



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AGRÍCOLA,  
GEOLOGÍA Y EDAFOLOGÍA

RECICLADO EN SUELOS DE LODOS DE REFINERÍA:  
NUEVAS APROXIMACIONES PARA LA BIODEGRADACIÓN DE  
HIDROCARBUROS MEDIANTE EL MANEJO DE ENMIENDAS  
ORGÁNICAS

**Irene Rodríguez Alhama**

2013



# ÍNDICE



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	11
<b>2. SUMMARY</b> .....	21
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	31
EL SUELO COMO RECURSO NATURAL.....	33
FUNCIONES Y USOS DEL SUELO.....	34
IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO .....	35
CALIDAD Y SALUD DEL SUELO.....	35
PROCESOS DE DEGRADACIÓN DEL SUELO .....	39
Degradación física .....	39
Degradación química .....	40
Degradación por acidificación .....	40
Degradación por salinización .....	41
Degradación por contaminación .....	41
Degradación biológica.....	42
ACTIVIDAD HUMANA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL .....	44
Fuentes y tipos de agentes contaminantes del suelo .....	44
Metales pesados .....	44
Emisiones ácidas atmosféricas.....	45
Uso de aguas salinas para riego.....	45
Compuestos orgánicos xenobióticos .....	45
CONTAMINACIÓN DEL SUELO POR HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO .....	46
Tipos de hidrocarburos y sus características. ....	46
Lodos de refinería .....	47
Efectos tóxicos de los hidrocarburos en suelo, planta y seres vivos .....	48
Factores que afectan a la biodegradabilidad de los hidrocarburos.....	49
Naturaleza y concentración del contaminante: .....	49

## Índice

Propiedades físico-químicas del suelo: .....	50
Factores biológicos: .....	53
Papel de los microorganismos en la degradación de los hidrocarburos. ....	54
TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN SUELOS CONTAMINADOS.....	56
TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CON PRESENCIA DE HIDROCARBUROS.....	58
Tratamiento físico .....	58
Técnicas de contención .....	58
Técnicas de confinamiento .....	59
Tratamiento físico-químico.....	59
Extracción .....	59
Lavado .....	59
Incineración .....	60
Recuperación electrocinética.....	60
Tratamientos biológicos (técnicas de biorremediación de suelos).....	60
Ventajas y desventajas de la biorremediación .....	62
Factores que influyen en la biorremediación.....	63
Estrategias de biorremediación.....	64
Landfarming.....	66
Fitorremediación.....	67
RESIDUOS ORGÁNICOS COMO ENMIENDAS DEL SUELO.....	68
Aspectos positivos y negativos de los biosólidos de depuración de aguas residuales urbanas como enmiendas del suelo. ....	70
Estabilización oxidativa de biosólidos mediante compostaje. ....	71
Tipos de compostaje .....	72
UTILIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS URBANOS EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS .....	72
<b>4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>75</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>83</b>

<b>CAPÍTULO I. ENSAYOS PRELIMINARES: 1) TRATABILIDAD; 2) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMIEDIACIÓN</b> .....	85
1) ENSAYO DE TRATABILIDAD DEL SUELO CON HIDROCARBUROS .....	87
2) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIORREDIACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE “LANFARMING” .....	89
a) Optimización de la dosis de enmienda orgánica a adicionar .....	89
Selección de los biosólidos .....	89
b) Selección de la dosis de enmienda a emplear.....	91
c) Establecimiento de la dosis más adecuada de nutrientes (N y P) a aplicar al suelo .....	95
d) Establecimiento del nivel mínimo de humedad necesario .....	95
<b>CAPÍTULO II. BIORREMIEDIACIÓN DE UN SUELO CON HIDROCARBUROS PESADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE LANDFARMING</b> .....	97
1) BIORREMIEDIACIÓN DE SUELOS CON INCORPORACIÓN RECIENTE DE HIDROCARBUROS PESADOS. ENSAYO EN MICROCOSMOS.....	99
Evolución del contenido de hidrocarburos .....	101
Evolución de las características del suelo durante la biorremediación .....	104
Características físico químicas .....	104
Evolución del Carbono y sus fracciones .....	105
Bioindicadores de la calidad microbiológica del suelo .....	107
Actividades enzimáticas extracelulares (hidrolasas) del suelo.....	114
Diversidad genética y funcional de la comunidad microbiana del suelo.....	116
Análisis mediante PCR en tiempo real.....	118
Estudio del perfil fisiológico de las comunidades microbianas (CLPP) .....	120
Análisis del gen del ARNr 16S por PCR-DGGE.....	127
Obtención y análisis de las librerías de clones .....	130
2) BIORREMIEDIACIÓN DE UN SUELO CON UN LARGO HISTORIAL DE RECICLADO DE LODOS DE REFINERÍA EN EL MISMO. ENSAYO A NIVEL DE CAMPO.....	133

## Índice

Antecedentes de la zona de estudio y caracterización del suelo y de los lodos de refinería aportados al suelo.....	134
Diseño Experimental.....	138
Evolución del contenido de hidrocarburos.....	141
Evolución de los n-alcanos.....	141
Evolución de las características del suelo durante el proceso de landfarming.....	148
Conductividad eléctrica y pH.....	148
Evolución del carbono y sus fracciones.....	150
Parámetros microbiológicos y bioquímicos del suelo.....	152
Actividad bioquímica específica (hidrolasas).....	158
Análisis de las comunidades microbianas implicadas en la biodegradación de hidrocarburos.....	159
Monitorización de las unidades formadoras de colonias (UFCs) de bacterias y hongos.....	160
Análisis de las comunidades microbianas mediante DGGE.....	162
Filogenética y análisis de la escisión de las bandas.....	166
<b>CAPÍTULO III. DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS MEDIANTE EL USO DE PLANTAS:</b>	
<b>1) FITORREMEDIACIÓN; 2) REVEGETACIÓN.....</b>	<b>175</b>
DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS MEDIANTE EL USO DE PLANTAS EN LA ZONA TRATADA...	177
INVENTARIO ECOLOGICO DE LAS ESPECIES COLONIZADORAS DE LA ZONA.....	178
1) FITORREMEDIACIÓN A NIVEL DE MICROCOSMOS CON Y SIN APORTE DE ENMIENDAS ORGÁNICAS.....	180
a) Selección de las especies vegetales más adecuadas para desarrollarse un suelo con hidrocarburos (ensayo de germinación). .....	181
b)Ensayo de fitorremediación.....	184
Rendimiento de biomasa vegetal.....	185
Degradación de los hidrocarburos procedentes del petróleo.....	186
Parámetros bioquímicos y microbiológicos del suelo.....	188
2) ENSAYO DE REVEGETACIÓN A NIVEL DE CAMPO.....	195
Implantación de una cubierta vegetal estable y resistente a la presencia de hidrocarburos, para la revegetación de la zona tratada.....	195



Cobertura vegetal .....	197
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	201
<b>7. MÉTODOS ANALÍTICOS.</b> .....	220
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	233
<b>9. ANEXO</b> .....	269



# **1.RESUMEN**



## RESUMEN

El suelo es un recurso natural imprescindible no sólo para la producción de alimentos y el mantenimiento de los diferentes ecosistemas, sino para la propia vida del planeta; ello condiciona la necesidad de su protección y conservación. Sin embargo, a pesar de su importancia, el suelo no ha recibido de la Sociedad toda la atención que se merece; se han fomentado acciones antrópicas centradas en un manejo inapropiado e irracional del suelo que han conducido a la disminución de su calidad, fertilidad y productividad, incidiendo negativamente en la propia funcionalidad de dicho suelo. En este contexto, la contaminación propiciada desgraciadamente por el desarrollo de nuestra sociedad es uno de los motivos principales de la mencionada disminución de la calidad de nuestros suelos.

A pesar de lo expuesto, hemos de indicar que el suelo posee una capacidad de auto-depuración, lo que le permite asimilar una cierta cantidad de contaminantes. Sin embargo, sus posibilidades de autodepurar contaminantes no es ilimitada, y cuando éstos se acumulan en exceso, sus niveles repercutirán negativamente en la funcionalidad del suelo. La contaminación de tipo químico más usual que puede llegar al suelo suele ser de tipo inorgánico (sales, metales pesados,...), u orgánico (hidrocarburos, plaguicidas, otros orgánicos peligrosos,...), estando este fenómeno estrechamente relacionado con el grado de industrialización de las áreas donde se encuentran los suelos.

La contaminación causada por el petróleo y sus derivados es un problema frecuente en el medioambiente, generando un gran interés en la comunidad científica; se necesita un conocimiento integral de los procesos de degradación de los hidrocarburos y las consecuencias de su presencia en el medio edáfico, y en definitiva en el medio ambiente, de tal manera que se puedan dar soluciones satisfactorias para paliar los problemas que pueden producir sobre los suelos donde se depositan (efectos negativos sobre la flora y la fauna, pudiendo ocasionar graves trastornos ambientales y de salud). De ahí la importancia de desarrollar técnicas adecuadas para la eliminación de hidrocarburos en los suelos.

Dentro de este contexto, se debe hacer mención a la existencia de lodos de refinería, residuo con una elevada concentración de hidrocarburos que se genera en el proceso del refinado del petróleo, así como en las actividades de limpieza y mantenimiento de las instalaciones de las refinerías. Se trata de una mezcla de hidrocarburos saturados (parafinas) e hidrocarburos aromáticos (oleofinas, alquil-bencenos, naftalenos, fenantrenos etc). Una práctica frecuente para su necesaria eliminación es la disposición periódica de estos efluentes en terrenos situados en las inmediaciones de las refinerías, adecuados a tal efecto, con el fin de conseguir la eliminación de los hidrocarburos contenidos en los mismos aprovechando la capacidad depurativa de los suelos y de los microorganismos existentes en ellos capaces de utilizar ciertos hidrocarburos como fuente de C, mineralizándolos hasta CO<sub>2</sub> (atenuación natural de los hidrocarburos). Pero este proceso es muy lento y puede durar bastantes años. Además, la propia saturación del suelo con cargas reiteradas de lodos de refinería condiciona aún más su capacidad de degradación de los

hidrocarburos que contienen, lo que representa un riesgo de contaminación atmosférica así como de aguas superficiales y subterráneas. Se hace pues necesaria la implementación de técnicas que permitan acelerar la degradación de los hidrocarburos que pueden ser reciclados en suelos. Se destacan las técnicas biológicas de biorremediación, basadas en el uso de microorganismos o plantas con el fin de acelerar la “degradación natural” de los hidrocarburos mediante la estimulación y/o aumentación de las poblaciones microbianas existentes en el suelo. Entre dichas técnicas se señalan como principales:

*Landfarming*: consiste en provocar la oxidación biológica de los hidrocarburos contenidos en el suelo, estimulando la microflora natural que se encuentra en el mismo (levaduras, hongos o bacterias) mediante la aplicación de fertilizantes, arado y riego superficial. En el fondo, se trata pues, de una bioestimulación de las poblaciones microbianas capaces de utilizar los hidrocarburos como sustratos energéticos, consiguiendo de este modo su degradación.

*Fitorremediación*: ha sido definida como el uso de plantas verdes para eliminar de forma indirecta o extraer del suelo y acumular en sus tejidos compuestos peligrosos para el medio ambiente. No todas las plantas son capaces de adaptarse a los lugares con hidrocarburos, pero aquellas que lo consiguen, desarrollan un sistema radicular que ejerce una influencia positiva en la biodegradación de los mismos a través de la estimulación de la actividad microbiana dentro de la rizosfera.

Una posibilidad de incentivar ambas técnicas de biorremediación, es aplicar a los suelos fuentes de enmiendas orgánicas (basadas en residuos orgánicos), que consigan: i) en el caso del landfarming, la activación y aumento de poblaciones microbianas de interés, las cuales se encuentran en las enmiendas orgánicas que se adicionen; ii) mejorar el crecimiento de las plantas usadas en fitorremediación, lo que conducirá a una mayor actividad microbiana en la rizosfera, y mayor degradación de hidrocarburos.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha establecido como **OBJETIVO GENERAL** de esta Memoria de Tesis Doctoral, la evaluación de la eficacia de técnicas de biorremediación tales como el landfarming y la fitorremediación cuando se emplean en un suelo semiárido con alto contenido de hidrocarburos (procedentes del reciclado en el suelo de lodos de refinería), así como de la utilidad de la adición a estos suelos de biosólidos (granulados o compostados) como estrategia para incrementar la eficacia de estos procesos de biorremediación, consiguiendo acortar los tiempos necesarios para la degradación de dichos hidrocarburos y una mayor degradación de los más recalcitrantes.

Para conseguir este objetivo, se realizaron una serie de ensayos englobados en 3 Capítulos, que describimos a continuación:

### **Capítulo I. Ensayos preliminares: 1) Tratabilidad; 2) Optimización del proceso de biorremediación**

En este capítulo se ha llevado a cabo en primer lugar, un ensayo de tratabilidad para verificar la capacidad de los microorganismos del suelo que queremos biorremediar para degradar hidrocarburos. Una vez

verificada la posibilidad de éxito del proceso de biorremediación en este suelo, y con el fin de optimizar el proceso de landfarming, se realizaron diversos ensayos a nivel de microcosmos con el fin de establecer:

a) *La dosis más idónea de biosólido o compost de biosólido a adicionar a las parcelas de landfarming.* Para esto, al suelo con hidrocarburos de la zona experimental se añadieron diferentes dosis de dos enmiendas orgánicas (biosólido granulado y compostado) incubándolo a continuación durante un periodo de 4 meses en condiciones controladas de humedad y temperatura, monitorizando mensualmente tanto el contenido de hidrocarburos totales como la actividad microbiana..

b) *La conveniencia de adicionar nutrientes,* que fue establecida mediante la aplicación al suelo de diferentes dosis de nutrientes (diferentes relaciones C/N/P) y midiendo periódicamente el nivel de hidrocarburos totales y la actividad de los microorganismos del suelo.

c) *El nivel mínimo de humedad que es imprescindible mantener en el suelo,* en nuestras condiciones climáticas de semiaridez, para que no se vea frenado el proceso de biodegradación de los hidrocarburos contenidos en el suelo. Para ello, se llevó el suelo, con agua destilada, a niveles de humedad entre el 5 % y el 50 % de su capacidad de retención hídrica (CRH), incubándolo durante 4 meses a 24 °C con aireación apropiada, y monitorizando mensualmente el contenido de hidrocarburos totales.

Los resultados indicaron que la actividad microbiana incrementaba de manera proporcional a la dosis de enmienda aplicada, incrementando la biodegradación de los hidrocarburos en las dosis superiores a 120 t ha<sup>-1</sup>, si bien eran las dosis de 180 y 250 t ha<sup>-1</sup> las que producían mayores niveles de degradación, independientemente del tipo de enmienda aplicada. Dado que no se observaron grandes diferencias entre ambas dosis se seleccionó la dosis de 180 t ha<sup>-1</sup> para posteriores ensayos. Asimismo, se concluyó que el nivel mínimo de humedad para que los microorganismos encargados de la degradación de los hidrocarburos puedan desarrollar su actividad con normalidad en el suelo, era el 30% de su CRH. Por último, se puso de relieve que en las condiciones experimentales no era necesario el aporte de nutrientes.

## **Capítulo II. Biorremediación de un suelo con hidrocarburos pesados mediante la técnica de landfarming**

Este capítulo se divide en dos apartados en los que diferenciamos, un ensayo en microcosmos de biorremediación de un suelo con una adición reciente de lodos de refinería (con alto contenido en hidrocarburos), y un ensayo posterior, en condiciones de campo, de biorremediación mediante landfarming, de un suelo con un largo historial de reciclado en el mismo de lodos de refinería (que contendrá, por tanto, una alta proporción de hidrocarburos recalcitrantes), y que se describen resumidamente a continuación:

### **1) Biorremediación de suelos con adición reciente de lodos de refinería. Ensayo en microcosmos.**

El objetivo, fue verificar la eficacia de la técnica de landfarming con y sin aporte de enmiendas orgánicas, en un suelo con adición reciente de lodos de refinería, y por tanto, con una menor proporción de hidrocarburos recalcitrantes que los que se estudiarán posteriormente en el ensayo de campo. La cantidad de lodo de refinería adicionada fue la necesaria para alcanzar una concentración de hidrocarburos en el suelo del 5%. Se trata por una parte, de comprobar, a nivel de microcosmos durante una incubación de 6 meses, si la incorporación de las enmiendas orgánicas en la dosis establecida en el Capítulo I-A (180t ha<sup>-1</sup>), favorece la degradación de los hidrocarburos, y por otra, de profundizar en el conocimiento del efecto de estas enmiendas sobre la actividad, funcionalidad y diversidad de las poblaciones microbianas implicadas en este proceso. Los suelos se muestrearon mensualmente, determinándose en ellos el contenido de hidrocarburos totales y diversos parámetros físico-químicos, químicos, biológicos y bioquímicos, así como la diversidad genética y funcional de la comunidad microbiana presente en los mismos.

Los resultados indicaron que tanto los lodos de refinería como las enmiendas orgánicas aportan al suelo substratos carbonados que actúan como fuente de energía para los microorganismos, incentivando la actividad de las poblaciones microbianas del suelo. La incorporación de las enmiendas orgánicas incrementaba la degradación de los hidrocarburos, debido a la mayor estimulación del crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas del suelo conseguida con las enmiendas. La presencia de los hidrocarburos daba lugar a un aumento de la comunidad bacteriana total, a una disminución de la diversidad microbiana y a un cambio funcional en dicha comunidad bacteriana en comparación con el suelo control, persistiendo estos cambios después del proceso de biorremediación independientemente del tipo de biorremediación realizada y del grado de degradación de los hidrocarburos. La comunidad bacteriana dominante al final del proceso, independientemente del tipo de biorremediación, pertenecía a *Actinobacterias*. Es de destacar que únicamente en los suelos biorremediados se encontraron bacterias pertenecientes a *Cloroflexi* (*Sphaeribacter*) y que, aunque las enmiendas orgánicas producían cambios en la cantidad y diversidad de la comunidad bacteriana, es la propia presencia del hidrocarburo la principal responsable de los cambios observados en dicha comunidad.

### **2) Biorremediación de un suelo con un largo historial de reciclado de lodos de refinería en el mismo. Ensayo a nivel de campo.**

El objetivo de este estudio ha sido comprobar si la técnica de landfarming, eficaz, como hemos visto en el apartado anterior, en la biorremediación en un suelo con adición reciente de hidrocarburos, sigue siendo viable en condiciones de campo y con hidrocarburos recalcitrantes, así como conocer el efecto del aporte de las enmiendas orgánicas, sobre la eficacia de la técnica de landfarming en estas nuevas condiciones de campo y con hidrocarburos recalcitrantes.



En una zona experimental donde se vienen reciclando lodos de refinería durante más de 12 años se establecieron por triplicado parcelas con y sin adición de enmienda orgánica (biosólido granulado y compostado) que se sometieron a un proceso de landfarming durante 8 meses, con movimiento mensual de tierras en profundidad (de 1-1,5 m). Asimismo, se estableció un triplicado de parcelas que se dejaron en atenuación natural. Los suelos se muestrearon periódicamente para análisis durante los 8 meses que duró el proceso de landfarming, determinándose el contenido de n-alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>36</sub>), y de hidrocarburos totales, así como una serie de parámetros indicadores de la calidad microbiológica del suelo. Asimismo, al inicio y final del proceso de biorremediación, se llevó a cabo un estudio de biodiversidad genética y funcional de la comunidad microbiana, con el fin de evaluar cómo afectaban tanto el tratamiento de landfarming por sí sólo, como este mismo tratamiento junto con adición de materiales orgánicos, al estatus de las poblaciones microbianas existentes en el suelo.

A partir de este ensayo podemos concluir que estos hidrocarburos más recalcitrantes siguen actuando también como fuente de carbono para los microorganismos, y que al igual que se observó en el ensayo de microcosmos la presencia de las enmiendas incentiva la abundancia y la actividad de las colonias microbianas incrementándose así su capacidad degradadora de hidrocarburos. Aunque al inicio del ensayo el biosólido granulado era capaz de estimular en mayor medida que el compost a la microbiota del suelo, al final del ensayo apenas habían diferencias entre los dos tipos de tratamientos. Hay que resaltar que las bacterias (*Actinobacterias*) y los hongos (*Ascomycota*), detectados en los suelos sometidos a landfarming pueden estar jugando un papel fundamental en la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes existentes en estos suelos, y que las bacterias pertenecientes a *Chloroflexi* y *Firmicutes* sólo se detectaron en los suelos con hidrocarburos, lo que es indicativo de su adaptación a la presencia de hidrocarburos y su intervención en los procesos de degradación de los mismos.

### **Capítulo III. Recuperación de suelos con hidrocarburos mediante fitorremediación**

Este capítulo está dividido en dos apartados, en el primero de ellos, se realiza un ensayo de fitorremediación a nivel de microcosmos, y en el segundo, se realiza, al nivel de campo, un ensayo de revegetación de la zona de reciclado de lodos de refinería.

#### **1) Fitorremediación a nivel de microcosmos de un suelo con hidrocarburos con y sin aporte de enmiendas orgánicas.**

El principal objetivo de este apartado fue optimizar el proceso de fitorremediación en suelos que han sido sometidos a un tratamiento previo de landfarming (con y sin aporte de enmiendas orgánicas), y establecer que especies vegetales son capaces de desarrollarse en estos suelos con hidrocarburos recalcitrantes y promover su degradación. Asimismo, se pretendía evaluar el efecto del aporte de enmiendas orgánicas sobre el nivel de degradación de hidrocarburos conseguido con la fitorremediación. Este estudio nos

permitió establecer si el desarrollo de una cubierta vegetal estable contribuye a la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes remanentes en el suelo.

En primer lugar se realizó un ensayo de germinación para establecer que especies vegetales eran las más adecuadas para desarrollarse en suelos con elevada proporción de hidrocarburos recalcitrantes. Basándonos en los resultados obtenidos en este ensayo de germinación se seleccionaron las siguientes especies para ser utilizadas en el ensayo de fitorremediación en microcosmos: (*Atriplex halimus* (atriplex), *Ordeum vulgare* (cebada), y una mezcla de semillas formada por *Triticum sativum* (trigo), *Lolium Perenne* (césped) y *Avena sativa* (avena).

En contenedores apropiados se colocó suelo (2 kg) procedente de las parcelas sin enmendar sometidas a landfarming, que fue enmendado con biosólido granulado y compostado a dosis de 30, 60, y 90 t/ha, sembrándose en ellos por cuadruplicado las especies vegetales seleccionadas. También se prepararon contenedores con suelo sin enmendar y sin sembrar como control. Después de 4 meses de crecimiento se determinaron los rendimientos de biomasa vegetal fresca y seca a 65 °C, así como la actividad metabólica global de los microorganismos a nivel de rizosfera (actividad deshidrogenasa, carbono de la biomasa microbiana, respiración y ATP) y el contenido total de hidrocarburos.

A partir de este estudio se pudo concluir que la fitorremediación es un tratamiento eficaz para la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes presentes en el suelo y que la aplicación de enmiendas orgánicas, mejora la eficacia de la fitorremediación, dependiendo la intensidad de esta mejora de la dosis de aplicación, del tipo de enmienda orgánica y de la especie vegetal sembrada. Es de destacar la eficacia remediadora del *Atriplex halimus* en presencia de compost de biosólido (40% de degradación de hidrocarburos), por lo que es una perfecta candidata para ser usada en programas de biorremediación y revegetación de suelos con hidrocarburos recalcitrantes en zonas semiáridas.

## **2) Ensayo de revegetación a nivel de campo.**

Se planteó como objetivo principal de este ensayo, la implantación de una cubierta vegetal estable y resistente a la presencia de hidrocarburos para la revegetación de la zona. Además, se evaluó el efecto sobre el desarrollo de la vegetación de la presencia en los suelos de enmiendas orgánicas.

Para alcanzar estos objetivos, tras el proceso de landfarming, cada uno de los triplicados de las parcelas existentes para cada tratamiento (con y sin adición de enmienda orgánica), se dividió en 3 sub-parcelas de unos 20 m<sup>2</sup>. En cada una de estas sub-parcelas se sembraron las diferentes especies vegetales seleccionadas a partir del ensayo anterior: cebada, atriplex y una mezcla de semillas, que englobaba la mezcla de semillas utilizada en el anterior ensayo de fitorremediación en microcosmos (trigo, avena y césped) junto con semillas de especies vegetales que se encontraron en el inventario de la zona, como especies ya adaptadas a las condiciones adversas de la misma (*oxalis*, *roseta*, *solanum*, y *ditriquia*). A estas parcelas se les realizó un seguimiento de cobertura vegetal para evaluar que especies vegetales se

desarrollaban mejor en la zona, y como influía el tipo de tratamiento (aporte o no aporte de enmienda orgánica) que el suelo había tenido sobre este desarrollo vegetal.

A partir de este estudio se pudo concluir que con el uso de especies vegetales adaptadas a la zona, como es el *Atriplex halimus* y aplicando compost como enmienda orgánica a los suelos tratados con landfarming, se consigue que las plantas se desarrollen con éxito a corto y medio/largo plazo, quedando instaurada una cubierta vegetal estable que integrará la zona en el paisaje y favorecerá los procesos de rizorremediación, además de contribuir a mejorar la calidad del suelo y conseguir mejorar la dinámica de autoprotección o resiliencia del suelo frente a posibles procesos degradativos.

### **CONCLUSION GENERAL DE LA MEMORIA**

El uso de técnicas de biorremediación de bajo coste (landfarming con adición de enmiendas orgánicas basadas en residuos orgánicos de origen urbano), junto con los conocimientos que aportamos en esta Memoria de Tesis Doctoral (dosis adecuada de dichas enmiendas y manejo idóneo), hace que seamos capaces de incentivar la capacidad de degradación del suelo para determinados hidrocarburos, así como incrementar el crecimiento de las plantas que puedan ser cultivadas en el mismo. Ello hará que podamos mejorar la degradación de ciertos hidrocarburos en suelos, aprovechando técnicas de biorremediación como "landfarming y fitorremediación", lo que significa posibilitar un mejor reciclado en los suelos de los lodos de refinería.



## **2.SUMMARY**



## SUMMARY

Soil is a vital natural resource not only for food production and maintenance of the different ecosystems, but for the life of the planet, it conditions the need for its protection and conservation. However, despite its importance, the soil has received from the Society all the attention it deserves; anthropic actions have been promoted focused on an inappropriate and irrational managing of the soil that have led to the decrease of its quality, fertility and productivity, negatively impacting the functionality of the soil itself. And in this context, the pollution propitiated unfortunately by the development of our society is one of the main reasons for the aforementioned decrease in the quality of our soils.

Despite the above, we have to indicate that the soil has a capacity for self-purification, allowing it to absorb a certain amount of pollutants. However, its chances for self-purifying contaminants is not unlimited, and when these accumulates in excess, their levels adversely impact soil functionality. The most common type of chemical contamination that can reach the ground is usually an inorganic (salts, heavy metals, ...), or organic type (hydrocarbons, pesticides, other hazardous organic, ...), this phenomenon being closely related to the degree of industrialization of the areas where the soil is found.

The pollution caused by oil and its derivatives is a common problem in the environment, generating great interest in the scientific community; it is required a comprehensive knowledge of the processes of hydrocarbon degradation and the consequences of its presence in the edaphic environment, and eventually into the environment, so that they can give satisfactory solutions to mitigate the problems that may occur on soils where they are deposited (negative effects on flora and fauna, possibility of causing serious environmental and health disorders). Hence the importance of developing appropriate techniques for the removal of hydrocarbons from soils.

