escogida en un rango adecuado.
- Ajuste de los datos a un modelo adecuado.
- Obtención del óptimo.
- Fijación de esta variable en ese valor.
- Repetición del proceso para otra variable.

Esta metodología presenta algunos inconvenientes ya que requiere un gran esfuerzo experimental y puede no detectar la existencia de interacción o dependencia entre variables. Además, presenta un campo de validez restringido y, puede llevar en algunos casos a dar interpretaciones erróneas sobre los óptimos obtenidos, en el caso de fijar las variables en unos de los valores determinados “*a priori*” (sin conocer si estos valores son los óptimos para esas variables). Si existe dependencia entre algunas variables ocurrirá que en función de que la primera tome un valor u otro, se obtendrá un óptimo distinto para la segunda.

En estos casos, no se podrá utilizar la optimización univariante ya que puede llevar a valores de óptimos para las variables equivocadas. La alternativa, es el uso de los métodos multivariantes que permiten conocer si existe o no dependencia entre las variables del sistema analítico. Además, el hecho de modificar en cada experiencia necesaria para obtener la misma información o más que en el caso de la optimización univariante.

5.2. Métodos Multivariantes

El empleo de la metodología multivariante se ha extendido bastante en las últimas décadas debido a que proporciona una mayor información del dominio experimental, reduce el número de experiencias y contempla la posible interacción entre variables.

Por una parte hay una reducción del número de experiencias necesarias para la optimización de variables conllevando a un menor coste, menor tiempo de análisis y mayor durabilidad de los instrumentos; y por otra parte, el uso de métodos multivariantes de optimización permite un conocimiento más profundo sobre el sistema analítico en estudio.

El empleo de métodos multivariantes para detectar dependencias de variables, variables significativas y optimización de variables, implica la realización de uno o varios diseños experimentales.

La metodología a emplear sería:

- Elección del tipo de diseño.
- Selección de los factores y niveles a emplear.
- Obtención de la matriz de experiencias asociada del diseño elegido.
- Adquisición de los datos analíticos.
- Comprobación de la ausencia de valores anómalos.
- Comprobación de la idoneidad del modelo propuesto.
- Inspección de efectos significativos.
- Obtención del óptimo en su caso.
- Conclusiones.

5.2.1. Diseño Estadístico de Experimentos

El proceso de diseño estadístico de experimentos permite planificar un experimento para obtener datos apropiados que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos con el objeto de obtener conclusiones

válidas y objetivas⁹⁵. El diseño experimental ayuda a seleccionar la estrategia óptima para obtener la información buscada con el mínimo coste y evaluar los datos experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan.

Si los factores involucrados en el análisis son independientes (rara vez ocurre), la práctica más común es el *diseño de experimentos un factor a la vez (diseño univariante)*. Sin embargo, suelen ser frecuentes las interacciones entre variables y a veces son los efectos más importantes sobre la respuesta de un sistema, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender su comportamiento. La solución, puede consistir en variar más de un factor a la vez al realizar un nuevo experimento (*diseño multivariante*). En este tipo de diseño, se observa una o más variables experimentales dependientes (respuestas (y)) cuyo valor depende de una o más variables independientes controlables (factores (x)). Las respuestas también pueden estar influidas por otras variables que no son controladas (z).

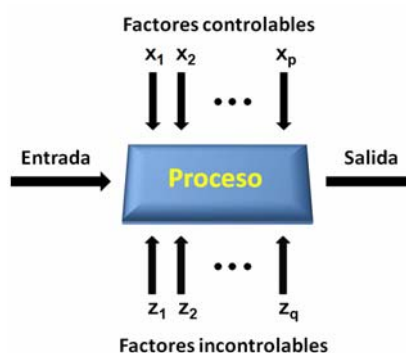


Figura I.1. Esquema general de un proceso multivariante

El diseño experimental multivariante conduce a una planificación con menos experimentos proporcionando un conocimiento mayor del sistema o proceso en estudio⁹⁶. Las herramientas quimiométricas que se aplican al diseño de experimentos multivariantes permiten el desarrollo de modelos

⁹⁵ Montgomery, D.C. *Diseño y Análisis de Experimentos*, 2^{da} ed. Limusa Wiley, México. (2002) 685-686.

⁹⁶ Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., Da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., Dos Reis, P.S., Souza, A.S., Dos Santos, W.N.L. Box-Behnken Design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 179-186.

matemáticos para describir el comportamiento del sistema, determinar la relevancia estadística de los efectos independientes que están siendo investigados, así como establecer las interacciones. Si existen interacciones significativas entre las variables examinadas, las condiciones óptimas indicadas por estudios univariantes serán muy diferentes de los resultados correctos de la optimización multivariante. A mayores interacciones, mayor será la diferencia entre ambas estrategias de optimización.

La realización de un diseño responde a un fin determinado, que genera los tres tipos diferentes:

- A. **Diseños de diagnóstico (Screening Design)**. El más empleado es el diseño *Plackett-Burman (PB)*⁹⁷.

- B. **Diseños de superficie de respuesta (Response Surface Design)**. Se emplean para seleccionar valores óptimos de factores en un sistema analítico concreto. Son diseños más grandes que los de diagnóstico, y en ellos son necesarios más de dos niveles por factor para obtener la información suficiente que permita establecer un valor óptimo determinado. Son muy útiles cuando se analizan y modelan problemas en los cuales la respuesta de interés está condicionada por varias variables, siendo el objetivo final el desarrollo, mejora y optimización de los productos y los procesos⁹⁸⁻¹⁰¹. Los diseños más empleados son

⁹⁷ Plackett, R.L., Burman, J. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33 (1946) 305-325.

⁹⁸ López, E.A., Sendra, J.M.B., Rodríguez, L.C., Gracia, L.G., Campaña, A.M.G., Casado, A.M., Quimiometría: Optimización de un método de análisis químico (9 edición). *Curso ofrecido por el centro de Formación Continua de la Universidad de Granada* (2002).

⁹⁹ Pérez, C., Estadística práctica con Statgraphic. Ed. *Prentice Hall, Madrid, España* (2001) 691.

¹⁰⁰ Montgomery, D.C., Diseño análisis de experimentos. Ed. *Limusa Wiley, México DF, México* (2002) 677-686.

las factoriales con réplicas del punto central, los cúbicos centrados en las caras, en estrella y los Doehlert. La elección de un diseño dependerá en gran medida del conocimiento previo que se tenga del sistema¹⁰²⁻¹⁰⁵.

C. *Diseños mezcla (Mixture Design)*. En este tipo de diseño, el intervalo de variación de los factores (que ahora siempre serán composiciones en tanto por uno) es de 0 a 1, y la suma de todas las composiciones debe dar uno. Es decir, que hay relaciones de ligadura entre esas composiciones. Esto hace que los valores que pueden tomar los factores sean menores que en los otros tipos de diseños. De nuevo, los modelos matemáticos son funciones polinómicas de grado 1, 2 o 3 generalmente. Debido a las restricciones que presentan estos diseños, las funciones polinómicas no poseen términos puros. Así que, para obtener el máximo, en vez de aplicar el criterio de Lagrange, se emplea la regla de la palanca sobre un mapa de contorno de la superficie.

En cualquier caso, en la optimización multivariante se siguen una serie de etapas ordenadas: (i) definición del problema y selección de las variables apropiadas y respuesta(s) a través de estudios de diagnóstico; (ii) elección del diseño de experimentos; (iii) selección de los niveles de

¹⁰¹ Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. Statistics for experiments. An introduction to design, data analysis, and model building. Ed. John Wiley and Sons, New York, USA (1978) 649-652.

¹⁰² Murphy, S.C., Gilroy, D., Kerry, J.F., Buckley, D.S., Kerry, J.P. Evaluation of surimi for and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface methodology. *Meat Science* 66 (2004) 689-670.

¹⁰³ Soo, E.L., Salleh, A.B., Barsi, M., Ralman, R.N.Z.A., Kamaruddin, K. Response surface methodological study on lipase-catalysed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry* 39 (2004) 1511-1518.

¹⁰⁴ Elibor, M., Ozer, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus Arrhizus*. *Process Biochemistry* 38 (2002) 367-372.

¹⁰⁵ Kiran, K.R., Manohar B., Divakar S., A central composite rotatable design analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus Arrhizus*. *Process Biochemistry* 38 (2002) 367-372.

variables y codificación; (iv) ajuste matemático del modelo; (v) revisión de la idoneidad del modelo; (vi) análisis del modelo y estimación del efecto; (vii) determinación de los óptimos; (viii) revisión de la robustez.

Los modelos matemáticos son funciones polinómicas de distintos órdenes. El soporte matemático empleado consiste en el establecimiento de un análisis de varianza (ANOVA). Después se debe comprobar estadísticamente la ausencia de valores anómalos. En este caso, dado que no hay valores repetitivos con los factores en los mismos niveles (excepto para el punto central), una vez detectado un anómalo, se deberá repetir esa experiencia.

Para detectar anómalos, hay varias posibilidades:

A. Representación de Daniell.

B. Análisis de residuos. En este caso podemos proceder de dos formas:

- **Inspección visual.**
- **Test estadístico.** *Q de Dixon*, *R de Grubbs* o criterio *t* al residuo más grande.

C. Reconstrucción del diseño.

5.2.2. Idoneidad del Modelo

Para verificar la idoneidad del modelo, se debe observar si los datos se ajustan al modelo matemático elegido y en qué grado lo hacen. Para ello existen diferentes herramientas estadísticas. Las más habituales son:

- A. El valor P del Test de fallo de ajuste.** Considerando un error " $\alpha=0.5$ ", un valor de P mayor del 5 %, da un modelo idóneo para los datos.
- B. El coeficiente de determinación ajustado a los grados de libertad R^2 (variable explicada) y el coeficiente Q^2 (variable predicha).** Ambos coeficientes deben estar cerca de la unidad y no deben diferir en más de 0.2 o 0.3 unidades. En la **tabla 1.2**, se representan los valores aceptables para cada uno de estos coeficientes en función de la naturaleza de los datos experimentales¹⁰⁶.

Tabla 1.2. Guía general para evaluar los coeficientes R^2 y Q^2

Naturaleza de los datos	R^2	Q^2
Química	Aceptable: ≥ 0.8	Aceptable: ≥ 0.5
		Excelente: > 0.8
Biológica	Aceptable: > 0.7	Aceptable: > 0.4

Para cada factor e interacción se puede calcular un test estadístico de la F de Snedecor basado en la distribución F de Fischer, calculando como cociente de la varianza de cada factor o interacción dividido por la varianza de error. Por comparación con la distribución estadística asociada a los grados de libertad correspondientes, se puede indicar si la variabilidad introducida por cada factor es significativa. Es decir, se puede verificar qué factores hay que tener en cuenta ya que alteran en mayor medida la señal e incluso, qué factor o factores no se debe considerar a causa de que aportan una fuente de variabilidad.

¹⁰⁶ Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, A., Pettersen, J., Bergaman, R. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42 (1998) 3-40.

6. Calibración y Parámetros Analíticos del Método

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser comparativos o relativos, de forma que para obtener la concentración de analito presente en una muestra, es necesario realizar la comparación de la medida física con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que llamamos *proceso de calibración química*. La calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo se puede obtener una buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración. El proceso de calibración consta de dos etapas:

- **Etapa de calibración.** En ella se establece el modelo que relaciona la variable dependiente (señal analítica) con la variable independiente (concentración): ***Señal analítica = f (concentración)***
- **Etapa de predicción.** Consiste en obtener las variables independientes, es decir, las concentraciones, de una o más muestras problema a partir del valor obtenido para la variable dependiente. El valor de la variable independiente correspondiente a muestras patrón junto con las sensibilidades, permiten predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

Dentro del campo de la Química Analítica los modelos de calibración más utilizados son de regresión univariante. Estos modelos se caracterizan por la existencia de una variable independiente (concentración) que se relaciona con la respuesta (señal instrumental) mediante una relación lineal. La relación funcional que se establece entre ambas variables, se ajusta a un modelo matemático del tipo **$y = a + b \cdot x$** , donde **y** es la variable

dependiente, x la independiente, y a y b dos parámetros estimados a partir de los datos experimentales.

De todos los modelos de regresión, el que ajusta los valores experimentales por medio del algoritmo gaussiano de hacer mínimo el cuadrado de los residuales, es el más frecuentemente usado para el establecimiento de la ecuación de la recta de calibrado. En la **figura 1.2** se muestra un modelo de regresión lineal univariante.

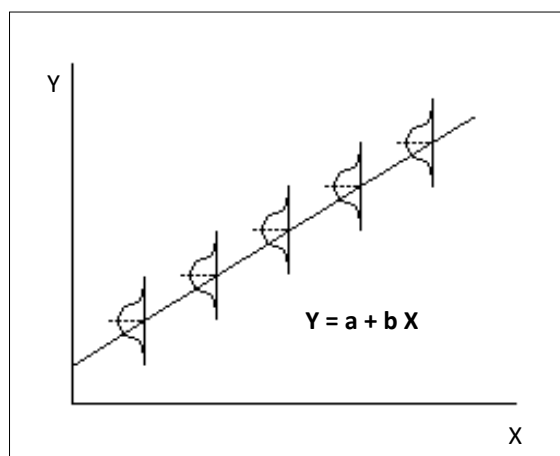


Figura 1.2. Representación gráfica del modelo de regresión lineal

6.1. Rechazo de Valores Anómalos

Tras la obtención de cualquier dato experimental se debe tener en cuenta que antes de considerarlo se debe verificar su idoneidad puesto que puede haber algún valor considerado anómalo. Para esta finalidad se puede recurrir al test estadístico que se emplea para el rechazo de valores anómalos, denominado prueba de la Q de Dixon¹⁰⁷.

¹⁰⁷ Dean, R.B., Dixon, W.J. Simplified statistics for small numbers of observations. *Analytical Chemistry* 23 (1951) 636-638.

6.2. Función de Calibración

El modelo de calibración seleccionado en la presente Tesis Doctoral fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados, estimándose en todos los casos los parámetros a y b del modelo.

Para comprobar la tendencia lineal de los datos, se ha empleado el coeficiente de determinación ($\%R^2$) y la evaluación estadística del **fallo de ajuste** de los datos al modelo. Esta condición se ha evaluado mediante el cálculo del valor P_{lof} del test de fallo de ajuste, si $P \geq 5\%$ se concluirá por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal.

Finalmente, se ha estudiado la homogeneidad de varianzas, es decir, la condición de homocedasticidad, a partir **del análisis gráfico de los residuos**¹⁰⁸. La **figura 1.3** representa una distribución ideal de los residuales (diferencia entre los valores predichos y los experimentales) frente a la concentración.

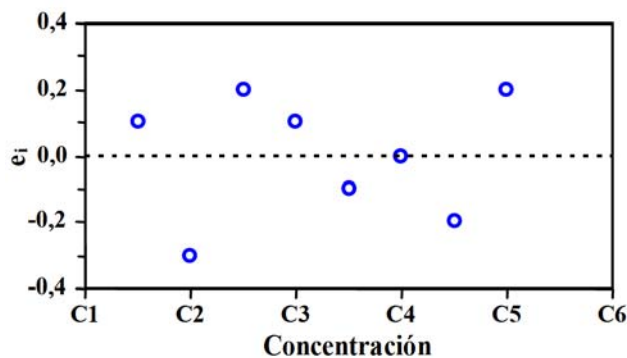


Figura 1.3. Condición de la homocedasticidad

¹⁰⁸ Boqué, R., Rius, F.X., Avances en Quimiometría Práctica, Servicio de publicaciones e intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. *Santiago de Compostela, España* (1994) 150-157.

6.3. Parámetros de Calidad del Método Analítico

Los métodos analíticos deben ser validados a través de pruebas de laboratorio: *“la validación de un proceso analítico es el procedimiento por el cual éste es establecido a través de estudios de laboratorio, de modo que la información que de él se derive sea útil para cumplir los requerimientos necesarios de los problemas analíticos en los que será aplicado”*¹⁰⁹. Hay muchas razones para justificar la necesidad de validar un procedimiento analítico. Entre ellas, se encuentran requerimientos regulatorios, buenas prácticas de laboratorio y control de calidad.

La validación implica en primer lugar la verificación de la exactitud de los resultados que genera un método analítico. La exactitud combina dos propiedades complementarias: la veracidad y la precisión de los resultados. Para completar la validación es necesario establecer otros parámetros de calidad del mismo, dentro de los cuales se pueden incluir: rango dinámico lineal y linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación y selectividad.

6.3.1. Evaluación de la Exactitud

Según la norma ISO 5725 la exactitud se define como *“el grado de concordancia entre el resultado en un ensayo y un valor de referencia aceptado”*¹¹⁰. Este concepto combina dos propiedades complementarias, la veracidad y la precisión de los resultados. La veracidad se logra al eliminar los errores sistemáticos, mientras que la precisión se obtiene al minimizar los errores aleatorios.

¹⁰⁹ USP 32. General Chapter 1225. Validation of compendial methods. *United States Pharmacopeia XXXII*. Rockville: United Pharmacopoeial Convention, Inc. (2009).

¹¹⁰ Norma ISO 5725. Partes 1 y 2. Exactitud (Veracidad y Precisión). *International Organization for Standardization, Ginebra* (1994) 2-26.

A. Estimación de la Veracidad. En el trabajo desarrollado la presente Tesis Doctoral, se ha evaluado la veracidad mediante el empleo de los denominados ensayos de recuperación sobre muestras libres de analitos y dopadas con los mismos, a un mínimo de tres niveles de concentración. Esta forma de validación de la veracidad es la aceptada por la Decisión 2002/657/EC¹¹¹, cuando no existen materiales de referencia certificados disponibles.

Para obtener experimentalmente la veracidad, se analizarán muestras reales no contaminadas a las que se ha adicionado una cantidad conocida del compuesto en estudio (muestra fortificada). Es necesario también analizar la muestra previamente a la fortificación, para comprobar que la concentración del analito es nula o se encuentra por debajo del límite de detección del método. Tras aplicar el método analítico, se relacionan las concentraciones encontradas en las muestras fortificadas y en las muestras-blanco con la concentración añadida. El cálculo se realiza según la ecuación:

$$\% R = \frac{C_{\text{muestra fortificada}} - C_{\text{muestra no fortificada}}}{C_{\text{adicionada}}} \cdot 100$$

Antes de realizar las experiencias para demostrar la veracidad del método, es necesario evaluar si los constituyentes de las muestras sobre las que se aplicara el método generan errores sistemáticos constantes o proporcionales sobre la respuesta analítica. El “efecto matriz” puede causar un error sistemático proporcional, manifestándose con un cambio en las pendientes de las rectas de calibrado con patrones y en presencia de

¹¹¹ Commission Decision 2002/657/EEC. *Official Journal of the European Communities*, L 221 (2002) 2-28.

matriz (matrix-matched calibration y adición de patrón). Puede detectarse comparando las pendientes de ambas rectas de calibrado mediante los test estadísticos adecuados¹¹².

B. Estimación de la Precisión. Mide el grado de concordancia entre resultados de un ensayo obtenidos bajo condiciones estipuladas. Matemáticamente la precisión se expresa por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación). La desviación estándar relativa de concentración, DER, se puede calcular a partir de la expresión:

$$DER = 100 \cdot \frac{s_c}{c}$$

Donde s_c es la desviación estándar obtenida a partir de réplicas¹¹³, y c es el valor de la concentración media.

La precisión se puede calcular en condiciones de repetibilidad, en el mismo laboratorio, con el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo, o de *reproducibilidad* donde se realizan las medidas con el mismo método pero en diferentes laboratorios, con diferentes operadores, equipos, y distintos intervalos de tiempo. Puede estimarse también la *precisión intermedia*, a partir de las variaciones dentro de un mismo laboratorio, por ejemplo, con medidas realizadas en diferentes días.

¹¹² Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers Verbeke, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier Science B.V., Amsterdam (1997) 886-887.

¹¹³ Cuadros Rodríguez, L., Garcia campaña, A.M., Jiménez Linares, C., Román Ceba, M. Estimation experiment. *Analytical Letters* 26 (1993) 1243-1258.

6.3.2. Rango Dinámico Lineal y Linealidad

El rango dinámico lineal viene definido por el límite superior del intervalo de concentraciones en el que ha aplicado el método analítico y el límite de cuantificación de dicho método.

Por otra parte, la linealidad indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado¹¹⁴. Se pueden distinguir dos tipos de linealidad:

- La linealidad “en línea” (in-line) estimada con el valor P del test de fallo de ajuste.
- La linealidad “sobre la línea” (on-line), estimada con el coeficiente de correlación (r), o como el coeficiente de determinación (R^2), sin embargo valores de (r) no indican necesariamente una alta calidad de los datos analíticos. También se puede emplear la desviación estándar relativa de la pendiente, $DER_{(b)}$, que se calcula según la ecuación:

$$LIN (\%) = [1 - DER_{(b)}] \cdot 100$$

donde $DER_{(b)}$ es la desviación estándar relativa de la pendiente de la función de calibrado.

El valor máximo de linealidad será el 100 % de forma que cuando más próximo esté el valor calculado para este parámetro a dicho valor, mayor será el ajuste de los datos experimentales obtenidos en el laboratorio al modelo lineal propuesto.

¹¹⁴ Analytical Methods Committee. Is my calibration linear? *Analyst* 119 (1994) 2363-2366.

6.3.3. Sensibilidad o Resolución Analítica

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de la calibración (recomendada por la IUPAC)¹¹⁵ mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, y viene dada por la pendiente de la recta de calibrado. Por otro lado Mandel y Stiehler¹¹⁶ proponen que la sensibilidad analítica ($S_{\text{Analítica}}$) debe definirse como el cociente entre la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente del calibrado (b), según la ecuación:

$$S_{\text{analítica}} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Para determinar la sensibilidad de un método analítico, dos aspectos básicos que deben examinarse son el límite de detección (LOD) y el de cuantificación (LOQ). Se define LOD como la cantidad mínima de analito detectable en la muestra, mientras que LOQ es la cantidad mínima de analito que se puede cuantificar con un nivel de confianza determinado. Se basan en la teoría de la prueba de hipótesis, las posibilidades de falsos positivos y falsos negativos¹¹⁷. Para calcular estos parámetros existen varias aproximaciones aceptadas por la IUPAC. En este trabajo se empleó el concepto de límite de detección, basado en un tratamiento estadístico de la señal del blanco¹¹⁸. Según esta metodología al límite de detección expresado como C_L le corresponde una señal analítica igual a $S_L = S_B + k \cdot s_B$.

¹¹⁵ IUPAC, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II data interpretation. *Analytical chemistry division. Spectrochimica Acta B* 33 (1978) 241-245.

¹¹⁶ Mandel, J., Stiehler, R.D. Sensitivity—A criterion for the comparison of methods of test. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 53 (1954) 155-159.

¹¹⁷ Currie, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta* 391 (1999) 105-126.

¹¹⁸ IUPAC, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II data interpretation. *Analytical chemistry division. Spectrochimica Acta B* 33 (1978) 241-245.

donde S_B es el valor medio de la respuesta del blanco; s_B la desviación estándar de dicha señal y k un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración C_L está relacionada con S_L según la expresión:

$$C_L = \frac{(S_L - S_B)}{b}$$

donde b es la pendiente de la función de calibrado.

Sustituyendo una ecuación en la otra, se obtiene que el límite de detección vendrá dado por:

$$C_L = \frac{k \cdot s_b}{b}$$

Este valor C_L será un fiel reflejo del límite de detección del método, siempre que b esté bien definida. Como regla general, se suele usar el valor $k = 3$ que proporciona un nivel de confianza del 99.86 % para el límite de detección y 10 para el de cuantificación, asegurándose así que la magnitud analítica $S_L > S_B + k \cdot s_B$ sea debida a la presencia de analito en la muestra problema y no a las fluctuaciones del blanco. En este trabajo, para calcular la desviación estándar correspondiente al blanco cromatográfico, se ha operado siguiendo la metodología propuesta por González y col¹¹⁹.

¹¹⁹ González, A., Cuadros, L., Alonso, E., Vílchez, J.L. Estimate of gas chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A* 726 (1996) 133-139.

CAPÍTULO II

Determinación de Disruptores
Endocrinos Mediante UPLC-MS/MS.
Optimización de Variables

1. Espectrometría de Masas en Tándem. Descripción y Modos de Trabajo

De una forma simplificada, se puede decir que un espectrómetro de masas en tándem es la combinación en línea de dos espectrómetros simples. El proceso consiste en emplear dos sistemas de generación de iones y dos sistemas de filtrado de iones (cuadrapolos), o dos procesos de aislamiento (trampa de iones) dentro de un solo instrumento. En el primer espectrómetro (filtro), se fragmenta la molécula neutra y se selecciona, en función de su relación masa/carga (m/z), un fragmento (ion precursor), que debe ser característico de la molécula que pretendemos analizar. El ion seleccionado pasa a una segunda zona (cámara de colisión) en la que se induce una nueva fragmentación, generalmente producida por la colisión con un gas neutro (gas de colisión en los equipos de triple cuadrapolo) o con el propio gas portador (trampa de iones), este proceso se denomina disociación inducida por colisión (collision-induced dissociation, CID). Finalmente, el segundo espectrómetro separa y analiza los fragmentos (iones producto) generados por la disociación del ion precursor en función de su relación m/z . El espectro de MS/MS resultante consiste en los iones producto formados a partir del precursor seleccionado. Este proceso puede ser continuado de manera que nuevamente se puede aislar uno de los iones producto y nuevamente ser fragmentado, de modo que se generen nuevos iones producto, dando lugar a la Espectrometría de Masas multietapa (MS^n)¹²⁰.

¹²⁰ Picó, Y., Blasco, C. y Font, G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrometry Reviews*. 23 (2004) 45-85.

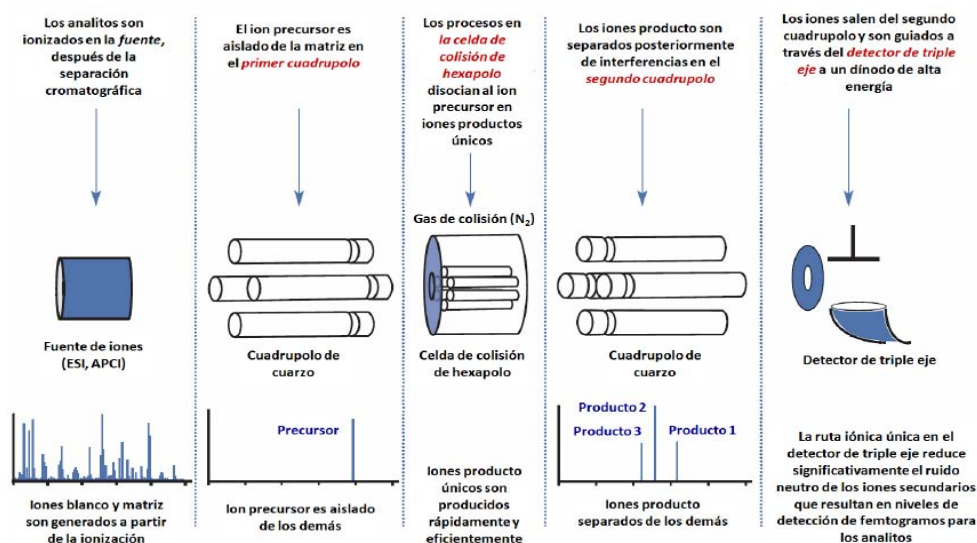


Figura II.1. Esquema del funcionamiento de un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo

- A. Los analitos son ionizados en la fuente después de la separación cromatográfica.
- B. Los iones precursores seleccionados, generados en la fuente, son aislados de la matriz y del resto de iones en el primer cuadrupolo.
- C. Los procesos de colisión en la celda de colisión disocian al ion precursor en iones productos únicos.
- D. Los iones producto generados son separados y aislados en función de su relación m/z .
- E. Los iones que salen del tercer cuadrupolo son detectados por el electrón-multiplicador y registrados por el software.

En la celda de colisión, que actúa como una fuente de ionización, el ion precursor sufre repetidos impactos con el gas de colisión, de forma que aumenta la energía potencial del ion, hasta alcanzar el umbral de fragmentación. Esto genera varios iones producto. A bajas energías (cercana a la energía umbral), las reacciones de fragmentación se limitan a pérdidas neutras (H_2O , MeOH , CO , CO_2 , MeCN), no consideradas estructuralmente significativas, a menos que puedan aportar información sobre grupos funcionales de la molécula. A altas energías, se producen reacciones más complejas, llegando a producirse rupturas de enlaces C-C, y la fragmentación de la molécula y generándose los iones producto¹²¹.

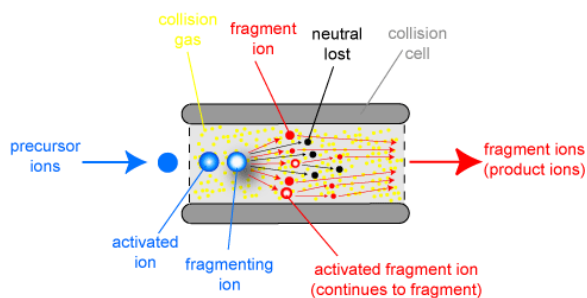


Figura II.2. Esquema de una celda de colisión de un espectrómetro de triple cuadrupolo

Los modos de trabajo en Espectrometría de Masas de triple cuadrupolo son los siguientes:

- A. Product ion scan.** En este modo, el primer cuadrupolo (Q1) selecciona un ion que es introducido en la celda de colisión (q2) donde se fragmenta. Posteriormente, todos los fragmentos son analizados por el tercer cuadrupolo (Q3) mediante un barrido o scan. Como resultado se obtiene un espectro MS/MS completo, similar al obtenido en modo *full-scan* en los espectrómetros de masas de simple cuadrupolo.

¹²¹ Hoffmann, E, Stroobant, V. Mass Spectrometry. *Principles and Applications*. 2ª ed. Paris: Jonh Wiley and Sons LTD (1999) 47-48.

- B. Precursor ion scan.** En este modo, el Q3 está fijado para únicamente medir una relación m/z seleccionada, mientras el Q1 realiza un barrido de todas las masas. Sólo se obtiene una respuesta cuando el Q1 selecciona la masa que genera la masa seleccionada en el Q3. En el espectro obtenido aparecen únicamente los iones precursores que generan dicho fragmento.
- C. Neutral loss scan.** En este caso mientras el Q1 realiza un barrido de masas, el Q3 lo realiza también pero con una determinada diferencia de masas con respecto al Q1, de modo que únicamente se obtiene respuesta para aquellos iones en el Q1 que sufran una pérdida de masa igual a la diferencia establecida entre los cuadrupolos.
- D. Selected reaction monitoring (SRM).** El Q1 y el Q3 están fijados para analizar un único ion precursor y producto que son característicos del compuesto que se desea analizar, mejorándose la selectividad y la sensibilidad de los análisis. Este modo de trabajo sólo se usa para el análisis de sustancias previamente pre-seleccionadas (*target*), puesto que requiere que los iones precursores y producto sean conocidos. Este modo es el más adecuado para análisis cuantitativos. A cada análisis SRM se le conoce como transición, el análisis simultáneo de varias transiciones en un mismo análisis se denomina *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*. En este modo, la confirmación de los positivos obtenidos se realiza midiendo una segunda transición, en la cual el ion producto seleccionado es diferente al primero. La relación entre las intensidades de la transición de cuantificación y la de confirmación, es comparada con la relación de las intensidades de dichas transiciones de un patrón de control, si es igual (con una

determinada tolerancia) la identidad de la sustancia puede ser inequívocamente confirmada¹²².

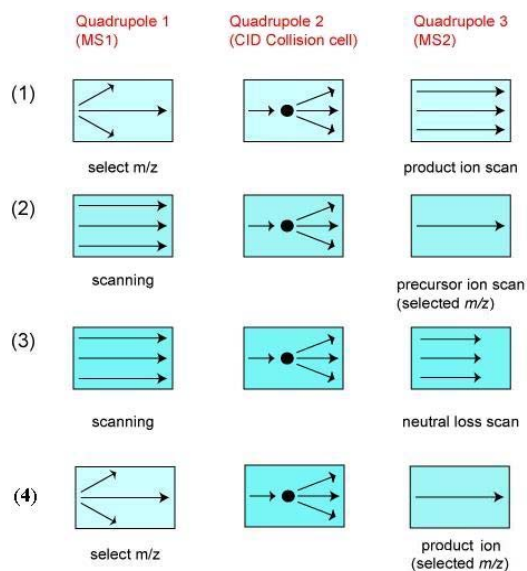


Figura II.3. Modos de adquisición de un Espectrómetro de Masas de triple cuadrupolo

¹²² Núñez, L., Tadeo, J.L., García-Valcárcel, A.I., Turiel, E. Determination of parabens in environmental solid samples by USE and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 178-182.

2. Optimización de las Variables del Espectrómetro de Masas

El trabajo experimental se desarrolló empleando el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) provisto de una fuente de ionización por electroespray (ESI) mostrado en la **figura II.4**.



Figura II.4. Cromatógrafo Waters Acquity UPLC™
H-Class-Xevo TQS™

Cuando el acoplamiento LC-MS se lleva a cabo mediante una interfase ESI, los analitos disueltos en la fase móvil pasan al espectrómetro de masas a través de un capilar de acero a presión atmosférica sometido a un voltaje de entre 3 y 6 kV. La corriente de líquido, al fluir a través del capilar, se dispersa y las moléculas de los analitos y del disolvente forman un spray de gotas cargadas (nebulización). La mayor parte del disolvente se evapora (desolvatación) al atravesar la fuente a una temperatura alrededor de los

150°C. Dicha desolvatación es asistida además por una corriente de nitrógeno a 500°C. A medida que se elimina el disolvente, las gotas se hacen cada vez más pequeñas hasta que las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie son capaces de superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial y se produce la ruptura de la gota originando iones en fase gaseosa. Los iones son transferidos, a través de lentes focalizadoras, al espectrómetro de masas.

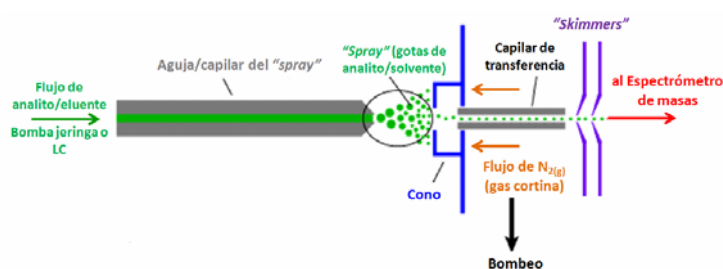


Figura II.5. Estructura de la interfase

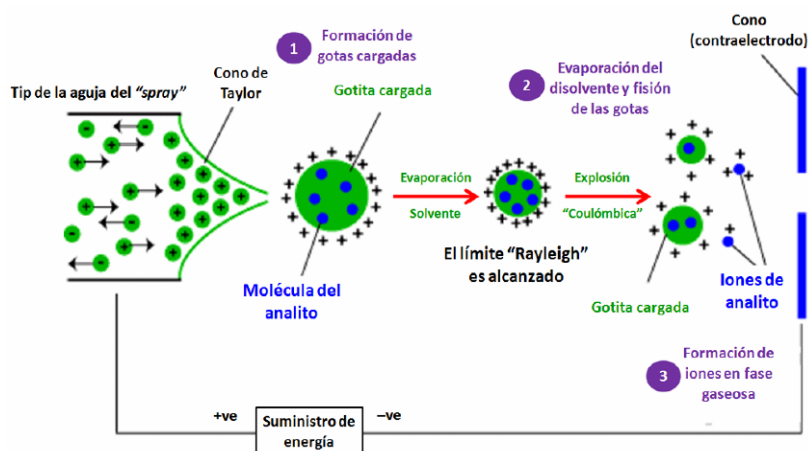


Figura II.6. Imagen de la formación del spray

Para la optimización de las variables del espectrómetro de masas, se realizaron perfusiones directas e individuales de cada analito. El objetivo final del procedimiento fue maximizar la concentración de ion precursor en la celda de colisión, y optimizar las condiciones de fragmentación, para

obtener los iones producto. Como gas de colisión se usó nitrógeno a un flujo de 0.5 mL min^{-1} y la temperatura de la fuente se fijó en 150°C . Con respecto a la sensibilidad, los parámetros más influyentes fueron el voltaje del cono (CV) y la energía de colisión (CE).

- **Voltaje del cono.** Potencial aplicado al orificio de entrada del espectrómetro con el objetivo de captar los iones provenientes del electrospray e introducirlos en el conjunto del triple cuadrupolo. Este voltaje permite eliminar las asociaciones no deseadas entre el ion de interés y cualquier otra especie que acompañe al analito durante la formación del spray. Debe ser lo suficientemente elevado como para eliminar estas asociaciones (“clusters”) pero lo suficientemente bajo como para no provocar la ruptura del ion precursor. Algunas de las agrupaciones más comunes son: $[\text{M}+\text{H}_3\text{O}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$ y $[\text{M}+\text{NH}_3]^+$.
- **Energía de colisión.** La fragmentación del ión precursor en la celda de colisión se controla mediante el potencial CE. Éste acelera los iones en mayor o menor medida en función de la energía de colisión que se desee. Así, una mayor energía de colisión dará como resultado una mayor fragmentación del ión padre.

En las siguientes tablas se recogen los parámetros optimizados para cada uno de los analitos estudiados en la presente Tesis Doctoral y las transiciones seleccionadas para cuantificación y confirmación.

Tabla II.1. Parámetros del espectrómetro de masas para PBs y BFA

Analito	Transición	CV / CE	Transición	CV / CE	Modo
MPB	151.1 → 91.8	38 / 22	151.1 → 135.9	38 / 14	ESI(-)
EPB	165.1 → 91.9	38 / 24	165.1 → 136.6	38 / 16	ESI(-)
PPB	179.1 → 91.9	42 / 24	179.1 → 136.1	42 / 16	ESI(-)
BPB	193.2 → 91.9	42 / 24	193.2 → 136.1	42 / 16	ESI(-)
Ph-PB	213.1 → 168.9	18 / 10	213.1 → 92.8	18 / 28	ESI(-)
EPB- ¹³ C ₆	171.2 → 143.8	44 / 14	171.2 → 97.9	44 / 22	ESI(-)
BFA	227.2 → 211.9	50/22	227.2 → 132.9	50/26	ESI(-)
BFA-d ₁₆	241.2 → 223.0	46/22	241.2 → 141.9	46/32	ESI(-)

Tabla II.2. Parámetros del espectrómetro de masas para las BPs

Analito	Transición	CV / CE	Transición	CV / CE	Modo
BP-1	214.9 → 136.8	2/18	214.9 → 80.81	2/32	ESI(+)
BP-2	245.1 → 134.8	40/16	245.1 → 108.8	40/22	ESI(-)
BP-3	229.0 → 150.8	4/20	229.0 → 104.9	4/18	ESI(+)
BP-6	275.0 → 150.9	14/18	275.0 → 128.7	14/18	ESI(+)
BP-8	244.9 → 120.8	14/20	244.9 → 150.8	14/20	ESI(+)
4-OHBP	199.0 → 120.8	36/20	199.0 → 104.8	36/18	ESI(+)
BP-d ₁₀	193.1 → 109.8	18/16	193.1 → 81.8	18/30	ESI(+)

Tabla II.3. Parámetros del espectrómetro de masas para TCS y TCB

Analito	Transición	CV / CE	Transición	CV / CE	Modo
TCS	287.0 → 141.8	22/32	287.0 → 160.8	22/40	ESI(-)
TCB	313.1 → 150.9	2/14	313.1 → 126.2	2/14	ESI(-)
AMC	294.2 → 258.0	2/16	294.2 → 213.9	2/20	ESI(-)

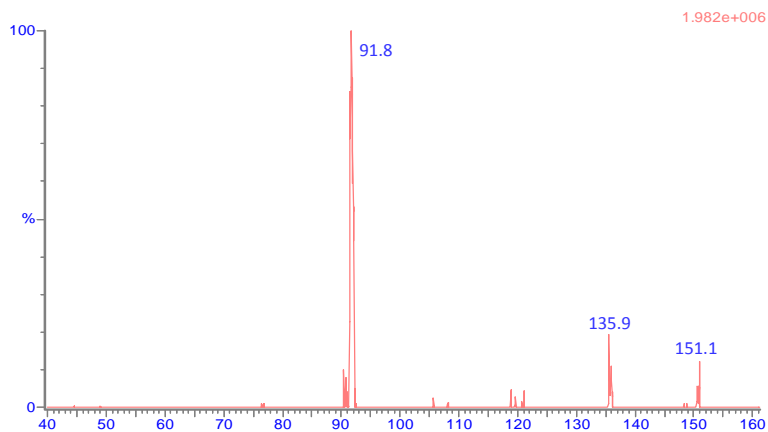
Por otro lado, se optimizaron los parámetros de la fuente, obteniéndose los siguientes valores óptimos:

Tabla II.4. *Parámetros de la fuente*

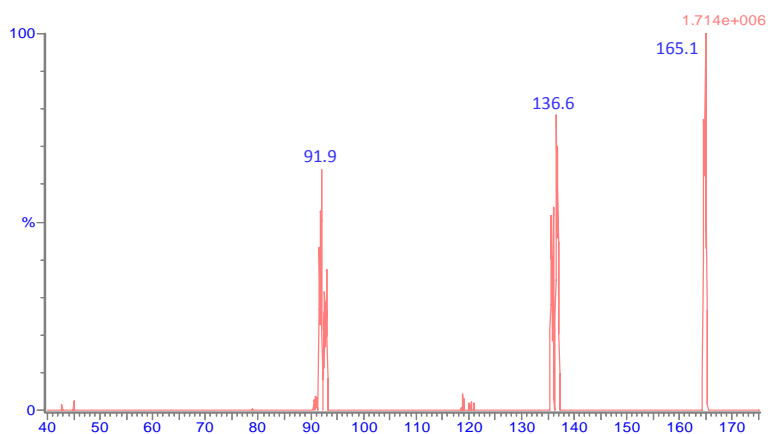
Parámetro	
Temperatura de desolvatación	500°C
Flujo del gas de desolvatación	800 (L h ⁻¹)
Flujo del cono	150 (L h ⁻¹)
Flujo del gas de colisión	0.5 (mL min ⁻¹)
Temperatura de la fuente	150°C
Voltaje del capilar ESI (-)	1.8 V
Voltaje del capilar ESI (+)	0.6 V
Presión del nebulizador	7 (bar)

En la **figura II.7** se muestran los espectros de masas obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las condiciones óptimas del espectrómetro de masas.

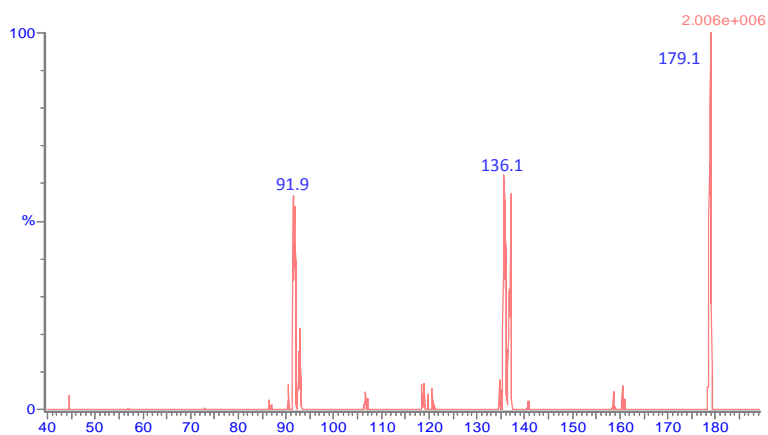
A. **MPB**: 151.1 \rightarrow 91.8 / 151.1 \rightarrow 135.9

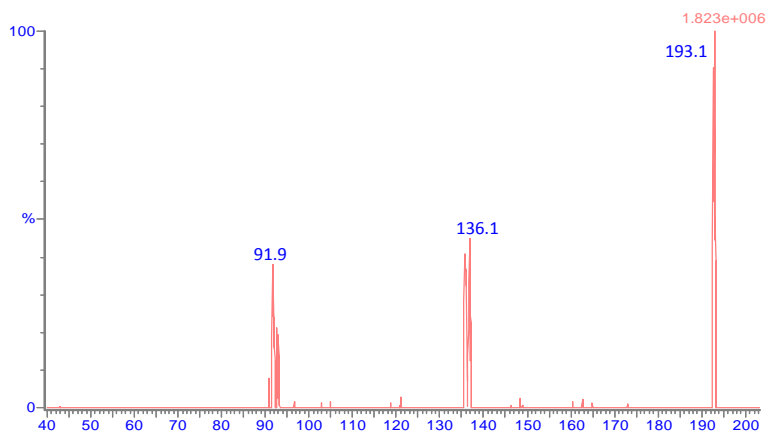
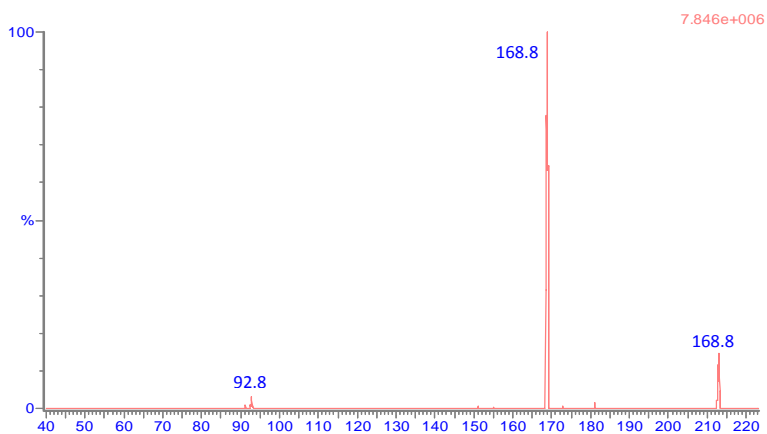
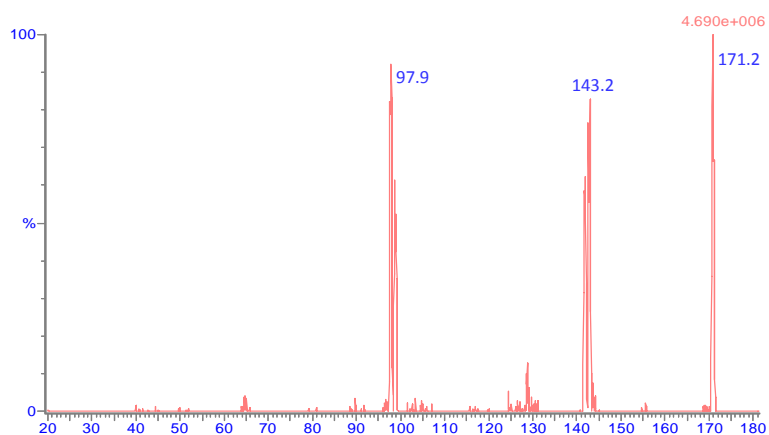


B. **EPB**: 165.1 \rightarrow 91.9 / 165.1 \rightarrow 136.6

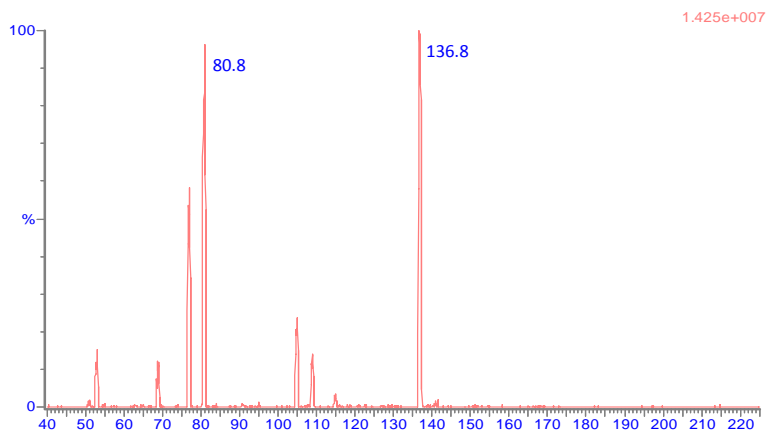


C. **PPB**: 179.1 \rightarrow 91.9 / 179.1 \rightarrow 136.1

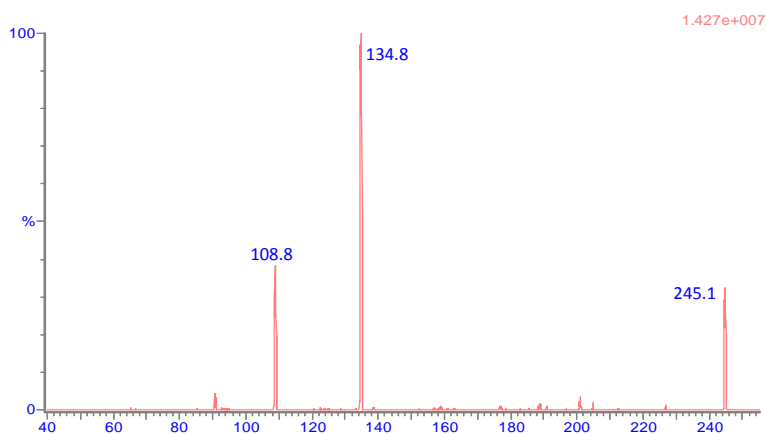


D. BPB: 193.1 → 91.9 / 193.1 → 136.1**E. Ph-PB: 213.1 → 168.8 / 213.1 → 92.8****F. EPB-¹³C₆: 171.2 → 143.8 / 171.2 → 97.9**

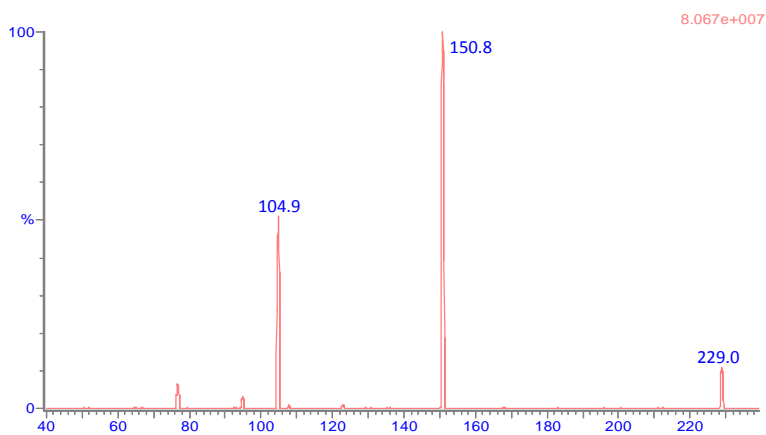
G. **BP-1**: 215.0 → 136.8 / 215.0 → 80.8



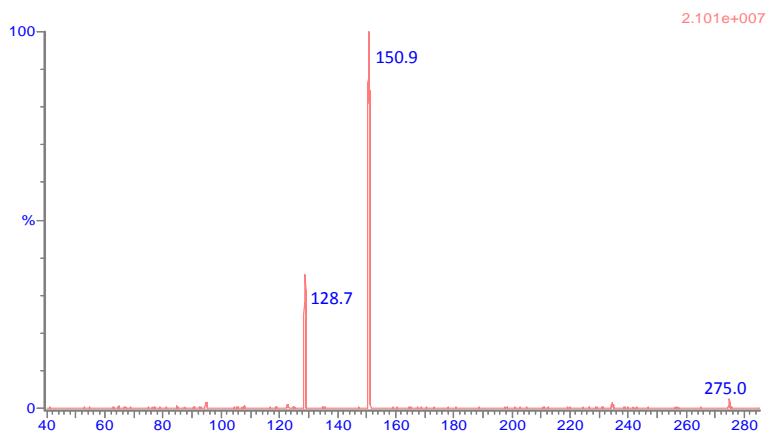
H. **BP-2**: 245.1 → 134.8 / 245.1 → 108.8



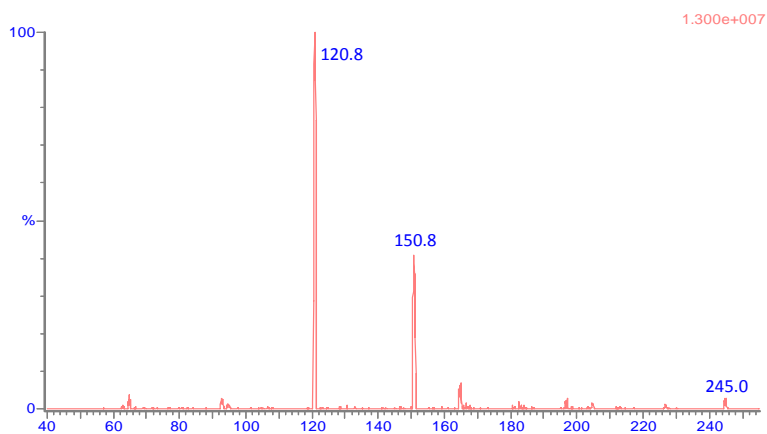
I. **BP-3**: 229.0 → 150.8 / 229.0 → 104.9



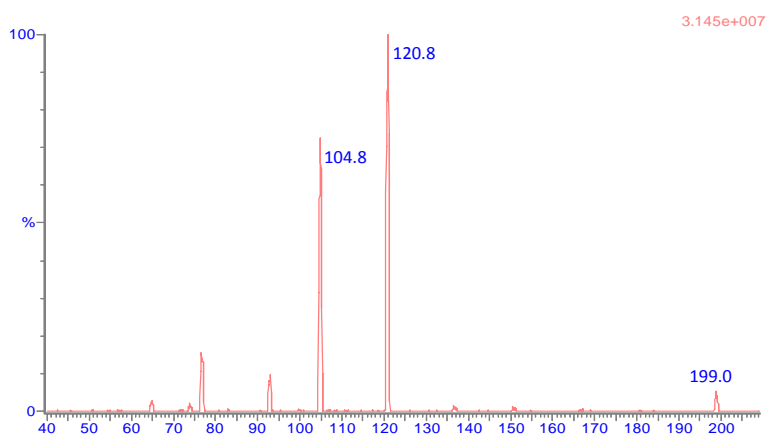
J. **BP-6**: 275.0 → 150.9 / 275.03 → 128.7



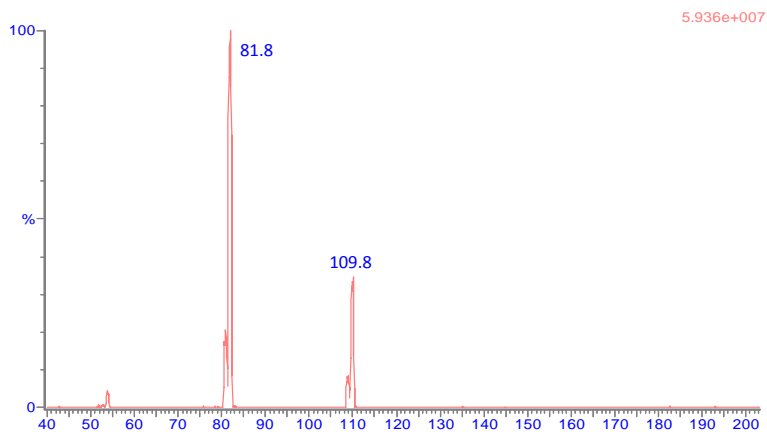
K. **BP-8**: 245.0 → 120.8 / 245.0 → 150.8



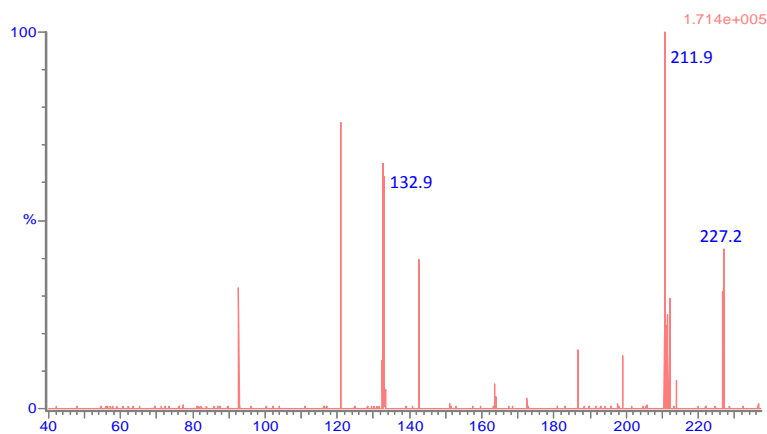
L. **4-OHBP**: 199.0 → 120.8 / 199.0 → 104.8



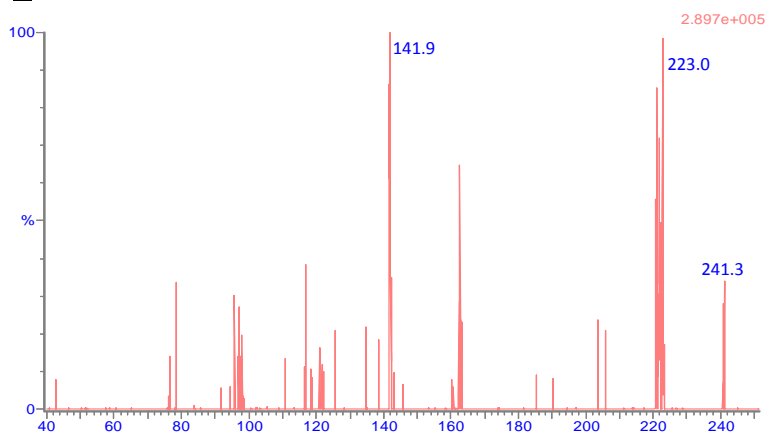
M. **BP-d₁₀**: 193.1 → 109.8 / 193.1 → 81.8



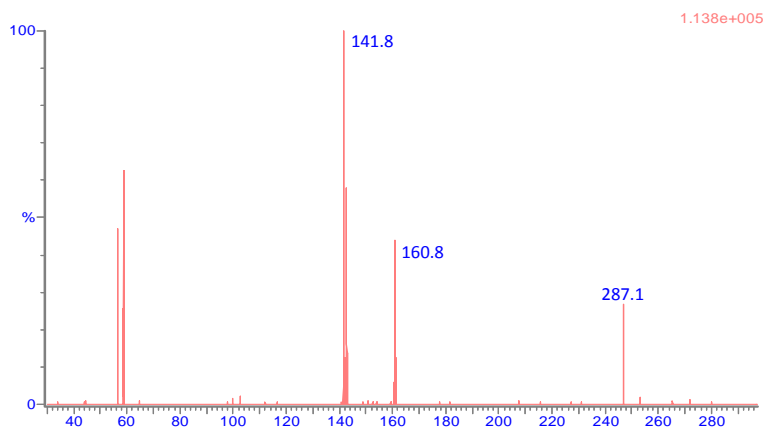
N. **BFA**: 227.2 → 211.9 / 227.2 → 132.9



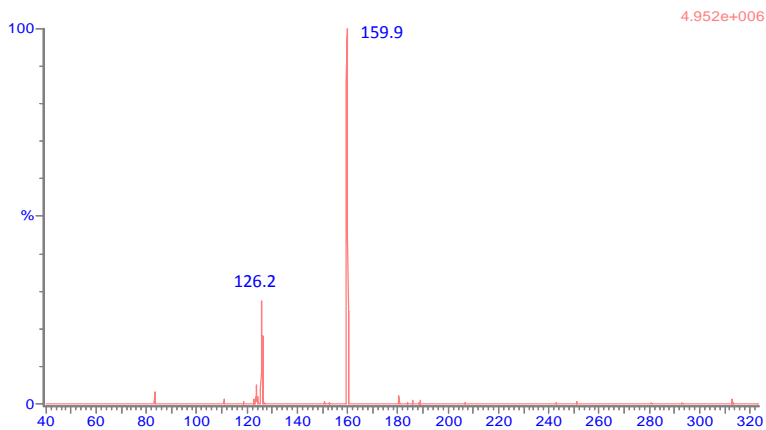
O. **BFA-d₁₆**: 241.3 → 223.0 / 241.3 → 141.9



P. **TCS**: 287.1 → 141.8 / 287.1 → 160.8



Q. **TCB**: 313.1 → 159.9 / 313.1 → 126.2



R. **AMC**: 294.2 → 258.0 / 294.2 → 213.9

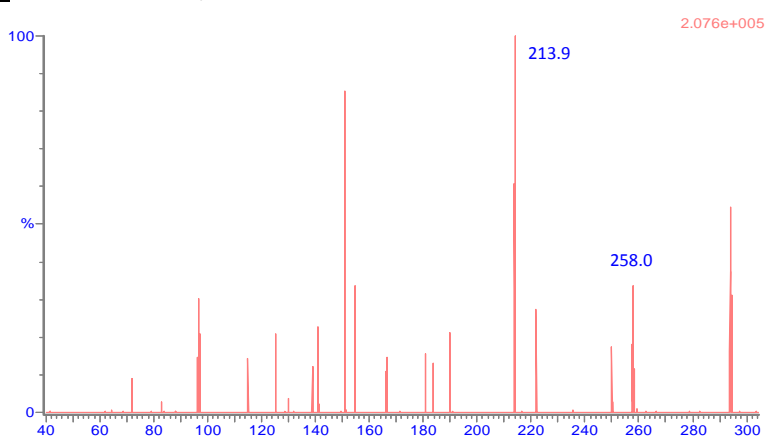


Figura II.7. Espectros de masas de los analitos objeto de estudio

3. Optimización de las Variables del Proceso Cromatográfico

A continuación se describe la optimización del método cromatográfico. Para el desarrollo de los experimentos, se empleó una disolución metanólica de los analitos a una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.1. Selección de la Fase Estacionaria

Dadas las características de los analitos seleccionados, en el desarrollo de la metodología propuesta se ha empleado la cromatografía de líquidos en fase reversa (fase estacionaria menos polar que la fase móvil). Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se seleccionó una columna con relleno C18 (ACQUITY UPLC® BEH C18) de 2.1 x 100 mm y 1.7 μm de tamaño de partícula, partiendo de las siguientes condiciones iniciales:

Tabla II.5. Resumen de las condiciones cromatográficas iniciales

Fase estacionaria	ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 x 100 mm) 1.7 μm		
Fase móvil	A: Agua B: Metanol		
	Tiempo (min)	A %	B %
Modalidad: Gradiente	0.0	40	60
	5.0	12	88
	5.1	40	60
	10.0	40	60
Flujo	0.3 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	4 μL		
Temperatura del horno	40°C		
Detección	ESI-MS/MS		

A continuación se muestra el cromatograma obtenido en las condiciones iniciales seleccionadas.

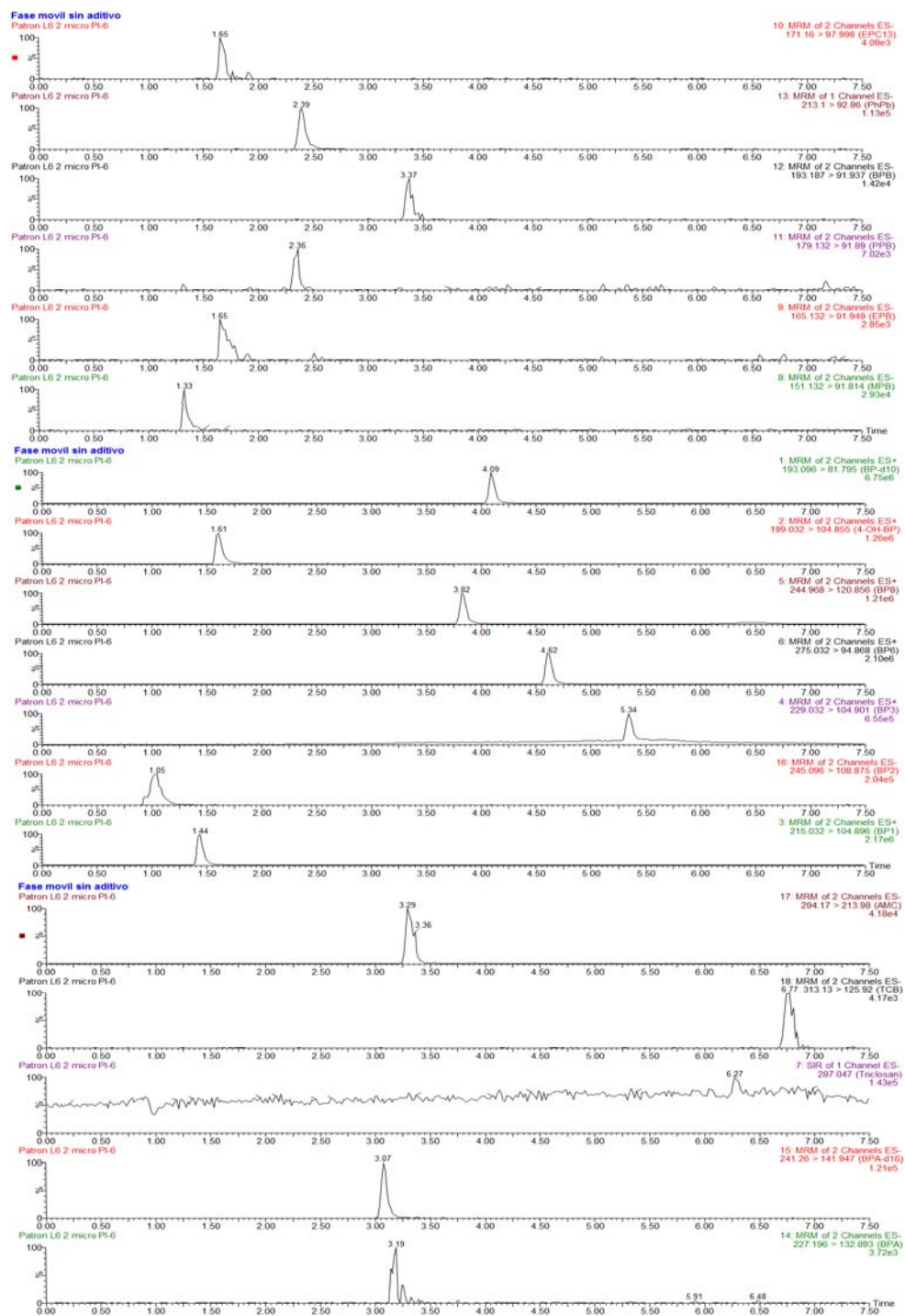


Figura II.8. Cromatograma obtenido a partir de las condiciones iniciales para todos los analitos

3.2. Estudio de la Composición de la Fase Móvil

A continuación, se describen los ensayos realizados para la optimización de la composición de la fase móvil.

Como hemos visto en la tabla anterior, el trabajo experimental se comenzó empleado agua y metanol puros como eluyentes. A pesar de que la resolución, usando estos dos eluyentes, fue aceptable, tal y como se ha mostrado en el cromatograma anterior, con el objeto de mejorar tanto la separación cromatográfica como la eficiencia de la ionización de los analitos en el espectrómetro de masas, se estudió la adición de distintas cantidades de dos aditivos a la fase móvil, ácido fórmico (medio ácido) y amoniaco (medio básico).

En la **figura II.9** se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido con ácido fórmico y en la **figura II.10** con amoniaco.

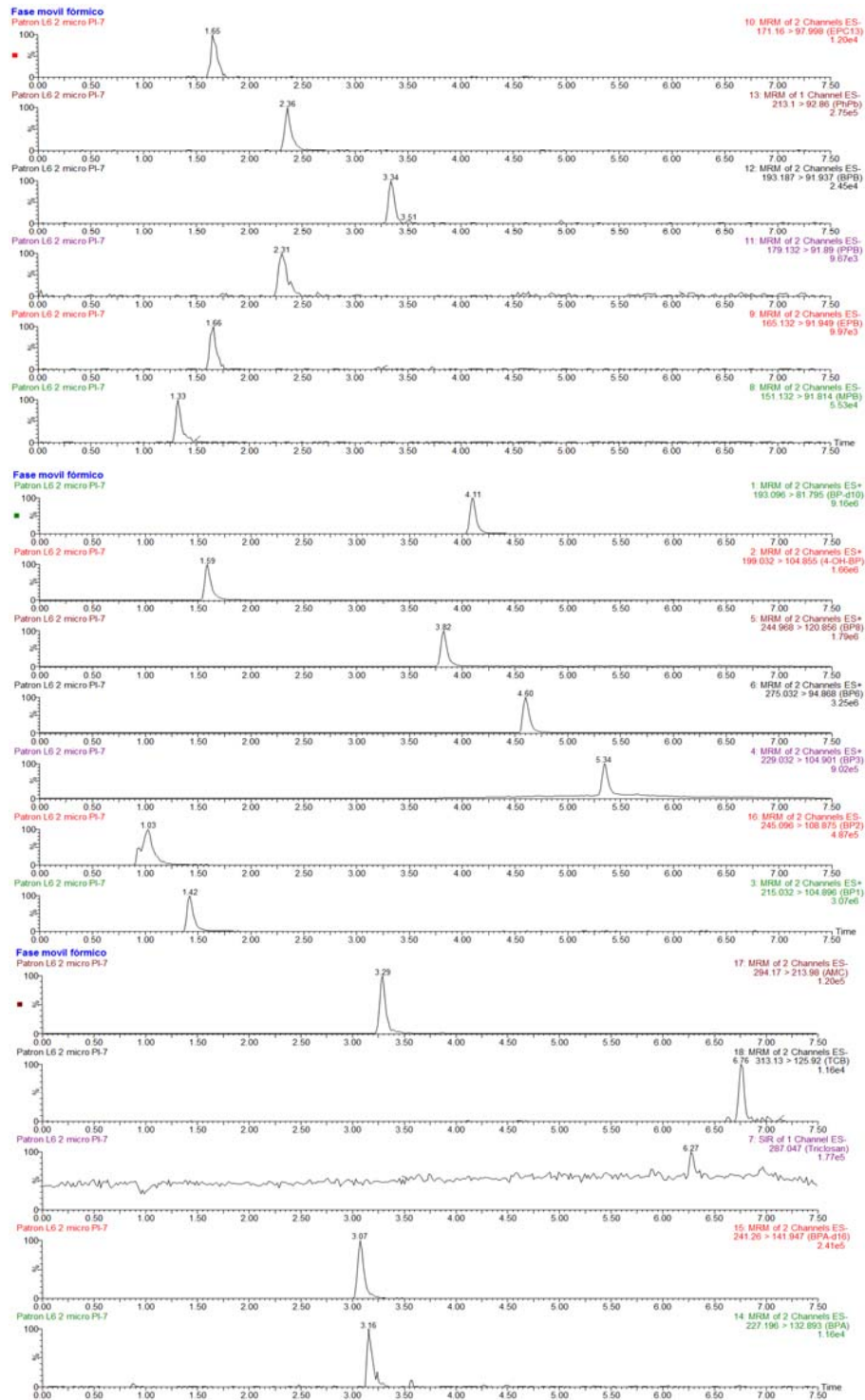


Figura II.9. Cromatograma obtenido con ácido fórmico como aditivo

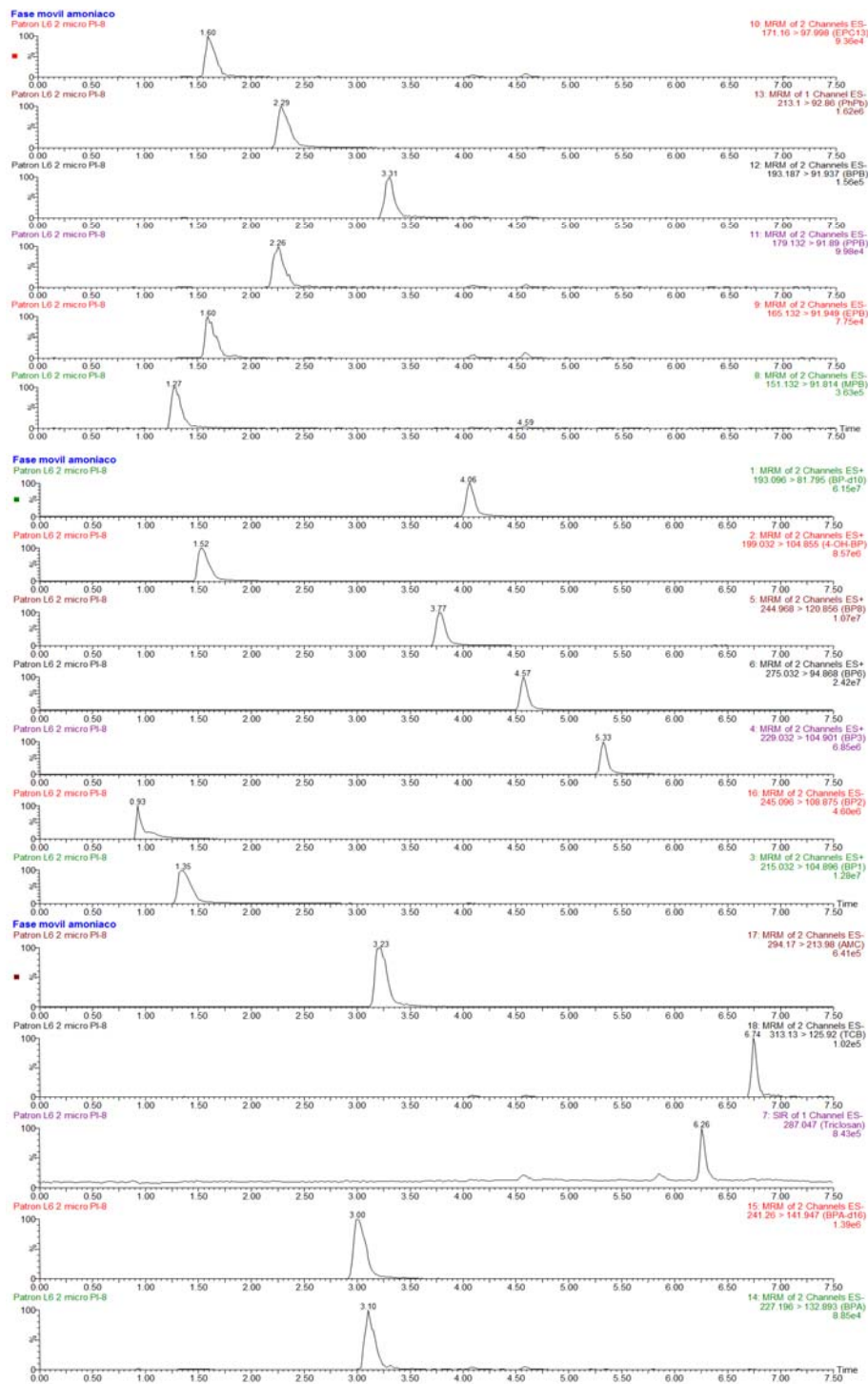


Figura II.10. Cromatograma obtenido con amoniaco como aditivo

Se observa que aunque el uso de ácido fórmico como aditivo ofreció buenos resultados, la intensidad de los picos cromatográficos fue menor que con amoniaco. El uso de este segundo aditivo proporcionó una mejora notable tanto en la separación y forma de los picos, como en la ionización de los analitos, por lo que se seleccionó este aditivo como adecuado.

A continuación, se procedió a estudiar el porcentaje de amoniaco en los eluyentes. Se ensayaron porcentajes de 0.01 %, 0.025 %, 0.05 % y 0.10 % (p/V), siendo 0.025 % el que mejor resultados ofreció, en cuanto a ionización, resolución y forma de pico, siendo el % seleccionado.

3.3. Optimización del Gradiente

Se ensayaron diferentes gradientes con el objetivo de obtener una separación adecuada en el tiempo de análisis más corto posible, a continuación se muestran los gradientes estudiados.

Tabla II.6. Gradientes ensayados en la puesta a punto del método cromatográfico

Gradiente 1			Gradiente 2		
Tiempo (min)	%A	%B	Tiempo (min)	%A	%B
0.0	40	60	0.0	40	60
5.0	12	88	3.5	40	60
5.1	40	60	4.0	0	100
10.0	40	60	6.5	0	100
			6.6	40	60
			10.0	40	60

Gradiente 3		
Tiempo (min)	%A	%B
0.0	40	60
4.0	0	100
6.5	0	100
6.6	40	60
10.0	40	60

Se seleccionó el gradiente 3, por presentar una mejor resolución de los analitos en el menor tiempo posible. En la figura se muestra el cromatograma obtenido en estas condiciones.

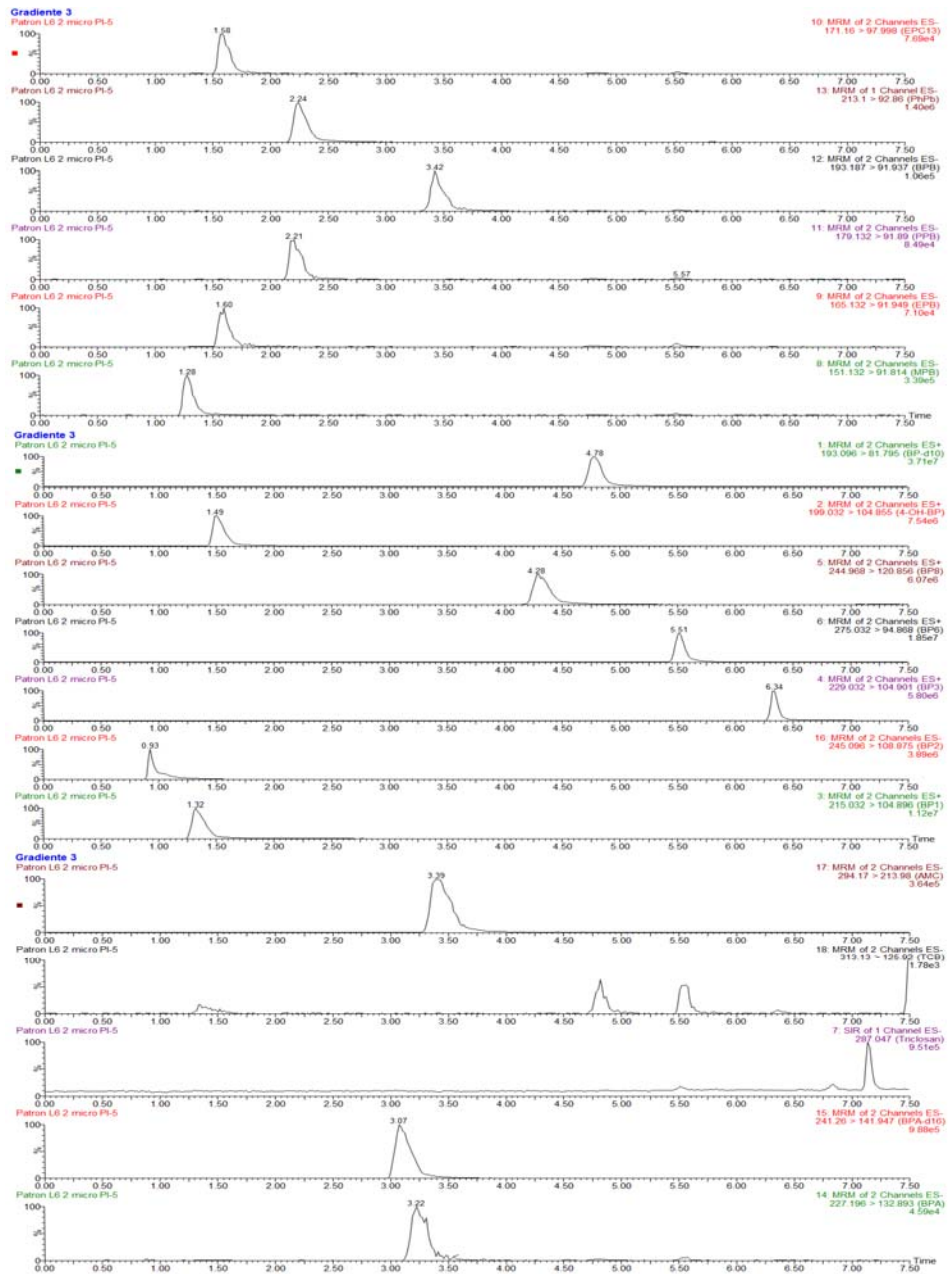


Figura II.11. Cromatograma obtenido con el gradiente óptimo

3.4. Influencia de la Temperatura de la Columna

La temperatura de la columna debe ser controlada para obtener resultados reproducibles. Por tanto, se debe trabajar con un sistema capaz de fijarla. Un aumento en la misma representa una disminución en la viscosidad de la fase móvil y con ello de la presión del sistema, mejorando la eficiencia de la separación. Por su lado, un aumento excesivo de la temperatura podría descomponer a los analitos termolábiles.