Within this context, we should mention the existence of sludge from refinery, residue with a high concentration of hydrocarbons generated in the oil refining process and in the cleanup and maintenance of the facilities of the refineries. It is a mixture of saturated hydrocarbons (paraffins) and aromatic hydrocarbons (olefins, alkyl benzenes, naphthalenes, phenanthrenes etc). A common practice for it necessary elimination is the periodic disposition of these effluents on land placed in the surrounding areas of the refineries, adapted to such an effect, in order to obtain the elimination of the hydrocarbons contained in the same ones taking advantage of the depurative capacity of the soils and of the existing microorganisms in them capable of using certain hydrocarbons as source of C, degrading them up to CO<sub>2</sub> (natural attenuation of hydrocarbons). But this process is very slow and can last many years. Further, the soil saturation with repeated loads of refinery sludges further affects their ability to degrade hydrocarbons they contain, representing a risk of air pollution as well as surface water and groundwater. It is therefore necessary to implement techniques to accelerate the degradation of hydrocarbons that can be recycled in soils. Stand bioremediation biological techniques based on the use of microorganisms or plants in order to accelerate the

"natural degradation" of hydrocarbons by stimulation and/or augmentation of the microbial populations in the soil. Among these techniques are identified as main:

*Landfarming* consists of inducing the biological oxidation of hydrocarbons contained in the soil and stimulating the microflora naturally found in the soil (yeast, fungi or bacteria) through the application of fertilizers, ploughing and surface irrigation. In essence, therefore, landfarming entails the biostimulation of the necessary microbial populations whose activation is of interest.

*Phytoremediation*, on the other hand, has been defined as the use of green plants to either indirectly eliminate environmentally harmful compounds or to extract such compounds from the soil and accumulate them in the plant tissues. Not all plants are capable of adapting to locations with hydrocarbons, but those that do develop a root system that exerts a positive influence on hydrocarbon biodegradation by stimulating microbial activity within the rhizosphere.

A possibility of stimulating both technologies of biorremediación, is to apply to the soils sources of organic amendments (based on organic residues), that they obtain: i) in case of the landfarming, the activation and increase of microbial populations of interest, which are in the organic amendments that are added; ii) to improve the growth of the plants used in phytoremediation, which will lead to increased microbial activity in the rhizosphere, and increased degradation of hydrocarbons.

Given these assumptions, the **GENERAL OBJECTIVE** of this work is therefore to evaluate the effectiveness of bioremediation techniques like landfarming and phytoremediation when used in a semi-arid soil with a high hydrocarbon content (from refinery sludge). The goal is also to assess the utility of adding sewage sludges, "biosolids", (granulated or composted) to such soils as a strategy for increasing the efficiency of these bioremediation processes, thus reducing the time required for hydrocarbon degradation and increasing the degradation of the most recalcitrant hydrocarbons.

A series of assays were performed to achieve this goal. These assays are described in three chapters as summarised below:

### **Chapter I. Preliminary assays: 1) Treatability; 2) optimisation of the bioremediation process.**

This chapter begins with a treatability assay performed to verify the degrading capacity of the microorganisms in the soil we wished to bioremediate, thus confirming their effectiveness in degrading the hydrocarbons present in the soil. Once the possibility of successful bioremediation in this soil was established, and in order to optimise the bioremediation process through landfarming, various assays were performed at the microcosm level in order to establish the following:

**a) *The ideal dose of biosolid or biosolid compost to add to the landfarming plots.*** To do this, various doses of two organic amendments (sewage sludge and composted granulate) were added to the soil with



hydrocarbons from the experimental zone. This amended soil was then incubated for a period of 4 months under controlled humidity and temperature conditions. Both the total hydrocarbon content and microbial activity were determined on a monthly basis.

**b) *The suitability of adding nutrients***, which was established by applying different doses of nutrients (different C/N/P ratios) to the soil and measuring the level of total hydrocarbons and the state of soil microorganisms.

**c) *The minimum level of moisture that it is necessary to maintain in the soil*** in our semi-arid climatic conditions so that the biodegradation process of the hydrocarbons in the soil is not hampered. To determine this factor, several samples of soil from the experimental area were brought to moisture levels of 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5% of the water retention capacity (WRC) of the soil using distilled water. The samples were incubated for 4 months at 24 °C with appropriate levels of aeration, and the total hydrocarbon content was determined on a monthly basis.

In these assays, it was demonstrated that the rate of respiration of soil microorganisms increased proportionally with the dose of amendment applied. Hydrocarbon biodegradation increased with doses greater than 120 t ha<sup>-1</sup>, while doses of between 180 and 250 t ha<sup>-1</sup> produced the highest levels of degradation, regardless of the amendment applied (fresh or composted biosolids). Moreover, no significant differences were observed between the two higher doses. As a result, the 180 t ha<sup>-1</sup> dose of biosolids and compost was chosen for subsequent assays. It was concluded that the treated soil must have a minimum moisture level of 30% of WRC for microbial activity to develop normally in the soil. Finally, the addition of nutrients is not considered necessary, since no significant differences were found between the levels of hydrocarbon degradation in treatments with and without added nutrients.

## **Chapter II. Bioremediation of heavy hydrocarbons soils using the landfarming technique.**

This chapter is divided into two sections. The first covers an assay at the microcosm level of the bioremediation process in a soil to which refinery sludge (with a high hydrocarbon content) has been recently added. The second section covers a subsequent assay in field conditions of bioremediation using landfarming in soils with a long history of added refinery sludge. Both sections are briefly described below:

### **1) *Bioremediation of soils to which refinery sludge has been recently added. Microcosm level assay.***

The objective of this assay was to verify the effectiveness of the landfarming technique – both with and without added organic amendments – in soils to which refinery sludges had been recently added and which therefore had a lower proportion of recalcitrant hydrocarbons than in the soils subsequently studied in the field assay. The amount of refinery sludge added was that necessary to achieve a 5% concentration of hydrocarbons in the soil. On the one hand, the aim was to verify at the microcosm level and during 6 months of incubation if adding the dose of organic amendments established in Chapter I-A (180 t ha<sup>-1</sup>) promotes

hydrocarbon degradation. On the other hand, the goal was to more deeply understand the impact of these amendments on the activity, function and diversity of the microbial populations involved in this process. Soils were sampled monthly in order to determine the hydrocarbon content and physico-chemical, chemical, biological and biochemical parameters, as well as the structure and functionality of the microbial community in these soils.

From the results, we can conclude that both refinery sludge and organic amendments provide the soil with carbonaceous substrates that act as an energy source for microorganisms, encouraging soil microbial populations. Stimulation of the growth and activity of soil microbial populations was even more pronounced in both soil types (with and without hydrocarbons) after the addition of organic amendments, resulting in further hydrocarbon degradation. The highest degree of hydrocarbon degradation thus occurs in soils that have been bioremediated with aeration together with such added amendments. It was also observed that the presence of hydrocarbons in the soil leads to an increase in the total bacterial community, a decrease in microbial diversity and a functional and structural change in the bacterial community in comparison with the control soil. Moreover, these changes were shown to persist after the bioremediation process, regardless of the type of bioremediation performed and the degree of hydrocarbon degradation. The dominant bacterial community at the end of the process was composed of *Actinobacteria*, regardless of the type of bioremediation. It is worth pointing out that bacteria belonging to *Cloroflexi* (*Sphaeribacter*) were only found in bioremediated soils.

Finally, it should be noted that although organic amendments produce changes in the quantity and diversity of the bacterial community in soils with hydrocarbons, it is the very presence of hydrocarbon that is chiefly responsible for the changes that occur in the bacterial community.

## **2) Bioremediation of soils with a long history of added refinery sludge. Field level assay.**

The objective of this assay was to determine if the landfarming technique, effective in the previous section in soils with recently added hydrocarbons and in microcosms, was also viable in field conditions and with recalcitrant hydrocarbons. We also wanted to ascertain the impact of adding organic amendments on the effectiveness of the landfarming technique in these new field conditions and with recalcitrant hydrocarbons.

In an experimental zone where refinery sludge has been being recycled for more than 12 years, plots with and without added organic amendments (granulated and composted biosolids) were established in triplicate. Landfarming methods were applied to these plots for a period of 8 months. This included turning the top soil (to a depth of 1-1.5 m) on a monthly basis. Plots left to natural attenuation were also established in triplicate. The soils were periodically sampled for analysis throughout the 8 months of the landfarming process. The n-alkane ( $C_{10}$ - $C_{36}$ ) and total hydrocarbon contents were determined in the soils from the different plots, as well as a number of parameters bioindicators of soil microbiological quality. Moreover, studies of the structural biodiversity of the microbial community were conducted at the beginning and end of the bioremediation

process using various molecular methods in order to evaluate how the landfarming treatment, both alone and together with added organic materials, affects the status of the soil microbial populations.

On the basis of the results we can state that the most recalcitrant hydrocarbons also continue to act as a carbon source for microorganisms. Furthermore, as observed in the microcosm assay, the presence of amendments was determined to encourage growth and increased activity in microbial colonies and thus increase the ability of the colonies to degrade hydrocarbons. Although fresh biosolids stimulated soil microbiota to a greater extent at beginning of the assay, at the end, the differences between soils treated with fresh biosolids and composed biosolids were minimal. We would like to highlight that the bacteria (*Actinobacterias*) and fungi (*Ascomycota*) detected in the soils treated with landfarming may be playing a key role in the degradation of the recalcitrant hydrocarbons present in these soils. We would also like to note that the bacteria belonging to *Chloroflexi* and *Firmicutes* were only detected in soils with hydrocarbons, which is indicative of their adaptation to the presence of hydrocarbons and their involvement in hydrocarbon degradation processes.

### **Chapter III. Recuperation of soils with hydrocarbons using the phytoremediation technic.**

This chapter is divided into two sections. The first section describes a phytoremediation assay performed at the microcosm level, and the second section describes an assay performed at the field level involving the revegetation of the refinery sludge recycling area.

#### **1) Phytoremediation at the microcosm level, with and without added organic amendments.**

The main objective of this section was to optimise the process of phytoremediation in soils that had previously been subjected to a landfarming treatment (with and without added organic amendments) and to identify the plant species that are able to grow in soils with recalcitrant hydrocarbons and promote hydrocarbon degradation. The extent to which the presence of organic amendments increases degradation was also determined. This study makes it possible to establish if the development of a stable vegetative cover contributes to the degradation of hydrocarbons remaining in the soil.

To begin with, a germination assay was performed to establish which plant species were best suited to grow in soils with a high proportion of recalcitrant hydrocarbons. Based on the results, the following species were selected for use in the phytoremediation assay at the microcosm level: *Atriplex halimus* (atriplex); *Ordeum vulgare* (barley); and a seed mixture consisting of *Triticum sativum* (wheat), *Lolium Perenne* (grass), *Avena sativa* (oats).

For this assay, soil from the unamended plots subjected to landfarming was placed in appropriate pots. The soil was then amended with granulated and composted biosolids in doses of 30, 60, and 90 t/ha, and the selected plant species were then planted in quadruplicate in the different soils. Pots with unamended and

unplanted soil were also prepared as control. The pots were watered appropriately and placed in a growth chamber under controlled light, temperature and humidity conditions. After 4 months of growing, the fresh and dry vegetable biomass yields were determined as well as the overall metabolic activity of microorganisms at the rhizosphere level (dehydrogenase activity, microbial biomass carbon, respiration and ATP), and total hydrocarbon content.

Based on this study, it was concluded that phytoremediation is an effective treatment for degrading recalcitrant hydrocarbon in the soil and that the application of organic amendments improves the efficiency of phytoremediation, with the intensity of improvement depending on the rate the application, the type of organic amendment and the plant species planted. In these findings, the efficacy of *Atriplex halimus* in the presence of biosolid compost (40% hydrocarbon degradation) stands out. This plant is also well adapted to the semi-arid climatic conditions that prevail in the area to be revegetated, making it a perfect candidate for use in bioremediation and revegetation programs for soils with recalcitrant hydrocarbons in semi-arid areas.

## **2) Revegetation assay at the field level.**

The main objective of this assay was to introduce a stable vegetative cover resistant to the presence of hydrocarbons to revegetate the area. We also evaluated the effect of the presence of organic amendments in the soil on the development of the vegetation.

To achieve these objectives, following the landfarming process, each triplicate of the existing plots for each treatment (with and without added organic amendments) was divided into 3 sub-plots of about 20 m<sup>2</sup>. The following plant species selected from the previous assay were planted in each of the sub-plots: barley, saltbush and a mixture of seeds, which included the seed mixture used in the previous phytoremediation assay at the microcosm level (wheat, oats and grass) together with seeds from plant species found in the inventory of the area, such as a species already adapted to the adverse conditions in the area (*oxalis*, *roseta*, *solanum*, and *ditriquia*). The vegetative cover was monitored in these plots to assess which plant species grew best in the area and to determine the impact of the type of treatment the soil had received on plant development.

Based on this study, we were able to conclude that by using plant species adapted to the area such as *Atripex halimus* and by applying compost as organic amendment to landfarmed soil, plants can successfully develop in the short and medium/long term. This results in a stable vegetative cover that will integrate the area into the landscape and encourage rhizoremediation processes and also contributes to improving soil quality and the self-protective dynamics and resilience of the soil against possible degradative processes.

**GENERAL CONCLUSION OF THE MEMORY**

The use of low cost biotechnology (use of organic amendments based on organic waste from urban areas), along with the knowledge we provide in this Thesis Report (proper dosage, ideal management), makes us able to encourage the capacity of soil for degrading certain hydrocarbons, and increase the growth of plants that can be installed in them. This will enable us to improve the degradation of certain hydrocarbons in soils, using bioremediation techniques such as "landfarming and phytoremediation", which means allow better recycling in soils of refinery sludges.



## **3.INTRODUCCIÓN**





## EL SUELO COMO RECURSO NATURAL

El suelo es un recurso natural, indispensable para la vida en el planeta, formado a lo largo de miles de años a partir de la roca madre a través de procesos físicos, químicos y biológicos en los que dicha roca es meteorizada en fragmentos e incorporada junto con restos orgánicos de organismos vegetales y animales (edafogénesis). Por tanto, dado el largo periodo de tiempo necesario para su formación, podemos considerar al suelo como un recurso no renovable, al menos en una escala temporal humana, y de ahí la necesidad de protegerlo y conservarlo para las generaciones presentes y futuras.

El suelo es la capa más superficial de la corteza terrestre y está constituido por material inorgánico (arena, limo y partículas arcillosas), materia orgánica, agua, gases y organismos vivos (lombrices, algas, bacterias y hongos) entre los que se establece un intercambio continuo mediante procesos físicos, químicos y biológicos (Figura 1). Por tanto, no es un ente estático, sino que mantiene un equilibrio dinámico con el medio que le rodea, con procesos continuos de síntesis y degradación, derivados fundamentalmente de la actividad de su biota y de su acción sobre los compuestos orgánicos.



Figura 1.- Componentes del suelo

El suelo ha existido siempre, desde el origen de la vida, siguiendo sus ciclos naturales de regeneración y ha sido y es, uno de los pilares para el sustento y desarrollo de la vida. Sin embargo, en los países más industrializados, se genera una ingente cantidad de residuos que si no son gestionados correctamente podrían llegar a contaminar los suelos haciéndoles perder su capacidad regenerativa e imposibilitando sus innumerables usos,

El suelo necesita de unas condiciones mínimas y adecuadas que le permitan llevar a cabo sin problemas aquellas funciones indispensables para su mantenimiento y conservación, así como para la producción de alimentos, y para el mantenimiento de la calidad ambiental local, regional y global (Doran *et al.*, 1999, Bastida, 2008) y de esto dependerá el mantenimiento de su calidad y fertilidad.

## **FUNCIONES Y USOS DEL SUELO.**

La importancia del suelo radica en las esenciales funciones que desempeña, siendo la base no sólo para la agricultura y otras actividades humanas (ganadería, infraestructuras, industria, etc.), sino que de él depende toda la vida del planeta. De acuerdo con Doran y Safley (1997) estas funciones las podemos agrupar en:

### a) Ecológicas:

- Es el soporte físico de una vegetación estable y de la producción de biomasa (alimentos, fibra y energía)
- Juega un papel crítico en el mantenimiento de la calidad del aire y de los ecosistemas, debido a su capacidad de filtrar, amortiguar y transformar compuestos tóxicos para proteger el ambiente y las masas de agua de la contaminación.
- Desempeña un papel esencial en el almacenamiento de agua y nutrientes para las plantas y microorganismos, proporcionándoles un hábitat adecuado, al tiempo que es un reservorio genético para plantas, animales y organismos, que deben ser protegidos de la extinción.

### b) Relacionadas con la actividad humana

- Constituye un medio físico que sirve de base espacial para las infraestructuras y actividades socioeconómicas
- Es fuente de materia prima y suplemento de agua, arcilla, arena, grava, y minerales, entre otros.
- Es parte de la herencia cultural al contener restos arqueológicos y paleontológicos importantes para preservar la historia de la tierra y de la humanidad.

Sin embargo, a pesar de su importancia, la protección de un recurso tan fundamental como es el suelo, no ha recibido la atención que se merece, estando sometido con frecuencia a acciones antrópicas centradas en un manejo inapropiado e irracional del mismo que ha conducido a la pérdida de materia orgánica, la reducción de su fertilidad y estabilidad estructural, la acentuación de los procesos erosivos, el incremento de las emisiones de CO<sub>2</sub> y en definitiva, a la pérdida de su calidad y a su degradación.

Los suelos destinados a fines agrícolas deben ser lo más productivos posible pero sin olvidar que la explotación agronómica debe ir conjugada con la conservación, lo que permitirá la permanencia de la fertilidad y calidad de los mismos. Esto último es lo que constituye la base del uso sostenible del suelo. Hay otros usos del suelo no menos importantes y que también deben ir asociados a acciones de protección y conservación, esto evitará la contaminación irreversible de los suelos permitiendo desempeñar sus funciones de forma adecuada.

## **IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO**

Aunque la biomasa microbiana del suelo pueda representar una fracción relativamente pequeña del total de la biomasa en los ecosistemas terrestres, que según algunas estimaciones representa del 1 al 5% de la fracción orgánica del suelo, la actividad de la misma es de la máxima importancia para la biodegradación, la mineralización y la inmovilización de los constituyentes orgánicos (Jenkinson, 1992; Labrador, 2001).

Es importante destacar la relevancia de la actividad microbiana en la calidad de un suelo, y por tanto, en su conservación y mantenimiento, así como en su recuperación cuando se encuentre sometido a procesos degradativos (Powlson *et al.*, 1987; García *et al.*, 2000). Los microorganismos ejercen una gran influencia en las reacciones de oxidación, hidrólisis y transformación en general de la materia orgánica, que a su vez tienen un claro reflejo en los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y otros elementos (Schloter *et al.*, 2003) son por tanto responsables de la salud del suelo, permitiendo el establecimiento de una cubierta vegetal estable la cual será de vital importancia para su protección y regeneración, evitando daños debidos a la erosión y constituyendo un hábitat adecuado para el desarrollo de la vida.

El suelo contiene cinco principales grupos de microorganismos: bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos. El ecosistema del suelo incluye estos grupos microbianos así como constituyentes orgánicos e inorgánicos que variarán en su composición en función del tipo de suelo (Alexander, 1991). Estos microorganismos del suelo están implicados en un gran número de procesos metabólicos con efectos a gran escala (Hawkes *et al.*, 2007), siendo críticos para el mantenimiento de las funciones del suelo puesto que están envueltos en procesos clave como la formación de la estructura del suelo, descomposición de la materia orgánica y eliminación de toxinas, además de su participación en los ciclos de los nutrientes del suelo ya mencionados anteriormente (García-Villaraco *et al.*, 2009).

## **CALIDAD Y SALUD DEL SUELO.**

Como ya se ha indicado anteriormente, el suelo está formado por material inorgánico (arena, limo y partículas arcillosas), materia orgánica, aguas, gases y organismos vivos (lombrices, insectos, algas, bacterias, hongos, etc.), entre los que se produce un intercambio continuo de moléculas mediante procesos físicos, químicos y biológicos. De ahí se deduce que para poder establecer la calidad de un suelo, el estudio de todo tipo de propiedades (físicas, químicas, biológicas, microbiológicas y bioquímicas) es imprescindible. En la Figura 2 se muestran las diferentes propiedades que afectan a las distintas fracciones que engloba la salud de un suelo.

A diferencia del agua y del aire, la calidad del suelo es difícil de definir y cuantificar. Esto es debido a que los criterios de calidad de un suelo pueden variar según el uso a que se destine, las prácticas de manejo que se utilicen, e incluso las prioridades socioeconómicas y/o políticas. Para Doran y Parkin (1994) los

aspectos que se deben tener en cuenta dentro de la definición de calidad del suelo son: i) La *productividad*, que representa la capacidad de un suelo para mejorar la producción vegetal y biológica; ii) La *calidad medioambiental*, es decir, la disposición del suelo a atenuar los efectos de los contaminantes y patógenos en el medio ambiente, y iii) La *relación*, existente entre la calidad del suelo y la salud de la planta, animales y el hombre.

Un enfoque integrado considera al suelo como un sistema vivo que responde a una intervención directa como si fuera un organismo (Kibblewithe *et al.* 2008), es en este contexto donde el concepto de salud del suelo es similar al de salud humana (Magdoff, 2001). El conjunto de propiedades del suelo importantes para mantener una buena salud del suelo, incluye una adecuada textura y estructura del suelo, un buen drenaje interno, cantidad suficiente de agua y capacidad de retención de nutrientes y reacción del suelo.



**Figura 2.-** Componentes de la salud del suelo

También un suelo sano, debe poder ofrecer una fuerte resistencia a los procesos degradativos y poder recuperarse tras la degradación debido a su resiliencia inherente (Magdoff, 2001). Salud del suelo, es un término usado principalmente por aquellas personas que trabajan del y en el suelo, frente a calidad del suelo que es usado por científicos y medioambientalistas (Herrick *et al.*, 1999; Karlen *et al.*, 2003).

Los parámetros usados como indicadores de la salud de un suelo, son similares a aquellos utilizados para medir la calidad del suelo. Sin embargo, son medidos y caracterizados cualitativamente para valorar la salud del suelo, y cuantitativamente para medir la calidad del mismo. Este conjunto de parámetros son específicos para tres componentes distintos (físicos, químicos y biológicos), pero relacionados entre sí (Tabla 1).

**Tabla 1.-** Parámetros de medida de la calidad y salud del suelo.

Parámetros cuantificables de calidad del suelo	Características cualitativas de salud del suelo
Distribución del tamaño de partícula	Textura, tacto
Estabilidad de agregados, peso y diámetro	Labrado, presencia de terrones
Distribución del tamaño de poro y porosidad total	Drenaje interno
Capacidad de retención hídrica	Sequia, inundabilidad
Erosionabilidad	Susceptibilidad a la erosión
Capacidad/Tasa de infiltración	Tiempo de estancado
pH	Sabor, olor
Capacidad de cambio catiónico/aniónico	Efecto tampón
Conductividad eléctrica	Salinidad
Concentración y disponibilidad de nutrientes	Fertilidad
Concentración del carbono orgánico del suelo	Color, olor
Carbono de masa microbiana	Biodiversidad
Tiempo de recuperación/restauración tras una agresión	Resiliencia

(Lal, 2011)

El término calidad del suelo es utilizado para definir ambos ecosistemas, naturales y alterados, mientras que el de salud del suelo, es utilizado para suelos alterados con cultivos en crecimiento y pastos.

Para valorar cual es la calidad del suelo es necesario disponer de una serie de parámetros que sean capaces de reflejar tanto su estado productivo como las posibles alteraciones producidas en sus ciclos biogeoquímicos por el manejo del suelo.

Como indicadores de la productividad y funcionalidad del suelo se han propuesto una serie de parámetros que podemos englobar en diferentes tipos:

- **Físicos:** textura y estructura del suelo, estabilidad de agregados, densidad, porosidad, capacidad de infiltración y capacidad de retención hídrica,
- **Químicos:** pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y contenido mineral,
- **Biológicos y Bioquímicos:** C y N de biomasa microbiana, respiración, actividades enzimáticas totales y específicas, medida de ATP e indicadores de biodiversidad.

Entre estos parámetros, los de tipo biológico y bioquímico son los que aportan una información más inmediata sobre cualquier perturbación sufrida por el suelo, debido a la gran sensibilidad y rápida respuesta de las comunidades microbianas ante cualquier alteración introducida en el ecosistema.

Sin embargo, los cambios en la componente física y química del suelo necesitan un tiempo mayor para poder ser detectables, por lo que es la componente biológica del suelo la que podrá servir como primer indicio de cualquier alteración en la calidad del suelo. Entre estos parámetros biológicos existen algunos

como el contenido en C y N de la biomasa microbiana, el ATP y la respiración del suelo, o incluso, la actividad de oxidorreductasas como la deshidrogenasa, que pueden ser considerados como generales, ya que su medida permite dar una idea de los procesos microbianos que se producen en el suelo de forma global. Por el contrario, otros parámetros bioquímicos, como la mayoría de las actividades enzimáticas del tipo hidrolasas, implicadas en los ciclos de los nutrientes:  $\beta$ -glucosidasa en el ciclo del carbono, fosfomonoesterasa en el ciclo del fósforo, ureasa en el ciclo del nitrógeno etc.) deben ser considerados como parámetros específicos, puesto que corresponden a reacciones concretas y dependen precisamente de sustratos específicos (Nannipieri *et al.*, 1990).

Estos cambios sufridos en el suelo provocados por agresiones de distinta índole, deben ser gestionados por el suelo para reponerse, y en este sentido se introduce el término resiliencia. La resiliencia de un suelo, se define como la capacidad de recuperarse después de sufrir una perturbación, reteniendo su estructura, función, identidad y reacciones (Brand y Jax, 2009; Holling *et al.*, 2002; Lal, 1997; Walker *et al.*, 2004, 2010; Walker y Salt, 2006).

La resiliencia y la resistencia, son atributos fundamentales en un buen suelo, que dependen de la salud del mismo. La resistencia, es la capacidad inherente del sistema para tolerar la alteración; y la resiliencia, es la capacidad amortiguadora y la habilidad para regenerarse. Por otro lado, la biodiversidad, es una propiedad que condiciona la capacidad de recuperación del sistema edáfico ante una alteración y de mantener su capacidad funcional (Griffiths *et al.*, 2001). Un suelo sano con concentraciones aceptables de materia orgánica, propia o introducida, y propiedades y procesos favorables tendrá una buena resiliencia, lo que le protegerá de la pérdida de calidad frente a las diversas agresiones, asimismo, la adaptabilidad es esencial para que un suelo tenga resiliencia. Definir los niveles límites de las diferentes propiedades del suelo, de los usos específicos de los suelos y los ecosistemas, es esencial para mantener y aumentar la capacidad de resiliencia de un suelo (Lal, 1997).

La actividad metabólica que muestre un suelo se verá afectada por problemas de contaminación, así como cuando se siga un proceso de descontaminación como el que nos ocupa en este trabajo, pudiendo ser dicha actividad un reflejo de la posibilidad de degradación de compuestos tóxicos para el suelo, como los hidrocarburos (Lobo *et al.* 2000). Desde hace unos años, también son frecuentes los estudios en los que se monitoriza el estado bioquímico y microbiológico en suelos a los que se ha adicionado enmiendas orgánicas considerados de nueva generación como son los biosólidos de depuradora, ya que dichos parámetros nos ayudan a conocer el efecto que dichos materiales orgánicos provocan sobre los procesos metabólicos globales de los microorganismos del suelo y su actividad microbiana particular (Pascual *et al.*, 2000; Bonmatí *et al.*, 2000; Canet *et al.*, 2000).

## PROCESOS DE DEGRADACIÓN DEL SUELO

Los procesos de degradación a los que el suelo puede estar sometido pueden ser naturales o antrópicos. Los procesos naturales se deben entre otros factores a fenómenos como el clima, la temperatura, las lluvias, etc., mientras que en la degradación antrópica mencionaremos la degradación física (malas prácticas en agricultura, compactación superficial, y erosión hídrica y eólica), la degradación química (salinización, alcalinización, desbasificación y contaminación), y la degradación biológica (disminución en el contenido de materia orgánica y degradación o eliminación de la cubierta vegetal).

Estos procesos pueden ocurrir de manera simultánea puesto que unos pueden inducir a otros o simplemente estar sometidos a diferentes factores de degradación. La conjunción de varios procesos en un mismo suelo, intensifica mucho más la pérdida de calidad del mismo.

- **Degradación física**

La degradación física se produce como consecuencia de diversos procesos relacionados entre sí, tales como la compactación, el encostramiento, la reducción de la permeabilidad, la falta de aireación, la degradación de la estructura, y las limitaciones en el enraizamiento, relacionados con la reducción de la porosidad del suelo. Dorronsoro y Barahona (2004), afirman que la degradación física se origina por la pérdida de estructura, aumento de la densidad aparente, disminución de la permeabilidad y disminución de capacidad de retención hídrica. La contaminación del suelo con hidrocarburos puede provocar alteraciones en las propiedades físicas del suelo, principalmente en la capacidad de retención hídrica (Ezeonu y Chukwuma, 2010).

La degradación física de un suelo se caracteriza por el deterioro de su estructura. De esta manera, un suelo con una buena estabilidad de agregados, y óptima porosidad se transforma en otro apelmazado, con escasa o nula porosidad. La causa intrínseca es la disminución del porcentaje de humus, como consecuencia de desmontes, labranzas excesivas, compactación, e inundaciones y anegamientos prolongados. Se vuelve a poner de manifiesto, de nuevo, la importancia que la materia orgánica, y por tanto, las propiedades biológicas del suelo, tienen sobre aspectos como la degradación física.

La compactación de aquellos suelos con una estabilidad estructural baja se produce por el paso continuado de maquinaria pesada, así como por el pastoreo intensivo, o por su uso recreativo intenso. Los efectos negativos de este proceso son: la pérdida de materia orgánica, la modificación del balance hídrico del suelo por su incapacidad para retener el agua, con el consiguiente riesgo de inundaciones, y la alteración de sus funciones ecológicas. Cuando la compactación afecta a las capas más profundas del subsuelo, puede dar lugar a cambios irreversibles en la estructura edáfica.

Este tipo de degradación, característica de zonas con sistemas de producción agrícola intensiva muy mecanizada, o en zonas donde existe una elevada concentración de ganado, provoca una pérdida de productividad en estas zonas que llega a ser en algunos casos de hasta un 35%.

- **Degradación química**

La degradación química puede deberse a pérdida de nutrientes, acidificación, salinización, sodificación, y aumento de toxicidad por la acumulación de determinados contaminantes o xenobióticos (Dorronso y Barahona, 2004). Los diversos procesos y ciclos biogeoquímicos que intervienen en el suelo, pueden verse modificados acusadamente como consecuencia de diferentes actividades industriales y agrícolas. De esta manera los fenómenos de degradación química del suelo son consecuencia del desequilibrio que se produce entre la tasa de vertido o contaminación y la descomposición o degradación natural de determinadas sustancias tóxicas en el mismo. En definitiva, el suelo se degrada al acumularse en él sustancias tóxicas a unos niveles tales que repercuten negativamente en el comportamiento y funcionamiento del mismo.

En las actividades agrícolas, los usos indebidos o intensivos del suelo pueden perjudicar enormemente la fertilidad del mismo, produciendo a su vez un deterioro de su calidad. El suelo puede contaminarse directamente al emplear elevadas concentraciones de fertilizantes y plaguicidas, debido a la expansión de algunas técnicas agrícolas intensivas con el fin de aumentar la producción de alimentos vegetales (Felipo y Garau, 1987). Asimismo, diversas actividades industriales, o de eliminación de residuos, pueden producir fenómenos degradación química de suelo.

#### Degradación por acidificación

La agricultura intensiva, mediante la utilización inadecuada de fertilizantes y plaguicidas, y la deposición atmosférica de compuestos de azufre y nitrógeno ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ , y  $\text{NH}_3$ ), procedentes de actividades industriales, así como de la utilización de combustibles fósiles, son las principales causas que pueden acelerar el proceso de la acidificación del suelo, originado por lluvia ácida. Bajo estas condiciones, una vez agotada la capacidad de amortiguación del suelo, se pueden liberar o movilizar elementos potencialmente contaminantes que anteriormente se encontraban inmovilizados a pH neutro-básicos. Asimismo, la acidificación conduce a una pérdida de la fertilidad de los suelos, producida, entre otros factores, por el lavado de nutrientes, la descomposición de la materia orgánica, y la destrucción de comunidades de organismos beneficiosos (García-Navarro, 2001).



### Degradación por salinización

La salinización es el enriquecimiento del suelo en sales solubles por encima de los niveles tolerables por las plantas. Constituye un problema que afecta principalmente a determinadas regiones áridas o semi-áridas, caracterizadas por un clima que favorece este proceso (escasas precipitaciones y elevadas temperaturas).

En zonas costeras, la sobreexplotación de acuíferos provoca un descenso de los niveles freáticos favoreciendo la intrusión salina. El agua de mar, debido a su elevada densidad, penetra en los acuíferos, llegando a invadir una parte importante de los mismos. La utilización reiterada de esta agua salina para el riego, incrementa la concentración de sales en el suelo, especialmente en terrenos mal drenados y con elevadas tasas de evapotranspiración. Por otro lado, la utilización excesiva de productos fertilizantes en la agricultura, también contribuye a la salinización de las tierras de cultivo adyacentes sobre las que se aplican.

En las primeras fases de la salinización se pueden producir serios daños sobre los cultivos por las dificultades creadas para la absorción de agua y nutrientes, o por la toxicidad directa de alguno de los elementos. También la salinidad tiene consecuencias negativas sobre la actividad microbiológica del suelo. Mas a largo plazo, este proceso degradativo perjudica también la estructura del suelo (dispersión de las arcillas encostramiento, etc.), Consecuentemente, la economía de las regiones afectadas, por lo general basada en la agricultura, se ve altamente perjudicada

### Degradación por contaminación

Se considera como suelo contaminado “aquél que ha superado su capacidad de amortiguación para una o varias sustancias y, como consecuencia, pasa de actuar como un sistema protector a ser causa de problemas para el agua, la atmósfera y/o los organismos. Al mismo tiempo se modifican sus equilibrios biogeoquímicos, y aparecen cantidades anómalas de determinados componentes que causan cambios en sus propiedades físicas, químicas, o biológicas” (Macías, 1993). Estas situaciones pueden estar provocadas por causas naturales o por la actividad del hombre, de modo que se diferenciaría entre una contaminación natural o endógena y una contaminación antrópica.

Existen diversas definiciones sobre un suelo contaminado que no se diferencian excesivamente entre si, como la propuesta por FAO (1997) que lo considera una “forma de degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo” o la utilizada por Logan (1990): “impacto negativo acumulativo de compuestos químicos que regulan los procesos biológicos del suelo”. Según estas definiciones prácticamente la totalidad de las acciones humanas son causa de contaminación del suelo lo que nos pondría en una difícil situación al establecer una gestión adecuada y eficaz de la utilización del suelo en el estado de desarrollo de nuestra civilización.

Bajo el término contaminación, indicamos la presencia de uno o varios compuestos o elementos en una concentración tal que genera un efecto fisiológico desfavorable en los organismos, y por tanto, puede causar un cambio ecológico (Lobo *et al.*, 2000). La contaminación del suelo es un fenómeno de origen fundamentalmente antrópico que se produce como consecuencia de la eliminación incontrolada de sustancias químicas, residuales al medio ambiente durante los procesos productivos desarrollados por el hombre.

En 2005 fue publicado el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Este real decreto de ámbito estatal, tiene por objeto establecer una relación de actividades susceptibles de causar contaminación en el suelo, así como adoptar criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, y obliga a los responsables a adoptar las medidas necesarias para descontaminar el suelo en caso necesario. En el anexo I del RD 9/2005, se contempla el refino de petróleo como actividad potencialmente contaminante del suelo, por lo que los titulares de dicha actividad están obligados a remitir a la comunidad autónoma correspondiente, un informe preliminar de situación para los suelos en los que se desarrolla dicha actividad. Específicamente para los hidrocarburos, se debe valorar su nivel genérico de referencia según los criterios establecidos en el anexo VII, para los que se establecen unos valores de 0,05 para hidrocarburos aromáticos policíclicos y 0,1 para hidrocarburos aromáticos monocíclicos, para verificar el cociente entre la dosis de exposición a largo plazo debida a la contaminación del suelo y la dosis máxima aceptable.

La contaminación causada por el petróleo y sus derivados es un problema cada vez más frecuente en el medioambiente que está generando un gran interés en la comunidad científica con el fin de poder abordar de forma integral los procesos de degradación y las consecuencias de estos en el medio edáfico y en definitiva en el medio ambiente (Millioli *et al.*, 2009). Por ser éste el proceso de degradación que compete a este trabajo de Tesis Doctoral desarrollaremos su problemática más ampliamente más adelante.

- **Degradación biológica**

En primer lugar debemos tener claro que suelo y materia orgánica constituyen un binomio que siempre debe ir unido cuando se habla de calidad, salud o sostenibilidad de un suelo (Bastida, 2008). La materia orgánica que se incorpora al suelo no procede exclusivamente de restos vegetales de plantas, sino también de sus exudados, restos de animales muertos y restos de microorganismos, y teniendo en cuenta su diversa procedencia, se puede definir la materia orgánica del suelo como un complejo sistema de sustancias en un estado dinámico permanente, producido por la incorporación al mismo de residuos orgánicos, principalmente de origen vegetal, y en menor cuantía animal, en diferentes estados de descomposición y evolución (Moreno, 1997).

La materia orgánica es vital para que el suelo pueda realizar sus funciones clave, además de tener una incidencia directa sobre el desarrollo y crecimiento vegetal y microbiano, por lo que resulta un factor determinante de la fertilidad del suelo y de su resistencia frente a la erosión y otros procesos de degradación (Alvadalejo y Díaz, 1990). Se establece pues una relación directa entre la presencia de materia orgánica en un suelo y la diversidad biológica que alberga.

Las propiedades del suelo sobre las que más influencia tiene la materia orgánica son la estabilidad, el tamaño, y la distribución de los agregados, la densidad, la porosidad, el drenaje, la capacidad de retención hídrica y el intercambio catiónico. Asimismo, garantiza la capacidad de amortiguación del suelo, lo que contribuye a limitar que la contaminación difusa del suelo llegue a las reservas de agua. La acumulación de materia orgánica en el suelo o humificación es un proceso lento, mucho más lento que la mineralización de la misma. Este proceso de acumulación se ve favorecido por el empleo de técnicas y prácticas adecuadas de manejo del suelo, la mayoría de las cuales son eficaces también a la hora de prevenir la erosión, aumentar la fertilidad, y potenciar la biodiversidad del suelo.

Algunos de los procesos de degradación biológica que más acusan los suelos del sudeste español como son, la roturación de los suelos naturales para su puesta en cultivo, y el arado repetido de estos, constituyen una práctica que se viene realizando desde hace muchos años, y que afecta de una manera muy intensa al proceso de humificación y a una serie de propiedades asociadas con éste. Tales prácticas conducen a una disminución muy importante de la cantidad de restos vegetales aportados al suelo, a la vez que la materia orgánica experimenta una mineralización acelerada por la acción del laboreo, dando como resultado una disminución progresiva del contenido en materia orgánica del suelo, con todas sus consecuencias. El empobrecimiento progresivo de los suelos en materia orgánica, tiene como efecto inmediato una modificación de su estructura, de forma que las uniones establecidas entre las arcillas y el humus del suelo se pierden, haciendo al suelo más vulnerable a la erosión.

La disminución y destrucción de la cubierta vegetal por diversos agentes, y la consecuente pérdida de materia orgánica de los suelos, provocado, en su mayor parte, por acciones de tipo antrópico: aclareos y tala de árboles, monocultivos con clara incidencia en la biodiversidad, quema de arbustos, pastoreo intensivo, incendios de bosques, etc., puede alterar profundamente el equilibrio ambiental natural. La falta del aporte de materia orgánica incide sobre la pérdida de diversidad biológica y la disminución de la actividad microbiana del suelo, lo que perjudicará a la calidad y salud del mismo. Estos agentes son fundamentales en regiones áridas y su uso afecta a la exposición a otros procesos de degradación como la erosión. Como consecuencia, se produce un empeoramiento de las propiedades del suelo y en general, una disminución de la producción y aumento de los gastos de explotación a corto plazo; y a largo plazo, infertilidad total, abandono, y como consecuencia grave, la desertización del territorio.

## ACTIVIDAD HUMANA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La actividad del hombre en la naturaleza afecta enormemente al medio natural que le rodea. Como consecuencia de las actividades antrópicas (industrial, minera, energética, agrícola, etc.), existe una elevada producción de residuos, lo cual se convierte en un problema medioambiental si no existe un buen plan de gestión de los mismos. En términos generales y en la medida de lo posible, se tiende a reducir la generación de residuos y gestionarlos de una manera adecuada, dados los conocimientos que tenemos actualmente sobre el daño medioambiental que provoca su vertido incontrolado.

De acuerdo con la definición de contaminación de suelos propuesta por Knox *et al.* (1999), un suelo se considera contaminado cuando la concentración de uno o varios contaminantes es tal que empieza a afectar los procesos bioquímicos y biológicos. Además la contaminación del suelo puede provocar cambios en su contenido de humus, en su estructura y en su pH (Mohammed *et al.*, 2011).

Una importante herramienta para gestionar la contaminación de los suelos es el ya citado Real Decreto 9/2005, en el que se detallan las actividades, usos y elementos considerados como contaminantes así como la responsabilidad y obligatoriedad de recuperación de los suelos afectados.

### Fuentes y tipos de agentes contaminantes del suelo

Se considera contaminante a toda sustancia que tiene el potencial de presentar un riesgo para la salud humana, de los animales y plantas así, como para la salud del suelo.

Los agentes contaminantes del suelo son diversos y tienen distintas procedencias (producción de energía, minería, industria, agricultura, comercio, etc.). La contaminación química es la más importante y la que más consecuencias puede tener para el medioambiente y por tanto, para la salud de los animales y el hombre. Entre los contaminantes químicos del suelo más comunes y representativos se incluyen los metales pesados, la lluvia ácida, las sales y los fitosanitarios, así como otros compuestos orgánicos como los hidrocarburos, que veremos con más detalle dado que es el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. La mayor parte de estos agentes contaminantes tiene su origen en la actividad humana aunque también aparecen de forma natural en el suelo.

- Metales pesados

Algunos son necesarios para los seres vivos a relativamente bajas concentraciones pero cuando se superan ciertos niveles resultan tóxicos. Se habla de una contaminación *local*, cuando ésta afecta a los alrededores del foco de contaminación, que suele estar relacionado con la minería, la industria, los vertederos y otras instalaciones, tanto en uso como ya clausuradas.

La contaminación *difusa*, está asociada generalmente a la dispersión de metales pesados tanto solubles como particulados en zonas alejadas del origen de la fuente, relacionadas con la deposición hídrica o

eólica. También existen una serie de prácticas agrarias que aumentan la presencia de estos contaminantes en el suelo de forma drástica *in situ* o en zonas aledañas (Vidal *et al.*, 2004). Las principales fuentes de contaminación por metales pesados en áreas agrícolas provienen de impurezas en los fertilizantes, lodos de depuradora, compost derivados de residuos orgánicos urbanos, el estiércol procedente de las explotaciones extensivas avícolas y porcinas, y plaguicidas utilizados en tratamientos fitosanitarios. También se debe considerar la contribución de la contaminación difusa de metales traza por transporte a través de la atmósfera, que a lo largo de muchos años se han dispersado por grandes áreas (Alloway, 1995; Förstner, 1995).

- Emisiones ácidas atmosféricas

Esta fuente de contaminación procede principalmente de la industria, el tráfico rodado y de abonos nitrogenados que sufren procesos de desnitrificación. La consecuencia directa de estas emisiones ácidas atmosféricas, una vez se depositan sobre el suelo (lluvia ácida), es su acidificación, de manera que el suelo puede perder su capacidad tamponadora, por lo que se solubilizan algunos elementos que quedan disponibles para plantas y animales con el consiguiente riesgo de toxicidad. Los efectos contaminantes de este tipo de emisiones han sido ampliamente estudiados por Kennedy (1992) incidiendo en la peligrosidad de la acidificación de los suelos.

- Uso de aguas salinas para riego

El mal uso del agua de riego puede provocar la salinización o sodificación del suelo. La salinización produce una acumulación de sales más solubles que el yeso, que interfieren en el crecimiento de la mayoría de los cultivos y plantas no resistentes. En el caso de la sodificación, se produce una acumulación de sodio intercambiable que tiene una acción dispersante sobre las arcillas, y de solubilización de la materia orgánica, que afecta muy negativamente a las propiedades físicas del suelo (agregados menos estables, sellado del suelo, encostramiento y disminución de la conductividad hidráulica), por lo que el medio será menos apto para el crecimiento de los cultivos.

- Compuestos orgánicos xenobióticos

Pertencen a este grupo los plaguicidas y los fertilizantes. Los plaguicidas, son generalmente productos químicos de síntesis y sus efectos dependen en su mayoría de las características de las moléculas orgánicas, y de las características del suelo. Los fertilizantes además de contener metales pesados, como impurezas, pueden producir contaminación por fosfatos y nitratos.

Existen también otros xenobióticos muy persistentes en el suelo y entre los que se encuentran algunos de los productos de mayor actividad mutagénica y carácter bioacumulativo, tales como las dioxinas, pentaclorofenol y PCBs. Debido a la peligrosidad y toxicidad que pueden presentar, existe una normativa

específica para su utilización, limitando el uso de algunos de ellos y referenciando unos niveles máximos tolerables presentes en el suelo.

A pesar de que no es deseable que este tipo de compuestos entren en el medio a través del suelo, en ocasiones es necesario elegir la opción menos perjudicial de las alternativas posibles y, sin duda, la peor de ellas es la entrada directa de estas sustancias en el medio acuático o atmosférico, ya que al menos, en los suelos pueden ser retenidas y parcialmente descompuestas por mecanismos como los de descomposición fotoquímica que se producen en las capas superficiales del suelo (Miller *et al.*, 1989).

## **CONTAMINACIÓN DEL SUELO POR HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO**

La dependencia que nuestra civilización tiene del petróleo ha sido la causa de la contaminación de suelos, muy extendida en los países productores y consumidores de petróleo, debido a los derrames de petróleo y sus derivados, así como al manejo indebido de los lodos procedentes de las refinerías. Los hidrocarburos del petróleo son tóxicos para los animales y el hombre ya que son mutagénicos y carcinogénicos (Flores *et al.*, 2001). La contaminación por estos compuestos se caracteriza en la mayoría de los casos, por ser muy persistente en los ecosistemas aunque existan procesos degradativos en los que intervienen microorganismos, presentes de forma natural en los ecosistemas, que pueden ser utilizados o activados en procesos de biorremediación. En el caso del suelo, las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar del derrame, los cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y la contaminación por infiltración de las masas de agua subterráneas. Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado (Castro, 2006).

### **Tipos de hidrocarburos y sus características.**

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos, formados por moléculas de carbono e hidrógeno de gran abundancia en la naturaleza. Las fuentes de los hidrocarburos son principalmente el gas natural, la hulla y el petróleo, siendo los derivados de esta última fuente los más interesantes por sus efectos perjudiciales en el medioambiente. Es por ello que la introducción de esta Memoria de Tesis Doctoral se va a centrar en la problemática que generan estos hidrocarburos como contaminantes del suelo.

Químicamente, el petróleo es una mezcla muy heterogénea de hidrocarburos aunque también presenta otros tipos de elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales. La complejidad y variedad de hidrocarburos que conocemos derivan de la capacidad que tiene el átomo de carbono de formar enlaces, lo que puede dar lugar a moléculas lineales o cíclicas más o menos complejas.

En función de su estructura química los hidrocarburos se pueden clasificar de manera clara en cinco grupos:

- **Saturados:** Incluyen a los alcanos que son cadenas lineales (acíclicas) de carbono unidas por enlaces sencillos. Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas. Estos pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 átomos de carbono, aunque se han logrado detectar cadenas de hasta de 60 átomos de carbono. Cuando estas cadenas forman estructuras cíclicas dan lugar a los cicloalcanos o cicloparafinas, los cuales son componentes minoritarios del petróleo crudo.
- **Insaturados:** Incluyen a los alquenos y alquinos que son cadenas lineales de C unidas por enlaces dobles y triples, respectivamente.
- **Aromáticos:** Los compuestos aromáticos son derivados del benceno, ciclos donde los átomos de carbono se unen por medio de enlaces simples y dobles alternados. Los anillos pueden encontrarse fusionados entre sí, dando lugar a los compuestos policíclicos aromáticos (PHA), constituyendo entre el 10 y 25% del petróleo crudo y son las fracciones más pesadas.
- **Resinas:** Agregados con una multitud de grupos del tipo sulfóxido, amida, tiofenos, piridinas, quinolinas y carbazones.
- **Asfaltenos:** Están formados por agregados de poliaromáticos, ácidos naftalénicos, sulfuros, compuestos polifenólicos, ácidos grasos y metaloporfirinas. Estos últimos son a menudo considerados como no biodegradables o escasamente biodegradables (Wilson y Jones, 1993; Walker y Colwell, 1975), aunque algunos autores consideran como una posible biodegradación a un mecanismo de cooxidación, en el cual estos hidrocarburos son oxidados en presencia de otros que sí sirven como sustrato de crecimiento microbiano (Perry, 1979; Rontani *et al.*, 1985; Marín, 2004)

### **Lodos de refinería**

En las empresas petroquímicas, la obtención de productos derivados del petróleo conlleva el uso constante de agua, la cual hay que depurar de forma adecuada para evitar problemas de vertidos contaminantes. Es precisamente durante la depuración de este tipo de aguas empleadas en refinerías de petróleo cuando surgen unos efluentes de carácter orgánico y consistencia pastosa, que se caracterizan por estar constituidos por hidrocarburos, en torno al 20-40%, con un número de carbonos que varía del rango de C9 a C20 (Demque *et al.*, 1997). Su composición cambia ligeramente de un crudo a otro pero son fundamentalmente hidrocarburos saturados (parafinas) e hidrocarburos aromáticos (oleofinas, alquil-bencenos, naftalenos, fenantrenos etc.). Aunque los primeros están muchas veces en una mayor cantidad

dentro de los residuos petroquímicos, los segundos son más difíciles de degradar por su carácter aromático.

Este tipo de compuestos son biodegradados por un amplio número de microorganismos en la naturaleza, sin embargo, el tiempo empleado en ello está directamente relacionado con su peso molecular y número de anillos (Demque et al., 1997), estimándose que la vida media de compuestos aromáticos de más de 5 o 6 anillos es del orden de años (Launen et al., 1995). El hecho de que estos hidrocarburos sean degradados tan lentamente se debe, entre otras causas, a que presentan un bajo contenido en nutrientes, características hidrófobas y baja difusión de oxígeno, lo que dificulta su metabolismo por los microorganismos (Clark, 1995).

La actividad de la industria petroquímica en el refino del petróleo conlleva la generación de estos lodos de refinería que se presentan como un problema que se debe gestionar adecuadamente para poder ser eliminado de una forma lo más respetuosa posible con el medioambiente. Son diversas las técnicas de eliminación de estos lodos de refinería, siendo la más extendida, y la que afecta a esta Memoria, su disposición en el suelo de una forma controlada para su posterior tratamiento mediante *landfarming*.

### **Efectos tóxicos de los hidrocarburos en suelo, planta y seres vivos**

La salud del suelo repercute directamente sobre las plantas y los seres vivos, puesto que es éste un componente fundamental de la biosfera de la tierra y actúa no sólo como productor de alimentos y fibras sino también como base para el desarrollo de la agricultura y las comunidades de plantas naturales. Por este motivo la salud del suelo representa la diferencia entre la supervivencia o no de los seres vivos que habitan en él (Doran et al., 2000).

La toxicidad de un elemento es distinta dependiendo de su movilidad, lo que va a regular no solo su biodisponibilidad sino también su grado de toxicidad.

Los hidrocarburos son moléculas altamente tóxicas para las plantas y los microorganismos e invertebrados que habitan el suelo donde se encuentran (Hernández y Hobbie, 2010), y constituyen un riesgo potencial para la salud que aumenta cuanto mayor es la resistencia a la degradación de los hidrocarburos (Labud et al., 2006). En el caso del suelo, además de su toxicidad para los microorganismos y las plantas, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera. Estos compuestos pueden sufrir en el suelo una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación, lixiviación y degradación, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, (los de cadena corta se degradan con mayor facilidad), además de la temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad de contaminante pueden ser procesos más o menos lentos, lo que condiciona su toxicidad. Otra característica asociada a la contaminación por hidrocarburos es la moderada o alta salinidad que provocan en el suelo, la cual puede destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células. Todo esto hace que se destruyan muchos



microorganismos indispensables para el mantenimiento de la funcionalidad del suelo, lo cual podría ser perjudicial para la biorremediación de los suelos contaminados con estos compuestos, puesto que la actividad de los microorganismos del suelo es de vital importancia para que se lleve a cabo la degradación de los hidrocarburos presentes en el mismo.

Existen diferentes estudios que han determinado el efecto de la contaminación con hidrocarburos en la germinación y crecimiento vegetativo de diferentes especies de pastos marcando un retraso en el crecimiento de todas las plantas evaluadas (Liu, 2010). Asimismo, otros estudios evaluaron el efecto de los hidrocarburos poliaromáticos (más persistentes y tóxicos) en ecosistemas forestales y plantas madereras, demostrando un efecto de necrosis foliar (Lopez de Mesa *et al.*, 2006).

Ésta contaminación está ocasionando un deterioro progresivo de muchos ecosistemas, destruyendo la calidad del medio ambiente y generando una amenaza real para la salud pública, así como la extinción de especies vegetales y animales.

### **Factores que afectan a la biodegradabilidad de los hidrocarburos**

Diversos estudios como el de Enning (1995) en la universidad de Idaho muestran como la degradación de los hidrocarburos por parte de los microorganismos en el medio ambiente está fuertemente influenciada por algunos factores del suelo y según la EPA (1993) los parámetros más importantes en los tratamientos de biorremediación del suelo incluyen: los horizontes del suelo, profundidad, textura, densidad aparente, porosidad, conductividad hidráulica, permeabilidad, labrado, capacidad de cambio de cationes y aniones, contenido en materia orgánica, pH, contenido en agua, capacidad de retención hídrica, contenido de nutrientes, salinidad, potencial redox, color y actividad biológica. Muchos de estos parámetros están relacionados entre sí y dependerán unos de otros. Algunos de ellos los describiremos más adelante.

También se consideran la naturaleza y los niveles de contaminante como factores limitantes para el éxito de los tratamientos de biorremediación.

- Naturaleza y concentración del contaminante:

Como ya hemos visto, no todos los hidrocarburos son iguales y dependiendo de su estructura y naturaleza serán más o menos fáciles de degradar. La biodegradabilidad de un compuesto orgánico está basada en que pueda ser utilizado por los microorganismos como fuente de carbono, y esta capacidad de ser biodegradado dependerá de factores como la solubilidad, grado de ramificación, grado de saturación, y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes (Niemi, 1987; Marín, 2004). La peligrosidad de la contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo depende del tipo y concentración del contaminante, y aunque son moléculas susceptibles al tratamiento de biorremediación, los hidrocarburos de cadena larga (de más de 20 carbonos) y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de 5-6 anillos, pueden ser considerados como

los materiales que se degradan con mas lentitud (EPA, 1993). De manera general se acepta que la susceptibilidad de los hidrocarburos al ataque de los microorganismos disminuye en el siguiente orden: *n*-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > alcanos cíclicos (Obrad *et al.*, 2004, Labud *et al.*, 2006). De forma genérica los hidrocarburos mas sencillos, que son los saturados, de cadena lineal y con enlaces simples, son los más fáciles de degradar, mientras que conforme la molécula se hace más compleja con la presencia de dobles y triples enlaces serán más difíciles de degradar, siendo los hidrocarburos mas complejos todavía, como los poliaromáticos, los más persistentes.

Puesto que son los microorganismos los encargados de la degradación de los hidrocarburos, y la estructura de los mismos afecta directamente a su disponibilidad para los microorganismos, será éste un factor clave.