Para optimizar este parámetro se llevó a cabo un estudio de la temperatura en el intervalo comprendido entre 30°C y 90°C (temperatura máxima que permite el equipo empleado), observándose el mejor rendimiento de la columna a una temperatura de 40°C, siendo ésta la temperatura fijada para el resto de experiencias.

3.5. Estudio del Flujo y Volumen de Inyección

Con objeto de disminuir el tiempo de análisis, sin perjudicar tanto a la resolución como a la calidad de los picos cromatográficos, se llevó a cabo un estudio del flujo de fase móvil. El flujo fue modificado entre 0.10 mL min⁻¹ y 0.40 mL min⁻¹ en intervalos de 0.05 mL min⁻¹. Los resultados obtenidos, en cuanto a las características de pico cromatográfico y condiciones instrumentales (presión), demostraron que el flujo de fase móvil que generaba los mejores resultados fue 0.30 mL min⁻¹, siendo éste el elegido como óptimo.

A continuación, se estudió la influencia del volumen de inyección para aumentar la sensibilidad del método analítico sin comprometer las características cromatográficas de los picos. Se ensayaron volúmenes de inyección entre 2 y 10 µL, observándose que, a medida que se aumentaba el volumen, los picos se ensanchaban y deformaban notablemente. De los

volúmenes ensayados, fue el volumen de 4 μL el que generó los mejores resultados en términos de intensidad, resolución y forma de pico, siendo este volumen el fijado como óptimo.

3.6. Resumen de las Condiciones Óptimas de Trabajo

En la **tabla II.7** se muestra un resumen de los valores óptimos fijados para la separación cromatográfica.

Tabla II.7. Valores óptimos de las condiciones cromatográficas

Fase estacionaria	ACQUITY UPLC [®] BEH C18 (2.1 x 100 mm) 1.7 μm		
Fase móvil	A: Agua (0.025 % amoniaco) B: Metanol (0.025 % amoniaco)		
	Tiempo (min)	A %	B %
	0.0	40	60
Modalidad: Gradiente	6.0	0	100
	6.5	0	100
	6.6	40	60
	10.0	40	60
Flujo	0.3 mL min ⁻¹		
Volumen de inyección	4 μL		
Temperatura del horno	40°C		
Detección	ESI-MS/MS		

La **figura II.13** muestra el cromatograma final obtenido en dichas condiciones.

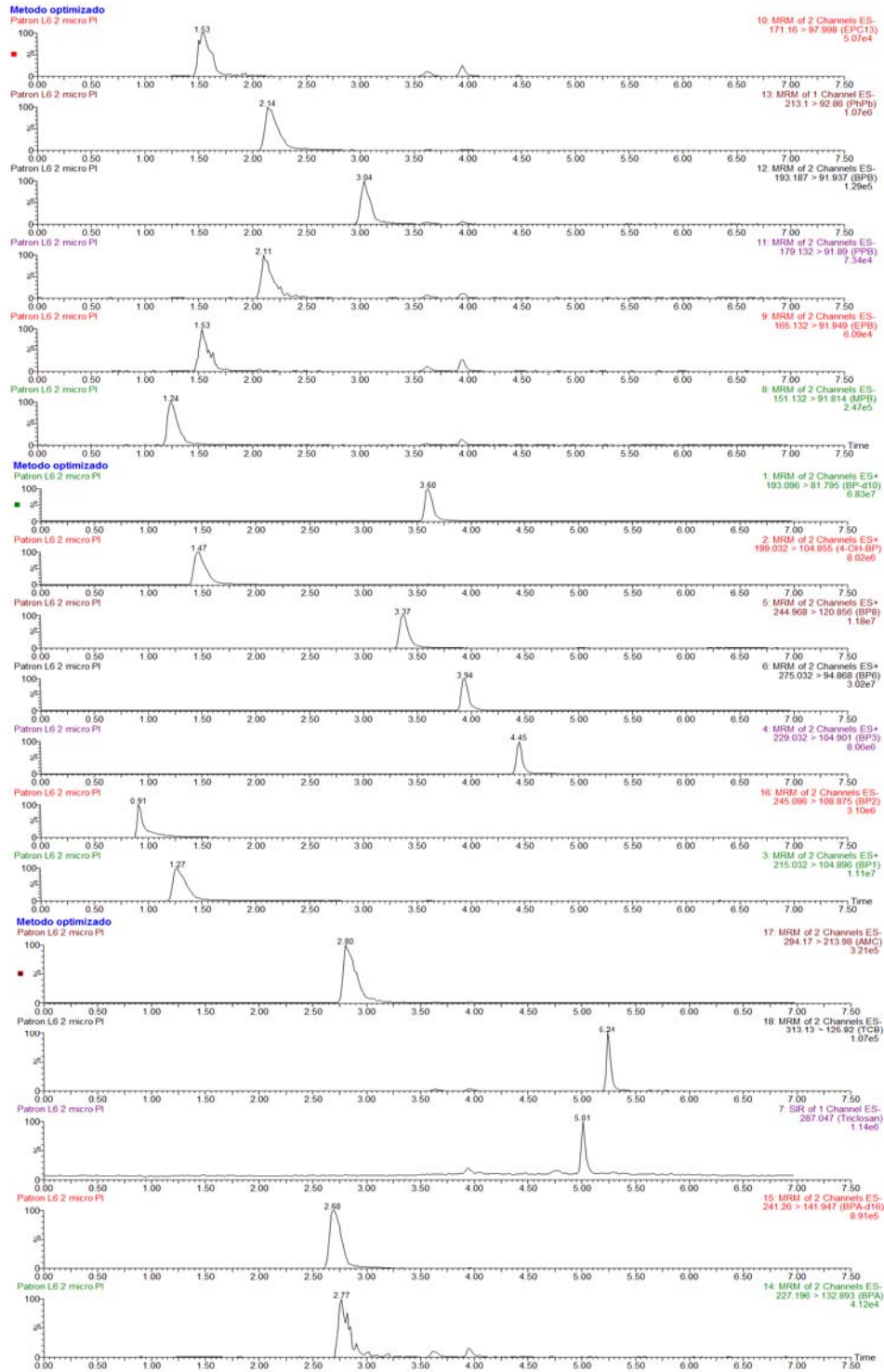


Figura II.13. Cromatograma obtenido en las condiciones óptimas

CAPÍTULO III

Tratamiento de Muestra. Optimización
de la Técnica de Extracción Mediante
Ultrasonidos

La extracción y purificación de compuestos orgánicos en muestras medioambientales de carácter sólido, presenta grandes dificultades debido a la complejidad de la matriz. Entre otros, los problemas principales que suelen encontrarse en el tratamiento de la muestra son:

- Las fuertes interacciones que se producen entre el analito y la superficie del sólido.
- La presencia de huecos intersticiales donde se adsorben los analitos impidiendo que sean accesibles al disolvente de extracción.
- La gran presencia de interferentes que puedan co-extraerse.
- El alto contenido en materia orgánica

Estas dificultades pueden ser aún mayores cuando se trata de matrices sólidas muy contaminadas y con mayor contenido en materia orgánica, como es el caso de dos de las matrices seleccionadas a lo largo de trabajo experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral, el lodo de depuradora y el compost procedente de dicho lodo.

Debido a las diferentes propiedades físico-químicas de las sustancias seleccionadas para su estudio en este trabajo (PBs, BPs, BFA, TCS y TCB), tradicionalmente se ha hecho necesario recurrir a métodos de extracción y análisis específicos para cada familia de compuestos. En la literatura científica se han publicado numerosas metodologías para la determinación

de estas familias de compuestos, de forma individual, en diferentes matrices medioambientales¹²³⁻¹³³.

-
- ¹²³ Canosa P., Pérez-Palacios D., Garrido-López A., Tena M.T., Rodríguez I., Rubí E., Cela R. Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and TCS in indoor dust. *Journal of Chromatography A* 1161 (2007) 105-112.
- ¹²⁴ Núñez, L., Tadeo, J.L., García-Valcárcel, A.I., Turiel, E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 178-182.
- ¹²⁵ Regueiro, J., Becerril, E., García-Jares, C., Llompart, M. Trace analysis of parabens, TCS and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4693-4702.
- ¹²⁶ Núñez, L., Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo, J.L. Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection. *Talanta* 80 (2010) 1782-1788.
- ¹²⁷ Buchberger, W.W. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 603-618.
- ¹²⁸ Ferreira, A.M.C., Möder, M., Laespada, M.E.F. Stir bar sorptive extraction of parabens, TCS and methyl TCS from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3837-3844.
- ¹²⁹ Ramírez, N., Marcé, R.M., Borrull, F. Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6226-6231.
- ¹³⁰ Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., Vílchez, J.L. Analysis of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples. Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *Journal of Chromatography A* 1253 (2012) 1-10.
- ¹³¹ Jeon, H.K., Chung, Y., Ryu, J.C. Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1131 (2006) 192-202.
- ¹³² Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R.M., Pocurull, E. Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 5619-5625.
- ¹³³ Liu, Y.S., Ying, G.G., Shareef, A., Kookana, R.S. Simultaneous determination of benzotriazoles and ultraviolet filters in ground water, effluent and biosolid samples using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5328-5335.

Hasta la fecha no existe ninguna metodología publicada que permita el análisis de todos estos compuestos de manera simultánea en al menos una de las tres matrices incluidas en la presente memoria. Disponer de métodos multi-residuo que permitan el análisis simultáneo de estas sustancias en las matrices seleccionadas supone una gran ventaja, tanto en costos como en tiempo de análisis.

En la actualidad, las técnicas de extracción más empleadas para el análisis de estos compuestos son la extracción con disolventes presurizados (PLE)^{123,132}, con ultrasonidos (USE)^{124,130}, asistida con microondas (MAE)¹³⁴, y combinaciones de estas técnicas con otras para muestras líquidas como la “stir bar sorptive extraction” (SBSE)^{128,129}. Además de estas técnicas instrumentales, también se ha empleado la extracción sólido-líquido clásica (SLE).

En esta Tesis se han seleccionado, por criterios de disponibilidad de instrumentación, las técnicas de USE, PLE y la SLE clásica, acompañada esta última de la técnica de los QuEChERS para la limpieza de los extractos obtenidos, como técnicas de extracción para el desarrollo de metodologías multi-residuo que permitan el análisis conjunto de los analitos seleccionados en lodos de depuradora, compost y suelos agrícolas.

En los próximos capítulos se desarrollará la optimización de cada una de estas técnicas y se validarán los métodos analíticos propuestos mediante el empleo de cada una de ellas.

¹³⁴ Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A.L. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2415-2440.

1. Descripción de la Técnica de Extracción

1.1. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)

La técnica de extracción asistida por ultrasonidos es una técnica instrumental de extracción sólido-líquido¹³⁵, en la que una muestra se pone en contacto con un disolvente y se somete a los ultrasonidos generados en un baño de agua o por una sonda de ultrasonidos. De este modo, se produce la agitación continua de la matriz con el disolvente de extracción. El efecto mecánico de los ultrasonidos provoca una mayor penetración del disolvente en los materiales sólidos, facilitando la transferencia de los analitos. Es una técnica muy útil en el tratamiento de muestras sólidas en múltiples aplicaciones¹³⁶.

El sonido, incluyendo el ultrasonido, es transmitido a través de cualquier medio físico (sólido, líquido o gas) por medio de ondas que comprimen y estiran el espacio molecular a lo largo de su paso por el medio. Las ondas de sonido deben viajar a través de la materia, produciendo ciclos de expansión y compresión mientras viajan a través del medio. La expansión hace que las moléculas se separen, mientras que la compresión las acerca. Las ondas del ultrasonido tienen una frecuencia mucho mayor que el rango audible a los humanos (10-16 kHz).

¹³⁵ Suslick, K.S. The Chemical Effects of Ultrasound. *Scientific American* 260 (1989) 80-86.

¹³⁶ Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. Ultrasound: a powerful tool leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 41-47.

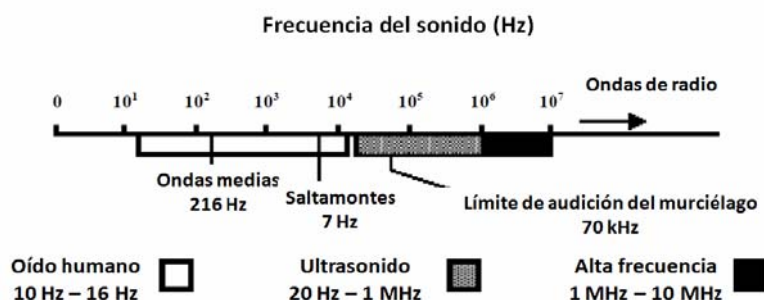


Figura III.1. Región de frecuencias del ultrasonido¹³⁷

En un líquido, el ciclo de expansión produce presión negativa. Si el ultrasonido es lo suficientemente fuerte, este ciclo puede crear burbujas o cavidades en el líquido. La presión negativa excede la fuerza de la tensión local del líquido. El proceso por el cual se forman las burbujas de vapor, crecen y sufren el colapso implosivo que recibe el nombre de “cavitación”, el cual tiene lugar en alrededor de 400 ms.

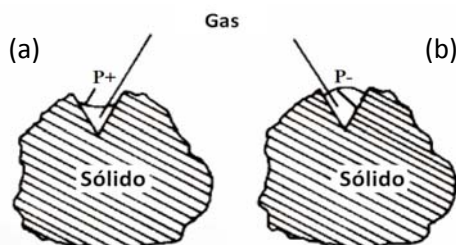


Figura III.2. Efecto del gas aprisionado en el poro de una partícula: (a) presión positiva, (b) presión negativa¹³⁸.

El origen de la cavitación está en el hecho de que debido a los ciclos periódicos de compresión y expansión se produce el aumento del tamaño de la cavidad, alcanzando en un momento dado un tamaño crítico y una implosión, liberando calor y presión en un periodo de tiempo muy corto y

¹³⁷ Mason, T.J. Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry. Mason T.S. Ed., *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.* (1990) 250-252.

¹³⁸ Lorimer, J.P., Mason, T.J. Sonochemistry Part 1-The physical aspect. *Chemical Society Reviews* 16 (1987) 239-274.

en determinados puntos del líquido¹³⁸. La temperatura de la implosión¹³⁵ es próxima a los 5.500°C (similar a de la superficie solar), mientras que alrededor de la cavidad es de 2.100°C. La presión está estimada en torno a las 500 atm.

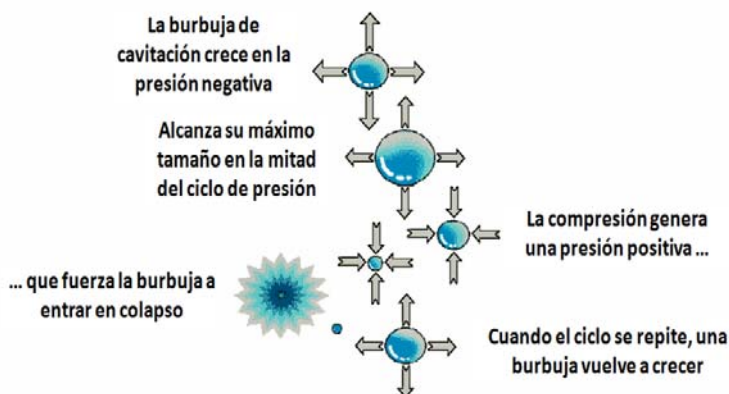


Figura III.3. Esquema de la implosión de una burbuja

La cavitación acústica proporciona una interacción única entre la materia y la energía, de forma que la dinámica del colapso de la cavidad cambia drásticamente. La energía potencial de la burbuja expandida se transforma en energía cinética que se propaga a gran velocidad, chocando con las partículas de la muestra. Estas colisiones provocan la ruptura de la matriz, generando partículas más pequeñas y exponiendo una mayor superficie al disolvente¹³⁹. Este hecho, junto a las altas temperaturas y las altas presiones, provocan el aumento de la solubilidad y la difusividad, favoreciendo la penetración y el transporte. Esto justifica el alto poder extractivo de esta técnica¹⁴⁰.

¹³⁹ Capelo, J.L., Mota, A.M. Ultrasonication for analytical chemistry. *Current Analytical Chemistry* 1 (2005) 193-201.

¹⁴⁰ Bossio, J.P., Harry, J., Kinney, C.A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds. *Chemosphere* 70 (2008) 858-864.

Existen dos dispositivos comúnmente empleados para la aplicación de ultrasonidos, los baños y las sondas. Aunque los baños son los más usados, presentan algunas desventajas, como la falta de uniformidad en la distribución de la energía y la disminución de la potencia en el tiempo. Además, su aplicación suele estar acompañada de una reducción de la repetibilidad y la reproducibilidad. Los sistemas que emplean sondas tienen la ventaja de enfocar su energía en una región localizada, por lo que proporciona una cavitación más eficiente. En el desarrollo de esta Tesis se ha utilizado el sistema de sonda mostrado en la **figura III.4**.

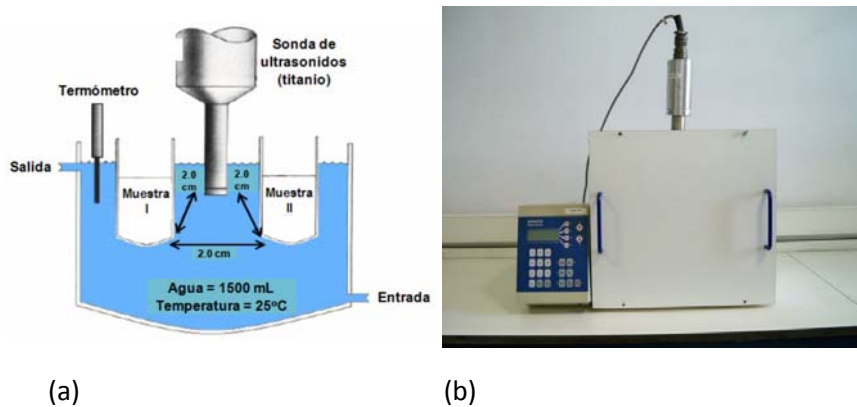


Figura III.4. (a) Esquema del proceso de extracción mediante ultrasonidos, (b) equipo de ultrasonido

La técnica de extracción con ultrasonidos presenta grandes ventajas, como son:

- Tiempos de extracción en general no muy elevados.
- Permite la extracción de analitos termolábiles.

- Permite la adición de un coextractante para modificar la polaridad¹⁴¹.
- Se emplea un equipo de bajo costo.
- Permite la extracción de una amplia variedad de compuestos, de diferentes polaridades, ya que puede emplear cualquier disolvente.

1.2. Toma y Preparación de las Muestras Estudiadas

Las muestras de lodo de depuradora y compost fabricado a partir de este lodo, fueron recolectadas en la empresa compostadora “Biomasa del Guadalquivir” situada en Santa Fe (Granada). Las muestras de compost fueron tomadas durante las diferentes etapas del proceso y al final del mismo. Las muestras, recogidas en botellas de polietileno, se trasladaron al laboratorio donde se secaron en estufa a 60°C, se trituraron en un molino y se tamizaron en tamiz de una malla de 1.41 mm. Por último fueron conservadas a 4°C en oscuridad, hasta el momento de su análisis, para evitar la degradación de los analitos.

En el caso del suelo agrícola, el muestreo se realizó en una parcela experimental situada en la Vega de Granada que tiene una extensión de 2.500 m². En esta parcela se realizó el estudio de campo que se describirá en próximos capítulos de la presente Memoria. A cada muestra de suelo, en el momento de su recogida, se le añadió 5 mL de formaldehído 1 % (m/V) para detener el crecimiento microbiano, se secó al sol, se tamizó y se introdujo en una bolsa de plástico herméticamente cerrada para su traslado al laboratorio.

¹⁴¹ Suslick, K.S. Modern Synthetic Methods. *Schelfold R., Ed. Springer Verlag, Berlin, Germany* 4 (1986) 1-60.

2. Selección y Optimización de las Variables del Proceso de Extracción

Para la optimización del proceso de extracción en cada una de las matrices seleccionadas, se eligieron los parámetros más influyentes en el proceso de extracción. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Naturaleza del disolvente.
- Volumen del disolvente.
- Tiempo de extracción.
- Ciclos de extracción.

En cuanto a la amplitud de las ondas de ultrasonido, esta variable está relacionada con la potencia de la sonda, de modo que, un 50 % de amplitud corresponde a usar el 50 % de la potencia del equipo. Una amplitud superior al 75 % acorta notablemente la vida de la sonda y encarece el proceso. Por tanto, se fijó la amplitud en el 75 % para todas las experiencias.

El procedimiento general seguido para la optimización de las variables de la extracción (en lodo de depuradora, compost y suelo agrícola) fue el siguiente:

Se pesó 0.5 g de muestra sólida en la celda metálica, dopándose a continuación con una disolución metanólica de los analitos en estudio a las concentraciones mostradas en la **tabla III.1**. Seguidamente, se agitó

durante 2 min en un vortex dejándose reposar un mínimo de 24 h, con el objeto de alcanzar el equilibrio entre los analitos y la matriz. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción de las muestras.

Tabla III.1. Concentración del analito en las muestras dopadas

Analito	$\mu\text{g kg}^{-1}$	Analito	$\mu\text{g kg}^{-1}$
EPB, PPB, BPB, BP-3, 4-OHBP	12	BFA	100
MPB	40	BP-6	80
Ph-BP, BP-2	180	TCB	6
BP-1	60	TCS	40
BP-8	20		

El valor óptimo de cada variable fue determinado a través del porcentaje de recuperación de los analitos en las muestras dopadas con las concentraciones anteriormente mostradas.

2.1. Selección del Disolvente de Extracción

Para la optimización de esta variable se empleó una metodología univariante. La optimización partió de las siguientes condiciones generales de extracción: 20 min de tiempo, 75 % de amplitud y 10 mL de volumen de disolvente.

Se ensayaron varios disolventes teniendo en cuenta el rango de polaridad que cubren estos compuestos: metanol, acetonitrilo, acetona y acetato de etilo. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de las matrices estudiadas.

- **Lodo de depuradora.** La *figura III.5* muestra los resultados obtenidos.

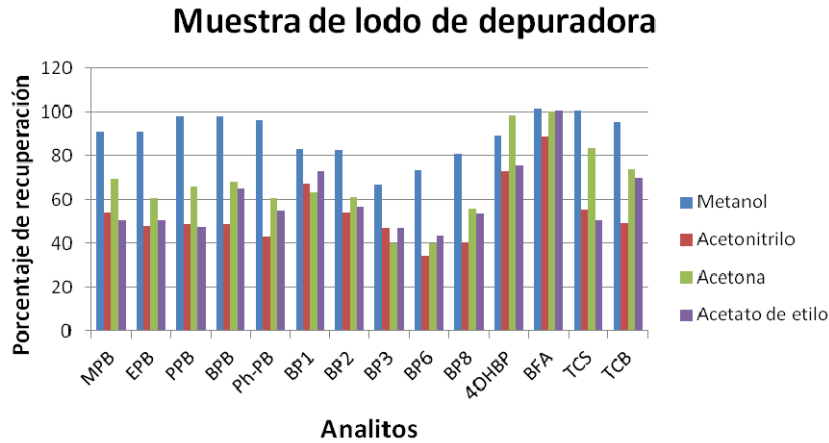


Figura III.5. Influencia de la naturaleza del disolvente en lodo de depuradora

Se observa que las mejores recuperaciones, para la mayor parte de los analitos, se obtuvieron cuando se utilizó metanol como disolvente de extracción. Por tanto, este disolvente fue elegido para continuar la optimización de las variables de extracción.

- **Compost.** En la *figura III.6*, se muestran los resultados obtenidos.

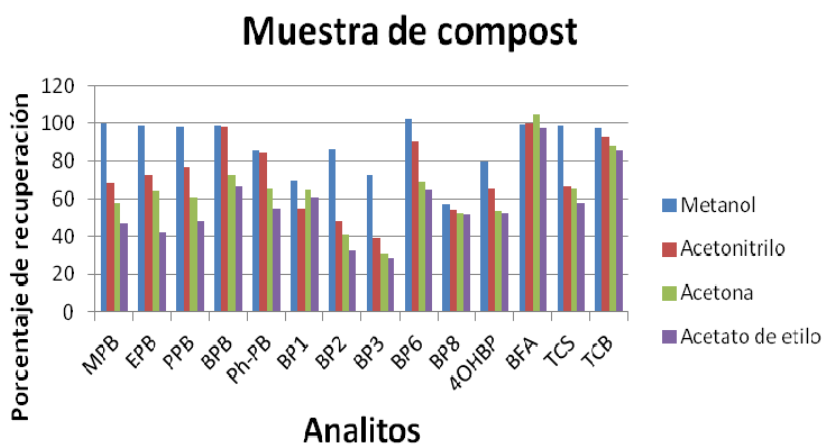


Figura III.6. Influencia de la naturaleza del disolvente en compost

En este caso, se observa también que las mejores recuperaciones, para la mayoría de los analitos, se obtienen con metanol.

➤ **Suelo.** En la *figura III.7* se muestran los resultados obtenidos.

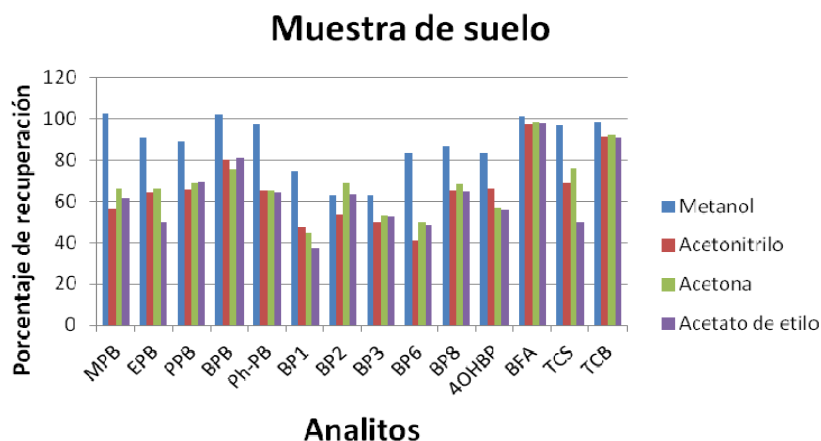


Figura III.7. Influencia de la naturaleza del disolvente en suelo

Al igual que en el caso del lodo y del compost las mejores recuperaciones, para la mayoría de los analitos, se obtuvieron cuando se utilizó metanol como disolvente de extracción.

2.2. Optimización del Tiempo y Volumen de Extracción

Dado que estos dos parámetros están estrechamente relacionados entre sí, en las tres matrices estudiadas (lodo de depuradora, compost y suelo agrícola), la optimización se llevó a cabo mediante metodología multivariante. Para ello, se desarrolló un diseño experimental de superficie de respuesta de tipo Doehlert¹⁴². Para dos variables el diseño consiste en

¹⁴² Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies C., Bensoussan, M. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of penicillium chrysogenum. *Journal of Applied Microbiology* 91 (2001) 900-906.

un punto central y otros seis puntos que forman un hexágono regular al rededor de dicho punto central¹⁴³. El ensayo constó de nueve experimentos (tres de ellos puntos centrales), siendo seleccionada como variable de respuesta la suma de las áreas por familias de compuestos.

Los máximos y mínimos de los factores experimentales, se fijaron de acuerdo a las posibilidades del sistema experimental. Para el tiempo, el valor mínimo fue de 5 min y el máximo de 25 min. Para el volumen, se estableció un mínimo de 5 mL y un máximo de 15 mL. La matriz Doehlert final fue la que se resume en la siguiente tabla.

Tabla III.2. Diseño experimental para tiempo y volumen de extracción

Tiempo total (minutos)	Volumen de extracción (mL)
15	10
15	10
15	10
25	10
20	15
5	10
10	15
20	5
10	15

La evaluación de los resultados se basó en el estudio del gráfico de Pareto, el análisis de la varianza, el gráfico de la superficie de respuesta y el óptimo calculado.

¹⁴³ Ferreira, S.L.C., Dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., Neto, B.B., Bosque-Sendra, J.M. Doehlert matrix: a chemometric tool analytical chemistry-review. *Talanta* 63 (2004) 1061-1067.

El primer parámetro estudiado fue el gráfico de Pareto, el cual indica qué variables suficientemente significativas como para ser representativas en el sistema propuesto. A continuación se describe el estudio de este parámetro para las tres matrices.

➤ **Lodo de depuradora.** En la *figura III.8* se muestran los gráficos de Pareto obtenidos para cada familia de compuestos.

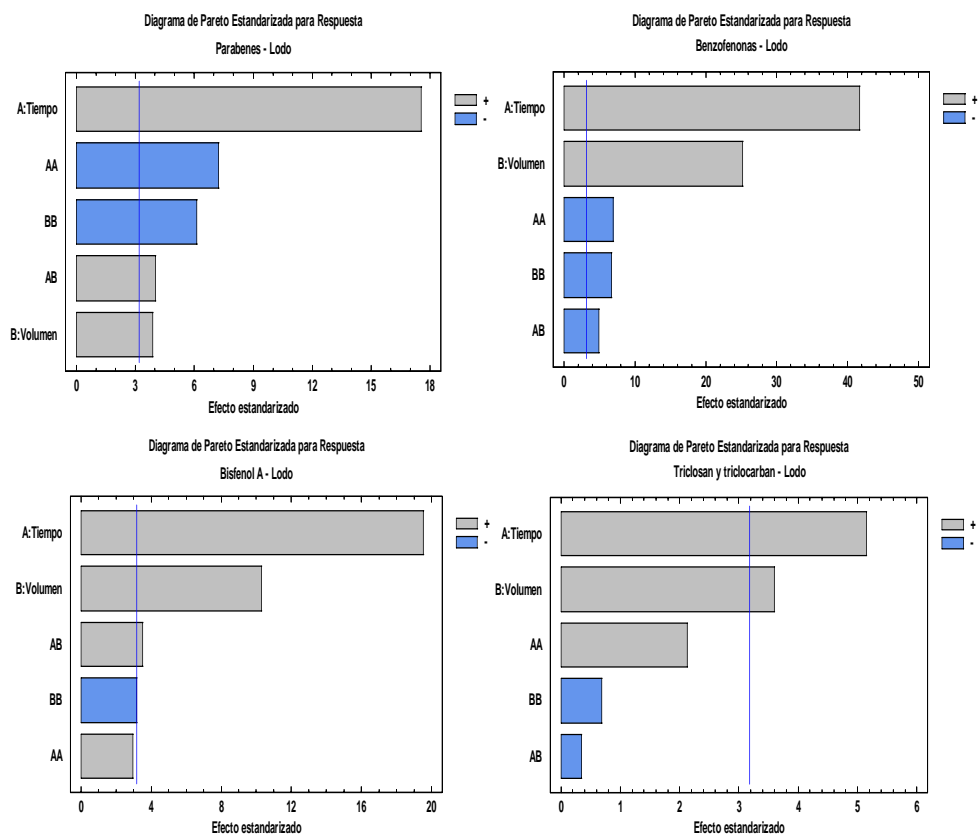


Figura III.8. Gráficos de Pareto en lodos de depuradora: PBs, BPs, BFA, TCS y TCB

Como se observa en las representaciones, las dos variables ensayadas también son significativas y tienen un efecto positivo en el proceso de extracción.

- **Compost.** En la **figura III.9**, se muestran los gráficos de Pareto obtenidos para cada familia de compuestos en las muestras de compost.

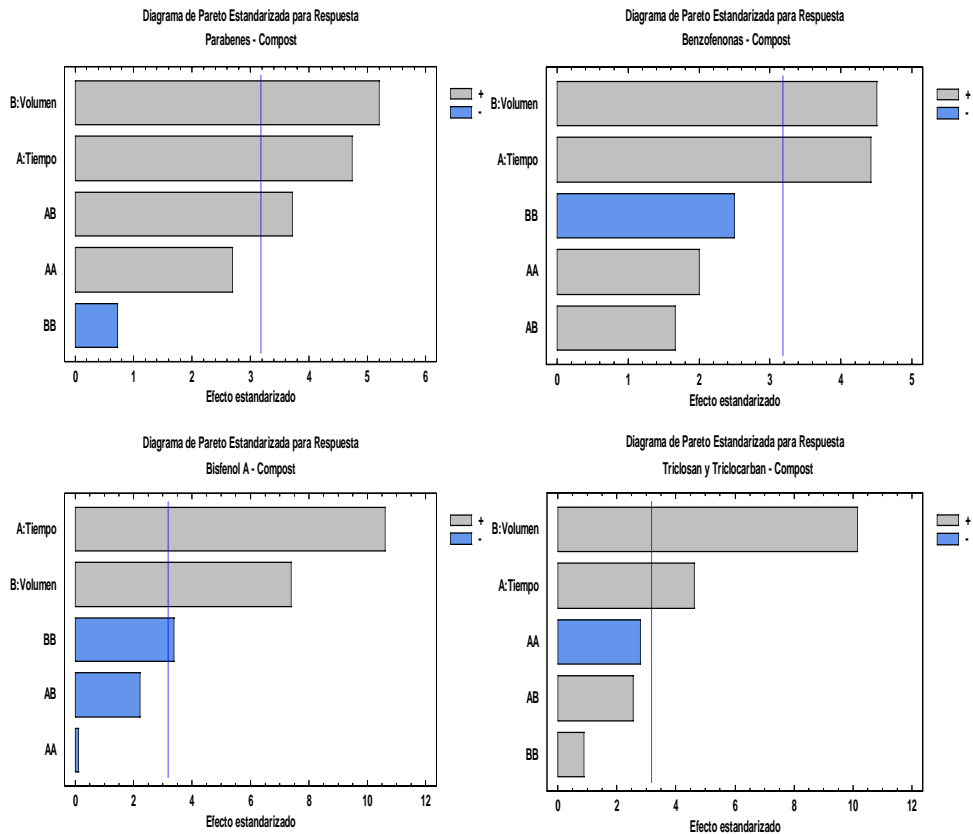


Figura III.9. Gráficos de Pareto el compost:
PBs, BP, BFA y TCS-TCB

Al igual que en el caso del lodo, los resultados obtenidos demuestran que, para todos los compuestos estudiados, las dos variables ensayadas son significativas y tienen un efecto positivo sobre el proceso de extracción.

- **Suelo.** En la **figura III.10** se muestran los gráficos de Pareto obtenidos para cada familia de compuestos en las muestras de suelo agrícola.

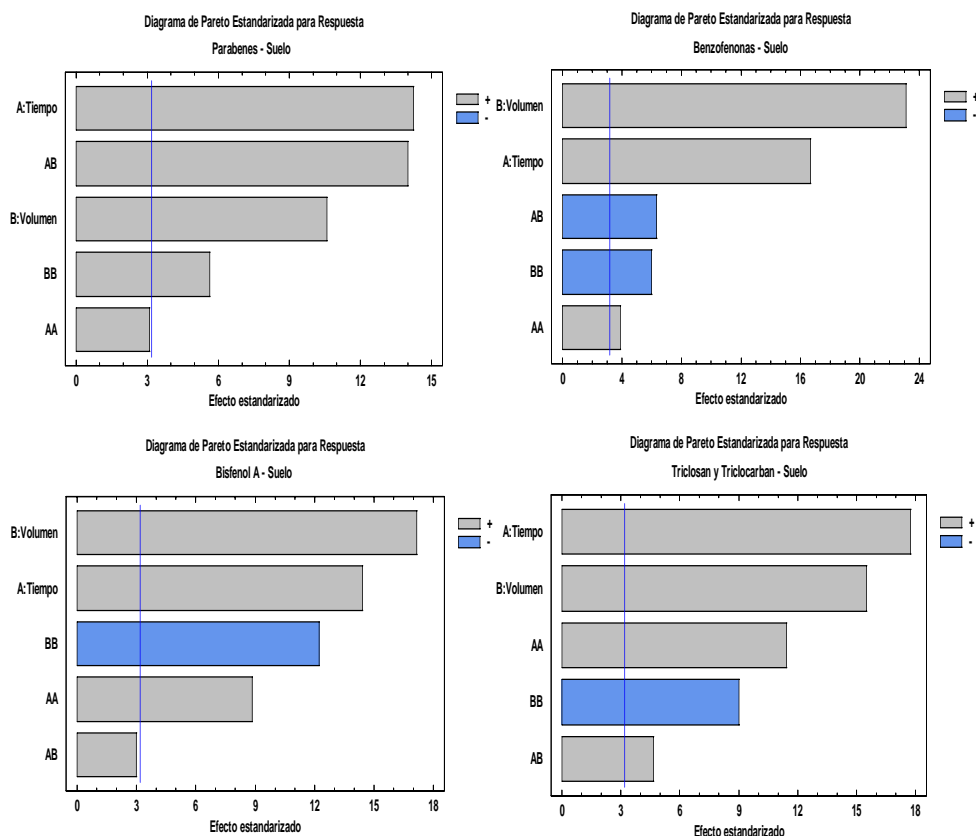


Figura III.10. Gráficos de Pareto en el suelo agrícola: PBs, BPs, BFA y TCS-TCB

Según los resultados mostrados en los gráficos de Pareto, para todos los compuestos estudiados, las dos variables son significativas y tienen un efecto positivo sobre la extracción.

A continuación se realizó un ANOVA, determinando el valor de R^2 , con objeto de conocer la idoneidad del diseño aplicado y si el modelo propuesto se ajusta de manera adecuada al sistema analítico en cuestión.

Tabla III.3. Tabla de análisis de varianza en suelo (R^2)

Lodo de depuradora	R^2 (%)
PBs	99.52
BPs	99.87
BFA	99.55
TCS y TCB	93.44
Compost	
PBs	97.46
BPs	95.78
BFA	97.90
TCS y TCB	98.70
Suelo agrícola	
PBs	99.70
BPs	99.57
BFA	99.63
TCS y TCB	99.68

Para todos los analitos en estudio en las tres matrices estudiadas el valor calculado fue siempre superior al 90 %. En la **tabla III.3**, se muestran los valores obtenidos.

Finalmente se procedió al estudio de las superficies de respuesta obtenida para cada familia de analitos en las diferentes matrices. La superficie nos indica de manera gráfica cuál es el óptimo de las condiciones propuestas, este óptimo se percibe de manera visual por el punto de inflexión máximo. El óptimo fue calculado maximizando la ecuación de la curva que da lugar a la representación de la superficie de respuesta. En las siguientes figuras se muestran las superficies de respuesta obtenidas en las diferentes matrices.

- **Lodo de depuradora.** En la **figura III.11** se muestran las superficies de respuesta obtenidas.

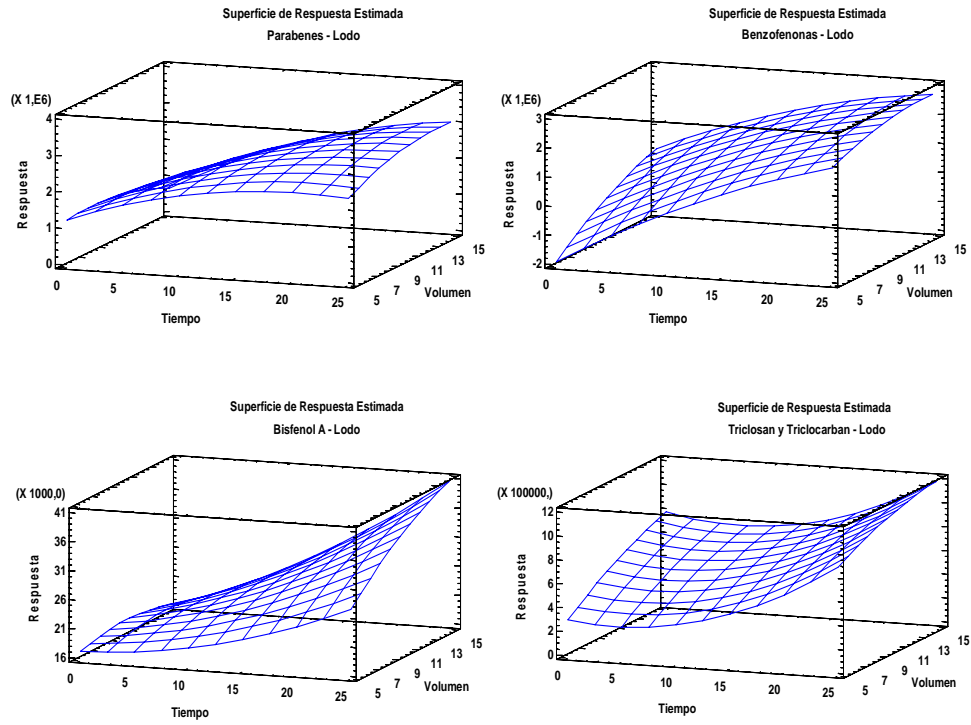


Figura III.11. Superficies de respuesta: PBs, BPs, BFA y TCS-TCB en el lodo de depuradora

- **Compost.** En la **figura III.12** se muestran las superficies de respuesta obtenidas.

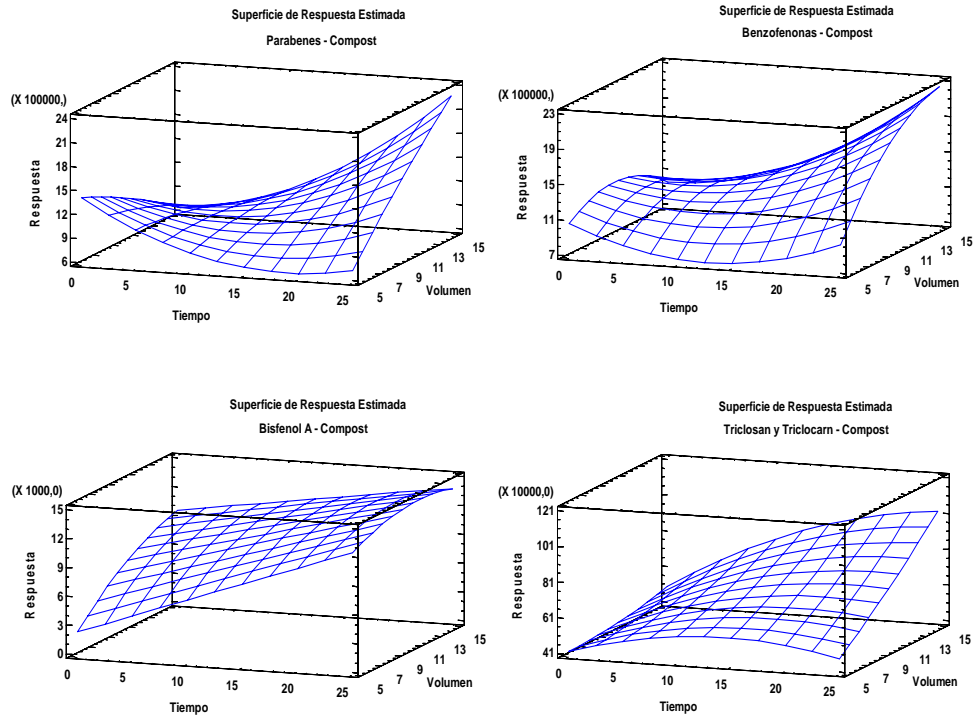


Figura III.12. Superficies de respuesta:
PBs, BPs, BFA y TCS-TCB en compost

- **Suelo.** En la **figura III.13** se muestran las superficies de respuesta obtenidas.

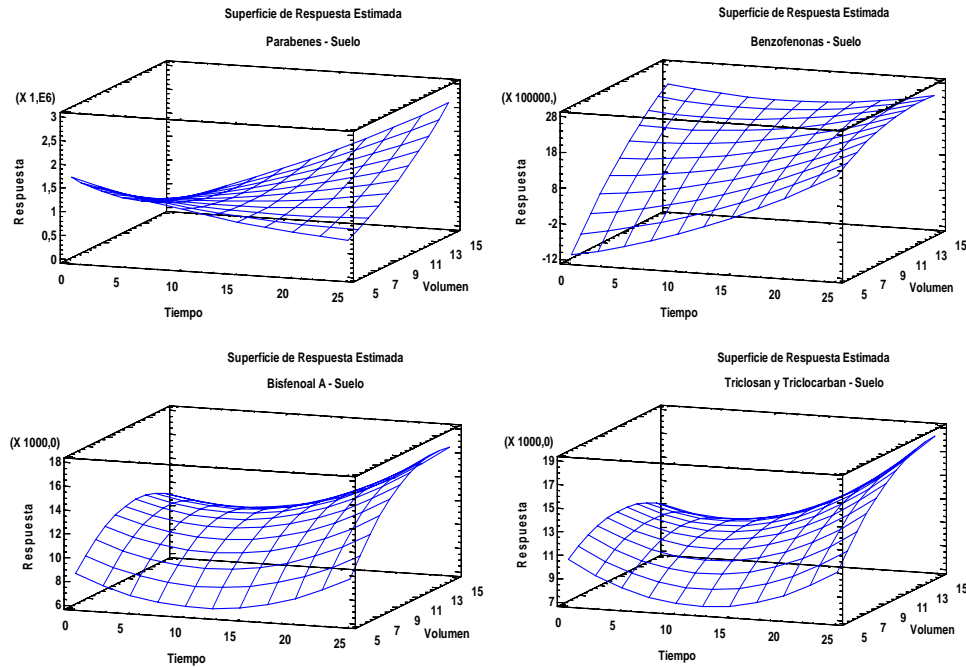


Figura III.13. Superficies de respuesta:
PBs, BPs, BFA y TCS-TCB en suelo

En la **tabla III.4** se muestran los valores óptimos para el tiempo y el volumen de extracción, así como las recuperaciones óptimas para el proceso de USE en las diferentes matrices.

Tabla III.4. Óptimos de tiempo y volumen de extracción en las diferentes matrices

	Tiempo (min)	Volumen (mL)
Lodo de depuradora		
PBs	25	13.8
BPs	25	14.4
BFA	25	15.0
TCS y TCB	25	15.0
Compost		
PBs	25	15.0
BPs	25	15.0
BFA	25	15.0
TCS y TCB	25	15.0
Suelo agrícola		
PBs	25	15.0
BPs	25	13.4
BFA	25	13.6
TCS y TCB	25	15.0

Teniendo en cuenta los datos mostrados en la tabla, los valores óptimos seleccionados fueron 15 mL para el volumen y 25 min para el tiempo de extracción.

2.3. Ciclos de Extracción

Por último se optimizó el número de ciclos de extracción. Se ensayaron 1, 2 y 3 extracciones sucesivas, observándose que con un único ciclo era suficiente para obtener excelentes recuperaciones en todos los casos. El uso de dos o más ciclos de extracción, además de no mejorar notablemente dichas recuperaciones, podría acortar de forma notable la vida útil de la sonda de ultrasonidos, encareciendo el proceso de extracción. Por esta razón se optó por emplear un solo ciclo de extracción.

En la siguiente tabla se resumen los parámetros de extracción óptimos para la extracción de los analitos a partir de muestras de lodo de depuradora, compost y suelo agrícola.

Tabla III.5. Variables optimizadas y resultados óptimos

Naturaleza del disolvente	Metanol
Cantidad de muestra (g)	0.5
Volumen de disolvente (mL)	15
Amplitud (%)	75
Tiempo (min)	25
Ciclos de extracción	1

2.4. Procedimiento Final de Extracción mediante Ultrasonido

El procedimiento final establecido para el tratamiento de las muestras mediante la técnica de ultrasonidos para las tres matrices fue el siguiente:

- Se pesan 0.5 g de muestra sólida en la celda metálica del ultrasonido y se adicionan 15 mL de metanol. Se extrae durante 25 min.
- Se recoge el extracto orgánico y se centrifuga durante 30 min a 5000 r.p.m. (3634 x g).
- El sobrenadante se transfiere en un vial de vidrio, donde se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno.
- Se redisuelve el extracto seco en 1 mL de la fase móvil inicial y se agita vigorosamente en vortex.
- Se filtra con filtro de nylon de 0.45 μm en un vial cromatográfico de vidrio, quedando listo para su inyección en el LC-MS/MS.

3. Calibración. Parámetros Analíticos y Validación del Método

3.1. Establecimiento del Modelo de Calibración

Para establecer la metodología analítica en las muestras medioambientales seleccionadas se procedió del siguiente modo:

- En primer lugar, se realizó un calibrado externo con patrones en disolvente para cada uno de los analitos en estudio.
- En segundo lugar, se realizó un calibrado en cada una de las matrices seleccionadas para cada uno de los analitos.
- Por último, se compararon las pendientes de ambos calibrados mediante un test estadístico de t-student.

Los patrones internos seleccionados fueron EPB-¹³C₆ para los PBs, BP-d₁₀ para las BPs, BFA-d₁₆ para el BFA y el AMC para TCS y TCB, usando en todos los casos la relación área del pico del analito/área de pico del patrón interno y la concentración de analito. Se eligieron estos patrones internos por presentar propiedades físico-químicas similares a los analitos.

3.2. Evaluación del Efecto Matriz

Esta evaluación implica la comparación de los dos calibrados, externo y en matriz, para determinar si existen diferencias significativas entre ambos. Si no existen, se concluirá por la no existencia de efecto matriz y se podrá aplicar el calibrado externo. En caso contrario, será necesario aplicar el calibrado en matriz para la cuantificación de los analitos en la muestra.

A. Calibrado en Disolvente

Para el establecimiento de esta función de calibrado, se prepararon patrones conteniendo cantidades crecientes de los analitos (3 réplicas por nivel), y una concentración constante de los patrones internos, EPB-¹³C₆ (37.5 µg kg⁻¹), BP-d₁₀ (0.6 µg kg⁻¹), BFA-d₁₆ (375 µg kg⁻¹) y AMC (375 µg kg⁻¹).

En las siguientes tablas se recogen los parámetros estadísticos del calibrado con patrones externos.

Tabla III.6. Parámetros del calibrado externo. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-12.8	-1.2	-5.1	-2.3	-5.4	-47.8
s_a	3.9	8.1	2.4	4.8	9.3	15.2
b (g ng⁻¹)	9.6	5.1	2.2	9.4	9.7	6.7
s_b	2.2·10 ⁻²	1.5·10 ⁻²	4.5·10 ⁻²	7.1·10 ⁻²	1.2·10 ⁻²	1.1·10 ⁻²
R² (%)	99.7	99.6	99.8	100.0	99.9	99.9
s_{y/x}	7.4	1.5	5.3	2.7	17.5	41.7

Tabla III.7. Parámetros del calibrado externo. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	-5.4	-2.5	3.9	15.6	2.6	46.8
s_a	8.4	1.4	2.4	5.7	1.6	2.4
b (g ng⁻¹)	7.9	8.5	1.4	5.0	4.8	1.1
s_b	3.2·10 ⁻²	1.8·10 ⁻²	4.6·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²	1.8·10 ⁻²	4.6·10 ⁻²
R² (%)	99.1	99.7	99.4	99.5	99.3	99.2
s_{y/x}	16.0	2.8	4.7	10.8	2.9	4.6

Tabla III.8. Parámetros del calibrado externo. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	1.8	-3.6
s_a	0.4	1.1
b (g ng⁻¹)	4.1	3.9
s_b	2.2·10 ⁻²	4.0·10 ⁻²
R² (%)	99.1	99.9
s_{y/x}	1.7	2.8

B. Calibrado en Matriz (Matrix Matched Calibration)

Al igual que en el caso anterior, se preparó una curva de calibración (con 3 réplicas por cada nivel) en cada una de las tres matrices objeto de estudio (lodo de depuradora, compost obtenido a partir de este lodo y suelo agrícola). Se añadieron los patrones internos para obtener las concentraciones finales de EPB-¹³C₆ (37.5 μg kg⁻¹), BP-d₁₀ (0.6 μg kg⁻¹), BFA-d₁₆ (375 μg kg⁻¹) y AMC (375 μg kg⁻¹), y se procedió a la extracción de los extractos, tratando las muestras de acuerdo al procedimiento experimental ya optimizado a lo largo del presente trabajo. En las tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos.

➤ **Lodo de depuradora**

Tabla III.9. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-2.0	-5.9	-2.7	-8.4	-11.9	8.5
s_a	2.8	5.5	2.6	9.4	11.7	10.0
b (g ng⁻¹)	4.6	3.3	1.5	5.4	4.9	6.8
s_b	2.0·10 ⁻²	0.1	5.0·10 ⁻²	0.2	1.4·10 ⁻²	2.2·10 ⁻²
R² (%)	99.4	99.5	99.5	99.5	99.6	99.5
s_{y/x}	5.2	1.1	4.9	1.8	22.2	19.1

Tabla III.10. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	-9.1	-7.5	9.6	237.1	-9.8	-33.5
s_a	9.5	7.6	5.4	81.3	25.8	18.6
b (g ng⁻¹)	3.7	4.3	3.8	1.4	15.6	7.5
s_b	3.5·10 ⁻²	9.5·10 ⁻²	0.1	2.2·10 ⁻²	0.3	0.3
R² (%)	99.2	99.8	99.7	99.0	99.8	99.6
s_{y/x}	18.1	1.4	1.2	15.4	4.9	3.5

Tabla III.11. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	37.7	7.1
s_a	8.4	3.0
b (g ng⁻¹)	3.9	3.8
s_b	0.4	0.1
R² (%)	98.6	99.6
s_{y/x}	1.6	5.8

➤ **Compost****Tabla III.12.** Parámetros de calibración en compost. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-42.3	2.8	4.1	-6.1	1.0	4.3
s_a	2.5	5.6	3.5	6.8	8.1	4.2
b (g ng⁻¹)	5.3	3.5	1.5	5.9	0.5	6.7
s_b	0.1	0.1	0.6	0.1	1.0·10 ⁻²	9.6·10 ⁻²
R² (%)	99.6	99.5	99.8	99.9	99.8	99.9
s_{y/x}	4.9	1.7	6.7	1.3	15.2	18.1

Tabla III.13. Parámetros de calibración en compost. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	2.4	-10.7	5.4	264.9	0.8	-3.7
s_a	2.1	6.8	4.3	90.8	2.63	1.6
b (g ng⁻¹)	3.7	5.1	4.7	1.7	1.9	1.2
s_b	7.8·10 ⁻²	8.5·10 ⁻²	8.1·10 ⁻²	0.2	2.9·10 ⁻²	3.0·10 ⁻²
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.7
s_{y/x}	13.9	1.9	2.2	17.1	4.9	3.1

Tabla III.14. Parámetros de calibración en compost. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	-5.3	-5.8
s_a	3.8	5.4
b (g ng⁻¹)	6.6	4.7
s_b	0.2	0.2
R² (%)	99.5	99.1
s_{y/x}	1.2	6.3

➤ Suelo

Tabla III.15. Parámetros de calibración en suelo. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-2.8	-3.6	-1.6	-8.2	-16.6	-3.6
s_a	1.4	5.5	1.9	7.3	7.6	6.8
b (g ng⁻¹)	4.8	3.3	1.5	5.9	5.3	6.7
s_b	7.8·10 ⁻²	0.1	3.6·10 ⁻²	0.1	9.5·10 ⁻²	1.5·10 ⁻²
R² (%)	99.9	99.5	99.7	99.7	99.8	99.7
s_{y/x}	2.6	1.4	3.6	1.8	14.4	12.8

Tabla III.16. Parámetros de calibración en suelo. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	3.7	-12.8	5.5	335.9	-1.5	3.2
s_a	2.6	8.1	4.6	122.1	2.6	2.8
b (g ng⁻¹)	3.5	4.7	5.3	1.9	2.3	4.3
s_b	1.0·10 ⁻²	1.0·10 ⁻²	8.5·10 ⁻²	0.3	2.8·10 ⁻²	5.0·10 ⁻²
R² (%)	99.6	99.8	99.9	99.2	99.9	99.9
s_{y/x}	14.9	1.5	8.7	23.2	4.8	5.3

Tabla III.17. Parámetros de calibración en suelo. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	4.6	4.6
s_a	3.4	3.4
b (g ng⁻¹)	5.9	4.5
s_b	1.7·10 ⁻²	0.1
R² (%)	99.6	99.6
s_{y/x}	1.8	6.4

A continuación, se presentan los resultados del test estadístico de comparación de los diferentes calibrados en matriz y disolvente.

Tabla III.18. Comparación de calibrados para el lodo de depuradora. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	54.8	2.0	2.17	SÍ	204.0	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	27.0						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.3	1.8	2.17	SÍ	17.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.2						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	28.1	1.2	2.17	SÍ	10.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	24.0						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.3	2.2	2.17	NO	20.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	3.2						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	306.3	0.6	2.17	SÍ	252.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	492.8						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1738.9	4.8	2.17	NO	4.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	364.8						

Tabla III.19. Comparación de calibrados para el lodo de depuradora. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.9	1.1	2.17	SÍ	2.2	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	24.1						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.8	0.2	2.17	SÍ	4.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	33.6						

Tabla III.20. Comparación de calibrados para el lodo de depuradora. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	256.8	0.7	2.17	SÍ	103.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	327.6						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.8	4.0	2.17	NO	88.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.9						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	22.1	15.3	2.17	NO	21.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.4						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	116.6	0.5	2.17	SI	22.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	237.2						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.3	2.17	SÍ	11.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	24.0						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	21.2	1.7	2.17	SÍ	18.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	12.3						

La evaluación de los resultados obtenidos para cada compuesto estudiado en el lodo de depuradora permite concluir que, en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede decir que existe efecto matriz.

Tabla III.21. Comparación de calibrados para el compost. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	54.8	2.28	2.17	NO	30.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	24.0						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.3	0.8	2.17	SÍ	15.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	2.9						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	28.1	0.6	2.17	SÍ	8.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	44.9						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.3	4.3	2.17	NO	23.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.7						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	306.3	1.32	2.17	SÍ	294.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	231.0						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1738.9	5.3	2.17	NO	0.1	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	327.6						

Tabla III.22. Comparación de calibrados para el compost. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.9	2.0	2.17	SÍ	81.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.4						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.8	0.2	2.17	SÍ	4.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	39.6						

Tabla III.23. Comparación de calibrados para el compost. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	256.8	1.3	2.17	SÍ	51.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	193.2						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.8	2.2	2.17	NO	72.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	3.6						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	22.1	4.5	2.17	NO	36.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	4.8						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	116.6	0.4	2.17	SÍ	12.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	292.4						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.3	2.17	SÍ	85.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	24.0						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	21.2	0.2	2.17	SÍ	1.0	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	39.7						

Al evaluar los resultados obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las muestras de compost se puede observar que, en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede decir que existe efecto matriz.

Tabla III.24. Comparación de calibrados para el suelo agrícola. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	54.8	8.1	2.17	NO	226.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	6.8						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.3	1.1	2.17	SÍ	17.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.9						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	28.1	2.2	2.17	NO	11.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	12.9						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.3	2.2	2.17	NO	22.8	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	3.2						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	306.3	1.5	2.17	SÍ	287.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	207.3						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1738.9	10.6	2.17	NO	6.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	163.8						

Tabla III.25. Comparación de calibrados para el suelo agrícola. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.9	0.9	2.17	SÍ	61.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	3.2						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.8	0.2	2.17	SÍ	4.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	40.9						

Tabla III.26. Comparación de calibrados para el suelo agrícola. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	256	11.6	2.17	NO	44.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	222.0						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	7.8	3.4	2.17	NO	80.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	2.3						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	22.1	0.3	2.17	SÍ	41.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	75.7						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	116.6	0.2	2.17	SÍ	82.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	538.2						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.4	2.17	SÍ	75.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	23.0						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	21.2	0.7	2.17	SÍ	44.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	28.1						

Al evaluar los resultados obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las muestras de suelo se puede observar que, en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en suelo en todos los casos, por lo que se puede decir que existe efecto matriz.

3.3. Límites de Detección y Cuantificación

Para evaluar el límite de detección y cuantificación se utilizó la metodología basada en la función del calibrado descrita con anterioridad en el **Capítulo I. Materiales y Métodos** de la presente Memoria de Doctorado. Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas.

Tabla III.27. Límite de detección y de cuantificación para el lodo de depuradora

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.19	0.06	0.06	0.06	0.90	0.47	0.20
LOQ (ng g ⁻¹)	0.57	0.18	0.18	0.18	2.70	1.40	0.60
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.03	0.89	0.06	0.38	0.10	0.06	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	0.90	2.68	0.18	1.15	0.30	0.90	0.08

Tabla III.28. Límite de detección y de cuantificación para el compost

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.19	0.06	0.06	0.06	0.90	0.47	0.20
LOQ (ng g ⁻¹)	0.57	0.18	0.18	0.18	2.70	1.40	0.60
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.30	0.89	0.06	0.10	0.10	0.06	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	0.90	2.68	0.18	0.30	0.30	0.18	0.08

Tabla III.29. Límite de detección y de cuantificación para el suelo agrícola

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.20	0.05	0.05	0.05	0.84	0.50	0.18
LOQ (ng g ⁻¹)	0.60	0.15	0.16	0.16	2.51	1.50	0.55
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.28	0.90	0.05	0.40	0.09	0.05	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	0.83	2.70	0.16	1.20	0.27	0.16	0.09

3.4. Rango Dinámico Lineal y linealidad

En la tabla siguiente se muestran los valores de Rango Dinámico Lineal (RDL) propuestos para cada analito en cada matriz, según se describe en el **Capítulo I. Materiales y Métodos** de la presente Memoria de Doctorado.

Tabla III.30. Rango dinámico lineal para cada analito ($ng\ g^{-1}$)

	Lodo	Compost	Suelo		Lodo	Compost	Suelo
MPB	0.6-400	0.6-400	0.6-400	BP-2	2.7-1800	2.7-1800	2.7-1800
EPB	0.2-120	0.2-120	0.2-120	BP-3	0.2-120	0.2-120	0.2-120
PPB	0.2-120	0.2-120	0.2-120	BP-6	1.2-800	1.2-800	1.2-800
BPB	0.2-120	0.2-120	0.2-120	BP-8	0.3-200	0.3-200	0.3 200
Ph-PB	2.7-1800	2.7-1800	2.7-1800	4-OHBP	0.2-120	0.2-120	0.2-120
BFA	1.5-1000	1.5-1000	1.5-1000	TCS	0.6-400	0.6-400	0.6-400
BP-1	0.9-600	0.9-600	0.9-600	TCB	0.1-60	0.1-60	0.1-60

3.5. Sensibilidad Analítica

En la **tabla III.31** se recogen los valores de sensibilidad analítica, para cada analito en cada matriz, calculados según el procedimiento descrito en el **Capítulo I, Materiales y Métodos** de la presente Memoria de doctorado.

Tabla III.31. Sensibilidad analítica ($ng\ g^{-1}$) para cada analito

	Lodo	Compost	Suelo		Lodo	Compost	Suelo
MPB	11.4	9.0	5.5	BP-2	33.0	25.5	32.5
EPB	3.1	3.1	3.2	BP-3	2.7	1.7	1.6
PPB	3.3	4.5	2.4	BP-6	29.8	31.3	26.3
BPB	45.0	2.2	2.4	BP-8	3.1	2.6	2.0
Ph-PB	20.3	29.4	26.8	4-OHBP	2.8	2.6	1.3
BFA	27.8	12.1	19.0	TCS	18.3	10.8	9.9
BP-1	20.3	10.5	14.1	TCB	1.5	2.2	1.4

3.6. Exactitud del Método: Precisión y Veracidad

Para establecer la exactitud del método propuesto, se ha estudiado la veracidad del mismo en términos de recuperación con muestras dopadas y su precisión en términos de variabilidad inter e intra-día.

Uno de los mayores problemas que se encuentran a la hora de estudiar la exactitud de un método, en términos de veracidad, especialmente en matrices ambientales poco investigadas, es la ausencia de materiales certificados. Por este motivo, en este trabajo, se ha llevado a cabo un estudio de recuperación con muestras dopadas, a un nivel de concentración cercano al límite de cuantificación, empleando para ello muestras limpias de los compuestos o cuyas concentraciones están por debajo de los límites de detección del método. Las muestras fueron analizadas empleando el procedimiento operatorio descrito a lo largo de esta Memoria y la concentración de cada analito en la muestra se determinó por interpolación a la curva de calibración dentro del rango dinámico lineal. Los valores de recuperación se obtuvieron por comparación con las cantidades de analito conocidas que fueron añadidas previamente a las muestras.

Por su parte, para evaluar la exactitud del método en términos de precisión, se realizaron diversas réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de veracidad, durante un mismo día y durante diez días consecutivos. En las tablas siguientes se muestran las recuperaciones de los ensayos realizados para cada analito durante la validación (%R) y en los valores obtenidos para la precisión, expresada como desviación estándar relativa (%RSD).

Tabla III.32. Exactitud (veracidad y precisión) del método analítico

	Lodo de Depuradora		Compost		Suelo	
	%R	% RSD	%R	% RSD	%R	% RSD
MPB	99	8	98	11	97	14
EPB	100	9	101	14	93	12
PPB	99	8	100	12	98	15
BPB	96	11	92	15	91	9
Ph-PB	101	9	104	12	95	12
BFA	98	9	104	16	98	14
BP-1	98	7	89	13	87	15
BP-2	94	9	88	13	95	13
BP-3	93	9	95	14	95	14
BP-6	99	8	102	14	91	9
BP-8	102	8	96	15	92	13
4-OHBP	101	6	98	13	87	12
TCS	90	11	103	14	83	13
TCB	92	9	107	15	93	11

Los promedios de los porcentajes de recuperación para las muestras de suelo fueron próximos al 100 % (entre el 83 % para el TCB en suelo y el 104 % para Ph-PB y BFA en compost), lo que nos lleva a deducir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, los valores obtenidos para el RSD fueron menores al 15 % en todos los casos. Estos datos se encuentran dentro de límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación empleada, según la cual se consideran aceptables valores iguales o inferiores al 15 % en general, y al 20 % en la zona próxima al límite de detección del método, por lo que se pudo concluir que el método propuesto para las muestras de suelo utilizando la técnica de extracción por ultrasonido genera resultados próximos entre sí, cumpliendo de este modo los requisitos de precisión. Se trata por tanto de un método veraz, preciso y por tanto exacto.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para las tres matrices dopadas utilizando el método optimizado por ultrasonido.

➤ Lodo de depuradora

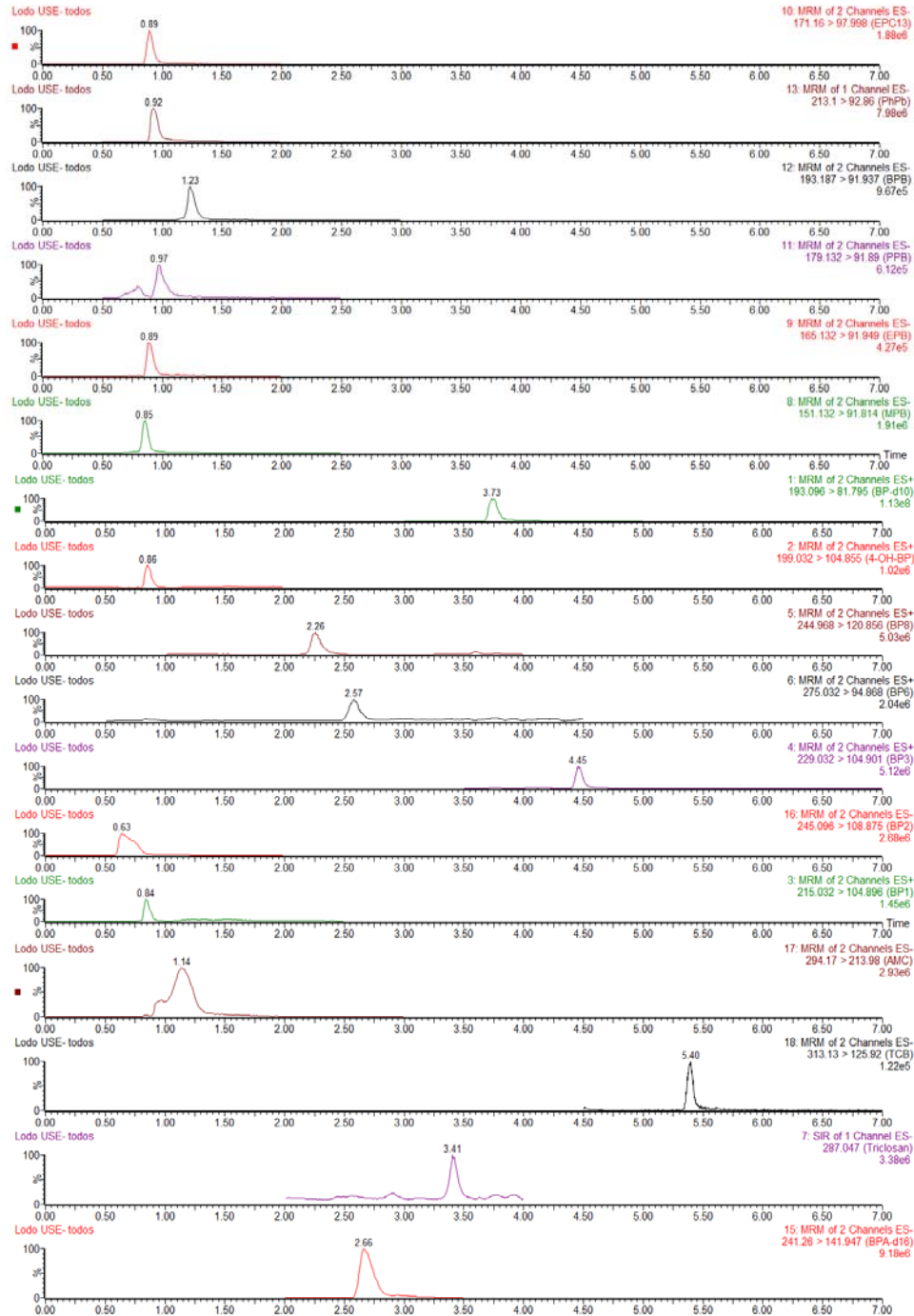


Figura III.14. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de lodo de depuradora empleando el método basado en la extracción mediante ultrasonido

➤ Compost

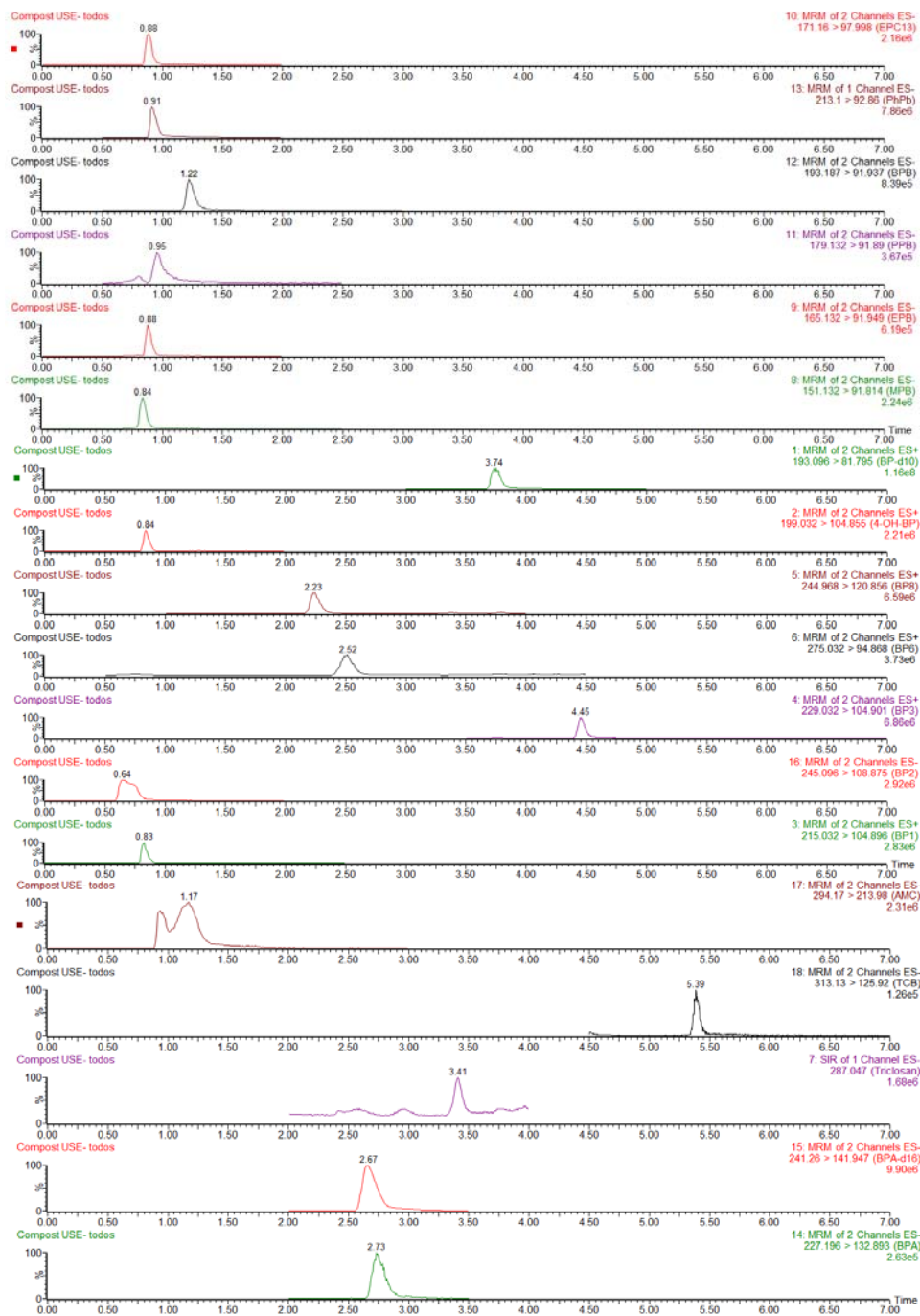


Figura III.15. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de compost por empleando el método basado en la extracción mediante ultrasonido

➤ Suelo

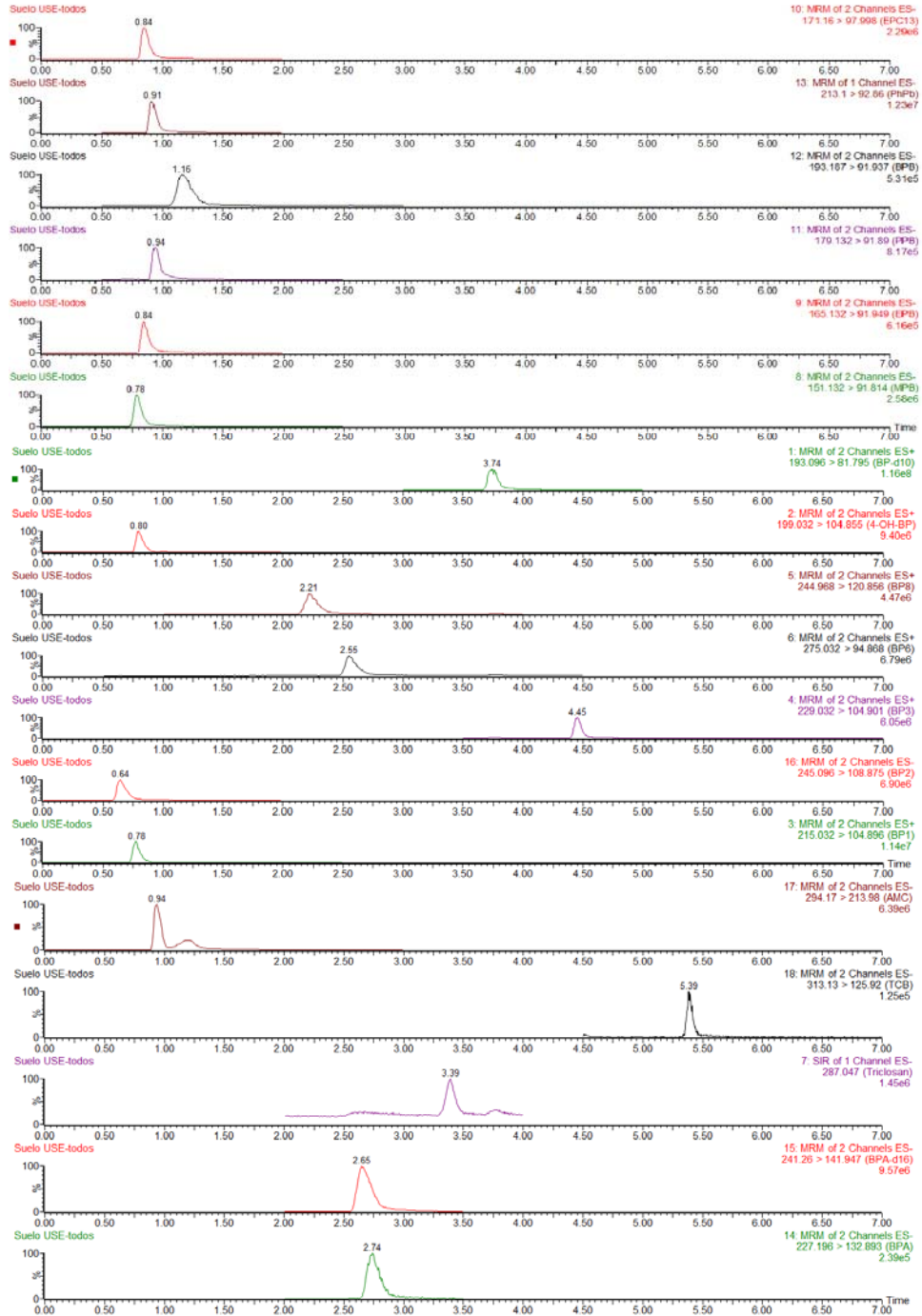


Figura III.16. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de suelo agrícola empleando el método basado en la extracción mediante ultrasonido

CAPÍTULO IV

Tratamiento de Muestra. Optimización
de la Técnica de Extracción Mediante
Disolventes Presurizados

1. Descripción de la Técnica de Extracción

La extracción con disolventes presurizados (PLE), también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), es una técnica de extracción sólido-líquido que combina eficacia y rapidez en la extracción. Se ha demostrado que esta técnica es equivalente a otras metodologías como Soxhlet, siendo incluso utilizada como método de referencia por la Agencia de Protección Medioambiental¹⁴⁴. Las elevadas presiones de trabajo permiten mantener el disolvente en estado líquido a las temperaturas de trabajo, normalmente por encima del punto de ebullición a presión atmosférica. A estas temperaturas, ligeramente inferiores al punto crítico, las propiedades del disolvente se modifican, de modo que su viscosidad disminuye, penetrando con facilidad en los poros de la matriz y favoreciendo la difusión de los analitos, incrementando la eficacia de extracción y minimizando el volumen de disolvente empleado¹⁴⁵.

El tipo de disolvente y la temperatura de trabajo son los parámetros que más afectan a la eficacia de extracción. El disolvente debe ser capaz de solubilizar a los analitos sin arrastrar el resto de los componentes de la matriz. Por su parte, la temperatura tiene que ser suficientemente elevada como para favorecer la cinética del proceso de extracción, sin degradar a

¹⁴⁴ Shin, M., Svodoba, M.L., Falleta, P. Microwave-assisted extraction (MAE) for the determination of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in sewage sludge. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 2923-2929.

¹⁴⁵ Díaz-Cruz, S., López, de Alda, M.J., Barceló, D. Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1130 (2006) 72-82.

los analitos. Otros factores a estudiar son el tiempo de extracción, el secado, la presión en las celdas de extracción y número de ciclos¹⁴⁶.

En la extracción en modo estático, el disolvente es introducido en la celda, manteniéndola a presión constante durante un tiempo determinado. Tras esta etapa, la celda se vacía recogiendo todo el extracto en un vial colector. A continuación, se hace pasar un volumen de disolvente, el cual viene expresado como tanto por ciento del volumen de celda (porcentaje de flush) para arrastrar posibles trazas de los analitos que pudiesen quedar en la celda¹⁴⁷. Ese volumen, en el caso de que se produzcan dos o más ciclos de extracción, es dividido entre el número de los mismos. Algunos equipos de PLE poseen una válvula restrictora que permite realizar la extracción en modo dinámico, pasando de forma continua un flujo constante de disolvente a través de la celda presurizada. En este caso, la extracción es más efectiva, pero presenta el inconveniente de generar un elevado volumen de extracto. En la **figura IV.1** se muestra el esquema de un equipo de extracción con disolventes presurizados.

¹⁴⁶ Golet, E., Strehler, A., Alder, A., Giger, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by SPE. *Analytical Chemistry* 74 (2002) 5455–5462.

¹⁴⁷ Tobiszewski, M., Mechlinske, A., Zygmunt, B., Namiesnik, J. Green Chemistry in simple preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends Analytical Chemistry* 28 (2009) 943-951.

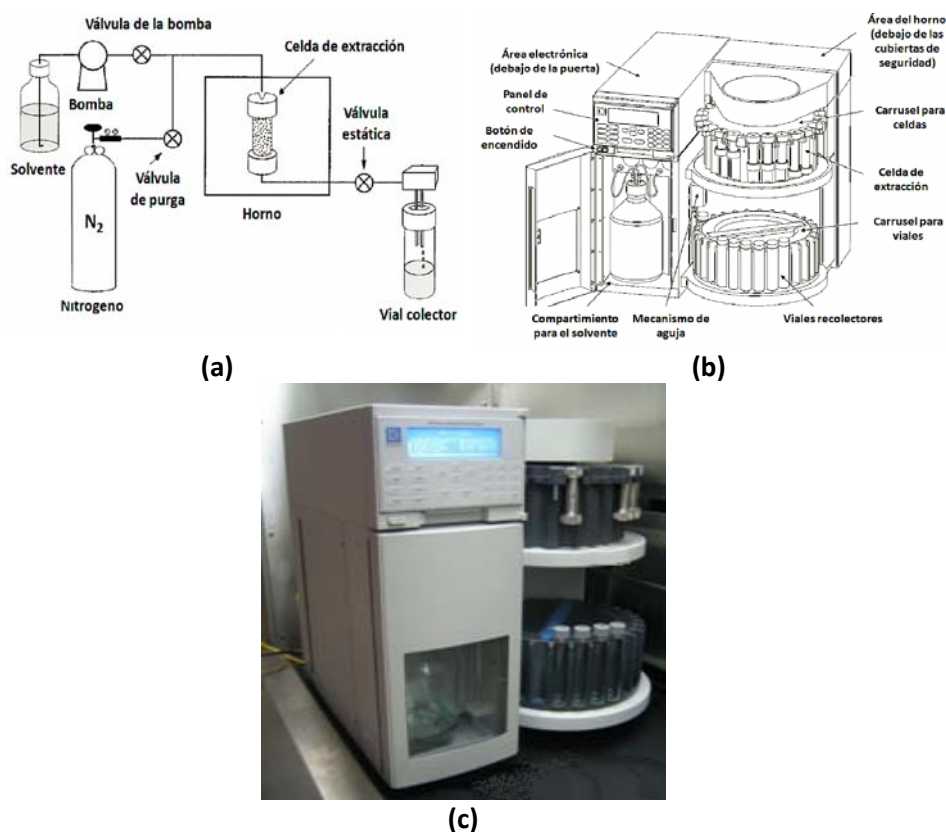


Figura IV.1. (a) Esquema del proceso de extracción PLE, (b) esquema de las partes del equipo, (c) fotografía del equipo de extracción de líquidos presurizados

El equipo de PLE consta de una bomba para impulsar el disolvente, un horno donde se introducen las celdas de acero presurizadas, para mantenerlas a una temperatura determinada, un vial colector para recoger el extracto líquido, y un sistema de suministro de nitrógeno para purgar la celda una vez terminado el proceso de extracción^{148,149}.

¹⁴⁸ Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R.M., Pocurull, E. PLE of contaminants from environmental samples. *Current Analytical Chemistry* 4 (2008) 157-167.

¹⁴⁹ Dabrowski, L., Giergielewicz-Mozajska, H., Biziuk, M., Gaca, J., Namiesnik, J. Some aspects of the analysis of environmental pollutants in sediments using pressurized extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 957 (2002) 59-67.

Los parámetros a controlar en esta modalidad de extracción son:

- **Precalentamiento.** Al introducir la celda en el horno, se produce un equilibrio térmico entre el horno y la celda antes que se produzca el calentamiento.
- **Calentamiento.** Aumento gradual de la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de extracción.
- **El tiempo estático.** Tiempo en el cual se produce la extracción de los analitos de la matriz, ésta se encuentra a la presión y temperatura óptima en el horno junto con el disolvente de extracción.
- **Flush.** Si se realiza más de un ciclo, se expulsa un porcentaje de disolvente del primer ciclo al vial recolector y se introduce disolvente fresco del mismo porcentaje que se expulsó. Por ejemplo si el flush es del 50 %, se vacían 0.5 mL a través de la celda de 1 mL.
- **Purga.** En esta etapa se hace pasar nitrógeno gas a través de la celda durante un cierto tiempo para poder depurarla.
- **Ciclos.** Es el número de veces que se realiza el tiempo estático. Cuando se especifica más de un ciclo el porcentaje del flush se divide entre el total del número de ciclos¹⁵⁰.

Algunos de estos parámetros, como el precalentamiento, el flush y la purga, no fueron optimizados debido a que en experiencias preliminares se demostró que su influencia sobre la extracción era mínima^{146,147}.

¹⁵⁰ Dionex Corporation. ASE® Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual (1999).

2. Selección y Optimización de las Variables del Proceso de Extracción

2.1. Optimización de las Variables Mediante Extracción Presurizada

Se optimizaron los parámetros más influyentes en el proceso PLE. En todos los casos, la cantidad de muestra de lodo de depuradora, compost o suelo agrícola empleada fue de 0.5 g. Los parámetros optimizados fueron:

- Tiempo de extracción.
- Temperatura de extracción.
- Presión.

El número de ciclos de extracción realizados a lo largo de todo el proceso de optimización de variables fue de 1, ya que previamente se demostró que el uso de más ciclos no repercutía en una mejora notable de la recuperación, pero aumentaba de forma innecesaria el consumo de disolvente y el tiempo de extracción.

En cuanto al disolvente de extracción, se ensayaron los mismos disolventes previamente estudiados en el caso de la extracción con ultrasonidos, demostrándose que el metanol es también el más adecuado para llevar a cabo la extracción mediante esta técnica.

Para la optimización las otras tres variables (tiempo, temperatura y presión), se llevó a cabo un estudio de las tres de manera conjunta

mediante un diseño experimental de tipo Doehlert¹⁵¹. Este diseño describe un dominio experimental esférico, ofreciendo una distribución uniforme de los experimentos en un espacio tridimensional cuboctaedro, de modo que 12 experimentos son equidistantes de un experimento central, describiendo una esfera de radio la unidad. El ensayo constó de quince experimentos (tres de ellos puntos centrales), siendo seleccionada como variable de respuesta la suma de las áreas de respuesta de cada familia de compuestos (PBs, BPs, BFA y TCS-TCB).

Los máximos y mínimos de cada factor experimental, se establecieron de acuerdo a las posibilidades del sistema instrumental. Es decir, para el tiempo de extracción, el valor mínimo fue de 5 min y el máximo de 25 min; para la temperatura, el mínimo fue de 80°C y el máximo de 140°C y para la presión el mínimo fue de 500 psi y el máximo de 1500 psi.

En la **tabla IV.1** se resume la matriz Doehlert final aplicada.

Tabla IV.1. Diseño experimental para tiempo, temperatura y presión

Tiempo (min)	T (°C)	Presión (psi)	Tiempo (min)	T (°C)	Presión (psi)
15	110	1000	10	100	500
15	110	1000	20	80	1000
15	110	1000	20	100	500
25	110	1000	10	140	1000
20	140	1000	15	130	500
20	120	1500	10	120	1500
5	110	1000	15	90	1500
10	80	1000			

¹⁵¹ Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology* 91 (2001) 900-906.

El procedimiento seguido para la optimización de estas variables fue el siguiente:

- Se pesaron 0.5 g de muestra sólida en una celda de extracción.
- Se dopó la muestra con una disolución metanólica conteniendo todos los analitos de estudio.
- Se agitó durante 2 min en un vortex y se dejó reposar durante al menos 24 h a temperatura ambiente, con el objetivo de alcanzar un equilibrio entre los analitos y la matriz. Una vez transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la extracción de las muestras.

En la **tabla IV.2** se muestra la concentración de cada analito en la disolución metanólica utilizada para el dopado de las muestras.

Tabla IV.2. Concentraciones empleadas en los dopados en las muestras

Analitos	$\mu\text{g kg}^{-1}$	Analitos	$\mu\text{g kg}^{-1}$
EPB, PPB, BPB, BP-3, 4-OHBP	12	BFA	100
MPB	40	BP-6	80
Ph-PB, BP-2	180	TCB	6
BP-1	60	TCS	40
BP-8	20		

La evaluación de los resultados del diseño experimental se basó en el estudio de ciertos parámetros como el gráfico de Pareto, el análisis de la varianza, el gráfico de la superficie de respuesta y el óptimo calculado.

El primer parámetro estudiado fue el gráfico de Pareto. A continuación se muestran los gráficos obtenidos en este estudio para las tres matrices.

- **Lodo de depuradora.** En la **figura IV.2** se muestran el nivel de significancia de las variables estudiadas en el diseño experimental.

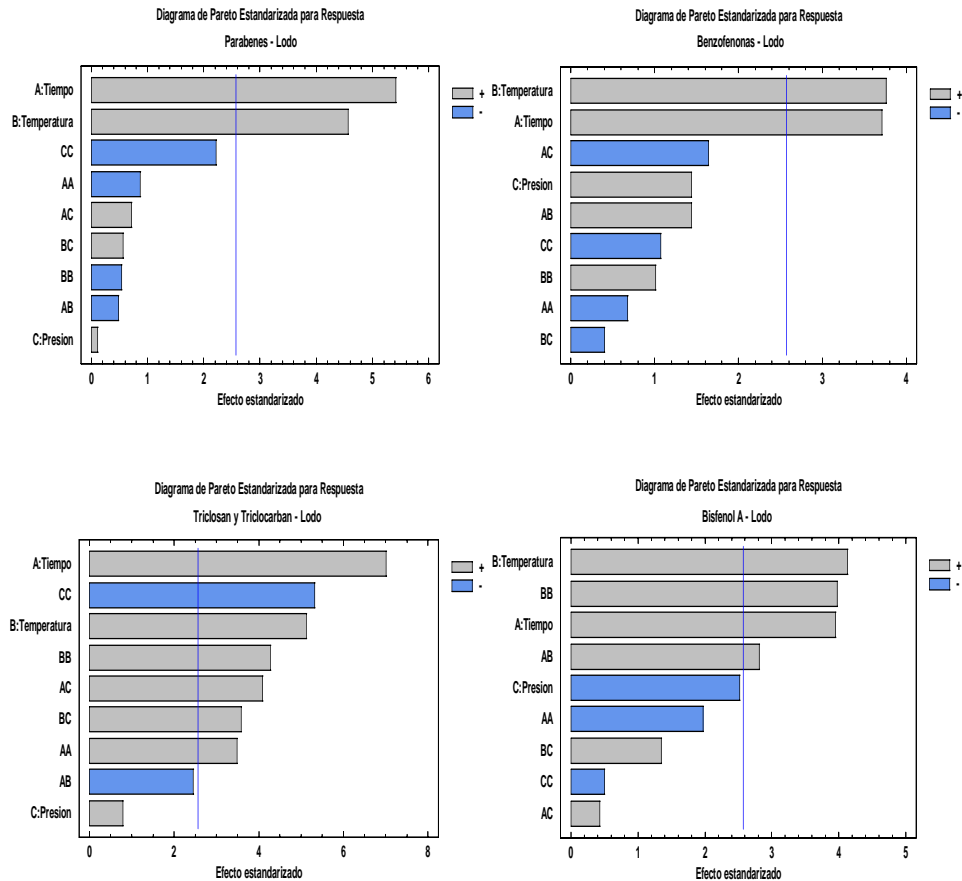


Figura IV.2. Gráficos de Pareto en lodos de depuradora.
PBs, BPs, BFA, TCS y TCB

Los resultados obtenidos demuestran que en el caso de PBs, BPs y TCS-TCB, el tiempo y la temperatura tienen un efecto positivo en el proceso de extracción y son significativas. Por su lado, la presión presenta efecto positivo, pero no significativo. Para el BFA, el tiempo y la temperatura tienen efecto positivo y son significativas, siendo el efecto en la presión negativo y no significativo.

- **Compost.** En la siguiente *figura IV.3* se muestran el nivel de significancia de las variables estudiadas en el diseño experimental.

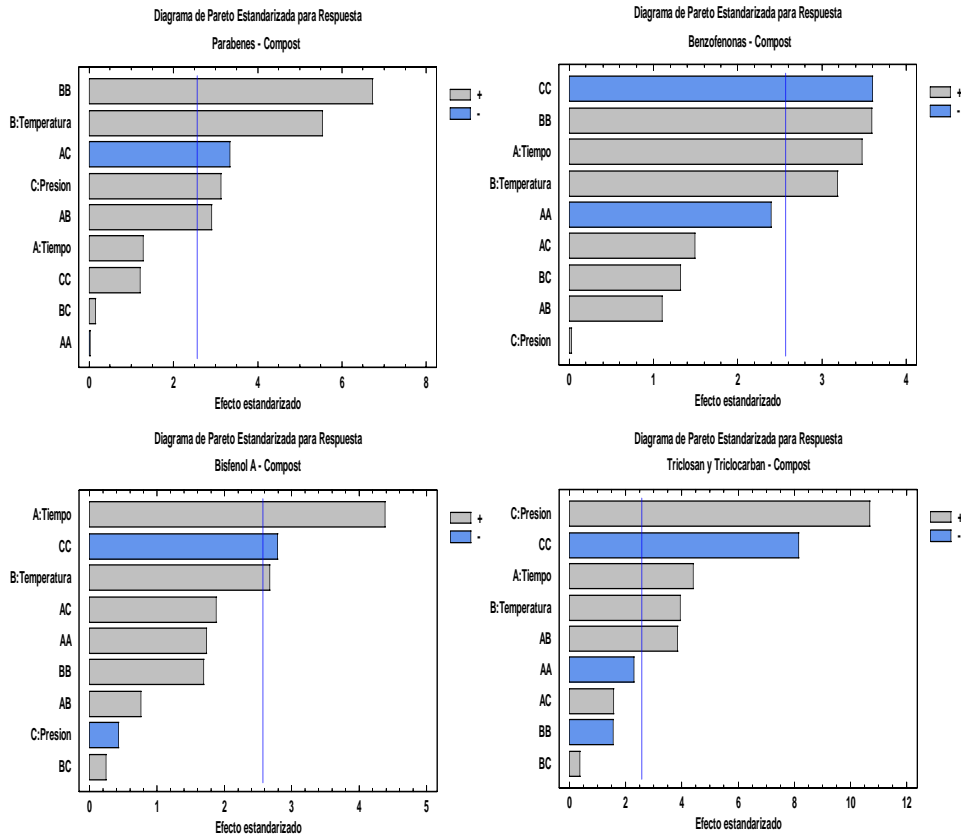


Figura IV.3. Gráficos de Pareto el compost.
PBs, BPs, BFA, TCS y TCB

Los resultados obtenidos demuestran que para PBs y TCS-TCB, las tres variables tienen un efecto positivo en el proceso de extracción y son significativas. En el caso de las BPs, el tiempo y la temperatura tienen un efecto positivo y son significativas, mientras que para la presión el efecto es positivo pero no significativo. Para el BFA, el tiempo y la temperatura tienen un efecto positivo y son significativos, mientras que para la presión es negativo y no significativo.

- **Suelo.** En la siguiente **figura IV.4**, se muestra el nivel de significancia de las variables estudiadas para cada grupo de analitos.

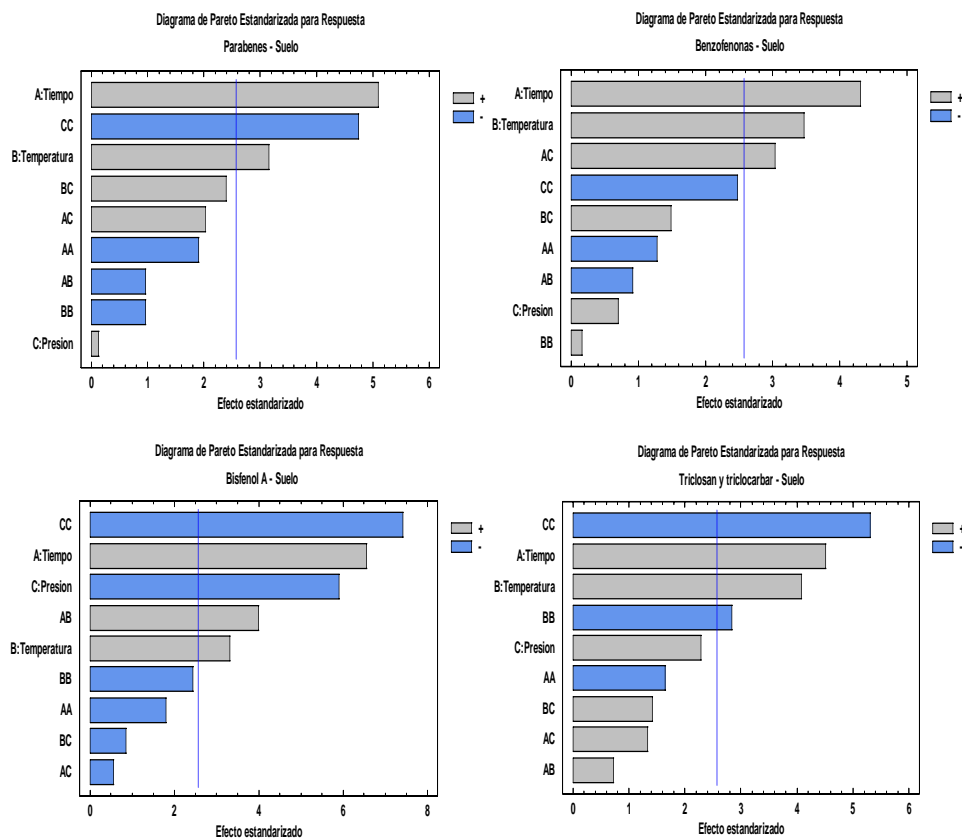


Figura IV.4. Gráficos de Pareto del suelo.
PBs, BPs, BFA, TCS y TCB

Los resultados obtenidos demuestran que para los PBs, las BPs y el TCS-TCB dos de las variables estudiadas, tiempo y temperatura, tienen un efecto positivo en el proceso de extracción y ambas son significativas para estas tres familias de compuestos, mientras que para la presión el efecto es positivo pero no significativo. Con respecto al BFA, el tiempo y la temperatura tienen un efecto positivo y son significativos, mientras que en el caso de la presión el efecto es negativo y significativo.

La siguiente etapa fue realizar un ANOVA, determinándose el valor de % R^2 , para así conocer la idoneidad del diseño aplicado.

Tabla IV.3. Tabla de análisis de varianza. Valores de R^2

	R^2 (%)		
	Lodo de depuradora	Compost	Suelo
PBs	91.81	95.55	93.17
BPs	88.32	93.21	90.76
BFA	93.66	91.45	96.99
TCS y TCB	97.53	97.96	93.99

Como se observa en la tabla, para todos los analitos en estudio en las tres matrices estudiadas, el valor calculado fue siempre superior al 85 %, demostrando un buen ajuste de los datos al modelo propuesto.

Finalmente se procedió al estudio de las superficies de respuesta obtenidas con objeto de determinar de manera gráfica cuál es el óptimo de las condiciones propuestas. El óptimo fue calculado maximizando la ecuación de la curva que da lugar a la representación de la superficie de respuesta.

A continuación, se muestra el estudio de las superficies de respuesta para los analitos estudiados en las diferentes matrices:

- **Lodo de depuradora.** En la *figura IV.5* se muestran las superficies de respuesta en esta matriz.

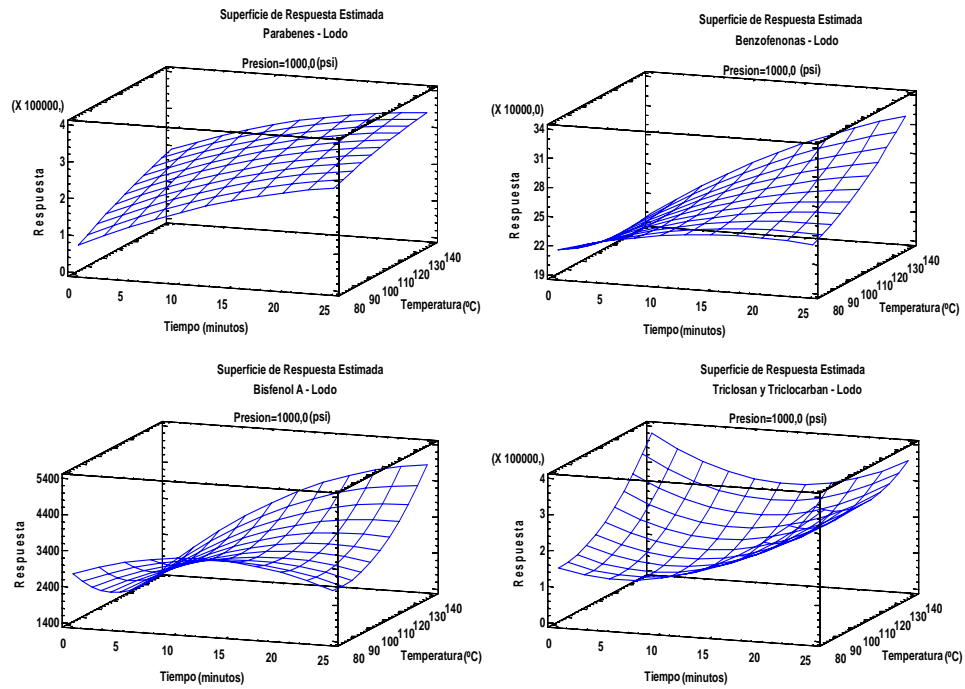


Figura IV.5. Superficies de respuesta.
PBs, BPs, BFA y TCS-TCB en lodo de depuradora

- **Compost.** En la **figura IV.6** se muestran las superficies de respuesta en esta matriz.

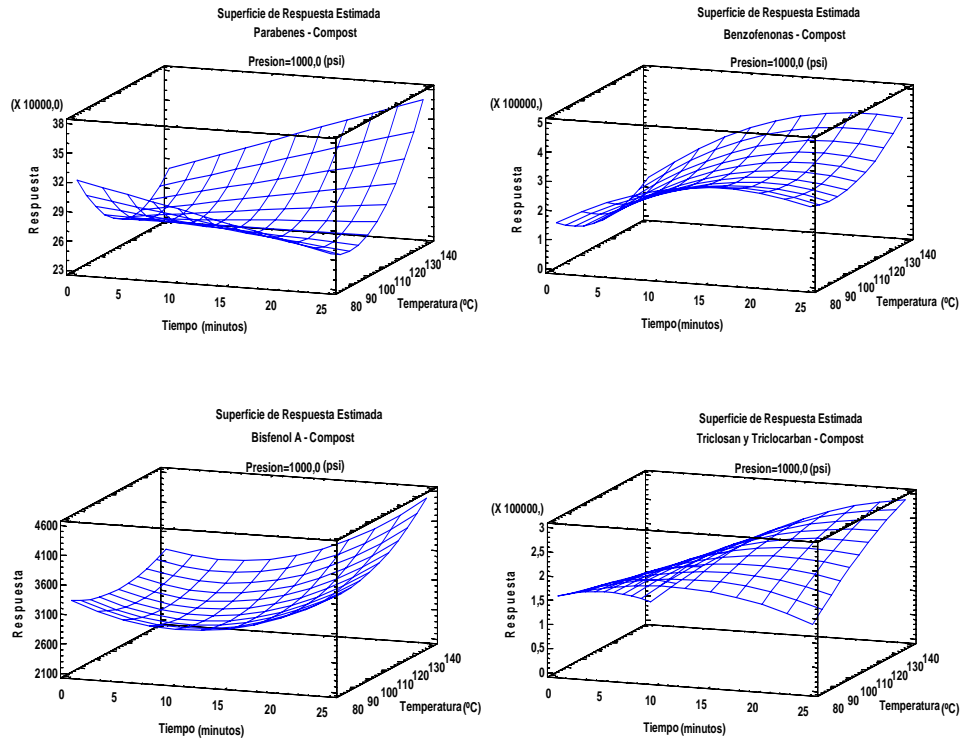


Figura IV.6. Superficies de respuesta.
PBs, BPs, BFA y TCS-TCB en compost

- **Suelo.** En la **figura IV.7** se muestran las superficies de respuesta para esta matriz.

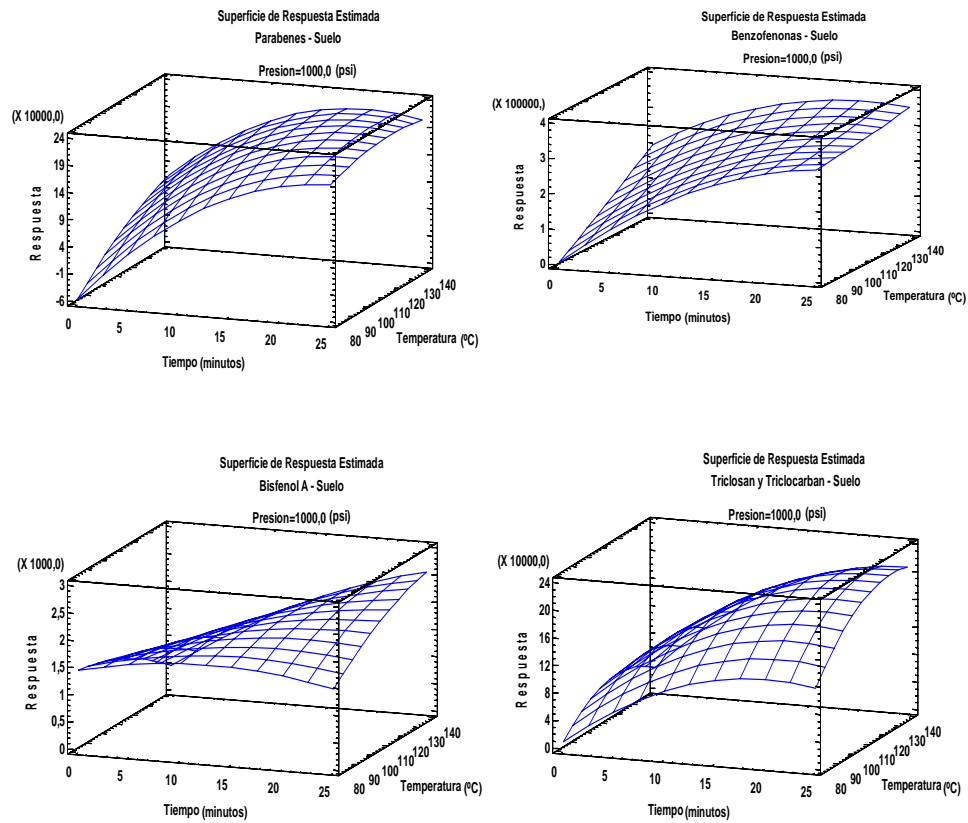


Figura IV.7. Superficies de respuesta.
PBs, BPs, BFA y TCS-TCB en suelo

En la **tabla IV.4** se muestran los valores óptimos para las tres variables optimizadas en el proceso de PLE en las diferentes matrices.

Tabla IV.4. Óptimos de tiempo, temperatura y presión de extracción

	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Presión (psi)
Lodo de Depuradora			
PBs	25.0	140.0	1260
BPs	24.4	139.2	653
BFA	25.0	140.0	915
TCS y TCB	24.6	140.0	1500
Compost			
PBs	25.0	140.0	844
BPs	23.7	140.0	1311
BFA	25.0	140.0	1313
TCS y TCB	25.0	140.0	1338
Suelo Agrícola			
PBs	24.3	140.0	1386
BPs	24.5	140.0	1500
BFA	25.0	140.0	780
TCS y TCB	25.0	134.7	1278

Los resultados obtenidos demuestran que para la mayoría de los analitos, el tiempo y la temperatura producen un efecto positivo en el proceso de extracción. Se fijó 25 min para el tiempo y 140°C para la temperatura de extracción. Estos valores son próximos a los óptimos obtenidos para la mayoría de los analitos en las tres matrices. En cambio para presión, dada la variabilidad observada, se escogió como solución de compromiso 1000 psi.

Por último, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se observó, que para el procedimiento de extracción mediante PLE, para todos los analitos estudiados, no existe una diferencia importante en relación a los óptimos seleccionados para cada parámetro estudiado en cada una de las matrices (lodo de depuradora, compost y suelo agrícola).

2.2. Procedimiento Final de Extracción Mediante PLE

A continuación se resumen los valores óptimos y se detalla el procedimiento final de extracción PLE aplicado a todas las matrices cuando se empleó esta técnica de extracción.

- Se pesan 0.5 g de muestra en la célula metálica, y se extrae en el equipo fijando las condiciones mostradas en la **tabla IV.5**.

Tabla IV.5. Variables optimizadas y las condiciones de extracción final para el procedimiento por PLE en las tres matrices estudiadas

Variable	Valor	Variable	Valor
Pre calentamiento	2 min	Presión	1000 psi
Calentamiento	5 min	Temperatura	140°C
Flush	30 %	Tiempo estático	25 min
Purga	90 s de N ₂	Ciclos	1

- El extracto orgánico obtenido se trasfiere a un tubo de centrifuga y se centrifuga durante 30 min a 5000 r.p.m. (3634 x g).
- El sobrenadante es recogido sobre un vial de vidrio y se evapora a sequedad bajo corriente de N₂.
- A continuación, se redisuelve con 1 mL de la fase móvil inicial cromatográfica, y se agita en vortex durante unos segundos.
- El extracto final, se filtra a través de filtro de nylon de 0.45 µm y se transfiere a un vial cromatográfico de vidrio, quedando listo para su inyección en el LC-MS/MS.

3. Calibración. Parámetros Analíticos y Validación del Método

3.1. Establecimiento del Modelo de Calibración

De forma análoga al procedimiento seguido en el caso de USE, para establecer la metodología analítica en las muestras de lodo de depuradora, compost y suelo agrícola se procedió del siguiente modo:

- Se realizó un calibrado externo con patrones para cada uno de los analitos en estudio.
- En segundo lugar se realizó un calibrado en la matriz correspondiente con todos los analitos seleccionados.
- Por último, se compararon las pendientes de ambos calibrados.

Al igual que en la técnica USE los patrones internos empleados en los calibrados externo y en matriz fueron EPB-¹³C₆ para los PBs, BP-d₁₀ para las BPs, BFA-d₁₆ para el BFA y el AMC (ácido meclofenámico) para el TCS y TCB, usando la relación entre el área del pico correspondiente al analito/área del patrón interno y la concentración del analito.

A continuación, se detalla el proceso seguido para el establecimiento de la metodología de cuantificación.

3.2. Evaluación del Efecto Matriz

De modo análogo al capítulo anterior, para evaluar el efecto matriz, se compararon las pendientes obtenidas en el calibrado externo y el calibrado en matriz, con objeto de conocer la existencia o no de diferencias significativas entre ellas.

A. Calibrado Externo

Para el establecimiento del calibrado externo, se prepararon 7 patrones conteniendo cantidades crecientes de los analitos; PBs, BPs, BFA, TCS y TCB (con 3 réplicas por cada nivel); y una concentración constante de los patrones internos, EPB-¹³C₆ (37.5 µg kg⁻¹), BP-d₁₀ (0.6 µg kg⁻¹), BFA-d₁₆ (375 µg kg⁻¹) y AMC (375 µg kg⁻¹).

En las siguientes tablas se recogen los parámetros estadísticos del calibrado con patrones externos.

Tabla IV.6. Parámetros del calibrado externo. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-8.3	-6.6	-4.2	-2.4	-3.6	-34.1
s _a	4.6	7.0	3.3	1.6	1.7	1.1
b (g ng ⁻¹)	8.1	5.4	3.2	9.6	9.7	7.9
s _b	2.6·10 ⁻²	1.3·10 ⁻²	6.5·10 ⁻²	3.0·10 ⁻²	2.2·10 ⁻²	2.2·10 ⁻²
R ² (%)	99.5	99.7	99.7	99.5	99.7	99.6
s _{y/x}	8.8	1.4	7.3	3.1	3.4	21.2

Tabla IV.7. Parámetros del calibrado externo. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	18.07	-3.2	5.0	51.7	1.4	2.2
s _a	7.9	1.5	2.7	8.2	0.9	1.3
b (g ng ⁻¹)	6.8	8.1	1.3	3.9	5.2	1.2
s _b	0.3	2.0·10 ⁻²	0.5	0.2	1.1	0.2
R ² (%)	99.1	99.7	99.3	98.3	99.8	99.8
s _{y/x}	14.9	2.9	5.1	15.5	1.8	2.5

Tabla IV.8. Parámetros del calibrado externo. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	2.1	-3.6
s _a	0.2	1.2
b (g ng ⁻¹)	4.1	3.9
s _b	1.0·10 ⁻²	7.4·10 ⁻²
R ² (%)	99.8	99.7
s _{y/x}	3.1	4.8

B. Calibrado en Matriz (Matrix Matched Calibration)

Al igual que para el calibrado externo se preparó una curva de 7 niveles de concentración (con 3 réplicas por cada nivel) mediante la adición de una solución patrón mezcla de todos los analitos en metanol. Se añadieron los patrones internos para obtener las concentraciones en los extractos finales de EPB-¹³C₆ (37.5 µg kg⁻¹), BP-d₁₀ (0.6 µg kg⁻¹), BFA-d₁₆ (375 µg kg⁻¹) y AMC (375 µg kg⁻¹) y se extrajeron según el procedimiento previamente optimizado.

En las tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos de los parámetros analíticos para las tres matrices estudiadas en la técnica de extracción PLE.

- **Lodo de depuradora.** A continuación se muestran los parámetros estadísticos del modelo para cada analito en las muestras de lodo de depuradora.

Tabla IV.9. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	36.9	4.4	15.1	14.3	1.6	-24
s _a	1.7	0.6	1.9	0.9	1.3	1.7
b (g ng ⁻¹)	1.8	1.3	1.6	7.9	2.4	0.5
s _b	9.5·10 ⁻²	1.2·10 ⁻²	3.5·10 ⁻²	1.8·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²	4.0·10 ⁻²
R ² (%)	99.4	99.9	97.9	99.7	99.9	99.9
s _{y/x}	3.2	1.2	3.6	1.8	2.5	3.4

Tabla IV.10. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	-2.2	1.8	7.2	399.2	21.4	38.3
s _a	0.8	1.7	5.3	141.6	11.4	12.3
b (g ng ⁻¹)	2.5	3.2	5.8	1.2	2.5	3.1
s _b	2.9·10 ⁻²	2.2·10 ⁻²	0.1	3.9·10 ⁻²	0.1	0.2
R ² (%)	99.9	99.9	99.9	99.6	98.6	98.7
s _{y/x}	15.1	3.3	1.1	26.8	2.7	2.4

Tabla IV.11. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	19.9	6.1
s _a	0.4	1.7
b (g ng ⁻¹)	1.1	3.8
s _b	2.5·10 ⁻²	6.4·10 ⁻²
R ² (%)	96.3	99.8
s _{y/x}	0.87	3.2

- **Compost.** A continuación se muestran los parámetros estadísticos del modelo para cada analito en las muestras de compost.

Tabla IV.12. Parámetros de calibración en compost. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	18.7	8.9	1.3	7.1	2.1	7.2
s _a	1.1	4.3	3.2	4.3	1.8	4.1
b (g ng ⁻¹)	2.1	1.9	9.2	7.3	2.3	6.8
s _b	5.9·10 ⁻²	8.0·10 ⁻²	6.0·10 ⁻²	8.0·10 ⁻²	2.2·10 ⁻²	9.3·10 ⁻⁶
R ² (%)	99.6	99.0	98.8	99.9	99.8	99.8
s _{y/x}	2.0	1.3	6.1	2.2	3.3	7.8

Tabla IV.13. Parámetros de calibración en compost. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	26.8	-2.2	1.7	327.1	-0.5	23.1
s _a	2.8	2.2	1.2	175.6	3.4	1.2
b (g ng ⁻¹)	2.7	2.6	1.1	4.9	3.6	3.7
s _b	1.0·10 ⁻²	2.8·10 ⁻²	2.3·10 ⁻²	4.9·10 ⁻²	3.8·10 ⁻²	2.1·10 ⁻²
R ² (%)	98.9	99.9	99.7	95.6	99.9	96.9
s _{y/x}	5.4	4.3	2.4	32.7	6.6	2.2

Tabla IV.14. Parámetros de calibración en compost. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	9.4	6.7
s _a	3.6	2.6
b (g ng ⁻¹)	3.7	12.1
s _b	2.0·10 ⁻²	9.8·10 ⁻²
R ² (%)	98.7	99.9
s _{y/x}	6.9	5.0

- **Suelo.** A continuación se muestran los parámetros estadísticos del modelo para cada analito en las muestras de suelo.

Tabla IV.15. Parámetros de calibración en suelo agrícola. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	23.3	9.9	7.9	13.0	48.0	56.8
s _a	1.7	2.4	3.2	8.8	15.8	13.8
b (g ng ⁻¹)	7.3	5.8	2.4	9.5	0.6	14.9
s _b	9.3·10 ⁻²	4.5·10 ⁻²	6.0·10 ⁻²	0.2	1.9·10 ⁻²	0.3
R ² (%)	99.7	99.7	99.6	99.9	99.5	99.9
s _{y/x}	3.2	4.5	6.1	1.7	3.1	2.3

Tabla IV.16. Parámetros de calibración en suelo agrícola. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	42.0	42.0	11.0	80.1	-26.2	56.8
s _a	17.4	13.5	3.4	34.16	12.2	13.8
b (g ng ⁻¹)	0.7	7.2	2.7	1.2	8.1	14.9
s _b	0.1	1.6·10 ⁻²	6.3·10 ⁻²	9.5·10 ⁻²	0.1	0.2
R ² (%)	97.0	99.6	99.7	97.1	99.9	99.9
s _{y/x}	32.9	2.5	6.4	34.7	6.1	37.4

Tabla IV.17. Parámetros de calibración en suelo agrícola. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	3.1	4.5
s _a	3.7	1.6
b (g ng ⁻¹)	1.7	5.1
s _b	2.1·10 ⁻²	6.0·10 ⁻²
R ² (%)	99.9	99.9
s _{y/x}	7.0	3.0

De forma análoga al capítulo anterior, en las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del efecto matriz.

➤ **Lodo de depuradora**

Tabla IV.18. Comparación de calibrados para el lodo de depuradora. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	77.4	7.5	2.17	NO	227.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	10.2						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1.9	1.4	2.17	SÍ	226.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.4						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	53.3	4.1	2.17	NO	22.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	12.9						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.6	2.9	2.17	NO	48.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	3.2						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	11.6	1.8	2.17	SÍ	330.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	6.3						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	449.4	38.8	2.17	NO	98.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	11.6						

Tabla IV.19. Comparación de calibrados para el lodo de depuradora. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.6	12.8	2.17	NO	229.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	0.7						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	23.0	2.3	2.17	NO	0.8	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	10.2						

Tabla IV.20. Comparación de calibrados para el lodo de depuradora. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	222.0	0.9	2.17	Sí	14.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	228.0						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.8	2.17	Sí	243.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	10.8						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	26.0	21.5	2.17	NO	8.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.2						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	240.2	0.3	2.17	Sí	13.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	718.2						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	3.2	0.4	2.17	Sí	2.4	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	7.3						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	6.3	1.1	2.17	Sí	6.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	5.8						

La evaluación de los resultados obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las muestras de lodo de depuradora, demuestra que en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede concluir que existe efecto matriz.

➤ **Compost****Tabla IV.21.** Comparación de calibrados para el compost. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	77.4	19.4	2.17	NO	225.0	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	4						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1.9	1.1	2.17	SÍ	42.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.7						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	53.3	1.4	2.17	SÍ	68.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	37.2						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.6	1.9	2.17	SÍ	25.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	4.8						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	11.6	1.1	2.17	SÍ	334.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	10.8						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	449.4	7.4	2.17	NO	46.0	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	60.8						

Tabla III.22. Comparación de calibrados para el compost. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.6	0.2	2.17	SÍ	21.8	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	47.6						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	23.0	0.9	2.17	SÍ	21.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	25						

Tabla III.23. Comparación de calibrados para el compost. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	222.0	7.6	2.17	NO	9.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	29.2						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.5	2.17	SÍ	268.8	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	18.5						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	26.0	4.5	2.17	NO	0.3	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	5.7						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	240.2	0.2	2.17	SÍ	4.8	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	4.8						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	3.2	0.1	2.17	SÍ	1.3	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	43.6						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	6.2	0.2	2.17	SÍ	12.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	4.8						

La evaluación de los resultados obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las muestras de compost, demuestra que en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede concluir que existe efecto matriz.

➤ Suelo

Tabla IV.24. Comparación de calibrados para el suelo. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	77.4	7.5	2.17	NO	29.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	10.2						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1.9	0.1	2.17	SÍ	8.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	20.2						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	53.3	1.4	2.17	SÍ	9.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	37.2						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.6	3.3	2.17	NO	0.6	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	2.9						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	11.6	1.2	2.17	SÍ	125.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	9.6						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	449.4	0.6	2.17	SÍ	91.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	800.9						

Tabla IV.25. Comparación de calibrados para el suelo. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.6	0.2	2.17	SÍ	103.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	49.0						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	23.0	2.6	2.17	NO	12.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	9						

Tabla IV.26. Comparación de calibrados para el suelo. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	222.0	0.2	2.17	Sí	1.3	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1082.4						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	1.3	2.17	Sí	35.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	6.2						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	26.0	0.6	2.17	Sí	2.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	40.9						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	240.2	0.2	2.17	Sí	13.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1204.1						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	3.2	0.1	2.17	Sí	2.6	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	37.2						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	6.2	1.2	2.17	Sí	0.6	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	5.3						

La evaluación de los resultados obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las muestras de suelo, demuestra que en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede concluir que existe efecto matriz.

3.3. Límites de Detección y Cuantificación

Para evaluar el límite de detección y cuantificación se utilizó la metodología basada en la función del calibrado, descrita anteriormente en el *Capítulo I Materiales y Métodos*, de esta Memoria. En las *tablas IV.27, IV.28 y IV.29* se muestran los resultados obtenidos para este parámetro, para cada uno de los analitos en las diferentes matrices.

Tabla IV.27. Límite de detección y de cuantificación para el lodo de depuradora

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-BP	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.57	0.22	0.02	0.05	2.06	0.67	0.07
LOQ (ng g ⁻¹)	1.70	0.66	0.07	0.16	6.20	2.00	0.20
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.21	0.44	0.11	0.16	0.03	0.02	0.11
LOQ (ng g ⁻¹)	0.63	1.31	0.34	0.47	0.09	0.06	0.34

Tabla IV.28. Límite de detección y de cuantificación para el compost

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-BP	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.08	0.76	1.09	0.14	0.84	2.56	0.23
LOQ (ng g ⁻¹)	0.26	2.28	3.28	0.43	2.51	7.68	0.69
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.23	1.76	0.12	0.20	0.37	0.02	0.07
LOQ (ng g ⁻¹)	0.68	5.27	0.37	0.61	1.10	0.08	0.23

Tabla IV.29. Límite de detección y de cuantificación para el suelo

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-BP	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.84	0.27	0.89	0.22	0.83	0.89	0.12
LOQ (ng g ⁻¹)	2.52	0.84	2.69	0.67	2.50	2.68	0.35
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.95	0.55	0.03	0.45	0.34	0.02	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	2.86	1.66	0.09	1.34	1.03	0.05	0.10

3.4. Rango Dinámico Lineal y Linealidad

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los analitos en las tres matrices (lodo de depuradora, compost y suelo).

Tabla IV.30. Rango dinámico lineal (ng g^{-1})

	Lodo	Compost	Suelo		Lodo	Compost	Suelo
MPB	1.7-400	0.3-400	2.5-400	BP-2	1.3-1800	5.3-1800	1.7-1800
EPB	0.7-120	2.3-120	0.8-120	BP-3	0.3-120	0.4-120	0.1-120
PPB	0.1-120	3.3-120	2.7-120	BP-6	0.5-800	0.6-800	1.3-800
BPB	0.2-120	0.4-120	0.8-120	BP-8	0.1-200	1.1-200	1.0-200
Ph-PB	6.2-1800	2.5-1800	2.5-1800	4OHBP	0.1-120	0.1-120	0.1-120
BFA	2.0-1000	7.7-1000	2.7-1000	TCS	0.2-400	0.7-400	0.4-400
BP-1	0.6-600	0.7-600	2.9-600	TCB	0.3-60	0.2-60	0.1-60

Por otro lado, los valores obtenidos de $\%R^2$ próximos al 100 % y el valor $P_{\text{lof}} > 5\%$, en todos los casos, demuestran que existe linealidad en el intervalo estudiado para todos los analitos en todas las matrices objeto de estudio.

3.5. Sensibilidad Analítica

De modo análogo al capítulo anterior, se evaluó la sensibilidad analítica o sensibilidad del calibrado. En la **tabla IV.31** se recogen los valores obtenidos para este parámetro, para cada analito en cada una de las matrices estudiadas.

Tabla IV.31. Sensibilidad analítica (ng g^{-1})

	Lodo	Compost	Suelo		Lodo	Compost	Suelo
MPB	14.3	11.1	7.0	BP-2	4.6	24.3	40.0
EPB	0.8	4.3	2.0	BP-3	1.6	2.5	0.8
PPB	5.0	4.4	2.0	BP-6	28.0	66.3	52.7
BPB	1.0	1.0	1.0	BP-8	8.3	2.8	1.6
Ph-PB	17.8	30.8	36.0	4-OHBP	6.1	4.0	1.2
BFA	5.6	11.5	12.8	TCS	34.0	16.2	4.0
BP-1	3.3	22.8	41.4	TCB	1.0	0.8	0.6

3.6. Exactitud del Método: Precisión y Veracidad

De forma análoga al caso de USE, para determinar la exactitud del método, se ha estudiado la veracidad del mismo en términos de recuperación y su precisión en términos de variabilidad inter e intra-día. En la **tabla IV.32** se muestran las recuperaciones de los ensayos realizados para cada analito durante la validación y en los valores obtenidos para la precisión, expresada como desviación estándar relativa (%RSD).

Tabla IV.32. Exactitud (veracidad y precisión) del método analítico

	Lodo de depuradora		Compost		Suelo	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	% RSD
MPB	103	5	99	7	101	5
EPB	102	5	98	3	98	4
PPB	99	3	100	5	96	4
BPB	97	4	99	4	98	5
Ph-PB	100	2	100	3	96	2
BFA	100	7	99	6	98	4
BP-1	100	2	100	2	99	3
BP-2	100	6	99	3	97	3
BP-3	103	6	100	4	101	4
BP-6	102	4	99	4	99	3
BP-8	101	7	101	4	98	4
4-OHBP	99	1	99	5	99	3
TCS	103	4	97	3	100	4
TCB	100	4	100	4	96	8

Los promedios de los porcentajes de recuperación para las diferentes matrices son próximos al 100 % (entre el 96 y el 103 %) en todos los casos, lo que nos lleva a concluir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, los valores de RSD obtenidos fueron menores del 10 % en todos los casos. Estos límites están dentro de límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación empleada, según la cual se consideran aceptables valores iguales o inferiores al 15 % y al 20 % en la zona próxima al límite de detección del método, por lo que se pudo concluir que el método propuesto empleando la técnica de PLE genera resultados próximos entre sí y por lo tanto cumple los requisitos de precisión. Se trata por tanto de un preciso y veraz y por tanto exacto.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para las tres matrices utilizando el método optimizado con la técnica PLE.

➤ **Lodo de depuradora**

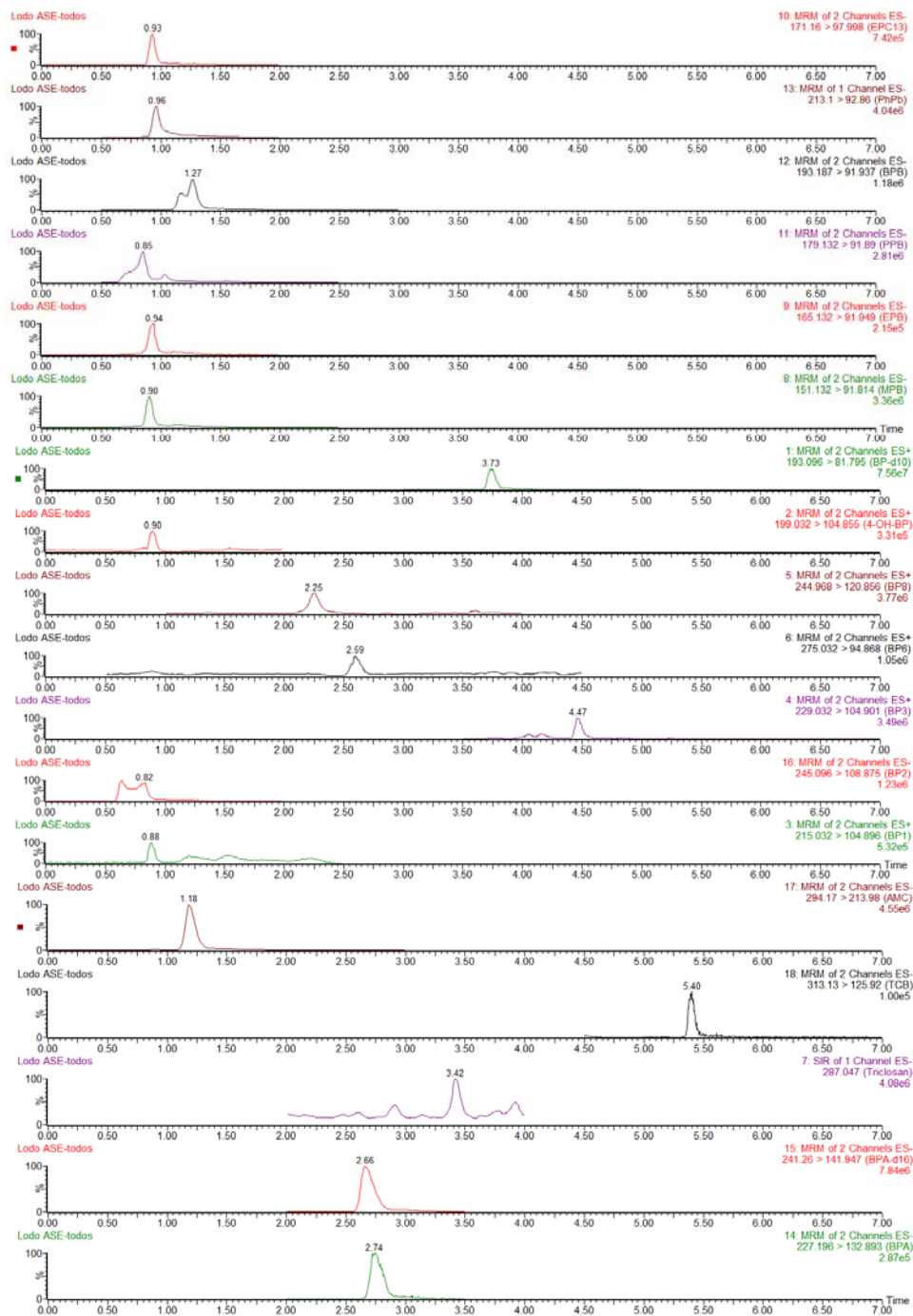


Figura IV.8. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de lodo de depuradora empleando el método de extracción basado en la técnica PLE

➤ Compost

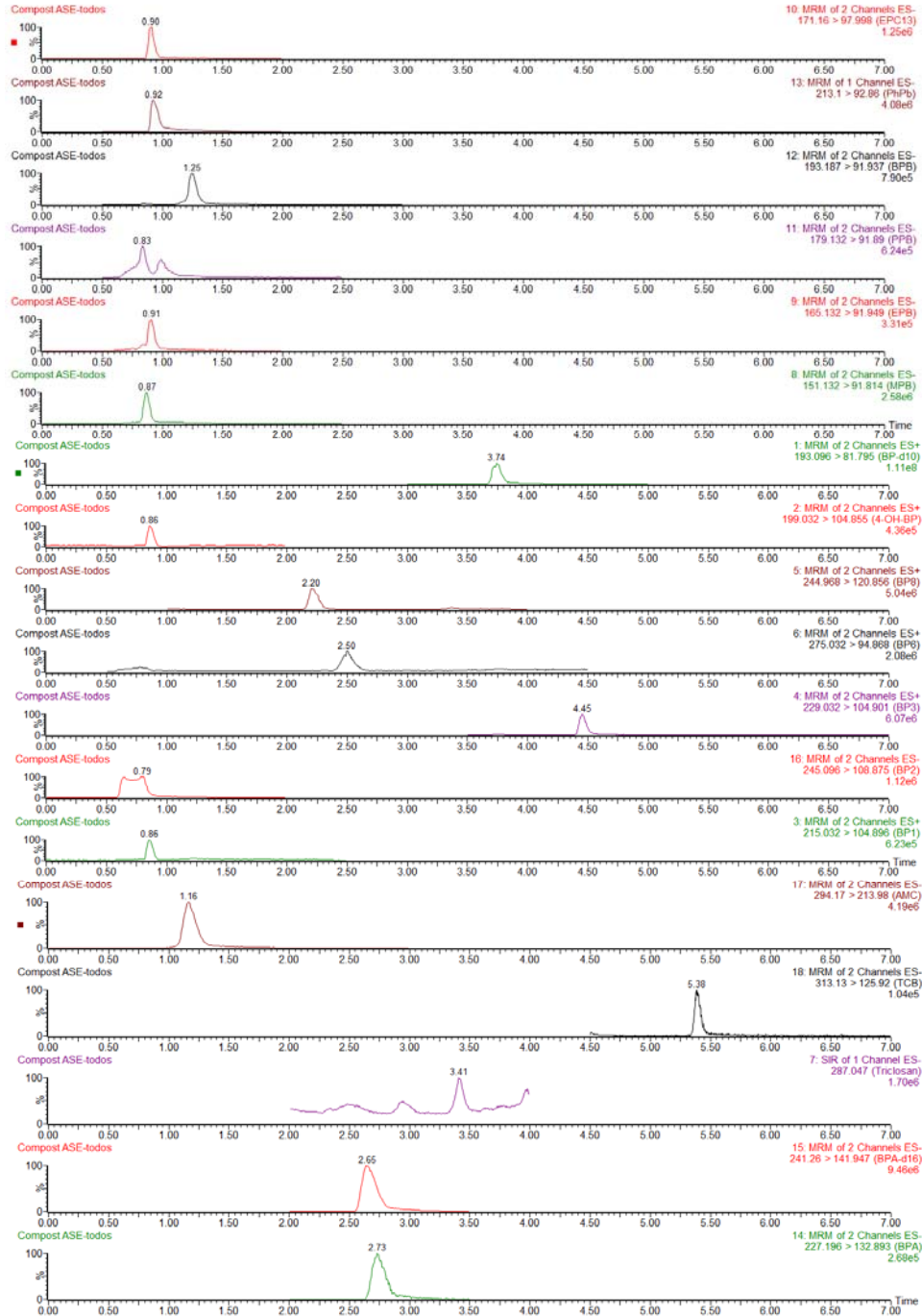


Figura IV.9. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de compost empleando el método de extracción basado en la técnica PLE

➤ Suelo

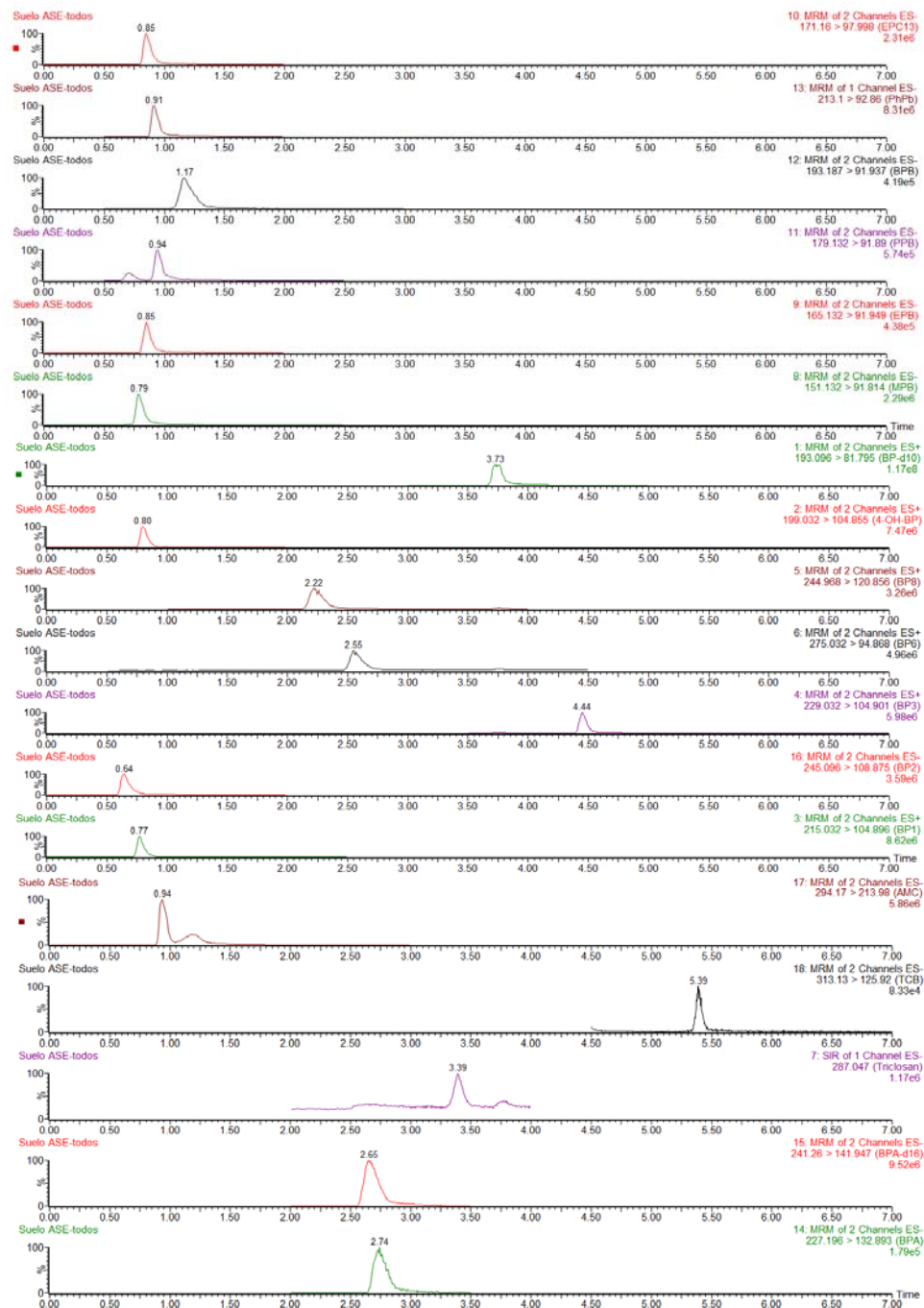


Figura IV.10. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de suelo agrícola empleando el método de extracción basado en la técnica PLE

CAPÍTULO V

Tratamiento de Muestra. Optimización
de la Técnica de Limpieza de los
Extractos Mediante QuEChERS

1. Descripción de la Técnica de QuEChERS

Tradicionalmente los procesos más comunes empleados para la limpieza de extractos obtenidos mediante extracción sólido-líquido han sido la purificación en columna, y la extracción en fase sólida (SPE); procedimientos que hacen que el proceso se alargue y sea más tedioso. Además hay que añadir posibles pérdidas de analito que harán que las recuperaciones sean aún más bajas. Recientemente se han propuesto, como alternativa a estos procedimientos, otros como la extracción en fase sólida dispersiva (dSPE)¹⁵², basada en la dispersión de la muestra sobre un adsorbente (florisil, C₁₈, alúmina, sílice o tierra de diatomeas) para llevar a cabo la extracción y *clean-up* de la muestra en una única etapa. Esta metodología ha derivado en la aparición de la conocida como técnica QuEChERS; siglas en ingles de rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), desarrollado inicialmente por Anastassiades y sus colaboradores¹⁵³ para la extracción de residuos de plaguicidas en frutas y verduras, cereales y derivados.

Consiste en un determinado número de etapas fáciles y rápidas de realizar donde no se requiere pre-concentración de los extractos. Los pasos en qué consiste la extracción son:

- Pesar una cantidad de muestra, añadir acetonitrilo y agitar.

¹⁵² Barker, S.A., Long, A.R., Short, C.R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A* 475 (1989) 353-361.

¹⁵³ Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *International Journal of Association Official Analytical Chemist* 86 (2003) 412-431.

- Añadir NaCl, MgSO₄ y otras sales para ajustar el pH y generar un efecto de “salting-out”.
- Agitar vigorosamente y centrifugar.
- Tomar una alícuota de la fase orgánica superior y realizar una extracción en fase sólida dispersiva con MgSO₄ y PSA (amina primaria-secundaria) para eliminar el agua e interferentes.
- Agitar, centrifugar y analizar el extracto obtenido.

El método QuEChERS se está convirtiendo en la actualidad el método más empleado para la extracción y limpieza en numerosas aplicaciones medioambientales, ya que se trata de una técnica simple y permite realizar el proceso directamente sobre el extracto de la muestra sin tener que recurrir a protocolos externos.

2. Selección y Optimización de las Variables del Proceso de Extracción

Tomando como punto de partida el método QuEChERS original, se han optimizado las diferentes etapas de las que consta el proceso de extracción para los analitos seleccionados en las tres matrices (lodo de depuradora, compost y suelo agrícola). Los parámetros optimizados han sido:

- Cantidad de muestra.
- Disolvente de extracción.
- Volumen de disolvente (relación sólido/disolvente).
- Cantidad de NaCl para producir la separación de fases.
- Adición de MgSO_4 para el secado del disolvente de extracción.
- pH.
- Tipo y cantidad de adsorbente: PSA, florisil, C_{18} y carbón negro grafitizado (GBC).

En todos los casos se ha empleado una metodología de tipo univariante. Para llevar a cabo las optimizaciones del procedimiento de extracción en el método del QuEChERS se utilizaron muestras libres de los analitos en estudio dopadas con todos los analitos a una concentración conocida de $750 \mu\text{g kg}^{-1}$.

2.1. Optimización de las Variables de Extracción

A. Disolvente de Extracción y pH

El primer parámetro que se evaluó fue el disolvente de extracción. Se decidió como punto de partida buscar y seleccionar el mejor disolvente, o mezcla de éstos, que presentara el mayor porcentaje de recuperación de los analitos. Posteriormente se mejoraría la extracción mediante la optimización del resto de parámetros.

Atendiendo a la polaridad de los analitos, los disolventes que se evaluaron fueron acetonitrilo, acetona, metanol, agua y mezclas de los tres disolventes orgánicos con agua.

El procedimiento seguido para la optimización de esta variable fue el siguiente:

- Se pesaron 5 g de muestra en un tubo falcon de 50 mL de capacidad.
- Se dopó la muestra con una disolución metanólica conteniendo a todos los analitos en estudio a una concentración de $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada analito y al patrón interno ($375 \mu\text{L}$ de una disolución de patrón interno para cada grupo de analitos de 5000 mg L^{-1} , EPB- $^{13}\text{C}_6$ para PBs, BP-d₁₀ para BPs, BFA-d₁₆ (BFA-d₁₆) para BFA y AMC para TCS y TCB).
- Se agitó la muestra durante 2 min en vortex y se dejó reposar un mínimo de 24 h, con el objeto de alcanzar el equilibrio entre los analitos y la matriz.

Transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción de las muestras, según el siguiente protocolo:

- Se añadieron 15 mL de disolvente, 1.5 g de NaCl y 6 g de Na₂SO₄.
- Basándonos en la técnica de QuEChERS original, la mezcla se agitó de forma manual durante 5 min.
- Tras agitar, se centrifugó para separar las fases y se recogió 1 mL del sobrenadante en un vial cromatográfico filtrando con filtro de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro.
- Los extractos así preparados fueron inyectados directamente en el cromatógrafo de líquidos.

Las mejores recuperaciones y los extractos más limpios se obtuvieron cuando se empleó acetonitrilo y la mezcla acetonitrilo-agua. Con metanol y la mezcla con agua se obtuvieron también resultados satisfactorios, pero dado que la toxicidad de este disolvente es mayor que la del primero, se decidió no emplearlo. Los extractos en acetona eran más sucios que los anteriores, y las recuperaciones con agua fueron las más bajas, por tanto, ambos disolventes se desecharon. Es importante destacar que, en general, las mezclas de disolvente orgánico-agua presentaron mejores resultados que los disolventes puros, esto se debe posiblemente a que los analitos presentan una cierta polaridad y a que se reduce la cantidad de interferentes orgánicos extraídos.

Siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito y en función de los resultados obtenidos, se abordó la optimización del disolvente de extracción, ensayando mezclas ACN/Agua en diferentes proporciones.

En las **figuras V.1** y **V.2** se resumen los resultados obtenidos. Las respuestas son relativas a las obtenidas empleando acetonitrilo puro.

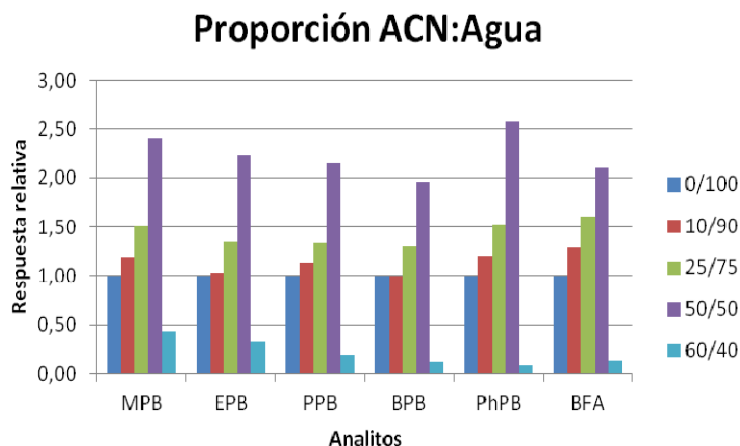


Figura V.1. Comparación de la eficacia de extracción de PB y BFA con diferentes mezclas acetonitrilo-agua

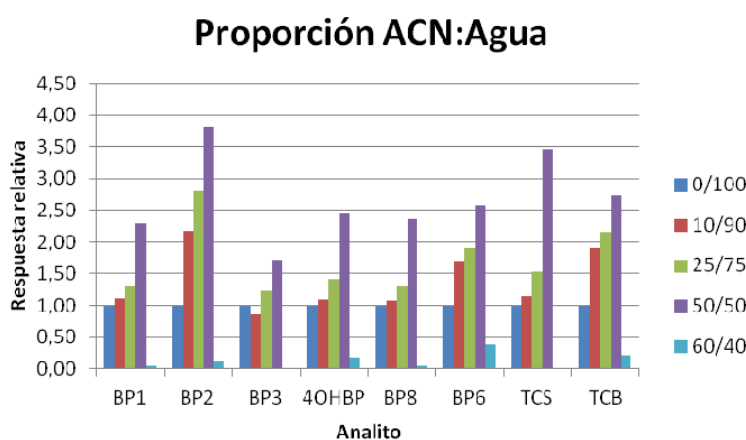


Figura V.2. Comparación de la eficacia de extracción de BPs, TCS y TCB con diferentes mezclas acetonitrilo-agua

De acuerdo a los resultados mostrados, las mejores recuperaciones para la mayoría de los analitos se obtuvieron con la mezcla 1:1 (v/v). Por tanto, para los sucesivos experimentos se seleccionó esta como disolvente de extracción.

A continuación se estudió la influencia del pH sobre la eficiencia de la extracción. Los analitos seleccionados tienen grupos hidroxilo (-OH) que le confieren cierto carácter ácido, por tanto el pH puede jugar un papel importante en la extracción de los compuestos. Se realizaron 5 experimentos por duplicado, adicionando diferentes volúmenes de ácido fórmico al disolvente de extracción: 0.0, 0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mL obteniéndose los resultados mostrados en las **figuras V.3** y **V.4**. Las respuestas son relativas a las obtenidas sin añadir ácido fórmico.

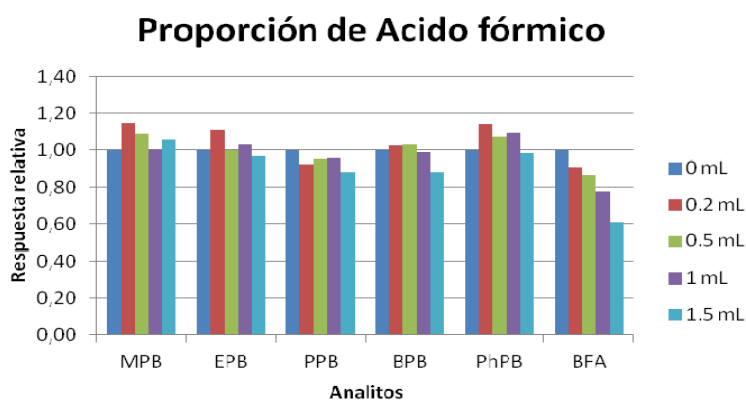


Figura V.3. Efecto del pH del disolvente de extracción en la recuperación de PBs y BFA

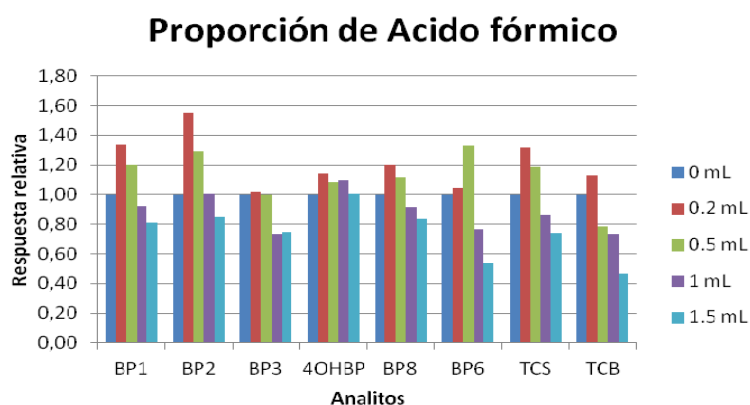


Figura V.4. Efecto del pH del disolvente de extracción en la recuperación de BPs, TCS y TCB

Al evaluar los resultados mostrados se demostró que el pH es un factor importante en la extracción. Las mejores recuperaciones se obtuvieron, para la mayoría de los analitos, cuando se adicionó un volumen de 0.2 mL de ácido fórmico sobre los 15 mL de disolvente. Por lo que este volumen de ácido fórmico concentrado se seleccionó como óptimo.

B. Cantidad de Muestra

Fijadas estas variables, se evaluó el efecto que ejerce la cantidad de muestra extraída, es decir, la proporción masa de muestra-volumen de disolvente. Se extrajeron diferentes masas de muestra, por duplicado, con el volumen de agente extractante previamente optimizado. En las **figuras V.5** y **V.6** se representan los resultados obtenidos. Las respuestas son relativas a las obtenidas con una masa de 0.5 g de muestra.

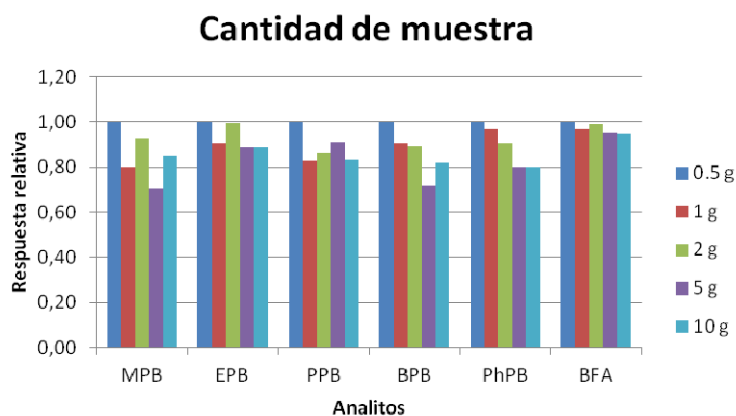


Figura V.5. Evaluación de la proporción relativa masa de muestra / volumen de disolvente para BFA y PBs

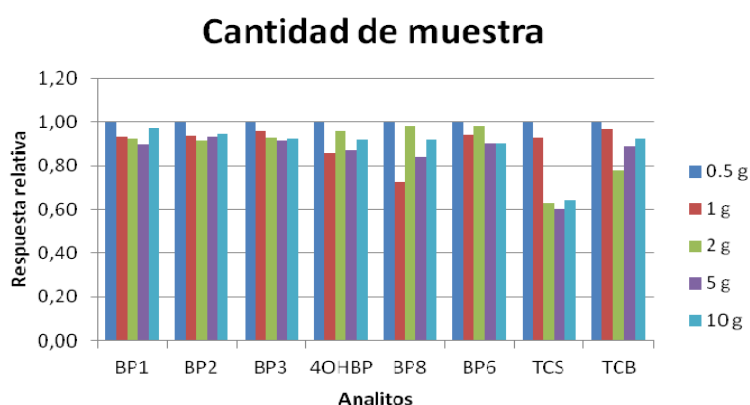


Figura V.6. Evaluación de la proporción relativa masa de muestra / volumen de disolvente para BPs, TCS y TCB

De acuerdo a los resultados obtenidos, las mejores recuperaciones para la mayoría de los analitos, se obtuvieron cuando se utilizó 0.5 g de muestra, siendo ésta la cantidad elegida para continuar la optimización de los siguientes parámetros de la extracción QuEChERS.

C. Efecto de las Sales en la Extracción: NaCl y Na₂SO₄.

Las dos sales empleadas en la extracción QuEChERS son el NaCl y el Na₂SO₄. El NaCl se emplea para que mediante el efecto "salting-out" se produzca la separación entre el disolvente orgánico y el agua que contiene la muestra, ya que el disolvente empleado es miscible con el agua. El Na₂SO₄ se emplea, además para potenciar el efecto "salting out" y ayudar en la separación de las fases, para evitar la formación de emulsiones. Además, tiene la capacidad de atrapar las grasas que pueda contener la muestra aunque no se produjera separación de fases.

Siguiendo el procedimiento descrito y aplicando las condiciones ya seleccionadas, se extrajeron muestras conteniendo 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 g

de NaCl. Los resultados obtenidos se muestran en las **figuras V.7 y V.8**. Las respuestas son relativas a las obtenidas en una extracción sin añadir NaCl.

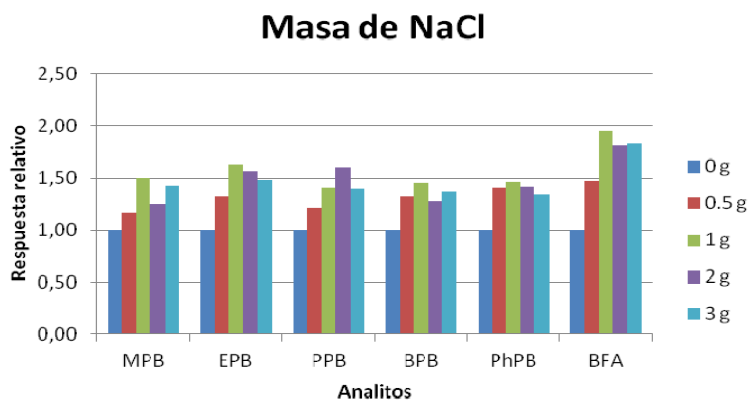


Figura V.7. Resultados de la evaluación de la masa de NaCl para la extracción de PBs y BFA

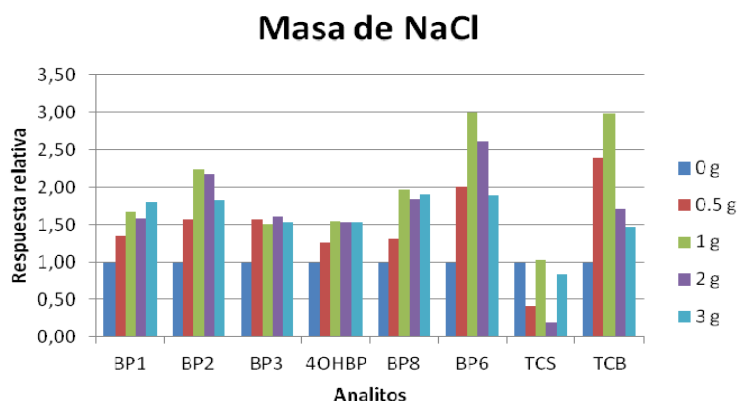


Figura V.8. Resultados de la evaluación de la masa de NaCl para la extracción de BPs, TCS y TCB

La evaluación de los resultados mostrados en las figuras demuestra que las mejores recuperaciones se obtuvieron, para la mayor parte de los analitos, cuando se utilizó 1 g de NaCl. Esta cantidad fue la seleccionada como óptima.