También la concentración en la que se encuentren los hidrocarburos es importante puesto que por un lado, debe ser suficiente como fuente de carbono para soportar la carga microbiana, pero por otro, no debe ser excesiva, puesto que en niveles muy elevados puede afectar de manera negativa resultando tóxica para el desarrollo microbiano (La Grega *et al.*, 1996). Así, niveles de contaminación de productos petrolíferos por encima del 25% en peso del suelo han sido catalogados como tratables, aunque algunas experiencias indican que niveles entre el 5 y el 8% en peso o menores son mas fácilmente tratables (EPA, 1993).

Generalmente, una vez que los niveles de contaminación alcanzados están por debajo de 50-200 mg/Kg de hidrocarburos poliaromáticos (PAH), la remediación mediante técnicas de tratamiento de recuperación de suelo son lentas, y futuros tratamientos mediante técnicas convencionales serán ineficaces (EPA, 1993).

Los niveles finales de descontaminación alcanzables, pueden variar en función del hidrocarburo, como ya hemos visto, y de las condiciones del lugar, que dependerán de distintos factores que describimos a continuación.

- Propiedades físico-químicas del suelo:

Son muchas las propiedades del suelo que afectan, de una u otra forma, al éxito de las técnicas de biodegradación. Describimos a continuación algunas de ellas según nos indica la EPA (1993).

El tipo de horizonte, la profundidad a la que se encuentra el límite de la roca madre o los acuíferos, y la textura (definida como la proporción de arenas, limos y arcillas que posee), determinarán el lugar en el que se encuentre el contaminante, puesto que estos factores afectan de forma directa o indirecta, a la movilidad de dicho contaminante a través del suelo.

La textura del suelo influirá en la porosidad, conductividad hidráulica, permeabilidad, facilidad de labrado, capacidad de cambio, y capacidad de adsorción de contaminantes, lo que influirá en la localización y disponibilidad del contaminante.

La porosidad, conductividad hidráulica y permeabilidad, describen las características del suelo y la velocidad de movimiento del agua a través del mismo, lo que influye en la movilidad de agua y gases en el suelo y es de particular importancia en los tratamientos de biorremediación porque la proporción de gas y agua en el suelo es importante para mantener una adecuada actividad microbiana.

La presencia de materiales arcillosos del suelo, confiere una alta capacidad de adsorción para materiales orgánicos como son los hidrocarburos, lo que afecta a la retención en el suelo del contaminante, y la capacidad de cambio afecta de forma beneficiosa aunque se trate de moléculas con carga negativa. La capacidad de cambio de las arcillas es muy elevada para contaminantes con carga positiva y no tan elevada para aquellos que tienen carga negativa, como son los hidrocarburos, aunque en cualquier caso siempre la presencia de arcillas, afectará a la retención de los contaminantes en el suelo (EPA, 1993).

#### *Aireación*

La biorremediación de los hidrocarburos es considerada un proceso aerobio. Se ha comprobado que el rendimiento de esta técnica se mejora con una correcta oxigenación (Harmsen, 1991) puesto que bacterias y hongos catabolizan los hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos mediante reacciones de oxidación. Aunque éstas serán las reacciones mayoritarias, también existe una pequeña parte de biodegradación de forma anaeróbica que debemos tener en cuenta para una descontaminación total del suelo.

#### *pH del medio*

Como ocurre en todas las reacciones bioquímicas, el pH del medio es un factor crucial puesto que dependiendo de este parámetro se consigue la velocidad máxima de reacción. En el caso de los microorganismos del suelo se considera que con un pH en torno al neutro (entre 6-8) el metabolismo de las células es óptimo. Los hongos, por el contrario, son capaces de funcionar correctamente con pH más ácidos. Dibble y Bartha (1979) indicaron, después de un estudio referente a estas condiciones, que el pH 7,8 era el óptimo para la mineralización de los hidrocarburos.

#### *Presencia de metales pesados y sales.*

La presencia de metales pesados genera un grave estrés a los microorganismos del suelo inhibiendo su desarrollo, o incluso, a elevadas concentraciones, pueden tener un efecto letal, lo que influirá considerablemente en la biodegradación del hidrocarburo por parte de estos microorganismos (Moreno *et al.* 2009). Lo mismo ocurre con la presencia de sales (Ezeonu *et al.* 2010), por este motivo, y siempre que sea posible, se deben evitar ambientes contaminados con metales pesados y/o sales para aplicar técnicas de biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos. Otra solución a este problema sería inocular microorganismos resistentes a estos contaminantes en consorcio con los degradadores de

hidrocarburos, pero nunca se obtendrían resultados tan aceptables como cuando se trabaja en condiciones adecuadas para las bacterias degradadoras de hidrocarburos.

#### *Condiciones ambientales*

La humedad y temperatura también afectan directamente a la biodegradabilidad de los hidrocarburos, puesto que son dos condiciones ambientales indispensables a tener en cuenta para el desarrollo microbiano.

La presencia de agua en el ambiente es fundamental para que los microorganismos sobrevivan y se desarrollen adecuadamente, Además, el agua es indispensable para el transporte de los sustratos y para que los mismos se encuentren biodisponibles para los microorganismos degradadores.

Dibble y Bartha (1979) encontraron en sus estudios valores óptimos de humedad del suelo entre 30 y 90% de su capacidad de saturación de agua, indicando que se debe mantener en torno al 70% la humedad del suelo para optimizar la actividad microbiana. Según indica la EPA (1993), la actividad de los microorganismos aerobios, es óptima cuando la humedad del suelo está entre el 70% - 80% de su capacidad de campo. Ezeonu (2010), observó que un suelo con hidrocarburos presentaba una capacidad de retención hídrica en torno al 76%, mientras que la capacidad de retención hídrica de este mismo suelo sin hidrocarburos se encontraba en valores inferiores al 30%. Tanto la escasez como el exceso de humedad afectarán de forma negativa a la degradación de los hidrocarburos ya que por una parte, en ausencia de agua no se puede desarrollar correctamente la vida microbiana, y por otra, un exceso de agua no permite la presencia de oxígeno en el suelo, lo cual es primordial para la supervivencia de estos microorganismos aeróbicos. También los suelos relativamente secos, tienden a absorber con más fuerza los contaminantes, puesto que estos contaminantes compiten con el agua por los lugares de absorción (EPA, 1993).

También la temperatura debe ser la adecuada puesto que no sólo afecta a la velocidad de las reacciones fisiológicas sino a la dinámica de las poblaciones microbianas y a las características fisicoquímicas del medioambiente, siendo así una pieza fundamental para la degradación de los hidrocarburos (Medaura *et al.* 2008).

#### *El contenido en nutrientes*

En el suelo deben existir las condiciones idóneas para el desarrollo microbiano con el fin de que tengan un metabolismo máximo y eficaz para realizar la biorremediación de manera óptima; para ello, necesitarán la presencia de nutrientes básicos como son: una fuente de carbono, que la encontrarán en la propia molécula del hidrocarburo; una fuente de nitrógeno, necesaria para la producción de aminoácidos y enzimas; y una fuente de fósforo, que utilizarán para la formación de compuestos energéticos dentro de la célula, los cuales son indispensables para los procesos de reproducción y degradación (Marín, 2004).

### *El contenido en materia orgánica*

Aproximadamente el 65-75% de la materia orgánica del suelo, está compuesta por materiales húmicos, los cuales son mezcla de compuestos orgánicos de alto peso molecular y resistentes a la degradación. Este porcentaje no incluye los compuestos orgánicos presentes en los contaminantes. Los suelos con elevado contenido en materia orgánica absorberán cantidades significativas de contaminantes orgánicos, como son los hidrocarburos, ya que los compuestos orgánicos tienden a absorberse en la materia orgánica del suelo retardando de esta manera su movimiento (EPA, 1993).

La presencia de materia orgánica, también hace que aumente la capacidad de cambio catiónico del suelo (Weber *et al.* 2007), incrementando la retención de los contaminantes. Además, los altos niveles de compuestos orgánicos favorecen la actividad microbiana, mejorando así la capacidad degradadora por parte de los microorganismos.

- Factores biológicos:

#### *Presencia de microorganismos*

La presencia de los microorganismos en un suelo afectado por la contaminación por hidrocarburos será crucial para su recuperación puesto que gran parte de las técnicas de biorremediación utilizadas para este fin se fundamentan precisamente en estos microorganismos degradadores de hidrocarburos, siendo las técnicas más exitosas en cuanto a su capacidad degradativa (Haristah y Kaushik, 2009). Se estima que la concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de hidrocarburos para poder llevar a cabo la biorremediación del suelo es de  $10^3$  a  $10^4$  unidades formadoras de colonias (Ercoli *et al.*, 2000). En el caso de que la biomasa del suelo no sea suficiente, se pueden inocular al mismo microorganismos mediante la técnica de bioaugmentación, que consiste precisamente en incentivar la degradación de los contaminantes del suelo con el aporte exógeno de microorganismos.

Como ya hemos mencionado, la presencia o no de microorganismos es fundamental pero también la variedad de los mismos es un factor importante que influirá en la eficacia de la descontaminación del suelo, y esto se observa en algunos trabajos donde existe una gran diferencia en el comportamiento de bacterias y hongos en suelos enmendados, frente a suelos sin aporte de material orgánico. El incremento de las poblaciones de hongos y bacterias observado al comienzo de la biorremediación en suelos enmendados y no enmendados con respecto a los suelos control sin contaminar, explica cómo la incorporación de hidrocarburos y enmiendas orgánicas proporciona sustancias que actúan como fuente de carbono y nutrientes para los microorganismos (Ros *et al.*, 2010), activando su metabolismo e influyendo positivamente en la descontaminación del suelo.

### *Adaptación de los microorganismos al medio con hidrocarburos*

Son muchos y diversos los estudios que hablan de la importancia de esta capacidad de adaptación de los microorganismos a las variables condiciones del medio en el que se encuentran. Se ha observado que la diversidad microbiológica de un suelo con hidrocarburos disminuye, con la consecuente predominancia de aquellos microorganismos bien adaptados a ese tipo de contaminación (Ahn *et al.* 2006). De esta adaptabilidad depende en parte el éxito de la biorremediación del suelo, puesto que gracias a ella los microorganismos son capaces de utilizar como fuente de energía las sustancias que se encuentren a su alcance, en nuestro caso los hidrocarburos del suelo.

Ros *et al.* (2010) observaron que las comunidades microbianas presentes en el suelo variaban en función de si el suelo contenía hidrocarburos o no, así como en función de la presencia o no de enmienda en los mismos y del tipo de enmienda; las variaciones en las condiciones ambientales, influyen en que las poblaciones de microorganismos que proliferan en el suelo sean unas u otras, ya que dependerá exclusivamente de su capacidad para adaptarse a las condiciones específicas del mismo.

La modificación en la composición de los lípidos de membrana es un importante mecanismo de adaptación de los microorganismos para poder desarrollarse con éxito en condiciones de estrés. Este hecho es debido a que las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular como la hidrofobicidad, los enlaces van der Waals y Lewis, las características ácido-base y las propiedades eléctricas, dependen, en parte, de la composición de los lípidos de la misma. Incluso dichas propiedades influyen directamente en la interacción que pueden tener las células bacterianas con las superficies abióticas del suelo (Bisbiroulas, 2010), como es, en nuestro caso, la interacción con los hidrocarburos del suelo. Además de este hecho, se han observado cambios en la expresión de algunas proteínas en bacterias afectadas por la contaminación por hidrocarburos en el suelo (Bastida *et al.*, 2010).

Resumiendo, los mecanismos por los cuales los microorganismos se adaptan a las condiciones de un suelo contaminado con hidrocarburos son:

- Inducción y/o depresión de enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos.
- Cambios genéticos en los microorganismos, dando como resultado nuevas capacidades metabólicas.
- Enriquecimiento en organismos capaces de degradar los hidrocarburos.

Esta capacidad de adaptarse al medio, sea cual sea el mecanismo que elijan para hacerlo, será crucial para el éxito de los procesos de biorremediación que queramos aplicar a los suelos contaminados.

### **Papel de los microorganismos en la degradación de los hidrocarburos.**

Las reacciones de transformación del hidrocarburo en anhídrido carbónico y agua tienen lugar en el interior de las células, por lo que es condición indispensable que los microorganismos sean capaces de captar e

introducir a través de su pared celular estas moléculas para degradarlas. La naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos hace que sean moléculas difíciles de metabolizar por los microorganismos puesto que estos necesitan de un medio acuoso para poder operar. También es importante la longitud de las cadenas de carbonos que componen los hidrocarburos puesto que cuanto más largas sean estas cadenas menor va a ser su solubilidad en agua y por tanto menor será su biodisponibilidad al ataque microbiano. Cuanto más complejas sean las moléculas, menor será su biodegradabilidad.

También existen estudios en los que se evalúa la degradabilidad de los hidrocarburos a lo largo del tiempo. La biodisponibilidad de los hidrocarburos se reduce con el tiempo debido a un proceso de envejecimiento. Entre las posibles causas se mencionan reacciones de oxidación química que incorporan el contaminante dentro de la materia orgánica, difusión lenta dentro de los poros muy pequeños y adsorción en las paredes de los mismos, así como la formación de películas semirrígidas alrededor de los líquidos en fase no acuosa, con una alta resistencia a la transferencia de la masa en acuíferos y reactores slurry (Ercoli *et al.*, 2000).

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la degradación de los hidrocarburos siendo los principales responsables de ella, si bien es cierto que son muchos los factores que hacen posible que esto tenga lugar. En los lugares donde ha habido depósito controlado o derrame de hidrocarburos aparecen de forma natural microorganismos que utilizan estas moléculas como fuente de energía frente a otras colonias que, por un lado, son inhibidas por este contaminante, y por otro, sufren la competencia de las bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Estas bacterias responsables de la degradación de los hidrocarburos pueden encontrarse en un ambiente más o menos óptimo para “trabajar” de manera que la toxicidad de uno de estos contaminantes orgánicos dependerá también de las características del suelo; una alta capacidad de cambio catiónico y una elevada adsorción de contaminantes orgánicos tendrá como consecuencia un bajo efecto tóxico en los ecosistemas (McBride, 1994).

Como estamos viendo a lo largo de esta Memoria, el papel de los microorganismos es primordial pudiendo nosotros influir tanto negativa como positivamente en su capacidad degradativa, modificando el ambiente del lugar contaminado, aun así, los propios microorganismos han desarrollado mecanismos para solventar el problema de biodisponibilidad de los hidrocarburos y mejorar así su capacidad biodegradativa. Según algunos investigadores (Syldat y Wagner, 1987) estos mecanismos son:

- Producción por parte de los microorganismos de surfactantes iónicos que favorecen las emulsiones hidrocarburo-agua; de esta forma, los hidrocarburos adquieren características hidrofílicas y pueden entonces atravesar la pared celular.

- Producción de cambios en la naturaleza de su pared celular, produciendo polímeros con estructura de surfactante no iónico, los cuales, adheridos a la superficie del microorganismo, vuelven a la célula lipófila y por tanto, capaz de convivir perfectamente con los hidrocarburos.

### **TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN SUELOS CONTAMINADOS**

Es importante conocer lo más ampliamente posible cómo se encuentran las colonias microbianas del suelo, cómo evolucionan con los cambios que sufre el suelo con la contaminación, o simplemente cómo evolucionan a lo largo del tiempo bajo unas condiciones determinadas, y a este respecto se está trabajando con nuevas técnicas que nos permiten detectar el estado de los microorganismos del suelo a nivel funcional y estructural. Las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados tienden a estar dominadas por aquellas bacterias que pueden sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente, siendo capaces de utilizar al contaminante para crecer; en este sentido el contaminante “desbalancea”, más que toxifica, las comunidades ecológicas del suelo.

Una técnica actualmente utilizada para conocer la biodiversidad funcional de los microorganismos del suelo es el sistema *BIOLOG*, que nos permite saber cual es la huella dactilar metabólica de los microorganismos, basándose en la distinta capacidad que tienen las comunidades microbianas para metabolizar diferentes substratos carbonados contenidos en los pocillos de las placas ELISA, donde los cambios en la absorbancia inducidos por la actividad microbiana, serán detectados fácilmente (Garland, 1997). La velocidad y la intensidad del cambio de color dependerán del número y actividad de las células microbianas en el pocillo de la placa de microtitulación. El sistema de *BIOLOG* se ha aplicado a la evaluación de la diversidad metabólica funcional de las comunidades microbianas de diferentes hábitats (Garland *et al.*, 1996) y tipos de suelo (Bossio y Scow, 1995), incluyendo la rizosfera (Grayston *et al.*, 1998) y los suelos de pastizales (Zak *et al.*, 1994), y se considera sensible para la detección de diferencias temporales entre las comunidades microbianas del suelo (Insam, 1997; Nannipieri *et al.*, 2002).

Esta técnica *BIOLOG* presenta como ventajas el ser un método simple y rápido, que utiliza el C orgánico como factor clave que rige el crecimiento microbiano en el suelo, y el que los patrones de oxidación de la fuente de C sean reproducibles en un hábitat específico. Sin embargo, tiene la desventaja de que los hongos no están involucrados en los perfiles de la utilización de sustratos de carbono.

Teóricamente la diversidad de especies presentes en el suelo puede ser un indicador de los efectos de la contaminación, en particular la aparición de microorganismos resistentes a ésta en una comunidad puede ser de utilidad en el momento de decidir por un indicador biológico de impacto. Según Duarte (2001) las “comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de contaminantes del petróleo, cambiando su estructura a otra que favorezca el que dichos microorganismos puedan sobrevivir en las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que son “reprimidos”. La biodiversidad estructural de



las colonias microbianas existentes en el suelo se conoce mediante el estudio con técnicas moleculares de los *ácidos nucleicos* que forman parte de la estructura de estos microorganismos, extraídos directamente de las muestras de suelo, lo que nos proporciona un perfil de las colonias de microorganismos, a nivel estructural. Es una buena técnica para caracterizar la estructura de la comunidad microbiana (Bundi *et al.* 2002) sin basarnos en técnicas de cultivos microbianos más tediosas y menos fiables.

Estas técnicas desarrolladas en los últimos años tienen como objetivo principal, representar la mayor proporción posible de la diversidad microbiana existente en una muestra ambiental (Amamm *et al.*, 1995). Estos métodos no necesitan pasos previos de cultivo de la muestra ambiental y se basan en el estudio directo de la muestra a diferentes niveles. Se utilizan entre otros métodos, aquellos que analizan ácidos nucleicos existentes en la comunidad: PCR y clonaje, PCR acoplada a electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE) o a polimorfismos de la longitud del fragmento terminal de restricción (T-RFLP), y técnicas de hibridación *in situ* (FISH).

Entre los métodos genéticos existentes, la electroforesis en gel de gradiente de desnaturización (DGGE) tras una amplificación del ADN extraído mediante PCR, permite una visualización directa de la diversidad bacteriana y fúngica en una muestra ambiental, y una rápida comparación de las muestras en base a los perfiles de las bandas resultantes de la electroforesis. Posteriormente, mediante análisis de la secuencia de bases de los fragmentos de ADN amplificados y separados, se obtiene la identificación de los miembros más representativos de la comunidad microbiana en un determinado ecosistema edáfico (Roy *et al.*, 2005; Whyte y Greer, 2005; Ros *et al.*, 2006).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica por la que se consigue sintetizar muchas copias de un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a elevadas temperaturas. Cuando hacemos una reacción de PCR, simulamos *in vitro* lo que ocurre en una célula cuando se sintetiza el ADN. Para ello, en el tubo de ensayo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo (polimerasa, ADN extraído de la muestra de suelo, cebadores específicos para hongos o bacterias, dinucleótidos, y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (Falcón y Valera, 2007).

Una vez que tenemos suficientes copias de los fragmentos de ADN (amplicones) podemos aplicar una electroforesis en gel de gradiente de desnaturización (DGGE) de forma que la mezcla de amplicones, se hace pasar por un gel de poliacrilamida con gradiente químico de formamida y urea. Cada fragmento de ADN específico para un gen determinado, presentará una movilidad específica en dicho gradiente dependiendo de su tamaño y secuencia de bases, de forma que cada molécula quedará acumulada en un punto concreto del gel, formando una banda en el mismo. Cada banda será representativa de una especie o grupo microbiano presente en el ecosistema. Para conseguir una visión más completa y precisa de la composición y diversidad microbiana de una muestra, se pueden recortar las bandas aisladas, reamplificarlas y secuenciarlas (Viñas, 2005). También se puede analizar el gel completo mediante sondas

específicas, para identificar especies microbianas de interés (Muyzer *et al.* 1993), o realizar un estudio estadístico de la estructura de la comunidad según la posición e intensidad de las bandas (Fromin *et al.*, 2002).

Aunque el conocimiento de la diversidad microbiana ha mejorado muy significativamente sobre la base de la utilización reciente de técnicas no dependientes de cultivo, todavía existen importantes limitaciones intrínsecas de estas metodologías que es conveniente tener en cuenta, fundamentalmente aquellas relacionadas con la extracción de ácidos nucleicos de muestra ambientales, en alteraciones y artefactos asociados a la amplificación enzimática de los ácidos nucleicos, en el clonaje de productos de PCR y en la sensibilidad y accesibilidad de las zonas diana en las técnicas de hibridación celular (Viñas, 2005).

## **TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CON PRESENCIA DE HIDROCARBUROS**

Son muchas y diversas las técnicas que se utilizan para recuperar suelos pero no todas pueden ser utilizadas para eliminar los hidrocarburos del suelo debido a la naturaleza de este contaminante.

Entre las técnicas más empleadas hasta ahora para la eliminación de los hidrocarburos contenidos en suelos podemos citar la extracción de hidrocarburos por vacío, el lavado del suelo contaminado con agua, la incineración, la recuperación electrocinética, etc. (Clark, 1995), todas ellas consideradas de descontaminación mediante procesos físicos o químicos. Con algunas de estas técnicas se han conseguido efectos positivos, pero su elevado coste económico junto con el hecho de que no se consideran totalmente respetuosas con el medioambiente constituye hoy en día un obstáculo muy a tener en cuenta para su empleo. Por ello, se ha planteado la posibilidad de buscar alternativas viables para la eliminación de los hidrocarburos contenidos en los suelos que sean ambientalmente correctas, simples y económicas. Aparecen así las técnicas de biorrecuperación que son las que nos ocupan en este trabajo.

Dependiendo de cuál sea el objetivo que se quiere alcanzar a la hora de recuperar un suelo contaminado, se pueden distinguir entre técnicas de contención, de confinamiento y de descontaminación, (Kaifer *et al.*, 2004). Asimismo, en función del tipo de tratamiento que se le de al suelo, las técnicas de degradación de hidrocarburos se pueden agrupar en físicas, químicas y biológicas.

### **Tratamiento físico**

Aquí se engloban principalmente las técnicas de contención y confinamiento.

#### Técnicas de contención

Aíslan el contaminante en el suelo mediante barreras físicas, sin eliminarlo ni actuar sobre él. Estas barreras pueden ser verticales, horizontales, de suelo seco, sellado superficial, sellado profundo y barreras hidráulicas. Son técnicas que se utilizan para prevenir o mitigar la migración de contaminantes orgánicos e

inorgánicos en suelos y aguas subterráneas. No requieren la excavación del suelo y son de bajo coste, aunque sí necesitan revisiones periódicas.

### Técnicas de confinamiento

También llamadas de estabilización/solidificación, reducen la movilidad del contaminante mediante métodos físicos o químicos, ya sea convirtiéndolos en formas menos solubles y tóxicas (estabilización) o encapsulando el material contaminado en una estructura sólida de gran integridad estructural (solidificación) (Suthersan, 1997). La mayoría de estas técnicas están algo limitadas con contaminantes orgánicos como los hidrocarburos, aunque siempre son una alternativa dependiendo de las características y condiciones del lugar y del vertido.

## **Tratamiento físico-químico**

### Extracción

Son técnicas aplicadas *in situ* que consisten en separar los contaminantes del suelo para su posterior eliminación. Son tratamientos sencillos que requieren que los suelos sean permeables y que las sustancias contaminantes tengan suficiente movilidad y no estén altamente adsorbidas por el suelo. Este sería un hándicap, en nuestro caso, por ser los hidrocarburos que tenemos en los suelos estudiados muy recalcitrantes y estabilizados en el suelo.

La técnica de extracción más efectiva para los hidrocarburos recalcitrantes es la de extracción con disolventes orgánicos. Es una técnica que se aplica *ex situ* y consiste en mezclar en un tanque el suelo contaminado con un disolvente orgánico que arrastre el contaminante. El disolvente se separará del suelo por volatilización y se tratará para reutilizarlo, y el suelo se debe lavar con agua para limpiarlo perfectamente de disolvente.

Esta técnica presenta el inconveniente de la posible toxicidad que genera el disolvente en el suelo.

### Lavado

Esta es una técnica aplicada básicamente *ex situ* que consiste en primer lugar, en coger el suelo excavado y separar por tamizado, gravedad o densidad, las partículas de grava gruesa del suelo, con menor capacidad de adsorción, de las partículas finas. Estas partículas finas se tratan químicamente con algún extractante que permita desorber y solubilizar el contaminante (van Benschoten *et al.*, 1997). A continuación se debe lavar el suelo con agua para eliminar los restos del extractante y se devuelve el suelo a su lugar de origen.

Se ha visto que los surfactantes son eficaces a la hora de separar los compuestos hidrófobos en general, de la fase líquida del agua (Mulligan *et al.*, 2001a) y los compuestos derivados del petróleo, en particular (Mayes *et al.*, 1986; Falatko, 1991; Burd y Ward, 1996). La eficacia de esta técnica dependerá del grado de

adsorción del contaminante en el suelo, que a su vez vendrá determinada por propiedades del suelo como su textura, pH, materia orgánica y composición, así como el tiempo que el suelo esté contaminado y la presencia de otros tóxicos en el mismo (Reed *et al.*, 1996).

### Incineración

Es este un tratamiento *ex situ* en el que se elimina el contaminante con el suministro de calor. El suelo se somete a temperaturas cercanas a los 1000 °C que facilitan la oxidación y volatilización de los compuestos orgánicos contaminantes. Este proceso genera gases y cenizas residuales que deben ser depurados. Los hornos más utilizados emplean aire a alta velocidad, infrarrojos y sistemas rotativos.

Es un tratamiento utilizado para hidrocarburos clorados aunque la reutilización posterior del suelo es prácticamente nula porque su estructura queda dañada. (Ortiz *et al.*, 2007).

### Recuperación electrocinética

Consiste en aplicar una corriente eléctrica de baja intensidad entre electrodos colocados *in situ* en el suelo contaminado, lo que promueve la movilización del agua, iones y partículas pequeñas cargadas. Las positivas migrarán al ánodo y las negativas al cátodo. Durante el tratamiento los contaminantes pueden ser desplazados por electromigración (movimiento de iones hacia el electrodo de carga opuesta), por electroósmosis (movimiento del agua respecto a la superficie cargada de las partículas del suelo), electrolisis (movimiento de iones como una respuesta a la diferencia de potencial) y electroforesis (desplazamiento iónico en suspensión) (Acar y Alshwabkeh, 1993). Esta técnica resulta eficaz para tratamientos de suelos con baja permeabilidad hidráulica difíciles de recuperar por otros medios. Cuenta también con la ventaja de ser de bajo consumo energético, controla la dirección del flujo del agua y de los contaminantes del suelo, y acumula los contaminantes en los electrodos lo que facilita su extracción o eliminación posterior (Ortiz *et al.*, 2007).

## **Tratamientos biológicos (técnicas de biorremediación de suelos)**

En estas técnicas se engloban aquellas de biorremediación que degradan contaminantes orgánicos y disminuyen la toxicidad de otros inorgánicos a través de la actividad biológica, principalmente de los microorganismos, mediante reacciones que forman parte de sus procesos metabólicos. Por ser las técnicas utilizadas en este trabajo de Tesis Doctoral, las veremos en los siguientes apartados con mayor detalle.

En la actualidad, hay un interés creciente por este tipo de técnicas ya que son más sencillas, económicas y respetuosas con el medio ambiente que aquellas en las que los contaminantes son simplemente extraídos y transportados a otros lugares. Sin embargo, la eficacia de estas técnicas biológicas está todavía por comprobar puesto que aquellas que son efectivas en un lugar determinado con un contaminante concreto, no lo son en otro lugar con otro contaminante u otras condiciones. En cualquier caso, un factor limitante es

el escaso conocimiento que existe acerca del comportamiento de las comunidades microbianas de los suelos contaminados, aunque en este sentido se están incorporando a estos estudios los avances técnicos, en genómica, proteómica y metabolómica, que están revolucionando el estudio de la microbiología ambiental aplicada a procesos de biorremediación de suelos (Lovley, 2003).

Las técnicas de biorremediación consisten en el uso de plantas o microorganismos como hongos, bacterias naturales y bacterias modificadas genéticamente, para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (López de Mesa *et al.*, 2006). Bajo condiciones favorables, los microorganismos pueden oxidar los contaminantes orgánicos y transformarlos en productos no tóxicos como dióxido de carbono y agua o ácidos orgánicos y metano (USEPA, 1991). Las técnicas de biorremediación, constituyen una tecnología en clara expansión y muy competitiva, capaz de conseguir la biodegradación de los hidrocarburos contenidos en el suelo (Atlas y Pramer 1990; Bollag y Bollag, 1995). La biorremediación es una técnica relativamente innovadora que se ha desarrollado en las décadas de los 80 y 90, y ha sido aplicada con éxito en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, caracterizándose por ser una técnica de bajo costo de operación. Sin embargo, la biorremediación no siempre permite alcanzar los rangos de descontaminación deseados, la aplicación de este tipo de tecnología ha encontrado cierta resistencia debido al tiempo necesario para completar un proceso hasta conseguir las metas de saneamiento deseadas. Es una técnica que no siempre es efectiva, porque el rango de contaminante en el que puede ser eficaz es limitado, se desarrolla en una escala de tiempo larga y los contaminantes residuales después de su aplicación no siempre son aceptables (Vidali, 2001).

Son técnicas *in situ* o *ex situ* lo que permite reducir el coste de aplicación, y no requieren demasiada intervención ni humana ni de maquinaria.

La biorremediación tiene como principio la mejora de un proceso natural (biodegradación de moléculas orgánicas), y esto puede ocurrir mediante dos técnicas distintas:

- (i) La *bioestimulación*, que consiste en la incentivación de las poblaciones microbianas indígenas existentes en el suelo, proporcionando las condiciones ambientales adecuadas mediante el uso de enmiendas tales como adición de nutrientes, regulación de condiciones redox, cambio de pH, u otras condiciones diversas sobre las que se puede influir;
- (ii) La *bioaugmentación*, que consiste en la inoculación de microorganismos capaces de actuar específicamente en determinados ambientes contaminados. Hemos de ser conscientes de que, prácticamente en cualquier momento en que nos fijemos, existen la mayoría de las especies de microorganismos, y entre ellas, están las que se deben de encargar de la degradación de los hidrocarburos. Sin embargo, a veces su cantidad no es lo suficientemente elevada como para que

actúen de un modo eficaz, y en ese caso, las inoculaciones de microorganismos pueden ser útiles para descontaminar un ambiente determinado.

La biorremediación en presencia de aire u oxígeno, es denominada biorremediación aeróbica y se basa en procesos oxidativos, que oxidan parcialmente los contaminantes convirtiéndolos en productos menos tóxicos, o son totalmente oxidados en constituyentes minerales (dióxido de carbono y agua). Bajo condiciones anaerobias, los procesos de biorremediación son más complejos.

La biorremediación aerobia es más rápida que la anaerobia, por ese motivo normalmente es la opción preferida. Sin embargo, algunos compuestos únicamente pueden ser metabolizados bajo condiciones reductoras y por tanto, los tratamientos anaerobios son la única opción.

Cabe señalar que una concentración de contaminantes muy elevada puede resultar tóxica para los microorganismos e inhibir así su actividad. En algunos lugares con una pesada contaminación, la biorremediación puede no ser la mejor opción. Por lo tanto, se hace necesaria antes de la ejecución, una investigación de factibilidad con el fin de determinar si la biodegradación es una opción viable para un sitio específico, tipo de suelo y condiciones del contaminante (Aggarwal *et al.*, 1990).

### **Ventajas y desventajas de la biorremediación**

La biorremediación tiene las siguientes *ventajas*:

- Es un proceso natural, y es percibido por la sociedad como un tratamiento aceptable para el suelo contaminado.
- Se puede conseguir una degradación de compuestos orgánicos en productos no tóxicos e incluso dióxido de carbono, agua y biomasa celular.
- Una gran variedad de compuestos considerados legalmente como peligrosos, pueden ser biodegradados en productos inocuos.
- Requiere un equipamiento mecánico mínimo.
- Puede ser aplicada *in situ* o *ex situ*. *In situ* la biorremediación puede ser más económica y segura, ya que no requiere excavación del suelo contaminado, ni su transporte y no se disturba el entorno natural.
- Es una técnica de bajo costo, comparada con otras técnicas de remediación.

Por otro lado, la biorremediación puede presentar las siguientes *desventajas*:

- Hay posibilidad de que la degradación parcial de los contaminantes origine metabolitos potencialmente tóxicos y con una alta movilidad.
- El proceso es altamente sensible a tóxicos y a las condiciones ambientales.
- Los procesos biológicos son también muy específicos.

- Es difícil extrapolar los resultados de los estudios de microcosmos en laboratorio a los tratamientos a gran escala en campo.
- Una mayor investigación es necesaria para desarrollar y diseñar tecnologías apropiadas para aquellos lugares con una mezcla de contaminantes
- Una monitorización amplia es necesaria para medir la velocidad de biodegradación
- Es difícil controlar los compuestos orgánicos volátiles durante el proceso de biorremediación *ex situ*.
- Generalmente, requiere largos tiempos de tratamiento, comparado con otras técnicas de remediación.

### **Factores que influyen en la biorremediación**

El control y optimización de los procesos de biorremediación es complejo e incluye algunos factores como: la existencia de una población microbiana capaz de degradar los contaminantes, la bio-disponibilidad de los contaminantes a las poblaciones microbianas y factores ambientales como el tipo de suelo, temperatura, pH, presencia de O<sub>2</sub> y otros aceptores de electrones, y nutrientes.

- *Población microbiana para los procesos de biorremediación*

Los microorganismos pueden ser aislados desde cualquier condición ambiental y ser capaces de adaptarse a otras condiciones. El requisito indispensable para que presenten este comportamiento, es la presencia de energía y fuente de carbono. Debido a la capacidad de adaptación de los microorganismos y otros sistemas biológicos, estos pueden ser usados para degradar o remediar ambientes peligrosos.

- *Nutrientes*

El crecimiento y la actividad microbiana pueden ser estimulados, con el fin de alcanzar los niveles de descontaminación requeridos en un lugar. La bioestimulación generalmente incluye la adición de nutrientes y oxígeno para incentivar la actividad de los microorganismos endógenos. Estos nutrientes permiten el desarrollo de microorganismos que crean las enzimas necesarias para degradar los contaminantes. Todas ellas necesitan la presencia de nitrógeno, fósforo y carbono. Los requerimientos de carbono:nitrógeno son 10:1, y los de carbono:fósforo son 100:1.

- *Requerimientos ambientales*

El crecimiento y la actividad microbiana, se ve afectada por el pH, temperatura y humedad. Crecen de forma óptima en un intervalo estrecho, por lo que es importante conseguir establecer las condiciones adecuadas.

- *Disponibilidad del contaminante*

Para la degradación, es necesario que microorganismos y contaminantes se pongan en contacto. Esto no siempre es fácil de conseguir, ya que ni los microorganismos ni los nutrientes están distribuidos de modo homogéneo en el suelo. Algunas bacterias son móviles y muestran una respuesta quimiotáctica. Los hongos crecen en una forma filamentosa hacia los contaminantes. En algunos casos, es posible mejorar la movilidad del contaminante con el uso de algunos surfactantes.

### **Estrategias de biorremediación**

Se utilizan diferentes estrategias de biorremediación en función de las condiciones y características del área a tratar y que se puedan clasificar como:

#### Técnicas de biorremediación ex situ:

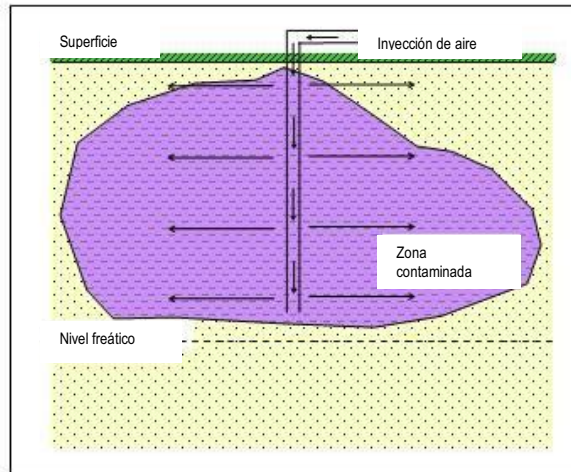
- *Compostaje*. Implica la combinación de suelo contaminado con enmiendas orgánicas no peligrosas como estiércol o residuos agrícolas. La presencia de estos materiales orgánicos, favorece el desarrollo de una población microbiana variada, el aumento de la temperatura y la transformación de compuestos orgánicos contaminantes que son características del proceso de compostaje.
- *Biorreactores*, o también denominados reactores slurry o reactores acuosos. Son utilizados para tratamientos *ex situ* de suelos y aguas contaminadas. El biorreactor slurry puede ser definido como un tanque contaminado y los aparatos usados para crear tres fases (sólido, líquido y gas) mezcladas en condiciones que aumenten la velocidad de biorremediación de los contaminantes unidos al suelo o solubles en el agua. En general, la velocidad de biorremediación suele ser mayor en biorreactores que en sistemas *in situ* o sistemas en fase sólida.
- *Biopilas*. Es un sistema híbrido entre landfarming y compostaje. Las células ingenieriles de tratamiento, se construyen como pilas de compostaje aireadas. Este sistema es una versión mejorada de landfarming que tiende a controlar las pérdidas físicas del contaminante por lixiviación y volatilización.

#### Técnicas de biorremediación in situ:

Se definen como aquellas que se aplican al suelo y aguas subterráneas contaminadas en el sitio donde se encuentran, con el menor trastorno posible al medioambiente circundante. Estas técnicas son generalmente la mejor opción, debido al bajo costo y a la mínima perturbación. Los procesos de biorremediación *in situ* pueden ocurrir de forma natural (atenuación natural) o pueden ser mejorados mediante diversos métodos (biorremediación mejorada). Estos tratamientos están limitados por la profundidad de suelo que puede ser tratada con efectividad. Los más importantes son:



- *Bioventing*, es una técnica que estimula de biodegradación natural *in situ* de algunos compuestos del suelo mediante degradación aeróbica, proporcionando oxígeno a los microorganismos existentes en el suelo.



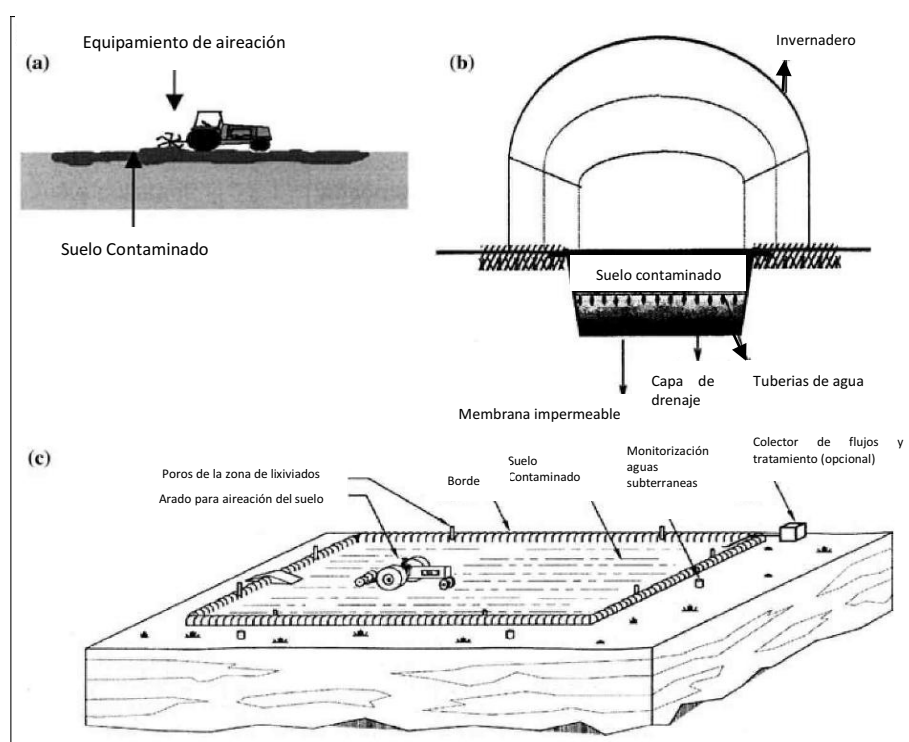
**Figura 3.-** Sistema bioventing

- El oxígeno se suministra en las zonas de suelo contaminado no saturadas mediante el movimiento de aire forzado por inyección o extracción de aire para aumentar la concentración de oxígeno y estimular la biodegradación (Figura 3). Esto puede ser utilizado en lugares donde la contaminación ocurre bajo la superficie.
- *Biosparging*. Este sistema (Figura 4) aumenta la mezcla en la zona saturada y con ello aumenta el contacto entre suelo y agua subterránea. Implica la inyección de aire a presión por debajo del nivel freático, para aumentar las concentraciones de oxígeno de las aguas subterráneas y mejorar las tasas de degradación biológica de los contaminantes por los microorganismos naturales.
  - *Bioaugmentación*. La biorremediación, frecuentemente implica la adición de microorganismos indígenas o exógenos en los lugares contaminados. Hay dos factores que limitan el uso de la adición de microorganismos en estos tratamientos y son: 1) que los cultivos microbianos no indígenas rara vez compiten bien con las poblaciones indígenas, y 2) que los suelos expuestos durante largos periodos de tiempo a residuos biodegradables, tienen microorganismos indígenas que son efectivos para degradar estos residuos, si se ha gestionado adecuadamente el lugar durante todo el tiempo.
  - *Landfarming*
  - *Fitorremediación*

Estas dos últimas técnicas las desarrollamos más ampliamente a continuación, por ser las de mayor aplicación y las utilizadas en este trabajo de Tesis Doctoral.

- **Landfarming**

El landfarming es una técnica de biorrecuperación que puede ser utilizada para descontaminación tanto “in situ” como “ex situ”, y consiste en provocar la oxidación biológica de los hidrocarburos contenidos en el suelo, por medio de la estimulación de la microflora natural que se encuentra en el mismo (levaduras, hongos o bacterias) mediante el agregado de fertilizantes, arado y riego superficial. En el fondo, se trata pues de una bioestimulación de las poblaciones necesarias que interesa activar.



**Figura 4.-** Diferentes sistemas de landfarming

Los microorganismos descomponen los contaminantes orgánicos en compuestos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua. Una vez degradados los contaminantes, las poblaciones microbianas se reducen al agotarse su fuente de energía (Alvarez *et al.*, 2001; Ercolli y Galvez, 2001). El proceso de landfarming tiene una serie de ventajas como son: su bajo costo, no dejar residuos posteriores y no provocar (si se realiza en condiciones controladas) riesgos de contaminación tanto superficial como subterránea. Debido a la baja migración de los hidrocarburos, su impacto ambiental es mínimo cuando el proceso está bien realizado, y puede resultar una técnica susceptible de emplearse en una gran variedad de condiciones climáticas.

Además, si se realiza en condiciones óptimas, se consigue degradar una considerable proporción de los hidrocarburos contenidos en los suelos. Sin embargo, también presenta inconvenientes o desventajas, como es el a veces elevado tiempo necesario para eliminar los hidrocarburos.

La efectividad de esta metodología depende de innumerables factores como hemos mencionado anteriormente, tales como tipo y concentración de contaminante, nutrientes, aireación, condiciones ambientales, presencia de inhibidores, concentración de microorganismos, etc. (EPA, 2004, Ercolli *et al.*, 2001, Marín *et al.*, 2006). La capacidad de controlar y optimizar todas estas variables será lo que determinará la eficiencia del proceso de landfarming.

- **Fitorremediación**

La fitorremediación ha sido definida como el uso de plantas verdes para extraer del suelo y acumular en sus tejidos contaminantes peligrosos para el medio ambiente. Esta definición afecta a todas las plantas que, con procesos químicos, biológicos y físicos ayudan a la biorrecuperación de sustratos contaminados (Cunningham y Berti, 1993). Podemos distinguir dos tipos diferentes de fitorremediación: “in planta” y “ex planta”. En el caso de la fitorremediación “in planta”, el vegetal absorbe el contaminante y lo incorpora en sus tejidos o lo almacena; mientras que cuando es “ex planta”, se realiza una degradación en la zona de la rizosfera, debido a que los exudados radicales que aporta la planta favorecen una mayor actividad microbiana en dicha zona (Hutchinson *et al.*, 2001).

Algunos de los ejemplos recientes de fitorremediación aplicada a hidrocarburos son realizados con plantas herbáceas de pastizal (Robinson *et al.*, 2003; White *et al.*, 2006). Sin embargo los ecosistemas semiáridos como aquél en el que se ha realizado este trabajo, se caracterizan por la dominancia de arbustos o herbáceas perennes singulares. Es por ello necesario adaptar las técnicas de fitorremediación a las características ecológicas locales, utilizando este tipo de especies.

Para nosotros, la fitorremediación *ex planta* tiene algunas ventajas sobre la modalidad *in planta*. En esta última, puede suponer un problema al final del ciclo vital de la planta, el que la misma incorpore un elemento contaminante, ya que se debería preveer, que hacer a posteriori con esa planta contaminada, a no ser que cambie la forma del citado contaminante hacia otras menos peligrosas. Otro problema añadido es que, las plantas acumuladoras de algunos contaminantes quizás no se adapten a la zona contaminada, debido a su propia ecología. En cambio, cualquier planta que se adapte, aunque no sea acumuladora de contaminante, si puede ejercer en su rizosfera una influencia positiva que contribuya a la eliminación de los tóxicos deseados (fitoestimulación o rizodegradación). El desarrollo de plantas resulta por tanto eficaz para llevar a cabo la degradación de contaminantes orgánicos en el suelo, debido a la mayor actividad microbiana que existe en la raíz de la planta o en la rizosfera. La planta ejerce una estimulación de la actividad microbiana en la rizosfera por varios caminos: (1) exudación desde la raíz de compuestos como azúcares, carbohidratos, aminoácidos, acetatos y enzimas que activan las poblaciones microbianas indígenas; (2) el sistema radicular proporciona oxígeno en la rizosfera asegurando las transformaciones aeróbicas; (3) los pelos radiculares incrementan el carbono orgánico disponible; (4) los hongos micorrízicos

que crecen en el interior de la rizosfera pueden degradar compuestos orgánicos que bacterias aisladas no serían capaces de degradar; (5) las condiciones del hábitat de las poblaciones microbianas se ven mejoradas por la presencia de plantas.

## RESIDUOS ORGÁNICOS COMO ENMIENDAS DEL SUELO

Son muchos y variados los residuos orgánicos que se producen como consecuencia de las actividades humanas y se clasifican como: agrícolas, forestales, ganaderos, industriales y residuos urbanos, considerando dentro de estos últimos a las basuras domésticas y a los lodos de depuración de aguas residuales.

✓ *Residuos agrícolas*: su uso es sumamente válido como enmienda para la biorremediación de suelos. Su uso tradicional ha sido para la alimentación animal, la producción de alcoholes y aceites, como cama para el ganado y como materia prima en las industrias papeleras.

✓ *Residuos forestales*: han constituido durante los últimos años una fuente energética muy importante. Los principales residuos proceden de la elaboración de la madera (corteza, serrín y viruta). El principal uso que se le ha dado ha sido como combustible, aunque actualmente, un considerable porcentaje se destina a la fabricación de conglomerados.

✓ *Residuos ganaderos*: están formados por una gran variedad de materias orgánicas sólidas y líquidas, en las que se incluyen compuestos procedentes de la digestión y actividad biológica del animal, restos de su alimentación y otros materiales arrastrados por las aguas de lavado.

✓ *Residuos industriales*: tanto por su heterogeneidad en los procesos de generación como por las dificultades para su clasificación y valoración, constituyen de todos los tipos de residuo el más incontrolado (Lobo, 1985) y el menos adecuado como enmienda de suelos. Se define como residuo industrial cualquier material pastoso, sólido o líquido, resultante de un proceso de fabricación, transformación, consumo o limpieza, que no se aprovecha. Estos residuos se podrían clasificar en inorgánicos y orgánicos (García, 1990).

Los residuos industriales son minoritarios pero son de especial interés debido al mayor impacto ambiental que supone su vertido incontrolado, ya que con ellos incluimos en el medio ambiente una gran cantidad de compuestos xenobióticos. Algunos de estos compuestos contienen en su estructura grupos halogenados y nitrogenados, los cuales son utilizados como refrigerantes, disolventes, plásticos, detergentes, explosivos y plaguicidas (Marín, 2004).

✓ *Residuos urbanos*: de entre todos los tipos de residuos que hoy en día se generan, los residuos de origen urbano (basuras domésticas y lodos de depuración de aguas residuales o biosólidos) presentan una de las problemáticas más significativas. Se producen de manera puntual y diaria, lo cual les confiere una

particularidad que les hace ser tratados de un modo especial al resto de residuos existentes (García, 1990). Además, su vertido incontrolado da lugar a un riesgo de contaminación de acuíferos debido a los lixiviados que se originan. Otros problemas de la inadecuada gestión de estos residuos son, por un lado, que constituyen un foco de infecciones, malos olores, plagas, etc., y por otro, suponen una agresión a la estética del entorno y la ocupación desordenada del terreno, inutilizándolo para otros usos (García *et al.*, 1992).

La solución a la problemática que se plantea en relación a los residuos orgánicos de origen urbano, pasa por dar a estos materiales la salida racional y más coherente posible, conjugando tanto los aspectos técnicos, como medioambientales y económico-sociales; de no hacerlo, la acumulación incontrolada de estos subproductos causaría focos de infestación no admisibles bajo ningún concepto.

Aparte de la incineración, que puede ser una opción factible para la eliminación de los biosólidos de depuradora en algunos países, pero que resulta cara si se quiere realizar en condiciones adecuadas, el reciclado en el suelo de los biosólidos tanto frescos como después de haber sufrido un proceso de estabilización de su materia orgánica (compostaje), ha sido hasta ahora la vía de reutilización más frecuente e idónea de estos biosólidos. En este sentido, han sido muchos los estudios realizados sobre el empleo de biosólidos o sus composts tanto en agricultura (Ayuso *et al.*, 1996; García, 1990; García *et al.*, 1992 y 1993) como en estrategias de recuperación de suelos degradados o en proceso de degradación (Ros *et al.*, 2001 y 2003; Pascual *et al.*, 1999), ya que el contenido en materia orgánica y nutrientes de estos materiales, junto con la gran cantidad y diversidad de poblaciones microbianas que incorporan (Eiland *et al.*, 2001), los convierten en enmiendas óptimas para mejorar la calidad y productividad del suelo e incentivar a las poblaciones microbianas del mismo.

Los suelos contaminados suelen tener un déficit en materia orgánica y consecuentemente la actividad microbiana en ellos está deprimida. Por ello, la adición de materiales orgánicos de origen urbano a estos suelos, produce un aumento del contenido de carbono, nutrientes y poblaciones microbianas propias de estos biosólidos, que *a priori*, deben incrementar la actividad enzimática extracelular del suelo y el metabolismo microbiano.

Por este motivo el empleo de residuos orgánicos como posibles potenciadores de la actividad microbiana es algo que se está estudiando actualmente en diversos trabajos, no sólo para degradar los hidrocarburos sino de forma genérica, para eliminar contaminantes orgánicos del suelo. En un apartado posterior de esta introducción se hará una revisión de los diversos estudios realizados sobre la incorporación de materiales orgánicos de tipo residual a suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

Por todo lo mencionado con anterioridad, pensamos que los biosólidos de depuradora incorporados al suelo pueden ser una excelente enmienda orgánica que mejorará la eficacia de las técnicas de biorremediación de los suelos contaminados por hidrocarburos. No obstante, si bien es cierto que estos materiales orgánicos

resultan beneficiosos para el suelo, también pueden presentar ciertos aspectos negativos que se deben valorar antes de su uso en el mismo.

### Aspectos positivos y negativos de los biosólidos de depuración de aguas residuales urbanas como enmiendas del suelo.

Los biosólidos de depuradora constituyen un residuo rico en materia orgánica y nutrientes, y es este un aspecto fundamental para su aplicación a suelos degradados del sureste español, puesto que es precisamente de materia orgánica de lo que carecen dichos suelos. Los biosólidos también poseen un elevado contenido en nitrógeno debido a su contenido proteico y en fósforo, procedente posiblemente de los detergentes (Tabla 2). Los niveles de potasio, sin embargo, son relativamente bajos puesto que están formando sales solubles, que permanecen en el agua una vez finalizado el proceso de depuración que origina los biosólidos.

**Tabla 2.-** Composición química de los lodos de depuradora (biosólidos) sobre muestra seca

PARÁMETROS	VALOR MÍNIMO Y-MÁXIMO
Conductividad Eléctrica (dS m <sup>-1</sup> )	0.8-11
pH	6-12
Materia Orgánica (g Kg <sup>-1</sup> )	500-800
Relación C/N	5-8
Nitrógeno (g Kg <sup>-1</sup> )	20-60
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (g Kg <sup>-1</sup> )	20-50
Potasio (K <sub>2</sub> O) (g Kg <sup>-1</sup> )	5-10

(Mena., 2001)

Estos materiales orgánicos también se caracterizan por mantener una alta carga microbiana, lo cual es un aspecto muy positivo. Una de las maneras de recuperar la calidad y fertilidad perdidas en los suelos es la mejora de su actividad microbiana la cual tiene un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos de importantes nutrientes, mejorando así la calidad biológica de los mismos. Además, con el aporte del biosólido no solo se mejora la actividad microbiana autóctona del suelo sino que se incorporan nuevas poblaciones microbianas procedentes de este material (Mena, 2008).

Sin embargo, los biosólidos pueden presentar también ciertos aspectos negativos que deben ser tenidos en cuenta antes de su reciclado en el suelo. Uno de estos aspectos es su contenido, a veces excesivo en metales pesados, lo cual merece especial atención debido a su peligrosidad. *A priori*, no deberíamos encontrarnos con este problema ya que se trabaja con biosólidos obtenidos de la depuración de aguas

residuales urbanas, sin embargo, debido a pequeñas industrias urbanas (talleres de automóviles, laboratorios, etc.) así como a la recepción dentro de las líneas de aguas residuales de las depuradoras de las procedentes de industrias periurbanas, es hasta cierto punto normal que aparezcan, en mayor o menor medida, contaminantes de este tipo. Cuando esto ocurre, el biosólido debe ser descartado para su uso en el suelo (García, 1991).

La salinidad es elevada en los biosólidos aunque puede ser enmascarado este aspecto negativo por los beneficios que confiere al suelo la aplicación del biosólido. Los altos contenidos de sales junto con el de metales pesados son aspectos negativos no subsanables por el proceso de compostaje, de ahí su importancia en cuanto a su detección para descartar el uso como enmienda de estos residuos orgánicos.

Otros problemas en los biosólidos pueden venir derivados de un exceso de materia orgánica lábil es decir fácilmente biodegradable, lo cual le confiere características no deseables, ya que este material se encuentra sometido a continuos cambios debido al uso que los microorganismos hacen de esa materia orgánica lábil.