A continuación se evaluó la presencia de cantidades crecientes (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10 g de Na_2SO_4). Los resultados obtenidos se muestran en las **figuras V.9** y **V.10**. Las respuestas son relativas a las obtenidas en una extracción sin añadir Na_2SO_4 .

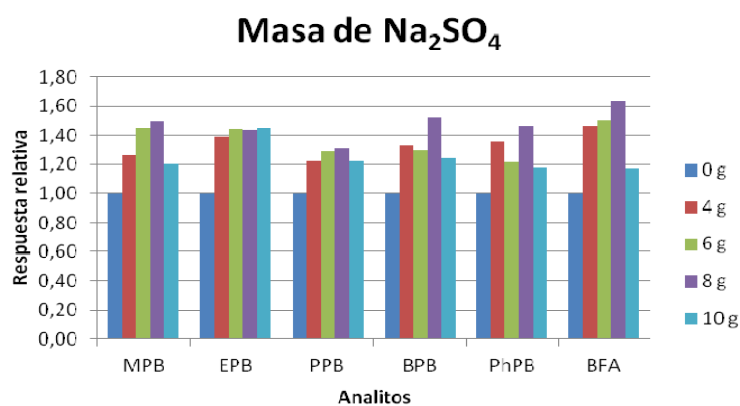


Figura V.9. Resultados de la evaluación de la masa de Na_2SO_4 para la extracción de PBs y BFA

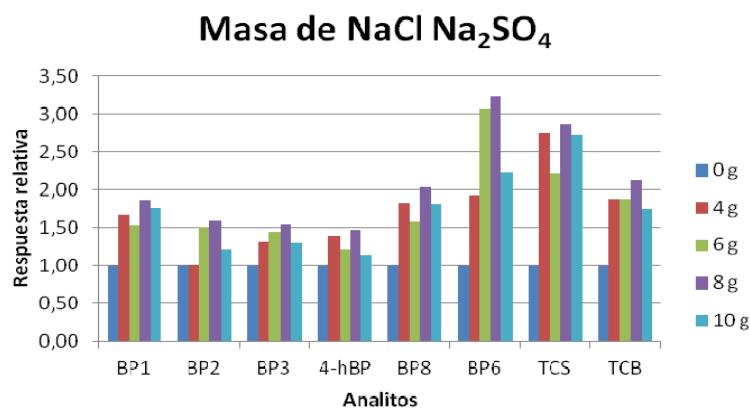


Figura V.10. Resultados de la evaluación de la masa de Na_2SO_4 para la extracción de BPs, TCS y TCB

Se observa que las mejores recuperaciones se obtuvieron, para la mayor parte de los analitos, cuando se utilizaron 8 g de Na_2SO_4 , siendo ésta cantidad seleccionada como óptima.

D. Elección del Adsorbente para la Extracción Dispersiva

Tras la extracción sólido-líquido, la muestra se centrifuga y el extracto se separa en otro tubo de centrifuga más pequeño, donde se añaden los adsorbentes para la limpieza del extracto. Estos adsorbentes deben eliminar interferentes sin que se produzca pérdidas de los analitos. Los adsorbentes que se evaluaron fueron: PSA, C₁₈, carbón activado (GBC) y mezclas binarias de éstos.

Para esta optimización un extracto de cada una de las muestras estudiadas se separó en alícuotas de 1 mL y se trataron cada una con 100 mg del adsorbente a ensayar, las mezclas binarias también consistieron en 100 mg de cada componente. Una vez añadido el adsorbente sólido, los extractos se agitaron manualmente durante un minuto y se centrifugaron. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. La eficiencia de cada adsorbente se determinó de acuerdo a la recuperación obtenida frente a la medida del extracto sin tratar con adsorbente, también por duplicado. En las **figuras V.11** y **V.12** se muestran los resultados obtenidos. En todos los casos, se muestra la comparación frente al extracto sin tratar.

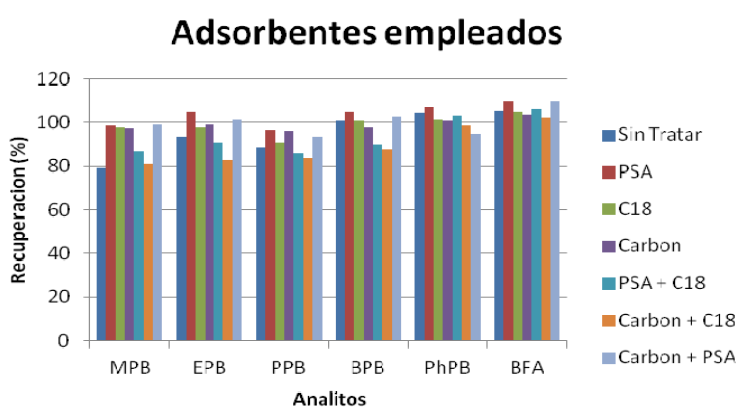


Figura V.11. Efecto de los diferentes adsorbentes empleados en dSPE en la recuperación de PBs y BFA

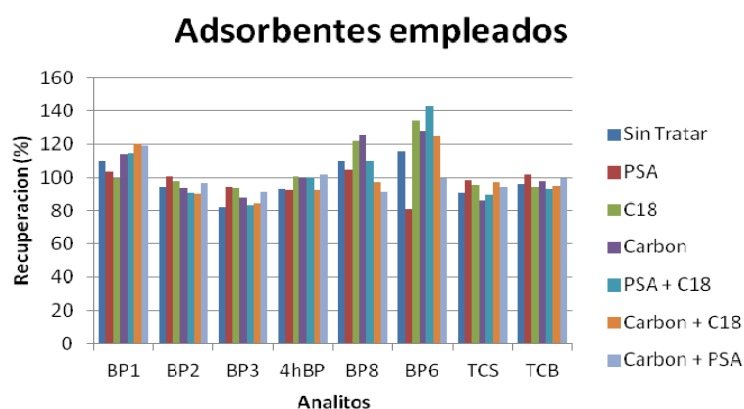


Figura V.12. Efecto de los diferentes adsorbentes empleados en dSPE en la recuperación de BPs, TCS y TCB

Los analitos MPB, PPB, BP-2, BP-3 y BP-6 presentan efectos de matriz significativos, obteniéndose recuperaciones del 85 % o inferiores en los extractos sin tratar. Esto se debe fundamentalmente a la interferencia por parte de la matriz, produciéndose supresión de la ionización en LC-MS/MS. Los resultados demuestran que la recuperación de todos los analitos mejora con el empleo de la extracción en fase sólida dispersiva. Los mejores resultados se obtuvieron empleando PSA y C18. El GCB adsorbió también algunos de los analitos y se obtuvieron recuperaciones más bajas que en los extractos sin tratar; los analitos que más se adsorbieron por el GCB fueron BPB, Ph-PB, BFA y BP-2 y TCS. Finalmente, se seleccionó PSA como adsorbente para la extracción dispersiva.

2.2. Procedimiento Final de Extracción con QuEChERS

El procedimiento final optimizado para el tratamiento de las muestras mediante extracción QuEChERS fue el siguiente:

- Pesar 0.5 g de muestra (lodo de depuradora, compost y suelo agrícola) en un tubo falcón de 50 mL de capacidad y añadir el patrón interno

para los cuatros grupos de analitos estudiados. Agitar vigorosamente en vortex y dejar reposar al menos 24 h para estabilizar.

- Adicionar 7.5 mL de agua, 7.5 mL de acetonitrilo y 0.2 mL de ácido fórmico.
- Agregar 1 g de NaCl y agitar manualmente durante 2 min. Terminada esta agitación, agregar 8 g de Na₂SO₄ anhidro y agitar de manera manual durante 2 min.
- Centrifugar durante 1 min a 5.000 r.p.m. (3634 x g) y separar una alícuota de 2 mL de la fase orgánica.
- Limpiar con 100 mg de PSA, y filtrar la disolución a través de un filtro de nylon 0.45 µm y se recoge en un vial cromatográfico de vidrio, quedando listo para su inyección.

Las cantidades empleadas, pueden adaptarse proporcionalmente a cantidades superiores de extracto.

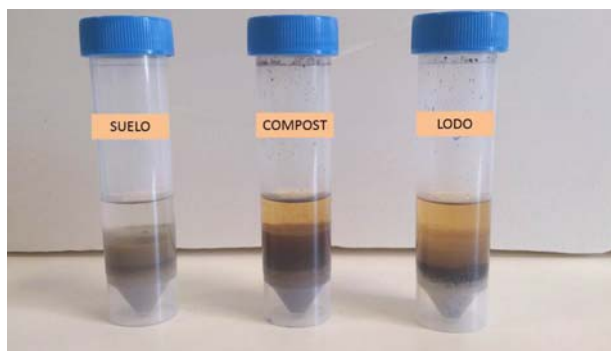


Figura V.13. Agitación manual y extractos finales de las tres matrices obtenidas tras la extracción de los QuEChERS

3. Calibración. Parámetros Analíticos y Validación del Método

3.1. Establecimiento del Modelo de Calibración

Al igual que en caso de las otras dos metodologías ya desarrolladas a lo largo de esta Memoria, para establecer la metodología analítica en las muestras de lodo de depuradora, compost y suelo agrícola se siguió el siguiente protocolo:

- En primer lugar se realizó un calibrado externo.
- En segundo lugar se realizó un calibrado en cada una de las matrices objeto de estudio.
- Finalmente, se compararon las pendientes de los calibrados externo y en cada una de las matrices estudiadas.

Se emplearon los patrones internos ya descritos anteriormente.

3.2. Evaluación del Efecto Matriz

Se procedió de modo similar a lo ya desarrollado en capítulos anteriores, comparándose el calibrado externo los correspondientes calibrados en cada una de las matrices objeto de estudio.

A. Calibrado Externo

Para el establecimiento de la función de calibrado externo, se prepararon patrones conteniendo cantidades crecientes de los analitos

(con 3 réplicas por cada nivel), y concentraciones constantes de los patrones internos de EPB-¹³C₆ (37.5 µg kg⁻¹), BP-d₁₀ (0.6 µg kg⁻¹), BFA-d₁₆ (375 µg kg⁻¹) y AMC (375 µg kg⁻¹).

En las siguientes tablas se recogen los parámetros estadísticos del calibrado con patrones externos.

Tabla V.1. Parámetros del calibrado externo. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-10.5	-4.6	-4.2	-2.3	-3.9	-14.2
s_a	0.28	0.6	0.3	1.1	1.1	1.9
b (g ng⁻¹)	8.4	5.4	2.1	9.6	9.2	7.6
s_b	1.6·10 ⁻²	1.1·10 ⁻²	5.2·10 ⁻²	2.0·10 ⁻²	1.4·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²
R² (%)	99.6	99.5	99.5	99.4	99.7	99.5
s_{y/x}	7.6	1.6	7.3	2.9	3.0	12.6

Tabla V.2. Parámetros del calibrado externo. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	16.2	-29.4	4.5	49.4	2.0	2.9
s_a	5.2	11.9	1.7	5.3	0.9	1.3
b (g ng⁻¹)	6.9	8.7	1.4	3.9	0.5	1.1
s_b	2.0·10 ⁻²	1.5·10 ⁻²	3.2·10 ⁻²	1.5·10 ⁻²	1.1·10 ⁻²	2.6·10 ⁻²
R² (%)	99.1	99.6	99.4	98.3	99.4	99.4
s_{y/x}	14.0	31.9	4.5	14.2	2.6	3.7

Tabla V.3. Parámetros del calibrado externo. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	5.1	-4.6
s_a	2.8	1.0
b (g ng⁻¹)	4.1	3.9
s_b	1.2·10 ⁻²	3.9·10 ⁻²
R² (%)	99.4	99.8
s_{y/x}	1.6	3.8

B. Calibrado en Matriz (Matrix Matched Calibration)

Al igual que para el calibrado externo se preparó una curva de 7 niveles de concentración (con 3 réplicas por cada nivel) mediante la adición de las disoluciones patrón mezcla de los analitos en metanol y de los patrones internos para obtener las concentraciones en el extracto final de EPB-¹³C₆ (37.5 µg kg⁻¹), BP-d₁₀ (0.6 µg kg⁻¹), BFA-d₁₆ (375 µg kg⁻¹) y AMC (375 µg kg⁻¹).

En las tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos de los parámetros analíticos para las tres matrices estudiadas:

- **Lodo de depuradora.** A continuación los parámetros estadísticos del modelo.

Tabla V.4. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-23.5	-4.7	-1.2	-6.8	-1.1	24.6
s_a	9.4	2.2	0.75	2.8	2.4	4.6
b (g ng⁻¹)	4.3	3.5	1.5	6.2	5.2	6.5
s_b	5.3·10 ⁻²	4.1·10 ⁻²	1.4·10 ⁻²	5.2·10 ⁻²	3.0·10 ⁻²	1.0·10 ⁻²
R² (%)	99.6	99.7	99.8	99.8	99.9	99.4
s_{y/x}	5.6	1.3	2.8	1.6	8.9	17.3

Tabla V.5. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	-2.9	-0.3	7.7	238.8	2.8	3.5
s_a	1.8	3.6	2.8	43.3	1.4	9.8
b (g ng⁻¹)	5.9	4.3	4.2	1.3	1.6	12.9
s_b	6.8·10 ⁻²	4.5·10 ⁻²	5.3·10 ⁻²	1.0·10 ⁻²	1.5·10 ⁻²	0.1
R² (%)	99.6	99.2	99.6	98.0	99.7	99.5
s_{y/x}	6.9	13.8	10.1	13.1	5.3	37.1

Tabla V.6. Parámetros de calibración en lodo de depuradora. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	5.2	6.9
s_a	3.7	1.4
b (g ng⁻¹)	4.7	3.6
s_b	2.1·10 ⁻²	5.4·10 ⁻²
R² (%)	95.1	99.8
s_{y/x}	4.2	5.5

- **Compost.** A continuación los parámetros estadísticos del modelo para el método analítico de cada uno de los analitos en las muestras de compost.

Tabla V.7. Parámetros de calibración en compost. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-2.2	4.1	2.6	6.2	13.8	7.0
s_a	0.5	0.1	0.6	2.4	2.7	4.1
b (g ng⁻¹)	4.4	3.7	1.5	6.2	5.5	6.8
s_b	2.6·10 ⁻²	2.3·10 ⁻²	1.2·10 ⁻²	3.8·10 ⁻²	3.4·10 ⁻²	9.3·10 ⁻²
R² (%)	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.5
s_{y/x}	1.7	4.6	2.5	7.7	10.3	15.7

Tabla V.8. Parámetros de calibración en compost. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	1.1	10.2	18.3	314.8	2.8	3.8
s_a	1.6	2.2	3.8	49.4	1.3	8.1
b (g ng⁻¹)	6.8	5.2	4.9	1.3	1.9	14.5
s_b	5.8·10 ⁻²	2.8·10 ⁻²	7.1·10 ⁻²	1.3·10 ⁻²	1.4·10 ⁻²	0.1
R² (%)	99.7	99.9	99.4	98.3	99.8	99.7
s_{y/x}	5.9	8.4	4.6	17.3	0.5	5.5

Tabla V.9. Parámetros de calibración en compost. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	3.5	2.3
s_a	2.3	4.4
b (g ng⁻¹)	5.3	3.1
s_b	1.3·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²
R² (%)	98.5	99.9
s_{y/x}	4.0	1.6

- **Suelo.** A continuación los parámetros estadísticos del modelo para el método analítico de cada uno de los analitos en las muestras de suelo.

Tabla V.10. Parámetros de calibración en suelo agrícola. PBs y BFA

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA
n	21	21	21	21	21	21
a	-3.1	-0.9	-4.6	-1.8	-20.6	-22.9
s_a	2.2	0.6	2.7	1.0	13.4	9.5
b (g ng⁻¹)	0.5	0.4	2.1	7.9	6.9	7.4
s_b	1.2·10 ⁻²	1.1·10 ⁻²	4.9·10 ⁻²	1.8·10 ⁻²	1.6·10 ⁻²	2.1·10 ⁻²
R² (%)	99.4	98.6	99.5	99.3	99.4	99.4
s_{y/x}	8.4	2.2	10.1	3.8	5.7	36.2

Tabla V.11. Parámetros de calibración en suelo agrícola. BPs

	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
n	21	21	21	21	21	21
a	7.2	-32.6	3.9	535.8	8.5	1.4
s_a	1.5	25.1	1.2	62.4	6.2	0.5
b (g ng⁻¹)	1.6	5.5	6.6	1.6	2.7	3.3
s_b	5.6·10 ⁻²	3.1·10 ⁻²	0.2	0.2	7.0·10 ⁻²	9.7·10 ⁻²
R² (%)	98.4	98.9	98.1	98.1	97.9	98.5
s_{y/x}	5.7	34.9	4.4	26.4	2.4	1.9

Tabla V.12. Parámetros de calibración en suelo agrícola. TCS y TCB

	TCS	TCB
n	21	21
a	-1.5	-7.8
s_a	3.2	2.8
b (g ng⁻¹)	5.4	4.5
s_b	1.8·10 ⁻²	1.0·10 ⁻²
R² (%)	98.8	98.3
s_{y/x}	2.3	10.9

De forma análoga a los capítulos anteriores, en las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos en la evaluación del efecto matriz.

➤ **Lodo de depuradora**

Tabla V.13. Comparación de los calibrados externo y en lodo. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	57.8	1.8	2.17	SÍ	74.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	31.3						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.6	1.5	2.17	SÍ	44.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1.7						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	53.3	6.8	2.17	NO	9.8	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	7.8						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	3.3	2.17	NO	61.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	2.6						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.0	0.1	2.17	SÍ	279.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	79.2						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	158.8	0.5	2.17	SÍ	64.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	299.3						

Tabla V.14. Comparación de los calibrados externo y en lodo. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.6	0.1	2.17	SÍ	23.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	17.6						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	14.4	0.5	2.17	SÍ	5.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	30.3						

Tabla V.15. Comparación de los calibrados externo y en lodo. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	196.0	4.1	2.17	NO	60.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	47.6						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1017.6	5.3	2.17	NO	214.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	190.4						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	20.2	0.1	2.17	SÍ	176.0	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	102.0						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	201.6	1.2	2.17	SÍ	75.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	171.6						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	6.8	0.2	2.17	SÍ	108.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	28.1						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	13.6	0.1	2.17	SÍ	64.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	187.4						

La evaluación de los resultados obtenidos para cada uno de los analitos estudiados en las muestras de lodo de depuradora demuestra que, en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede concluir que existe efecto matriz.

➤ **Compost****Tabla V.16.** Comparación de los calibrados externo y en compost. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	57.8	20.1	2.17	NO	489.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	2.9						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.6	0.1	2.17	SÍ	446.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	21.2						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	53.3	8.5	2.17	NO	9.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	6.3						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.1	2.17	SÍ	79.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	59.3						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.0	0.1	2.17	SÍ	600.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	106.1						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	158.8	0.6	2.17	SÍ	43.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	246.5						

Tabla V.17. Comparación de los calibrados externo y en compost. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.6	0.2	2.17	SÍ	58.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	16.0						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	14.4	5.6	2.17	NO	72.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	2.6						

Tabla V.18. Comparación de los calibrados externo y en compost. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	196.0	5.6	2.17	NO	9.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	34.8						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1017.6	14.4	2.17	NO	404.9	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	70.5						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	20.3	0.9	2.17	SÍ	48.2	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	21.2						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	201.0	0.7	2.17	SÍ	74.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	299.3						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	6.8	27.0	2.17	NO	36.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	0.2						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	13.7	0.4	2.17	SÍ	88.0	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	30.2						

La evaluación de los resultados obtenidos en las muestras de compost demuestra que, en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede concluir que existe efecto matriz.

➤ Suelo

Tabla V.19. Comparación de los calibrados externo y en suelo agrícola. PBs y BFA

MPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	57.8	0.8	2.17	Sí	387.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	70.6						
EPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.6	0.5	2.17	Sí	315.4	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	4.8						
PPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	53.3	0.5	2.17	Sí	0.4	2.69	NO EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	102.0						
BPB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	8.4	0.6	2.17	Sí	334.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	14.4						
Ph-PB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	9.0	0.3	2.17	Sí	85.8	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	32.5						
BFA	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	158.8	0.1	2.17	Sí	7.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1310.4						

Tabla V.20. Comparación de los calibrados externo y en suelo agrícola. TCS y TCB

TCS	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	2.6	0.5	2.17	Sí	55.1	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	5.3						
TCB	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	14.4	0.1	2.17	Sí	6.1	2.687	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	118.8						

Tabla V.21. Comparación de los calibrados externo y en suelo agrícola. BPs

BP-1	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	196.0	6.0	2.17	NO	334.7	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	32.5						
BP-2	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	1017.6	0.8	2.17	SÍ	85.8	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	1218.0						
BP-3	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	20.2	1.0	2.17	SÍ	196.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	19.4						
BP-6	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	201.0	0.3	2.17	SÍ	12.5	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	696.9						
BP-8	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	6.8	1.2	2.17	SÍ	172.6	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	5.8						
4-OHBP	$S_{y/x}^2$	F_{cal}	F_{tab}	Homog. var.	t_{cal}	t_{tab}	Conclusión
Agua	13.7	3.8	2.17	NO	79.3	2.69	EXISTE EFECTO MATRIZ
Matriz	3.6						

Al igual que en las otras dos matrices estudiadas, la evaluación de los resultados obtenidos demuestra que, en la mayor parte de los casos, existen diferencias significativas entre las pendientes en el calibrado externo y el calibrado en matriz, por lo que se puede concluir que existe efecto matriz.

3.3. Límites de Detección y Cuantificación

Para evaluar el límite de detección y cuantificación se utilizó la metodología basada en la función del calibrado, ya descrita a lo largo de la presente Memoria. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla V.22. Límites de detección y de cuantificación para el lodo de depuradora

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.19	0.06	0.06	0.90	0.47	0.47	0.20
LOQ (ng g ⁻¹)	0.57	0.18	0.18	2.70	1.40	1.40	0.60
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.30	0.89	0.06	0.38	0.10	0.06	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	0.90	2.68	0.18	1.15	0.30	0.18	0.08

Tabla V.23. Límites de detección y de cuantificación para el compost

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.19	0.06	0.06	0.06	0.90	0.47	0.20
LOQ (ng g ⁻¹)	0.57	0.18	0.18	0.18	2.70	1.40	0.60
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.30	0.89	0.06	0.38	0.10	0.06	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	0.90	2.68	0.18	1.15	0.30	0.18	0.08

Tabla V.24. Límites de detección y de cuantificación para el suelo

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB	BFA	TCS
LOD (ng g ⁻¹)	0.20	0.05	0.05	0.05	0.84	0.50	0.18
LOQ (ng g ⁻¹)	0.60	0.15	0.16	0.16	2.51	1.50	0.55
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP	TCB
LOD (ng g ⁻¹)	0.28	0.90	0.05	0.40	0.09	0.05	0.03
LOQ (ng g ⁻¹)	0.83	2.70	0.16	1.20	0.27	0.16	0.09

3.4. Rango Dinámico Lineal y Linealidad

A continuación se muestran los resultados obtenidos para este parámetro en las tres matrices.

Tabla V.25. Rango dinámico lineal para cada analito (ng g^{-1})

	Lodo	Compost	Suelo		Lodo	Compost	Suelo
MPB	0.6-400	0.6-400	0.6-400	BP-2	2.7-1800	2.7-1800	2.70-1800
EPB	0.2-120	0.2-120	0.2-120	BP-3	0.2-120	0.2-120	0.2-120
PPB	0.2-120	0.2-120	0.2-120	BP-6	1.2-800	1.2-800	1.2-800
BPB	0.2-120	0.2-120	0.2-120	BP-8	0.3-200	0.3-200	0.3-200
Ph-PB	2.7-1800	2.7-1800	2.5-1800	4-OHBP	0.2-120	0.2-120	0.2-120
BFA	1.4-1000	1.4-1000	1.5-1000	TCS	0.6-400	0.6-400	0.6-400
BP-1	0.9-600	0.9-600	0.8-600	TCB	0.1-60	0.1-60	0.1-60

Por otro lado, los valores de $\%R^2$ próximos al 100 % y el valor $P_{\text{lof}} > 5\%$, en todos los casos, demuestran que existe linealidad en el intervalo estudiado para todos los analitos en todas las matrices objeto de estudio.

3.5. Sensibilidad Analítica

De modo análogo a los capítulos anteriores, se evaluó la sensibilidad analítica o sensibilidad de calibración. En la **tabla V.26** se recogen los valores obtenidos para este parámetro para cada analito en cada una de las matrices estudiadas.

Tabla V.26. Sensibilidad analítica (ng g^{-1}) para cada analito

	Lodo	Compost	Suelo		Lodo	Compost	Suelo
MPB	9.0	4.0	10.6	BP-2	64.2	16.0	40.6
EPB	3.0	1.2	4.7	BP-3	5.6	3.0	3.3
PPB	3.0	1.6	2.9	BP-6	41.6	34.7	36.3
BPB	3.2	1.2	3.4	BP-8	9.8	2.6	5.3
Ph-PB	34.2	18.4	47.0	4-OHBP	5.0	2.1	3.3
BFA	24.6	23.0	26.3	TCS	14.9	16.5	10.7
BP-1	20.2	10.3	25.6	TCB	2.6	0.5	0.9

3.6. Exactitud del Método: Precisión y Veracidad

De forma análoga a las dos técnicas estudiadas en los dos capítulos anteriores, se estableció la exactitud del método, en términos de veracidad (recuperación con muestras dopadas) y precisión (variabilidad inter e intra-día). En la **tabla V.27** se muestran los valores obtenidos.

Tabla V.27. Exactitud (veracidad y precisión) del método analítico

	Lodo de Depuradora		Compost		Suelo	
	%R	%RSD	%R	%RSD	%R	%RSD
MPB	88	15	90	10	88	11
EPB	90	12	93	14	90	10
PPB	90	14	90	12	88	11
BPB	93	13	92	15	86	12
Ph-PB	92	15	93	14	94	10
BFA	88	14	96	14	90	10
BP-1	88	15	90	13	86	7
BP-2	92	13	87	8	92	12
BP-3	87	15	93	14	87	11
BP-6	90	13	92	13	89	14
BP-8	92	12	93	14	85	12
4-OHBP	90	13	86	13	92	12
TCS	85	10	94	14	91	11
TCB	93	10	97	12	91	15

Como se observa en la **tabla V.27**, los promedios de los porcentajes de recuperación son próximos al 100 % en todos los casos (entre el 85 y el 97 %), lo que nos lleva a concluir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, los valores obtenidos para el RSD fueron menores o iguales al 15 % en todos los casos. Estos valores están dentro de los límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación, por lo que se pudo concluir que el método propuesto genera resultados próximos entre sí, por lo tanto cumple los requisitos de precisión. Se trata de un método veraz y preciso y por tanto exacto.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para las tres matrices utilizando el método de extracción QuEChERS, dopadas con todos los analitos.

➤ Lodo de depuradora

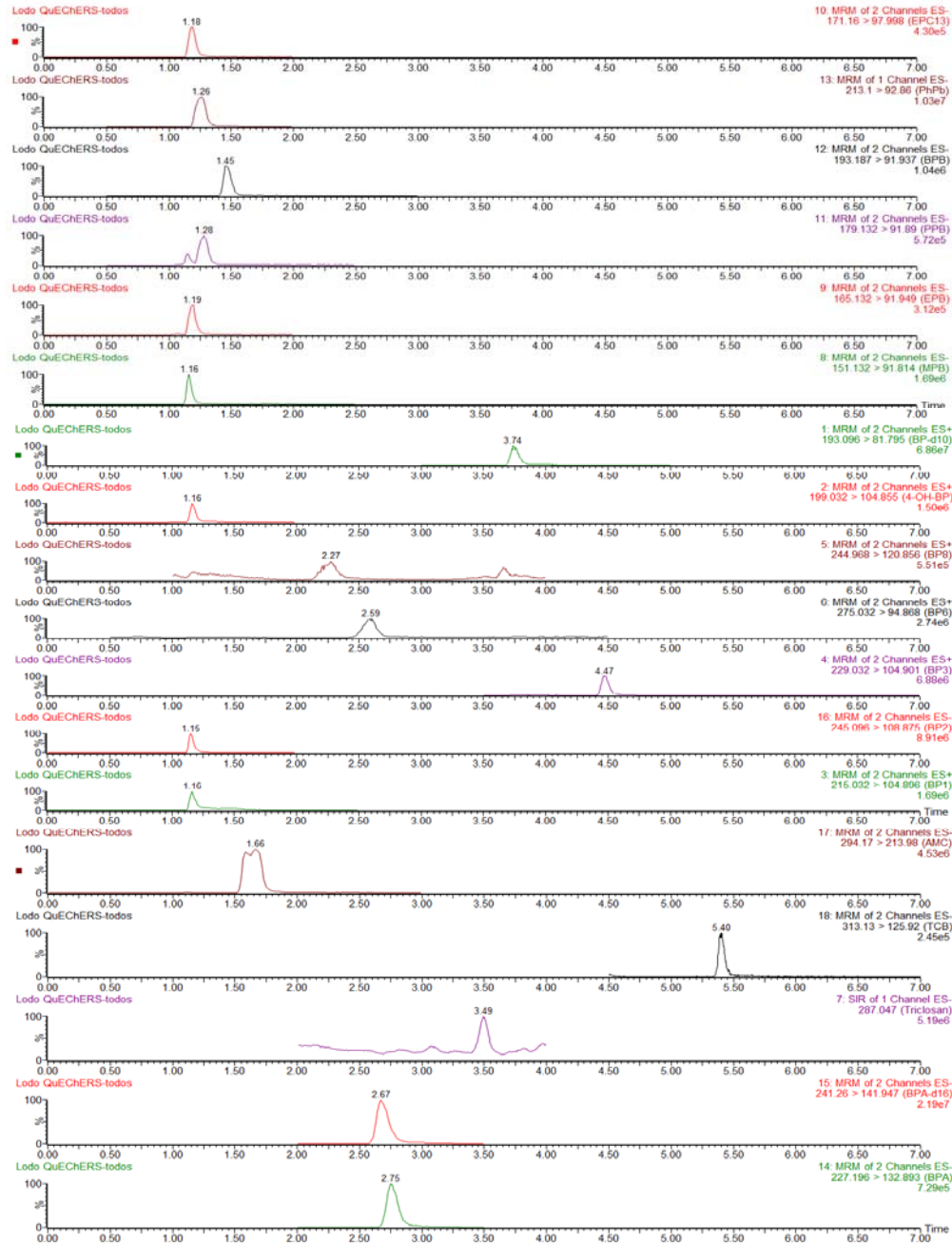


Figura V.14. Cromatograma obtenido para una muestra dopada de lodo de depuradora empleando el método optimizado basado en la técnica de QuEChERS

➤ Compost

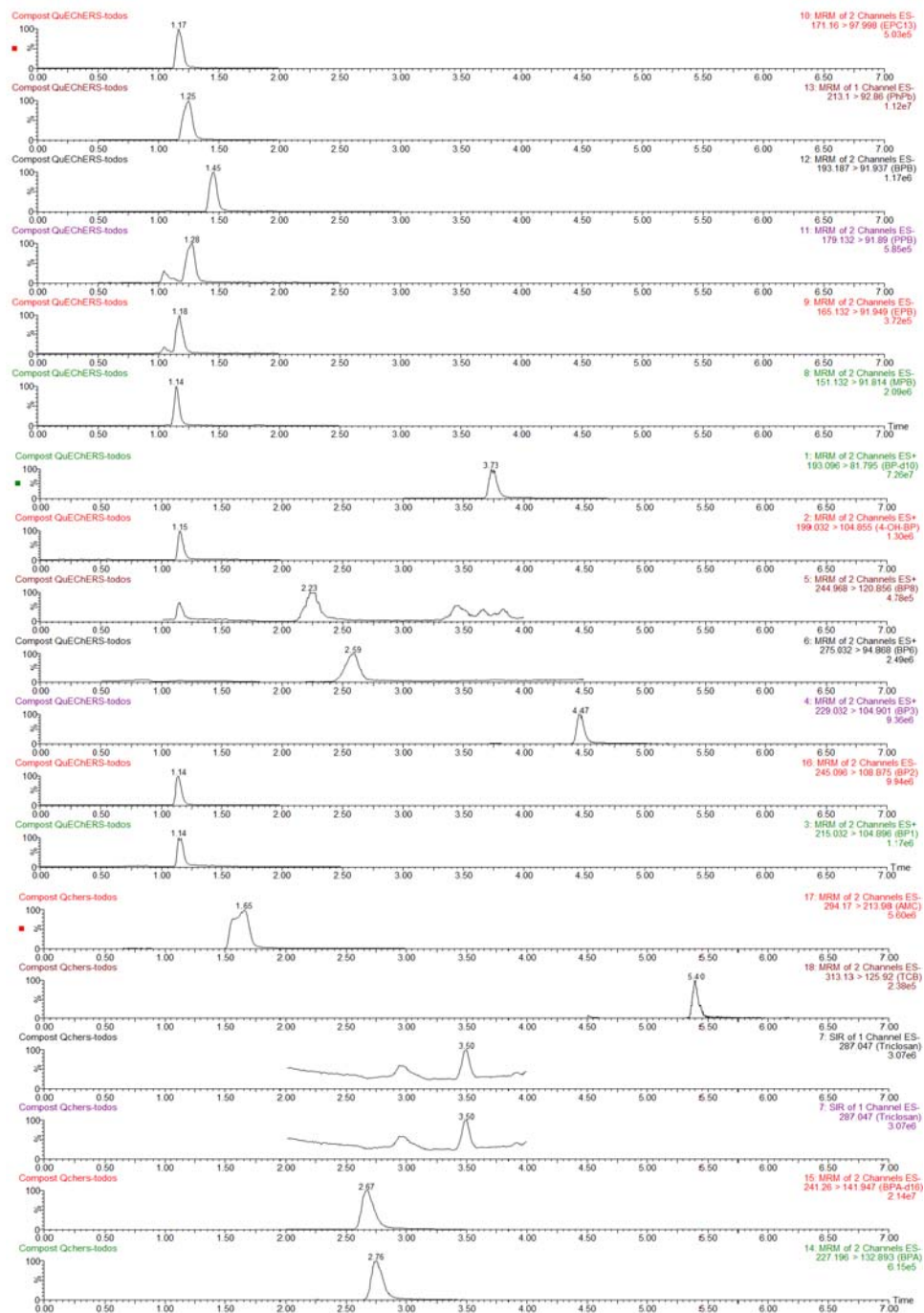


Figura V.15. Cromatograma obtenido de una muestra dopada de compost empleando el método optimizado basado en la técnica de QuEChERS

➤ Suelo

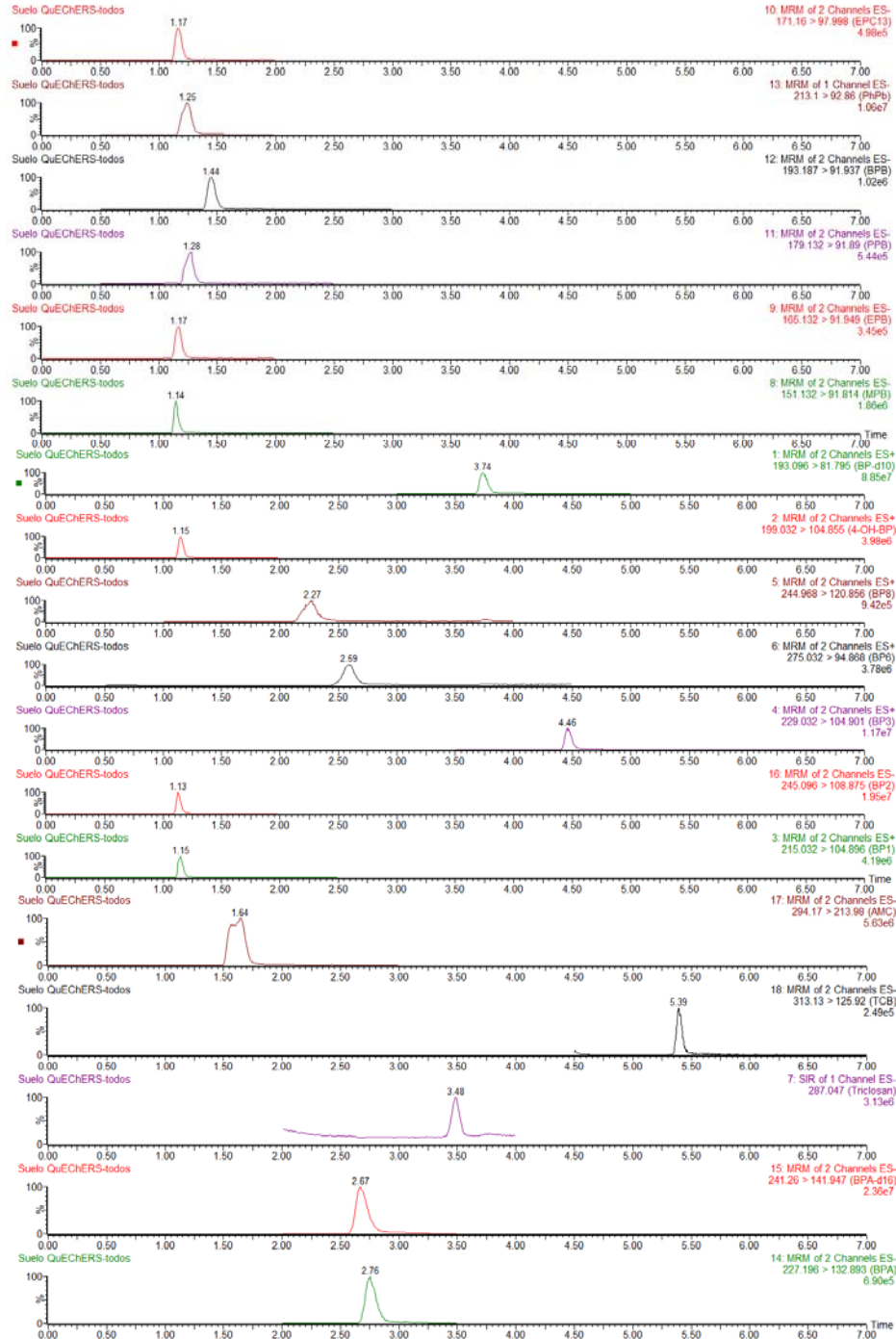


Figura V.16. Cromatograma obtenido de una muestra dopada de suelo agrícola empleando el método optimizado basado en la técnica de QuEChERS

CAPÍTULO VI

Aplicación en Campo. Estudio Químico

En este capítulo se desarrolla un estudio del comportamiento ambiental de los disruptores endocrinos seleccionados (PBs, BPs, BFA, TCS y TCB) en suelos agrícolas. El estudio se ha llevado a cabo en suelo de labor de una parcela situada en la Vega de Granada, tanto en condiciones naturales, como enmendada con compost obtenido a partir de lodos de depuradora. El objetivo final ha sido estudiar de forma comparativa la cinética de degradación de los contaminantes en ambas situaciones y realizar además un estudio microbiológico del suelo para determinar los efectos de los compuestos más representativos de cada familia, sobre el comportamiento de la microbiota cultivable del suelo.

En primer lugar, se describen los experimentos preliminares realizados para caracterizar físico-químicamente las matrices involucradas en estos ensayos (suelo agrícola, compost procedente de lodo de depuradora y agua de pozo), así como el diseño de las parcelas experimentales donde se ha realizado el estudio cinético y microbiológico.

A continuación, se describe la metodología desarrollada para la realización de los ensayos cinéticos y se muestran los resultados más relevantes obtenidos para cada compuesto, discutiendo los resultados obtenidos en cada caso y obteniendo las conclusiones oportunas.

Además en el capítulo siguiente, se describe la metodología utilizada para la realización de diversos ensayos microbiológicos, mostrando los resultados obtenidos para cada estudio y obteniendo las conclusiones oportunas.

1. Caracterización del Suelo, Agua y Compost Empleados

Como parte del estudio del comportamiento de los compuestos seleccionados en suelos y suelos enmendados con compost se realizó la caracterización tanto del suelo, como del agua de pozo y compost usados.

1.1. Estudio del Suelo Agrícola

Se ha caracterizado un suelo agrícola perteneciente a la Huerta Santa María situada en la Vega de Granada, en el municipio de Belicena a 5 km de la capital y de coordenadas $37^{\circ} 11'09.50''$ N; $3^{\circ} 41'39.85''$ O.

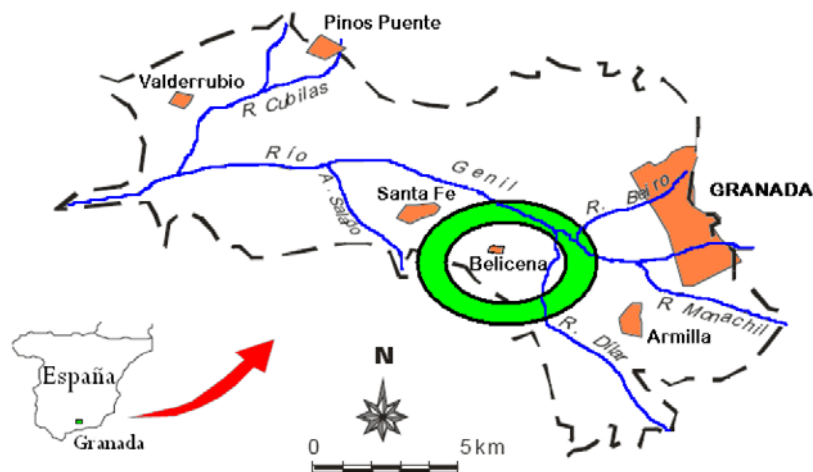


Figura VI.1. Zona de la Vega de Granada

Una vez en el laboratorio, el suelo recogido se secó al aire, fue triturado y pasado por un tamiz de 2 mm de malla. Los elementos gruesos superiores a este tamaño (grava) se lavaron con agua, se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se pesaron.

1.1.1. Propiedades Físicas del Suelo

- A) Textura.** El análisis granulométrico, se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Robinson¹⁵⁴.
- B) Densidad aparente.** Es la razón de la masa de suelo seco respecto al volumen del mismo en su estado natural, es decir, considerando tanto el volumen que ocupan las partículas sólidas como el que ocupan los poros. El procedimiento seguido para su determinación es el propuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵.
- C) Densidad real.** Es la densidad de las partículas sólidas del suelo, es decir, a la masa del suelo dividida entre el volumen que ocupan sus partículas. Para su determinación se ha seguido también el método propuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵.
- D) Porosidad.** Es la relación entre el volumen de poros y el volumen total de la muestra de suelo. Se puede calcular indirectamente, a partir de los valores de la densidad aparente y de la densidad real, mediante la expresión (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵):

$$\theta = \frac{(p_r - p)}{p_r} \cdot 100 \quad \mathbf{6.1}$$

donde θ es la porosidad (%), p_r , es la densidad real (g cm^{-3}) y p es la densidad aparente (g cm^{-3}).

¹⁵⁴ Robinson, G.W. A. A new method for mechanical analysis of soil and other dispersion. *Journal of Agricultural Science and Technology* 12 (1922) 306-321.

¹⁵⁵ Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas. *Ed. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación*. Madrid (1986) 182.

- E) Humedad.** El contenido en humedad del suelo en las condiciones del laboratorio se determina por diferencia de pesada entre un muestra de suelo antes y después de ser sometida a desecación a 105°C hasta peso constante (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵).
- F) Ensayos de permeabilidad.** Se llevó a cabo utilizando un permeámetro de carga variable. Se coloca la muestra en un recipiente cilíndrico y se compacta hasta tratar de reproducir la porosidad inicial. A la parte inferior de este recipiente se conecta un manómetro de vidrio, de pequeño diámetro, lleno de agua hasta un nivel inicial (h_0), que debe estar por encima del desagüe del recipiente que contiene la muestra, de modo que, iniciando el ensayo, el agua aporta por el tubo manométrico fluye a través de la muestra ensayada. En este momento, se mide el descenso del nivel de agua observando en el tubo en un tiempo determinado t . La permeabilidad se calcula mediante la expresión:

$$K = 2.3 \frac{a \cdot I}{A \cdot t} \cdot \log \frac{h_0}{h}$$

donde K es la permeabilidad (cms^{-1}), a es la sección del tubo manométrico de vidrio (cm^2), I es la altura del molde (cm), A es la sección del molde (cm^2), t es el tiempo (s), h_0 es el nivel inicial del agua en el tubo manométrico y h es el nivel del agua en el tubo manométrico en el tiempo t .

- G) Resultados.** Las características físicas y mineralógicas resumidas en la **Tabla VI.1**. El suelo estudiado es de textura fina, con predominio de limos finos y en menor proporción de limos gruesos y arcillas, estipulando que se trata de un suelo de tipo fluvisol calcáreo. Entre las arcillas predomina la illita, a la que le sigue en abundancia la esmectita.

Las arcillas menos abundantes son las del grupo de la caolinita. Debido a que el suelo presente una textura fina, un valor de la porosidad del 42.18 % y un valor bajo de la permeabilidad ($4.42 \cdot 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$), este suelo posee características que condicionan una baja capacidad de infiltración. A continuación, se recogen los resultados obtenidos.

Tabla VI.1. Propiedades físicas del suelo estudiado

Propiedades físicas			
Propiedades generales		Textura	
Densidad aparente (g cm^{-3})	1.39	Arenas totales (%)	20.00
Densidad real (g cm^{-3})	2.75	Limos gruesos (%)	24.50
Porosidad (%)	42.18	Limos finos (%)	33.55
Permeabilidad (cm s^{-1})	$4.42 \cdot 10^{-5}$	Arcillas (%)	21.95
Composición mineralógica			
Illita (%)	39.72	Caolinita (%)	10.25
Calcita (%)	23.71	Feldspatos (%)	8.34
Esmectita (%)	13.33	Cuarzo (%)	4.65

1.1.2. Propiedades Químicas del Suelo

A continuación se comentan brevemente las propiedades químicas estudiadas.

A) pH. La determinación del pH se realizó según el procedimiento propuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵. Se ha efectuado sobre cuatro suspensiones, dos de ellas de suelo y otras dos de suelo en disolución de KCl 0.1 N.

- B) Materia Orgánica.** Para su determinación se ha empleado el método propuesto por Tyurin¹⁵⁶.
- C) Aniones y cationes solubles del suelo.** Los iones solubles del suelo son aquellos que se disuelve al incorporar agua al suelo seco. Se miden en el extracto recogido de la pasta de saturación que se prepara añadiendo agua lentamente a la muestra de suelo, hasta que todos los poros estén llenos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵).
- D) Nitrato total.** El procedimiento seguido para su determinación fue el propuesto por Bouat & Crouzet¹⁵⁷.
- E) Determinación analítica de la capacidad de cambio.** La determinación de la capacidad de cambio catiónico se realizó según el procedimiento propuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵.
- F) Carbonatos.** Para determinar los carbonatos, se introduce un peso determinado de muestra en un crisol y horno de mufla, se eleva gradualmente la temperatura hasta 560°C (a esta temperatura los carbonatos no se ven alterados) y se mantiene durante 3 h, se deja enfriar y se pesa (de la diferencia de pesos obtienes el contenido en materia orgánica). Se vuelve a introducir el crisol en la estufa y se calienta gradualmente hasta 950 °C, se deja 2 h. enfriar y pesar. De esta forma descontada la materia orgánica se puede conocer el contenido en carbonatos.

¹⁵⁶ Tyurin, I.V. Analytical procedure for a comparative study of soil humus. Trudy Pochr. Inst. Dokuchaeva 33 (1951) 5-21.

¹⁵⁷ Bouat, A., Crouzet, C. Notes techniques sur un appareil semi-automatique de dosage de l'azote (et de certains composés volatils). *Annals of Agriculture* 16 (1965) 107-118.

G) Resultados. En **tabla VI.2** se muestran las características químicas del suelo agrícola seleccionado en el presente estudio.

Tabla VI.2. Propiedades químicas suelo estudiado

Propiedades Químicas			
pH (KCl)	7.4	Cationes solubles del suelo (mg kg⁻¹ de suelo)	
pH (agua)	7.9	Ca ⁺²	44.50
Materia orgánica (%)	1.81	Mg ⁺²	37.00
Carbono orgánico (%)	1.05	Na ⁺	42.50
Carbonatos (%CO ₂)	15.4	Minerales	
Nitrato total (%)	0.07	Al ₂ O ₃ (%)	12.76
Capacidad de cambio (meq Na ⁺ /100 g suelo)	22.12	SiO ₂ (%)	46.35
Bases de cambio (meq/100 g de suelo)		Fe ₂ O ₃ (%)	4.97
Ca ⁺²	29.78	MnO (%)	0.08
Mg ⁺²	2.56	MgO (%)	4.01
Na ⁺	0.34	Na ₂ O (%)	1.76
K ⁺	0.49	K ₂ O (%)	2.15
Aniones solubles del suelo (mg kg⁻¹ de suelo)		TiO ₂ (%)	0.61
SO ₄ ⁻²	241	P ₂ O ₅ (%)	0.24
Cl ⁻	91.5	CaO (%)	10.52

Se observa que este suelo presenta un valor de pH ligeramente básico (7.9). La presencia de KCl en el medio provoca una disminución de aproximadamente una unidad en el valor de pH, pasando a ser más neutro, lo que indica que el suelo actúa como cambiador iónico, con gran capacidad para la fijación de hidrogenoides.

La materia orgánica representa un porcentaje de 1.81 %, y los óxidos de Fe⁺³ y Al⁺³, determinados por fluorescencia de Rayos-X, representan el 4.97 y 12.76 % de la totalidad de los minerales detectados por la misma metodología. Además, las superficies de los óxidos pueden adquirir carga eléctrica y así interaccionar con especies cargadas, por medio de

interacciones electrostáticas. La adquisición de cargas ocurre por ionización de los grupos OH^- superficiales. En general, se observa que con los valores del pH del suelo estudiado (7.9), dichos óxidos e hidróxidos presentan una carga positiva, que junto a la calcita (CaCO_3) y el óxido de magnesio (MgO), confieren al suelo una sensible capacidad de intercambio de aniones.

Otra de las propiedades importantes relacionada con la capacidad de adsorción del suelo es la capacidad de cambio catiónico, que corresponde al total de las cargas negativas disponibles para fijar cationes en disolución. Esto puede ser debido a que la illita y la esmectita presentan cargas permanentes negativas, mientras que la carga de la caolinita depende del pH, sin embargo, dado que el pH del suelo estudiado tiene, un valor muy cercano a 7, la caolinita también presenta carga negativa junto con el feldespato, el cuarzo, el óxido de manganeso, la materia orgánica y el óxido de titanio (TiO_2), lo que le confiere al suelo una importante capacidad de interaccionar con los cationes del líquido intersticial que ocupa los poros. El suelo de la Vega posee una elevada capacidad de cambio de 22.12 meq de sodio/100 g de suelo. También se observa que en el suelo se encuentra una alta concentración de sulfatos y cloruros solubles, lo que está relacionado con la composición de la roca madre de la zona.

Finalmente, también se ha determinado el contenido en metales pesados. En la **tabla VI.3** se muestran los contenidos encontrados.

Tabla VI.3. Metales pesados determinados en muestra de suelo $\mu\text{g kg}^{-1}$

Suelo							
Li	15.0	Zn	36.5	Th	0.00	Er	0.00
Rb	14.4	Ga	0.26	La	0.81	Tm	0.00
Cs	0.92	Y	0.44	Ce	1.30	Yb	0.00
Be	0.07	Nb	0.43	Pr	0.12	Lu	0.01
Sr	22.1	Ta	0.06	Nd	0.49	Sc	59.2
Ba	15.1	Zr	1.56	Sm	0.08	Mn	962
Sc	11.3	Hf	0.00	Eu	0.02	As	30.7
V	1.44	Mo	6.18	Gd	0.07	Cd	1.52
Cr	9.94	Sn	0.35	Tb	0.00	In	0.00
Co	3.57	Tl	0.39	Dy	0.11	Sb	9.72
Ni	37.7	Pb	1.56	Ho	0.00	Bi	0.08
Cu	24.6	U	2.64				

En resumen, las propiedades físico-químicas del suelo estudiado revelan, en primer lugar, que los compuestos del mismo, al tener carácter coloidal y poseer carga eléctrica, pueden contribuir de forma relevante a la interacción sólido-fluido y a su capacidad de cambio. Ello pone de manifiesto la capacidad de este suelo para retener los solutos presentes en el agua intersticial proveniente del agua de riego. En segundo lugar, es evidente que las propiedades físicas del suelo que dependen de su textura y estructura, influyen de manera significativa y decisiva en el comportamiento del mismo frente al movimiento vertical del agua.

1.2. Estudio del Compost

1.2.1. Propiedades Físicas del Compost

El compost es el producto de la transformación biológica controlada de mezclas adecuadas de materiales orgánicos. Sus características vienen muy influenciadas por los materiales tratados y duración del proceso, así como

por la tecnología empleada¹⁵⁸. Algunas características físicas del compost son:

- Tiene un color marrón oscuro o negro, y un olor agradable a tierra de bosque.
- Su aspecto es homogéneo, y no se deben diferenciar los restos orgánicos que se han incorporado.
- Es ligero y esponjoso. Se puede desmenuzar fácilmente con las manos y no se compacta al presionarlo.



Figura VI.2. Aspecto final del compost

1.2.2. Propiedades Químicas del Compost

La aplicación del compost al suelo de labor produce grandes beneficios. La principal característica que diferencia el empleo de fertilizantes inorgánicos respecto al uso de compost, es el aporte de materia orgánica que se efectúa durante su aplicación. Sin embargo, la composición química del compost puede variar mucho en función del

¹⁵⁸ Elizabeth, P.T., Miriam, C.R, Francisco, M., Adolfo, R. N. y Nelson, C. C. Manual para la producción de abonos orgánicos en la agricultura urbana. *INIFAT* (2002) 14-39.

material empleado para fabricarlo. Además, al no tratarse de un producto natural no tiene una composición química definida.

En la tabla, a modo de ejemplo, se muestran los valores típicos de un compost genérico.

Tabla VI.4. Valores típicos de la composición del compost

Materia orgánica	65-70 %	Carbono orgánico	14-30 %
Humedad	40-45 %	Calcio	2.0-8.0 %
Nitrógeno	1.5-2.0 %	Magnesio	1.0-2.5 %
Fósforo P₂O₅	2.0-2.5 %	Sodio	0.02 %
Potasio	1.0-1.5 %	Cobre	0.05 %
Relación C/N	10-11	Hierro	0.02 %
Ácidos húmicos	2.5-3.0 %	Manganeso	0.06 %
pH	6.5-7.2		

En el caso del compost empleado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se le determinó la capacidad de intercambio catiónico y bases de cambio así como su contenido de metales pesados siguiendo para ello el procedimiento propuesto para tal fin por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación¹⁵⁵, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.

Tabla VI.5. Capacidad de cambio y bases de cambio en muestra de compost

Compost	
Capacidad de cambio (meq Na ⁺ /100 g suelo)	69.2
Bases de cambio (meq/100 g de suelo)	
Ca ⁺²	152
Mg ⁺²	13.1
Na ⁺	1.73
K ⁺	2.49

La capacidad de cambio de los principales cationes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ y K^+) es mucho mayor a la del suelo agrícola estudiado anteriormente. El resultado de la capacidad de cambio para el compost fue de 69.2 meq de sodio/100 g de suelo. Estos resultados, de capacidad de cambio superiores, pueden deberse a un alto contenido de materia orgánica en el compost, pues la capacidad de cambio catiónico se incrementa a medida que la materia orgánica se incrementa.

Tabla VI.6. Metales pesados determinados en muestra de compost $\mu\text{g kg}^{-1}$

Compost							
Li	10.17	Zn	158.23	Th	0	Er	0.03
Rb	20.55	Ga	0.51	La	0.85	Tm	0
Cs	0.19	Y	0.64	Ce	1.43	Yb	0
Be	0.07	Nb	0.56	Pr	0.15	Lu	0.01
Sr	1266	Ta	0.13	Nd	0.65	Sc	54.8
Ba	84.66	Zr	2.54	Sm	0.11	Mn	497
Sc	9.79	Hf	0.02	Eu	0.02	As	13.76
V	8.79	Mo	9.49	Gd	0.12	Cd	0.2
Cr	12.12	Sn	0.86	Tb	0	In	0
Co	2.33	Tl	0.16	Dy	0.16	Sb	4.16
Ni	16.37	Pb	2.47	Ho	0	Bi	0.28
Cu	30.89	U	0.94				

En cuanto a los metales pesados en el compost analizado, es importante destacar que se encuentran dentro de los límites fijados por la legislación española en el R.D. 824/2005, de 8 de julio sobre productos

fertilizantes¹⁵⁹, por lo que no existe ningún inconveniente a la hora de utilizarlo como fertilizante en suelo agrícola.

1.3. Estudio del Agua del Pozo

Se ha llevado a cabo la determinación de aniones (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- y NO_2^-) y cationes (Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Fe^{+3} y Al^{+3}) mediante cromatografía iónica. Para separar los aniones se empleó una columna Ionpac AS 14 (4 x 250 mm) con una fase estacionaria divinilbenceno. El equipo estaba provisto adicionalmente de precolumnas Ionpac AS (4 x 5 mm) para proteger a la columna analítica. Como eluyente se usó una disolución mezcla de 3.5 mM Na_2CO_3 y 1.0 mM NaHCO_3 , con un flujo de 1.3 mL min^{-1} . Los aniones separados se pasaron a través de una supresora de membrana (AMM-II), a través de la cual circulaba de forma continua una disolución regeneradora de H_2SO_4 (0.1 N). En la membrana supresora, los aniones se transforman en su forma ácida, de alta conductividad y el disolvente en ácido carbónico, de baja conductividad. La detección se llevó a cabo con un detector de conductividad y una compensación de temperatura de 1.3 a 2.0 % $^\circ\text{C}^{-1}$. Se realizó una calibración analítica con patrones en los intervalos de concentración mostrados en la tabla.

Tabla VI7. Calibrado para los aniones

Concentraciones (mg L^{-1})					
Cl^-	3.0 - 20.0	NO_3^-	1.0 - 5.0	SO_4^{2-}	3.0 - 20.0
NO_2^-	1.0 - 5.0	PO_3^{-4}	1.0 - 5.0		

¹⁵⁹ Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. «BOE» núm. 171, de 19 de Julio de 2005, 25592-25669.

Para la separación de los cationes, se empleó una columna catiónica Ionpac CS 12A (4 x 250 mm), con una fase estacionaria divinilbenceno-carboxilato. El eluyente fue una disolución de H₂SO₄ (0.02 N) a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ y la supresión, a diferencia del caso de los aniones, no fue química sino eléctrica, empleándose una supresora de membrana (CSRS-ultra-4 mm). Para la detección, al igual que en el caso anterior, se utilizó una célula de conductividad ajustada a 1 μS cm⁻¹. La fuente de alimentación de la supresora se mantuvo a una corriente de 100 mA. Como en el caso de los aniones, después de estabilizar el sistema, se inyectó un patrón para su comprobación. Se realizó una calibración analítica con patrones en los rangos de concentración mostrados en la tabla.

Tabla VI.8. Calibrado para los cationes

Concentraciones (mg L ⁻¹)					
Na ⁺	5.0 - 20.0	K ⁺	2.0 - 5.0	Mg ⁺²	5.0 - 20.0
NH ₄ ⁺	1.0 - 5.0	Ca ⁺²	5.0 - 20.0		

Para la preparación de ambas funciones de calibración, se partió de una disolución madre de 1000 mg L⁻¹ en agua destilada de cada uno de los iones. Los diferentes patrones se prepararon por dilución de ésta. El calibrado completo se inyectó a modo de control de calidad cada 20 análisis y cada vez que se realizó algún cambio o ajuste del detector o algún componente del sistema.

Para determinar el pH y la conductividad eléctrica del agua, se empleó un pH-metro WTW (pH 196) y un conductímetro WTW (LF 537), respectivamente.

En la **figura VI.3**, se muestra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las muestras.

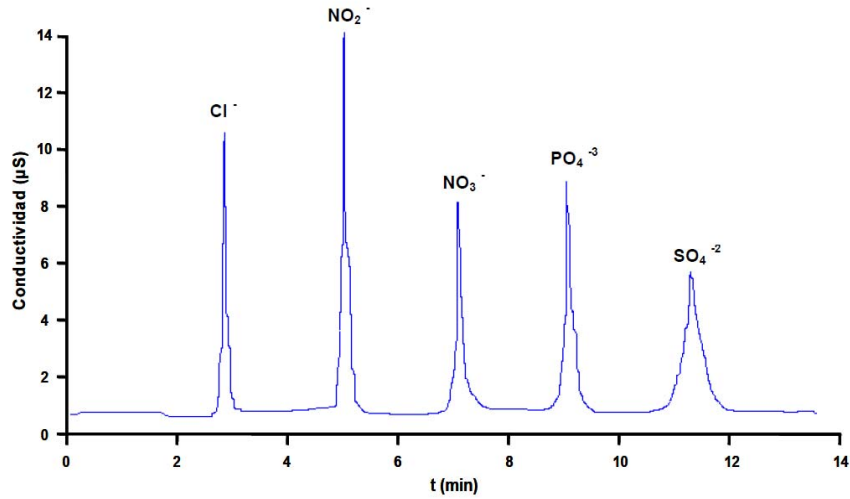


Figura VI.3. Cromatograma de determinación de los aniones

A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla VI.9. Contenido iónico del agua del pozo

Contenido en iones			
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	23.6	Na ⁺ (mg L ⁻¹)	26.3
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	23.4	K ⁺ (mg L ⁻¹)	6.00
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	60.6	Ca ⁺² (mg L ⁻¹)	45.0
PO ₄ ⁻³ (mg L ⁻¹)	43.6	Mg ⁺² (mg L ⁻¹)	4.42
SO ₄ ⁻² (mg L ⁻¹)	95.0	Al ⁺³ (mg L ⁻¹)	0.02
SiO ₂ (mg L ⁻¹)	12.2	Fe ⁺³ (mg L ⁻¹)	0.13
pH	7.53	Conductividad (µS)	1026

2. Experiencia de Campo

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el comportamiento de los analitos (MPB, EPB, PPB, BPB, Ph-PB, BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8, 4-OHBP, BPA, TCS y TCB) en un determinado ambiente natural, donde los contaminantes pueden ser aportados por diferentes vías. En todos los experimentos llevados a cabo se hizo uso de la irrigación forzada.

2.1. Descripción de las Parcelas Experimentales

La parcela experimental está situada en la Huerta de Santa María, dentro del término municipal de Belicena, en la Vega de Granada y cuenta con una extensión de 2500 m². En el suelo agrícola de dicha parcela no se ha utilizado ningún tipo de pesticida, herbicida o insecticida en los últimos 10 años. Esta condición es muy importante, ya que su uso podría alterar la microbiota del suelo¹⁶⁰⁻¹⁶².



Figura VI.4. Parcela experimental. Huerta de Santa María (Vega de Granada)

¹⁶⁰ Araujo, A., Monteiro, R., Abarkeli, R. Effect of glyphosate on microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere, Oxford* 52 (2003) 799-804.

¹⁶¹ Haney, R., Senseman, S., Hons, F., Zuberer, D. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* 48 (2000) 89-93.

¹⁶² Haney, R., Senseman, S., Hons, F. Effect of roundup ultra on microbial biomass from selected soils. *Journal of Environmental Quality* 31 (2002) 730-735.

Dentro de la parcela experimental se realizaron distintas subparcelas de 4 m² (2 x 2 m). Dos subparcelas fueron utilizadas para los ensayos químicos (cinética de degradación). Una subparcela fue tratada con los analitos y la otra, con los analitos y enmendada con compost. Además se realizaron otras pequeñas parcelas de 1 m² (1 x 1 m) para el estudio microbiológico. Al inicio del estudio se procedió a la limpieza de toda la vegetación superficial existente, para evitar interferencias tanto en los mecanismos de adsorción-desorción o degradación de los compuestos, como en variables climatológicas como el índice de evaporación del agua.



Figura VI.5. Vista de las subparcelas al inicio del estudio

Durante el estudio experimental de campo se realizó un seguimiento continuo de la temperatura y la humedad del suelo. Para ello, se utilizó un equipo de la casa comercial¹⁶³ AquaCheck, compuesto por una sonda de temperatura y humedad y un registrador de datos inalámbrico, **figura VI.6**. La sonda está provista de seis termómetros digitales y seis sensores de humedad distribuidos cada 10 cm.

¹⁶³ AquaCheck. Soil Moisture management. Products: probes, data loggers and software. URL: <http://www.aquacheck.co.za> (Visitada el 26/8/2013).



Figura VI.6. Registrador de datos inalámbrico AquaCheck Hand-held RF Logger (izquierda); Sonda AquaCheck II probe (derecha)

Los termómetros se situaron, el primero en la superficie para medir la temperatura ambiental y los demás a profundidades de 10, 20, 30, 40 y 50 cm respectivamente. Las medidas se registraron cada media hora durante todo el tiempo que duró la experiencia. Los datos fueron descargados cada semana a un datalogger y posteriormente transferidos a un PC.



Figura VI.7. Sonda Aquacheck en la subparcela experimental

Los datos de la temperatura y humedad del aire fueron suministrados por la Estación Meteorológica del Aeropuerto de Granada (84190-LEGR), situado en el municipio de Santa Fe, en las cercanías de la Finca.

2.2. Descripción de la Metodología Experimental

A continuación, se describe la metodología experimental puesta a punto para la realización de los estudios de campo.

2.2.1. Tratamiento o Dopado con los Analitos

En esta etapa se realiza el tratamiento de las dos parcelas experimentales con los compuestos a estudiar. El tratamiento consiste en añadir los contaminantes de forma manual y regar las parcelas con agua de pozo. Antes del dopado, se realizó una toma de muestra a modo de blanco. La parcela 1, se dopó con 1 g de todos los compuestos, añadiendo 480 L de agua (37.5 L min^{-1} durante 12.8 min) para obtener una concentración final de 2 mg L^{-1} de cada analito. La parcela 2, se dopó siguiendo el mismo procedimiento, previo tratamiento con compost procedente de lodo de depuradora (8 kg de compost en los 4 m^2 de la parcela).



Figura VI.8. Etapa de tratamiento o dopado

Los compuestos en estudio se doparon a una concentración elevada con el objeto de establecer su comportamiento a distintas profundidades. Este tratamiento supone un aporte al suelo por encima de los valores habitualmente encontrados en el agua residual, el lodo de depuradora o el propio compost. Este hecho representa una mayor garantía en cuanto al conocimiento del comportamiento de los compuestos, en el caso de una contaminación accidental elevada en este ambiente.

2.2.2. Toma de Muestra y Riego Sucesivo

Una vez dopada la parcela experimental, se llevaron a cabo dos operaciones sucesivas, una de muestreo y otra de riego. Las experiencias previas realizadas, demostraron que la mayor frecuencia de muestreo se debía producir durante la primera semana de aplicación, correspondiente al primer tramo de la caída exponencial de la concentración. Por lo tanto, durante los 4 primeros días se estableció realizar una toma de muestra cada día. Pasado esos 4 primeros días, la frecuencia de las tomas disminuyó. La frecuencia de regadío se estableció, según ensayos previos, en un riego diario, y se mantuvo constante durante todo el tiempo que duró cada estudio.

La toma de muestra se realizó a distintas profundidades (2, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 cm) utilizando un muestreador de 2 cm de calado y una barrena helicoidal tipo EIJKELKAMP, *figura VI.10*. Como convenio en el presente estudio, al referirse a la toma de muestra a diferentes profundidades, se procuró seleccionar una muestra representativa de cada tramo, de tal forma que por ejemplo cuando se emplea el término “Profundidad a 20 cm”, significa que esta fue la profundidad máxima excavada y que se refiere a todo el tramo que abarca los 10 hasta los 20 cm. A la muestra de 2 cm se le denominó muestra superficial.



Figura VI.9. Toma de muestra superficial, muestreador de 2 cm de calado



Figura VI.10. Toma de muestras de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 cm, barrena helicoidal

El agujero resultante de la toma de muestra se rellena con tierra limpia para evitar la entrada de agua durante los riesgos posteriores y se señala adecuadamente para evitar muestrear de nuevo sobre la misma zona y asegurar un muestreo representativo del total de las subparcelas. Una vez tomada la muestra, se realiza el riego correspondiente con una cantidad de agua de pozo establecida, en este caso 120 L m^{-2} .

2.2.3. Pre-tratamiento de Muestra

Cada una de las muestras tomadas se sometió a las siguientes etapas para asegurar su correcto análisis en el laboratorio.

- **Adición de formaldehído 1 % (m/v)**, para evitar el crecimiento microbiano en las muestras.
- **Secado y tratamiento de las muestras**, en bandejas de plástico y al sol a temperatura ambiente.

Una vez secas se molturaron con un mortero de hierro y se tamizaron con ayuda de una malla de 2 mm. Posteriormente se introdujeron en una bolsa de plástico y se llevaron al laboratorio donde permanecieron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

2.2.4. Análisis

Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo se analizaron según la metodología propuesta a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Para este ensayo se realizaron en total 12 tomas de muestra a diferentes tiempos.

Tabla VI.10. *Tiempos de muestreo*

Toma	Tiempo (h)	Toma	Tiempo (h)
Dopado (T ₀)	0	Dopado (T ₀)	0
T ₁	5	T ₇	245
T ₂	29	T ₈	341
T ₃	53	T ₉	405.5
T ₄	77	T ₁₀	505.5
T ₅	125	T ₁₁	673.5
T ₆	173.5	T ₁₂	845.5

Paralelamente, se registraron los valores de temperatura y humedad a las distintas profundidades mediante el uso de la sonda instalada en la parcela previamente descrita.

2.2.5. Evolución de los Parámetros Ambientales

En las siguientes figuras se muestran los datos obtenidos de las medidas de temperatura y humedad a las diferentes profundidades (2, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 cm).

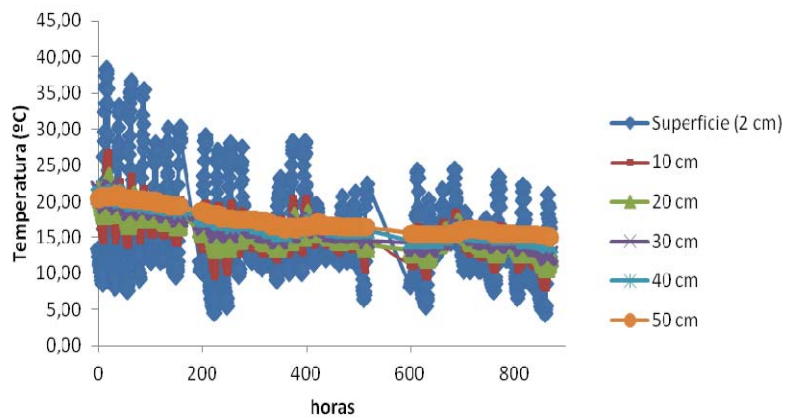


Figura VI.11. Temperatura a diferentes profundidades

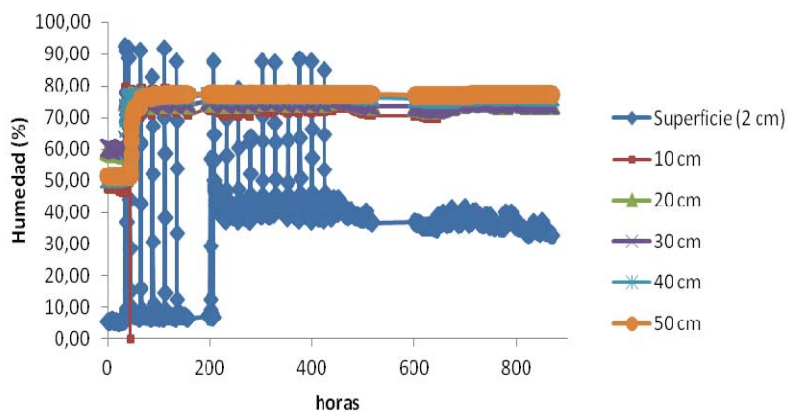


Figura VI.12. Humedad a diferentes profundidades

En las figuras se observa que la variabilidad disminuye al aumentar la profundidad. En la **tabla VI.11** se muestra un resumen de los parámetros ambientales medidos.

Tabla VI.11. *Parámetros ambientales medidos durante el tratamiento*

Temperatura (°C)			
	Max.	Media	Min.
En superficie	32	11.85	4.60
10 cm de profundidad	12.37		
20 cm de profundidad	13.44		
30 cm de profundidad	14.58		
40 cm de profundidad	15.21		
50 cm de profundidad	15.87		
Humedad media (%)			
2 cm de profundidad	35.91		
10 cm de profundidad	74.67		
20 cm de profundidad	74.64		
30 cm de profundidad	74.46		
40 cm de profundidad	76.44		
50 cm de profundidad	77.18		

Dado que el estudio se realizó durante el otoño, a lo largo del mismo, hubo muchos días de precipitación desde el comienzo del tratamiento, siendo el ambiente muy húmedo con una media de precipitaciones del orden de 98 mm.

3. Análisis de los Disruptores Endocrinos Seleccionados

3.1. Determinación la Concentración de Analito (Parcela 1)

En las siguientes tablas se muestran las concentraciones de cada analito en las muestras de suelo contaminadas.

Tabla VI.12. Concentraciones de MPB en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de MPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	12.4	11.7	11.7	9.1	8.8	7.0
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	5.3	3.9	2.6	1.2	1.1	0.6

Tabla VI.13. Concentraciones de EPB en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de EPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	15.4	14.5	13.7	11.1	10.5	9.6
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	6.2	5.3	3.6	2.2	1.2	0.9

Tabla VI.14. Concentraciones de PPB en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de PPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	14.3	13.7	12.7	10.7	7.3	6.0
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	5.6	4.3	3.6	2.5	1.4	0.6

Tabla VI.15. Concentraciones de BPB en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	12.2	11.4	9.1	7.9	6.4	5.2
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	4.6	3.1	2.8	1.7	1.3	0.9

Tabla VI.16. Concentraciones de Ph-PB en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de Ph-PB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	12.1	11.8	9.8	8.3	7.1	6.9
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	5.9	4.8	3.9	2.8	1.5	0.7

Tabla VI.17. Concentraciones de BP-1 en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BP-1 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	5.6	4.3	3.9	2.6	1.6	1.5
10 cm	3.3	3.1	2.1	2.0	1.0	0.7
20 cm	3.4	3.3	2.1	1.2	1.2	0.9
30 cm	3.3	2.9	2.7	1.6	1.6	0.9
40 cm	2.8	2.7	2.2	1.6	1.5	1.4
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	1.4	0.7	0.6	0.1	0.1	0.1
10 cm	0.7	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3
20 cm	0.8	0.8	0.7	0.4	0.3	0.3
30 cm	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3
40 cm	1.2	1.0	0.9	0.6	0.3	0.3

Tabla VI.18. Concentraciones de BP-2 en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BP-2 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	9.4	8.6	7.6	6.8	5.3	4.9
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	4.5	3.9	2.0	1.3	0.9	0.8

Tabla VI.19. Concentraciones de BP-3 en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BP-3 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	2.6	2.0	1.9	1.4	1.1	0.8
10 cm	10.7	9.2	7.9	6.7	5.6	4.4
20 cm	3.1	2.5	1.8	1.5	1.5	1.2
30 cm	5.0	4.4	4.0	3.5	2.8	2.6
40 cm	14.1	13.7	11.8	10.5	9.5	8.8
50 cm	2.9	2.6	2.1	2.0	1.7	1.3
60 cm	2.8	2.6	2.3	2.0	1.9	1.9
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	0.8	0.7	0.6	0.3		
10 cm	3.3	2.3	2.0	1.9	0.6	0.5
20 cm	1.0	0.9	0.7	0.7	0.6	
30 cm	2.3	1.7	1.0	0.9	0.6	0.4
40 cm	6.9	5.8	4.1	3.4	2.4	1.3
50 cm	1.1	0.9	0.8	0.8	0.7	0.6
60 cm	1.2	1.2	0.8	0.8	0.7	0.7

Tabla VI.20. Concentraciones de BP-6 en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BP-6 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	6.0	5.8	4.8	3.8	3.7	2.7
10 cm	6.0	5.9	4.9	3.8	2.8	2.8
20 cm	5.0	4.8	4.4	3.7	2.8	2.7
30 cm	6.2	5.2	4.1	3.9	3.3	2.9
40 cm	6.6	6.3	5.9	5.4	4.1	3.2
50 cm	9.7	8.0	7.8	7.2	6.9	5.6
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	1.7	0.9	0.7	0.7		
10 cm	1.7	1.2	0.7	0.7	0.7	
20 cm	1.7	0.7	0.7			
30 cm	2.8	1.8	1.6	0.7	0.7	
40 cm	2.8	1.7	1.7	0.9	0.6	
50 cm	5.0	4.8	3.7	2.8	1.9	0.9

Tabla VI.21. Concentraciones de BP-8 en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BP-8 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	7.8	7.7	6.9	6.6	5.5	4.91
10 cm	5.3	4.8	4.7	4.3	4.0	3.3
20 cm	4.4	4.2	4.1	3.9	2.9	2.8
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	4.4	3.7	1.6	1.1	0.6	
10 cm	3.1	2.5	2.0	1.9	1.4	1.0
20 cm	2.3	1.8	1.7	1.5	1.4	1.3

Tabla VI.22. Concentraciones de 4-OHBP en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de 4-OHBP ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	10.9	9.9	8.8	5.6	4.9	3.4
10 cm	5.3	4.8	3.2	2.9	1.7	1.6
20 cm	2.6	2.3	2.1	1.8	1.5	1.3
30 cm	2.2	2.0	1.8	1.6	1.5	1.3
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	2.8	1.6	1.2	1.1	0.9	0.3
10 cm	1.2	1.0	1.1	1.0	0.5	0.1
20 cm	1.1	1.0	0.9	0.5	0.3	
30 cm	1.3	0.9	0.6	0.5	0.2	

Tabla VI.23. Concentraciones de BFA en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de BFA ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	7.9	7.6	7.5	6.5	4.7	4.4
10 cm	7.9	6.8	6.6	6.5	4.4	3.9
20 cm	7.9	6.3	6.2	6.1	4.7	4.4
30 cm	7.3	6.6	5.2	5.1	4.9	4.7
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	2.5	2.1	1.3	1.1		
10 cm	3.8	3.1	2.5	1.5	1.3	0.9
20 cm	3.8	2.5	1.3	1.3	1.2	0.9
30 cm	4.4	3.3	2.6	1.2	1.0	0.9

Tabla VI.24. Concentraciones de TCS en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de TCS ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	16.6	12.2	11.8	10.8	9.7	8.7
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	6.7	5.4	4.4	3.0	1.3	1.0

Tabla VI.25. Concentraciones de TCB en el tratamiento en la parcela 1

Concentración de TCB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
Muestra	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	2.6	2.1	1.6	0.9	0.6	0.4
10 cm	5.9	4.1	3.8	2.7	1.2	0.9
20 cm	3.2	2.3	1.7	1.2	0.9	0.8
30 cm	44.7	44.5	40.1	32.1	27.5	24.2
40 cm	1.2	1.1	0.9	0.7	0.7	0.6
50 cm	1.1	0.9	0.8	0.8	0.7	0.6
Muestra	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	0.2	0.1	0.1	0.08		
10 cm	0.7	0.6	0.5	0.52	0.19	
20 cm	0.6	0.5	0.5	0.42	0.40	0.26
30 cm	17.6	16.5	13.9	12.74	11.10	10.16
40 cm	0.4	0.4	0.4	0.38	0.29	0.19
50 cm	0.5	0.5	0.4	0.34	0.34	

3.2. Cinéticas de Desaparición de los Compuestos en el Suelo (Parcela 1)

Dado que es imposible determinar el destino exacto de cada analito en cada uno de los puntos de muestreo (parte se degradará y otra parte se desplazará hacia un punto de mayor profundidad por efecto de los riegos) se hablará de cinética de desaparición de cada compuesto en cada uno de los niveles seleccionados.

La variación de las concentraciones de todos los contaminantes estudiados en el suelo agrícola contaminado, a las distintas profundidades, como consecuencia de los procesos adsorción-desorción, transporte y degradación, permite deducir que el proceso de desaparición de los

compuestos, en cada uno de los puntos de toma de muestra, sigue una cinética de primer orden. Este modelo se rige por la siguiente ecuación:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt}$$

donde, C representa la concentración de analito ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$) a un tiempo determinado t (min), C_0 es la concentración inicial del analito ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$) y k es una constante cinética (h^{-1}).

En las siguientes figuras se representan los ajustes obtenidos para los distintos analitos estudiados.

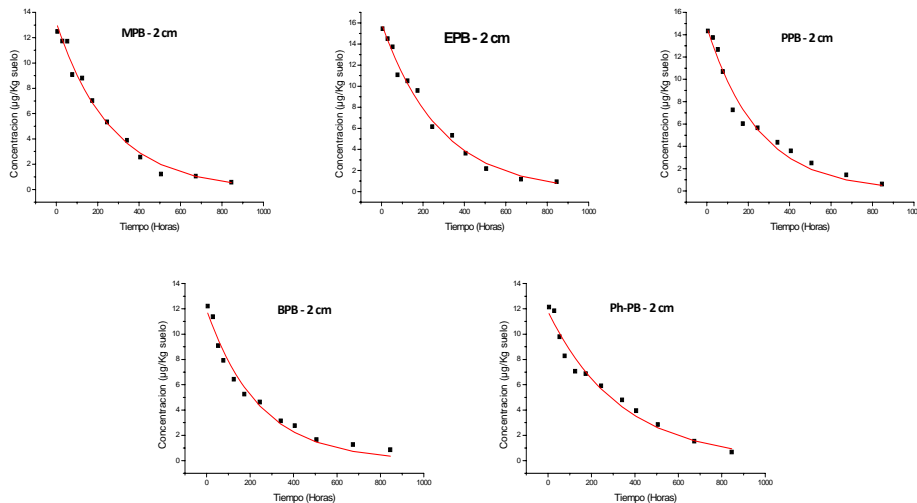


Figura VI.13. Cinética de desaparición de los parabenos en superficie (2 cm)

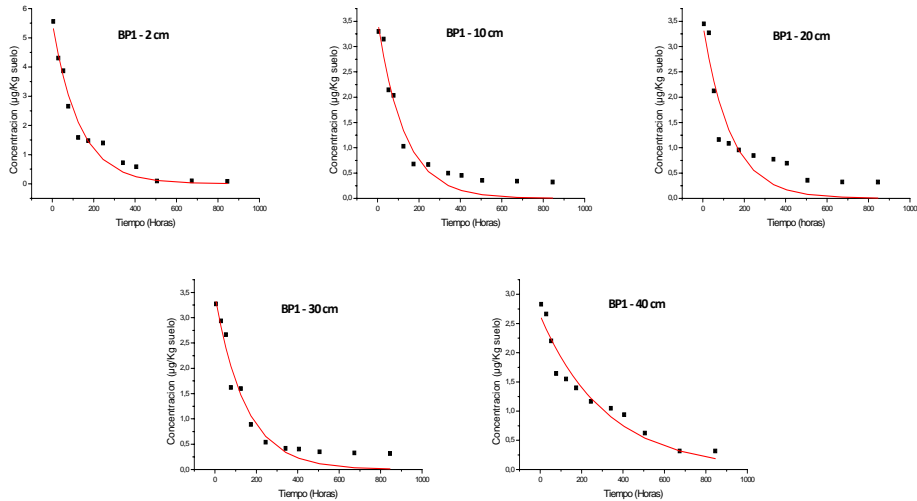


Figura VI.14. Cinética de la desaparición de la BP-1 a diferentes profundidades

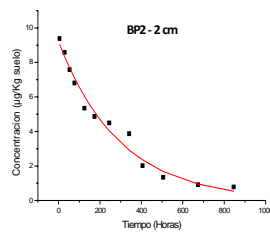


Figura VI.15. Cinética de desaparición de la BP-2 en la superficie (2 cm)

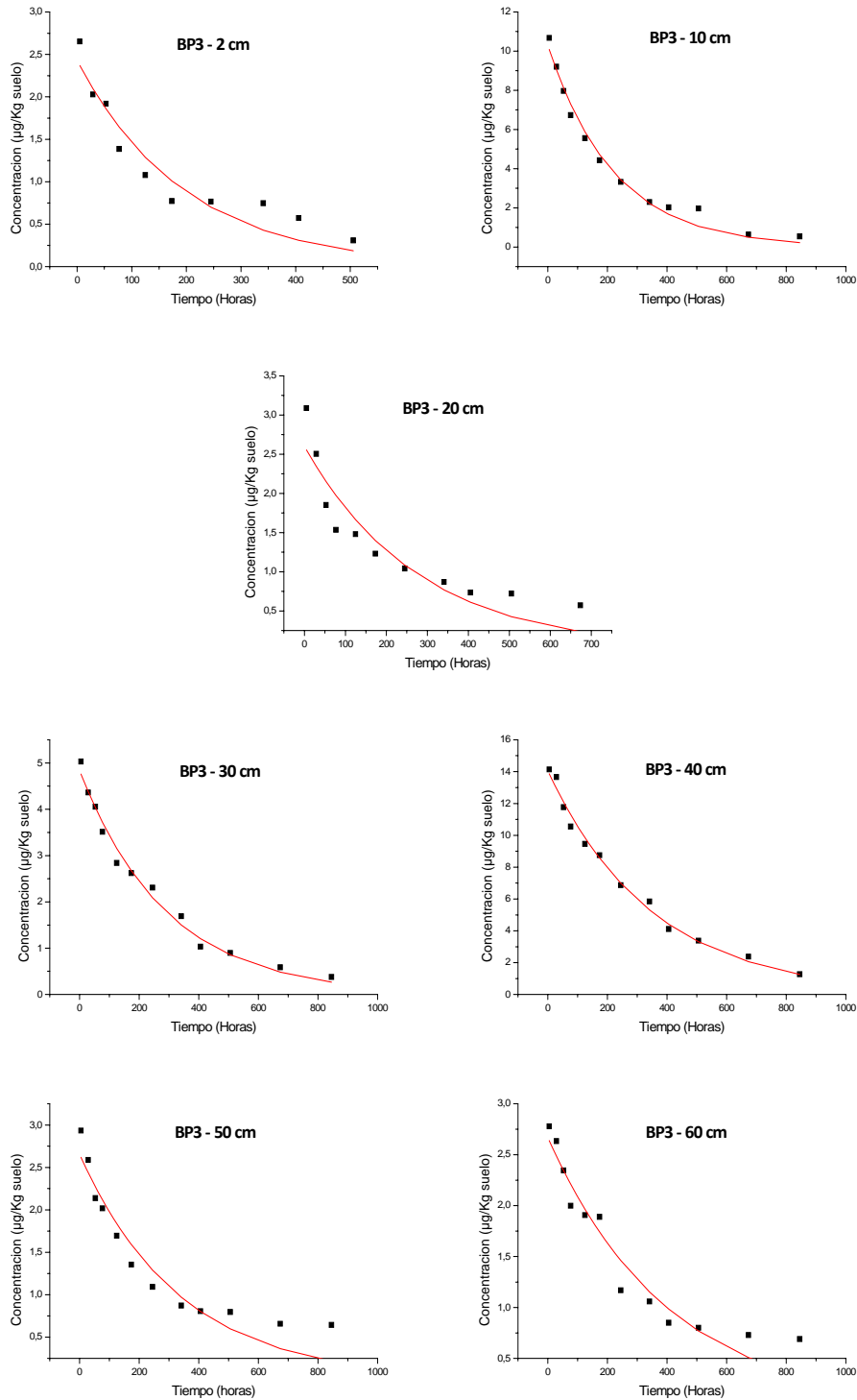


Figura VI.16. Cinética de desaparición de la BP-3 a diferentes profundidades

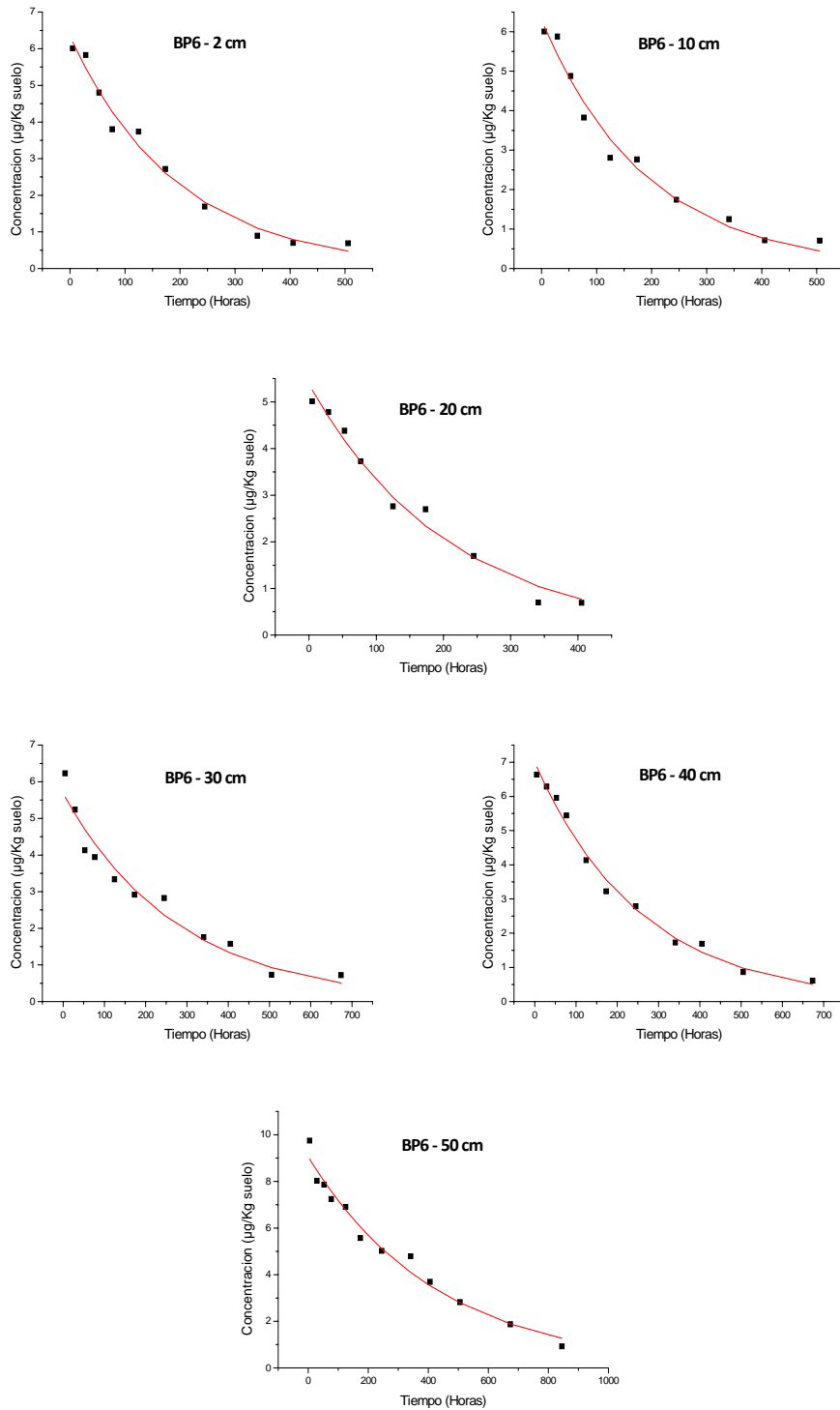


Figura VI.17. Cinética de desaparición de la BP-6 a diferentes profundidades

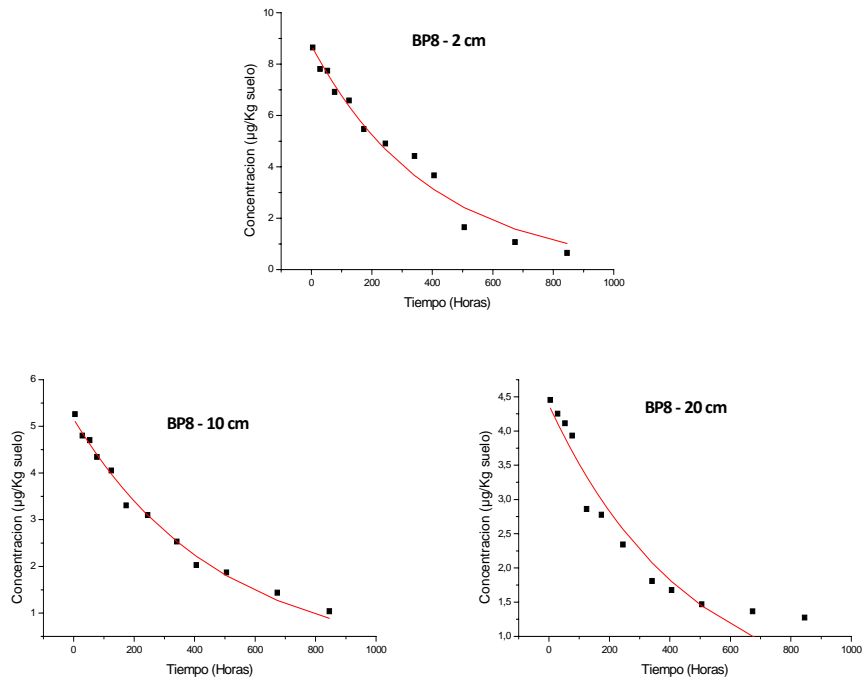


Figura VI.18. Cinética de desaparición de la BP-8 a diferentes profundidades

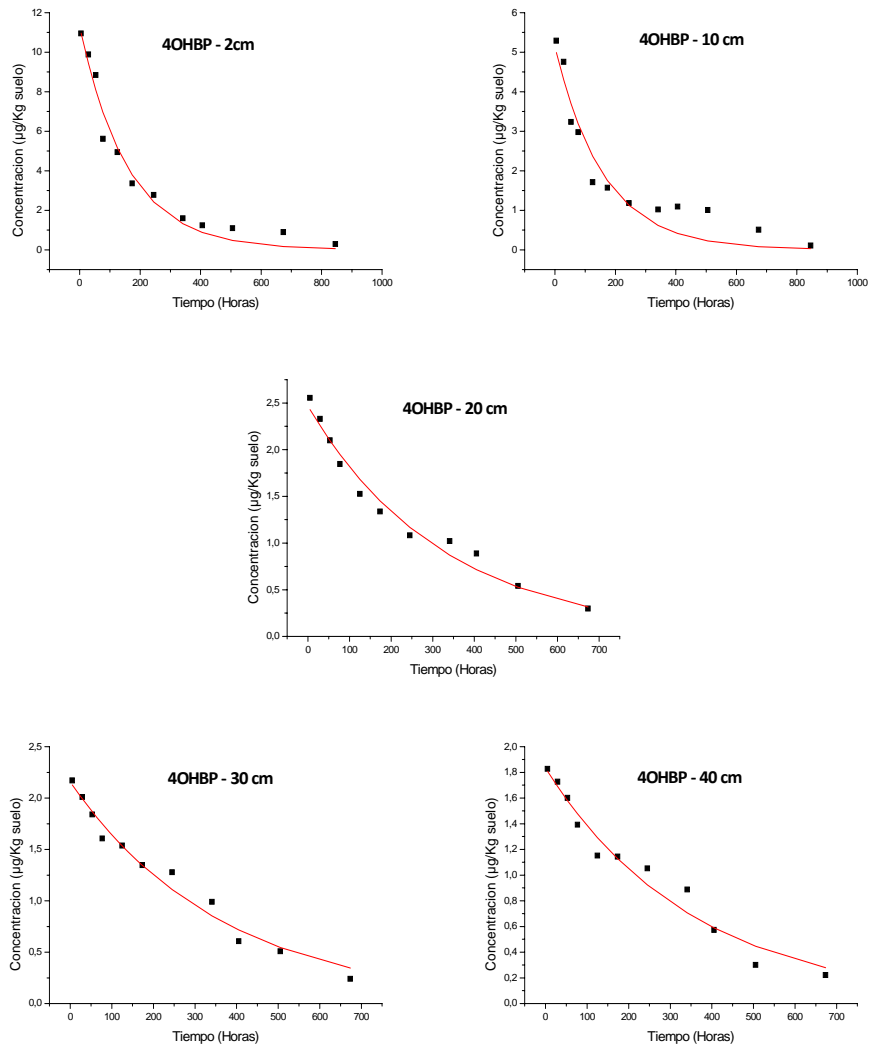


Figura VI.19. Cinética de desaparición de la 4-OHBP a diferentes profundidades

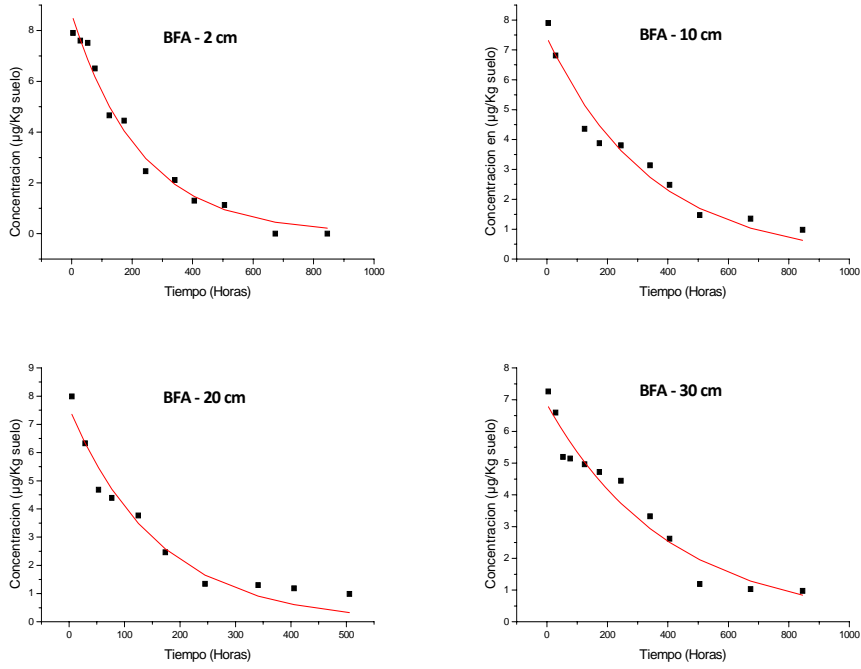


Figura VI.20. Cinética de desaparición del BFA a diferentes profundidades

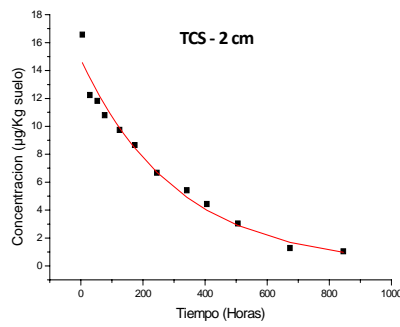


Figura VI.21. Cinética de desaparición del TCS en la superficie (2 cm)

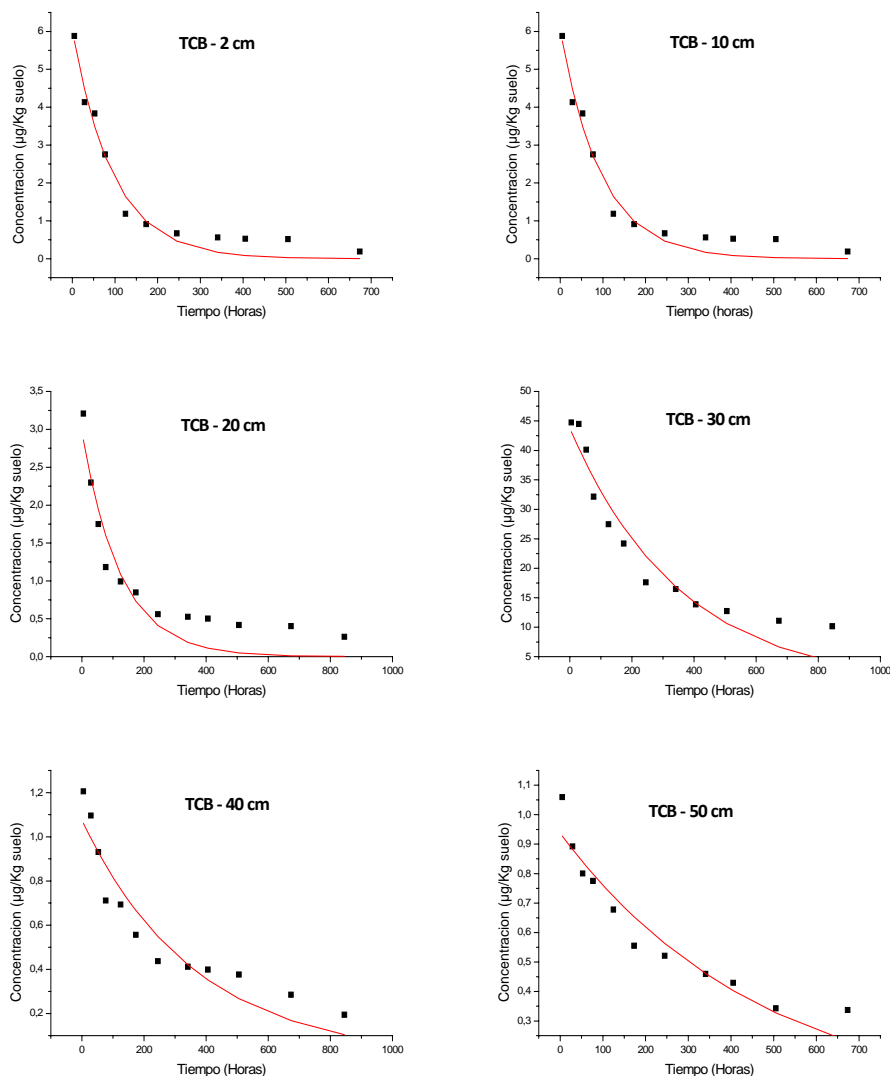


Figura VI.22. Cinética de desaparición del TCB a diferentes profundidades

Los datos mostrados en las figuras, se ajustan, en todos los casos, a la ecuación exponencial de primer orden anteriormente citada ($C = C_0 \cdot e^{-kt}$). A partir de los datos, se obtuvieron los correspondientes valores de la constante de desaparición del compuesto (k), el tiempo de vida media en cada zona del suelo ($t_{1/2}$) y coeficiente de determinación (R^2). En las siguientes tablas se muestran los valores obtenidos para estos parámetros.

Tabla VI.26. Parámetros del ajuste para los PBs en superficie

Compuestos	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB
k (h^{-1})	$3.8 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-3}$	$4.1 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^{-3}$	$2.9 \cdot 10^{-3}$
C_0	13.2	15.9	11.91	14.7	11.8
$t_{1/2}$	183.8	196.4	167.4	172.9	231.8
$\%R^2$	98.7	98.9	97.9	97.3	97.2

En este caso se observa que los parabenos se absorben y degradan en la superficie de la parcela, desapareciendo totalmente y no lixiviando a mayores profundidades. La degradación fue relativamente rápida con tiempos de vida media comprendidos entre las 167.4 h del PPB y las 231.8 h para el Ph-PB.

Tabla VI.27. Parámetros del ajuste para la BP-1 a distintas profundidades

Profundidad	Sup.	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm
k (h^{-1})	$7.7 \cdot 10^{-3}$	$7.5 \cdot 10^{-3}$	$7.4 \cdot 10^{-3}$	$6.7 \cdot 10^{-3}$	$3.1 \cdot 10^{-3}$
C_0	5.5	3.51	3.43	3.44	2.63
$t_{1/2}$	90.0	92.4	93.2	102.2	220.7
$\%R^2$	97.1	94.4	85.7	95.7	94.0

En este caso, los fenómenos que conducen a la desaparición del compuesto se producen en los primeros 40 cm, no lixiviando a mayores profundidades (50 y 60 cm). La desaparición de los contaminantes en las diferentes zonas de estudio, es relativamente rápida con tiempos de vida media comprendidos entre las 90.0 h en la capa superficial a las 220.7 h a los 40 cm de profundidad.

Tabla VI.28. Parámetros del ajuste para la BP-2 en superficie

k (h^{-1})	$3.3 \cdot 10^{-3}$	$t_{1/2}$	205.7
C_0	9.2	$\%R^2$	97.8

Al igual que los parabenos, la BP-2 también se absorbe y biodegrada en la superficie (2 cm), no lixiviando a mayores profundidades, además, la degradación se produce de forma relativamente rápida con tiempo de vida media en la superficie de 205.7 h.

Tabla VI.29. Parámetros del ajuste para la BP-3 a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
k (h⁻¹)	5.1·10 ⁻³	4.5·10 ⁻³	3.6·10 ⁻³	3.4·10 ⁻³	2.8·10 ⁻³	2.9·10 ⁻³	2.4·10 ⁻³
C₀	2.4	10.3	2.6	4.8	14.1	2.7	2.7
t_{1/2}	136.4	154.0	194.1	202.1	243.2	243.9	281.7
%R²	91.4	98.4	85.9	98.7	99.1	91.6	93.9

La BP-3 aparece a todas las profundidades. Este hecho, nos hizo pensar que incluso este compuesto podría llegar a profundidades mayores a los 60 cm, antes de degradarse completamente, pudiendo por tanto alcanzar la zona freática del suelo y suponer un problema desde el punto de vista medioambiental por la posible contaminación de los acuíferos. Los tiempos de vida medio de la desaparición del compuesto, en la franja de suelo estudiada, oscilan entre 136.4 h en la capa superficial y 281.7 h a 60 cm.

Tabla VI.30. Parámetros del ajuste para la BP-6 a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm
k (h⁻¹)	5.5·10 ⁻³	5.2·10 ⁻³	4.8·10 ⁻³	3.6·10 ⁻³	3.4·10 ⁻³	2.3·10 ⁻³
C₀	6.3	6.3	5.4	5.7	7.0	9.1
t_{1/2}	124.9	132.3	144.1	193.6	204.5	297.5
%R²	98.3	97.9	98.2	95.7	99.1	97.7

La BP-6 por su parte, se detecta hasta los 50 cm de profundidad, no lixiviando a la profundidades mayores. La degradación fue también rápida con tiempos de vida media comprendidos entre las 124.9 h en la capa superficial a las 297.5 h a 50 cm de profundidad.

Tabla VI.31. Parámetros del ajuste para la BP-8 a distintas profundidades

	Sup.	10 cm	20 cm
k (h⁻¹)	2.5·10 ⁻³	2.1·10 ⁻³	1.9·10 ⁻³
C₀	8.7	5.2	4.4
t_{1/2}	272.9	333.2	353.6
%R²	97.4	99.2	93.7

Este contaminante aparece en los primeros 20 cm, no lixiviando a mayores profundidades. La desaparición del compuesto es algo más lenta que en otros casos con tiempos de vida media comprendidos entre las 272.9 h en la capa superficial y las 353.6 h a los 20 cm de profundidad.

Tabla VI.32. Parámetros del ajuste para la 4-OHBP a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm
k (h⁻¹)	6.3·10 ⁻³	6.2·10 ⁻³	3.1·10 ⁻³	2.7·10 ⁻³	2.5·10 ⁻³
C₀	11.3	5.1	2.5	2.2	1.8
t_{1/2}	110.0	111.4	226.5	254.8	270.8
%R²	98.7	91.9	97.6	97.6	96.5

La 4-OHBP se detecta en los primeros 40 cm, no lixiviando a mayores profundidades. La degradación fue rápida con los tiempos de vida media comprendidos entre las 110.0 h de la capa superficial y las 270.8 h a los 40 cm de profundidad.

Tabla VI.33. Parámetros del ajuste para el BFA a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm
k (h⁻¹)	6.2·10 ⁻³	4.4·10 ⁻³	2.9·10 ⁻³	2.5·10 ⁻³
C₀	7.6	8.7	7.4	6.9
t_{1/2}	111.8	158.2	237.4	279.5
%R²	95.8	98.3	96.1	94.7

El BFA se detecta solamente en los primeros 30 cm, no lixiviando a mayores profundidades. La velocidad de desaparición del compuesto fue rápida con tiempos de vida media comprendidos entre las 111.8 h en la capa superficial y las 279.5 h a 30 cm de profundidad.

Tabla VI.34. *Parámetros del ajuste para el TCS en superficie*

k (h⁻¹)	3.2·10 ⁻³
C₀	14.8
t_{1/2}	214.6
%R²	97.2

Al igual que en otros casos, el TCS se adsorbe y desaparece en la superficie no lixiviando a mayores profundidades. La degradación del TCS en el suelo fue relativamente rápida con los tiempos de vida media 214.6 h.

Tabla VI.35. *Parámetros del ajuste TCB a distintas profundidades*

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm
k (h⁻¹)	1.2·10 ⁻²	1.0·10 ⁻²	8.1·10 ⁻³	2.8·10 ⁻³	2.7·10 ⁻³	2.1·10 ⁻³
C₀	2.8	6.1	2.9	43.8	1.1	0.9
t_{1/2}	57.6	66.2	85.8	247.5	252.0	333.2
%R²	98.9	96.9	88.9	92.8	89.5	91.9

Por último, el TCB se detecta en los primeros 50 cm, no lixiviando a la mayor profundidad de 60 cm. La desaparición del compuesto fue rápida con tiempos de vida media comprendidos entre las 57.6 h en la capa superficial a las 333.2 h a los 50 cm de profundidad.

Es importante destacar que, en todos los casos salvo para la BP-3, la desaparición total del compuesto se produce antes de los 60 cm de profundidad. Esto permite concluir que estos compuestos tienen un buen

comportamiento desde el punto de vista ambiental y no contaminan por ejemplo las aguas subterráneas, ya que primero quedan retenidos en el suelo a distintas profundidades para a continuación desaparecer.

Además y como era de esperar, debido a los fenómenos de degradación y lixiviación principalmente, al establecer la relación entre las constantes obtenidas, se constata que la velocidad de desaparición del compuesto es mayor cuanto más cerca de la superficie se encuentra el analito, de forma que $k_{sup} > k_{10\text{ cm}} > k_{20\text{ cm}} > k_{30\text{ cm}} > k_{40\text{ cm}}$. La explicación radica en que parte del compuesto se degrada y otra parte migra por arrastre con el agua hacia puntos inferiores tras cada uno de los regados.

3.3. Determinación la Concentración de Analito (Parcela 2)

Finalizado el estudio en la parcela 1 (suelo con los analitos puros), se repitió el proceso de la misma forma, pero en este caso empleando una parcela que previamente había sido enmendada con compost procedente de lodo de depuradora (parcela 2) tal y como se describió con anterioridad. En las siguientes tablas, se muestran los datos de concentración obtenidos en los análisis de las diferentes muestras tomadas a las distintas profundidades.

Tabla VI.36. Concentración de MPB en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de MPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	14.7	11.0	9.6	7.5	6.9	4.9
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	3.4	2.2	1.4	1.0	0.8	0.7

Tabla VI.37. Concentración de EPB en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de EPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	15.2	14.3	11.6	8.2	6.0	4.9
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	4.5	4.0	3.6	2.4	1.4	1.0

Tabla VI.38. Concentración de PPB en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de PPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	13.5	12.5	9.8	8.4	7.5	6.3
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	5.2	4.1	3.2	2.6	1.4	1.2

Tabla VI.39. Concentración de BPB en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de BPB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	11.5	10.6	9.5	8.4	7.9	7.4
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	6.6	5.3	4.9	3.2	2.9	1.4

Tabla VI.40. Concentración de Ph-PB en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de Ph-PB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	14.0	12.8	11.6	9.3	7.8	5.6
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	3.9	3.2	2.9	2.1	1.7	0.6

Tabla VI.41. Concentración de BP-1 en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de BP-1 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	4.4	3.8	2.5	1.6	0.9	0.7
10 cm	4.4	3.9	2.9	1.8	1.4	1.1
20 cm	3.7	3.0	2.6	1.9	1.4	0.9
30 cm	5.7	5.3	4.8	3.9	2.7	1.6
40 cm	23.9	18.9	13.6	9.7	8.6	7.2
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1
10 cm	0.8	0.8	0.4	0.1	0.1	0.1
20 cm	0.9	0.5	0.3	0.3	0.1	0.1
30 cm	1.0	0.6	0.3	0.3	0.2	0.16
40 cm	6.9	5.1	3.9	2.2	1.0	

Tabla VI.42. Concentración de BP-2 en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de BP-2 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	10.3	9.9	7.9	6.9	5.8	4.1
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	3.9	3.4	2.3	1.9	0.5	0.1

Tabla VI.43. Concentración de BP-3 en el tratamiento en la parcela 2

	Concentración de BP-3 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)					
	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	3.2	2.4	1.3	1.2	0.8	0.6
10 cm	2.8	2.5	2.1	1.5	0.8	0.7
20 cm	2.1	1.7	1.5	1.2	0.8	0.8
30 cm	1.8	1.6	1.4	1.2	1.2	0.7
40 cm	2.3	1.9	1.8	1.5	1.1	0.9
50 cm	9.4	8.7	7.6	6.6	5.2	4.6
60 cm	65.2	56.7	54.0	46.6	38.6	31.4
	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10 cm	0.6	0.6	0.5	0.5	0.4	0.3
20 cm	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1
30 cm	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1
40 cm	0.8	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1
50 cm	3.3	2.8	1.7	0.7	0.47	0.3
60 cm	29.9	26.8	23.8	17.3	13.65	11.2

Tabla VI.44. Concentración de BP-6 en el tratamiento en la parcela 2

	Concentración de BP-6 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)					
	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	1.7	0.9	0.7	0.7	0.6	0.3
10 cm	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3
20 cm	1.0	0.9	0.8	0.8	0.6	0.4
30 cm	1.1	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5
40 cm	25.6	22.1	19.8	18.9	15.7	13.8
	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10 cm	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
20 cm	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
30 cm	0.4	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1
40 cm	9.4	7.5	6.2	5.5	4.8	2.9

Tabla VI.45. Concentración de BP-8 en el tratamiento de la parcela 2

Concentración de BP-8 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	6.4	5.2	4.0	3.8	2.7	1.7
10 cm	4.7	4.0	3.5	3.3	2.3	1.2
20 cm	26.7	23.3	20.5	18.1	14.8	11.5
30 cm	5.2	4.9	4.3	4.1	3.9	2.8
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	1.1	0.9	0.7	0.7	0.4	0.3
10 cm	1.1	0.9	0.7	0.4	0.1	0.1
20 cm	9.8	8.7	7.4	5.4	3.8	2.3
30 cm	1.7	0.7	0.7	0.4	0.1	0.1

Tabla VI.46. Concentración de 4-OHBP en el tratamiento en la parcela 2

Concentración de BP-6 ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)						
	Toma 1	Toma 2	Toma 3	Toma 4	Toma 5	Toma 6
	5 h	29 h	53 h	77 h	125 h	173.5 h
2 cm (sup)	3.6	3.3	2.0	1.5	1.0	0.8
10 cm	2.5	1.9	1.5	1.3	1.3	1.1
20 cm	15.1	13.4	12.2	10.1	8.4	7.8
30 cm	12.6	10.9	9.5	8.2	7.6	6.5
40 cm	2.0	1.8	1.6	1.4	1.4	1.1
	Toma 7	Toma 8	Toma 9	Toma 10	Toma 11	Toma 12
	245 h	341 h	405.5 h	505.5 h	673.5 h	845.5 h
2 cm (sup)	0.6	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1
10 cm	0.7	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1
20 cm	5.8	4.9	3.2	1.8	0.5	0.4
30 cm	5.5	4.3	3.3	2.2	1.0	0.5
40 cm	0.9	0.7	0.6	0.3	0.1	0.1

Tabla VI.47. Concentración de BFA en el tratamiento en la parcela 2

	Concentración de BFA ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)					
	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	23.9	13.5	11.6	11.0	11.0	5.2
10 cm	9.0	7.7	6.9	6.2	3.8	3.2
20 cm	9.3	6.4	5.8	3.9	3.3	2.9
30 cm	11.0	7.4	4.7	4.4	3.9	3.2
	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	4.9	3.2	2.6	2.1	1.8	1.3
10 cm	3.1	1.6	1.4	1.4	1.3	1.0
20 cm	2.6	1.8	1.5	1.4	1.2	1.2
30 cm	3.0	2.7	1.8	1.2	1.2	1.1

Tabla VI.48. Concentración de TCS en el tratamiento en la parcela 2

	Concentración de TCS ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)					
	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	24.6	19.8	16.7	11.3	9.5	8.7
	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	6.3	5.8	3.8	0.9	0.4	

Tabla VI.49. Concentración de TCB en el tratamiento en la parcela 2

	Concentración de TCB ($\mu\text{g kg suelo}^{-1}$)					
	Toma 1 5 h	Toma 2 29 h	Toma 3 53 h	Toma 4 77 h	Toma 5 125 h	Toma 6 173.5 h
2 cm (sup)	1.8	1.4	0.9	0.7	0.6	0.6
10 cm	3.0	2.2	1.9	1.2	0.8	0.8
20 cm	4.6	4.4	3.7	2.7	1.9	1.3
30 cm	0.9	0.9	0.7	0.6	0.6	0.4
40 cm	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7
	Toma 7 245 h	Toma 8 341 h	Toma 9 405.5 h	Toma 10 505.5 h	Toma 11 673.5 h	Toma 12 845.5 h
2 cm (sup)	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	
10 cm	0.8	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1
20 cm	1.1	0.8	0.7	0.6	0.5	0.3
30 cm	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
40 cm	0.6	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1

Los resultados mostrados en las tablas demuestran que al igual que en el caso del estudio realizado en la primera parcela, todo el grupo de los parabenos, la BP-2 y el TCS eran retenidos en la superficie (2 cm), degradándose completamente en este punto. En el caso de las demás benzofenonas, la BP-1 aparece hasta profundidades de 40 cm; la BP-3, al igual que en el caso del primer experimento, alcanza la profundidad máxima estudiada de 60 cm; La BP-6 aparece hasta los 40 cm; la BP-8 hasta los 30 cm y la 4-OHBP hasta los 40 cm de profundidad. Por último, el BFA aparece hasta los 30 cm y el TCB, hasta los 40 cm.

3.4. Cinéticas de Desaparición de los Compuestos en Suelos Enmendados con Compost (Parcela 2)

Al igual que en el caso del primer experimento llevado a cabo en la parcela 1, la observación de la variación de las concentraciones con el

tiempo, a las distintas profundidades, permite vaticinar una cinética de primer orden para todos casos estudiados ($C = C_0 \cdot e^{-kt}$).

En las siguientes figuras se representan los ajustes obtenidos para cada uno de los compuestos estudiados.

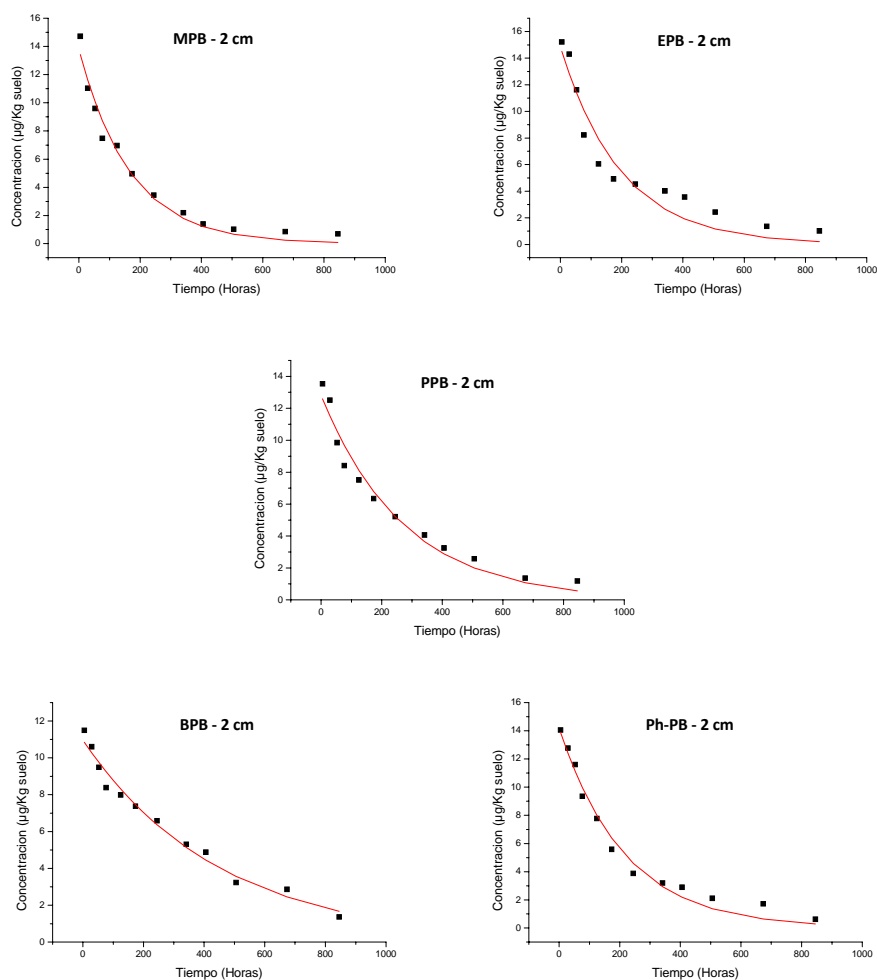


Figura VI.23. Cinética de desaparición de los parabenos en la superficie (2 cm)

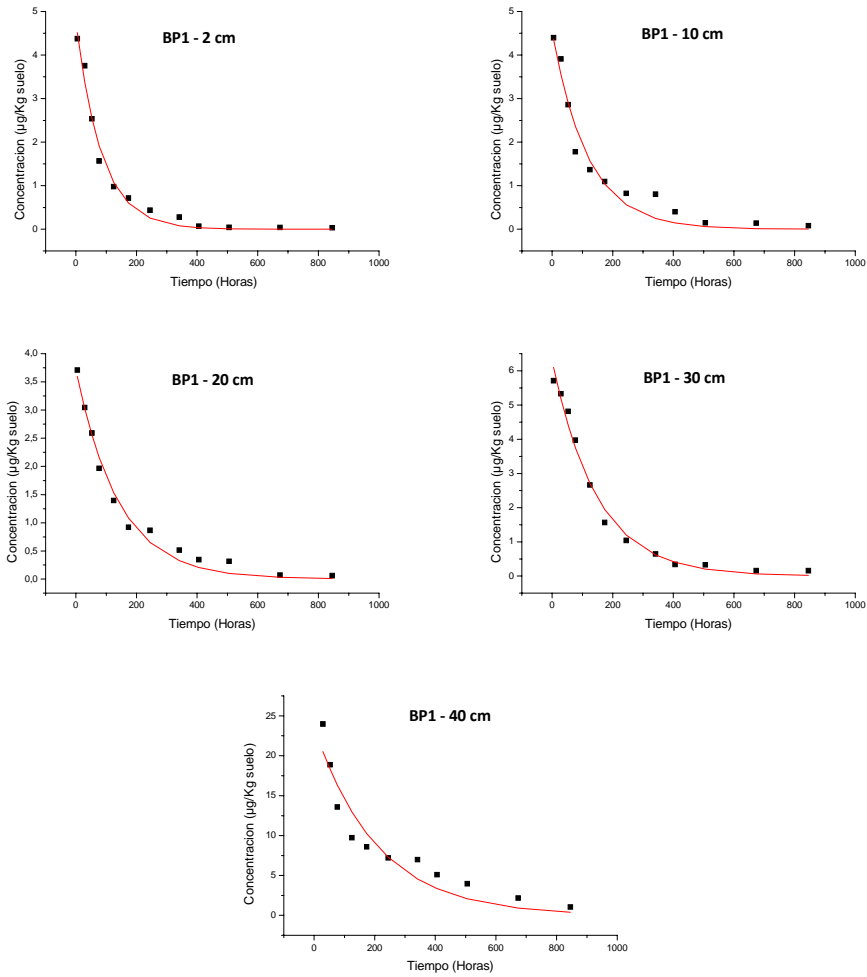


Figura VI.24. Cinética de desaparición de la BP-1 a las diferentes profundidades

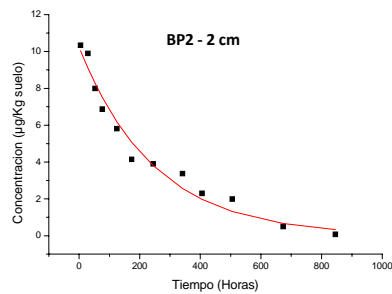


Figura VI.25. Cinética de desaparición de la BP-2 en la superficie (2 cm)

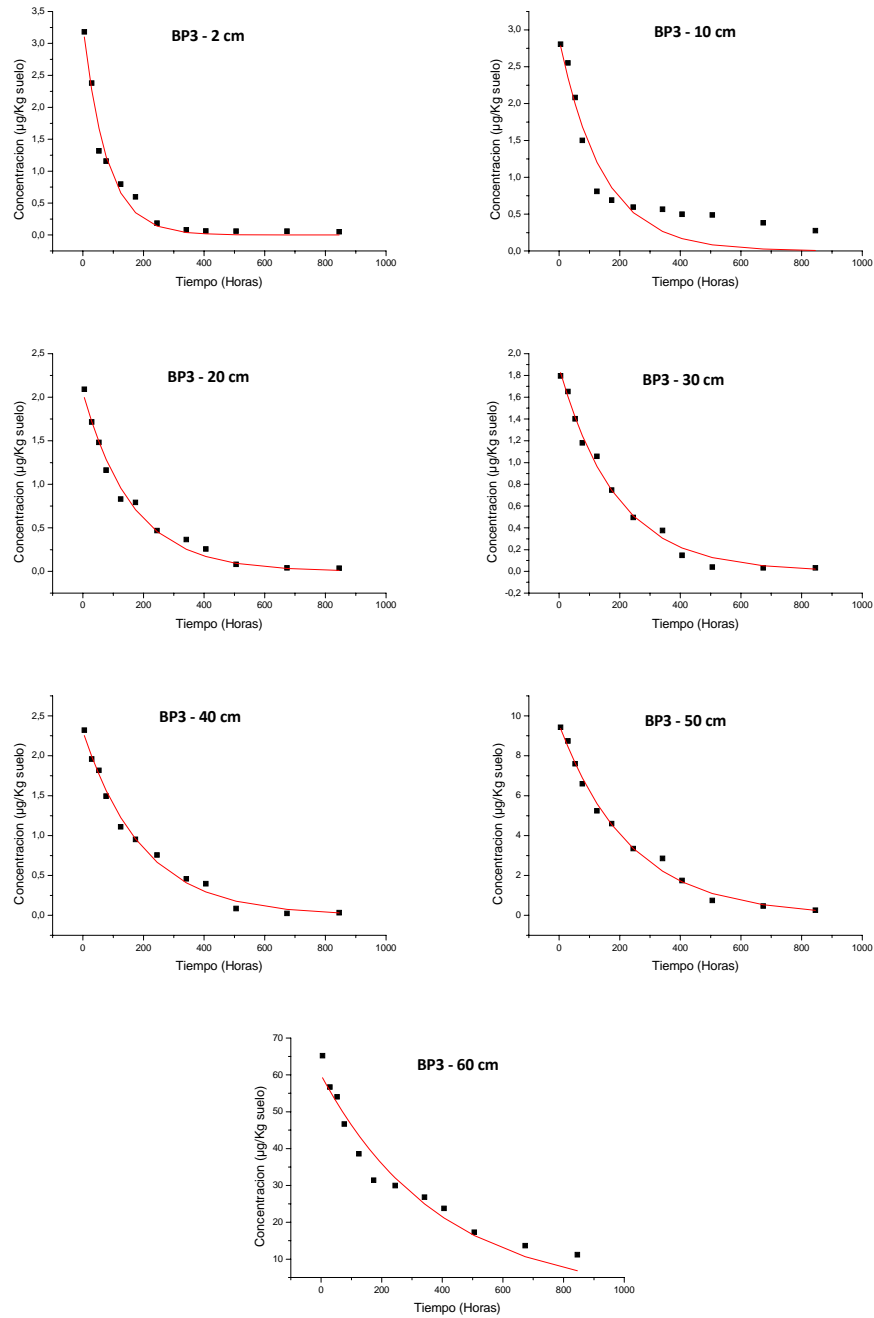


Figura VI.26. Cinética de desaparición de la BP-3 a las diferentes profundidades

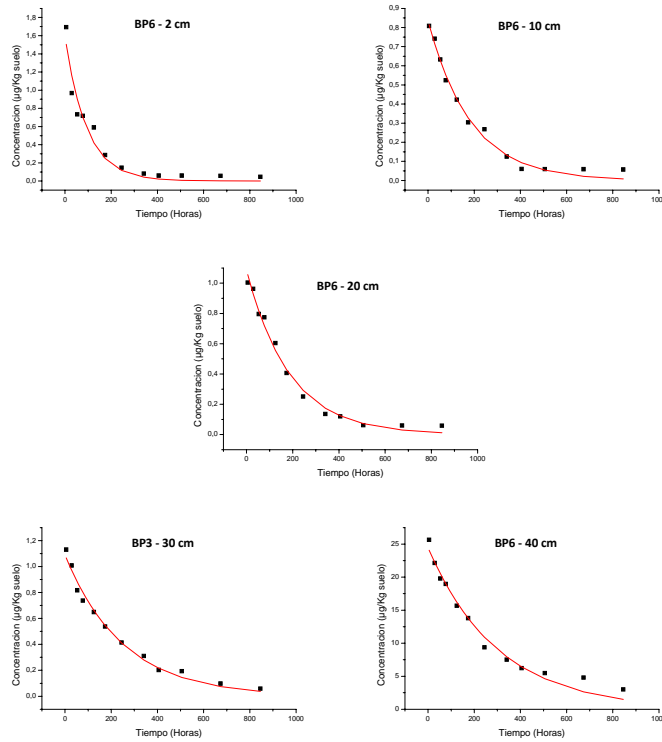


Figura VI.27. Cinética de desaparición de la BP-6 a las diferentes profundidades

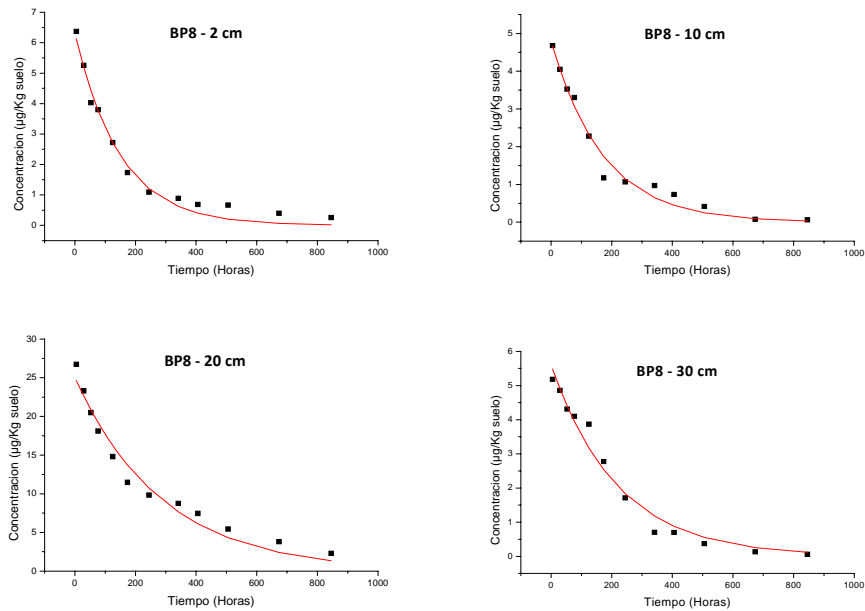


Figura VI.28. Cinética de desaparición de la BP-8 a las diferentes profundidades

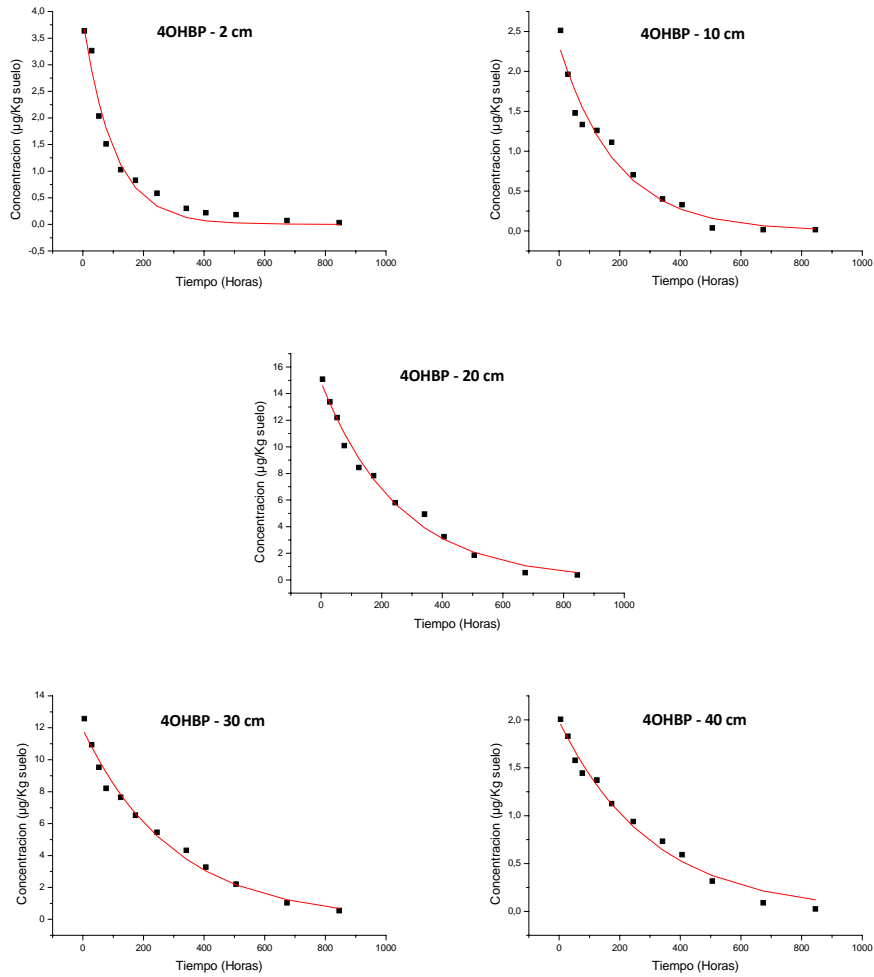


Figura VI.29. Cinética de desaparición de la 4-OHBP a las diferentes profundidades

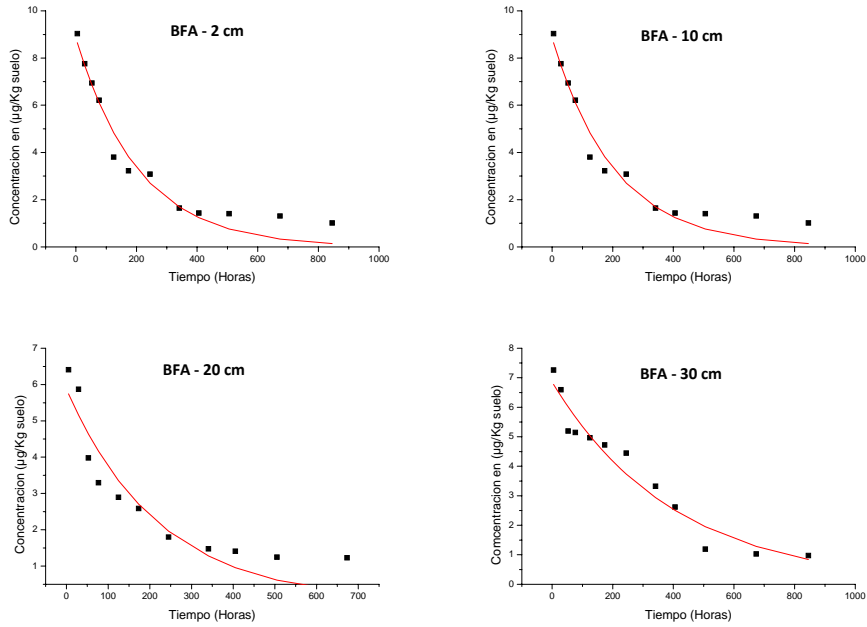


Figura VI.30. Cinética de desaparición del BFA a las diferentes profundidades

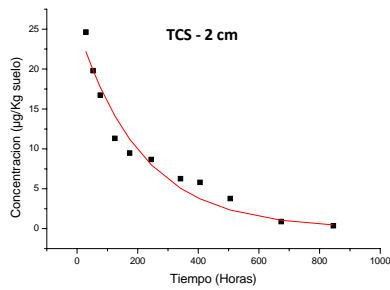


Figura VI.31. Cinética de desaparición del TCS en superficie (2 cm)

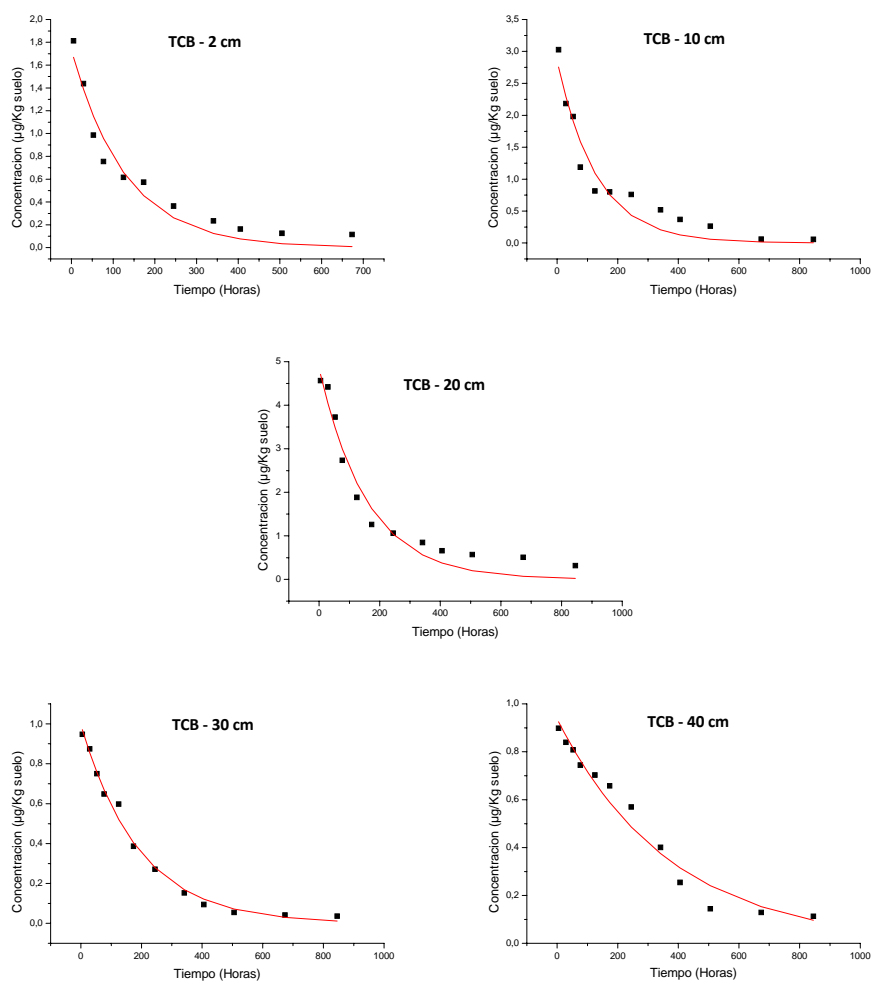


Figura VI.32. Cinética de desaparición de la TCB a las diferentes profundidades

A continuación, partiendo de los datos de concentración obtenidos para cada profundidad, se obtuvieron los parámetros correspondientes de la ecuación exponencial de primer orden $C = C_0 \cdot e^{-kt}$, es decir, los valores de la constante de desaparición del compuesto (k), el tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) y el coeficiente de determinación (R^2). La siguiente tabla muestra los valores obtenidos.

Tabla VI.50. Parámetros del ajuste para los PBs en superficie

	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB
k (h^{-1})	$6.0 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$3.7 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$	$4.6 \cdot 10^{-3}$
C_0	13.8	14.9	12.8	10.9	14.2
$t_{1/2}$	115.5	136.9	188.3	312.2	150.0
%R ²	97.8	92.8	97.1	98.1	98.2

Tabla VI.51. Parámetros del ajuste para la BP-1 a distintas profundidades

Profundidad	Sup.	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm
k (h^{-1})	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$8.5 \cdot 10^{-3}$	$7.1 \cdot 10^{-3}$	$6.8 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-3}$
C_0	4.8	4.6	3.7	6.3	23.6
$t_{1/2}$	57.8	81.1	97.2	102.1	144.1
%R ²	98.6	95.9	98.5	98.8	90.6

Tabla VI.52. Parámetros del ajuste para la BP-2 en superficie

k (h^{-1})	$4.1 \cdot 10^{-3}$	$t_{1/2}$	170.7
C_0	10.2	%R ²	97.3

Tabla VI.53. Parámetros del ajuste para la BP-3 a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
k (h^{-1})	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$6.9 \cdot 10^{-3}$	$6.1 \cdot 10^{-3}$	$5.3 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$
C_0	3.3	2.9	2.1	1.9	2.3	9.6	59.9
$t_{1/2}$	53.6	99.2	112.9	130.0	136.2	161.6	269.7
%R ²	97.9	90.6	98.8	99.3	99.2	99.28	95.3

Tabla VI.54. Parámetros del ajuste para la BP-6 a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm
k (h^{-1})	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$5.4 \cdot 10^{-3}$	$5.4 \cdot 10^{-3}$	$3.9 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-3}$
C_0	1.6	0.8	1.1	1.1	24.5
$t_{1/2}$	65.0	128.1	129.3	174.2	210.0
%R ²	94.9	98.9	98.9	98.7	97.9

Tabla VI.55. Parámetros del ajuste para la BP-8 a distintas profundidades

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm
k (h^{-1})	$6.8 \cdot 10^{-3}$	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$3.5 \cdot 10^{-3}$	$4.6 \cdot 10^{-3}$
C_0	6.3	4.8	25.1	5.6
$t_{1/2}$	102.1	118.3	119.2	151.7
%R ²	98.3	97.9	96.9	97.7

Tabla VI.56. *Parámetros del ajuste para la 4-OHBP a distintas profundidades*

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm
k (h⁻¹)	9.9·10 ⁻³	5.3·10 ⁻³	3.9·10 ⁻³	3.4·10 ⁻³	3.3·10 ⁻³
C₀	3.8	2.3	14.8	11.9	1.9
t_{1/2}	69.9	130.0	177.3	205.7	209.4
%R²	97.4	96.6	98.9	98.5	98.6

Tabla VI.57. *Parámetros del ajuste para el BFA a distintas profundidades*

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm
k (h⁻¹)	5.4·10 ⁻³	4.9·10 ⁻³	4.5·10 ⁻³	3.6·10 ⁻³
C₀	14.0	8.9	5.9	4.7
t_{1/2}	128.1	142.6	155.1	192.0
%R²	95.5	95.7	93.8	97.4

Tabla VI.58. *Parámetros del ajuste para el TCS en superficie*

k (h⁻¹)	4.7·10 ⁻³	t_{1/2}	146.5
C₀	25.4	%R²	95.7

Tabla VI.59. *Parámetros del para el TCB a distintas profundidades*

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm
k (h⁻¹)	7.7·10 ⁻³	7.7·10 ⁻³	6.3·10 ⁻³	5.2·10 ⁻³	2.7·10 ⁻³	2.3·10 ⁻³
C₀	1.7	2.9	4.9	0.9	0.9	52.4
t_{1/2}	89.7	89.9	109.8	133.3	257.7	297.5
%R²	95.0	93.4	96.0	99.2	96.9	95.5

En todos los casos, el comportamiento es similar al observado en la parcela 1, aunque con ciertas diferencias que desarrollaremos a continuación.

4. Comparación del Comportamiento de los Contaminantes en Suelo y en Suelo Enmendado con Compost

Durante este estudio comparativo de la cinética de degradación de los disruptores endocrinos en suelos y suelos enmendados con compost se demuestra que, todos los analitos estudiados en las diferentes condiciones, tienen un comportamiento similar, ajustándose en todos los casos a una cinética de primer orden.

En las siguientes tablas se comparan los tiempos de vida media de cada uno de los compuestos estudiados a las distintas profundidades, en ambos estudios.

Tabla VI.60. Comparación del comportamiento de los parabenos en el suelo y suelo enmendado con compost (en superficie)

	$t_{1/2}$
MPB	P 1 > P 2
EPB	P 1 > P 2
PPB	P 1 < P 2
BPB	P 1 < P 2
Ph-PB	P 1 > P 2

En la tabla se observa que, en ambas condiciones experimentales (P1 y P2) los cinco parabenos estudiados mostraron un comportamiento similar en cuanto a su desaparición; todos quedaron retenidos en superficie y ninguno penetró en el suelo. En el caso del MPB, EPB, y Ph-PB los tiempos de vida medios fueron superiores en las condiciones experimentales de la parcela P1, sucediendo lo contrario en el caso del PPB y BPB, los cuales degradan con mayor rapidez en la P1.

Tabla VI.61. Comparación del comportamiento de las benzofenonas en el suelo y suelo enmendado con compost

	$t_{1/2}$					
	BP-1	BP-2	BP-3	BP-6	BP-8	4-OHBP
2cm (sup)	P1 > P2	P1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2
10 cm	P1 > P2		P 1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2
20 cm	P1 > P2		P 1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2	P 1 > P2
30 cm	P1 < P2		P 1 > P2	P 1 > P2		P 1 > P2
40 cm	P1 > P2		P 1 > P2	P 1 > P2		P 1 > P2
50 cm	P1 > P2		P 1 > P2	P 1		
60 cm			P 1 > P2			

En el caso de la BP-1 se aprecia que el compuesto en las dos condiciones experimentales aparece hasta una profundidad de 50 cm, no lixiviando a mayores profundidades. En casi todas las profundidades el tiempo de vida media fue mayor en la P1 respecto a la P2, excepto a los 30 cm. La BP-2 no lixivia en ninguno de los dos casos, siendo el tiempo de vida medio mayor en la P1 que en la P2. En el caso de la BP-3, el compuesto es detectado a la profundidad máxima estudiada de 60 cm, en ambas condiciones, pudiendo incluso lixiviar a mayores profundidades. En todos los casos el tiempo de vida medio fue mayor en la P1 que en la P2. La BP-6 lixivia hasta los 50 cm en las condiciones experimentales de la P1 y hasta los 40 cm en las condiciones de la P2, siendo el tiempo de vida medio en todos los casos mayores en la P1. La BP-8 se detecta hasta la profundidad 20 cm, no lixiviando a mayores profundidades. El tiempo de vida medio fue mayor en las condiciones de la P1. Finalmente, la 4-OHBP, aparece hasta los 40 cm de profundidad e igualmente, en todos los casos el tiempo de vida medio fue mayor en las condiciones de la P1.

Tabla VI.62. Comparación del comportamiento de BFA, TCS y TCB en el suelo y suelo enmendado con compost

	$t_{1/2}$		
	BFA	TCS	TCB
2cm (sup)	P 1 <P 2	P 1 >P 2	P 1 >P 2
10 cm	P 1 >P 2		P 1 >P 2
20 cm	P 1 >P 2		P 1 >P 2
30 cm	P 1 >P 2		P 1 >P 2
40 cm			P 1 >P 2
50 cm			P 1 >P 2
60 cm			P 1 >P 2

El BFA aparece hasta los 30 cm de profundidad en las dos condiciones experimentales estudiadas. No alcanzando mayores profundidades. El tiempo de vida medio en la mayor parte de los casos es superior para las condiciones de la P1, salvo en superficie, donde es al revés. En el caso del TCS, se puede observar que sólo se absorbe y biodegrada en la superficie en ambas condiciones, mostrando que el tiempo de vida medio es mayor en las condiciones de la P1. Finalmente, en el caso del TCB, se aprecia que el compuesto aparece hasta la máxima profundidad estudiada (60 cm), pudiendo incluso lixiviar a mayores profundidades. En todos los casos el tiempo de vida media fue mayor bajo las condiciones de la parcela P1.

Como conclusión general, se observa que en la mayoría de los compuestos, los tiempos de vida media son mayores en las condiciones experimentales de la parcela P1. Esto puede deberse a que al enmendar el suelo agrícola con compost, se aporta materia orgánica, hecho que favorece el crecimiento de microorganismos que podría provocar un aumento tanto en la retención de los analitos como en el fenómeno de la biodegradación.

CAPÍTULO VII

Aplicación en Campo. Estudio
Microbiológico

1. Ensayos Microbiológicos

1.1. Recuento de la Microbiota a Diferentes Profundidades en Suelo Agrícola y en Suelo Enmendado con Compost, en Presencia de Diferentes Compuestos en las Parcelas Experimentales

1.1.1. Metodología: Descripción del Ensayo. Tratamiento de Campo

Con objeto de determinar la influencia de los diferentes compuestos químicos objeto de estudio sobre la microbiota cultivable presente en el suelo agrícola, se adicionaron dichos compuestos al suelo de la parcela experimental, dividida en este caso en subparcelas de 1 m², siendo la cantidad de los compuestos añadida de 1 g L⁻¹, en un volumen de agua de 120 L m⁻². En la **tabla VII.1** se describen las fechas de muestreo. Previamente a la adición de los compuestos se homogeneizó y humedeció la zona de ensayo con agua de pozo para que la disposición de los compuestos fuera homogénea en la zona de aplicación.

Tabla VII.1. Fecha y hora de muestreo durante el tratamiento

Nº	Fecha	Hora de muestreo	Nº	Fecha	Hora de muestreo
T1	08/10/2012	16:30	T4	29/10/2012	13:00
T2	15/10/2012	17:00	T5	05/11/2012	17:00
T3	22/10/2012	16:30	T6	12/11/2012	13:00

T1-T3-T6: Muestreo a tiempo 0, 15 y 30 días de todas las parcelas tratadas con compost + los compuestos y la parcela control. **T2-T4-T6:** Muestreo a tiempo 0, 15 y 30 días de las parcelas tratadas con los compuestos sin tratamiento previo de compost

Para llevar a cabo el presente estudio, se seleccionaron los compuestos más representativos y empleados en la actualidad de cada una de las familias estudiadas a lo largo de la presente Tesis Doctoral, concretamente MPB, BPB, BP-3, BFA, TCS y TCB. Las siete parcelas

seleccionadas se trataron inicialmente con la disolución de los compuestos. En este momento se realizó el primer muestreo (T1 y T2) correspondiente al tiempo 0 días (muestra control de evolución de ensayo). Los siguientes muestreos se realizaron a los 15 días (T3 y T4) y los últimos a los 30 días (T5 y T6) tal y como se describe en la **tabla VII.1**.

En la **tabla VII.2** se muestran los distintos suelos dopados con los compuestos en presencia y ausencia de compost. A cada parcela se le adicionó 2 kg m^{-2} de compost. Las parcelas fueron dopadas con cada uno de los compuestos en estudio a excepción de una de ellas que se consideró como la parcela control. En la **figura VII.1** se muestra una de las parcelas utilizadas para este ensayo.

Tabla VII.2. Descripción de las parcelas individuales para ensayos microbiológicos de suelos tratados y sin tratar con compost

Parcelas sin Compost	Parcelas con Compost
Suelo + MPB	Suelo + MPB + Compost
Suelo + BPB	Suelo + BPB + Compost
Suelo + BP-3	Suelo + BP-3 + Compost
Suelo + BFA	Suelo + BFA + Compost
Suelo + TCS	Suelo + TCS + Compost
Suelo + TCB	Suelo + TCB + Compost
Suelo (Control)	Suelo + Compost (Control)



Figura VII.1. Parcela experimental. **A:** Tras adición del analito.
B: 5 h después de realizar el tratamiento

2. Estudio de la Temperatura y Humedad Relativa

Al igual que en el caso del estudio químico de campo, durante todo el proceso, se realizó un seguimiento de la temperatura y de la humedad del suelo; empleando para ello el equipo AquaCheck ya descrito en el capítulo anterior. En la **figura VII.2** se muestran los valores promedio durante los 30 días de ensayo.

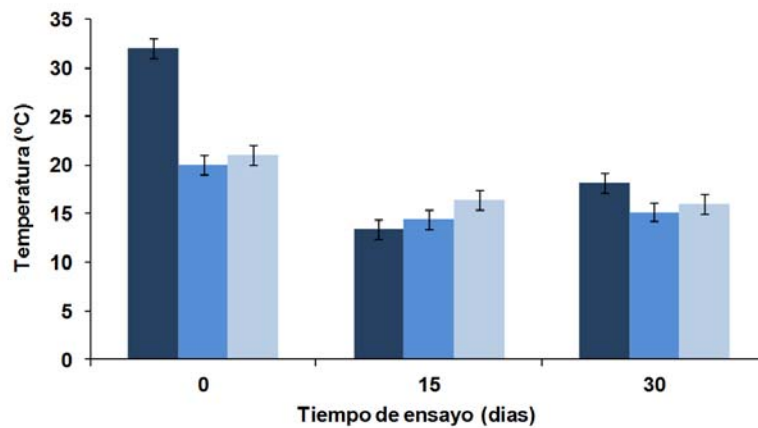


Figura VII.2. Temperatura de las muestras a diferentes profundidades durante el ensayo (0 días, 15 y 30 días). Superficie (■); 30 cm (■); 60 cm (■)

Se observa un descenso gradual de la temperatura durante el periodo de realización del estudio. Al comienzo de los ensayos (día 0) la temperatura en la superficie fue un 58 % y un 43 % superior respecto a las temperaturas medidas a los 15 y 30 días respectivamente. Además, se observa que la temperatura al inicio del ensayo a la profundidad de 30 cm y 60 cm es ligeramente superior que las medidas a los 15 y 30 días.

En la **figura VII.3** se muestran los valores de humedad relativa (%) a lo largo del ensayo.

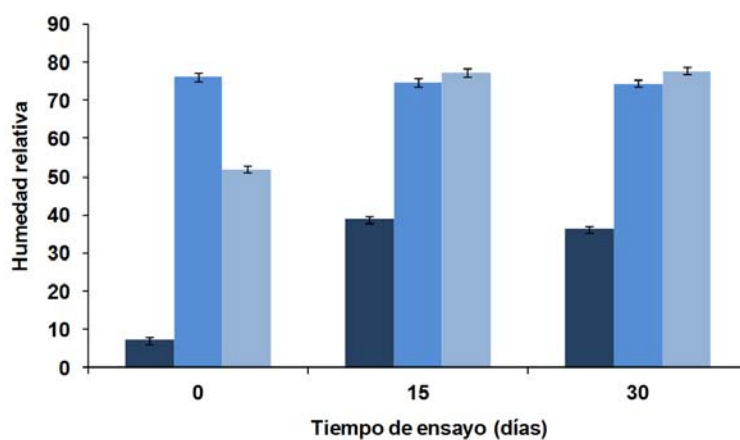


Figura VII.3. Humedad media relativa de las muestras a diferentes profundidades durante el ensayo (0 días, 15 y 30 días). Superficie (■); 30 cm (■); 60 cm (■)

En superficie y a tiempo 0, la humedad media relativa es menor, aumentando a mayores profundidades. En los días siguientes de muestreo la humedad aumenta en la superficie y a las diferentes profundidades debido a las precipitaciones durante esos días. Por otro lado, se puede observar que al inicio del ensayo (0 días) la superficie del suelo presentaba un valor de humedad relativa muy inferior respecto a los días 15 y 30 (7.1 %, 38.8 % y 36.3 %). A la profundidad de 30 cm la humedad se mantuvo relativamente constante (76.2 %; 74.7 % y 74.5 %), al igual que a los 15 y 30 días a la profundidad de 60 cm, (77.3 % y 77.8 %) observándose que al inicio del ensayo a esta profundidad, la humedad relativa fue significativamente inferior (52.0 %).

La información sobre las precipitaciones en estas fechas se obtuvo de la Estación Meteorológica del Aeropuerto de Granada (84190-LEGR), situado en las cercanías de la finca experimental. Los datos obtenidos informaron de **"un ambiente muy húmedo con una media del orden de 98 mm de precipitación y una temperatura media de 16.1°C"** durante el tiempo de ensayo. Los días de precipitaciones durante el estudio fueron los siguientes: 15, 20, 21, 24, 25 y 26 de Octubre de 2012.

3. Tratamiento de las Muestras Procedentes de las Parcelas para el Ensayo Microbiológico

El estudio se llevó a cabo en parcelas diferentes para cada analito y a distintos tiempos. La toma de muestra para la cuantificación de la microbiota cultivable se realizó a tres profundidades (2, 30 y 60 cm) a lo largo del tiempo (0, 15 y 30 días), utilizando el muestreador tipo barrena helicoidal y recipientes estériles para la recolección de dichas muestras.