El olor desagradable es un aspecto muy negativo en los materiales orgánicos frescos y es debido a los gases producidos en las primeras fases de la degradación de la materia orgánica lábil. Esta característica indica putrefacción pero desaparece con el tiempo debido a la estabilización de la materia orgánica por parte de los actinomicetos, dando origen a un olor muy similar a la tierra húmeda (Chanyasak *et al.*, 1980)

La presencia de microorganismos patógenos y metabolitos orgánicos que pueden ser considerados como tóxicos (restos de plaguicidas, etc.) que en ocasiones pueden aparecer en los lodos, pueden suponer un riesgo cuando se usan en agricultura. Sin embargo, estos aspectos negativos de los biosólidos (a excepción de los metales pesados y la salinidad) pueden ser eliminados sometiendo al biosólido a un proceso adecuado de biofermentación oxidativa (compostaje), mediante el cual se conseguirá estabilizar la materia orgánica contenida en el mismo.

### **Estabilización oxidativa de biosólidos mediante compostaje.**

Consideramos que este tipo de proceso aerobio de estabilización puede ser una manera aceptable de conseguir un producto sano para ser utilizado como enmienda orgánica en el suelo.

Este proceso permite eliminar gran cantidad de problemas, como los citados anteriormente (patógenos, metabolitos orgánicos fitotóxicos, fracción lábil de materia orgánica, malos olores, etc.). Cuando se lleva a cabo de modo adecuado se obtiene un producto final de calidad, el compost, que servirá como fuente de materia orgánica para los suelos, aumentando el contenido en sustancias húmicas, y mejorando su fertilidad.

El compostaje se define como un proceso biofermentativo oxidativo controlado, en el que intervienen numerosos y variados microorganismos y que requiere una humedad adecuada y sustratos orgánicos heterogéneos. Además, este proceso requiere el paso por una etapa termofílica, dando al final como producto de los procesos de degradación, dióxido de carbono, agua y minerales, así como un material orgánico estabilizado (compost), libre de fitotoxinas y patógenos y dispuesto para su uso como enmienda orgánica de suelos, sin que provoque fenómenos adversos (Costa *et al.*, 1991).

### Tipos de compostaje

En el suelo se produce la transformación biológica de la materia orgánica (humificación) de una manera lenta y discontinua, y que depende del sustrato de que se trate, así como de los microorganismos que actúen. El producto final será muy distinto dependiendo de si las condiciones son aerobias o anaerobias. Con el compostaje artificial, se controlan los parámetros implicados en el proceso para garantizar un bajo coste económico junto a la reducción de la duración del proceso y la obtención de un material útil desde el punto de vista agrícola.

- Los tipos de sistemas de compostaje son diversos, y se clasifican en:

#### *Sistemas abiertos*

- Apilamiento estático
- Apilamiento con volteos
- Aireación periódica
- Sistema con volteos y ventilación forzada

#### *Sistemas cerrados*

- Reactores verticales
- Reactores horizontales

El compost que se utiliza en este trabajo es un compost comercial obtenido mediante un sistema de compostaje abierto, en el que el lodo de depuradora como material orgánico, mezclado con restos de poda y paja, utilizados como agente estructurante, que permiten que se desarrolle el proceso de compostaje adecuadamente, se dispuso en pilas estáticas con insuflado de aire, controlando los parámetros (humedad, temperatura y oxigenación) necesarios para asegurar el adecuado desarrollo del proceso de compostaje.

## **UTILIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS URBANOS EN LA BIORREMEDIAÇÃO DE SUELOS**

Como ya hemos visto a lo largo de esta introducción es bien conocida la importancia que tienen los microorganismos del suelo para que las técnicas de biorremediación tengan lugar de manera óptima. Por



este motivo nos interesa proporcionar al suelo las condiciones ideales para que la actividad microbiana se desarrolle adecuadamente, siendo la fuente de nutrientes un pilar fundamental para ello.

La adición de residuos orgánicos a suelos agrícolas para enriquecer el mismo en materia orgánica y nutrientes, se viene utilizando como un método tradicional, a lo largo de la historia en agricultura, y de la misma manera y por el mismo principio este método podría ser útil para incrementar la efectividad de las técnicas de biorremediación. La aplicación de residuos orgánicos puede tener un doble efecto de estimulación y bioaugmentación de los microorganismos degradadores durante los tratamientos de biorremediación de suelos. En este sentido existe cierta controversia dependiendo del tipo de enmienda orgánica que se utilice y el tipo de contaminante que se pretenda eliminar, ya que la adición de materiales orgánicos al suelo puede incrementar o no, la efectividad de las técnicas de biorremediación, de manera que en los estudios realizados en este sentido se han observado resultados contradictorios. Por este motivo se debe evaluar cada caso. Sang-Hwan *et al.* (2007) observaron el efecto positivo de la incorporación de materiales orgánicos (serrín de pino, heno de arroz y compost de estiércol de cerdo) en la degradación de los hidrocarburos del suelo. De igual manera Medaura y Ércoli (2008) observaron iguales resultados sobre los hidrocarburos con la aplicación de residuos alimentarios al suelo. También se ha observado una disminución de este contaminante cuando se incentiva la actividad microbiana con la aplicación de algunos agentes como surfactantes, nutrientes o inoculación bacteriana (Pinto *et al.*, 2007), o fertilizantes inorgánicos (Margesin *et al.*, 2007), lo que confirma la hipótesis de que estimulando la actividad de la comunidad microbiana del suelo encargada de degradar el contaminante se puede conseguir una optimización de los procesos de biorremediación y puesto que las enmiendas orgánicas promueven la actividad microbiana de los suelos, como observaron Bastida *et al.* (2008), en este trabajo de Tesis Doctoral se valorará la incorporación de materia orgánica al suelo contaminado para optimizar los procesos de biorremediación.

En contrapartida, también existen trabajos en los que la aplicación de enmiendas orgánicas procedentes de residuos industriales de café, hortalizas y cerveza no han estimulado la degradación de los hidrocarburos (Schaefer y Filser, 2006), por lo que no siempre las enmiendas orgánicas consiguen los efectos beneficiosos que buscamos sobre la descontaminación del suelo. Por este motivo se debe valorar cada tipo de enmienda en función del tipo de contaminante y del suelo en el que se va a realizar la biorremediación.

A lo largo de esta Introducción se ha puesto de manifiesto el papel fundamental que juegan los microorganismos en los procesos de degradación de los hidrocarburos, lo cual ha dado lugar al desarrollo de técnicas de biorremediación, tales como el landfarming o la fitorremediación basadas en la estimulación del crecimiento y/o la actividad de los microorganismos presentes en el suelo. Por ello, en este trabajo de Tesis Doctoral, además de verificar la efectividad de estas técnicas cuando se aplican en ambientes semiáridos, se tratará de incrementar la eficacia de las mismas mediante la incorporación a los suelos con

hidrocarburos de residuos orgánicos como fuente de materia orgánica y biomasa microbiana. Los biosólidos frescos o compostados son una excelente fuente de materia orgánica, capaz de mejorar la calidad de los suelos a los que se aplica, mejorando sus propiedades físicas, químicas bioquímicas y microbiológicas, por lo que es de esperar que su incorporación mejore la capacidad degradadora del suelo, consiguiendo una mayor disminución del contenido de hidrocarburos y consecuentemente, una mayor fertilidad del suelo para albergar una vegetación estable que consiga integrar estas zonas en el entorno en el que se encuentran, a la vez que contribuyen a su descontaminación.

## **4.OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Para comprender la problemática que se estudia en esta memoria, y enfocar los objetivos que se quieren alcanzar, se deben considerar las siguientes *premisas*:

- 1) El desarrollo de la actividad humana conlleva un aumento del consumo de agua, así como la necesidad de depurar dicha agua tanto para poder reutilizarla como para evitar que se convierta en un foco de contaminación e infecciones. Como resultado de esta depuración aparecen como subproductos unos lodos (biosólidos) de consistencia pastosa y composición variable en función de las características de los efluentes que se tratan en las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR), pero que se caracterizan por ser un recurso importante de materia orgánica y nutrientes y cuya acumulación representa un problema importante que urge resolver, siendo necesario buscar vías de reciclado o valorización de los mismos coherentes y respetuosas con el medio ambiente. En este sentido, el uso como enmienda orgánica en el suelo de los lodos tanto frescos como después de haber sufrido un proceso de estabilización de su materia orgánica (compostaje), ha sido hasta ahora la vía de reciclado más frecuente de estos biosólidos.
  
- 2) La sociedad actual, está fundamentada en la actividad industrial, sostenida principalmente por el uso de combustibles fósiles, entre los que cabe destacar aquellos derivados del petróleo, como fuente de energía, los cuales generan una degradación continuada de los ecosistemas terrestres y acuáticos por derrames de hidrocarburos de petróleo y sus derivados, generando un problema medioambiental que debemos resolver de manera eficaz, económica y respetuosa con el medio ambiente, ya que estos hidrocarburos son altamente tóxicos para los microorganismos, animales y plantas, constituyendo también un riesgo potencial para la salud humana. El petróleo es la fuente de energía más utilizada del planeta (40% del consumo energético mundial) y para ello debe ser tratado en las refinerías. En este tratamiento se generan como producto de desecho unos lodos (lodos de refinería), de carácter orgánico y consistencia pastosa, que se caracterizan por estar constituidos por hidrocarburos (en torno al 20-40%), planteándose el problema de su gestión adecuada, la cual debe ir orientada a evitar la posible contaminación por hidrocarburos de los ecosistemas. La deposición de estos lodos de refinería en zonas controladas situadas en las inmediaciones de las refinerías, es una práctica frecuente de tratamiento en las empresas petroquímicas con el fin de conseguir la eliminación de los hidrocarburos contenidos en los mismos mediante atenuación natural, es decir, por medio de los microorganismos existentes en el suelo, que utilizan los hidrocarburos como fuente de carbono. Sin embargo, el proceso de “atenuación natural” es muy lento y puede durar muchos años, por lo que como consecuencia de la disposición repetitiva y acumulación de estos efluentes de refinería sobre un mismo suelo nos encontramos que el mismo soporta una carga muy elevada de hidrocarburos, que los microorganismos del suelo no son capaces de degradar a corto o medio plazo, representando un riesgo de

contaminación tanto atmosférica como de aguas superficiales y subterráneas, por lo que se hace necesario la implementación de técnicas que permitan acelerar la biodegradación de los hidrocarburos que se encuentran en alto contenido en estos suelos. Entre estas técnicas, el *landfarming* es una de las más utilizadas en este sector industrial, y en consecuencia, es tema de estudio la optimización de esta tecnología, así como la fitorremediación (fitoestimulación).

- 3) Los microorganismos existentes en el suelo son los agentes encargados de la degradación de los hidrocarburos aportados al mismo con los lodos de refinería, ya que son capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono. Sin embargo, como ya hemos indicado, este proceso de “atenuación natural” es muy lento y puede durar muchos años. Con el fin de acelerar este proceso de degradación de hidrocarburos, las técnicas de biorremediación, entre las que se encuentran el *landfarming* y la fitorremediación, encaminadas a incrementar la cantidad (*bioaugmentación*) y/o actividad (*bioestimulación*) de las poblaciones microbianas del suelo se consideran como técnicas en clara expansión y muy competitivas. En este contexto, la utilización de biosólidos reviste un gran interés ya que los numerosos estudios realizados sobre ellos han demostrado claramente el gran potencial enzimático y la gran cantidad y diversidad de microorganismos existentes en este tipo de residuos, además de funcionar como substratos orgánicos para la activación de los microorganismos biodegradadores de hidrocarburos. Estas características les hace idóneos para ser utilizados en la recuperación de suelos que sufren procesos de degradación por contaminantes orgánicos, ya que incrementarán las poblaciones microbianas existentes en el suelo, al tiempo que estimularán la actividad de las poblaciones microbianas autóctonas del mismo, aumentaran la concentración de enzimas y nutrientes en el medio, ayudaran a mantener la humedad del suelo, y mejorarán las características físicas del mismo.

Teniendo en cuenta estas premisas se establece como **objetivo general** de este trabajo *la evaluación, tanto de la eficacia de técnicas de biorremediación tales como el landfarming y la fitorremediación cuando se emplean en un suelo semiárido con presencia de hidrocarburos procedentes de lodos de refinería, como de la utilidad de adicionar a estos suelos biosólidos (granulados o compostados) como estrategia para incrementar la eficacia de estos procesos de recuperación, consiguiendo acortar los tiempos necesarios para la degradación de dichos hidrocarburos y una mayor degradación de los más recalcitrantes. El empleo de estos biosólidos se realizará siempre teniendo muy en cuenta la problemática que puede derivarse del mencionado empleo en el suelo en relación a la salinidad, los nitratos, y los metales pesados, entre otros. Esto nos permite, por una parte, ofertar una vía alternativa para el uso de los biosólidos de depuradora, y por otra, establecer una metodología innovativa para la biorrecuperación de suelos con alto contenido de hidrocarburos. Una vez recuperado el suelo, se procederá a la restauración integral de la zona tratada*

*mediante la implantación de una cubierta vegetal estable que proteja al suelo frente a la erosión, y que permita, al mismo tiempo, la integración paisajística de esta zona.*

Como **objetivos específicos** se plantearon los siguientes:

- Caracterización de los lodos de refinería, de los materiales orgánicos utilizados como enmiendas orgánicas (biosólidos de depuradora granulados y compostados) y del suelo con hidrocarburos.
- Evaluación mediante un ensayo de tratabilidad, de la capacidad de los microorganismos presentes en el suelo para llevar a cabo el proceso de biorremediación, comprobando su eficacia para biodegradar los hidrocarburos presentes en el suelo.
- Optimización del proceso de landfarming, dirigido a la degradación de hidrocarburos, cuando dicho proceso se lleva a cabo en una zona con clima semiárido (escasa humedad y temperatura elevada). Se optimizarán los siguientes factores: a) la dosis idónea de enmienda orgánica (biosólido granulado o compostado) que debemos aplicar al suelo; b) la necesidad o no de aportar nutrientes; y c) el nivel mínimo de humedad que se debe mantener en el suelo para que el proceso de biorremediación no se vea afectado.
- Evaluar la eficacia de la adición al suelo de biosólidos granulados o compostados (de buena calidad y exentos de contaminantes) para acelerar e intensificar los procesos de degradación de hidrocarburos, dada su capacidad para actuar como catalizadores de dichos procesos, debido, entre otros factores, a la gran cantidad y diversidad de biomasa microbiana, substratos orgánicos y enzimas inmovilizadas que incorporan.
- Establecimiento de la evolución de la calidad microbiológica del suelo durante el proceso de landfarming mediante: 1) la monitorización de parámetros microbiológicos y bioquímicos indicadores del tamaño y actividad de las poblaciones microbianas; 2) la caracterización de la estructura y tamaño de las comunidades bacteriana y fúngica, con el fin de establecer cuales son los microorganismos con mayor implicación en este proceso de biodegradación de los hidrocarburos y la incidencia de la incorporación de biosólido y compost sobre estas comunidades microbianas.
- Evaluar la incidencia de la adición de biosólido fresco tratado térmicamente (granulado) o compostado en la eficacia del empleo de técnicas de fitoestimulación para la degradación de hidrocarburos.
- Determinar qué especies de plantas fitorremediadoras son más adecuadas y resistentes para desarrollarse, en las condiciones semiáridas de la zona, con el fin de conseguir la revegetación de dicha zona después del landfarming. Se ensayarán especies autóctonas capaces de desarrollarse en ambientes semiáridos. Asimismo, se establecerá la incidencia de las incorporaciones tanto del biosólido granulado como del compostado realizadas durante el proceso de landfarming, en el desarrollo y pervivencia de esta vegetación.

- Establecer la revegetación de la zona recuperada con la implantación de una cubierta vegetal estable, consiguiendo una integración paisajística de esta zona, y a la vez, facilitando a nivel de la rizosfera, el establecimiento de unas condiciones idóneas para que se puedan seguir eliminando los hidrocarburos más recalcitrantes.

Para la consecución de estos objetivos se realizaron una serie de ensayos tal y como se muestra en el Esquema 1.

En primer lugar se llevó a cabo un ensayo de tratabilidad con el fin de comprobar la eficacia biodegradativa de la microflora autóctona del suelo que se pretende biorremediar. Una vez verificada la posibilidad de éxito del proceso de biorremediación en este suelo, se realizaron diversos ensayos a nivel de microcosmos para optimizar el proceso de landfarming teniendo en cuenta cuatro aspectos fundamentales:

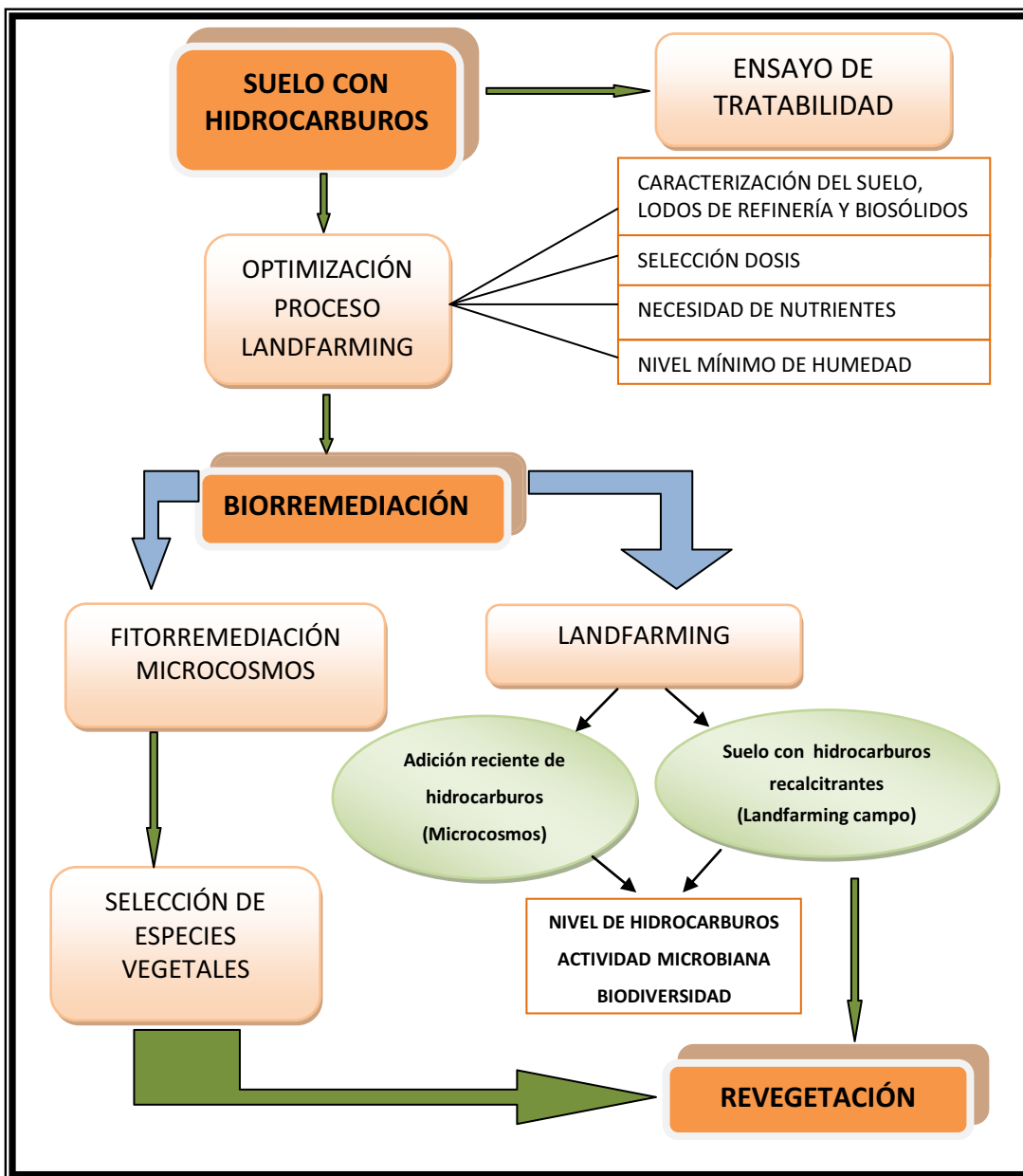
- 1) Caracterización de los materiales implicados en el proceso de biorremediación, tales como suelo, fuente de contaminación y enmiendas orgánicas (biosólido granulado y compostado).
- 2) Selección de la dosis de enmienda orgánica que se debe aplicar al suelo, para incentivar al máximo la actividad degradativa de las colonias microbianas presentes en él.
- 3) Valorar la necesidad de adicionar nutrientes al suelo tratado para conseguir una actividad microbiana óptima.
- 4) Determinar el nivel mínimo de humedad necesario para mantener la actividad de los microorganismos del suelo de tal manera que el proceso de landfarming se desarrolle con éxito.

En una segunda fase, se evaluó tanto al nivel de microcosmos como al nivel de campo la eficacia de la técnica de landfarming en la degradación de hidrocarburos.

En primer lugar se desarrolló un experimento de *landfarming en microcosmos* para evaluar la eficacia de esta técnica en la biorremediación de un suelo con incorporación reciente de hidrocarburos, así como la incidencia de la adición de enmiendas orgánicas (biosólido granulado y compostado), en la composición y actividad de las poblaciones microbianas encargadas de biodegradar los hidrocarburos, y consecuentemente en la disminución del contenido de éstos en el suelo. En este ensayo un suelo con y sin adición de enmienda orgánica fue contaminado con un 5% de hidrocarburos mediante la incorporación de lodos de refinería, sometiéndolo a continuación a un proceso de landfarming de 6 meses de duración.

Por otro lado, se desarrolló un ensayo de *landfarming a nivel de campo*, en suelos en los que desde hace años se han venido reciclando de forma controlada lodos de refinería, con el fin de comprobar si los resultados obtenidos con el experimento en microcosmos y con contaminación de hidrocarburos reciente, son extrapolables a zonas con un largo historial de incorporación de hidrocarburos, en las que la degradación de aquellos hidrocarburos más sencillos ha dado lugar a un enriquecimiento en hidrocarburos más recalcitrantes, lo que hace más difícil su degradación.





Esquema 1. Plan de trabajo

En la tercera fase de esta Memoria, se llevó a cabo un ensayo de *fitorremediación a nivel de microcosmos*, con el fin de evaluar la capacidad fitorremediadora de una variedad de plantas en este suelo con hidrocarburos, con y sin adición de enmiendas orgánicas, en el que existe un predominio de hidrocarburos recalcitrantes tras el proceso de landfarming sufrido. Además, se ha evaluado la incidencia de la presencia o no de enmiendas orgánicas en el desarrollo de las especies vegetales ensayadas. Como paso previo al ensayo de fitorremediación se realizó un test de germinación y crecimiento con una amplia variedad de especies vegetales, a fin de realizar el ensayo de fitorremediación y la evaluación de la incidencia de las

enmiendas orgánicas en la eficacia de la fitorremediación, con aquellas especies que mostrasen una mayor tolerancia a los hidrocarburos presentes en la zona en estudio.

Una vez establecidas aquellas especies vegetales con mayor capacidad fitorremediadora y que mejor se adaptan y desarrollan en este suelo con hidrocarburos (con distintos "inputs" de lodo de refinería), se llevó a cabo un *ensayo de revegetación* de la zona de estudio, implantando una cubierta vegetal estable que permitiese cerrar el ciclo de recuperación del suelo, consiguiendo su integración paisajística en el área que alberga la zona tratada y la protección del suelo frente a posibles procesos erosivos, así como la posibilidad de continuar eliminando al máximo los hidrocarburos recalcitrantes, mediante los microorganismos que colonizan la rizosfera de las plantas.

## **5.PARTE EXPERIMENTAL**



## **CAPÍTULO I**

**ENSAYOS PRELIMINARES: 1) TRATABILIDAD  
2) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE  
BIORREMEDIACIÓN**



## 1) ENSAYO DE TRATABILIDAD DEL SUELO CON HIDROCARBUROS

Antes de acometer cualquier proceso de biorremediación en un suelo con presencia de hidrocarburos, es fundamental comprobar que las poblaciones microbianas autóctonas son adecuadas para conseguir la biorremediación propuesta. Por ello, se realizó este ensayo de tratabilidad cuyo objetivo era, precisamente, evaluar las posibilidades de éxito del proceso de biorrecuperación, comprobando de manera experimental el tamaño y la actividad de las poblaciones microbianas presentes en el suelo, y su capacidad para acometer la biodegradabilidad de los hidrocarburos existentes en el mismo.

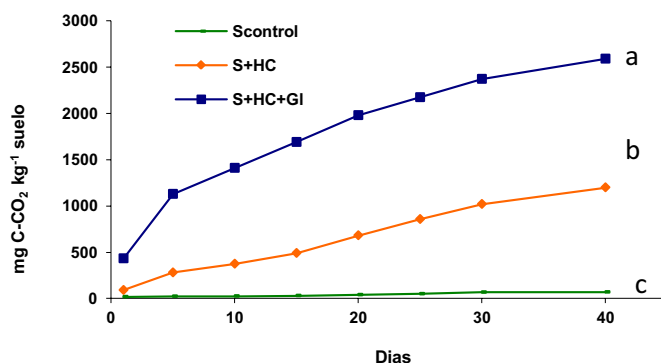
Para la realización de este ensayo se muestreó un suelo con hidrocarburos (HC) en una zona experimental de reciclado de lodos de refinería, situada en el valle de Escombreras (Cartagena), que será el objeto del estudio a realizar en este trabajo de Tesis Doctoral. Esta muestra de suelo estaba formada por varias submuestras tomadas aleatoriamente y homogeneizadas, y con ella se prepararon por triplicado cada uno de los tratamientos a ensayar: el suelo muestreado conteniendo hidrocarburos (S+HC) y este mismo suelo pero con adición de glucosa (S+HC+GI). Un suelo adyacente con características similares (Tabla I.1) al suelo de la zona experimental pero que no contenía hidrocarburos se muestreó y preparó de la misma manera, utilizándose como referencia (S<sub>control</sub>).

**Tabla I.1-** Principales características del suelo con hidrocarburos utilizado en los ensayos de incubación en microcosmos

PARÁMETRO /unidad	VALOR
pH (H <sub>2</sub> O) (1:2,5 a 20°C)	8,40
Conductividad eléctrica a 25°C (Dilución 1:5), µS/cm	297
Amonio (Expresado como N-NH <sub>4</sub> ), mg/kg	<1
Carbonatos totales (CaCO <sub>3</sub> ), g/100g	37,3
Carbono orgánico oxidable, g/100g	0,4
Cloruros, meq/100g	0,39
Caliza activa, g/100g	15
Fósforo asimilable, mg/kg	29,8
Fósforo total, mg/kg	405,9
Nitrógeno total Kjendahl, g/100g	0,10
Potasio asimilable, meq/100g	0,75
Potasio total, g/100g	0,68
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ), meq/100g	0,4
Hidrocarburos totales, g/100g	4,9
Arena gruesa (2-0,25 mm), g/100g	5,3
Arena fina (0,25-0,05 mm), g/100g	50,2
Limo (0,05-0,002 mm), g/100g	27,2
Arcilla (<0,002 mm), g/100g	17,3
Textura (USDA)	Franco arenosa (Textura gruesa)

En este ensayo, el suelo con hidrocarburos, se ha sometido en presencia (S+HC+GI) y ausencia (S+HC) de glucosa a un periodo de incubación de 40 días en condiciones óptimas de humedad (50-60 % de su capacidad de retención hídrica) y temperatura (28 °C). La glucosa adicionada al suelo, en principio actuará como fuente de materia orgánica fácilmente degradable por los microorganismos que pueda haber en el suelo, con lo que nos aseguramos de que se producirá un aumento de la actividad metabólica de la comunidad microbiana presente en ese suelo; pero es necesario determinar si la presencia de hidrocarburos inhibe la mineralización de la glucosa o funciona como co-substrato capaz de activar o incrementar el número de microorganismos biodegradadores de hidrocarburos.