Al igual que en el caso del estudio químico, una vez recolectadas, las muestras se trasladaron al laboratorio y se dejaron secar a temperatura ambiente en un desecador durante 24 h, con objeto de eliminar los restos de humedad. A continuación se homogeneizaron y tamizaron utilizando un tamiz estéril de 1 mm de diámetro de poro.

Todas las siembras, así como el procesamiento de las muestras (preparación de diluciones), se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar. A partir de 1 g de cada muestra se realizaron diluciones seriadas (1/10) en solución salina (NaCl, 0.9 %, p/v), sembrándose 0.1 mL de cada dilución en medio sólido TSA (Agar Tripticasa Soja, Oxoid) mediante método de siembra de la gota. De cada dilución se realizaron tres réplicas. Posteriormente, las placas se incubaron en aerobiosis durante 24/48 h en la estufa a 28-30°C.

Los resultados se expresaron como logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias de microorganismos heterótrofos cultivables por gramo de suelo ($\log \text{UFC g suelo}^{-1}$).

3.1. Resultados de Recuento de la Microbiota a Diferentes Profundidades de Suelos Tratados con los Compuestos

3.1.1. Muestras de Suelo Tratado con Metilparabeno

En la *figura VII.4* se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo y muestras de suelo tratado con MPB.

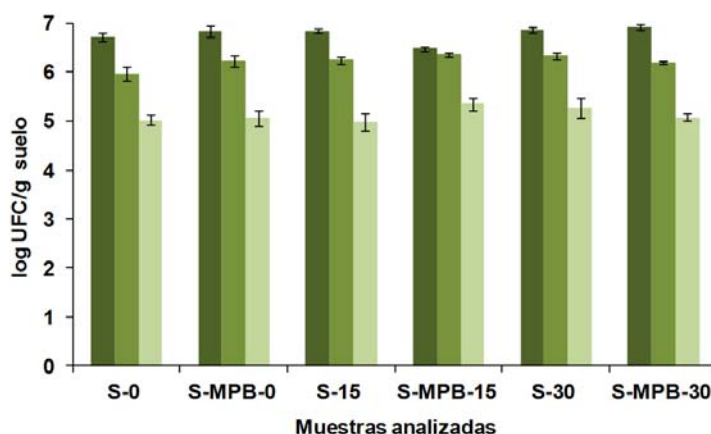


Figura VII.4. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo (S) y de muestras de suelo tratado con MPB (S-MPB) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** Las muestras control obtenidas de las parcelas experimentales (tiempo 0 días) tanto de suelo como de suelo tratado con MPB, mostraron un resultado similar en relación al número de microorganismos heterótrofos cultivables detectados (muestras S-0 y S-MP-0) con un resultado de log UFC g suelo⁻¹ de 6.72±0.09 y 6.82±0.11, respectivamente). Por otro lado, a lo largo del tiempo, no se observaron cambios significativos en el recuento en las muestras no tratadas de superficie S-15 y S-30 cuyos resultados fueron de 6.84±0.03; 6.86±0.06, respectivamente. Además, en las muestras

obtenidas de suelos tratados con el compuesto, se pudo apreciar que trascurridos 15 días y 30 días desde el inicio del tratamiento, no se observaron variaciones relevantes en el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables (6.47 ± 0.05 y 6.91 ± 0.05), respectivamente.

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** El comportamiento en relación al recuento de microorganismos es similar al obtenido en superficie, no obstante los recuentos fueron significativamente inferiores al aumentar la profundidad.

A 30 cm de profundidad el número de microorganismos expresado como log UFC g suelo⁻¹ de todas las muestras oscilaron entre valores de 5.96 ± 0.15 (S-0) y 6.35 ± 0.04 (S-MP-15), observándose que las diferencias entre muestras distintas no eran significativas. Puede apreciarse que a tiempo inicial de ensayo el recuento de las muestras tratadas con MPB fue ligeramente superior a las muestras sin el compuesto (5.96 ± 0.15 y 6.21 ± 0.11), siendo esta tendencia similar a las muestras de superficie.

A 60 cm los recuentos fueron significativamente inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. Dichos recuentos fueron similares en las muestras sin tratar y tratadas con el analito a tiempo inicial (5.02 ± 0.10 y 5.06 ± 0.15 respectivamente), aumentando a los 15 días en la muestra de suelo tratado con el analito (5.43 ± 0.12), y disminuyendo ligeramente a los 30 días (5.07 ± 0.07). No obstante estos datos no se consideraron como cambios relevantes.

- **En resumen.** El valor de media aritmética del log UFC g suelo⁻¹ de las muestras analizadas en superficie fue de 6.77 ± 0.16 , y los valores para 30 y 60 cm fueron de 6.21 ± 0.14 y 5.12 ± 0.14 , respectivamente. Puede observarse que los resultados porcentuales de log UFC g suelo⁻¹

obtenidos fueron significativamente diferentes a las diferentes profundidades, detectándose un descenso microbiano del 8.2 % y 24.3 % en las muestras recolectadas a 30 cm y 60 cm respectivamente, respecto a la superficie considerada como control (100 %).

3.1.2. Muestras de Suelo Tratado con Butilparabeno

En la **figura VII.5** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo y muestras de suelo tratado con BPB.

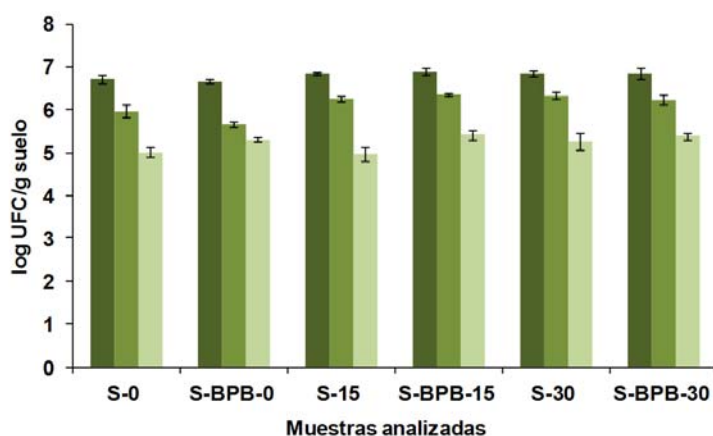


Figura VII.5. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo (S) y de muestras de suelo tratado con BPB (S-BPB) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** Las muestras control obtenidas de las parcelas experimentales (tiempo 0 días) tanto de suelo como de suelo tratado con BPB, presentan un comportamiento similar en relación al número de microorganismos heterótrofos cultivables detectados (muestras S-0 y S-BPB-0: log UFC g suelo⁻¹ = 6.72±0.09 y 6.66±0.05, respectivamente). A lo largo del tiempo, no se observaron

cambios significativos en los recuento de dichos microorganismos en las muestras no tratadas de superficie S-15 y S-30, fueron de 6.84 ± 0.03 ; 6.86 ± 0.06 , respectivamente. Además, en las muestras obtenidas en suelos tratados con el compuesto, se pudo apreciar que transcurridos 15 y 30 días desde el inicio del tratamiento, tampoco se observaron cambios significativos en el recuento (6.89 ± 0.07 y 6.85 ± 0.12 , respectivamente).

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** El comportamiento en relación al recuento de microorganismos es similar al obtenido en superficie no obstante los recuentos fueron significativamente inferiores a medida que aumenta la profundidad.

A 30 cm los recuentos expresados como log UFC g suelo⁻¹ de todas las muestras oscilaron entre valores de 5.96 ± 0.15 (S-0) y 6.89 ± 0.07 (S-BPB-15). Se observa que a tiempo inicial de ensayo (0 días) el recuento microbiano de las muestras tratadas con BPB (S-BPB-0) fue ligeramente inferior a las muestras sin compuesto (5.96 ± 0.15 y 6.66 ± 0.05). En los recuentos realizados a 15 y 30 días la población microbiana se mantiene estable.

A 60 cm de profundidad el número de microorganismos fue significativamente inferior en relación a las muestras de superficie y 30 cm. Dichos recuentos fueron similares en las muestras sin tratar y tratadas con el compuesto a tiempo inicial (5.02 ± 0.10 y 5.31 ± 0.05).

En las muestras tratadas con BPB, los recuentos se mantuvieron relativamente constantes a los 15 y 30 días de tratamiento (5.42 ± 0.11 y 5.38 ± 0.07). No obstante, se pudo observar que en el suelo no tratado con el compuesto, transcurridos 15 días de ensayo, los recuentos fueron ligeramente inferiores (4.97 ± 0.17) a los obtenidos en la parcela

tratada con el analito tras 15 días de ensayo. Es de destacar que, al igual que en el caso anterior, estos datos no fueron considerados como cambios estadísticamente significativos.

- ***En resumen.*** Al igual que en el caso anterior (MPB), se determinó el valor de la media aritmética de las muestras analizadas en superficie, a 30 y 60 cm, siendo de 6.81 ± 0.07 , 6.13 ± 0.08 y 5.23 ± 0.12 (resultado de $\log \text{ UFC g suelo}^{-1}$) respectivamente. Se observa que los resultados porcentuales de $\log \text{ UFC g suelo}^{-1}$ obtenidos fueron significativamente diferentes en relación a las muestras de superficie (100 %), es decir, el descenso en el número de microorganismos viables observado fue de un 10.0 % y 23.2 % en las muestras de 30 y 60 cm respectivamente.

3.1.3. Muestras de Suelo Tratado con Benzofenona 3

En la **figura VII.6** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo y muestras de suelo tratado con BP-3.

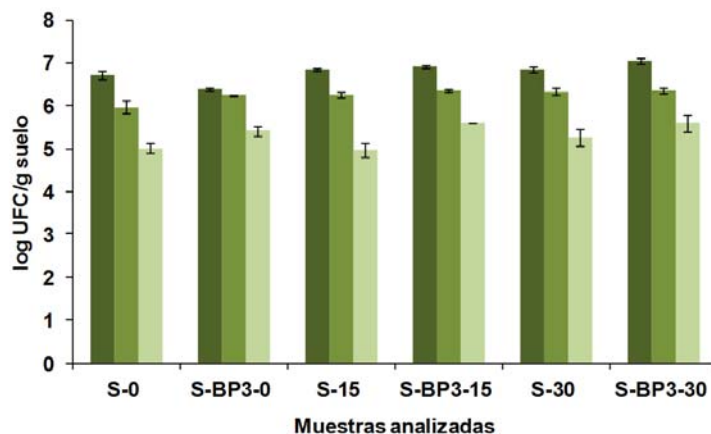


Figura VII.6. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C ($\log \text{ UFC g suelo}^{-1}$) de muestras control de suelo (S) y de muestras de suelo tratado con BP-3 (S-BP-3) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** Al analizar los resultados se puede apreciar que, en las muestras control obtenidas en las parcelas experimentales (tiempo de análisis 0 días), el suelo tratado con BP-3 tiene un comportamiento similar al suelo no tratado, en relación al número de microorganismos heterótrofos cultivables detectados (muestras S-0 y S-BP-3-0: 6.72 ± 0.09 y 6.39 ± 0.02 , respectivamente). Por otro lado, a lo largo del tiempo, no se observaron cambios significativos en el recuento microbiano de las muestras no tratadas de superficie S-15 y S-30 cuyos resultados fueron de 6.84 ± 0.03 ; 6.86 ± 0.06 , respectivamente. No obstante, parece detectarse un menor número de microorganismos en las muestras correspondientes a suelo tratado a tiempo 0 días (S-BP-3-0) cuyo resultado fue 6.39 ± 0.02 . Además, en las muestras obtenidas de suelos tratados con el compuesto, tras 15 y 30 días desde el inicio del tratamiento, se observó un ligero aumento en el número de microorganismos en superficie (muestras S-BP-3-15 y S-BP-3-30) respecto a las muestras iniciales (6.91 ± 0.02 y 7.05 ± 0.05).

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** La tendencia observada en relación al recuento a 30 cm y 60 cm indicó que el número de microorganismos fue significativamente inferior a medida que aumentaba la profundidad.

A 30 cm los recuentos (\log UFC g suelo⁻¹) de todas las muestras oscilaron entre valores de 5.96 ± 0.15 (S-0) y 6.35 ± 0.04 (S-BP-3-15), observándose que las diferencias no eran significativas. Se aprecia que a tiempo inicial de ensayo (S-0) el recuento de las muestras tratadas con el compuesto fue ligeramente superior al de las muestras sin el compuesto (6.215 ± 0.14 y 5.96 ± 0.15 , respectivamente), siendo esta tendencia inversa en las muestras de superficie a tiempo 0 días.

A 60 cm los recuentos fueron significativamente inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. Dichos recuentos fueron similares en las muestras sin tratar y tratadas con el compuesto al inicio (5.02 ± 0.10 y 5.41 ± 0.10 , respectivamente). Transcurridos 15 días de ensayo el número de microorganismos en el suelo sin tratar disminuyó (4.97 ± 0.17), manteniéndose relativamente constante tras 15 días de tratamiento (S-BP-3-15, 5.60 ± 0.01). Tras 30 días de ensayo, tanto en el suelo no tratado como en el suelo tratado, el número de microorganismos se mantuvo constante con un resultado de 5.26 ± 0.20 y 5.61 ± 0.07 , respectivamente.

- ***En resumen.*** La media aritmética de las muestras estudiadas en superficie fue de 6.79 ± 0.05 , y los valores para 30 y 60 cm fueron de 6.24 ± 0.06 y 5.31 ± 0.12 respectivamente. Puede observarse que los porcentajes de $\log \text{ UFC g suelo}^{-1}$ obtenidos fueron significativamente diferentes respecto a las muestras de superficie (100 %), es decir el descenso de microorganismos viables observado fue de un 8.1 % y 21.8 % en las muestras recolectadas a 30 y 60 cm respectivamente.

3.1.4. Muestras de Suelo Tratado con Bisfenol A

En la **figura VII.7** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo y muestras de suelo tratado con BFA.

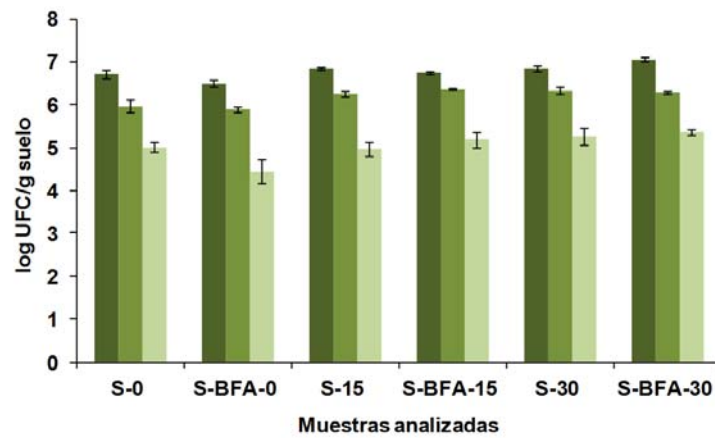


Figura VII.7. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo (S) y de muestras de suelo tratado con BFA (S-BFA) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** En las muestras control (tiempo de análisis 0 días) tanto de suelo como de suelo tratado con BFA, se observó un comportamiento similar en relación al número de microorganismos heterótrofos cultivables detectados, siendo el recuento (log UFC g suelo⁻¹) de la muestra del suelo S-0, 6.72±0.09 y de la muestra del suelo S-BFA-0, 6.49±0.07. Por otro lado, a lo largo del tiempo de ensayo, no se observaron cambios significativos en el recuento de microorganismos en las muestras no tratadas de superficie S-15 y S-30 cuyos resultados fueron de 6.84±0.03 y 6.86±0.06, respectivamente, en relación al suelo control a tiempo 0 días. En las muestras obtenidas de suelos tratados con el compuesto, transcurridos 15 y 30 días (S-BFA-15 y S-BFA-30) se apreció un leve aumento del recuento (6.76±0.03 y 7.05±0.03) respecto al día del inicio del tratamiento (6.49±0.07); es de destacar el aumento del número de microorganismos heterótrofos cultivables a lo largo del ensayo.
- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** Al igual que sucede en los casos anteriores, el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables

en las muestras recolectadas a 30 y 60 cm de profundidad fue significativamente inferior a medida que aumenta la profundidad.

A 30 cm en las muestras tratadas con el analito se observa una evolución positiva; es decir en las muestras recolectadas a 15 días (S-BFA-15) el recuento fue de 6.36 ± 0.02 siendo inicialmente de 5.88 ± 0.06 (S-BFA-0). A partir del día 15 el número de microorganismos se mantuvo estable hasta los 30 días de ensayo (6.29 ± 0.03 , S-BFA-30).

A 60 cm de profundidad los recuentos fueron significativamente inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. En dichos recuentos se observó una reducción en el número de microorganismos presentes en las muestras sin tratar y tratadas con el analito a tiempo inicial (5.02 ± 0.10 y 4.46 ± 0.27) respecto a los resultados obtenidos en superficie y a 30 cm de profundidad. A lo largo del tiempo de ensayo se observó un aumento del número de microorganismos en las muestras tratadas con el analito (S-BFA-15 y S-BFA-30) con un resultado de 5.26 ± 0.20 y 5.37 ± 0.07 , respectivamente, en relación a los resultados obtenidos a tiempo inicial (4.46 ± 0.27). Por tanto, se observa que al cabo de 30 días de ensayo, las muestras de suelo tratado con el compuesto aumentaron, en aproximadamente 1 logaritmo, el número de microorganismos heterótrofos cultivables.

- ***En resumen.*** Al realizar los cálculos de la media aritmética del log UFC g suelo⁻¹ de las muestras analizadas en superficie el resultado fue de 6.79 ± 0.05 , y los valores para 30 y 60 cm fueron de 6.18 ± 0.16 y 5.05 ± 0.16 , respectivamente. También se pudo observar que los resultados porcentuales de log UFC g suelo⁻¹ obtenidos eran significativamente diferentes en relación a las muestras de superficie (100 %), es decir, el descenso de microorganismos observado fue de un 9.0 % y 25.6 % para las muestras a 30 y 60 cm respectivamente.

3.1.5. Muestras de Suelo Tratado con Triclosán

En la **figura VII.8** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo y muestras de suelo tratado con TCS.

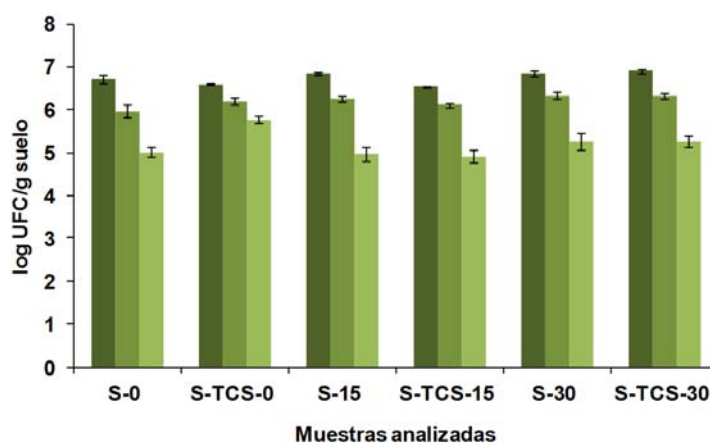


Figura VII.8. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo (S) y de muestras de suelo tratado con TCS (S-TCS) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Recolectadas en superficie.** Se puede apreciar que en las muestras control obtenidas de las parcelas experimentales (0 días) tanto de suelo sin tratar como de suelo tratado con TCS, tienen un comportamiento similar en relación al número de microorganismos heterótrofos cultivables detectados, con un resultado para las muestras de los suelos identificados como S-0 y S-TCS-0, de 6.72 ± 0.09 y 6.59 ± 0.01 , respectivamente. En relación a las muestras de suelo tratado con el compuesto se apreció que, transcurridos 15 y 30 días desde el inicio del tratamiento, no se producían variaciones significativas en el recuento (6.54 ± 0.01 y 6.90 ± 0.04 , respectivamente). Por otro lado, a lo largo del tiempo, no se observaron cambios significativos en el recuento de microorganismos en las muestras no

tratadas de superficie (S-15 y S-30) cuyos resultados fueron de 6.84 ± 0.03 y 6.86 ± 0.06 , respectivamente.

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** El comportamiento en relación al recuento de microorganismos es similar al obtenido en superficie. No obstante, los recuentos fueron significativamente inferiores a medida que aumenta la profundidad.

A 30 cm de profundidad los recuentos de todas las muestras oscilaron entre valores de 5.96 ± 0.15 (S-0) y 6.11 ± 0.04 (S-TCS-15), no observándose diferencias significativas. A tiempo inicial de ensayo el recuento microbiano de las muestras tratadas con el compuesto (S-TCB-0) fue de 6.19 ± 0.08 y el de las muestras no tratadas (S-0) fue de 5.96 ± 0.15 . No se observó aumento significativo del número de microorganismos a lo largo del tiempo siendo los recuentos a 15 y 30 días (S-TCS-15 y S-TCS-30) de 6.11 ± 0.04 y 6.33 ± 0.06 , respectivamente.

A 60 cm de profundidad los recuentos fueron significativamente inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. Se observó que en las muestras de suelo tratado con el compuesto a tiempo 15 y 30 días (S-TCS-15 y S-TCS-30), el crecimiento microbiano fue significativamente inferior (4.92 ± 0.15 y 5.27 ± 0.07) respecto al inicio del ensayo (5.77 ± 0.07 , S-TCS-0); no obstante, el recuento a los 30 días de ensayo fue ligeramente superior que a 15 días.

- **En resumen.** El valor de la media aritmética del log UFC g suelo⁻¹ de las muestras analizadas en superficie fue de 6.74 ± 0.04 , y los valores a 30 y 60 cm de profundidad, 6.19 ± 0.08 y 5.20 ± 0.13 , respectivamente. Se observó que los resultados porcentuales de log UFC g suelo⁻¹ obtenidos fueron significativamente diferentes a las distintas profundidades estudiadas y un descenso en el número de microorganismos viables a

30 y 60 cm de profundidad respecto al crecimiento en superficie fue del 8.2 % y 22.8 % respectivamente.

3.1.6. Muestras de Suelo Tratado con Triclocarbán

En la **figura VII.9** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo y muestras de suelo tratado con TCB.

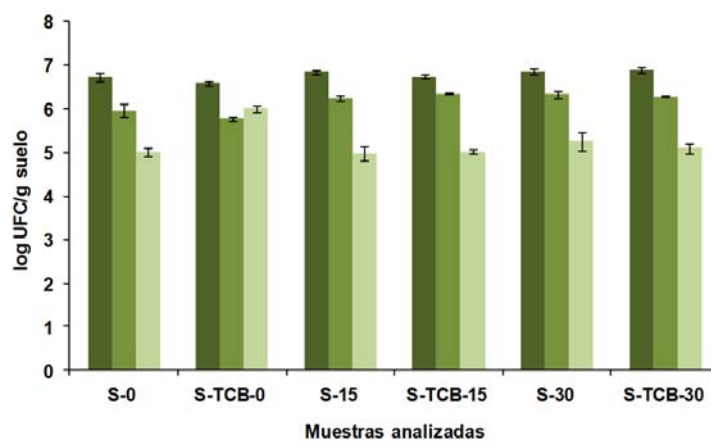


Figura VII.9. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo (S) y de muestras de suelo tratado con TCB (S-TCB) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** En relación a las muestras recolectadas de los suelos control en superficie (S-0 y S-TCB-0), los recuentos fueron muy similares, con un resultado de log UFC g suelo⁻¹ de 6.72±0.09 y 6.58±0.04. Se observa, además, que a lo largo del tiempo, no se produjeron cambios significativos en el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables de las muestras no tratadas de superficie (S-15 y S-30) cuyos resultados fueron de 6.84±0.03 y 6.86±0.06, respectivamente. En las muestras tratadas con el compuesto (S-TCB-0; S-TCB-15; S-TCB-30) se observó un leve aumento

del número de microorganismos con un resultado tras 15 y 30 días de tratamiento de 6.73 ± 0.03 y 6.88 ± 0.06 , respecto a su control correspondiente a tiempo inicial de tratamiento (6.58 ± 0.04).

- **Muestras recolectadas a 30 cm y 60 cm.** Los resultados de recuentos microbianos de los suelos a 30 y 60 cm de profundidad fueron significativamente inferiores a los obtenidos en superficie.

A 30 cm los recuentos de todas las muestras oscilaron entre valores de 5.96 ± 0.15 (S-0) y 6.35 ± 0.01 (S-TCB-15). Se aprecia que, a tiempo inicial de ensayo, el recuento de las muestras tratadas con TCB (S-TCB-0) fue ligeramente superior al de las muestras sin el compuesto (S-0), con un resultado de 5.96 ± 0.15 y 5.77 ± 0.04 , respectivamente, siendo esta tendencia similar a las muestras de superficie.

A 60 cm de profundidad, los recuentos fueron significativamente inferiores en relación a las muestras de superficie y a 30 cm. En las muestras no tratadas, a lo largo del tiempo de ensayo (S-0; S-15 y S-30), el número de microorganismos se mantuvo relativamente constante con un resultado de 5.02 ± 0.10 ; 4.97 ± 0.17 y 5.26 ± 0.20 , respectivamente. En relación a las muestras tratadas, el resultado del recuento de microorganismos a los 15 y 30 días de tratamiento fue similar (5.02 ± 0.04 y 5.09 ± 0.10), y a su vez inferior respecto a su correspondiente control (S-TCB-0) con un resultado de 5.99 ± 0.10 .

- **En resumen.** El valor de la media aritmética del log UFC g suelo⁻¹ de las muestras analizadas en superficie, a 30 y a 60 cm de profundidad fue de 6.77 ± 0.05 , 6.15 ± 0.06 y 5.23 ± 0.11 , respectivamente. Se observa que los resultados porcentuales de log UFC g suelo⁻¹ obtenidos fueron significativamente diferentes a 30 y 60 cm en relación a las muestras

de superficie (100 %), es decir, el descenso de microorganismos fue de un 9.2 % y 22.7 % para las muestras recolectadas a 30 cm y 60 cm.

3.2. Recuento de la Microbiota a Diferentes Profundidades en Suelos Tratados con Compost y con Diferentes Compuestos

3.2.1. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Metilparabeno

En la **figura VII.10** se muestran los resultados del recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelos, en presencia de compost y MPB. Los estudios se realizaron a diferentes profundidades (superficie, 30 cm y 60 cm) y tiempos (0, 15 y 30 días).

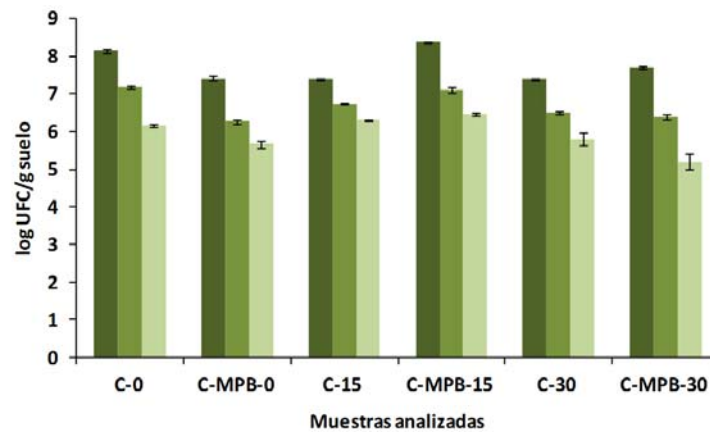


Figura VII.10. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo + compost (C), y de muestras de suelo + compost y contaminado con MPB (C-MPB) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y a 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** En las muestras obtenidas de las parcelas experimentales (0 días) de suelo tratado con compost (control), el recuento microbiano fue mayor que en las muestras de suelo adicionado con compost y el compuesto, con un resultado expresado como log UFC g suelo⁻¹ de 8.14±0.05 para el suelo control y

de 7.42 ± 0.05 para el suelo adicionado de MPB. A los 15 y 30 días de tratamiento, los suelos control (C-15 y C-30) presentaron menor número de microorganismos respecto al día inicial del ensayo, con un resultado de 7.39 ± 0.02 y 7.41 ± 0.02 , disminuyendo el número de microorganismos en 0.5 logaritmos.

Este comportamiento de la microbiota del suelo difiere del obtenido en las muestras de suelos tratados con compost + MPB donde se observa que tras 15 y 30 días de tratamiento el número de microorganismos fue de 8.37 ± 0.03 y 7.71 ± 0.04 respectivamente. Comparando con su respectivo control (C-MP-0), cuyo resultado fue de 7.42 ± 0.05 , se advierte que se produce un aumento del número de microorganismos a los 15 días de tratamiento de 1 logaritmo.

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** A estas profundidades se observa, en general, que el número de microorganismos heterótrofos cultivables es significativamente inferior al observado en la superficie, es decir, se reduce el número de UFC al aumentar la profundidad.

A 30 cm puede apreciarse que a tiempo inicial de ensayo, el recuento en las muestras de suelo tratado con compost y el compuesto, fue inferior a las muestras de suelo de la parcela sólo tratada con compost, con un resultado de 7.19 ± 0.03 (C-0) y 6.26 ± 0.04 (C-MP-0), respectivamente. Esta tendencia fue similar a las muestras obtenidas en superficie. Por otro lado, se observa un aumento en el número de microorganismos viables en las muestras de suelo tratado con el compuesto, a lo largo del tiempo. Los recuentos a 15 y 30 días para los suelos identificados como C-MPB-15 y C-MPB-30 fueron de 7.10 ± 0.06 y 6.39 ± 0.39 , apreciándose un aumento del número de microorganismos respecto al día inicial de ensayo (C-MPB-0) cuyo resultado fue de 6.26 ± 0.05 .

A 60 cm de profundidad los recuentos fueron inferiores a los obtenidos en las muestras de superficie y 30 cm. A tiempo inicial, el número de microorganismos fue ligeramente inferior en las muestras con MPB (C-MPB-0) respecto de las no contaminadas (C-0), con resultados de 5.67 ± 0.08 y 6.18 ± 0.03 , respectivamente. Se observa un aumento de 1 logaritmo en los recuentos tras 15 días de tratamiento (C-MPB-15), con un resultado de 6.47 ± 0.04 , manteniéndose constante tras los siguientes 15 días de tratamiento (C-MPB-30).

3.2.2. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Butilparabeno

En la **figura VII.11** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo con compost y muestras de suelo con compost y butilparabeno.

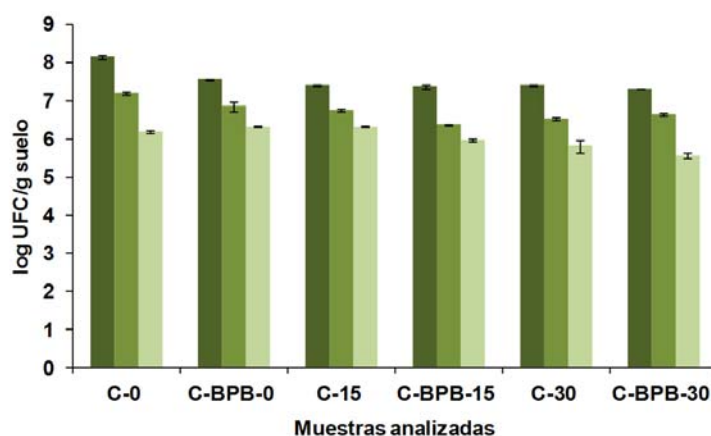


Figura VII.11. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo + compost (C), y de muestras de suelo + compost y contaminado con BPB (C-BPB) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y a 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** Se puede apreciar que en las muestras de suelo control obtenidas de las parcelas experimentales al

inicio del ensayo (0 días) tanto de suelo tratado con compost (suelo + compost), como la del suelo tratado con compost y BPB (suelo + compost + BPB), tienen un comportamiento diferente en relación al número de microorganismos detectados. En las muestras de suelo sin el compuesto (C-0) el número de microorganismos fue de 8.14 ± 0.05 , mientras en las muestras de suelo adicionado de compost y BPB el recuento microbiano fue de 7.54 ± 0.02 . Se observa, por tanto una diferencia de 0.6 logaritmos.

Por otro lado, a lo largo del tiempo, no se observaron cambios significativos en el recuento de microorganismos en las muestras tratadas con el analito, manteniéndose relativamente constante con valores de 7.36 ± 0.04 y 7.30 ± 0.01 en las muestras de suelo recogidas a los 15 y 30 días de tratamiento. Además, en las muestras de suelo adicionado de compost pero sin BPB la evolución del número de microorganismos en el tiempo, fue decreciente (C-15 y C-30) hasta alcanzar al final del ensayo un valor de 7.40 ± 0.02 .

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** La tendencia en relación al recuento de microorganismos es similar al obtenido en superficie, no obstante los recuentos fueron significativamente inferiores a medida que aumenta la profundidad.

A 30 cm los recuentos oscilaron entre valores de 6.36 ± 0.02 (C-BPB-15) y 7.19 ± 0.03 (C-0). Puede apreciarse que a tiempo inicial de ensayo el recuento de las muestras de las parcelas tratadas con compost y BPB (C-BPB) fue ligeramente inferior (0.34 logaritmos) respecto a las muestras procedentes de las parcelas tratadas con compost sin el compuesto (C-0) siendo los resultados de 6.85 ± 0.12 y 7.19 ± 0.03 respectivamente.

Por otro lado, a medida que avanza el tiempo de ensayo (15 y 30 días) los suelos compostados sin BPB presentan una tendencia decreciente en relación al número de microorganismos detectados (6.74 ± 0.02 y 6.51 ± 0.04 respectivamente), mientras que se mantiene aproximadamente constante en el caso de las muestras contaminadas con el compuesto, 6.36 ± 0.02 y 6.63 ± 0.04 , respecto al tiempo inicial de ensayo.

En las muestras de suelo analizadas a la profundidad de 60 cm, los recuentos de microorganismos fueron significativamente inferiores en relación a recolectadas en superficie y a 30 cm, con una diferencia de hasta 2 logaritmos (C-0 a 60 cm respecto a C-0 inicial).

El número de microorganismos fue relativamente similar tanto en las muestras adicionadas de BPB (C-BPB-0) como en las muestras sin el compuesto (C-0), con un resultado de 6.31 ± 0.01 y 6.18 ± 0.03 . A lo largo del tiempo de ensayo los resultados se mantuvieron relativamente constantes (15 días) (muestras con y sin analito), observándose una reducción del número de microorganismos al cabo de 30 días en las muestras con BPB (5.56 ± 0.06) de 0.7 logaritmos.

3.2.3. Muestras de Suelo con Compost Contaminado con Benzofenona 3

En la **figura VII.12** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo con compost y muestras de suelo con compost y benzofenona 3.

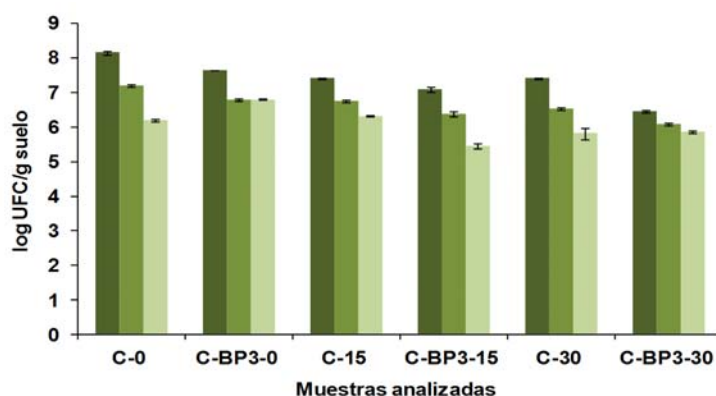


Figura VII.12. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo + compost (C), y de muestras de suelo + compost y contaminado con BP-3 (C-BP-3) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y a 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** Los recuentos realizados a partir de las muestras de suelo control a tiempo 0 días, presentaron una diferencia 0.5 logaritmos. Los resultados fueron de 8.14 ± 0.05 en el suelo adicionado sólo de compost (C-0) y de 7.62 ± 0.01 para el suelo adicionado de compost y el compuesto. La evolución del recuento a lo largo de los 30 días de ensayo en las muestras sin el compuesto fue decreciente, obteniéndose un resultado de 7.39 ± 0.02 (C-15) y 7.40 ± 0.02 (C-30). Esta tendencia también se detectó en las muestras adicionadas del compuesto siendo los recuentos de 7.07 ± 0.06 (en el suelo C-BP-3-15) y de 6.44 ± 0.04 (en el suelo C-BP-3-30).
- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** El comportamiento en relación al recuento de microorganismos es similar al obtenido en superficie, no obstante los recuentos fueron significativamente inferiores a medida que aumenta la profundidad.

A 30 cm los recuentos en el suelo adicionado únicamente de compost presentaron una tendencia decreciente desde el tiempo 0 días (C-0) hasta los 30 días, con un resultado de 7.19 ± 0.03 (C-0), 6.74 ± 0.02 (C-15) y 6.51 ± 0.04 (C-30). En relación a las muestras de suelo con compost contaminado con BP-3, los resultados fueron de 6.79 ± 0.04 (C-BP-3-0), 6.37 ± 0.07 , (C-BP-3-15) y 6.06 ± 0.03 (C-BP-3-30), indicando estos resultados una tendencia decreciente en ambos tipos de muestra.

A 60 cm de profundidad los recuentos de microorganismos heterótrofos cultivables fueron significativamente inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. Al igual que ocurre con los recuentos a 30 cm de profundidad, la tendencia del número de microorganismos a 60 cm de profundidad fue decreciente desde el tiempo 0 días hasta el final del ensayo. Los resultados en las muestras sin BP-3 fueron de 6.18 ± 0.03 (C-0), 6.30 ± 0.01 (C-15), y 5.80 ± 0.06 (C-30); en relación a las muestras adicionadas del compuesto, a esta misma profundidad, los resultados a lo largo del tiempo de ensayo fueron de 6.78 ± 0.01 (C-BP-3-0), 5.44 ± 0.08 (C-BP-3-15) y de 5.84 ± 0.06 (C-BP-3-30) observándose una reducción de 0.9 logaritmos a lo largo del tiempo de ensayo en las muestras adicionadas de BP-3.

3.2.4. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Bisfenol A

En la **figura VII.13** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo con compost y muestras de suelo con compost y BFA.

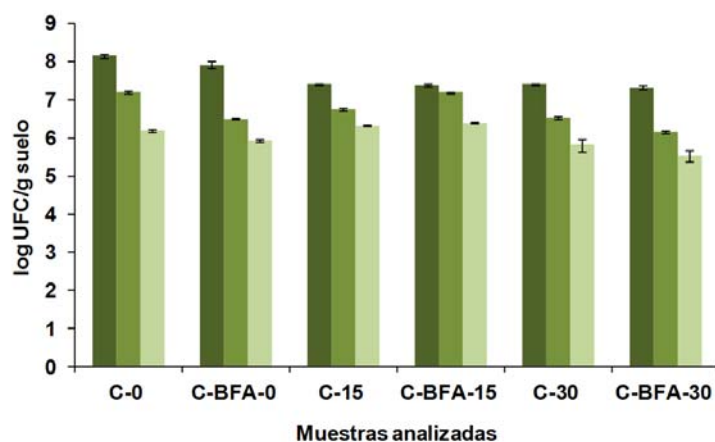


Figura VII.13. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo + compost (C), y de muestras de suelo + compost y contaminado con BFA (C-BFA) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y a 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** A tiempo 0 días, el recuento en la muestra de suelo con compost y sin BFA (C-0) fue mayor (8.14 ± 0.05) que en la de suelo con analito (7.89 ± 0.09), detectándose una diferencia de 0.7 logaritmos entre ambas muestras. La evolución en el suelo contaminado con BFA fue decreciente obteniéndose resultados de 7.89 ± 0.09 (C-BFA-0), 7.37 ± 0.03 (C-BFA-15) y 7.30 ± 0.05 (C-BFA-30) y observándose una reducción de 0.5 logaritmos en el recuento de UFC g suelo⁻¹, a lo largo del tiempo de ensayo.
- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** El comportamiento en relación al recuento de microorganismos es similar al obtenido en superficie. No obstante los recuentos fueron significativamente inferiores al aumentar la profundidad.

A 30 cm el recuento de las muestras a tiempo inicial de la parcela tratada con compost y BFA (C-BFA-0), fue inferior al de las muestras de la parcela tratada con compost sin el compuesto (C-0), observándose

una diferencia de 0.5 logaritmos en el recuento de UFC. La tendencia a lo largo del tiempo indicó que se produce un leve descenso en el número de microorganismos tras 30 días. Los resultados de desde el inicio hasta el final del ensayo en los suelos con analito fueron de 6.49 ± 0.01 (C-BFA-0), 7.17 ± 0.01 (C-BFA-15), y de 6.15 ± 0.03 (C-BFA-30).

A 60 cm de profundidad los recuentos fueron significativamente inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. En las muestras de suelo adicionado de compost y BFA (C-BFA-0), el número de microorganismos fue de 5.93 ± 0.03 , detectándose un leve aumento a los 15 días de ensayo (6.38 ± 0.03) y un decrecimiento a los 30 días (5.50 ± 0.14 , no obstante los resultados indican que no se produjeron cambios relevantes entre las muestras a tiempo inicial y tiempo final del ensayo.

3.2.5. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Triclosán

En la **figura VII.14** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo con compost y muestras de suelo con compost y TCS.

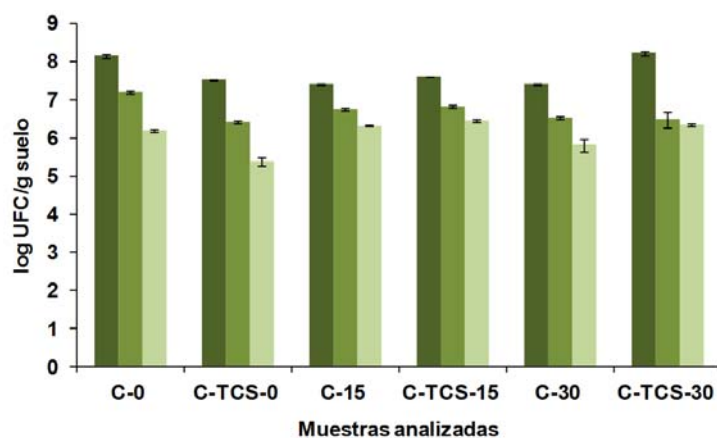


Figura VII.14. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo + compost (C), y de muestras de suelo + compost y contaminado con TCS (C-TCS) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y a 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** La tendencia en las muestras, a tiempo 0 días, del suelo adicionado de compost y TCS es similar a las muestras control de suelo sin el compuesto. Cuando se comparan los recuentos microbianos, en superficie a lo largo del tiempo, en las muestras de suelo con compost y TCS, se observa que se produce un aumento de 0.7 logaritmos en el recuento de microorganismos tras 30 días de tratamiento. Los resultados a los 0, 15 y 30 días de tratamiento son de 7.50 ± 0.02 , 7.60 ± 0.01 y 8.21 ± 0.04 , respectivamente.
- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** El comportamiento en este caso es similar al obtenido en superficie. No obstante los recuentos fueron significativamente inferiores al aumentar la profundidad.

A 30 cm no se observaron diferencias significativas en las muestras tratadas con el compuesto. Sin embargo, se apreció un ligero aumento del número de microorganismos heterótrofos cultivables viables a los

15 días de tratamiento. Los resultados obtenidos en el ensayo a 30 cm de profundidad tratados con TCS a tiempo 0, 15 y 30 días, fueron de 6.42 ± 0.04 , 6.80 ± 0.17 y 6.47 ± 0.02 , respectivamente.

A 60 cm, los recuentos de microorganismos fueron inferiores en relación a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. El número de microorganismos aumentó significativamente a los 15 y 30 días de tratamiento como se constata en los resultados obtenidos: C-TCS-0, 5.38 ± 0.11 ; C-TCS-15, 6.44 ± 0.03 y C-TCS-30, 6.33 ± 0.03 . En los primeros 15 días de tratamiento, aumenta el número de microorganismos en 1 logaritmo, y en la última quincena se mantiene constante.

3.2.6. Muestras de Suelo con Compost y Contaminado con Triclocarbán

En la **figura VII.15** se muestran los resultados obtenidos de recuento de microorganismos heterótrofos cultivables en muestras de suelo con compost y muestras de suelo con compost y TCB.

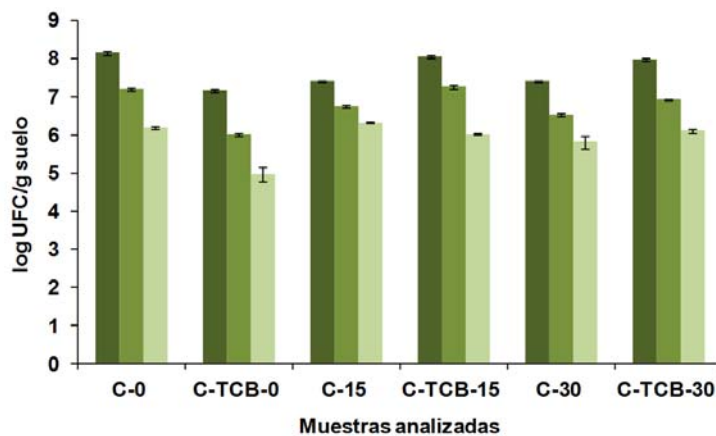


Figura VII.15. Recuento de microorganismos heterótrofos aerobios a 30°C (Log UFC g suelo⁻¹) de muestras control de suelo + compost (C), y de muestras de suelo + compost y contaminado con TCS (C-TCS) a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y a 30 días. Muestras en superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■)

- **Muestras recolectadas en superficie.** Los recuentos son inferiores significativamente en las muestras a tiempo 0 días de suelos tratados con compost y TCB (C-TCB-0) con un resultado de 7.13 ± 0.03 . Se puede apreciar una reducción en el número de microorganismos de 1 logaritmo respecto al control a tiempo 0 días sin el compuesto. La evolución microbiana en la superficie de los suelos tratados con TCB y compost indica que se produce un aumento en el número de microorganismos a medida que avanza el tiempo de ensayo. Se observa un aumento de 0.9 logaritmos tras 15 días de tratamiento, manteniéndose estable a los 30 días. Los resultados obtenidos fueron de 7.13 ± 0.04 , 8.04 ± 0.04 y 7.95 ± 0.03 para las muestras C-TCB-0; C-TCB-15 y C-TCB-30, respectivamente.

- **Muestras recolectadas a 30 y 60 cm.** Al igual que en los casos anteriores, el recuento es similar al obtenido en superficie, disminuyendo significativamente al aumentar la profundidad.

A 30 cm se observa que a tiempo inicial de ensayo el recuento de microorganismos viables en las muestras recolectadas de parcelas tratadas con compost y el TCB (C-TCB-0) fue del orden de 1.2 logaritmos inferior respecto al suelo adicionado de compost pero sin el compuesto. El resultado de la muestra C-TCB-0 fue de 6.00 ± 0.02 . Por otro lado, se observa que en el transcurso del ensayo (0 a 30 días) se produce un aumento de microorganismos del orden de 0.9 logaritmos en las muestras de suelo con compost y TCB. Los resultados obtenidos fueron de 7.24 ± 0.04 y 6.92 ± 0.02 a los 15 y 30 días respectivamente.

A 60 cm los recuentos fueron inferiores respecto a las muestras recolectadas en superficie y a 30 cm. Se observó un aumento significativo, de 1 logaritmo, al cabo de 15 días de ensayo. A partir de este tiempo, los recuentos se mantuvieron constantes. Los resultados

obtenidos fueron 4.97 ± 0.18 , 6.01 ± 0.02 y 6.10 ± 0.04 en las muestras de suelo tomadas a 0, 15 y 30 días de tratamiento, respectivamente.

- ***En resumen.*** Se observa que los resultados porcentuales de log UFC g suelo⁻¹ fueron significativamente diferentes a 30 y 60 cm en relación a las muestras de suelo de superficie (100 %). En la **tabla VII.3**, se muestra el descenso de microorganismos al aumentar la profundidad para los suelos tratados con los diferentes compuestos.

Tabla VII.3. Porcentaje de microorganismos a 30 y 60 cm en relación a los recuentos en superficie considerados como 100 %

	Porcentaje de Microorganismos (%)			Porcentaje de Microorganismos (%)	
	30 cm	60 cm		30 cm	60 cm
MPB	13.4	23.2	BFA	11.5	20.6
BPB	10.8	20.0	TCS	11.5	20.6
BP-3	10.0	17.5	TCB	11.9	23.2

4. Caracterización Morfológica de los Microorganismos Aislados y Seleccionados a Partir de las Diferentes Parcelas Estudiadas

4.1. Introducción

Una vez realizado el estudio de la evolución del número de microorganismos en las diferentes parcelas tratadas con los compuestos objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se procedió a realizar los aislamientos y selección de los microorganismos dependientes de cultivo presentes en los diferentes suelos, en medio sólido en placa (TSA). De cada tipo de suelo se realizaron 20-25 aislamientos. La selección de los microorganismos se realizó en función de criterios morfológicos de las colonias (forma, elevación, borde, tamaño y coloración) así como de criterios microscópicos (Gram, morfología, y agrupación).

Con objeto de poder obtener una información inicial acerca de los microorganismos presentes en los suelos de estudio, se realizó la tinción de Gram de los microorganismos seleccionados. Dicha tinción genera información acerca del tipo de pared celular así como de la morfología y tipo de agrupación celular. La posterior observación al microscopio permitió averiguar cuáles eran las características morfológicas básicas de los microorganismos de trabajo.

La tinción propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884 es una de las tinciones diferenciales más utilizadas en Microbiología. Esta tinción clasifica a las células bacterianas en positivas o negativas según la cantidad de peptidoglucano presente en las paredes celulares. Las bacterias Gram positivas contienen numerosas capas de peptidoglucano,

las cuales, a su vez, contienen moléculas de ácido teicóico. Las bacterias Gram positivas retienen el colorante básico (cristal violeta) complejado con yodo tras la decoloración con alcohol etílico. En las células Gram negativas el alcohol etílico es capaz de eliminar el cristal violeta de la célula bacteriana tras el proceso de tinción, así como el lipopolisacárido en caso de existir alrededor de la célula. La posterior tinción de contraste (con safranina o fuscina) permite diferenciar entre bacterias Gram positivas o negativas.

4.2. Resultados

Los microorganismos observados en los suelos tratados con el MPB fueron en su mayoría *bacilos*, cinco de ellos eran Gram positivos y dos Gram negativos. Además, se obtuvieron tres tipos de bacterias de tipo coco Gram positivo. A partir de las parcelas experimentales tratadas con BPB se aislaron los siguientes microorganismos: 4 bacilos Gram positivos, dos bacilos Gram negativos y cuatro cocos Gram positivos. En los suelos tratados con BP-3 se aislaron cinco bacilos Gram positivos, dos bacilos Gram negativos y tres cocos Gram positivos. En el caso de suelos tratados con BFA, se aislaron dos bacilos Gram positivos, cuatro bacilos Gram negativos y cuatro cocos Gram positivos. En las parcelas tratadas con TCS se obtuvieron siete bacilos, cinco de ellos Gram positivos y dos Gram negativos, además se aislaron tres cocos Gram positivos. Por último, en los suelos tratados con TCB se aislaron siete bacilos todos ellos Gram positivos y tres cocos Gram positivos.

Tabla VII.4. Características morfológicas de los microorganismos aislados en los suelos tratados con los diferentes compuestos

MPB			
Identificación	Gram	Morfología	Agrupación
MPB-1	+	Bacilo	Aislado
MPB-2	+	Bacilo	En cadena
MPB-3	+	Bacilo	En cadena
MPB-4	+	Bacilo	Aislado
MPB-5	+	Coco	En cadena
MPB-6	-	Bacilo	Aislado
MPB-7	+	Coco	En tetradas
MPB-8	-	Bacilo	En cadena
MPB-9	+	Bacilo	En cadena
MPB-10	+	Coco	En cadena
BPB			
Identificación	Gram	Morfología	Agrupación
BPB-1	-	Bacilo	Aislado
BPB-3	-	Bacilo	Aislado
BPB-4	+	Bacilo	Aislado
BPB-7	+	Bacilo	En cadena
BPB-8	+	Coco	En cadena
BPB-9	+	Coco	En cadena
BPB-11	+	Bacilo	En cadena
BPB-12	+	Bacilo	Aislado
BPB-13	+	Coco	En cadena
BPB-15	+	Coco	En tetradas
BP-3			
Identificación	Gram	Morfología	Agrupación
BP-3-1	+	Bacilo	Aislado
BP-3-5	+	Bacilo	En cadena
BP-3-7	+	Coco	En cadena
BP-3-10	+	Coco	En cadena
BP-3-11	+	Bacilo	Aislado
BP-3-14	+	Bacilo	En cadena
BP-3-16	+	Coco	en cadena
BP-3-18	-	Bacilo	Aislado
BP-3-20	-	Bacilo	Aislado
BP-3-21	+	Bacilo	aislado

Tabla VII.4 cont. Características morfológicas de los microorganismos aislados en los suelos tratados con los diferentes compuestos

BFA			
Identificación	Gram	Morfología	Agrupación
BFA-1	+	Coco	En cadena
BFA-3	+	Coco	En cadena
BFA-4	+	Bacilo	Aislado
BFA-5	-	Bacilo	Aislado
BFA-6	+	Bacilo	Aislado
BFA-8	+	Coco	En tetrada
BFA-9	-	Bacilo	Aislado
BFA-10	-	Bacilo	Aislado
BFA-11	-	Bacilo	Aislado
BFA-12	+	Coco	En cadena

TCS			
Identificación	Gram	Morfología	Agrupación
TCS-1	+	Bacilo	Aislado
TCS-2	+	Bacilo	En cadena
TCS-3	+	Bacilo	En cadena
TCS-4	+	Bacilo	Aislado
TCS-5	+	Bacilo	Aislado
TCS-6	+	Coco	En cadena
TCS-7	-	Bacilo	Aislado
TCS-8	-	Bacilo	Aislado
TCS-9	+	Coco	An cadena
TCS-10	+	Coco	En tetradas

TCB			
Identificación	Gram	Morfología	Agrupación
TCB-1	+	Bacilo	Aislado
TCB-2	+	Bacilo	Aislado
TCB-3	+	Coco	Aislado
TCB-4	+	Bacilo	En cadena
TCB-5	+	Bacilo	En cadena
TCB-6	+	Bacilo	En cadena
TCB-7	+	Bacilo	En cadena
TCB-8	+	Coco	Aislado
TCB-9	+	Coco	En cadena
TCB-10	+	Bacilo	En tetradas

5. Caracterización Bioquímica de los Microorganismos

Con objeto de determinar el comportamiento de los microorganismos en relación a su capacidad de usar diferentes sustratos como fuente de carbono y energía (C/E), así como a su capacidad enzimática, se realizaron ensayos de API 50 CH y API ZYM.

5.1. API 50 CH. Utilización de Carbohidratos como Fuente de C/E

El sistema API 50 CH es un sistema estandarizado que está compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los carbohidratos (CH) en los microorganismos. El API 50 CH se utiliza en combinación con el API 50 CHB/E Medium para la identificación de: *Lactobacillus* y microorganismos próximos, de *Bacillus* y microorganismos próximos y de las *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*.

La galería API 50 CH está compuesta por microtubos y permite el estudio de la utilización de sustratos perteneciente a la familia de los hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Los ensayos de fermentación se inoculan en API 50 CHB/E Medium que rehidrata los sustratos. Durante el periodo de incubación, la utilización de HC se traduce en un cambio de color en el microtubo, debido a una producción de ácidos en anaerobiosis (fermentación) y en aerobiosis (oxidación) revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer microtubo, sin principio activo, sirve como testigo negativo.

De los microorganismos seleccionados se realizaron estudios tanto de oxidación como de fermentación ya que esta galería permite estudiar ambas vías. La oxidación se investigó en microtubos no sellados, y la

fermentación en microtubos sellados con parafina líquida. El envase de los test consta de 10 galerías API 50 CH, 10 cámaras de inoculación, 10 hojas de resultados y una ficha técnica. La composición de la galería API 50 CH puede observarse en la **tabla VII.5**.

Tabla VII.5. Composición de la galería API 50 CH

Microtubo	Ensayo	Componentes activos	CANT. (mg cúp ⁻¹)
0		TESTIGO	-
1	GLY	Glicerol	1.64
2	ERY	Eritritol	1.44
3	DARA	D-Arabinosa	1.40
4	LARA	L-Arabinosa	1.40
5	RIB	D-Ribosa	1.40
6	DXYL	D-Xilosa	1.40
7	LXYL	L-Xilosa	1.40
8	ADO	D-Adonitol	1.36
9	MDX	Metil-β-D-xilopiranosida	1.28
Microtubo	Ensayo	Componentes activos	CANT. (mg cúp ⁻¹)
10	GAL	D-Galactosa	1.40
11	GLU	D-Glucosa	1.56
12	FRU	D-Fructosa	1.40
13	MNE	D-Manosa	1.40
14	SBE	L-Sorbosa	1.40
15	RHA	L-Rhamnosa	1.36
16	DUL	Dulcitol	1.36
17	INO	Inositol	1.40
18	MAN	D-Manitol	1.36
19	SOR	D-Sorbitol	1.36
Microtubo	Ensayo	Componentes activos	CANT. (mg cúp ⁻¹)
20	MDM	Metil-α-D-manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil-α-D-glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-Acetilglucosamina	1.28
23	AMY	Amigdalina	1.08
24	ARB	Arbutina	1.08
25	ESC	Esculina citrato férrico	1.16
26	SAL	Salicina	0.15
27	CEL	D-Celobiosa	1.04
28	MAL	D-Maltosa	1.32
29	LAC	D-Lactosa (origen bovino)	1.40

Microtubo	Ensayo	Componentes activos	CANT. (mg cúp ⁻¹)
20	MDM	Metil- α -D-manopiranosida	1.28
21	MDG	Metil- α -D-glucopiranosida	1.28
22	NAG	N-Acetilglucosamina	1.28
23	AMY	Amigdalina	1.08
24	ARB	Arbutina	1.08
25	ESC	Esculina citrato férrico	1.16
26	SAL	Salicina	0.15
27	CEL	D-Celobiosa	1.04
28	MAL	D-Maltosa	1.32
29	LAC	D-Lactosa (origen bovino)	1.40
Microtubo	Ensayo	Componentes activos	CANT. (mg cúp ⁻¹)
30	MEL	D-Melibiosa	1.32
31	SAC	D-Sacarosa	1.32
32	TRE	D-Trehalosa	1.32
33	INU	Inulina	1.28
34	MLZ	D-Melezitosa	1.32
35	RAF	D-Rafinosa	1.56
36	AMD	Almidón	1.28
37	GLYG	Glicógeno	1.28
38	XLT	Xilitol	1.40
39	GEM	Gentiobiosa	0.50
Microtubo	Ensayo	Componentes activos	CANT. (mg cúp ⁻¹)
40	TUR	D-Turanosa	1.32
41	LYX	D-Lixosa	1.40
42	TAG	D-Tagatosa	1.40
43	DFUC	D-Fucosa	1.28
44	LFUC	L-Fucosa	1.28
45	DARL	D-Arabitól	1.40
46	LARL	L-Arabitól	1.40
47	GNT	Gluconato potásico	1.84
48	2KG	2-Cetogluconato potásico	2.12
49	5KG	5-Cetogluconato potásico	1.80

Para el ensayo se empleó medio de inoculación (API 50 CHL Medium), aceite de parafina, escala McFarland Standard y agua destilada. Las galerías se conservaron a 2-8°C hasta la fecha de su utilización.

5.1.1. Microorganismos Seleccionados

En base a los resultados de degradación de los diferentes compuestos, es decir, aquellos que acusaron mayor degradación, se seleccionaron cinco microorganismos aislados del suelo, codificados como MPB-8, BPB-3, BP-3-5, BFA-4 y TCB-4. No se realizaron ensayos con los microorganismos aislados a partir de las parcelas tratadas con TCS, ya que no se observó degradación de este compuesto a la concentración seleccionada (5 mg L^{-1}).

5.1.2. Preparación de las Galerías API 50 CH

Cada galería consta de cinco filas con 10 microtubos numerados. Se prepararon de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

5.1.3. Inoculación de las Galerías API 50 CH

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos frescos de 24 h en TSA de cada microorganismo seleccionado. A partir de los cultivos en TSA se prepararon las suspensiones en medio API 50 CHB/E (2 g de sulfato amónico, 0.5 g de extracto de levadura, 1 g de triptona, 3.22 g de fosfato disódico, 0.12 g de fosfato monopotásico, 10 mL de solución de oligoelementos, 0.17 g de rojo fenol y 1 L agua desionizada). Las suspensiones fueron homogeneizadas y utilizadas de inmediato.

- **Inoculación:** La suspensión bacteriana (inóculo) se distribuyó en los 50 microtubos de las galerías API 50 CH. En el ensayo de fermentación se cubrió la parte superior de los alveolos con aceite de parafina. Como control se usó el primer microtubo, sin principio activo el cual se identificó como testigo negativo en los ensayos.
- **Incubación:** Las galerías se incubaron 24 h a 28-30°C.

5.1.4. Resultados

Los microorganismos tienen la capacidad de utilizar diversas sustancias como fuente de carbono y energía en sus procesos metabólicos. Durante el periodo de incubación la oxidación se puso de manifiesto mediante un cambio de color en los microtubos (en presencia de un indicador de pH), debido a la producción de ácidos en aerobiosis. El proceso de fermentación se puso de manifiesto mediante el crecimiento del microorganismo en los microtubos sellados con parafina, mediante el viraje de color de rojo a amarillo (presencia de ácidos consecuencia del metabolismo de los carbohidratos).

A. Asimilación de CH del microorganismo MPB-8. En las **figuras VII.16 y VII.17** se observa el cambio de color ocurrido a las 24 h y 48 h de incubación, debido al proceso de oxidación y de fermentación del microorganismo identificado como MPB-8.



Figura VII.16. Proceso oxidativo del microorganismo MPB-8: cambio de color en los microtubos API 50 CH (de rojo a amarillo) durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h



Figura VII.17. Proceso fermentativo del microorganismo MPB-8: cambio de color en los microtubos API 50 CH (de rojo a amarillo) durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h

En la **tabla VII.6** se muestran los resultados de asimilación de CH del microorganismo identificado como MPB-8.

Tabla VII.6. Asimilación de CH del microorganismo MPB-8 mediante procesos de oxidación y fermentación

MPB-8						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
0	TESTIGO		-	-	-	-
1	Glicerol	GLY	+	+	+	+
2	Eritritol	ERY	+	+	-	-
3	D-Arabinosa	DARA	+	+	+	+
4	L-Arabinosa	LARA	+	+	+	+
5	D-Ribosa	RIB	+	+	+	+
6	D-Xilosa	DXYL	+	+	+	+
7	L-Xilosa	LXYL	-	-	-	-
8	D-Adonitol	ADO	-	-	-	-
9	Metil-β-D-xilopiranosida	MDX	-	-	-	-
10	D-Galactosa	GAL	+	+	+	+
11	D-Glucosa	GLU	+	+	+	+
12	D-Fructosa	FRU	+	+	+	+
13	D-Manosa	MNE	+	+	+	+
14	L-Sorbosa	SBE	-	-	-	-
15	L-Rhamnosa	RHA	+	+	+	+
16	Dulcitol	DUL	-	-	-	-
17	Inositol	INO	-	-	-	-
18	D-Manitol	MAN	+	+	+	+
19	D-Sorbitol	SOR	+	+	+	+
20	Metil-α-D-manopiranosida	MDM	-	-	-	-
21	Metil-α-D-glucopiranosida	MDG	+	+	+	+
22	N-Acetilglucosamina	NAG	-	-	+	+
23	Amigdalina	AMY	-	-	-	-
24	Arbutina	ARB	+	+	+	+
25	Esculina citrato férrico	ESC	-	-	-	-
26	Salicina	SAL	+	+	-	-
27	D-Celobiosa	CEL	+	-	+	+
28	D-Maltosa	MAL	+	-	+	+
29	D-Lactosa (origen bovino)	LAC	+	-	+	+
30	D-Melibiosa	MEL	+	-	+	+
31	D-Sacarosa	SAC	+	-	+	+
32	D-Trehalosa	TRE	+	-	+	+
33	Inulina	INU	-	-	-	-

Tabla VII.6 cont. Asimilación de CH del microorganismo identificado como MPB-8 mediante procesos de oxidación y fermentación

MPB-8						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
34	D-Melezitosa	MLZ	-	-	-	-
35	D-Rafinosa	RAF	+	-	+	+
36	Almidón	AMD	+	-	-	-
37	Glicógeno	GLYG	+	-	-	-
38	Xilitol	XLT	+	-	-	-
39	Gentiobiosa	GEM	-	-	+	+
40	D-Turanosa	TUR	-	-	-	-
41	D-Lixosa	LYX	-	-	-	-
42	D-Tagatosa	TAG	-	-	-	-
43	D-Fucosa	DFUC	-	-	-	-
44	L-Fucosa	LFUC	+	+	+	+
45	D-Arabitól	DARL	-	-	-	-
46	L-Arabitól	LARL	-	-	-	-
47	Gluconato potásico	GNT	-	-	-	-
48	2-Cetogluconato potásico	2KG	-	-	+	+
49	5-Cetogluconato potásico	5KG	-	-	-	-

El microorganismo MPB-8 utiliza un 55 % de sustratos como fuente de C/E mediante el proceso oxidativo, y un 39 % mediante el proceso fermentativo. Los carbohidratos utilizados en proceso oxidativo fueron: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-rhamnosa, D-manitol, D-sorbitol, metil- α D-glucopiranosida, arbutina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa (origen bovino), D-melibiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-rafinosa, almidón, glicógeno, silitol y L-fucosa, no utilizando el resto de carbohidratos de la batería (resultado negativo). Los carbohidratos utilizados en proceso fermentativo fueron: glicerol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-manitol, D-sorbitol, metil- α D-glucopiranosida, N-acetilglucosamina, arbutina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa (origen bovino), D-melibiosa,

D-sacarosa, D-trehalosa, D-rafinosa, gentiobiosa y el 2-cetogluconato potásico, no utilizando el resto de hidratos de carbono.

B. Asimilación de CH del Microorganismo BPB-3. En las **figuras VII.18** y **VII.19** se observa el cambio de color ocurrido a las 24 h y 48 h de incubación, debido al proceso de oxidación y de fermentación del microorganismo identificado como BPB-3.



Figura VII.18. Proceso oxidativo del microorganismo BPB-3 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h



Figura VII.19. Proceso fermentativo del microorganismo BPB-3 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h

En la **tabla VII.7** se muestran los resultados de asimilación de CH del microorganismo BPB-3.

Tabla VII.7. Asimilación de CH del microorganismo identificado como BPB-3 mediante procesos de oxidación y fermentación

BPB-3						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
0	TESTIGO		-	-	-	-
1	Glicerol	GLY	-	-	-	-
2	Eritritol	ERY	-	-	-	-
3	D-Arabinosa	DARA	-	-	-	-
4	L-Arabinosa	LARA	-	-	-	-
5	D-Ribosa	RIB	-	-	-	-
6	D-Xilosa	DXYL	-	-	-	-
7	L-Xilosa	LXYL	-	-	-	-
8	D-Adonitol	ADO	-	-	-	-
9	Metil-β-D-xilopiranosida	MDX	-	-	-	-
10	D-Galactosa	GAL	-	-	-	-
11	D-Glucosa	GLU	-	-	-	-
12	D-Fructosa	FRU	-	-	-	-
13	D-Manosa	MNE	-	-	-	-
14	L-Sorbosa	SBE	-	-	-	-
15	L-Rhamnosa	RHA	-	-	-	-
16	Dulcitol	DUL	-	-	-	-
17	Inositol	INO	-	-	-	-
18	D-Manitol	MAN	-	-	-	-
19	D-Sorbitol	SOR	-	-	-	-
20	Metil-α-D-manopiranosida	MDM	-	-	-	-
21	Metil-α-D-glucopiranosida	MDG	-	-	-	-
22	N-Acetilglucosamina	NAG	-	-	-	-
23	Amigdalina	AMY	-	-	-	-
24	Arbutina	ARB	-	-	-	-
25	Esculina citrato férrico	ESC	+	+	-	-
26	Salicina	SAL	-	-	-	-
27	D-Celobiosa	CEL	-	-	-	-
28	D-Maltosa	MAL	-	-	-	-
29	D-Lactosa (origen bovino)	LAC	-	-	-	-
30	D-Melibiosa	MEL	-	-	-	-
31	D-Sacarosa	SAC	-	-	-	-
32	D-Trehalosa	TRE	-	-	-	-
33	Inulina	INU	-	-	-	-

Tabla VII.7 cont. Asimilación de CH del microorganismo identificado como BPB-3 mediante procesos de oxidación y fermentación

BPB-3						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
34	D-Melezitosa	MLZ	-	-	-	-
35	D-Rafinosa	RAF	-	-	-	-
36	Almidón	AMD	-	-	-	-
37	Glicógeno	GLYG	-	-	-	-
38	Xilitol	XLT	-	-	-	-
39	Gentiobiosa	GEM	-	-	-	-
40	D-Turanosa	TUR	-	-	-	-
41	D-Lixosa	LYX	-	-	-	-
42	D-Tagatosa	TAG	-	-	-	-
43	D-Fucosa	DFUC	-	-	-	-
44	L-Fucosa	LFUC	-	-	-	-
45	D-Arabitól	DARL	-	-	-	-
46	L-Arabitól	LARL	-	-	-	-
47	Gluconato potásico	GNT	-	-	-	-
48	2-Cetogluconato potásico	2KG	-	-	-	-
49	5-Cetogluconato potásico	5KG	-	-	-	-

En el ensayo de oxidación de BPB-3 se observa que el microorganismo solo utiliza una fuente de carbono (esculina citrato férrico) apreciándose color negro en el microtubo (resultado positivo). El resultado para el resto de carbohidratos fue negativo, observándose ausencia de cambio de color respecto al microtubo testigo. De igual forma, los resultados del ensayo fermentativo fueron todos negativos para este microorganismo.

C. Asimilación de CH del microorganismo BP-3-5. En las **figuras VII.20** y **VII.21** se observa el cambio de color ocurrido a las 24 h y 48 h de incubación, debido al proceso de oxidación y de fermentación del microorganismo identificado como BP-3-5.



Figura VII.20. Proceso oxidativo del microorganismo BP-3-5 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h



Figura VII.21. Proceso fermentativo del microorganismo BP-3-5 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h

En la **tabla VII.8** se muestran los resultados de asimilación de CH del microorganismo BP-3-5.

Tabla VII.8. Asimilación de CH del microorganismo BP-3-5 mediante procesos de oxidación y fermentación

BP-3-5						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
0	TESTIGO		-	-	-	-
1	Glicerol	GLY	-	-	-	-
2	Eritritol	ERY	-	-	-	-
3	D-Arabinosa	DARA	-	-	-	-
4	L-Arabinosa	LARA	-	-	+	+
5	D-Ribosa	RIB	-	-	+	+
6	D-Xilosa	DXYL	-	-	+	+
7	L-Xilosa	LXYL	-	-	-	-
8	D-Adonitol	ADO	-	-	-	-
9	Metil- β -D-xilopiranosida	MDX	-	-	-	-
10	D-Galactosa	GAL	+	+	-	-
11	D-Glucosa	GLU	+	+	+	+
12	D-Fructosa	FRU	+	+	+	+
13	D-Manosa	MNE	-	-	+	+
14	L-Sorbosa	SBE	-	-	-	-
15	L-Rhamnosa	RHA	-	-	-	-
16	Dulcitol	DUL	-	-	-	-
17	Inositol	INO	-	-	-	-
18	D-Manitol	MAN	-	-	+	+
19	D-Sorbitol	SOR	-	-	-	-
20	Metil- α -D-manopiranosida	MDM	-	-	-	-
21	Metil- α -D-glucopiranosida	MDG	-	-	-	-
22	N-Acetilglucosamina	NAG	-	-	+	+
23	Amigdalina	AMY	+	+	+	+
24	Arbutina	ARB	-	-	+	+
25	Esculina citrato férrico	ESC	+	+	+	+
26	Salicina	SAL	-	-	+	+
27	D-Celobiosa	CEL	-	-	+	+
28	D-Maltosa	MAL	-	-	-	-
29	D-Lactosa (origen bovino)	LAC	-	-	-	-
30	D-Melibiosa	MEL	-	-	-	-
31	D-Sacarosa	SAC	+	+	+	+
32	D-Trehalosa	TRE	-	-	+	+
33	Inulina	INU	-	-	-	-

Tabla VII.8 cont. Asimilación de CH del microorganismo BP-3-5 mediante procesos de oxidación y fermentación

BP-3-5						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
34	D-Melezitosa	MLZ	-	-	-	-
35	D-Rafinosa	RAF	-	-	-	-
36	Almidón	AMD	-	-	-	-
37	Glicógeno	GLYG	-	-	-	-
38	Xilitol	XLT	-	-	-	-
39	Gentiobiosa	GEM	-	-	+	+
40	D-Turanosa	TUR	-	-	-	-
41	D-Lixosa	LYX	-	-	-	-
42	D-Tagatosa	TAG	-	-	+	+
43	D-Fucosa	DFUC	-	-	-	-
44	L-Fucosa	LFUC	-	-	-	-
45	D-Arabitól	DARL	-	-	-	-
46	L-Arabitól	LARL	-	-	-	-
47	Gluconato potásico	GNT	-	-	-	-
48	2-Cetogluconato potásico	2KG	-	-	-	-
49	5-Cetogluconato potásico	5KG	-	-	-	-

Al igual que los ensayos anteriores, la interpretación de los resultados se basó en la coloración desarrollada en cada uno de los microtubos. En el ensayo de oxidación se observa que el microorganismo BP-3-5 utiliza el 12 % de los sustratos como fuente de C/E (6 carbohidratos positivos), y en el proceso fermentativo utiliza un 35 % de los sustratos. Los carbohidratos utilizados en el proceso oxidativo fueron: D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, amigdalina, esculina citrato férrico y la D-sacarosa mientras que el resto de carbohidratos no fueron asimilados. En el ensayo de fermentación este microorganismo utilizó los siguientes carbohidratos como fuente de C/E: L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, N-acetilglucosamina, arbutina, esculina citrato férrico, salicina, D-celobiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, gentiobiosa, D-tagatosa, no utilizando el resto.

D. Asimilación de CH del Microorganismo BFA-4. En las **figuras VII.22 y VII.23** se muestra el cambio de color ocurrido a las 24 h y 48 h de incubación, debido al proceso de oxidación y de fermentación del microorganismo identificado como BFA-4.



Figura VII.22. Proceso oxidativo del microorganismo BFA-4 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h



Figura VII.23. Proceso fermentativo del microorganismo BFA-4: cambio de color en los microtubos API 50 CH (de rojo a amarillo) durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h

En la **tabla VII.9** se muestran los resultados de asimilación de CH del microorganismo BFA-4.

Tabla VII.9. Asimilación de CH del microorganismo identificado como BFA-4 mediante procesos de oxidación y fermentación

BFA-4						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
0	TESTIGO		-	-	-	-
1	Glicerol	GLY	-	-	-	-
2	Eritritol	ERY	-	-	-	-
3	D-Arabinosa	DARA	-	-	-	-
4	L-Arabinosa	LARA	-	-	-	-
5	D-Ribosa	RIB	-	-	-	-
6	D-Xilosa	DXYL	-	-	-	-
7	L-Xilosa	LXYL	-	-	-	-
8	D-Adonitol	ADO	-	-	-	-
9	Metil-β-D-xilopiranosida	MDX	-	-	-	-
10	D-Galactosa	GAL	-	-	-	-
11	D-Glucosa	GLU	-	-	-	-
12	D-Fructosa	FRU	-	-	-	-
13	D-Manosa	MNE	-	-	-	-
14	L-Sorbosa	SBE	-	-	-	-
15	L-Rhamnosa	RHA	-	-	-	-
16	Dulcitol	DUL	-	-	-	-
17	Inositol	INO	-	-	-	-
18	D-Manitol	MAN	-	-	-	-
19	D-Sorbitol	SOR	-	-	-	-
20	Metil-α-D-manopiranosida	MDM	-	-	-	-
21	Metil-α-D-glucopiranosida	MDG	-	-	-	-
22	N-Acetilglucosamina	NAG	-	-	-	-
23	Amigdalina	AMY	-	-	-	-
24	Arbutina	ARB	-	-	-	-
25	Esculina citrato férrico	ESC	-	-	-	-
26	Salicina	SAL	-	-	-	-
27	D-Celobiosa	CEL	-	-	-	-
28	D-Maltosa	MAL	-	-	-	-
29	D-Lactosa (origen bovino)	LAC	+	-	-	-
30	D-Melibiosa	MEL	+	-	-	-
31	D-Sacarosa	SAC	-	-	-	-
32	D-Trehalosa	TRE	+	-	-	-
33	Inulina	INU	-	-	-	-

Tabla VII.9 cont. Asimilación de CH del microorganismo identificado como BFA-4 mediante procesos de oxidación y fermentación

BFA-4						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
34	D-Melezitosa	MLZ	-	-	-	-
35	D-Rafinosa	RAF	-	-	-	-
36	Almidón	AMD	-	-	-	-
37	Glicógeno	GLYG	-	-	-	-
38	Xilitol	XLT	-	-	-	-
39	Gentiobiosa	GEM	-	-	-	-
40	D-Turanosa	TUR	-	-	-	-
41	D-Lixosa	LYX	-	-	-	-
42	D-Tagatosa	TAG	-	-	-	-
43	D-Fucosa	DFUC	-	-	-	-
44	L-Fucosa	LFUC	-	-	-	-
45	D-Arabitól	DARL	-	-	-	-
46	L-Arabitól	LARL	-	-	-	-
47	Gluconato potásico	GNT	-	-	-	-
48	2-Cetogluconato potásico	2KG	-	-	-	-
49	5-Cetogluconato potásico	5KG	-	-	-	-

En el ensayo de oxidación se puede observar utiliza únicamente 3 sustratos como fuente de C/E durante las primeras 24 h, D-lactosa (de origen bovino), D-melibiosa, D-trehalosa, tras 48 h se aprecia viraje a rojo del indicador lo que indica desaparición de ácidos (responsables del color amarillo) en el microtubo. En el ensayo de fermentación no se observó ningún resultado positivo, lo que indica que este microorganismo no puede asimilar ninguno de los carbohidratos del ensayo en anaerobiosis.

E. Asimilación de CH del Microorganismo TCB-7. En las **figuras VII.24 y VII.25** se puede observar el cambio de color ocurrido a las 24 y 48 h de incubación, debido al proceso de oxidación y de fermentación del microorganismo identificado como TCB-7.



Figura VII.24. Proceso oxidativo del microorganismo TCB-7 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h



Figura VII.25. Proceso fermentativo del microorganismo TCB-7 mediante API 50 CH durante un periodo de incubación de 24 h y 48 h

En la **tabla VII.10** se muestran los resultados de asimilación de CH del microorganismo TCB-7.