Con la presencia de glucosa veremos si con un aporte de carbono fácilmente degradable junto con la presencia de hidrocarburos, existen colonias activas y se incrementa su capacidad biodegradadora en el suelo. La actividad metabólica de estas colonias se evaluará determinando la tasa respiratoria de los suelos mediante la cuantificación acumulativa del desprendimiento de CO<sub>2</sub> a lo largo del tiempo. Este ensayo nos permite conocer tanto el estatus metabólico de las poblaciones microbianas, como la biodegradabilidad del hidrocarburo.



**Figura I.1.-** Curvas acumulativas de desprendimiento de CO<sub>2</sub> indicativas del potencial biodegradativo del suelo. Tratamientos con igual letra indicarían valores de respiración acumulada durante 40 días que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey al nivel  $p < 0,05$

Como se aprecia en la Figura I.1, la actividad respirométrica del suelo control ( $S_{control}$ ) es prácticamente nula, lo cual no es sorprendente ya que se trata de un suelo con escaso contenido en materia orgánica (Tabla I.1) por lo que no dispone de fuentes de carbono orgánico fácilmente biodegradables. En cambio, cuando el suelo contiene lodos de refinería con altas concentraciones de hidrocarburos (S+HC) y en las condiciones óptimas de humedad y temperatura para el desarrollo microbiano establecidas en este ensayo, la actividad metabólica aumenta. Este hecho es indicativo de que algunas poblaciones microbianas utilizan los hidrocarburos así como otros substratos orgánicos existentes en estos lodos de refinería como fuente de carbono para desarrollarse, lo que confirma el potencial degradador de los microorganismos presentes en el suelo, así como la biodegradabilidad de los hidrocarburos contenidos en los lodos de refinería



La explosión metabólica más acentuada la protagoniza el suelo tratado con glucosa siendo significativamente diferente al resto de tratamientos, ya que los microorganismos disponen, por una parte, de la glucosa, que les sirve como fuente de carbono fácilmente biodegradable utilizándola en primer lugar (Brohon *et al.* 2001), y por otra parte, una vez consumida la glucosa, los microorganismos continúan su desarrollo a expensas de los hidrocarburos presentes en el suelo, que requieren mecanismos de biodegradación más complejos. Este hecho demuestra que, a pesar de la recalcitrancia de los hidrocarburos existentes en el suelo, los microorganismos del mismo poseen la capacidad de degradar este tipo de compuestos. La presencia de glucosa en el suelo incentiva el desarrollo inicial de las poblaciones microbianas heterótrofas, entre la cuales existen algunas especies microbianas capaces de sintetizar los sistemas enzimáticos necesarios para degradar los hidrocarburos, y una vez se agotan las fuentes de C más lábiles, utilizan otros compuestos orgánicos más recalcitrantes, como los hidrocarburos, como fuente de C y energía principalmente.

## **2) OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIORREDIACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE “LANFARMING”**

El objetivo de este ensayo fue optimizar el proceso de biorremediación mediante landfarming de un suelo con presencia de hidrocarburos, que se pretendía llevar a cabo posteriormente. Para ello, se establecieron diferentes ensayos de incubación en microcosmos con el fin de determinar: a) la dosis más idónea de biosólido o compost de biosólido a adicionar al suelo; b) la conveniencia de adicionar nutrientes; y c) el nivel mínimo de humedad que es imprescindible mantener en el suelo, en nuestras condiciones climáticas de semiaridez, para que no se vea frenado el proceso de biodegradación de los hidrocarburos contenidos en el suelo.

### **a) Optimización de la dosis de enmienda orgánica a adicionar**

#### Selección de los biosólidos

El objetivo de esta actividad fue la selección de dos biosólidos de calidad, uno fresco y otro compostado, con adecuados contenidos en materia orgánica y nutrientes, y que no pudiesen presentar problemas derivados de un contenido peligroso de metales pesados o de sustancias fitotóxicas.

Para ello, se caracterizaron una amplia gama de biosólidos de depuración de aguas residuales y de compost obtenidos a partir de ellos, determinándose sus diversas fracciones de materia orgánica, su contenido en nutrientes totales y asimilables, pH y conductividad eléctrica, y su contenido de metales pesados, a fin de seleccionar los materiales orgánicos más adecuados. Los materiales orgánicos finalmente seleccionados fueron, un biosólido granulado sometido a secado térmico, procedente de la depuración de aguas residuales urbanas y un compost obtenido a partir de un biosólido de depuración de aguas

residuales urbanas mezclado con restos vegetales y paja de cereal, utilizados como agente estructurante. Las principales características de estos materiales se muestran en la Tabla I.2. Como puede observarse en dicha Tabla, estos materiales poseen un pH cercano a la neutralidad, compatible con el desarrollo vegetal y de las poblaciones microbianas, y un considerable contenido de materia orgánica y nutrientes, que les hacen ser idóneos para mejorar la calidad de los suelos a los que se aplique y como consecuencia, activar los microorganismos degradadores de los hidrocarburos.

**Tabla I.2.** Principales características de los materiales orgánicos empleados como enmienda (datos sobre peso seco)

PARÁMETRO, unidad	Biosólido granulado	Compost de biosólido
Humedad, g/100g	4,6	54,9
pH en agua (a 20°C)	7,46	7,53
C.E. (1/5 a 25°C), $\mu\text{S}/\text{cm}$	2250	2800
Materia orgánica total, g/100g	58,2	72,1
Materia orgánica oxidable, g/100g	35,0	36,0
Nitrógeno total Kjeldahl, g/100g	4,53	2,70
Nitrógeno nítrico, mg/kg	9,30	154
Amonio, (expresado como N-NH <sub>4</sub> ) mg/kg	3769	99,6
Fósforo total, g/100g	2,48	1,59
Fósforo asimilable, g/10g	835	588
Potasio total, g/100g	0,61	0,44
Potasio extraíble, meq/100g	5,84	4,36
Cadmio total, mg/kg	1,80	0,7
Cobre total, mg/kg	337	270
Cromo total, mg/kg	132	22,4
Níquel total, mg/kg	50,6	14,4
Plomo total, mg/kg	173	109
Zinc total, mg/kg	1385	858

El biosólido fresco presenta un mayor contenido de nitrógeno total, fósforo y amonio, mientras que el compost posee un mayor contenido de nitratos, indicativo del proceso de nitrificación que se produce durante el proceso de compostaje (Mena, 2008). Entre los metales pesados el cinc es el elemento más abundante seguido por el cromo sin que en ningún caso el contenido en metales pesados de estos materiales sobrepase los límites establecidos en la legislación nacional y europea para el empleo de biosólidos en agricultura (Directiva 86/278/EEC, Real Decreto 1310/1990 y O.M. de 26 de Octubre de 1993).

Asimismo, se observan diferencias en la humedad de los materiales orgánicos seleccionados, siendo el compost el que tiene un contenido de agua considerable mayor que el biosólido granulado, ya que éste último ha sufrido un secado térmico. En cambio, para obtener el compost es necesario humedecer el material fresco de manera que haya una cantidad óptima de agua accesible para los microorganismos

encargados de la transformación de la materia orgánica durante el proceso de compostaje. Dicho contenido en agua que se aporta al suelo con este tipo de enmienda es beneficioso para la actividad de los microorganismos nativos del suelo y para la instauración de una cubierta vegetal sobre el mismo. Por otra parte esta cantidad de agua se debe tener en cuenta para determinar la dosis más adecuada de dicha enmienda en peso seco de material.

### **b) Selección de la dosis de enmienda a emplear**

Para la optimización de la dosis de enmienda a emplear en los experimentos de landfarming se realizó un ensayo en microcosmos, en el que al suelo con aporte periódico de hidrocarburos, procedentes de lodos de refinería, utilizado en el ensayo anterior (Tabla I.1), se le adicionaron diferentes dosis de cada una de las enmiendas orgánicas seleccionadas (biosólido granulado o compostado) con el objetivo de establecer con cual de estas dosis, se mejoraba en mayor medida la capacidad degradativa de los microorganismos implicados en el proceso de biorremediación, consiguiendo una mayor disminución del contenido de hidrocarburos.

Muestras del suelo con hidrocarburos (500g) se colocaron en contenedores de vidrio de 500 ml y se enmendaron, por triplicado, con biosólido granulado o compostado, a dosis equivalentes a 40, 80, 120, 150, 180, y 250 t ha<sup>-1</sup>(peso húmedo). Asimismo, se preparó un triplicado de suelo sin adición de enmienda orgánica para que sirviera de referencia (control) y reflejara el nivel de degradación de hidrocarburos cuando el suelo se somete a landfarming sin una enmienda orgánica que suponga una fuente adicional de carbono lábil para los microorganismos. Estas muestras de suelo se humedecieron al 60% de su capacidad de retención hídrica, colocándose los contenedores en una cámara de cultivo a una temperatura constante de 24°C durante 4 meses. Los microcosmos se airearon semanalmente mediante volteo y homogenización del suelo usando una espátula, con el fin de mantener en el suelo el nivel de oxígeno necesario para la actividad microbiana. La pérdida de humedad se controló por pesada durante todo el periodo experimental, reponiendo el agua evaporada mediante la adición de agua destilada cuando era necesario. De esta manera se lograba mantener la humedad de los suelos entre el 50-60 % de su capacidad de retención hídrica. Los suelos se muestrearon mensualmente, determinándose en ellos el contenido de hidrocarburos totales y la actividad microbiana (desprendimiento de CO<sub>2</sub>).

Mediante este experimento se pudo constatar que la adición de biosólido, granulado o compostado, a dosis inferiores a 120 t ha<sup>-1</sup> (Tabla I.3), no incrementaba el nivel de degradación de hidrocarburos conseguido en el tratamiento sin enmienda (Control).

Sin embargo, a partir de la dosis citada anteriormente se conseguía una mayor degradación de los hidrocarburos existentes en el suelo con la adición del material orgánico, pasando a ser de un 20% en el control a un 32-35% en los suelos tratados con biosólido o compost a las dosis de 180-250 t ha<sup>-1</sup>.

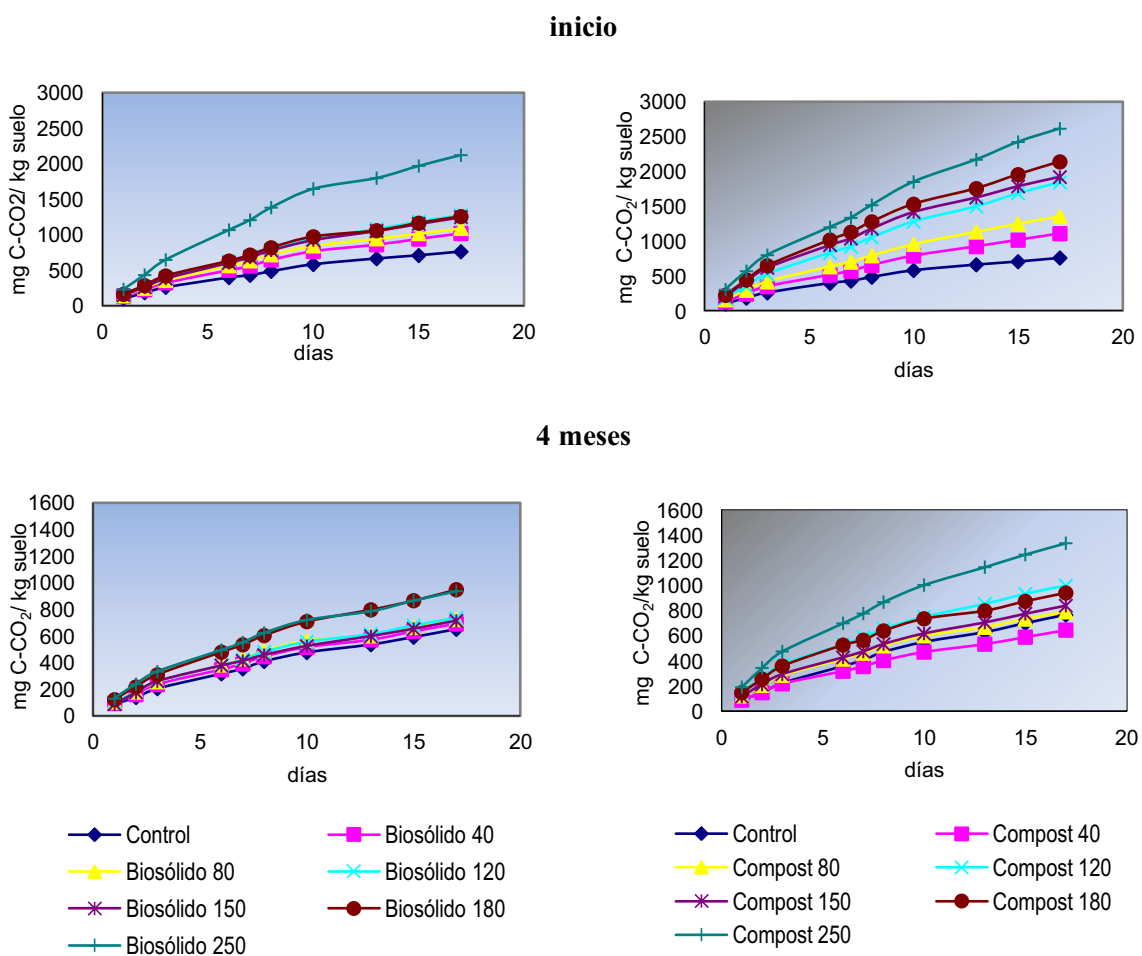
**Tabla I.3.-** Evolución en el tiempo, de la concentración total de hidrocarburos en el suelo (%) para los diferentes tratamientos ensayados

TRATAMIENTO	inicio	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses
Control	4,9 E	4,6 eD	4,3 eC	4,0 fB	3,9 gA
<b>Compost ( t ha<sup>-1</sup>)</b>					
40	4,9 E	4,6 eD	4,3 eC	4,1 gB	3,9 gA
80	4,9 E	4,6 eD	4,2 dC	4,0 fB	3,9 gA
120	4,9 E	4,5 dD	4,2 dC	3,9 eB	3,8 fA
150	4,9 E	4,4 cD	4,0 cC	3,8 dB	3,6 dA
180	4,9 E	4,3 bD	3,9 bC	3,6 bB	3,3 bA
250	4,9 E	4,3 bD	3,8 aC	3,5 aB	3,4 cA
<b>Biosólido ( t ha<sup>-1</sup>)</b>					
40	4,9 E	4,6 eD	4,2 dC	4,1 gB	3,9 gA
80	4,9 E	4,6 eD	4,3 eC	4,0 fB	3,9 gA
120	4,9 E	4,4 cD	4,2 dC	3,9 eB	3,7 eA
150	4,9 E	4,3 bD	3,9 bC	3,7 cB	3,3 bA
180	4,9 E	4,2 aD	3,8 aC	3,5 aB	3,2 aA
250	4,9 E	4,3 bD	3,8 aC	3,5 aB	3,3 bA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ )

La mayor degradación de hidrocarburos conseguida con la adición del biosólido (granulado o compostado) hay que atribuirlo al hecho de que estos materiales aportan al suelo una gran cantidad y diversidad de microorganismos y fuentes de carbono fácilmente biodegradables (Ros *et al.*, 2003; Tejada *et al.*, 2006), lo que favorece el incremento de las poblaciones microbianas degradadoras, y como consecuencia, se produce una mayor biosíntesis de enzimas implicadas en los procesos de degradación y/o transformación de los hidrocarburos presentes en el suelo.

Esta estimulación de la actividad microbiana del suelo se ha confirmado mediante las medidas de respiración (desprendimiento de CO<sub>2</sub>) realizadas en estos suelos al principio y al final de la incubación (4 meses), y que han puesto de relieve un notable aumento inicial de la respiración con la adición al suelo de la enmienda orgánica, mayor cuanto mayor era la dosis (Figura I.2).

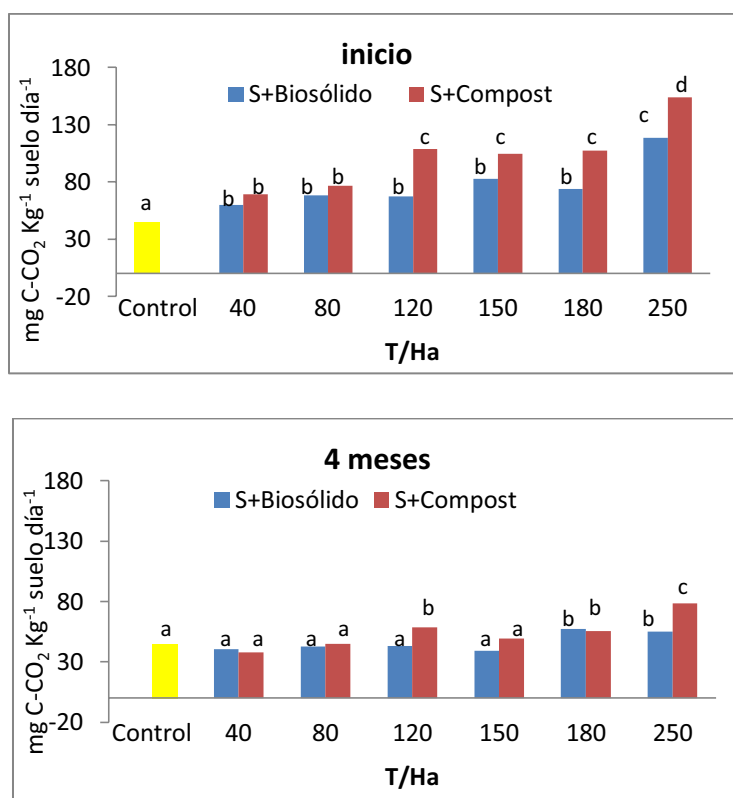


**Figura I.2.-** Curvas de desprendimiento acumulativo de CO<sub>2</sub> en el suelo enmendado con diferentes dosis de biosólido y compost y el control al inicio y después de 4 meses de simulación de landfarming

Como puede apreciarse, tanto al inicio como al final del proceso todos los suelos con enmienda orgánica mostraban una mayor actividad respiratoria que el suelo sometido también a landfarming pero sin adición de enmienda orgánica, siendo los tratamientos con 250 t ha<sup>-1</sup> de biosólido o compost, seguidos por los de 180 t ha<sup>-1</sup> los que mostraban los valores más elevados de respiración microbiana (Figura I.2, inicio). Este hecho es debido a la gran estimulación microbiana provocada, como hemos indicado ya anteriormente, por la adición de los materiales orgánicos, que ponen a disposición de los microorganismos del suelo una gran cantidad de sustratos fácilmente biodegradables, que es mayor cuanto más elevada es la dosis aplicada.

Después de 4 meses de incubación, el comportamiento de los suelos enmendados con 180 y 250 t ha<sup>-1</sup> de biosólido granulado tendía a igualarse, mostrando valores similares de respiración (reflejo de la actividad microbiana) y siempre superiores a los del resto de los tratamientos ensayados. A su vez, los suelos que habían recibido dosis más bajas de enmienda, aunque mostraban valores de respiración significativamente superiores a los del suelo control sin enmendar, estas diferencias no eran notables. En los suelos tratados

con compost a dosis mayores a  $80 \text{ t ha}^{-1}$ , los valores de respiración eran mayores que los correspondientes del tratamiento con biosólido granulado, tanto al inicio como después de 4 meses de incubación. Esto podría ser debido a que el tratamiento térmico de secado que sufre el biosólido, propicie el enquistamiento de algunos microorganismos, que pasan a un estado latente, los cuales no intervienen en los mecanismos metabólicos de degradación de los hidrocarburos, también es posible que exista algún tipo de inhibidor microbiano que a dosis elevadas contrarreste el efecto beneficioso derivado de esta enmienda, haciendo que su efecto estimulador sobre la actividad microbiana se vea mermado de algún modo cuando se aplica a dosis muy elevadas. Del mismo modo, los valores de respiración basal (Figura I.3) muestran claramente la mayor actividad microbiana desarrollada inicialmente en el suelo con la adición del compost en relación al suelo tratado con biosólido granulado, particularmente cuando se adiciona a las dosis más altas. Como ya hemos comentado anteriormente, el compost de biosólido está incorporando al suelo, una materia orgánica madura y adecuada para ser degradada por los microorganismos del suelo, además de colonias microbianas activas que incrementan el nivel de desprendimiento de  $\text{CO}_2$ .



**Figura I.3.** Respiración basal del suelo enmendado con diferentes dosis de biosólido o compost y el control, al inicio y tras 4 meses de simulación de landfarming. Para cada tiempo de muestreo, barras con igual letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ )

De acuerdo con este estudio las dosis que parecen producir una mayor estimulación de las poblaciones microbianas encargadas de degradar los hidrocarburos serían las de  $180$  y  $250 \text{ t ha}^{-1}$ . Ya que ambas dosis

producen efectos semejantes en el suelo, se ha considerado que la dosis más apropiada para utilizar en el ensayo de landfarming a efectuar en campo es, por razones económicas, la de 180 t ha<sup>-1</sup>.

### **c) Establecimiento de la dosis más adecuada de nutrientes (N y P) a aplicar al suelo**

Teniendo en cuenta el contenido de carbono orgánico total del suelo en estudio (Tabla I.1), se llevó a cabo un ensayo consistente en adicionar a este suelo N (en forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) y P (como K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) en las cantidades necesarias para alcanzar en el suelo diferentes relaciones C/N/P. Las distintas relaciones C/N/P ensayadas han sido: 100/5/1; 100/10/1; 100/10/2; y 100/10/4 por ser las más aconsejables de acuerdo con la bibliografía existente (Alexander *et al*, 1994; Skipper y Turco, 1995). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado estableciéndose como referencia un triplicado del suelo contaminado sin adición de nutrientes (control).

Las muestras de suelo (500 g) con los diferentes tratamientos se humedecieron al 50-60% de su capacidad de retención hídrica y se colocaron en la cámara de incubación ya descrita en el apartado anterior, en la que se mantuvieron durante 4 meses a 24 °C, aireando el suelo periódicamente. Tanto al inicio como después de 1, 2, 3 y 4 meses se tomaron muestras de suelo para la determinación del contenido de hidrocarburos totales, y de la respiración del suelo medida como desprendimiento de CO<sub>2</sub>, que nos informaría del estado de la actividad microbiana del suelo.

En este estudio no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el control y los diferentes tratamientos en cuanto al nivel de degradación de hidrocarburos y la actividad microbiana desarrollada en el suelo. Ello nos sugiere que el contenido total de N y P en el suelo con hidrocarburos de partida (Tabla I.1) es suficiente para mantener la actividad microbiana en niveles aceptables, no siendo necesaria la incorporación de nutrientes a este suelo para obtener una mayor degradación de los hidrocarburos presentes en el mismo.

### **d) Establecimiento del nivel mínimo de humedad necesario**

Dado que en este trabajo de Tesis Doctoral se pretende optimizar la técnica de landfarming para su empleo en ambientes semiáridos, donde las precipitaciones son escasas (200-300 mm anuales en promedio), y en consecuencia el agua es un factor limitante, el objetivo de este ensayo ha sido establecer la humedad mínima necesaria para que los microorganismos encargados de degradar los hidrocarburos mantengan su actividad. De este modo podremos conocer cuál es la cantidad de agua que debemos aportar mediante el riego para mantener, de forma más o menos constante, una humedad mínima en las parcelas del experimento de landfarming a escala de campo, en dichas condiciones semiáridas.

Para ello, varias muestras del mismo suelo de la zona experimental en la que se realizará más adelante el ensayo de biorremediación *in situ*, y que se ha utilizado también en los ensayos de incubación anteriores, se llevaron, con agua destilada, a niveles de humedad del 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5% de la capacidad de retención hídrica del suelo. Todos los tratamientos se efectuaron por triplicado, colocándose las muestras en una cámara de incubación donde se mantuvieron a 24 °C y con aireación apropiada, removiendo diariamente con una espátula, durante 4 meses. Durante este tiempo el nivel de humedad fue controlado mediante pesada, reponiendo el agua perdida cuando era necesario. Los suelos se muestrearon mensualmente, determinándose en ellos el contenido de hidrocarburos totales (Tabla I.4).

**Tabla I.4.-** Evolución con el tiempo del contenido total de hidrocarburos (%) en el suelo con diferentes contenidos de humedad

Nivel de humedad	inicio	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses
50%	4,9 aE	4,6 aD	4,3 aC	4,0 aB	3,9 aA
40%	4,9 aE	4,6 aD	4,3 aC	4,2 bB	4,0 bA
30%	4,9 aE	4,6 aD	4,5 bC	4,3 cB	4,2 cA
20%	4,9 aC	4,8 bB	4,6 cA	4,6 dA	4,6 dA
15%	4,9 aB	4,8 bA	4,8 dA	4,8 eA	4,8 eA
10%	4,9 aB	4,9 cB	4,8 dA	4,8 eA	4,8 eA
5%	4,9 aB	4,9 cB	4,8 dA	4,9 fB	4,8 eA

*Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ )*

En este estudio se puso de manifiesto que niveles de humedad por debajo del 30 % provocaban una ralentización de la actividad microbiana que se traducía en una menor degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo, que en el periodo experimental iba desde un 20% de disminución de los hidrocarburos totales con respecto al contenido inicial, después de 4 meses, en el suelo con una humedad del 50 %, a un 5,3-1 % en los suelos con humedades inferiores al 30 % (Tabla I.4)

*A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que el proceso de biorremediación del suelo mediante landfarming es factible ya que el suelo contiene microorganismos capaces de utilizar los hidrocarburos y otros compuestos carbonados procedentes del lodo de refinería como fuentes de carbono.*

*En cuanto a la optimización del proceso de landfarming se ha puesto de manifiesto que la adición de enmiendas orgánicas incentivan la degradación de los hidrocarburos cuando se aplican a dosis elevadas, debido a la estimulación del crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas que provocan en el suelo, siendo la dosis de 180 t ha<sup>-1</sup> la más idónea para este fin; asimismo, puede concluirse que una humedad mínima del 30 % de la capacidad de retención hídrica del suelo es imprescindible para que el proceso se realice adecuadamente, y que la adición de nutrientes (N y P) no es necesaria para el proceso de biorremediación de este suelo.*



## **CAPÍTULO II**

# **BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CON HIDROCARBUROS PESADOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE LANDFARMING**



## 1) BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON INCORPORACIÓN RECIENTE DE HIDROCARBUROS PESADOS. ENSAYO EN MICROCOSMOS

El suelo de la zona experimental presenta una alta proporción de hidrocarburos recalcitrantes, debido al largo historial de reciclado de lodos de refinería en el mismo y el proceso de landfarming que se ha venido realizando en él durante más de 12 años. Según se ha visto en algunos trabajos como el de Labúd *et al.* (2006), no todos los hidrocarburos responden de igual manera a tratamientos de biorremediación, puesto que depende en gran medida, de su biodisponibilidad para ser atacados por los microorganismos del suelo.

Esta biodisponibilidad dependerá, a su vez, de la estructura y naturaleza del hidrocarburo, siendo los de cadena lineal corta y con enlaces simples los más lábiles, mientras que los que permanecen en el suelo después de un largo periodo de tiempo son aquellos que son más complejos y recalcitrantes.

Por ello, dada la diferente naturaleza de los hidrocarburos que pueden aparecer en el suelo, hemos considerado de interés, antes de llevar a cabo los ensayos de biorremediación en campo, verificar la eficacia de la técnica de landfarming, con y sin aporte de enmiendas orgánicas, en un suelo con incorporación reciente de hidrocarburos, y por tanto, con una menor proporción de hidrocarburos recalcitrantes. Se trata, por una parte, de comprobar, a nivel de microcosmos, si la incorporación de las enmiendas orgánicas favorece la degradación de los hidrocarburos y por otra, de profundizar en el conocimiento del efecto de estas enmiendas sobre la actividad, funcionalidad y diversidad de las poblaciones microbianas implicadas en este proceso.