Tabla VII.10. Asimilación de CH del microorganismo identificado como TCB-7 mediante procesos de oxidación y fermentación

TCB-7						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
0	TESTIGO		-	-	-	-
1	Glicerol	GLY	-	-	-	-
2	Eritritol	ERY	-	-	-	-
3	D-Arabinosa	DARA	-	-	-	-
4	L-Arabinosa	LARA	-	-	-	-
5	D-Ribosa	RIB	-	-	+	+
6	D-Xilosa	DXYL	-	-	-	-
7	L-Xilosa	LXYL	-	-	-	-
8	D-Adonitol	ADO	-	-	-	-
9	Metil-β-D-xilopiranosida	MDX	-	-	-	-
10	D-Galactosa	GAL	+	+	+	+
11	D-Glucosa	GLU	+	+	+	+
12	D-Fructosa	FRU	+	+	+	+
13	D-Manosa	MNE	-	-	-	-
14	L-Sorbosa	SBE	-	-	-	-
15	L-Rhamnosa	RHA	-	-	-	-
16	Dulcitol	DUL	-	-	-	-
17	Inositol	INO	-	-	-	-
18	D-Manitol	MAN	-	-	-	-
19	D-Sorbitol	SOR	-	-	-	-
20	Metil-α-D-manopiranosida	MDM	-	-	-	-
21	Metil-α-D-glucopiranosida	MDG	-	-	-	-
22	N-Acetilglucosamina	NAG	+	+	+	+
23	Amigdalina	AMY	-	-	+	+
24	Arbutina	ARB	+	+	+	+
25	Esculina citrato férrico	ESC	+	+	+	+
26	Salicina	SAL	+	+	+	+
27	D-Celobiosa	CEL	+	+	+	+
28	D-Maltosa	MAL	+	+	+	+
29	D-Lactosa (origen bovino)	LAC	-	-	-	-
30	D-Melibiosa	MEL	-	-	-	-
31	D-Sacarosa	SAC	+	+	+	+
32	D-Trehalosa	TRE	+	+	+	+
33	Inulina	INU	-	-	-	-

Tabla VII.10 cont. Asimilación de CH del microorganismo identificado como TCB-7 mediante procesos de oxidación y fermentación

TCB-7						
Microtubos	Componentes activos	Ensayo	Oxidación		Fermentación	
			24 h	48 h	24 h	48 h
34	D-Melezitosa	MLZ	-	-	-	-
35	D-Rafinosa	RAF	-	-	-	-
36	Almidón	AMD	+	+	+	+
37	Glicógeno	GLYG	+	+	+	+
38	Xilitol	XLT	-	-	-	-
39	Gentiobiosa	GEM	-	-	-	-
40	D-Turanosa	TUR	-	-	-	-
41	D-Lixosa	LYX	-	-	-	-
42	D-Tagatosa	TAG	-	-	-	-
43	D-Fucosa	DFUC	-	-	-	-
44	L-Fucosa	LFUC	-	-	-	-
45	D-Arabitól	DARL	-	-	-	-
46	L-Arabitól	LARL	-	-	-	-
47	Gluconato potásico	GNT	-	-	+	+
48	2-Cetogluconato potásico	2KG	-	-	-	-
49	5-Cetogluconato potásico	5KG	-	-	-	-

En el ensayo de oxidación se puede observar que el microorganismo identificado como TCB-7 utiliza el 22 % de los sustratos como fuente de C/E: D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, N-acetilglucosamina, arbutina, esculina citrato férrico, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, almidón y glicógeno. En el proceso de fermentación, este microorganismo utiliza el 33 % de los sustratos como fuente de C/E: D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, N-acetilglucosamina, amígdalina, arbutina, esculina citrato férrico, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, almidón, glicógeno y gluconato potásico.

5.2. API ZYM: Determinación de Actividades Enzimáticas

La importancia que hoy en día está adquiriendo la determinación de la actividad microbiana de suelos, mediante parámetros bioquímicos tales como la actividad enzimática, es cada vez mayor en los estudios avanzados de la *Ciencia del Suelo*, puesto que sin su ayuda sería imposible llegar a entender la funcionalidad de dicho suelo, su medida dará idea de su actividad metabólica, y esto es esencial para que ese suelo realice sus funciones de manera correcta^{164,165}.

En los ensayos desarrollados en la presente Tesis Doctoral, se determinó la presencia de enzimas en los microorganismos seleccionados mediante el API ZYM. A continuación se describen brevemente los enzimas involucrados en los ensayos bioquímicos del API ZYM.

- La mineralización del fósforo orgánico se mide mediante las ***fosfatasas*** (fosfatasas ácidas y alcalinas). Estas pueden ser sintetizadas, tanto por las raíces de las plantas, las cuales producen fosfatasas ácidas^{166,167}, como por la flora micótica y las bacterias capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas^{168,169}. Aunque gran parte de la actividad mineralizadora del fósforo orgánico es atribuida a las micorrizas^{170,171}

¹⁶⁴ Burns, R.G. Enzyme activity in soil: Location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14 (1982) 423-427.

¹⁶⁵ Dick, W.A., Tabatabai, M.A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: F.B. Metting Jr. (Ed): *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker Inc., New York, (1993) 95-127.

¹⁶⁶ Ridge, E.H., Rovira, A.D. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. *New Phytologist* 70 (1971) 1017-1026.

¹⁶⁷ Dinkelaker, B., Marschner H. In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil grown plants. *Plant Soil* 144 (1992) 199-205.

¹⁶⁸ Dighton, J. Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 71 (1983) 455-462.

¹⁶⁹ Tarafdar, J.C., Rao, A.V., Bala, K. Production of phosphatase by fungi isolated from desert soils. *Folia Microbiologica* 33 (1988) 453-457.

¹⁷⁰ Ho, I., Zak, B. Acid Phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 57 (1979) 1203-1205.

se ha descrito que, que los microorganismos involucrados en procesos de descomposición, también son capaces de producir fosfatasa¹⁷². Por lo que el papel potencial de los enzimas producidos por estos organismos en la mineralización de compuestos orgánicos de fósforo es de gran importancia ecológica¹⁷³.

- **Esterasas**: hidrolizan los ésteres orgánicos y liberan el alcohol (naftol), el cual se acopla a una sal diazoica para formar un azocolorante que se deposita sobre el sitio de actividad enzimática¹⁷⁴. Existen diferentes variedades según el sustrato empleado, en nuestro ensayo el sustrato utilizado para la esterasa C4 fue el 2-naftilbutirato y para la esterasa lipasa (C 8) el sustrato fue de 2-naftilcaprilato.

- La función principal de las **lipasas** es la de catalizar la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos libres¹⁷⁵. Las lipasas se encuentran en gran variedad de seres vivos. En microorganismos, se encuentran presentes en los procesos de la digestión de las grasas, la reconstitución del organismo y el metabolismo lipoproteico¹⁷⁶.

¹⁷¹ Antibius, R.K., Sinsabugh, R.L., Linkins, A.E. Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 70 (1992) 794-800.

¹⁷² Joner, E.J., Johansen, A. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 104 (2000) 81-86.

¹⁷³ Dighton, J. Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 71(1983) 455-462.

¹⁷⁴ Park, N.J., Kamble, S.T. Decapitation impacting effect of topically applied chlorpyrifos on acetylcholinesterase and general esterases in susceptible and resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 94 (2001) 499-505.

¹⁷⁵ Berner, D. L., Hammond, E. G. Phylogeny of lipase specificity. *Lipids* 5 (1970) 558-562.

¹⁷⁶ Bertolini, M.C., Schrag, J.D., Cygler, M., Ziomek, E., Thomas, D.Y., Vernet, T. Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene. Comparison of specificity profile with lipase II. *European Journal of Biochemistry* 228 (1995) 863-869.

- **Leucina arilamidasa:** es un enzima que descompone el aminoácido leucina en acetilacetato y acetil-CoA este proceso es muy común en bacilos Gram negativos¹⁷⁷.

- **Valina arilamidasa:** Están estructural y funcionalmente relacionadas con las **glutamato deshidrogenasas**, **fenilalanina deshidrogenasa** y **leucina deshidrogenasa**¹⁷⁹.

- **Cistina arilamidasa:** es un enzima que cataliza la reacción L-cisteína con el NAD obteniendo como producto L-cistina + NADH + H⁺. Pertenece a la familia de las oxidoreductasas, y más específicamente a aquellas que actúan sobre un grupo de azufre de los donantes con NAD⁺ o NADP⁺ como aceptor de electrones. Este enzima participa en el metabolismo de la cisteína^{178,179}.

- **Tripsina:** es un enzima del tipo peptidasas, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Las tripsinas activadas a su vez activan más tripsinógeno (autocatálisis) y al resto en enzimas, de manera que sólo una pequeña cantidad de enteropeptidasa (enteroquinasa) es necesaria para comenzar la reacción¹⁸⁰.

¹⁷⁷ Combaret, L. Human Nutrition Research Centre of Clermont-Ferrand. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *Journal of Physiology* 569 (2008) 489-499.

¹⁷⁸ Combaret, L. Human Nutrition Research Centre of Clermont-Ferrand. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *Journal of Physiology* 569 (2008) 489-499.

¹⁷⁹ Rosenthal, J. Department of Medicine, University of Toronto, Toronto, Canada. "Metabolic fate of leucine: A significant sterol precursor in adipose tissue and muscle". *American Journal of Physiology* 226 (2008) 411-418.

¹⁸⁰ Alberts, B. Biología molecular de la célula. En: *Biología molecular de la célula*, Alberts B. (2010)73-75.

- **Quimotripsina:** es un enzima proteolítico que, conjuntamente con tripsina degrada las proteínas a polipéptidos y aminoácidos¹⁸¹.
- **α -Galactosidasa:** es un enzima del tipo hidrolasa que hidroliza los restos terminales α -galactosilo de glicolípidos y glicoproteínas. Está codificado por el gen GLA. Este enzima es una glicoproteína homodimérica que hidroliza los restos terminales α -galactosilo de glicolípidos y glicoproteínas. Especialmente hidroliza el trihexósido de ceramida, y que puede catalizar la hidrólisis de melibiosa a galactosa y glucosa¹⁸².
- **β -Galactosidasa:** es un enzima del tipo hidrolasa que cataliza la hidrólisis de galactósidos en monosacáridos. En *E. coli*, el gen de la galactosidasa (*lacZ*) está presente como parte del sistema inducible "operón lac" que se activa en presencia de lactosa cuando el nivel de glucosa es bajo¹⁸².
- **β -Glucuronidasa:** es un enzima producido por ciertas bacterias, que cataliza la escisión de los β -glucurónidos. Puesto que las plantas generalmente no presentan esta actividad, el gen bacteriano que lo codifica se ha utilizado de forma generalizada como gen indicador en transgénesis de plantas¹⁸³.

¹⁸¹ Jeremy, M., Berg, John, L., Tymoczko, Lubert Stryer. *Biochemistry (5th ed.)*. New York: Freeman (2002) 4684-4690.

¹⁸² Dimri, G.P., Lee, X, Basile, G, Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1995) 9363-9367.

¹⁸³ Jiménez, J.A., Harold, S., Cole, Rafael, A., Camerini-Dávalos. Aumento de la actividad de la beta-glucuronidasa del suero en la diabetes química. *Acta diabetologia latina* 6 (1969) 523-533.

- **Glucosidasas:** (también conocidas como glucósido hidrolasas) catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos para generar glúcidos menores. Son enzimas muy comunes con papeles importantes en la naturaleza como en la degradación de biomasa, como celulosa y hemicelulosa, en la defensa contra las bacterias, en mecanismos de patogénesis y en el normal funcionamiento celular. Junto a las glucotransferasas, las glucosidasas forman la mayor maquinaria catalítica para la síntesis y rotura de enlaces glucosídicos^{184,185}.

- **N-acetil-β-D-glucosaminidasa:** (NAG) es un enzima que cataliza la hidrólisis de residuos terminales, no reductores, de 2-acetamido-2-desoxi-β-glucosa en la quitobiosis y análogos mayores, así como en glicoproteínas. Ha sido ampliamente usada en estudios estructurales de las paredes celulares bacterianas y en estudios de enfermedades tales como la mucopolipidosis y varios trastornos inflamatorios del tejido muscular y conjuntivo^{186,187}.

- **α-Manosidasa:** es un enzima que cataliza la hidrólisis de residuos terminales, no reducibles α-D-manosa en α-D-manosidas. Este enzima desempeña un papel importante en el proceso de formación de nuevos N-glicanos y en la degradación de glicoproteínas maduras^{188,189}.

¹⁸⁴ Gräbnitz, F., Rücknagel, K.P., Seiss, M., Staudenbauer, W.L. Nucleotide sequence of the *Clostridium thermocellum* bgIB gene encoding thermostable α-glucosidase B: homology to fungal β-glucosidasas. *Molecular and general genetics* 217 (1989) 70-76.

¹⁸⁵ Hong, M.R., Kim, Y.S., Park, C.S., Lee, J.K., Kim, Y.S., Oh, D.K. Characterization of a recombinant α-glucosidase from the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioscience and Bioengineering* 17 (2009) 36-40.

¹⁸⁶ Gallo, J.L. Actividad urinaria del N-acetil-beta-glucosaminidasa (NAG) durante la gestación normal 56 (2001) 349-50.

¹⁸⁷ Tanaka, K., Nakano, T., Noguchi, S., Pigman, W. Purification of alpha-L-fucosidase of abalone livers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126 (1968) 624-33.

¹⁸⁸ Winchester, B. "Role of α-D-mannosidasas in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins". *Biochemical Society Transactions* 12 (1984) 522-524.

- ***α -Fucosidasa***: este enzima pertenece a la familia de las hidroselasas, específicamente las glicosidasas capaz de hidrolizar la S-glicosil. Además, participa en la degradación de N-glicanos¹⁹⁰.

Los ensayos bioquímicos del API ZYM son pruebas simples utilizadas para determinar la presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o de una determinada vía metabólica de un microorganismo determinado. Se trata de un micrométodo que permite la medida cualitativa/semicuantitativa de la capacidad metabólica de un microorganismo. Es aplicable a diferentes tipos de muestra (suspensiones celulares, tejidos, líquidos, microorganismos, etc.). En nuestro caso se utilizó para los estudios de actividades enzimáticas de los microorganismos seleccionados. Mediante este sistema se pueden estudiar conjuntamente 19 actividades enzimáticas a partir de pequeñas cantidades de muestra (suspensión bacteriana). La galería API ZYM consta de 20 microtubos cuyo fondo está constituido por un soporte que contiene un sustrato enzimático tamponado, que favorece el contacto entre el enzima y el sustrato generalmente insoluble.

5.2.1. Microorganismos Seleccionados

Para realizar el ensayo de las actividades enzimáticas utilizando el API ZYM se seleccionaron cinco microorganismos representativos de cada grupo de muestras de suelo tratado con los diferentes compuestos. Los microorganismos seleccionados se muestran en la **Tabla VII.11**.

¹⁸⁹ Vlahopoulos, S., Gritzapis, A.D., Pérez, S.A., Cacoullos, N., Papamichail, M., Baxevanis, C.N. "Mannose addition by yeast *Pichia Pastoris* on recombinant HER-2 protein inhibits recognition by the monoclonal antibody herceptin". *Vaccine* 27 (2009) 4704-4708.

¹⁹⁰ Reglero, A., Cabezas, J.A. Glycosidases of molluscs. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from *Chamelea gallina* L. *European Journal of Biochemistry* 66 (1976) 379–387.

Tabla VII.11. *Microorganismos utilizados en el ensayo de actividades enzimáticas*

Suelos tratados con:	Microorganismos seleccionados
MPB	MPB-1, MPB-2, MPB-3, MPB-8, MPB-10
BPB	BPB-3, BPB-7, BPB-12, BPB-13, BPB-15
BP-3	BP-3-5, BP-3-7, BP-3-10, BP-3-14, BP-3-16
BFA	BFA-1, BFA-4, BFA-8, BFA-9, BFA-10
TCB	TCB-2, TCB-4, TCB-7, TCB-8, TCB-9

5.2.2. Preparación de las Galerías API ZYM

El test consta de 25 galerías API ZYM, 25 cámaras de inoculación, 25 hojas de respuesta y una ficha técnica. Cada galería estuvo constituida por una fila con 19 microtubos numerados. Los reactivos empleados fueron API Suspension Medium, 2 mL o API NaCl 0.85 % Medium, 2 mL; Reactivos ZYM A + ZYM B; Escala McFarland estándar y agua destilada. Las galerías se conservaron a 2-8°C hasta la fecha de utilización.

5.2.3. Inoculación de las Galerías

A partir de una suspensión bacteriana densa (5-6 de Mc Farland) preparada en solución salina, se inocularon los microtubos a razón de 65 µL, con la consiguiente rehidratación de los sustratos de cada microtubo. Seguidamente se incubaron las galerías durante 4h a 28-30°C.

5.2.4. Lectura de los Resultados

Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color que se revelan mediante la adición de reactivos. Tras la incubación se adicionó 1 gota de reactivo ZYM A (agente tensioactivo) y 1 gota de reactivo ZYM B en la cúpula. Transcurridos 5 min

(tiempo de generación de color), se procedió a exponer las galerías durante 10 s a la radiación de una lámpara de 1000 W a una distancia de 10 cm aproximadamente por encima de las cúpulas. Esta operación tiene por objeto eliminar el fondo amarillo debido al exceso de Fast Blue BB que no ha reaccionado dando reacciones negativas incoloras. Una exposición prolongada a la luz normal puede producir el mismo efecto La lectura de las reacciones enzimáticas se realizó de acuerdo a la **Tabla VII.12**.

Tabla VII.12. Interpretación de los resultados (API ZYM)

ENZIMA ESTUDIADO	SUSTRATO	pH	Reacción	
			+	-
1	Control	---	Incolora o color de la muestra según importancia de la coloración	
2	Fosfatasa alcalina	2-naftilfosfato	8.5	Violeta
3	Esterasa (C 4)	2-naftilbutirato	6.5	Violeta
4	Esterasa Lipasa (C 8)	2-naftilcaprilato	7.5	Violeta
5	Lipasa (C 14)	2-naftilmiristato	7.5	Violeta
6	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamina	7.5	Naranja
7	Valinaarilamidasa	L-valil-2-naftilamida	7.5	Naranja
8	Cistina Arilamidasa	L-cistil-2naftilamida	7.5	Naranja
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8.5	Naranja
10	α -Quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7.5	Naranja
11	Fosfatasa acida	2-naftilfosfato	5.4	Violeta
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	5.4	Azul
13	α -Galactosidasa	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosido	5.4	Violeta
14	β -Galactosidasa	2-naftil- β D-galactopiranosido	5.4	Violeta
15	β -Glucuronidasa	Naftol-AS-BI- β D-glucurónido	5.4	Azul
16	α -Glucosidasa	2-Naftil- α D-glucopiranosido	5.4	Violeta
17	β -Glucosidasa	6-Br-2-naftil- β D-galactopiranosido	5.4	Violeta
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil- β D-glucosamínido	5.4	Marrón
19	α -manosidasa	6-Br-2-naftil- α D-mannopiranosido	5.4	Violeta
20	α -fucosidasa	2-naftil- α L-fucopiranosido	5.4	Violeta

5.2.5. Resultados

En la **figura VII.26** se muestran los resultados obtenidos para los microorganismos aislados y seleccionados de las muestras de los suelos tratados con MPB, BPB, BP-3, BFA, TCS y TCB. Se observan las diferentes coloraciones, indicativas de resultados positivos/negativos para las diferentes actividades enzimáticas.

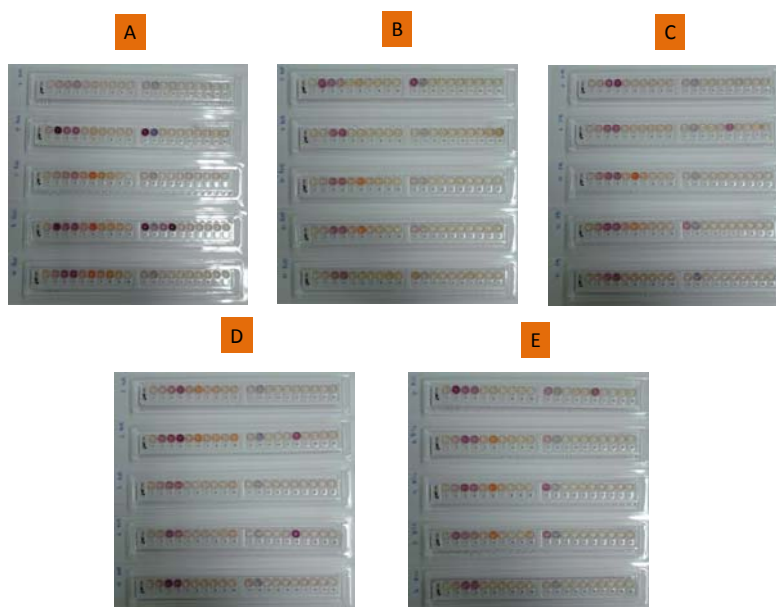


Figura VII.26. Resultado API ZYM para los microorganismos seleccionados tras un periodo de incubación de 4 h y adición de los correspondientes reactivos.

A: MPB-1, MPB-2, MPB-3, MPB-8 y MPB-10; **B:** BPB-3, BPB-7, BPB-12, BPB-13 y BPB-15; **C:** BP-3-5, BP-3-7, BP-3-10, BP-3-14 y BP-3-16; **D:** BFA-1, BFA-4, BFA-8, BFA-9 y BFA-10; **E:** TCB-2, TCB-4, TCB-7, TCB-8 y TCB-9

A. Actividades enzimáticas de los microorganismos aislados a partir de suelos tratados con metilparabeno. En la **tabla VII.13** se muestran los resultados cualitativos de actividades enzimáticas encontradas.

Tabla VII.13. Actividades enzimáticas (MPB)

Nº	Enzimas estudiados	MPB-1	MPB-2	MPB-3	MPB-8	MPB-10
1	Control	-	-	-	-	-
2	Fosfatasa alcalina	-	+	-	+	-
3	Esterasa (C 4)	+	+	+	+	+
4	Esterasa lipasa (C 8)	+	+	+	+	+
5	Lipasa (C 14)	+	+	+	+	+
6	Leucina arilamidasas	-	+	+	+	+
7	Valinaarilamidasas	-	-	+	+	+
8	Cistina arilamidasas	-	-	-	+	+
9	Tripsina	-	-	-	+	-
10	α -Quimotripsina	-	-	-	-	-
11	Fosfatasa ácida	-	+	-	+	-
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+
13	α -Galactosidasa	-	-	-	+	-
14	β -Galactosidasa	-	-	-	+	-
15	β -Glucuronidasa	-	-	-	-	-
16	α -Glucosidasa	-	-	-	-	-
17	β -Glucosidasa	-	-	-	-	-
18	N-Acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-
19	α -Manosidasa	-	-	-	-	-
20	α -Fucosidasa	-	-	-	-	-

Se observa que todos los microorganismos ensayados dieron positivo para las actividades enzimáticas esterasa (C 4), esterasa lipasa (C 8), lipasa (C 14) y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. Los microorganismos MPB-2 y MPB-8 presentaron actividad fosfatasa alcalina y la fosfatasa ácida. La actividad leucina arilamidasas se encontró en todos los microorganismos excepto en MPB-1. La actividad valinaarilamidasas se encontró en los microorganismos MPB-3, MPB-8 y MPB-10. La actividad cistina arilamidasas se ha encontrado en los microorganismos MPB-8 y MPB-10. Por último, el microorganismo identificado como MPB-8 además dio positivas las actividades tripsina, α -galactosidasa y β -galactosidasa. Los demás enzimas no produjeron color dando un resultado negativo.

B. Actividades enzimáticas de los microorganismos aislados a partir de suelos tratados con butilparabeno. En la *tabla VII.14* se muestran los resultados cualitativos de actividades enzimáticas encontradas.

Tabla VII.14. *Actividades enzimáticas (BPB)*

Nº	Enzimas estudiados	BPB-3	BPB-7	BPB-12	BPB-13	BPB-15
1	Control	-	-	-	-	-
2	Fosfatasa alcalina	+	-	-	-	-
3	Esterasa (C 4)	+	+	+	+	+
4	Esterasa lipasa (C 8)	+	+	+	+	+
5	Lipasa (C 14)	-	-	-	-	-
6	Leucina arilamidasa	+	+	+	+	-
7	Valina arilamidasa	-	-	+	-	-
8	Cistina arilamidasa	-	-	+	-	-
9	Tripsina	-	-	-	-	-
10	α -Quimotripsina	-	-	-	-	-
11	Fosfatasa ácida	+	-	+	-	-
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	-	+	-	-
13	α -Galactosidasa	-	-	-	-	-
14	β -Galactosidasa	-	-	-	-	-
15	β -Glucuronidasa	-	-	-	-	-
16	α -Glucosidasa	-	-	-	-	-
17	β -Glucosidasa	-	-	-	-	-
18	N-Acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-
19	α -Manosidasa	-	-	-	-	-
20	α -Fucosidasa	-	-	-	-	-

Todos los microorganismos ensayados presentaron actividad esterasa (C 4) y actividad esterasa lipasa (C 8). La actividad leucina arilamidasa se describió en todos los microorganismos ensayados salvo en el BPB-15. Las actividades fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa se encontraron en los microorganismos BPB-3 y el BPB-12 y la actividad fosfatasa alcalina fue positiva únicamente en el microorganismo BPB-3, mientras que la actividad valinaarilamidasa y la cistina arilamidasa fue positiva para el

microorganismo BPB-12. Los demás enzimas no produjeron color dando un resultado negativo.

C. Actividades enzimáticas de los microorganismos aislados a partir de suelos tratados con benzofenona 3. En la *tabla VII.15* se muestran los resultados cualitativos de actividades enzimáticas encontradas.

Tabla VII.15. Actividades enzimáticas (BP-3)

Nº	Enzimas estudiados	BP-3	BP-3	BP-3	BP-3	BP-3
		5	7	10	14	16
1	Control	-	-	-	-	-
2	Fosfatasa alcalina	-	-	+	+	-
3	Esterasa (C 4)	+	+	+	+	+
4	Esterasa lipasa (C 8)	+	+	+	+	+
5	Lipasa (C 14)	-	-	+	+	-
6	Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+
7	Valinaarilamidasa	-	-	+	+	-
8	Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-
9	Tripsina	-	-	-	-	-
10	α -Quimotripsina	+	+	-	-	-
11	Fosfatasa ácida	-	-	-	-	-
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+
13	α -Galactosidasa	-	-	-	+	-
14	β -Galactosidasa	-	-	-	-	-
15	β -Glucuronidasa	-	-	-	-	-
16	α -Glucosidasa	+	+	-	-	-
17	β -Glucosidasa	-	-	-	+	-
18	N-Acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-
19	α -Manosidasa	-	-	-	-	-
20	α -Fucosidasa	-	-	-	-	-

Todos los microorganismos presentaron actividad esterasa (C 4), esterasa lipasa (C 8), naftol-AS-BI-fosfohidrolasa y leucina arilamidasa. Además, las actividades fosfatasa alcalina y valinaarilamidasa fueron positivas para los microorganismos BP-3-10 y BP-3-14. Las actividades α -

quimotripsina y α -glucosidasa para BP-3-5 y BP-3-7 y los enzimas α -galactosidasa y β -glucosidasa también fueron positivas para el BP-3-14. Los demás enzimas no produjeron color, siendo el resultado negativo.

D. Actividades enzimáticas de los microorganismos aislados a partir de suelos tratados con bisfenol A. En la *tabla VII.16* se muestran los resultados cualitativos de actividades enzimáticas encontradas.

Tabla VII.16. Actividades enzimáticas (BFA)

Nº	Enzimas estudiados	BFA-1	BFA-4	BFA-8	BFA-9	BFA-10
1	Control	-	-	-	-	-
2	Fosfatasa alcalina	-	+	-	-	-
3	Esterasa (C 4)	+	+	+	+	+
4	Esterasa lipasa (C 8)	+	+	+	+	+
5	Lipasa (C 14)	+	+	-	-	-
6	Leucina arilamidasa	+	+	-	-	-
7	Valinaarilamidasa	-	+	-	-	-
8	Cistina arilamidasa	-	+	-	-	-
9	Tripsina	-	+	-	-	-
10	α -Quimotripsina	-	+	+	+	+
11	Fosfatasa ácida	-	-	-	-	-
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+
13	α -Galactosidasa	-	-	-	-	-
14	β -Galactosidasa	-	-	-	-	-
15	β -Glucuronidasa	-	-	-	-	-
16	α -Glucosidasa	-	+	-	+	+
17	β -Glucosidasa	-	-	-	-	-
18	N-Acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-
19	α -Manosidasa	-	-	-	-	-
20	α -Fucosidasa	-	-	-	-	-

El 100 % de los microorganismos ensayados presentaron actividad esterasa (C 4), esterasa lipasa (C 8) y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. El enzima α -quimotripsina se localizó en todos los microorganismos excepto en el BFA-1, observándose además que BFA-1 y BFA-4 presentaban actividad lipasa (C 14) y leucina arilamidasa. Por último, el enzima α -glucosidasa dio

positivo para los microorganismos BFA-4, BFA-9 y BFA-10, y los enzimas fosfatasa alcalina, valinaarilamidasa, cistina arilamidasa y tripsina dieron positivo en el microorganismo BFA-4. Los demás enzimas no produjeron color dando como resultado pruebas negativas.

E. Actividades enzimáticas de los microorganismos aislados a partir de suelos tratados con triclocarbán. En la *tabla VII.17* se muestran los resultados cualitativos de actividades enzimáticas encontradas.

Tabla VII.17. Actividades enzimáticas (TCB)

Nº	Enzimas estudiados	TCB-2	TCB-4	TCB-7	TCB-8	TCB-9
1	Control	-	-	-	-	-
2	Fosfatasa alcalina	+	-	-	+	-
3	Esterasa (C 4)	+	+	+	+	+
4	Esterasa lipasa (C 8)	+	+	+	+	+
5	Lipasa (C 14)	-	+	-	-	-
6	Leucina arilamidasa	-	+	+	+	+
7	Valinaarilamidasa	-	+	-	-	-
8	Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-
9	Tripsina	-	-	-	-	-
10	α -Quimotripsina	-	-	+	+	-
11	Fosfatasa ácida	+	+	+	+	-
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	-	-	+	+	+
13	α -Galactosidasa	-	-	-	-	-
14	β -Galactosidasa	-	-	-	-	-
15	β -Glucuronidasa	-	-	-	-	-
16	α -Glucosidasa	+	-	-	-	-
17	β -Glucosidasa	-	-	-	-	-
18	N-Acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-
19	α -Manosidasa	-	-	-	-	-
20	α -Fucosidasa	-	-	-	-	-

Al igual que sucede en los casos anteriores, el 100 % de los microorganismos ensayados presentaron actividad esterasa (C 4) y esterasa lipasa (C 8). El enzima leucina arilamidasa fue positivo en todos los microorganismos excepto en el TCB-2 y la fosfatasa ácida se fue

nuevamente positiva en todos los microorganismos a excepción de TCB-9. El enzima naftol-AS-BI-fosfohidrolasa dio positivo en los microorganismos TCB-7, TCB-8 y TCB-9 y α -quimotripsina igualmente dio positivo en los microorganismos TCB-7 y TCB-8. La fosfatasa alcalina se encontró en TCB-2 y TCB-8. La lipasa (C 14) y valinaarilamidasa en el microorganismo TCB-4. Los demás enzimas no produjeron color, siendo el resultado negativo.

5.2.6. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos en los procesos de oxidación y fermentación se concluye que cada microorganismo metaboliza de manera diferente los hidratos de carbono ensayados, lo cual informa que se trata de microorganismos diferentes.

Por otro lado, tras realizar los ensayos de actividad enzimática (API ZYM), se determinó la presencia o ausencia de una determinada actividad, grupo actividades, o una determinada vía metabólica. Todo ello, al igual que en el ensayo de utilización de fuentes de carbono, permitió discriminar los microorganismos estudiados y deducir que eran diferentes desde el punto de vista metabólico.

6. Cinéticas de Crecimiento de Microorganismos Procedentes de las Parcelas Experimentales en Presencia de Diferentes Compuestos. Estudio de Degradación

Tras el estudio de recuentos microbianos obtenidos a partir de las muestras de las parcelas tratadas y no tratadas con compost y los microcontaminantes objeto de estudio, se procedió a realizar aislamientos con objeto de seleccionar aquellos microorganismos capaces de crecer y degradar los diferentes compuestos.

6.1. Metodología

Los aislamientos se realizaron en placa con medio de cultivo TSA. La selección de microorganismos se realizó en base a criterios morfológicos de las colonias aisladas. De todos los microorganismos aislados finalmente se realizó una selección de 10 microorganismos para los ensayos de cinética de crecimiento y degradación de cada analito.

Los ensayos se llevaron a cabo en frascos fondo cónico tubo de centrífuga estériles de acuerdo a la **tabla VII.18**. Para cada analito utilizado como fuente de C/E se realizaron 20 cultivos + 1 frasco sin microorganismo sometido al mismo proceso de incubación (control químico).

Tabla VII.18. Descripción de los ensayos (10 microorganismos por analito)

Ensayo	Muestras	Tipo de Análisis
Medio TSB1/10 + Microorganismo + analito	10	Microbiológico / Químico
Medio TSB1/10 + Microorganismo	10	Microbiológico (Controles)
Medio TSB1/10 + analito	1	Químico (Control)

- **Medio de cultivo e inóculo.** 15 mL TSB diluido 1/10 suplementado con 50 mg L⁻¹ del compuesto en estudio. Se utilizó TSB diluido de acuerdo con los ensayos realizados Valkova¹⁹¹. Los inóculos se prepararon en medio TSB diluido 1/10. Inóculo inicial/ensayo = 10⁵ UFC mL⁻¹.
- **Incubación, toma de muestra y Lectura de resultados.** Todos los tubos se incubaron en un agitador orbital (New Brunswick E25R) a 100 r.p.m. a 30°C durante 5 días.
- **Análisis microbiológicos.** Se realizó la medida de densidad óptica en un espectrofotómetro (UNICAM UV/VIS 5821) a 600 nm. Las lecturas se realizaron a las 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h. Los resultados de UFC mL⁻¹ se obtuvieron de acuerdo a las diferentes curvas de calibración (relación D.O./recuento UFC mL⁻¹), cuyas rectas de calibración y valores de R² se indican en las figuras correspondientes.
- **Análisis químicos.** El estudio de la cantidad de compuesto degradado se realizó mediante UPLC-MS/MS.

Para la obtención de resultados se utilizaron las condiciones óptimas de cromatografía de acuerdo a la metodología desarrollada a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Tras la toma de muestra se centrifugó a 13.000 r.p.m. para la retirada de células. Las lecturas se realizaron a 0 h y 96 h de incubación.

¹⁹¹ Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Labrie, L., Bisailon, J.G., Beaudet, R., Shareck, F., Villemur, R. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (Parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant enterobacter cloacae strain EM. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2001) 2404-2409.

6.2. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Metilparabeno como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto

6.2.1. Cinéticas de Crecimiento Microbiano

En las **figuras VII.27 a VII.36** se muestran los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados de suelos tratados con MPB en las parcelas experimentales.

- Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-1

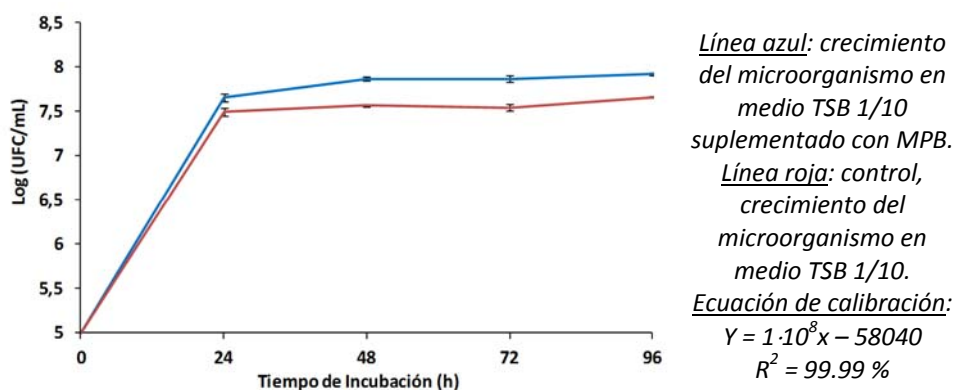


Figura VII.27. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-1** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

El crecimiento (expresado como $\log \text{UFC mL}^{-1}$) es de 7.65 ± 0.02 tras 24 h de cultivo, partiendo de un cultivo inicial estándar de 10^5UFC mL^{-1} . A partir de este tiempo, el número de microorganismos se mantuvo constante hasta el final del ensayo. Los recuentos a 48 h, 72 h y 96 h fueron de 7.86 ± 0.01 ; 7.86 ± 0.02 ; 7.92 ± 0.02 , respectivamente. En relación al cultivo control (sin analito), dado que ambos cultivos presentaban un soporte de carbono (TSB diluido 1/10), se observó crecimiento aunque con una leve diferencia. Los recuentos del ensayo control fueron de 7.49 ± 0.04 ; 7.56 ± 0.01 ; 7.54 ± 0.04 y 7.66 ± 0.01 .

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-2**

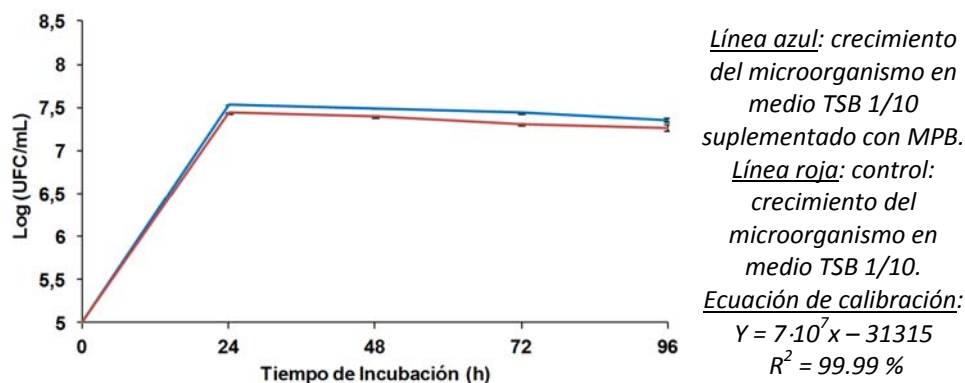


Figura VII.28. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-2** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

No se aprecian diferencias significativas entre el cultivo con y sin MPB, partiendo de un cultivo inicial estándar de 10^5 UFC mL⁻¹. Se observa un crecimiento de $7.53 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ (resultado expresado como log UFC mL⁻¹) tras 24 h de cultivo en presencia del analito. Los resultados a las 48 h, 72 h y 96 h fueron de 7.49 ± 0.02 ; $7.43 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; 7.34 ± 0.04 respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-3**

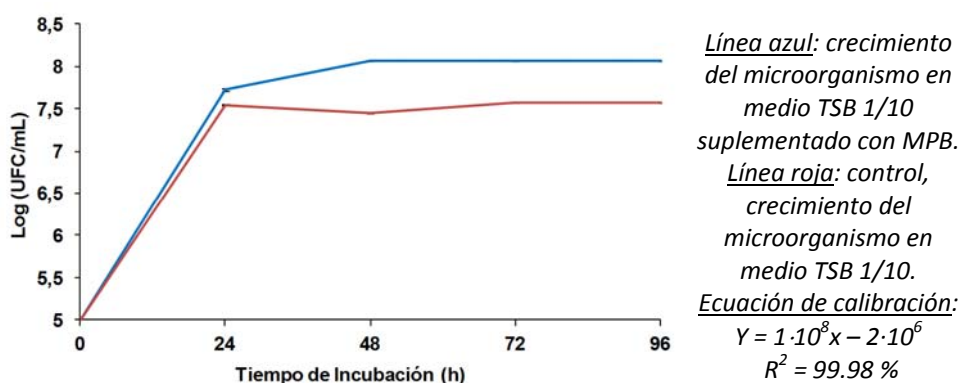


Figura VII.29. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-3** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

Tras 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de cultivo, el crecimiento del microorganismo fue 7.73 ± 0.02 ; $8.06 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.06 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.06 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. A las 48 h se alcanza una fase estacionaria que se mantiene hasta el final del ensayo. Los cultivos control generaron un resultado de $7.55 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$; $7.45 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$, $7.57 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.57 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$. Se observa además que existe diferencia de crecimiento entre ambos cultivos siendo tras 96 h de 0.5 logaritmos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-4**

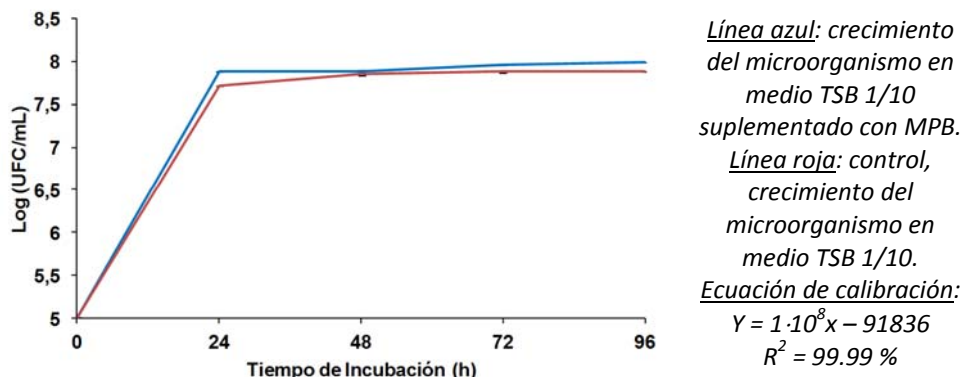


Figura VII.30. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-4** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

En este caso se observa un aumento de 2.5 logaritmos tras 24 h de cultivo ($\log \text{ UFC mL}^{-1} = 7.87 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$), manteniéndose relativamente constante el número de microorganismos a las 48 h, 72 h y 96 h, con resultados de $7.88 \pm 4.0 \cdot 10^{-3}$; $7.95 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.98 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. La diferencia de crecimiento respecto al cultivo control (sin el compuesto) no fue significativa.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-5**

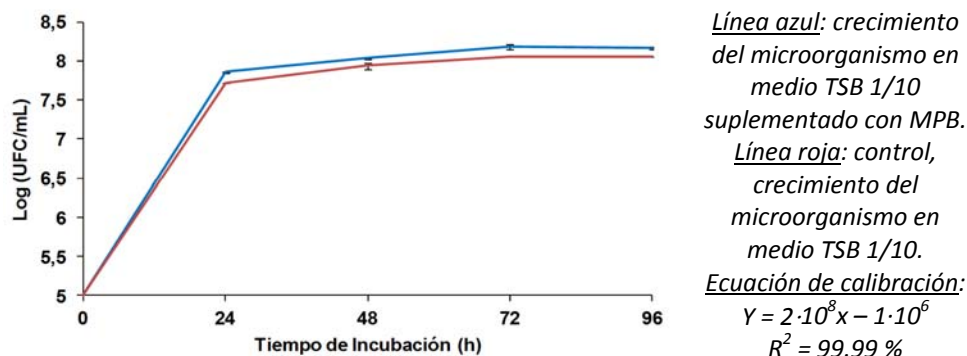


Figura VII.31. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-5** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

El número de microorganismos se incrementa notablemente tras 24 h tanto en el control como en presencia del compuesto. Los resultados de los cultivos en presencia de MPB fueron de $7.85 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; 7.93 ± 0.03 ; 8.18 ± 0.03 ; 8.16 ± 0.01 a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-6**

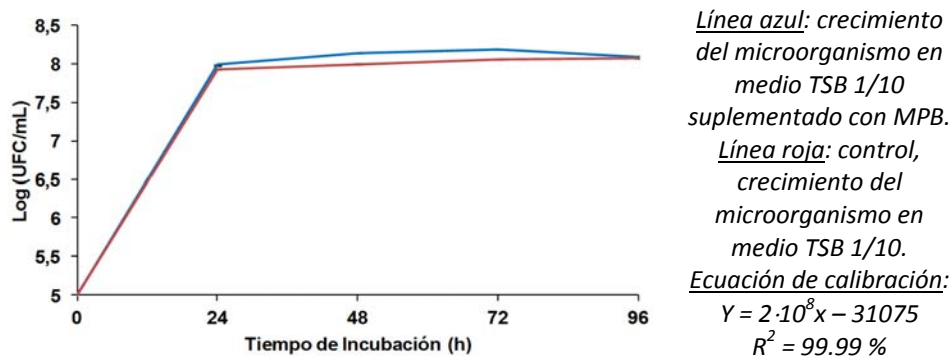


Figura VII.32. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-6** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

Se aprecia un aumento de casi 3 logaritmos a las 24 h de cultivo con un resultado de $7.98 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$, valor que se mantiene prácticamente constante

tras 96 h de cultivo. Los resultados de recuentos a las 48 h, 72 h y 96 h fueron de $8.13 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; $8.19 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; 8.09 ± 0.02 , respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-7**

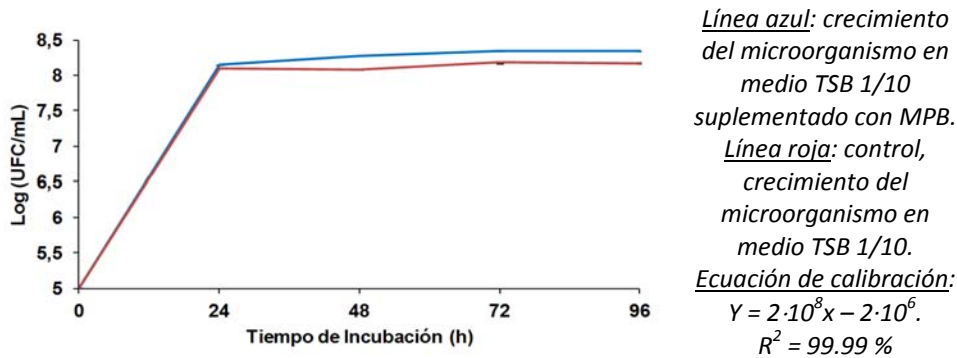


Figura VII.33. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-7** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

Se observa que tras 24 h se produce un aumento del número de células de más de 3 logaritmos, con un resultado de $8.15 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. Se aprecia igualmente un alto crecimiento microbiano en los cultivos control. Los resultados a 48 h, 72 h y 96 h de ensayo en presencia de MPB fueron de $8.27 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.34 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.34 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-8**

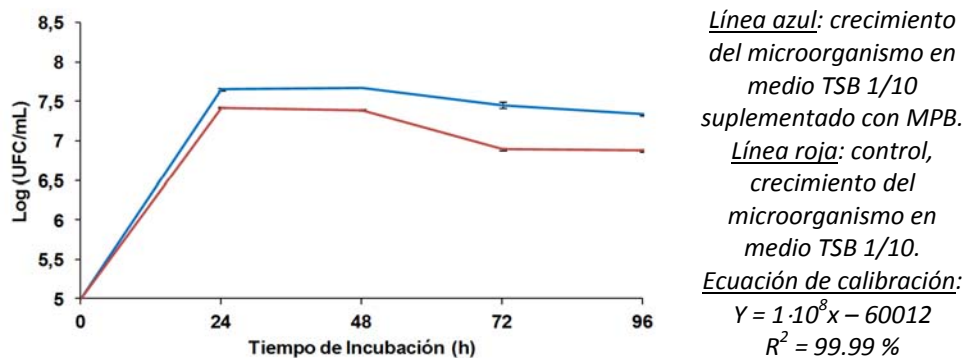


Figura VII.34. Cinética de crecimiento del microorganismo **MPB-8** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

Tras 24 h de cultivo, el recuento bacteriano aumentó en 2.5 logaritmos aproximadamente respecto al inicio del ensayo. A continuación, hasta las 48 h, se observa una fase de crecimiento. A partir de este tiempo se aprecia un leve descenso, el cual es más acusado en los cultivos control. Los resultados a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h fueron de 7.65 ± 0.02 ; $7.67 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; 7.45 ± 0.04 y $7.33 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$, y en los cultivos control de $7.42 \pm 4.0 \cdot 10^{-3}$; $7.39 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$; 6.90 ± 0.02 ; y 6.88 ± 0.02 respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-9**

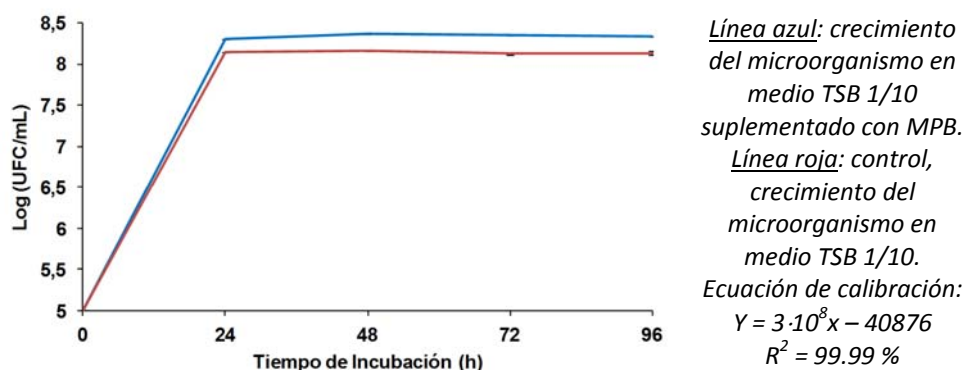


Figura VII.35. Cinética de crecimiento del microorganismo identificado como **MPB-9** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

No se aprecia diferencia significativa de crecimiento entre el ensayo con MPB y sin el compuesto, lográndose un crecimiento tras 24 h de cultivo de aproximadamente 3 logaritmos en ambos casos. Tras las 24 h de cultivo, el número de microorganismos se mantiene constante hasta final del ensayo. Los resultados a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h con MPB fueron de $8.29 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.36 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.35 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.33 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo MPB-10**

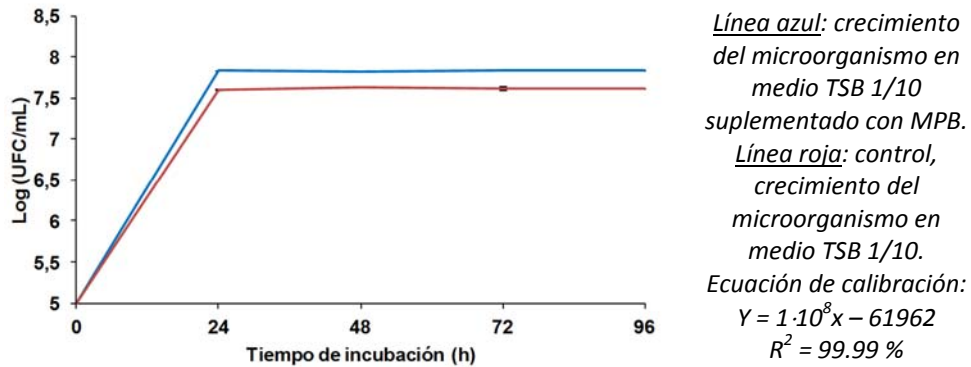


Figura VII.36. Cinética de crecimiento del microorganismo identificado como **MPB-10** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de MPB

Tras 24 h se observa un aumento de crecimiento de aproximadamente 2.5 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de $7.84 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos fueron de $7.84 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.83 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.84 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. Por otro lado, al igual que en los casos anteriores, el crecimiento de los cultivos control fue inferior respecto a los cultivos del microorganismo en presencia de MPB.

Como resultado de las cinéticas de crecimiento de los diferentes microorganismos seleccionados, en la **tabla VII.19** se expone la diferencia de crecimiento ($\log \text{UFC mL}^{-1}$) entre los cultivos en presencia de MPB y los cultivos control sin compuesto tras 48 h de ensayo.

Tabla VII.19. Relación entre los cultivos de los diferentes microorganismos en presencia y ausencia de MPB tras 48 h de cultivo. **A:** Cultivo en presencia de compuesto. **B:** Cultivo en ausencia de compuesto. Resultados expresados como log UFC mL⁻¹

Microorganismo	A – B (log UFC mL⁻¹)	Microorganismo	A – B (log UFC mL⁻¹)
MPB-1	0.31	MPB-6	0.14
MPB-2	0.09	MPB-7	0.19
MPB-3	0.61	MPB-8	0.29
MPB-4	0.04	MPB-9	0.21
MPB-5	0.10	MPB-10	0.21

6.2.2. Degradación de MPB en Presencia de Diferentes Microorganismos

La cantidad de MPB degradada en presencia de los diferentes microorganismos fue muy diversa. En la **tabla VII.20** se observa que tras 96 h de cultivo, el microorganismo que degradó casi completamente el compuesto fue el MPB-3 con un 99.9 % de degradación total. El nivel de degradación observado utilizando los microorganismos MPB-1, MPB-2, MPB-8 y MPB-9 fue de 27.6 %, 24.8 %, 17.3 % y 18.3 % respectivamente. Los microorganismos que menos degradaron el compuesto fueron el MPB-4, el MPB-5, el MPB-6 y el MPB-7 con porcentajes de degradación de 10.3 %, 8.6 %, 9.8 % y 10.0 %, siendo el microorganismo identificado como MPB-9 el que menos utilizó este compuesto como fuente de C/E con un porcentaje de degradación de 5.6 %.

Tabla VII.20. Relación entre los cultivos de los diferentes microorganismos en presencia y ausencia de MPB tras 48 h de cultivo. **A:** Cultivo en presencia de compuesto. **B:** Cultivo en ausencia de compuesto. Resultados expresados como log UFC mL⁻¹

Microorganismo	A (ppm)	B (ppm)
MPB-1	3.42	1.30
MPB-2	3.55	1.17
MPB-3	1.0·10 ⁻³	4.72
MPB-4	4.23	0.48
MPB-5	4.32	0.40
MPB-6	4.25	0.46
MPB-7	4.25	0.47
MPB-8	3.90	0.82
MPB-9	4.45	0.26
MPB-10	3.86	0.86
CONTROL	4.72	

6.3. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Butilparabeno como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto

6.3.1. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Butilparabeno

En las **figuras VI.37** y **VI.46** se describen los resultados obtenidos para las cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados en suelos tratados con BPB.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-1**

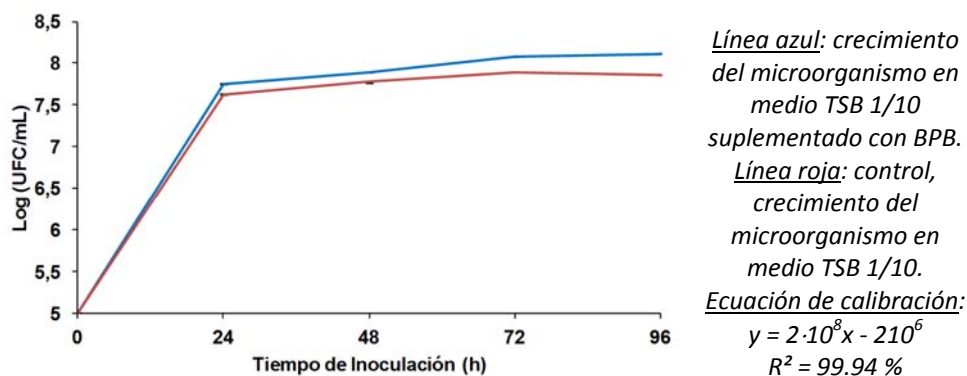


Figura VII.37. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-1** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Se aprecia un elevado aumento del número de microorganismos tras 24 h de cultivo tanto en los cultivos control (sin compuesto) como en los cultivos en presencia del compuesto. Los resultados obtenidos (expresados como $\log \text{ UFC mL}^{-1}$) de los cultivos en presencia de BPB fueron de $7.75 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$; $7.88 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$; $8.07 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; $8.11 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-3**

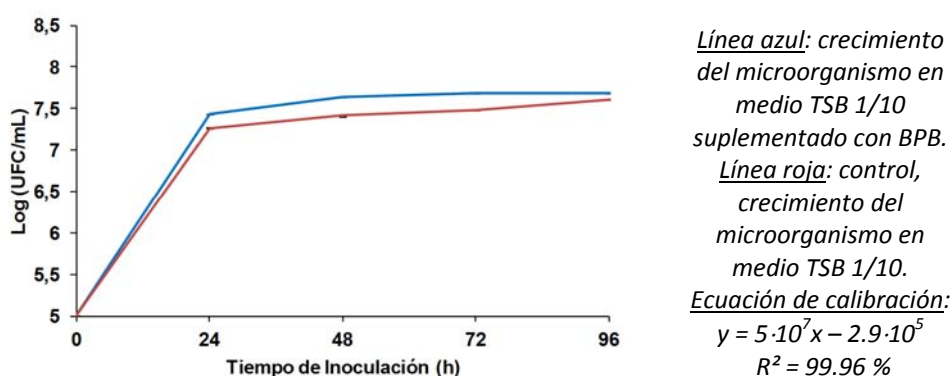


Figura VII.38. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-3** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Tras 24 h de cultivo se observa un aumento de crecimiento de aproximadamente 2.5 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de $7.44 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. Además, a las 48 h de cultivo, el número de microorganismos aumenta levemente respecto a las 24 h, alcanzándose la fase estacionaria. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos fueron de $7.64 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.68 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.69 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. Por otro lado, al igual que sucede en los casos anteriores, los crecimientos de los cultivos control fueron ligeramente inferiores respecto a los cultivos del microorganismo en presencia BPB.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-4**

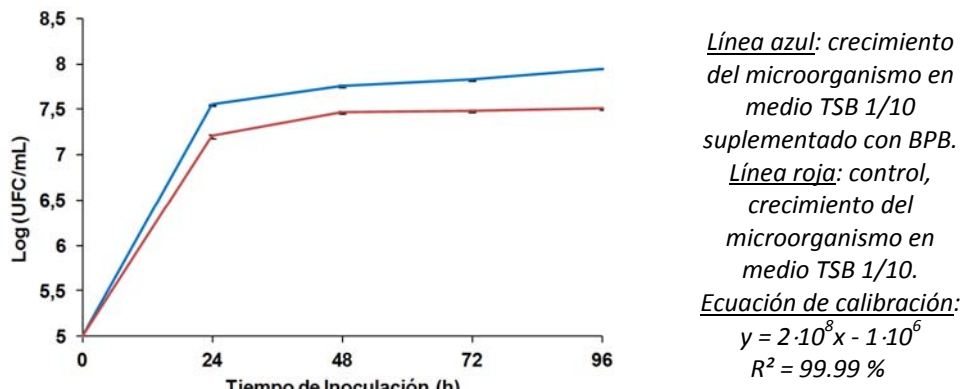


Figura VII.39. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-4** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

El crecimiento del microorganismo fue de $7.55 \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$ tras 24 h de cultivo. Los recuentos a 48 h, 72 h y 96 h fueron 7.75 ± 0.01 ; $7.82 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$; $7.94 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. En relación al cultivo control y dado que ambos cultivos presentaban un soporte de carbono (TSB diluido 1/10) al igual que en todos los cultivos, se pudo observar que el microorganismo BPB-4 creció aunque de menor cuantía tal y como se puede observar a los diferentes tiempos de incubación. Los recuentos del ensayo control fueron de $7.20 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; 7.47 ± 0.01 ; 7.47 ± 0.01 y $7.51 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-7**

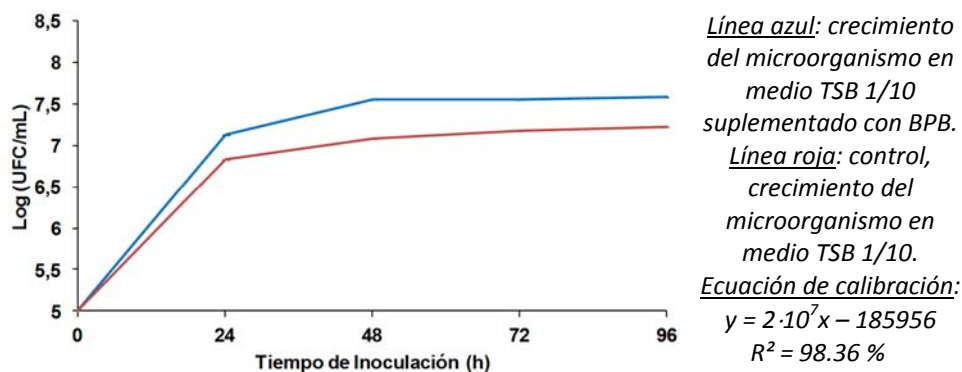


Figura VII.40. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-7** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Tras 24 h de cultivo el crecimiento del microorganismo en presencia del compuesto fue de $7.13 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, aumentando a las 48 h hasta alcanzar el valor de $7.55 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, manteniéndose prácticamente constante hasta el final del ensayo con resultados a 72 h y 96 h de $7.55 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y 8.07 ± 0.03 . Los recuentos del control fueron $6.83 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$, $7.08 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, $7.17 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.22 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, respectivamente. Existe diferencia de crecimiento entre ambos cultivos siendo tras 96 h de aproximadamente 0.5 logaritmos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-8**

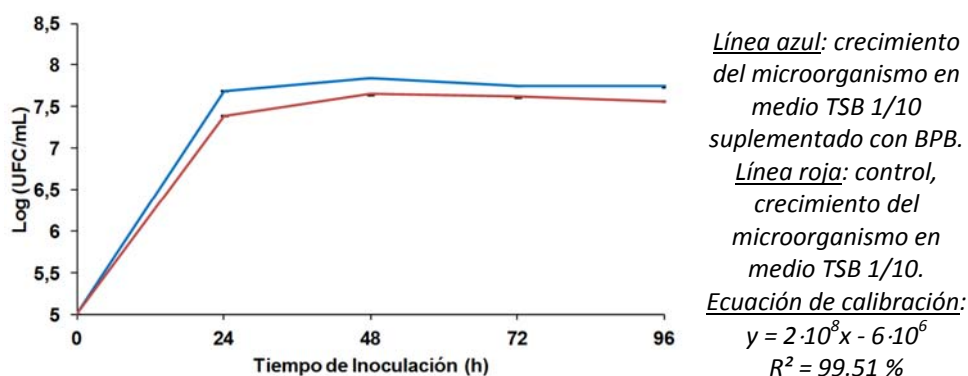


Figura VII.41. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-8** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

A las 24 h se aprecia una diferencia en torno a 0.3 logaritmos en el crecimiento entre el ensayo en presencia y ausencia del compuesto. Tras este tiempo, el aumento de crecimiento respecto al inicio del ensayo fue de aproximadamente 2.5 logaritmos. Tras 48 h de cultivo, el número de microorganismos se mantiene constante hasta final. Los resultados a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h en el ensayo con el compuesto fueron de $7.68 \pm 6.0 \cdot 10^{-3}$; $7.84 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; $7.74 \pm 4.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.74 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-9**

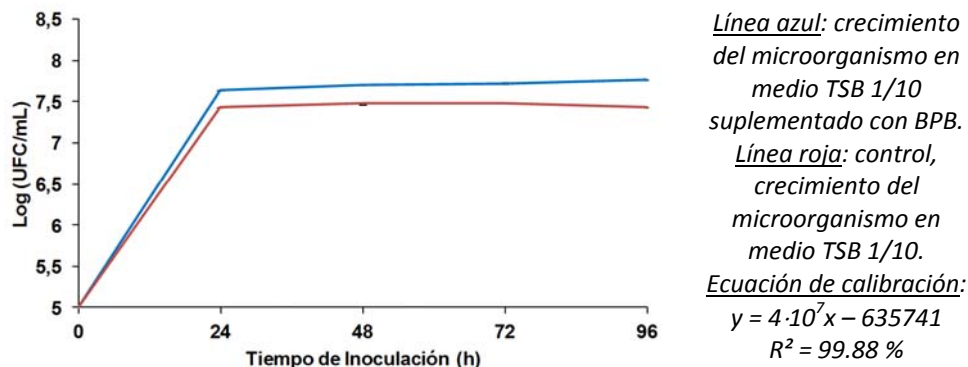


Figura VII.42. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-9** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Tras 24 h de cultivo se alcanza una fase estacionaria, manteniéndose hasta el final del ensayo. Se aprecia un aumento de crecimiento de aproximadamente 2.5 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de $7.63 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos fueron de $7.71 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.72 \pm 9.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.77 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. Al igual que sucede en casos anteriores, los crecimientos en los cultivos control fueron inferiores respecto a los cultivos del microorganismo en presencia del compuesto.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-11**

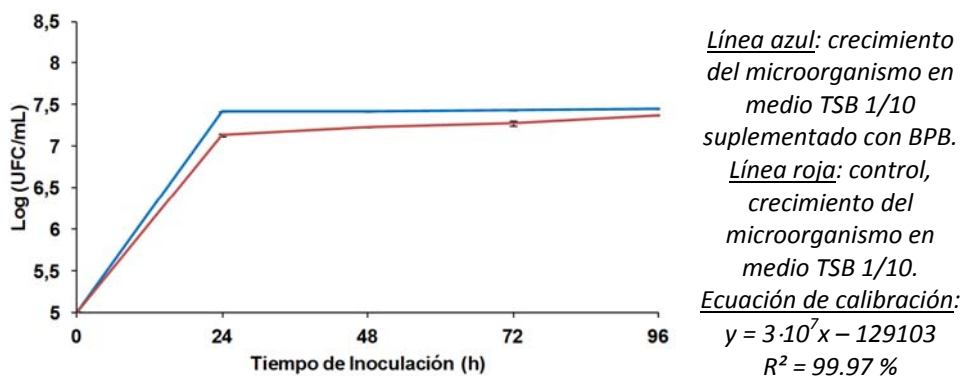


Figura VII.43. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-11** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Se aprecia un aumento de aproximadamente 2.4 logaritmos tras 24 h de cultivo ($\log \text{UFC mL}^{-1} = 7.42 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$), manteniéndose relativamente constante el número de microorganismos a las 48 h, 72 h y 96 h, con resultados de $7.42 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.42 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.45 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. La diferencia de crecimiento respecto al cultivo control fue más acusada a las 24 h de cultivo respecto al resto de tiempos de incubación.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-12**

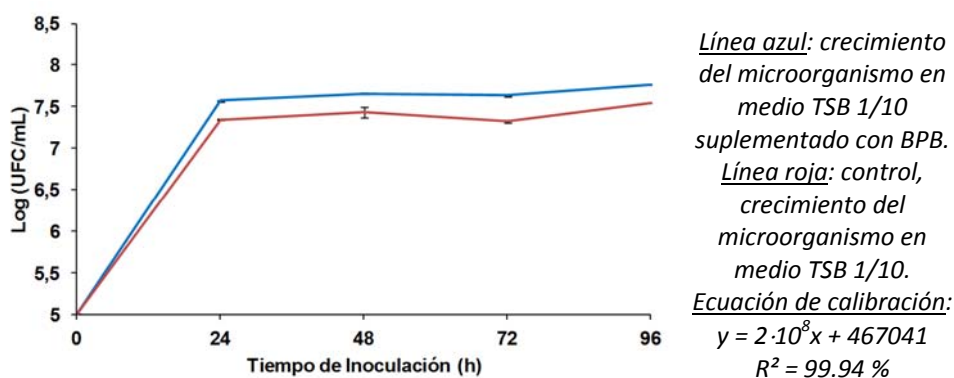


Figura VII.44. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-12** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Tras 24 h de cultivo, el crecimiento del microorganismo en presencia del compuesto fue de $7.57 \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$, manteniéndose aproximadamente constante en los siguientes tiempos ($7.65 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$; $7.63 \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.76 \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$). Los resultados de crecimiento en los cultivos control fueron $7.34 \pm 9.0 \cdot 10^{-3}$, 7.43 ± 0.06 , 7.33 ± 0.01 y $7.54 \pm 4.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. Se observa que existe una diferencia de crecimiento entre ambos cultivos siendo tras 96 h de aproximadamente 0.3 logaritmos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-13**

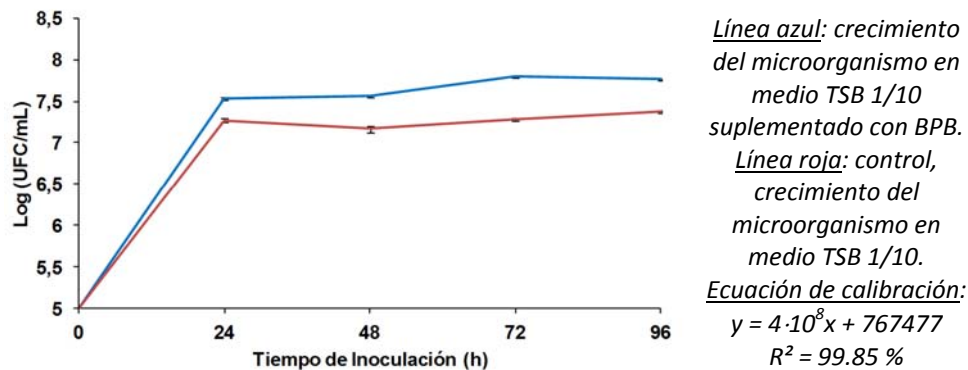


Figura VII.45. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-13** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Se observa un aumento del crecimiento de 2.5 logaritmos tras el inicio del ensayo en el cultivo con BPB. Los resultados en el cultivo con el compuesto fueron de 7.53 ± 0.01 ; 7.56 ± 0.01 ; $7.79 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.76 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$ a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente. Los resultados obtenidos para los cultivos control fueron de 7.26 ± 0.02 ; 7.16 ± 0.04 ; 7.28 ± 0.02 y 7.37 ± 0.01 respectivamente a los mismos tiempos de cultivo, observándose una diferencia de crecimiento entre ambos cultivos de aproximadamente 0.4 logaritmos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BPB-15**

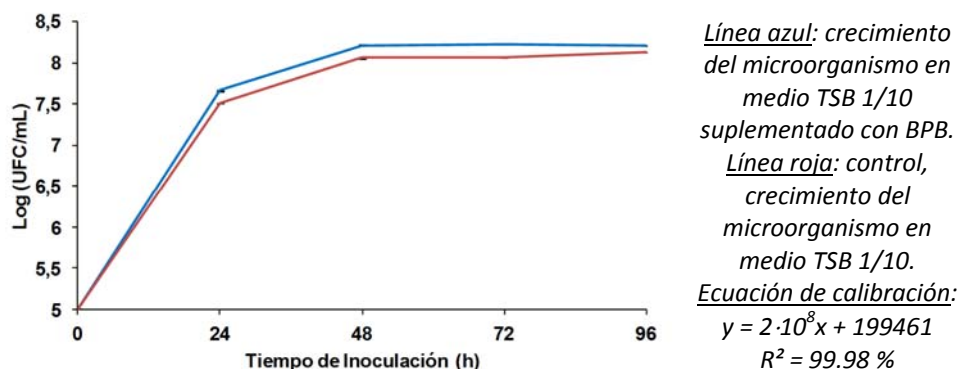


Figura VII.46. Cinética de crecimiento del microorganismo **BPB-15** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BPB

Se aprecia un elevado aumento del número de microorganismos tras 24 h de cultivo tanto en los cultivos control, como en los cultivos en presencia del compuesto. A las 48 h de cultivo se produce un aumento del número de microorganismos de 0.5 logaritmos respecto al cultivo de 24 h. A partir de este tiempo de incubación el número de microorganismos se mantiene relativamente constante. Los resultados obtenidos en presencia de BPB fueron de $7.66 \pm 5.0 \cdot 10^{-3}$; $8.21 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.22 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.20 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente. Las diferencias entre las cinéticas de crecimiento con y sin compuesto no fueron significativas.

Como resultado de las cinéticas de crecimiento de los diferentes microorganismos seleccionados, en la **tabla VII.21** se expone la diferencia de crecimiento (expresado como $\log \text{ UFC mL}^{-1}$) entre los cultivos en presencia de BPB y los cultivos control sin compuesto tras 48 h de ensayo. La mayor diferencia entre ambos cultivos se observó en el caso del ensayo con el microorganismos BPB-7, siendo ésta del 6.3 %.

Tabla VII.21. Relación entre los cultivos de los diferentes microorganismos en presencia y ausencia de BPB a las 48 h de incubación. **A:** Cultivo en presencia de compuesto. **B:** Cultivo en ausencia del compuesto. Resultados expresados como $\log \text{UFC mL}^{-1}$

Microorganismo	A – B (log UFC mL⁻¹)	Microorganismo	A – B (log UFC mL⁻¹)
BPB-1	0.12	BPB-9	0.23
BPB-3	0.23	BPB-11	0.20
BPB-4	0.28	BPB-12	0.22
BPB-7	0.47	BPB-13	0.40
BPB-8	0.19	BPB-15	0.16

6.3.2. Degradación de BPB en Presencia de Diferentes Microorganismos

La cantidad del compuesto degradada en presencia de los diferentes microorganismos fue muy variada dependiendo del microorganismo utilizado en el cultivo. En la **tabla VII.22** se observa que tras 96 h de cultivo, 8 de los microorganismos ensayados degradaron este compuesto en una concentración superior al 95 %, observándose que el microorganismo que degradó al compuesto casi en su totalidad fue el BPB-4 (99.98 %). El nivel de degradación conseguido utilizando los microorganismos BPB-3, BPB-7, BPB-8, BPB-9, BPB-11, BPB-12, BPB-13 fue de 99.1 %, 96.4 %, 99.2 %, 99.7 %, 95.4 %, 98.8 % y 97.5 % respectivamente. Los microorganismos que degradaron el compuesto en menor porcentaje fueron BPB-1 (74.0 %) y BPB-15 (71.0 %).

Tabla VII.22. Concentración final de BPB (ppm) determinada mediante LC-MS/MS. Concentración inicial 5 ppm. **A:** Concentración final (ppm) de BPB detectada tras 96 h de cultivo con diferentes microorganismos aislados de suelos tratados con BPB. **B:** Concentración de BPB degradada (ppm) tras finalizar el ensayo

Microorganismo	A (ppm)	B (ppm)
BPB-1	1.17	3.34
BPB-3	0.04	4.47
BPB-4	$1.0 \cdot 10^{-3}$	4.51
BPB-7	0.16	4.35
BPB-8	0.03	4.47
BPB-9	0.01	4.50
BPB-11	0.21	4.31
BPB-12	0.05	4.45
BPB-13	0.11	4.40
BPB-15	1.31	3.20
CONTROL	4.51	

6.4. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Benzofenona 3 como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto

6.4.1. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en presencia de Benzofenona 3

En las **figura VII.47- VII.56** se describen los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados de suelos tratados con BP-3 en las parcelas experimentales.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-1**

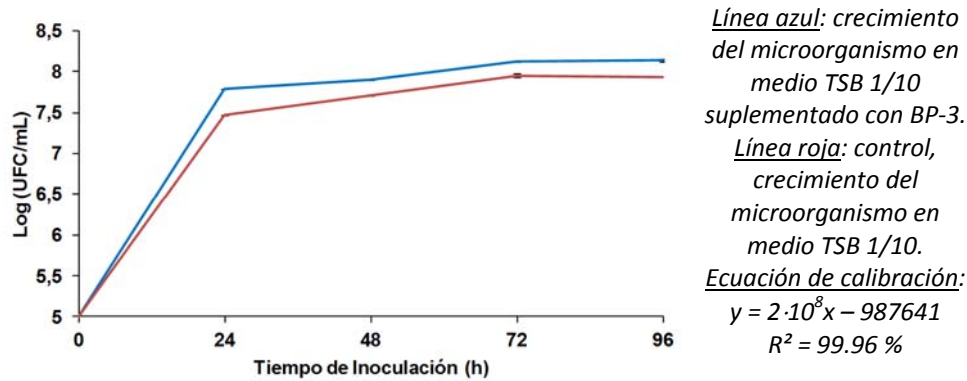


Figura VII.47. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-1** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

En las primeras 24 h de cultivo se observa un crecimiento exponencial con un aumento de 2.5 logaritmos respecto al inicio del ensayo. En presencia del compuesto los recuentos (expresados como $\log \text{UFC mL}^{-1}$) fueron de $7.78 \pm 4.0 \cdot 10^{-3}$; $7.90 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$; $8.12 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y 8.14 ± 0.01 a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-5**

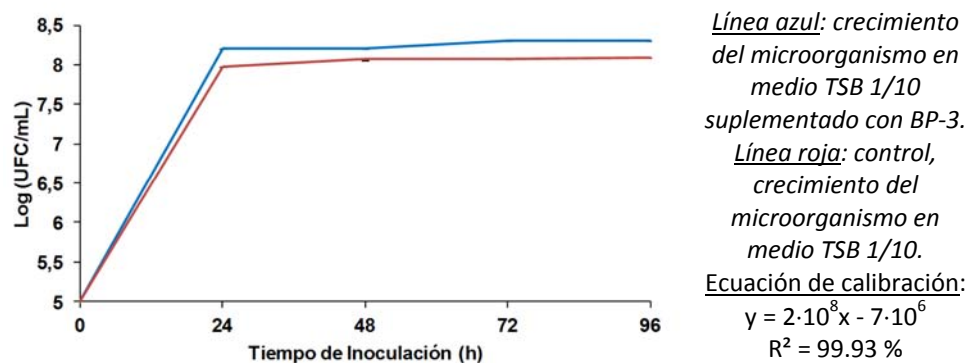


Figura VII.48. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-5** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Tras 24 h de se aprecia un aumento del número de microorganismos de más de 3 logaritmos en presencia del compuesto. A partir de este tiempo de incubación el número de células se mantiene relativamente estable hasta el final del ensayo. Los resultados a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h fueron de $8.20 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.20 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.29 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.30 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-7**

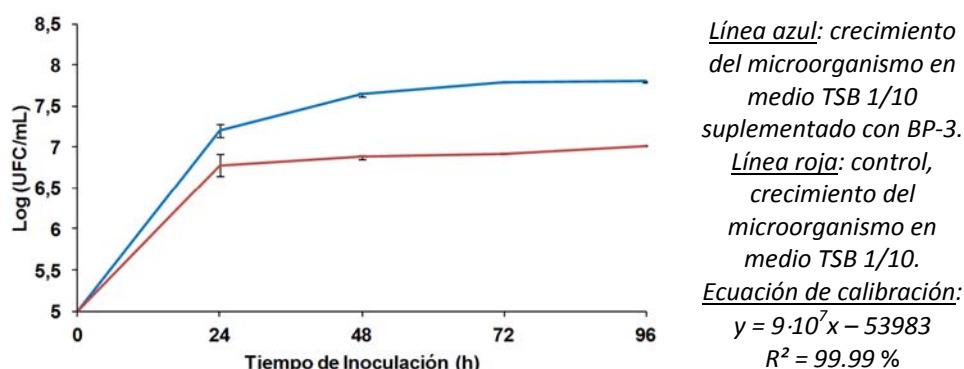


Figura VII.49. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-7** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Tras 24 h de cultivo, se observa un aumento de aproximadamente 2 logaritmos en relación al recuento de UFC mL⁻¹, resultando interesantes las diferencias de crecimiento entre el control y el ensayo con compuesto a los diferentes tiempos de incubación. El crecimiento en presencia del compuesto a las 24 h fue de 7.20 ± 0.07 , observándose un ligero aumento a las 48 h y 72 h de cultivo, con resultados de 7.64 ± 0.02 ; $7.78 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.79 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a las 48 h, 72 h y 96 h. Los crecimientos en los cultivos control generaron un resultado de 6.78 ± 0.12 ; 6.88 ± 0.02 ; 6.92 ± 0.01 y 7.01 ± 0.01 a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-10**

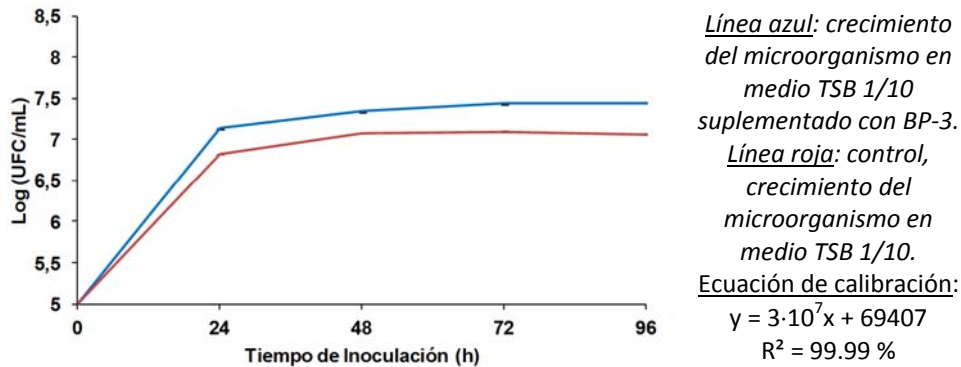


Figura VII.50. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-10** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Tras 24 h el aumento de crecimiento desde el inicio del ensayo con BP-3 fue de aproximadamente 2 logaritmos. Tras 48 h, el número de microorganismos se mantiene aproximadamente constante hasta final del ensayo. Los resultados a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h en el ensayo con compuesto fueron de $7.13 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; $7.34 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.43 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.44 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-11**

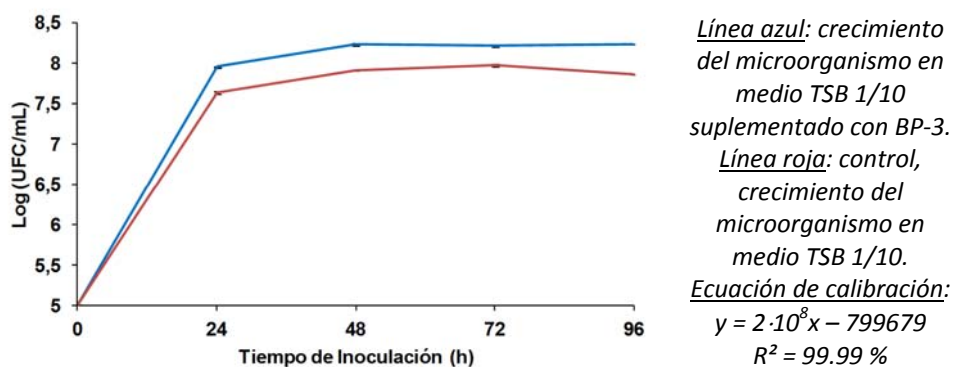


Figura VII.51. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-11** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Tras 48 h de cultivo se alcanza una fase estacionaria que se mantiene hasta el final del ensayo. A las 24 h se aprecia un aumento del crecimiento de aproximadamente 3 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de $7.94 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos fueron de 8.22 ± 0.01 ; 8.21 ± 0.01 ; $8.22 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. Al igual que sucede en casos anteriores, se observó que los crecimientos en los cultivos control fueron inferiores respecto a los cultivos del microorganismo en presencia de BP-3.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-14**

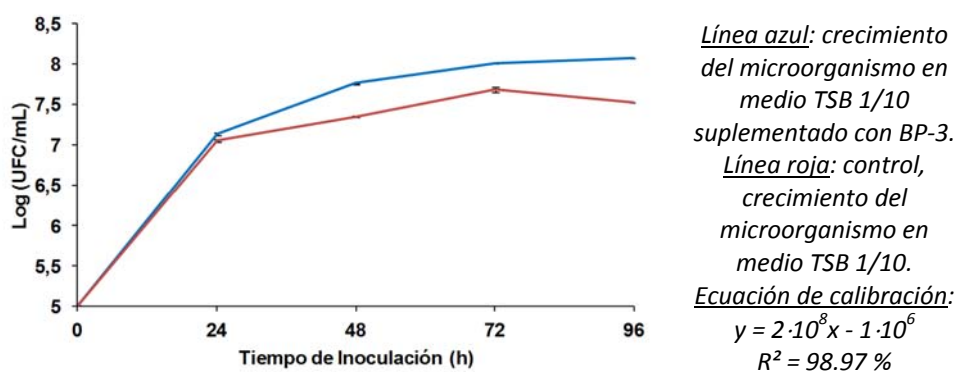


Figura VII.52. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-14** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Tras 24 h de cultivo el aumento crecimiento es de aproximadamente 2 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de 7.13 ± 0.01 . Se observa que, durante los siguientes tiempos de incubación el número de células continúa aumentando apreciándose una diferencia de log UFC mL⁻¹ entre las 24 h y 96 h de cultivo de 1 logaritmo aproximadamente. Este mismo comportamiento se observa en el ensayo control aunque se aprecia que los cultivos control fueron ligeramente inferiores respecto a los cultivos del microorganismo en presencia del compuesto. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos en el ensayo con compuesto fueron de 7.75 ± 0.01 ; $8.01 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.07 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-16**

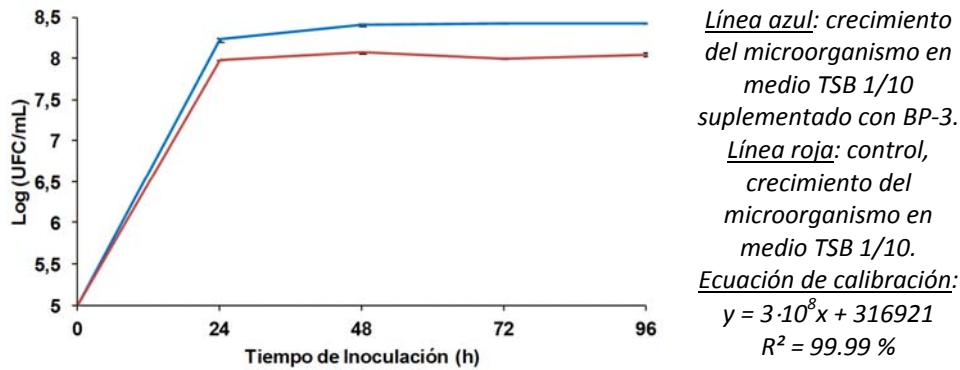


Figura VII.53. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-16** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Al igual que sucede en el caso del BP-3-5, tras 24 h de se aprecia un aumento del número de microorganismos de más de 3 logaritmos en presencia del compuesto. A partir de este tiempo de incubación el número de células se mantiene relativamente estable hasta el final del ensayo. Los resultados a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h fueron de 8.22 ± 0.02 ; 8.40 ± 0.01 ; $8.42 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.42 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-18**

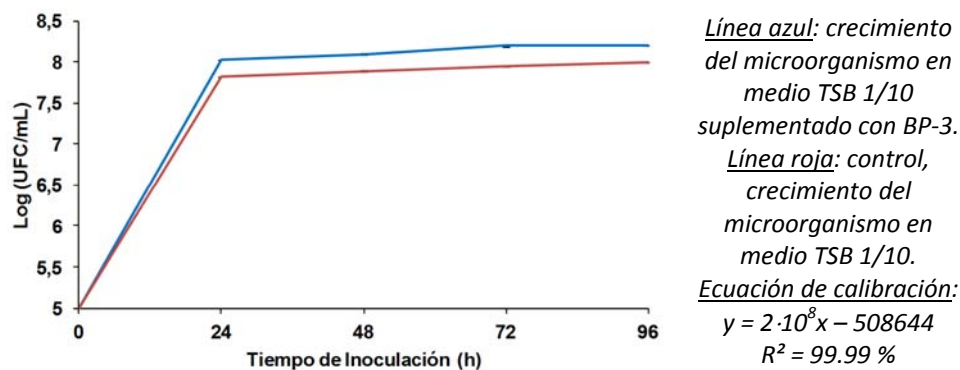


Figura VII.54. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-18** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

En el caso del cultivo realizado con el microorganismo BP-3-18 se aprecia un aumento de aproximadamente 3 logaritmos tras 24 h de cultivo ($\log \text{UFC mL}^{-1} = 8.03 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$), manteniéndose relativamente constante el número de microorganismos a las 48 h, 72 h y 96 h, con resultados de $8.09 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; 8.19 ± 0.01 y $8.21 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-20**

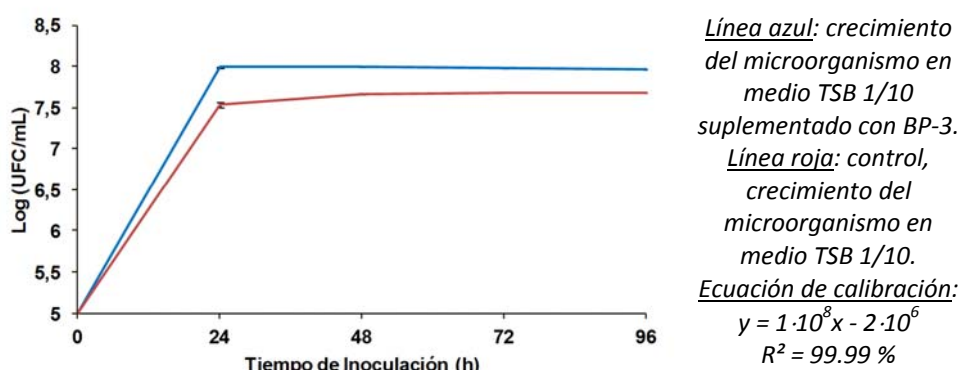


Figura VII.55. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-20** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Se produce un aumento de aproximadamente 3 logaritmos tras 24 h de cultivo ($7.98 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$), manteniéndose relativamente constante a 48 h, 72 h y 96 h, con resultados de $7.99 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.97 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.95 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. La diferencia de crecimiento respecto al cultivo control fue más acusada a las 24 h de cultivo respecto al resto de tiempos de incubación (aproximadamente 0.5 logaritmos).

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BP-3-21**

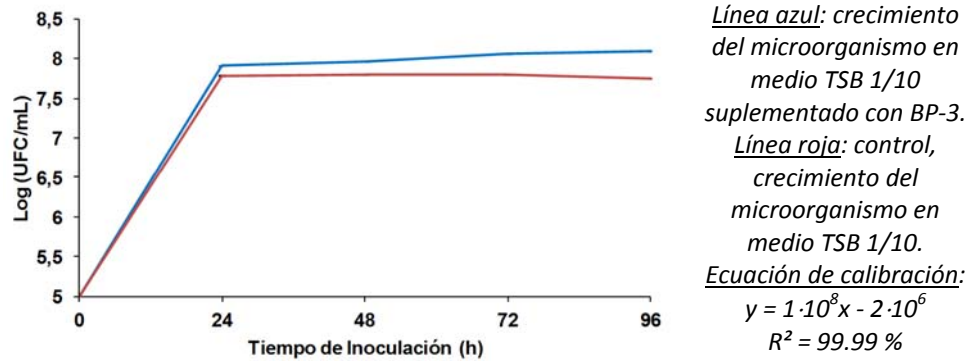


Figura VII.56. Cinética de crecimiento del microorganismo **BP-3-21** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BP-3

Los resultados obtenidos en este caso son muy similares a los que se obtuvieron en el caso el microorganismo anterior aunque en este caso, con un aumento algo menor a 3 logaritmos a las 24 h respecto al tiempo inicial de ensayo. Tras este tiempo el número de microorganismos se mantiene prácticamente constante hasta final del ensayo. Los resultados a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h en el cultivo con el compuesto fueron de $7.92 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.95 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.06 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.10 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

Como resultado de las cinéticas de crecimiento de los diferentes microorganismos seleccionados, en la **tabla VII.23** se expone la diferencia de crecimiento ($\log \text{ UFC mL}^{-1}$) entre los cultivos en presencia de BP-3 y los cultivos control sin compuesto tras 48 h de ensayo. La mayor diferencia de crecimiento entre ambos cultivos se observó en el caso del ensayo con el microorganismo BP-3-7, siendo éste de 10.0 %.

Tabla VII.23. Relación entre los cultivos de los diferentes microorganismos en presencia y ausencia de BP-3 a las 48 h de incubación. **A:** Cultivo en presencia de compuesto. **B:** Cultivo en ausencia de compuesto. Resultados expresados como log UFC mL⁻¹

<i>Microorganismo</i>	A – B (log UFC mL ⁻¹)	<i>Microorganismo</i>	A – B (log UFC mL ⁻¹)
BP-3-1	0.19	BP-3-14	0.41
BP-3-5	0.14	BP-3-16	0.33
BP-3-7	0.76	BP-3-18	0.21
BP-3-10	0.26	BP-3-20	0.33
BP-3-11	0.31	BP-3-21	0.16

6.4.2. Degradación de BP-3 en Presencia de Diferentes Microorganismos

La cantidad del compuesto degradada en presencia de los diferentes microorganismos fue similar en todos los ensayos realizados. En la **tabla VII.24** se observa que tras 96 h de cultivo, todos los microorganismos ensayados degradaron el compuesto en una concentración superior al 75 %, siendo casi total la degradación en el caso del microorganismo BP-3-1 (99.3 %) y BP-3-14 (99.9 %). Los microorganismos que degradaron el compuesto en menor porcentaje fueron BP-3-7 (78.0 %) y BP-3-11 (76.3 %).

Tabla VII.24. Concentración final de BP-3 (ppm) determinada mediante LC-MS/MS. Concentración inicial 5 ppm. **A:** Concentración final (ppm) de BP-3 detectada tras 96 h de cultivo con diferentes microorganismos aislados de suelos tratados con MPB. **B:** Concentración de BP-3 degradada (ppm) tras finalizar el ensayo

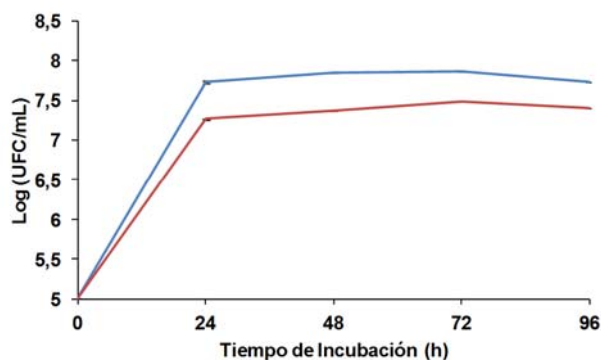
Microorganismo	A (ppm)	B (ppm)
BP-3-1	0.03	4.05
BP-3-5	0.43	3.65
BP-3-7	0.89	3.18
BP-3-10	0.36	3.72
BP-3-11	0.96	3.12
BP-3-14	$1.0 \cdot 10^{-3}$	4.08
BP-3-16	0.59	3.48
BP-3-18	0.53	3.55
BP-3-20	0.27	3.81
BP-3-21	0.68	3.39
CONTROL	4.08	

6.5. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Bisfenol A como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto

6.5.1. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Bisfenol A

En las **figuras VII.57 - VII.66** se describen los resultados obtenidos para las cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados de suelos tratados con BFA en las parcelas experimentales.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-1**



Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con BFA.

Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:

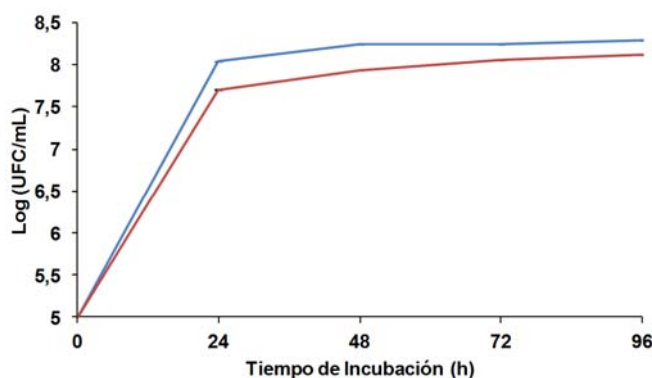
$$Y = 8 \cdot 10^7 x + 1 \cdot 10^5$$

$$R^2 = 99.98 \%$$

Figura VII.57. Cinética de crecimiento del microorganismo BPF-1 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Tras 24 h de cultivo el crecimiento (expresado como log UFC mL⁻¹) en presencia del compuesto fue de 7.73±0.01, manteniéndose prácticamente constante a 48 h, 72 h y 96 h con resultados de 7.85±1.0·10⁻³, 7.85±1.0·10⁻³ y 7.73±1.0·10⁻³. Los crecimientos en los cultivos fueron 7.26±3.0·10⁻³, 7.37±2.0·10⁻³; 7.48±2.0·10⁻³ y 7.40±2.0·10⁻³. Existe una mínima diferencia de crecimiento entre ambos cultivos siendo tras 96 h de 0.3 logaritmos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-3**



Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con BFA.

Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:

$$Y = 2 \cdot 10^8 x - 57560$$

$$R^2 = 99.99 \%$$

Figura VII.58. Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-3 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Al igual que en el resto de los ensayos, se produce un crecimiento del microorganismo de $8.04 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ tras 24 h de cultivo. Los recuentos a 48 h, 72 h y 96 h fueron de $8.23 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $8.24 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.29 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. En el ensayo con el compuesto, se aprecia un aumento de crecimiento respecto al inicio del ensayo de 3 logaritmos tras 24 h de cultivo. En relación al cultivo control, y dado que ambos cultivos presentaban un soporte de carbono (TSB diluido 1/10) al igual que en todos los cultivos, se pudo observar que el microorganismo BFA-3, creció hasta lograr un aumento en el número de UFC mL^{-1} de 2.7 logaritmos tras 24 h. Los recuentos del ensayo control fueron de $7.71 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$; $7.93 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; $8.05 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $8.12 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-4**

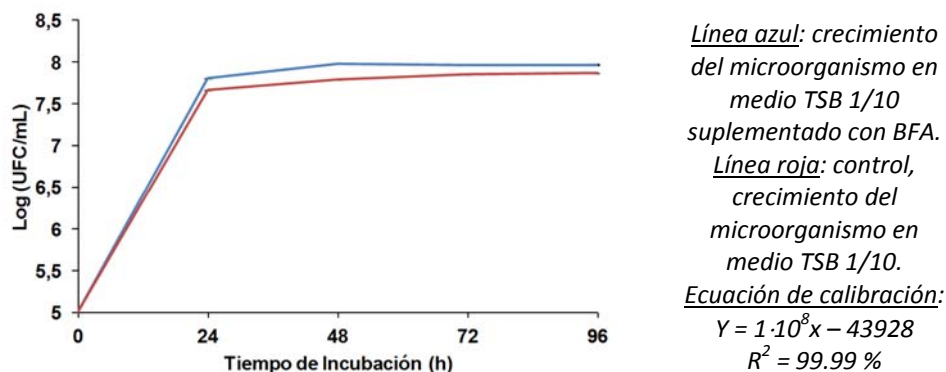


Figura VII.59. Cinética de crecimiento del microorganismo **BFA-4** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Tras 24 h de cultivo el crecimiento aumenta en aproximadamente 2.8 logaritmos respecto al inicio del ensayo a tiempo 0 h, con un resultado de $7.81 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos fueron de $7.98 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.96 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.97 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. Puede apreciarse que a lo largo del tiempo los recuentos se mantuvieron prácticamente constantes. Además, se observa que los crecimientos de los cultivos control fueron similares a los cultivos en presencia de BFA.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-5**

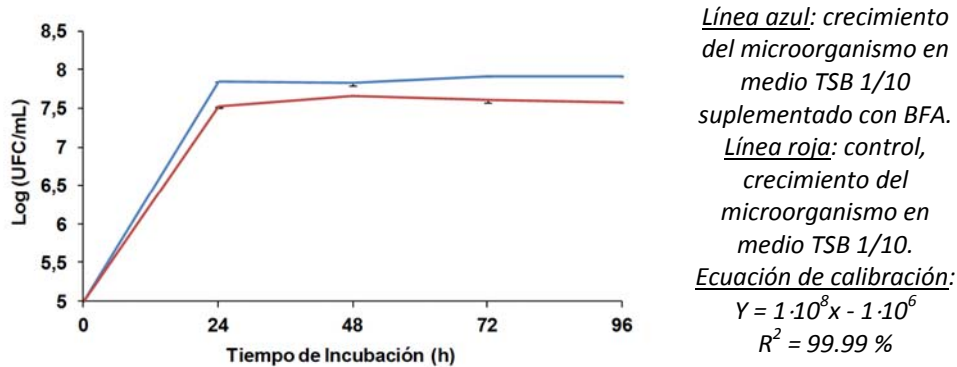


Figura VII.60. Cinética de crecimiento del microorganismo **BFA-5** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Se observa un aumento de casi 3 logaritmos tras 24 h ($7.84 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$), manteniéndose prácticamente constante a las 48 h, 72 h y 96 h, con resultados de 7.82 ± 0.02 ; $7.91 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.91 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ respectivamente. La diferencia de crecimiento respecto al cultivo control tras 96 h de cultivo fue aproximadamente de 0.3 logaritmos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-6**

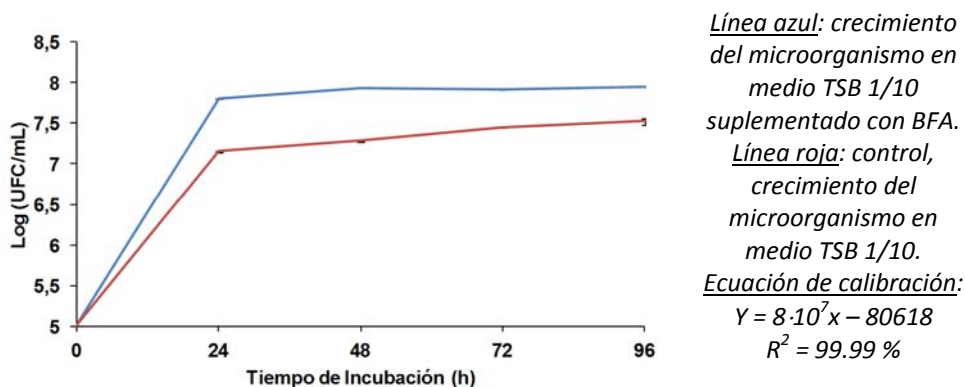


Figura VII.61. Cinética de crecimiento del microorganismo **BFA-6** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Tras 24 h de cultivo, se observa un aumento de aproximadamente 2.8 logaritmos respecto al inicio del ensayo, siendo en el control (sin compuesto) al mismo tiempo de incubación, de 2.1 logaritmos. Esta diferencia en el recuento se mantiene a las 48 h (0.65 logaritmos) reduciéndose levemente a las 72 h y 96 h. El crecimiento del microorganismo en presencia del compuesto a las 48 h, 72 h, y 96 h fue de $7.93 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, $7.92 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.95 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. En el caso del cultivo control los crecimientos alcanzados fueron de $7.15 \pm 9.0 \cdot 10^{-3}$, $7.28 \pm 6.0 \cdot 10^{-3}$, $7.45 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$ y 7.53 ± 0.03 a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-8**

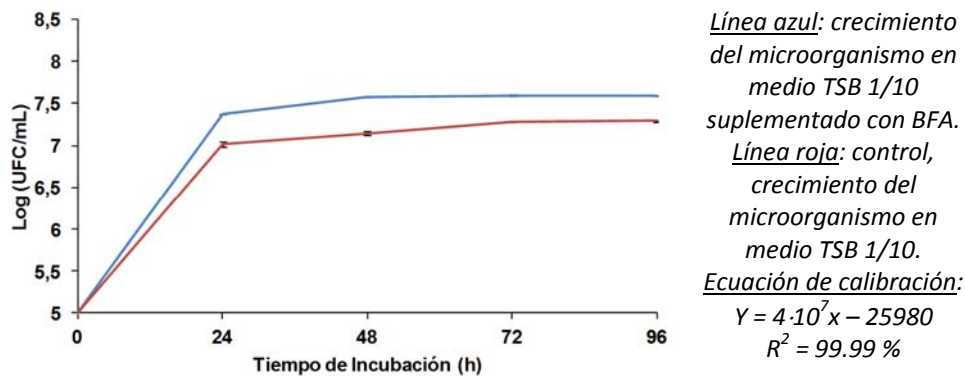


Figura VII.62. Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-8 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

El aumento de crecimiento tras 24 h de cultivo fue de 2.4 logaritmos aproximadamente, con un resultado de $7.37 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ (resultado expresado como $\log \text{ UFC mL}^{-1}$). Se aprecia igualmente, un crecimiento microbiano en los cultivos control de 2 logaritmos. Los resultados a 48 h, 72 h y 96 h del en presencia de BFA fueron de $7.58 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, 7.59 ± 0.01 y $7.59 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ ($\log \text{ UFC mL}^{-1}$), respectivamente. Se aprecia nuevamente que la diferencia del número de microorganismos entre el cultivo con el compuesto y el control se mantiene a lo largo del ensayo.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-9**

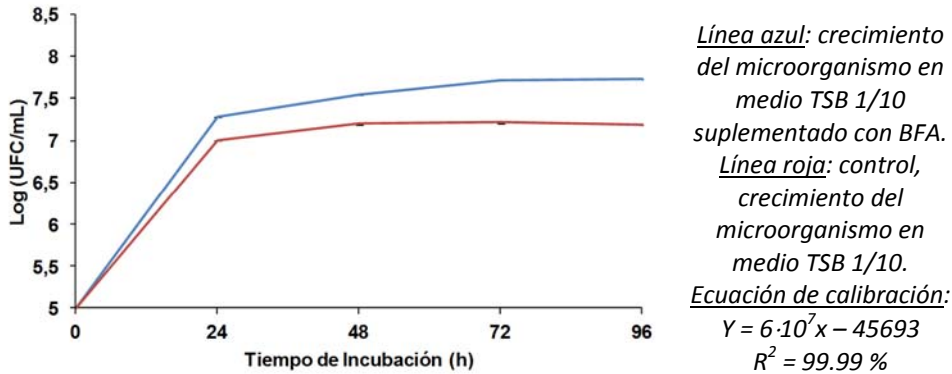


Figura VII.63. Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-9 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Se produce un aumento crecimiento entre el ensayo con compuesto respecto al control. Tras 24 h, en el ensayo con BFA, se alcanza un recuento superior a 2 logaritmos ($7.28 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$). Además, los recuentos aumentan al aumentar el tiempo de incubación con resultados de $7.55 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.71 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a 48 h y 72 h de incubación, manteniéndose prácticamente constante a 96 h. En el ensayo control el número de microorganismos se mantiene constante a partir de las 48 h con un resultado de $7.19 \pm 3.0 \cdot 10^{-3}$.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-10**

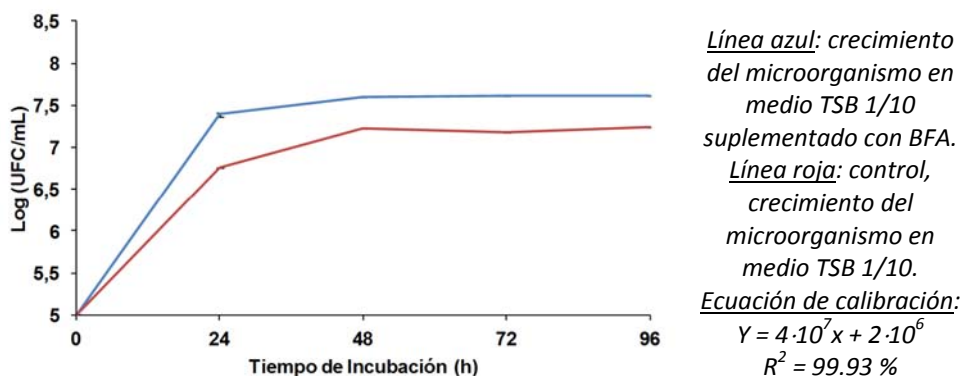


Figura VII.64. Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-10 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

En este caso, se aprecia una diferencia significativa de crecimiento entre el ensayo con BFA y sin el compuesto. Tras 24 h de crecimiento con el compuesto se produce un aumento de 2.5 logaritmos, no así en ausencia de compuesto cuyo aumento de crecimiento fue de 1.7 logaritmos. Al cabo de 48 h los crecimientos se estabilizan alcanzándose la fase de crecimiento estacionaria. Los recuentos en presencia de compuesto fueron de 7.38 ± 0.01 ; $7.59 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.61 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.61 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente. La cantidad de microorganismos tras 96 h en ausencia de compuesto fue de $7.24 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-11**

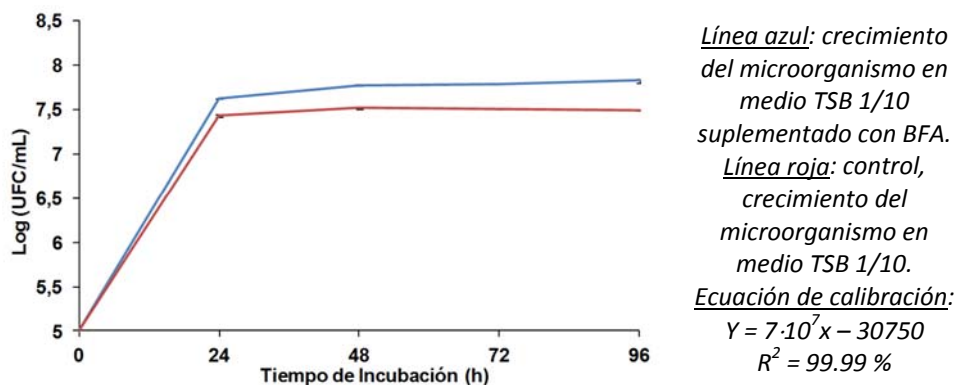


Figura VII.65. Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-11 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

Tras 24 h de cultivo se observa un aumento de crecimiento de 2.5 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de $7.62 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$. A 48 h el recuento se mantiene relativamente constante alcanzándose la fase estacionaria. Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos fueron de $7.77 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.77 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y 7.82 ± 0.02 . Por otro lado, se observa que, al igual que sucede en los casos anteriores, los crecimientos de los cultivos control fueron inferiores a los cultivos del microorganismo en presencia del compuesto, con un resultado tras 96 h de $7.48 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo BFA-12**

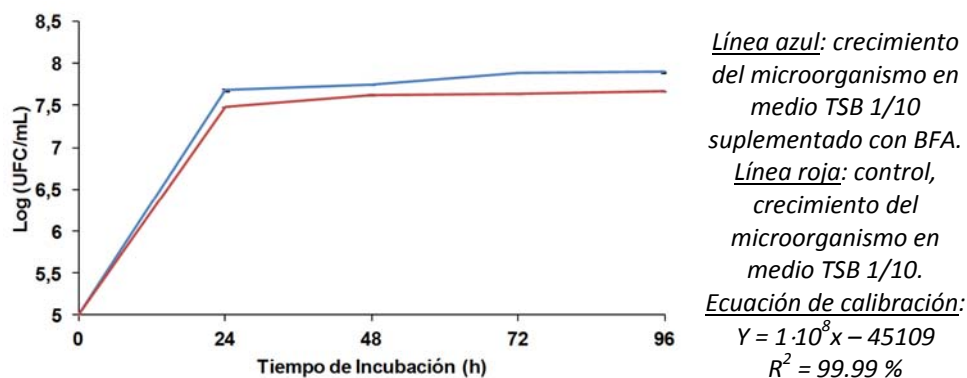


Figura VII.66. Cinética de crecimiento del microorganismo **BFA-12** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de BFA

No se aprecian diferencias relevantes de crecimiento entre los cultivos con y sin el compuesto, aunque si resulta evidente, al igual que en casos anteriores, que tras 24 h de cultivo se produce un aumento de crecimiento microbiano del orden de 2.5 logaritmos. La fase de crecimiento se alcanza tras 24 h de cultivo, siendo los resultados de los recuentos a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de cultivo en presencia de compuesto de 7.68 ± 0.02 , $7.75 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.88 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y 7.89 ± 0.01 , respectivamente.

Como resultado de las cinéticas de crecimiento de los diferentes microorganismos seleccionados, en la **tabla VII.25** se expone la diferencia de crecimiento (expresado como $\log \text{ UFC mL}^{-1}$) entre los cultivos en presencia de BFA y los cultivos control sin compuesto tras 48 h de ensayo. La mayor diferencia de crecimiento entre ambos cultivos se observó en el caso del ensayo con el microorganismos BFA-6, siendo ésta de 8.2 %.

Estos datos se corresponden con los resultados de las cinéticas de crecimiento de los diferentes microorganismos seleccionados a partir de las parcelas de estudio.

Tabla VII.25. Relación entre los cultivos de los microorganismos en presencia y ausencia de BFA a las 48 h de incubación. **A:** Cultivo en presencia de compuesto. **B:** Cultivo en ausencia de compuesto. Resultados expresados como log UFC mL⁻¹

Microorganismo	A – B (log UFC mL⁻¹)	Microorganismo	A – B (log UFC mL⁻¹)
BFA-1	0.48	BFA-8	0.43
BFA-3	0.31	BFA-9	0.35
BFA-4	0.18	BFA-10	0.37
BFA-5	0.16	BFA-11	0.26
BFA-6	0.65	BFA-12	0.12

6.5.2. Degradación de BFA en Presencia de Diferentes Microorganismos

La cantidad de BFA degradada fue parecida en todos los ensayos. En la **tabla VII.26** se observa que tras 96 h de cultivo, todos los microorganismos degradaron el compuesto casi en su totalidad (>99.9 %.)

Tabla VII.26. Concentración final de BFA (ppm) determinada mediante LC-MS/MS. Concentración inicial 5 ppm. **A:** Concentración final (ppm) de BFA detectada tras 96 h de cultivo con diferentes microorganismos aislados de suelos tratados con BFA. **B:** Concentración de BFA degradada (ppm) tras finalizar el ensayo

Microorganismo	A (ppm)	B (ppm)
BFA-1	2.0·10 ⁻³	4.31
BFA-3	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-4	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-5	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-6	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-8	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-9	2.0·10 ⁻³	4.31
BFA-10	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-11	1.0·10 ⁻³	4.31
BFA-12	1.0·10 ⁻³	4.31
CONTROL	4.31	

6.6. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Triclocarbán como Fuente de C/E. Degradación del Compuesto

6.6.1. Cinéticas de Crecimiento Microbiano en Presencia de Triclocarbán

Las figuras VII.67 a VII.76 muestran los resultados obtenidos para las cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados de suelos tratados con TCB en las parcelas experimentales.

- Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-1

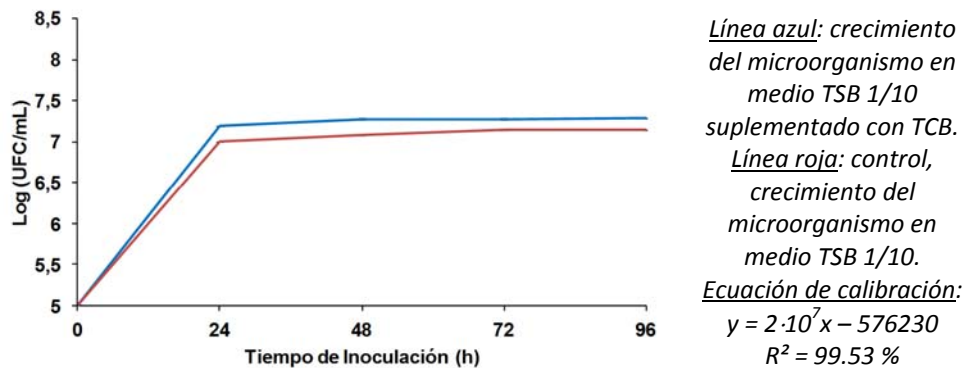
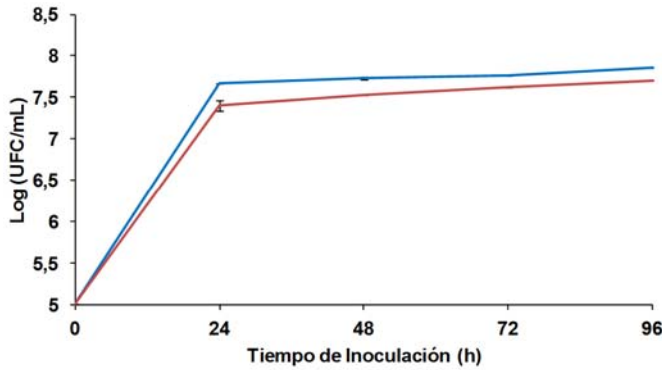


Figura VII.67. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-1 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

Tras 24 h de cultivo, se aprecia un aumento del número de microorganismos de 2 logaritmos, tanto en el cultivo con compuesto como en el cultivo control (ausente de TCB). Los resultados obtenidos de los cultivos en presencia de TCB fueron de $7.19 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$; $7.27 \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$; 7.27 ± 0.01 y $7.28 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente, apreciándose una fase estacionaria a partir de las 24 h de cultivo. En relación a los resultados del control, estos fueron similares.

Cinética de crecimiento de los microorganismos TCB-2, TCB-3 y TCB-4



Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con TCB.

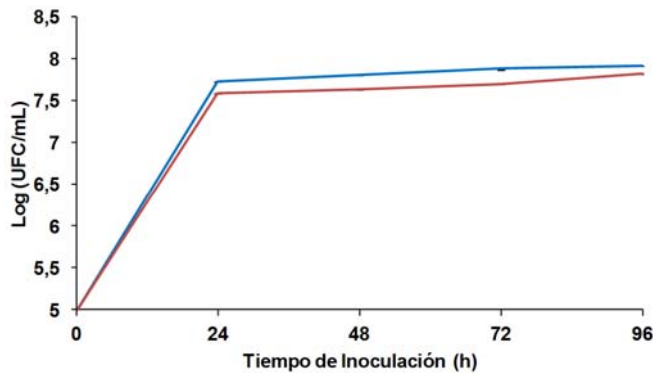
Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:

$$y = 1 \cdot 10^8 x + 487104$$

$$R^2 = 99.82 \%$$

Figura VII.68. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-2 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB



Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con TCB.

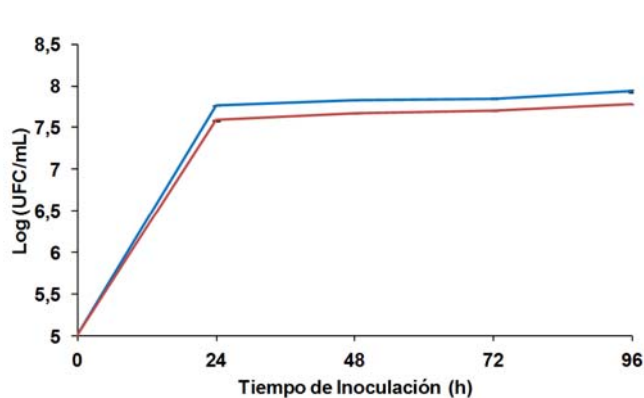
Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:

$$y = 1 \cdot 10^8 x + 155405.$$

$$R^2 = 99.99 \%$$

Figura VII.69. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-3 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB



Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con TCB.

Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:

$$y = 1 \cdot 10^8 x - 23253.$$

$$R^2 = 99.99 \%$$

Figura VII.70. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-4 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

Al observar las figuras se aprecia un comportamiento similar en relación al crecimiento de los microorganismos TCB-2, TCB-3 y TCB-4. Tras 24 h de cultivo se alcanza aproximadamente un aumento de crecimiento de 2.5 logaritmos respecto al inicio, a partir de aquí se observa una fase de crecimiento estacionaria. Tras 24 h los resultados fueron de $7.67 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.72 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.67 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, respectivamente, observándose una similitud entre ellos que se mantiene hasta el final del ensayo. Además se aprecia que la diferencia con sus respectivos controles es similar en los tres casos.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-5**

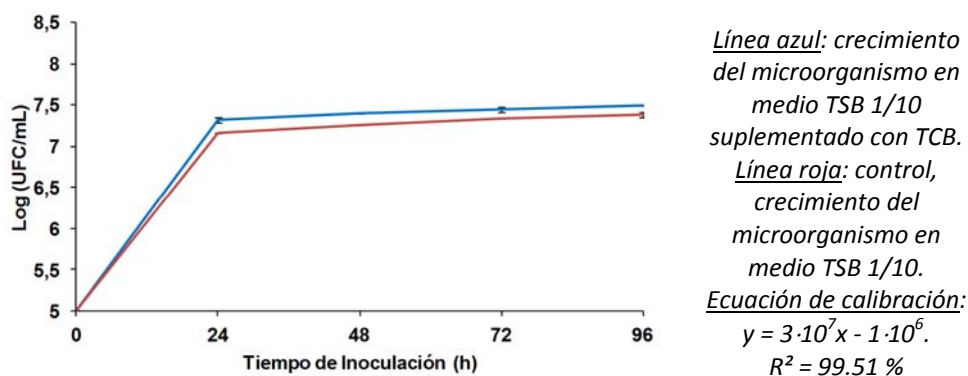


Figura VII.71. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-5 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

Se aprecia que el microorganismo TCB-5 presentó un comportamiento similar al del microorganismo TCB-1 en relación al crecimiento obtenido tras 24 h. En ambos casos el aumento de crecimiento fue de 2 logaritmos tras 24 h de cultivo. Después, se alcanza una fase de crecimiento estacionaria tanto en el cultivo control como en el cultivo en presencia del compuesto. No existe, por otro lado, una diferencia significativa en relación al número de microorganismos lo largo de la cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h fueron de 7.32 ± 0.03 ; $7.39 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; 7.44 ± 0.02 y $7.49 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$, respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-6**

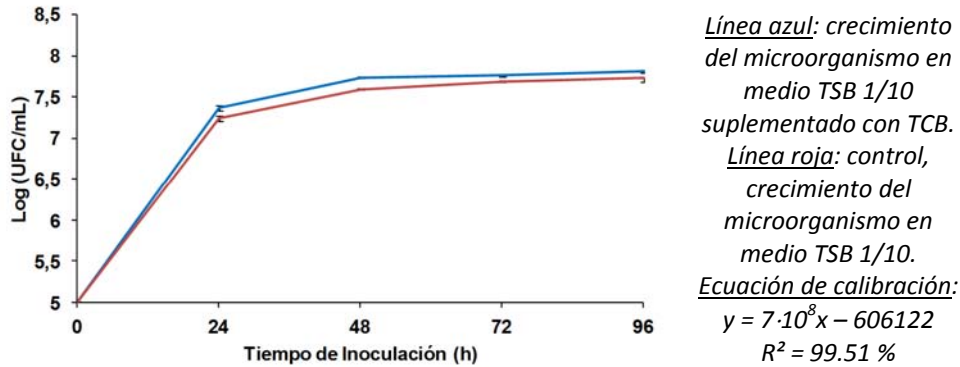


Figura VII.72. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-6 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

Tras 24 h de cultivo se logra un aumento del crecimiento de 2.3 logaritmos respecto al cultivo inicial. La fase estacionaria de la curva de crecimiento se alcanza tras 48 h. Pasadas 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos fueron de 7.73 ± 0.01 ; 7.76 ± 0.01 y 7.81 ± 0.01 . Al igual que sucede en casos anteriores, se pudo observar que los crecimientos en los cultivos control fueron similares respecto a los cultivos del microorganismo en presencia de TCB.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-7**

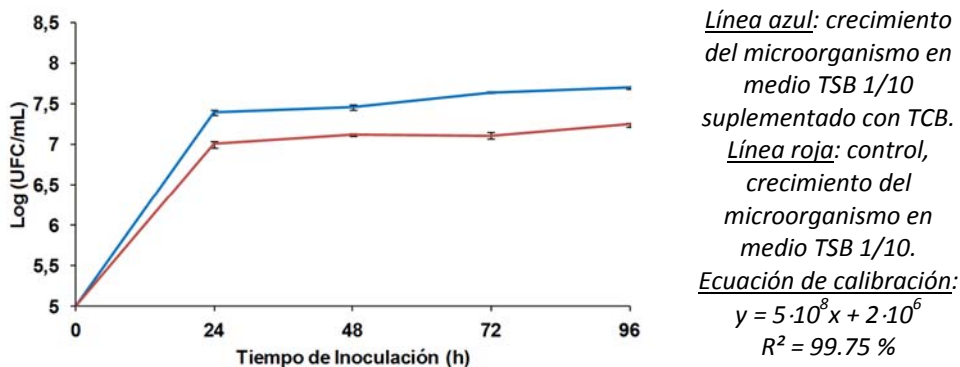


Figura VII.73. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-7 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

Tras 24 h de cultivo se pudo observar un aumento de crecimiento de aproximadamente 2.3 logaritmos respecto al cultivo inicial, con un resultado de 7.38 ± 0.03 . Tras 48 h, 72 h y 96 h los crecimientos obtenidos fueron de 7.45 ± 0.03 ; $7.63 \pm 9.0 \cdot 10^{-3}$ y 7.69 ± 0.01 respectivamente. Por otro lado, se observó que los crecimientos de los cultivos control fueron inferiores respecto a los cultivos del microorganismo en presencia del TCB.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-8**

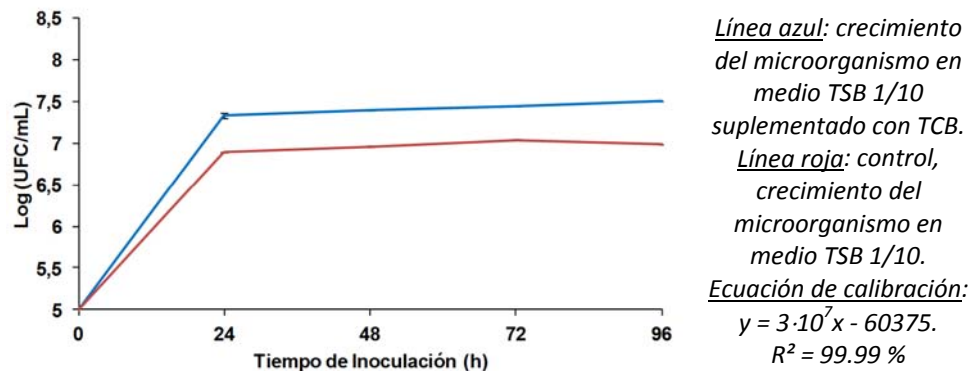
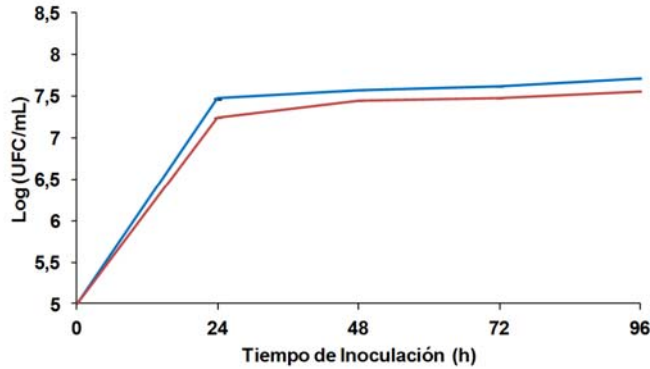


Figura VII.74. Cinética de crecimiento del microorganismo **TCB-8** en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

En los cultivos del microorganismo TCB-8 en presencia del compuesto, se observó el mismo comportamiento, siendo el crecimiento microbiano alcanzado tras 24 h de cultivo similar al caso anterior. A partir de este tiempo de cultivo se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento la cual se mantuvo hasta el final del ensayo. La diferencia de crecimiento entre el cultivo del microorganismo en presencia y en ausencia de compuesto fue de 0.45 logaritmos tras 24 h de cultivo. El resultado en presencia del compuesto fue de 7.34 ± 0.03 ; $7.39 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$; $7.44 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.51 \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$ a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h respectivamente.

- **Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-9 y TCB-10**

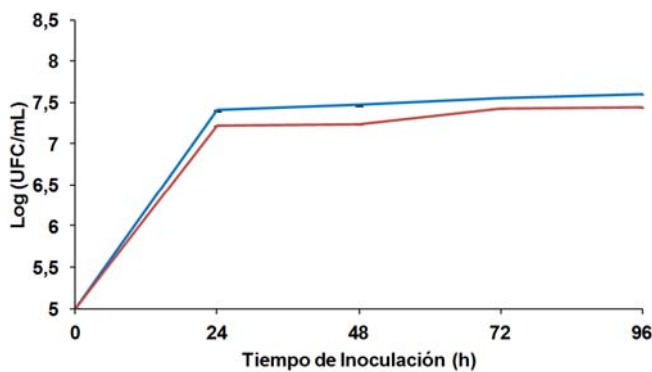


Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con TCB.

Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:
 $y = 6 \cdot 10^7 x - 136536.$
 $R^2 = 99.99 \%$

Figura VII.75. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-9 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB



Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con TCB.

Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

Ecuación de calibración:
 $y = 4 \cdot 10^7 x + 242074.$
 $R^2 = 99.99 \%$

Figura VII.76. Cinética de crecimiento del microorganismo TCB-10 en un medio de cultivo conteniendo 5 ppm de TCB

Por último, en la figura se aprecia un comportamiento similar en relación al crecimiento de los microorganismos TCB-9 y TCB-10. Tras 24 h de cultivo en ambos ensayos se observa un crecimiento de 2.5 logaritmos respecto al inicio del ensayo, a partir del cual se observa una fase de crecimiento estacionaria. Tras 24 h se obtuvo un resultado en el recuento de $7.47 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ y $7.40 \pm 2.0 \cdot 10^{-3}$ en los cultivos con compuesto y los microorganismos TCB-9 y TCB-10 respectivamente.

Como resultado de las cinéticas de crecimiento de los diferentes microorganismos estudiados, en la **tabla VII.27** se puede apreciar la diferencia de crecimiento (expresado como $\log \text{UFC mL}^{-1}$) entre los cultivos en presencia de TCB y los controles sin el compuesto tras 48 h de ensayo. La mayor diferencia de crecimiento entre ambos cultivos se observó en el caso del ensayo con el microorganismos TCB-8, siendo ésta de 5.8 %.

Tabla VI.27. Relación entre los cultivos de los microorganismos en presencia y ausencia de TCB a las 48 h de incubación. **A:** Cultivo en presencia de compuesto. **B:** Cultivo en ausencia de compuesto. Resultados expresados como $\log \text{UFC mL}^{-1}$

<i>Microorganismo</i>	<i>A – B</i> ($\log \text{UFC mL}^{-1}$)	<i>Microorganismo</i>	<i>A – B</i> ($\log \text{UFC mL}^{-1}$)
TCB-1	0.19	TCB-6	0.14
TCB-2	0.20	TCB-7	0.34
TCB-3	0.16	TCB-8	0.43
TCB-4	0.16	TCB-9	0.12
TCB-5	0.14	TCB-10	0.22

6.6.2. Degradación de TCB en Presencia de Diferentes Microorganismos

La cantidad de TCB degradado en presencia de diferentes microorganismos fue diferente en los diversos ensayos. En la **tabla VII.28** se observa que tras 96 h de cultivo, la mayor parte de los microorganismos (7 de 10) degradaron este compuesto en una concentración superior al 70 %, siendo los microorganismos que degradaron este compuesto en mayor proporción el TCB-4 (92.3 %) y TCB-8 (95.6 %). El microorganismo que menos degradó el compuesto fue el TCB-3 (4.5 %).

Tabla VII.28. Valores de concentración final de TCB (ppm) determinada LC-MS/MS. Concentración inicial 5 ppm. **A:** Concentración final (ppm) de TCB detectada tras 96 h de cultivo con diferentes microorganismos aislados de suelos tratados con TCB. **B:** Concentración de TCB degradada (ppm) tras finalizar el ensayo

Microorganismo	A (ppm)	B (ppm)
TCB-1	1.36	3.41
TCB-2	0.51	4.26
TCB-3	4.55	0.21
TCB-4	0.36	4.41
TCB-5	1.25	3.52
TCB-6	1.51	3.26
TCB-7	0.62	4.15
TCB-8	0.21	4.56
TCB-9	0.69	4.07
TCB-10	2.14	2.63
CONTROL	4.77	

7. Discusión

En los estudios de microbiología realizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral se ha pretendido evaluar los efectos que producen los compuestos MPB, BPB, BP-3, BFA, TCS y TCB sobre la microbiota del suelo. Para ello, tal y como se ha descrito, se aplicó una determinada concentración de compuesto sobre las parcelas, con objeto de estudiar el comportamiento microbiano a diferentes profundidades.

En un primer ensayo, se estudiaron suelos agrícolas de parcelas con y sin aplicación de compost. A continuación, las siguientes determinaciones se realizaron bajo condiciones físicas y químicas controladas, con objeto de determinar la capacidad de crecimiento de los diferentes microorganismos seleccionados frente a concentraciones conocidas de distintos compuestos. Las cinéticas de crecimiento aportaron una importante información ya que paralelamente se obtuvieron resultados de la reducción de la concentración de compuesto, y por tanto de la capacidad de biodegradación de los microorganismos utilizados a tal fin. Por otro lado, la caracterización bioquímica, concretamente ensayos de utilización de diferentes fuentes de carbono así como ensayos de actividades enzimáticas de los microorganismos nos permitió establecer que los microorganismos implicados en los ensayos de biodegradación eran metabólicamente diferentes.

7.1. Recuento de la Microbiota Presente a Diferentes Profundidades de Suelos y Suelos Enmendados con Compost, Tratados con Diferentes Compuestos en las Parcelas Experimentales

- Parcelas de suelos sin compost

La profundidad del suelo afecta la densidad bacteria, por lo general la abundancia bacteriana disminuye con la profundidad^{192,193}. En el estudio desarrollado, en el caso de las parcelas tratadas con los compuestos pero sin compost (**figuras VII.4 - VII.9**), se puede observar que se produce un notable decrecimiento del número de microorganismos heterótrofos cultivables tanto en las parcelas control como las parcelas tratadas con los diferentes compuestos a medida que aumenta la profundidad del suelo (2, 30 y 60 cm), es decir, se produce una tendencia progresiva descendente del número de microorganismos a medida que aumenta la profundidad del suelo, repitiéndose este comportamiento en todos los ensayos realizados a lo largo del tiempo (0, 15 y 30 días).

Janssen y colaboradores¹⁹⁴ y Jense y colaboradores¹⁹⁵ describen que este comportamiento puede deberse a una alteración biológica como consecuencia de la fluctuación en la cantidad de carbono orgánico y

¹⁹² Hastings, R.C., Butler, C., Singleton, I., Saunders, J.R., McCarthy, A.J. Analysis of ammonia oxidizing bacteria populations in acid forest soil during conditions of moisture limitation. *Letters in Applied Microbiology* 30 (2000) 14-18.

¹⁹³ Holmes, A. J., Bowyer, J., Holley, M.P. Donoghe M., Montgomery M., Gillings M.R. Diverse, yet to be cultured members of the rubrobacter subdivision of the actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiology Ecology* 33 (2002) 111-120.

¹⁹⁴ Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B. E., Taylor, P.M., Sait, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the division acidobacteria, actinobacteria, pseudobacteria, and verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) 2391-2396.

¹⁹⁵ Jensen, L. E., Nybroe, O. Nitrogen availability to *Pseudomonas fluorescens* DF57 is limited during decomposition of barley straw in bulk soil and in the barley rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 4320-4328.

oxígeno disponibles en el suelo. Generalmente estos parámetros disminuyen a medida que aumenta la profundidad. También pueden influir parámetros tales como la humedad, el pH, las sales minerales del suelo y el CO₂ disponible.

Al cabo de 30 días de tratamiento el porcentaje de microorganismos en la superficie de los suelos tratados con los compuestos estudiados fue diferente. En suelos tratados con MPB y BPB, el número de microorganismos al finalizar el ensayo aumentó en un 1.3 y 2.8 % respecto a los suelos a tiempo inicial. En el caso de suelos tratados con TCS y TCB el porcentaje de microorganismos se duplicó respecto a los compuestos anteriores siendo de 4.5 y 4.4 % respectivamente. El mayor número de microorganismos detectados al final del ensayo en superficie fue en los suelos tratados con BP-3 y BFA con un aumento respecto al día 0 de 9.4 y 7.9 %. Los porcentajes indicados corresponden al % de los valores de log UFC g suelo.

En las muestras de suelo tomadas a 30 cm de profundidad, los mayores recuentos se obtuvieron en suelos tratados con BPB y TCB, con un aumento en el número de microorganismos respecto al día inicial de ensayo de 9.1 % y 8.1 %, respectivamente. De igual modo, se obtuvo un 6.5 % más de microorganismos en los suelos tratados con BFA. En el caso de MPB, BP-3 y TCS el aumento de microorganismos al cabo de 30 días fue de 0.3 %, 1.6 % y 2.2 % respectivamente, no considerándose un aumento significativo de microorganismos en estos casos.

En el caso de suelos analizados a la profundidad de 60 cm, el mayor número de microorganismos se obtuvo en el suelo tratado con BFA con un aumento del número de microorganismos del 16.9 % (log UFC g suelo). Estos datos se consideraron significativos ya que indica que se produce un aumento notable en relación al número de microorganismos heterótrofos,

no obstante se ha de considerar que el número de microorganismos a esta profundidad fue inferior respecto al número de microorganismos recontados en superficie y a 30 cm. Pudo detectarse que en el suelo tratado con BP-3 el aumento microbiano fue del 3.4 % no considerándose estimable en el resto de suelos tratados con resultados inferiores a 2.0 %.

Los resultados obtenidos a las diferentes profundidades hacen pensar que posiblemente los procesos de percolación de compuestos pueden influir en el número de microorganismos con capacidad de crecimiento en suelos tratados. Otros hechos que pudieron haber incidido, pueden ser la variabilidad de los factores ecológicos como el contenido del agua del suelo, la temperatura y de las actividades microbianas de cómo pueden responder en presencia de estos compuestos. Se debe matizar que durante el tiempo que duró el estudio se produjeron abundantes precipitaciones, por lo que se pudo facilitar el desarrollo de la microbiota del suelo, dado que los suelos presentaban abundante humedad en el momento de la toma de muestra. Estos factores ecológicos podrían ejercer un mayor efecto sobre los microorganismos del suelo que los compuestos en este estudio, tal y como mencionan Busse y colaboradores¹⁹⁶ y Domsch y colaboradores¹⁹⁷. Otros autores, igualmente comentan acerca de este efecto; así, Weber y colaboradores¹⁹⁸ explican cómo la humedad del suelo y la temperatura afectan directamente sobre los procesos biológicos del suelo tal como el metabolismo de las plantas y la degradación microbiana.

¹⁹⁶ Busse, M., Ratcliff, A., Shestak, C., Powers, R. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33 (2001) 1777-1789.

¹⁹⁷ Domsch, K., Jagnow, G., Anderson, T. An ecological concept for the assesment of sides effects of agrochemicals on soils microorganisms. *Residue Reviews* 86 (1983) 65-105.

¹⁹⁸ Weber, J., Best, J., Gonese, J. Bioavaibility and bioactivity of sorbed organic chemicals. In D.M LINN et al., eds. Sorption and degradation of pesticides and organic chemicals in soil. *Maddison, WI: American Society of Agronomy And Soil Science Society of America* (1993) 153-196.

- **Parcelas de suelos suplementados con compost**

La fertilidad de los suelos agrícolas está íntimamente ligada a su microbiota particular y a las relaciones que existen entre los grupos microbianos involucrados en los ciclos de los nutrientes, los cuales son esenciales para el funcionamiento y la evolución normales del suelo¹⁹⁹.

En las parcelas de suelos adicionados de compost, tanto en las parcelas control como las tratadas con los diferentes compuestos, se pudo observar que el desarrollo microbiano fue mayor en superficie respecto a las profundidades de 30 y 60 cm. Es de destacar que se observó un mayor desarrollo microbiano en las parcelas adicionadas de compost respecto a los suelos sin compost, a todos los tiempos de muestreo, y en todas las parcelas tratadas con los diferentes compuestos. Este hecho indica que resulta muy aprovechable el uso del compost en suelos agrícolas ya que produce un incremento de los microorganismos que son beneficiosos para los cultivos²⁰⁰. Es sabido que un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para las plantas o bien una población microbiana capaz de aportar nutrientes que permitan un buen desarrollo de los vegetales²⁰¹.

El compost aporta al suelo materias orgánicas y en general nutrientes que proporciona mejoras al suelo agrícola dado que favorece

¹⁹⁹ Paul, D., Pandey, G., Meier, C., Van de Meer, J.R., Jain, R.K. Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology* 57 (2006) 116-127.

²⁰⁰ Bigeriego Martín de Saavedra, M., Bellido de Lestable, N., Miralles de Imperial, R., Porcel, M.A., Delgado, M.M., García, J., Beltrán, E.M. Empleo de compost de depuradora como fertilizante en cultivo de maíz. *Vida rural* 109 (2000) 24-26.

²⁰¹ Beltrán, E.M., Miralles de Imperial, R., Porcel, M.A., Beringola, M.L., Martín, J.V., Calvo, R. and Delgado, M.M. Impact of sewage sludge compost utilization on chemical properties of olive grove soils. *Compost science and utilization* 14 (2006) 260-266.

simultáneamente el desarrollo de la comunidad bacteriana del suelo²⁰². La microbiota del suelo es la responsable de la descomposición de la materia orgánica, la producción de humus, fijación del nitrógeno atmosférico, solubilización de nutrientes esenciales como el fósforo, control biológico de plagas y enfermedades, descomposición de xenobióticos y otros²⁰³. Es por eso que es necesaria la utilización del compost para una mejor fertilización de los suelos agrícolas ya que su uso aumenta la biodiversidad de los microorganismos del suelo que afectan en la descomposición de la materia orgánica que contribuye a la fertilidad del suelo²⁰⁴. Por otro lado, la utilización del compost ayuda a la integridad de la capacidad metabólica de la microbiota del suelo, siendo éste un requerimiento fundamental para el mantenimiento de la calidad de los suelo²⁰⁵. Estos microorganismos también pueden actuar como control biológico facilitando la reducción de microorganismos indeseables mejorando la calidad de los suelos y por tanto en una mejora del desarrollo vegetal.

Por otro lado, es de destacar que los compuestos utilizados en este estudio no resultan ser perjudiciales para el desarrollo microbiano a la concentración de 5 ppm, tal y como se ha demostrado a lo largo de los ensayos. Este hecho se pudo demostrar con los ensayos realizados a las diferentes profundidades y teniendo en cuenta la percolación de los compuestos.

²⁰² Alvarez, C., Alvarez, R., Grigera, M. Lavado, R. Associations between organic matter fractions and the active soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (1997) 767-773.

²⁰³ Moreira, F., Siquiera, J. Xenobióticos no solo. In: Moreira, F., Siquiera, J. O. Microbiología e bioquímica do Solo. *Lavras: UFLA* (2002) 243-284.

²⁰⁴ Bromilow, R., Evans, A., Nichols, P., Todd, A., Briggs, G. The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years. *Pesticide Science* 48 (1996) 63-72.

²⁰⁵ Alef, K. Soil respiration. In: Alef, K., Nannipieri, P. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London, Academic Press (1995) 214-219.

7.2. Degradación de los Compuestos Utilizando Microorganismos Aislados de las Parcelas Experimentales

Tal y como se ha descrito en el apartado de resultados, se realizaron diferentes cultivos con una concentración conocida de los diferentes compuestos (5 mg L^{-1}), utilizando diferentes microorganismos aislados de las parcelas tratadas con los compuestos. Se pretendió determinar el posible crecimiento de los microorganismos utilizando como fuente de carbono los compuestos de estudio (MPB, BPB, BP-3, BFA Y TCB).

Se utilizaron diez microorganismos diferentes para cada compuesto. Los resultados obtenidos proporcionaron una evidencia de la capacidad de biodegradación de los microorganismos en presencia de estos compuestos. Nuestros resultados fueron concordantes con los obtenidos por otros autores tales como Valkova¹⁹¹ y Mohapatra²⁰⁶.

En todos los ensayos algunos de los compuestos fueron degradados en un 99 %, indicando una actividad metabólica microbiana muy satisfactoria. Por otro lado, con estos ensayos se pudo demostrar que los microorganismos seleccionados pueden sobrevivir en condiciones extremas lo que le confiere esa capacidad de transformación de compuestos xenobióticos²⁰⁷. Alexander²⁰⁸ afirma que cuando las bacterias se exponen a una única fuente de carbono, se pueden producir fenómenos de selección de poblaciones microbianas capaces de degradar esa fuente de carbono. Se puede, por tanto deducir que, los microorganismos son

²⁰⁶ Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. Degradation of endocrine disrupting bisphenol A during pre-treatment and biotransformation of wastewater sludge. 163 (2010) 273-283.

²⁰⁷ Conklin, A.R. Soil microorganisms. AEHS Magazine: Soil, sediment and water (2002) 1-4.

²⁰⁸ Alexander, M. Biodegradation and Bioremediation. *Academic Press, San Diego* (1994) 302.

agentes clave en la degradación de muchos compuestos químicos que pueden llegar al medioambiente por diversas vías tales como las enmiendas de suelos agrícolas con compost²⁰⁹. De igual modo, resulta importante destacar que la degradación biológica puede realizarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas por la microbiota del suelo²¹⁰. Los resultados del trabajo realizado muestran la habilidad de crecimiento de los microorganismos seleccionados en presencia de estos compuestos químicos como fuente de carbono y energía. Por tanto, estos microorganismos podrían ser utilizados en procesos de biorremediación de algunos ambientes contaminados.

²⁰⁹ Mendoza, J.C., Perea, Y.S., Salvador, J.A., Morales, J. A., Pérez G. Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencias e Ingeniería (ISSN: 0718-8706)* 2 (2011) 45-55.

²¹⁰ Torstesson, L. Behaviour of glyphosate in soils and its degradation. *The herbicide glyphosate (Grossbard.E; Atkinson D., eds). London, Butterworth (1985)* 137-149.

CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación realizada durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones principales:

1. Se han desarrollado y validado diferentes metodologías analíticas para la detección y cuantificación de microcontaminantes pertenecientes a tres familias de disruptores endocrinos químicos (PBs, BPs y BFA) y dos antimicrobianos (TCS y TCB) en lodos de depuradora, compost procedente de estos lodos y suelos agrícolas.
2. La técnica analítica empleada para el análisis de los extractos obtenidos a partir de las muestras ha sido la cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).
3. Las técnicas de extracción empleadas en la etapa de tratamiento de muestra han sido, la extracción mediante ultrasonidos (USE), mediante líquidos presurizados (PLE) y mediante QuEChERs. Cada una de estas técnicas ha sido optimizada con el objeto de mejorar las características analíticas de los métodos propuestos.
4. El método puesto a punto utilizando la técnica USE, ha permitido obtener recuperaciones de los compuestos estudiados comprendidas entre 90.0 y 102.0 % en el caso de las matrices procedentes de los lodos EDAR, 98.0 y 101.0 % para las de compost, y 96.0 y 101.0 % en el caso del suelo agrícola.
5. El método puesto a punto utilizando la técnica PLE, ha permitido obtener recuperaciones de los compuestos estudiados entre 97.0 y 103.0 % para los lodos EDAR, 98.0 y 101.0 % para el compost y 98.0 y 101.0 % para el suelo agrícola.

6. El método puesto a punto utilizando la técnica de extracción mediante QuEChERS, ha permitido obtener recuperaciones de los compuestos entre 85.0 y 93.0 % para el lodo EDAR, 86.0 y 97.0 % para el compost y 86.0 y 94.0 % para el suelo agrícola.
7. En los tres casos, los límites de detección y cuantificación obtenidos en los métodos propuestos, han sido lo suficientemente bajos como para poder emplear estos métodos para la detección y cuantificación de estos compuestos en las muestras medioambientales seleccionadas.
8. Los métodos analíticos desarrollados ofrecen una importante innovación científica, ya que en la actualidad son muy pocos los métodos publicados sobre el estudio de estos microcontaminantes en las tres matrices seleccionadas, principalmente en suelos y compost procedentes de las EDAR.
9. En los estudios realizados para los contaminantes en campo, se observó que los compuestos de la familia de los parabenos, la BP-2 y el TCS eran retenidos en la superficie (2 cm), desapareciendo por completo en esta zona. Para las demás benzofenonas, la BP-1 lixivia hasta profundidades de 40 cm; la BP-3 alcanza la profundidad máxima estudiada de 60 cm; la BP-6 aparece hasta los 40 cm; la BP-8 hasta los 30 cm y la 4-OHBP hasta los 40 cm de profundidad. Por último, el BFA lixivia hasta los 30 cm y el TCB, hasta los 40 cm.
10. Durante este estudio de campo, se evaluó la cinética de desaparición de los compuestos estudiados en suelos y suelos enmendados con compost. Se determinaron las concentraciones de estos compuestos a diferentes profundidades, y a partir de estos valores se demostró que todos los compuestos en las diferentes condiciones, tienen un

comportamiento similar ajustando su cinética de desaparición a una ecuación exponencial de primer orden, $C = C_0 \cdot e^{-kt}$. A partir de esta ecuación se pudo determinar el tiempo de vida medio para cada analito, la concentración inicial (C_0) y la constante cinética (k).

11. En el estudio de campo se observó además, que para la mayoría de los compuestos estudiados, los tiempos de vida medios eran mayores en las condiciones experimentales de la Parcela 1 respecto a la Parcela 2. Esto puede deberse a que al enmendar el suelo con el compost, se aporta materia orgánica favoreciéndose el crecimiento de microorganismos. Este hecho puede provocar un aumento tanto en la retención de los compuestos como en la velocidad de desaparición.
12. El recuento de la microbiota heterótrofa cultivable de los suelos tratados con los compuestos, y de los suelos enmendados con compost y tratados con los compuestos demostró que al aumentar la profundidad del suelo se produce un descenso progresivo del número de microorganismos viables. Por otro lado, se pudo observar que el mayor desarrollo microbiano se detectó en las parcelas enmendadas con compost respecto a las parcelas únicamente tratadas con los compuestos.
13. El estudio de las características morfológicas y tintoriales de los microorganismos aislados de los suelos tratados con los diferentes compuestos demostró una mayor proporción de bacilos Gram (+) y Gram (-), y en menor cuantía de cocos Gram (+).
14. El microorganismo codificado como MPB-8, aislado de suelos tratados con metilparabeno fue capaz de asimilar el 55 % de los diferentes compuestos ensayados como fuente de C/E en proceso oxidativo, y el 39 % de los mismos compuestos en proceso fermentativo. Los demás

microorganismos ensayados presentaron menor capacidad de asimilación de los diferentes compuestos ensayados como fuente de C/E.

15. En relación a los estudios de las actividades enzimáticas de los microorganismos aislados de las diferentes parcelas, todos los microorganismos presentaron actividad esterasa demostrando su capacidad para hidrolizar esteroides orgánicos, así como actividad lipasa. Los microorganismos que presentaron mayor capacidad enzimática fueron los codificados como MPB-8 y BFA-4 con 12 y 11 actividades enzimáticas demostradas, respectivamente.
16. Todos los compuestos estudiados en los ensayos microbiológicos fueron degradados en mayor o menor medida por los microorganismos seleccionados. Se pudo demostrar la total desaparición de los compuestos utilizando los microorganismos MPB-3, BPB-4, BP3-1, BP3-14, así como todos los microorganismos seleccionados de las parcelas tratadas con BP-3, tras 96 h de cultivo. La mayoría de los microorganismos ensayados degradaron los diferentes compuestos en un porcentaje superior al 70 %.
17. Los resultados obtenidos demuestran la habilidad de crecimiento de los microorganismos seleccionados en presencia de estos compuestos como fuente de C/E. Por tanto, estos microorganismos podrían ser utilizados en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con disruptores endocrinos y antimicrobianos de este tipo.

ANEXO

Publicación

Julio César Benítez-Villalba
Alberto Zafra-Gómez
Noemí Dorival-García
Francisco Javier
Camino-Sánchez
Samuel Cantarero
José Luis Vilchez

Department of Analytical
Chemistry, Research Group of
Analytical Chemistry and Life
Sciences, Campus of
Fuentenueva, University of
Granada, Granada, Spain

Received March 24, 2013

Revised May 25, 2013

Accepted May 28, 2013

Research Article

Ultra-performance liquid chromatography MS/MS method for the determination of parabens in compost from sewage sludge: Comparison of the efficiency of two extraction techniques

The efficiency of two extraction techniques—ultrasound-assisted extraction and pressurized liquid extraction—are compared and evaluated in the determination of parabens in compost samples. The extraction parameters for each technique were accurately optimized. The selected compounds were detected and quantified using ultra-performance LC MS/MS, operating in negative ESI and in SRM mode. The analytes were separated in less than 5 min. Ethylparaben (ring- $^{13}\text{C}_6$ labeled) was used as an internal standard. Two selective, sensitive, and accurate analytical methods were developed and validated. The LODs of the methods ranged from 3 to 7 ng/g and the LOQs from 10 to 23 ng/g, while inter- and intraday variability was under 6% in all cases. The methods were validated separately by using matrix-matched calibration and recovery assays with spiked samples. Recovery rates ranged from 94.0 to 105.0%. Compost samples were taken from different composting plants. Although the statistical comparison demonstrated no statistically significant differences between the two extraction techniques, the method based on pressurized liquid extraction was more sensitive than the ultrasound extraction based method.

Keywords: Compost / Endocrine-disrupting chemicals / LC MS/MS / Pressurized liquid extraction / Ultrasound-assisted extraction
DOI 10.1002/jssc.201300318

1 Introduction

Parabens, the alkyl esters of 4-hydroxybenzoic acid, are a family of compounds used as preservatives in cosmetics since the 1920s. The main parabens used in cosmetics come in two forms: short chain (methyl- and ethylparaben) and long chain (propyl- and butylparaben). Other parabens with more limited uses are known as branched-chain parabens (isobutyl- and isopropylparaben), which are also used as their sodium salts. Although parabens have been used for more than 90 years, their safety has only become of interest and started to be studied over the last years [1]. This interest arises from the fact that parabens seem to increase the risk of breast cancer [2, 3]. Parabens are weak endocrine disruptors because

they interfere with the function of endogenous hormones. Previous studies showed that parabens are able to bind to estrogen receptors, activate genes controlled by these receptors, stimulate cell growth, and increase the levels of estrogen receptor protein. They have also been linked to other human conditions such as infertility [4], but there is currently not enough evidence to confirm it. The estrogenic activity *in vitro* and *in vivo* was shown to increase with increasing length of the linear alkyl chain and with increasing branching of the alkyl chains [1, 2, 4–7] (http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_074.pdf).

Parabens have been detected in almost all environmental matrices [8, 9]. The major sources of input into the environment are wastewaters and soils amended with contaminated materials. This represents a serious hazard because the use of sewage sludge as an organic amendment of soils has become a common practice in Europe in the last decade, facilitating the “arrival” of these pollutants to humans through the food chain. Given the ubiquity of parabens in human environments, it is not surprising that exposure to these compounds is virtually universal. Other sources include water from pools or lixiviation of products that contain them. Parabens have also been found in fruits and vegetables grown in soils or treated with contaminated water [8, 10–13].

Some methods have been proposed in the scientific literature for the analysis of parabens in environmental

Correspondence: Dr. Alberto Zafra-Gómez, Department of Analytical Chemistry, Campus of Fuentenueva, Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, University of Granada, E-18071 Granada, Spain
E-mail: azafra@ugr.es
Fax: +34-958-24-33-28

Abbreviations: **BPB**, butylparaben; **EPB**, ethylparaben; **ESI**, electrospray ionization; **MPB**, methylparaben; **Ph-PB**, phenylparaben; **PLE**, pressurized liquid extraction; **PPB**, propylparaben; **UPLC**, Ultra-performance LC; **USE**, ultrasound-assisted extraction

- [10] Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T., *Desalination* 2009, 239, 229–246.
- [11] Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., *Water Res.* 2009, 43, 363–380.
- [12] González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., Cela R., *Water Res.* 2011, 45, 6770–6780.
- [13] Wu, C., Spongberg, A. L., Witter, J. D., Sridhar, B. B. M., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012, 8, 104–109.
- [14] Ramaswamy, B. R., Shanmugam, G., Velu, G., Rengaranjan, B., Larsson, D. G. J., *J. Hazard. Mater.* 2011, 186, 1586–1593.
- [15] Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Pérez, R. A., Tadeo, J. L., *J. Chromatogr. A* 2012, 1248, 9–17.
- [16] Casas-Ferreira, A. M., Möder, M., Laespada, M. E. F., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 3837–3844.
- [17] Canosa, P., Pérez-Palacios, D., Garrido-López, A., Tena, M. T., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 105–112.
- [18] Núñez, L., Turiel, E., Martín-Esteban, A., Tadeo J. L., *Talanta* 2010, 8, 1782–1788.
- [19] Salemi, A., Shafiei, E., Vosough, M., *Talanta* 2012, 101, 504–509.
- [20] He, S., Zhao, Y., Zhu, Z., Liu, H., Li, M., Shao, Y., Zhuang, Q., *Talanta* 2006, 69, 166–171.
- [21] Ramírez, N., Marcé, R. M., Borrull, F., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 6226–6231.
- [22] Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A. I., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 2415–2440.
- [23] Díaz-Vázquez, L. M., García, O., Velázquez, Z., Marrero, I., Rosario, O., *J. Chromatogr. B* 2005, 825, 11–20.
- [24] Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., Vilchez J. L., *J. Chromatogr. A* 2012, 1253, 1–10.
- [25] Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso E., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1770–1766.
- [26] Yu, Y., Huang, Q., Cui, J., Zhang, K., Tang, C., Peng X., *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399, 891–902.
- [27] Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R. M., Pocurrull E., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 5619–5625.
- [28] Speltini, A., Sturini, M., Maraschi, F. Profumo, A., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1115–1131.
- [29] Fulara, I., Czaplicka, M., *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 2075–2087.
- [30] Pacáková, V., Loukotková, L., Bosáková Z., Štulík, K., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 867–882.
- [31] Zhao, R. S., Wang X., Yuan J. P., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1652–1657.
- [32] European Commission. COMMISSION DECISION 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L 221 17/8/2002.
- [33] Viglino, L., Prévost, M., Sauvé, S., *J. Environ. Monit.* 2011, 13, 583–590.
- [34] Ferreira, S. L. C., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B. B., Bosque-Sendra, J. M., *Talanta* 2004, 63, 1061–1067.
- [35] Jelić, A., Petrović, M., Barceló, D., *Talanta* 2009, 80, 363–371.
- [36] Miller, J. N., Miller, J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 15th ed., Pearson Education Limited, Essex, England 2005.