Para este estudio, se utilizó un suelo agrícola sin hidrocarburos al que se añadió lodo de refinería en cantidad suficiente para alcanzar un nivel de hidrocarburos del 5%. Las características del suelo y del lodo de refinería utilizados se muestran respectivamente en las Tablas II.1 y II.2. El lodo fresco de refinería empleado en este estudio, se genera en las refinerías durante el proceso de refinado y el mantenimiento y limpieza de las instalaciones, poseyendo una alta concentración de hidrocarburos y una consistencia semisólida.

Se prepararon los siguientes tratamientos:

- (i) Un suelo sin lodo de refinería que se ha utilizado como control (S),
- (ii) Suelo sin lodo de refinería con aporte de biosólido granulado (S+B),
- (iii) Suelo sin lodo de refinería con aporte de biosólido compostado (S+C),
- (iv) Suelo con aporte de lodo de refinería en una cantidad tal que se llegue a una concentración de hidrocarburos (HC) en el suelo del 5% (S+HC),
- (v) Suelo con lodo de refinería y con aporte de biosólido granulado (S+HC+B),
- (vi) Suelo con lodo de refinería y con aporte de biosólido compostado (S+HC+C).

**Tabla II.1.-** Características del suelo utilizado en los ensayos en microcosmos

PARÁMETRO /unidad	VALOR
pH (H <sub>2</sub> O) (1:2,5 a 20°C)	8,04
Conductividad eléctrica a 25°C (Dilución 1:5), µS/cm	257
Amonio (Expresado como N-NH <sub>4</sub> ), mg/kg	<1
Carbonatos totales (CaCO <sub>3</sub> ), g/100g	35,6
Carbono orgánico oxidable, g/100g	0,3
Cloruros, meq/100g	0,32
Caliza activa, g/100g	13,5
Fósforo asimilable, mg/kg	25,9
Fósforo total, mg/kg	306,9
Nitrógeno total Kjendahl, g/100g	0,10
Nitratos por reducción, mg/kg	62,9
Potasio asimilable, meq/100g	0,73
Potasio total, g/100g	0,75
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> ), meq/100g	0,3
Arena gruesa (2-0,25 mm), g/100g	3,9
Arena fina (0,25-0,05 mm), g/100g	51,1
Limo (0,05-0,002 mm), g/100g	30,1
Arcilla (<0,002 mm), g/100g	14,4
Textura (USDA)	Franco arenosa (Textura gruesa)

De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, la dosis de enmienda orgánica empleada fue en todos los casos de 180 t ha<sup>-1</sup>. Todos los tratamientos se prepararon por triplicado.

Se prepararon 500 g de suelo tamizado que se mezclaron homogéneamente con las enmiendas orgánicas (biosólido compostado y sin compostar) y el lodo de refinera, para obtener los respectivos tratamientos descritos anteriormente, los cuales se pusieron en contenedores de vidrio y se colocaron en una cámara de incubación a una temperatura constante de 24 °C durante 6 meses. La humedad de los suelos se mantuvo entre el 50-60% de su capacidad de retención hídrica, adicionando agua siempre que fue necesario. Los suelos se airearon, mediante volteos quincenales, para mantener unos niveles óptimos de oxígeno en los mismos.

Los suelos se muestrearon mensualmente, determinándose en ellos el contenido de hidrocarburos totales, la actividad microbiana (desprendimiento de CO<sub>2</sub>), parámetros físico-químicos, químicos y bioquímicos (conductividad eléctrica, pH, carbono orgánico total, nitrógeno kjeldahl, potasio y fósforo total, metales pesados y actividades enzimáticas).. La caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana se realizó mediante técnicas moleculares independientes de cultivo, en 2 pasos. En primer lugar, los amplicones derivados de la amplificación (mediante PCR) del gen 16S ARNr a partir del ADN total extraído de las muestras de suelo, fueron separados y diferenciados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturante químico (DGGE). Esta técnica permitió observar la existencia de cambios básicos en la

estructura de la comunidad bacteriana. En un segundo paso, se construyeron librerías de clones del gen 16S ARNr en *Escherichia coli* y posteriormente se secuenció el ADN. Esta metodología permitió obtener una información mucho más detallada de la composición y diversidad de la comunidad bacteriana.

**Tabla II.2.-** Características del lodo de refinería utilizado en los ensayos de microcosmos

PARÁMETRO	Lodo A	MÉTODO
pH (1:5, lodo:agua)	7,80	pH metro
Conduct. Eléctrica (dS/m) (1:5)	1,83	Conductímetro
Carbono Orgánico Total (g/Kg)	206	Analizador elemental
Cloruros (g/kg)	3,9	Extr.acuosa (det. HPLC)
Sulfatos (g/kg)	22,0	Extr.acuosa (det. HPLC)
Nitritos (mg/kg)	3,75	Det. por HPLC
Fenoles (mg/kg)	356	Método espectrofotométrico
Amonio (mg/kg)	22,15	Extr. KCl (Electr. Selectivo)
Disolventes clorados (mg/kg)	<0,2	Extr. Orgánica (det. CG)
Arsénico (mg/kg)	6,4	Digestión húmeda (AA)
Plomo (mg/kg)	145,6	Digestión húmeda (AA)
Mercurio (mg/kg)	<2	Digestión húmeda (AA)
Cadmio (mg/kg)	<1	Digestión húmeda (AA)
Niquel (mg/kg)	381	Digestión húmeda (AA)
Zinc (mg/kg)	521	Digestión húmeda (AA)
Cobre (mg/kg)	133,8	Digestión húmeda (AA)
Cromo (mg/kg)	93,2	Digestión húmeda (AA)
Hidrocarburos totales (g/kg)	178	Extr. Con Soxhlet

El perfil fisiológico de las comunidades microbianas para la utilización de diversas fuentes de C se realizó por medio de la metodología BIOLOG-CLPPs, que nos permite diferenciar los tipos de bacterias presentes en el suelo en función de su capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono.

### **Evolución del contenido de hidrocarburos**

Cuando la concentración de hidrocarburos es alta puede ocurrir que se produzca inhibición del desarrollo microbiano (disminuya su capacidad de metabolización) o si es excesivamente alta que intoxique a los microorganismos y estos mueran (LaGrega *et al.*, 1996); esto ocurre con valores de concentración en el suelo superiores al 30% por lo que en este ensayo, donde la concentración inicial del contaminante es del 5%, no debemos tener problemas en este sentido.

En la Tabla II.3 se observa como el porcentaje de degradación de hidrocarburos aumentaba a lo largo del tiempo en todos los tratamientos, y cómo esta degradación era mayor en los suelos a los se les había

adicionado una enmienda orgánica antes de iniciar el proceso de landfarming. Entre las dos enmiendas utilizadas, el biosólido granulado era el que proporcionaba una mayor tasa de degradación.

**Tabla II.3.-** Porcentaje de degradación de hidrocarburos en los diferentes tratamientos en función del tiempo de biorremediación

Tratamiento	% degradación hidrocarburos			
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses
Sin enmienda	0 A	26,07 aB	39,33 aC	46,20 aD
Biosólido granulado		33,80 cB	46,70 cC	51,87 cD
Compost		32,93 bB	46,00 bC	49,47 bD

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ )

En todos los tratamientos se observó una disminución del contenido de hidrocarburos, lo cual pone de relieve la eficacia, al nivel de microcosmos, del empleo de la aireación y adición de biosólidos (que promueven la actividad de los microorganismos degradadores de estos hidrocarburos) como técnica de biorremediación de suelos con hidrocarburos. Esto implica *a priori* que la técnica de landfarming a escala de campo, en la que se apliquen estos tratamientos sería factible. No obstante, según Vecchioli *et al.* (2000), debemos ser cautelosos en esta afirmación, puesto que existen numerosos factores, que en campo no controlamos y de los que depende el éxito de la biorremediación. La biodegradación de los hidrocarburos es un proceso natural limitado por el pH, los nutrientes, la aireación y humedad del suelo (Leahy and Colwell, 1990). La reducción del efecto negativo de los hidrocarburos en el suelo puede no ser debida únicamente a la biodegradación, sino también a su adsorción en compuestos orgánicos y a otros factores abióticos (Marín *et al.*, 2005).

La degradación de hidrocarburos era mayor en los suelos enmendados que en los suelos sin enmendar (Tabla II.3), siendo las diferencias estadísticamente significativas, aunque no tan acusadas como cabría esperar. El tratamiento con la adición de biosólido granulado era el que producía una mayor disminución de la concentración de hidrocarburos pasando ésta de un 5% inicial, a un 2,4 %. Según se indica en el trabajo de García *et al.* (2012), la disponibilidad del contaminante para los microorganismos del suelo juega un papel fundamental para su biodegradación; esta biodisponibilidad puede verse afectada por algunas propiedades del suelo como su textura o el contenido y características de su materia orgánica. Amellal *et al.* (2001), indicaron que la biodegradación de los hidrocarburos en el suelo no depende únicamente de la presencia de microorganismos degradadores y de nutrientes, sino que también puede verse afectada por la inmovilización de estos hidrocarburos en los agregados del suelo y en la materia orgánica. Esta inmovilización podría ser mayor en los suelos enmendados debido al aporte adicional de materia orgánica que la enmienda conlleva y será mayor cuando esta materia orgánica esté estabilizada, como es el caso del compost de biosólido. Esto podría explicar la menor biodisponibilidad y por tanto, la menor degradación de hidrocarburos observada en el tratamiento con compost en comparación con el tratamiento con biosólido sin

compostar, y el que las diferencias entre los suelos enmendados y sin enmendar, aún siendo estadísticamente significativas, no sean tan notorias como era de esperar.

Sin embargo, se observaba una mayor diferencia, en relación al porcentaje de degradación de hidrocarburos, entre el suelo sin enmendar y el enmendado con compost que entre los suelos enmendados con uno u otro tipo de enmienda (biosólido granulado y compostado). Por otro lado, la accesibilidad a los hidrocarburos más recalcitrantes y difíciles de degradar, se mejora considerablemente con tratamientos que incrementen la desintegración de estos agregados como es el caso del tratamiento de landfarming aplicado (aireación mediante volteo del suelo). Este tratamiento aporta aireación al suelo, lo que favorece la difusión del oxígeno que será requerido para llevar a cabo la oxidación enzimática de las moléculas complejas de hidrocarburo (Cerniglia, 1992), y son estas condiciones aeróbicas las que favorecen la degradación de los hidrocarburos del suelo, permitiendo el éxito de estas técnicas de biorremediación (Castro *et al.*, 2012).

El ajuste de la evolución de la degradación de los hidrocarburos en el suelo a un modelo matemático no resulta sencillo debido a la naturaleza compleja de cada componente de los sistemas estudiados: hidrocarburos y suelo.

La expresión matemática que mejor explicaría la evolución con el tiempo del % de degradación de hidrocarburos observado en nuestro experimento, es la propuesta por Vecchioli (1998), reflejada por la siguiente ecuación:

$$C_t = a \cdot e^{-k_1 t} + b,$$

donde,  $C_t$ , representa la concentración final de los hidrocarburos totales;  $a$ , representa la concentración de hidrocarburos totales al inicio de la primera fase cuya velocidad de degradación depende del aporte de oxígeno y nutrientes;  $b$ , representa la concentración de hidrocarburos totales al inicio de la segunda fase, cuya velocidad de degradación depende de la desorción de constituyentes desde la matriz del suelo.

En este modelo cinético propuesto por Vecchioli para expresar la cinética de degradación de los hidrocarburos se diferencian claramente dos fases, una inicial en la que se aprecia una degradación más rápida del hidrocarburo, seguida de una segunda fase en la que la degradación se realiza de manera paulatina. Esto es debido a que al inicio de la incubación se encuentran en el medio los compuestos más fáciles de degradar, y a medida que estos desaparecen quedan los más recalcitrantes. En la Tabla II.3, se observa claramente esta cinética en dos fases, donde el mayor porcentaje de degradación se observa durante los 4 primeros meses, pasando de 0 a 39-46,7% dependiendo del tratamiento, y en la segunda fase (a los 6 meses) el porcentaje de degradación que se alcanza es 46,2-51,9% dependiendo del tipo de tratamiento, siendo la variación de este porcentaje con respecto al alcanzado a los cuatro meses, muy pequeña. Un modelo cinético en dos etapas es justificable, teniendo en cuenta que este contaminante es una mezcla compleja de hidrocarburos de diferente tipo y que la determinación de los hidrocarburos

extraíbles con cloroformo utilizada para medir el nivel de hidrocarburos totales, no es un método selectivo ya que incluye tanto compuestos fácilmente degradables, como compuestos de degradación lenta y recalcitrantes (Vecchioli *et al.*, 2000).

## Evolución de las características del suelo durante la biorremediación

### Características físico químicas

Todos los suelos, independientemente del tratamiento al que estuvieran sometidos mostraban valores de *pH* neutros o ligeramente básicos (entre 7,30 y 8,80) (Tabla II.4), sin que en ningún caso estos valores de *pH* representen un inconveniente para el desarrollo y la actividad de las poblaciones microbianas del suelo necesarias para que el proceso de biorremediación transcurra con normalidad.

**Tabla II.4.-** Evolución del *pH* y conductividad eléctrica en los diferentes tratamientos durante el proceso de biorremediación

Tratamiento	<i>pH</i>			
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses
Suelo	8,83 cF	8,59 bF	8,58 bF	8,49 aF
Suelo+Biosólido	8,24 cD	7,70 aD	7,75 bD	7,78 bD
Suelo+Compost	8,47 bE	8,32 aE	8,25 aE	8,25 aE
S+HC	7,68 bC	7,37 aC	7,55 bC	7,66 bC
S+HC+Biosólido	7,50 cB	7,29 aA	7,43 bA	7,54 cA
S+HC+Compost	7,49 bA	7,30 aB	7,54 bB	7,64 cB
Tratamiento	Conductividad Eléctrica,(dS/m)			
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses
Suelo	0,136 aA	0,220 bA	0,228 cA	0,257 dA
Suelo+Biosólido	0,515 aC	1,358 cC	1,271 bC	1,368 dC
Suelo+Compost	0,291 aB	0,399 bB	0,431 cB	0,481 dB
S+HC	2,4 aD	2,7 dD	2,6 cD	2,5 dD
S+HC+Biosólido	2,7 aF	2,9 dF	2,9 cF	2,8 dF
S+HC+Compost	2,6 aE	2,8 cE	2,7 dC	2,6 aE

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ )

En cuanto a la *conductividad eléctrica* (CE), se apreciaron diferencias considerables entre los suelos con hidrocarburos y el suelo control, presentando los primeros valores de CE muy superiores al del control (Tabla II.4). Esto es debido a la salinidad que aportan los lodos de refinera a los suelos, que hace que presenten valores de CE por encima de los 2 dS m<sup>-1</sup>, lo que podría suponer algún problema para la instauración de vegetación sensible a la salinidad (Bastida, 2008). También se observó un aumento de la CE en los suelos con enmiendas orgánicas, puesto que la mineralización de estos materiales puede causar la acumulación de sales solubles, las cuales pueden afectar a la solubilidad de los hidrocarburos (Ward and Brock, 1978), e inhibir la capacidad de degradación de la microflora autóctona del suelo (Kästner *et al.*,



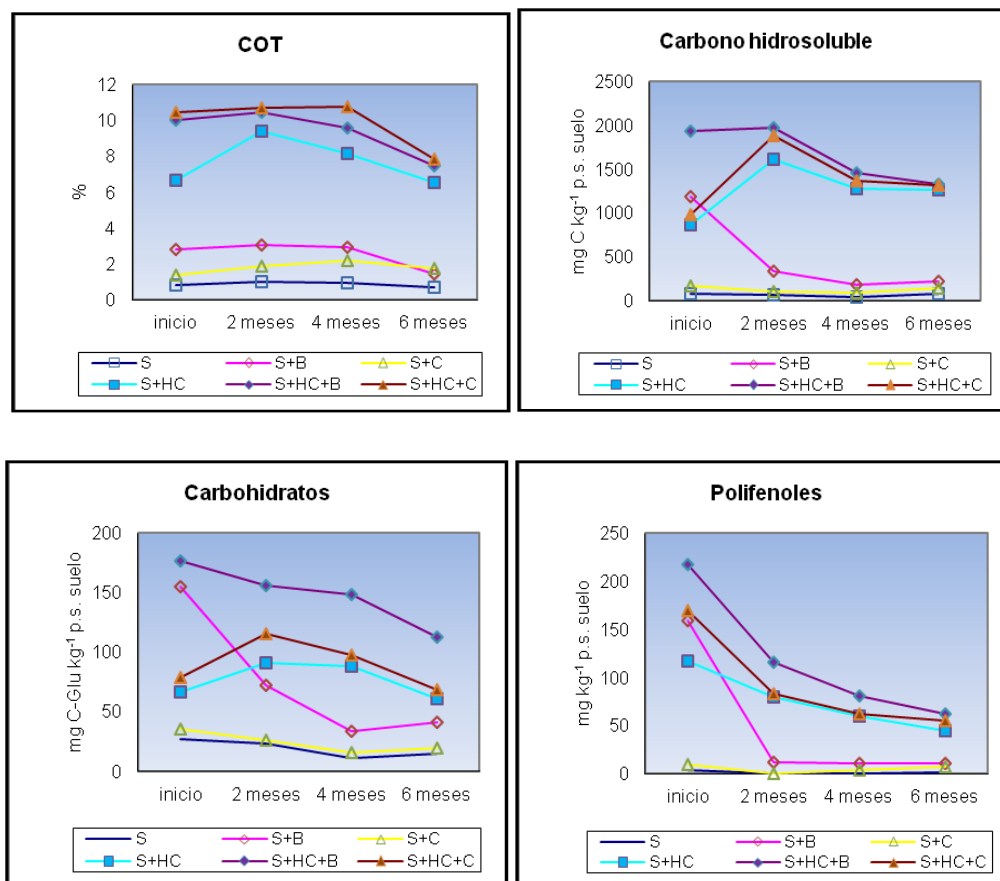
1998; Hamdi *et al.*, 2007). Además, no se debe olvidar que dichas enmiendas poseen un alto contenido en sales (Tabla I.2).

### Evolución del Carbono y sus fracciones

El *carbono orgánico total* (COT), íntimamente relacionado con la materia orgánica (Stevenson, 1982), es un parámetro de gran importancia para la fertilidad y productividad de los suelos. Este COT está sometido constantemente a procesos de mineralización (pérdida de carbono como CO<sub>2</sub>) y humificación (Bastida, 2008). Como puede observarse en la Figura II.1, la presencia de hidrocarburos, supone la entrada en los suelos de una considerable cantidad de COT, presentando los suelos con hidrocarburos mayores contenidos de COT que los suelos que no habían recibido aporte de hidrocarburos, tanto al inicio como al final del proceso de biorremediación. Además, entre los suelos con hidrocarburos, los enmendados con biosólidos (granulado o compostado) presentaban una concentración de carbono orgánico significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la del suelo sin enmendar a lo largo de todo el periodo experimental (Figura II.1 y Tabla A.1 del Anexo). Estas diferencias entre suelos enmendados y sin enmendar se observaban asimismo, en los suelos que no contenían hidrocarburos, donde eran también los suelos enmendados los que mostraban una concentración de COT significativamente mayor. Esto demuestra que las enmiendas orgánicas incrementan a corto plazo el contenido de carbono en el suelo. Estos contenidos de COT tendían a disminuir con el tiempo, debido a la degradación de los hidrocarburos y de los compuestos orgánicos carbonados fácilmente mineralizables aportados por las enmiendas orgánicas. Cabe destacar que tanto en los suelos con hidrocarburos como en los suelos sin ellos, la enmienda con compost daba lugar a contenidos de COT en el suelo al final de la incubación superiores a los de los suelos enmendados con biosólido granulado. Esto es atribuible a la mayor estabilidad de la materia orgánica presente en el compost, que determina un mayor incremento de carbono del suelo debido a que hay menor pérdida de materia orgánica por procesos de mineralización.

El COT, engloba todas las formas de C presentes en el suelo susceptibles de ser oxidadas, sin embargo, son más reactivas aquellas más lábiles que vienen reflejadas en el *carbono hidrosoluble* (C<sub>hidr</sub>). En relación a este parámetro se observa (Figura II.1) una clara diferencia entre los suelos con y sin incorporación de lodos de refinería, debido a la naturaleza del lodo de refinería, que proporciona moléculas orgánicas hidrosolubles al suelo. Al inicio de la incubación, los suelos con aporte de biosólido granulado presentaban concentraciones de C<sub>hidr</sub> significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a las de los suelos sin enmendar o con aporte de compost, tanto en los suelos con hidrocarburos como en los que no habían recibido aporte de hidrocarburos (Figura II.1). Este hecho es debido, sin duda, a la mayor fracción de C<sub>hidr</sub> existente en el lodo granulado que en el compost. Hay que destacar, asimismo, la rápida biodegradación del C<sub>hidr</sub> en el tratamiento del suelo sin hidrocarburos y enmendado con biosólido granulado, lo cual indica que dicha fracción de C<sub>hidr</sub>, aportada inicialmente con la enmienda, está compuesta de moléculas de C muy lábiles y

con una alta dinámica de degradación (Campbell y Zenyner, 1993). Así, el contenido de  $C_{\text{hidr}}$  en este suelo pasa a ser después de cuatro meses de incubación muy similar al del suelo enmendado con compost (S+C).



**Figura II.1.** Evolución del contenido de C orgánico total (COT), y de las diferentes fracciones de C hidrosoluble en los diferentes tratamientos en estudio durante el experimento de incubación. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.1 del Anexo

Si bien esta fracción de C disminuye con el tiempo debido a que es una fracción fácilmente degradable por los microorganismos, al final del proceso de biorremediación seguían observándose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), en relación al contenido de  $C_{\text{hidr}}$ , entre los suelos enmendados y los no enmendados, tanto en los suelos con hidrocarburos como en los que no contenían hidrocarburos (Figura II.1).

En cuanto al contenido de *carbohidratos*, que al igual que los *polifenoles* forman parte de la fracción de  $C_{\text{hidr}}$ , tendía a disminuir con el tiempo en todos los casos, si bien, los valores finales variaban considerablemente en cada tratamiento. El suelo con hidrocarburos y con aporte de biosólido granulado (S+HC+B), era el tratamiento que mostraba el mayor contenido de carbohidratos al final de la incubación, diferenciándose significativamente ( $p < 0,05$ ) del resto de tratamientos, seguido del suelo con hidrocarburos y con aporte de compost (S+HC+C), y del suelo con hidrocarburos y sin enmienda (S+HC), sin que existiesen diferencias

significativas entre estos últimos (Figura II.1). Se pueden agrupar por un lado, los suelos sin hidrocarburos, observándose sólo diferencias significativas entre el suelo con biosólido (S+B), con mayor contenido de carbohidratos, y los otros dos tratamientos (S y S+C), y por otro lado, los suelos con hidrocarburos, en los que los suelos enmendados presentaban a lo largo de todo el proceso de biorremediación contenidos de carbohidratos significativamente ( $p < 0,05$ ) superiores a los del suelo sin enmendar

Independientemente de esto, en los suelos, con y sin hidrocarburos, enmendados con biosólido, se observó claramente una disminución rápida de las fracciones más lábiles del carbono ( $C_{\text{hidr}}$ , carbohidratos y polifenoles) lo que vuelve a poner de manifiesto el mayor contenido del biosólido en carbono fácilmente degradable que supone una fuente de energía inmediata para los microorganismos del suelo, y sus variaciones constituyen el reflejo de la acción microbiana potencial del suelo (García *et al.*, 2002).

Los compuestos polifenólicos hidrosolubles también son considerados como una fracción lábil del carbono. Estos compuestos mostraron en todos los casos una fuerte disminución en los dos primeros meses (Figura II.1), estabilizándose después, con una leve disminución, hasta el final de la incubación.

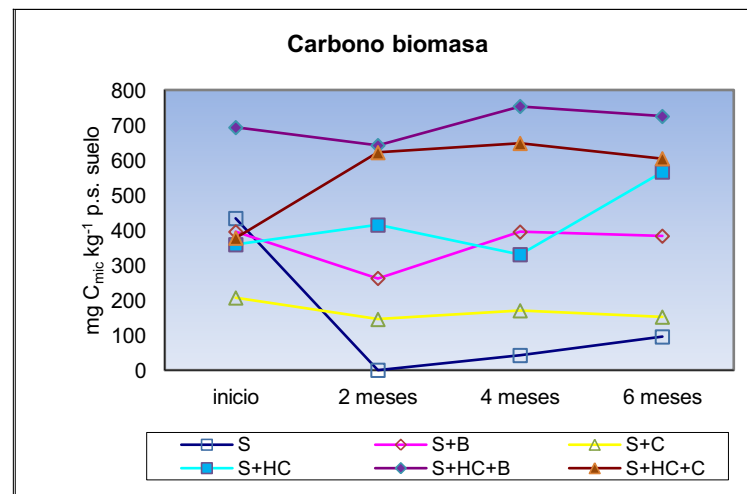
Los suelos con hidrocarburos presentaron, en general, concentraciones de polifenoles significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a las de los suelos sin hidrocarburos, siendo en todos los casos los contenidos de polifenoles de los suelos enmendados significativamente superiores a los de los suelos sin enmendar (Figura II.1). Los polifenoles son los compuestos más resistentes a la biodegradación de todos los compuestos de la fracción de  $C_{\text{hidr}}$  (Marín, 2004), puesto que son moléculas con estructuras más complejas. Este hecho no debe considerarse como positivo, ya que algunos estudios (Concawe, 1980), demuestran que elevadas concentraciones de estos compuestos en el suelo, pueden afectar negativamente a las poblaciones microbianas capaces de degradar los hidrocarburos, así como al crecimiento de las plantas. La concentración de polifenoles mostró en todos los tratamientos una clara tendencia a disminuir con el tiempo de incubación.

### Bioindicadores de la calidad microbiológica del suelo

#### *Biomasa microbiana*

El *carbono de la biomasa microbiana* ( $C_{\text{mic}}$ ) ha demostrado ser un indicador sensible a cambios en el manejo del suelo, contaminación, cobertura vegetal, adición de enmiendas, etc, (Liao y Xiao, 2007), si bien no debemos considerarlo como un indicador de la actividad microbiana por sí mismo, ya que su medida engloba tanto el “tamaño” de las poblaciones microbianas que se encuentran activas, como a aquellas que permanecen en estado latente. Todos los tratamientos ensayados mostraron valores finales de  $C_{\text{mic}}$ , superiores a los del suelo control (Figura II.2), presentando los suelos enmendados valores de  $C_{\text{mic}}$

superiores a los de los suelos no enmendados. Bastida (2008), observó también un incremento en el contenido de  $C_{mic}$  con la adición de enmiendas a un suelo degradado.



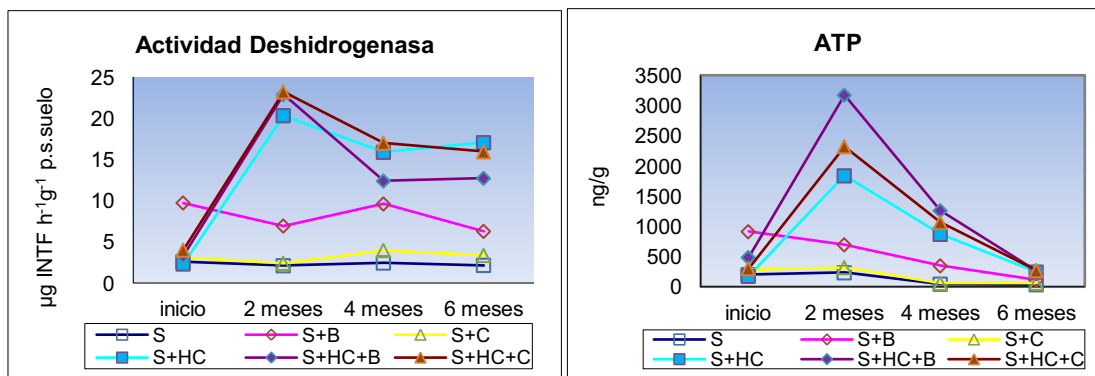
**Figura II.2.-** Evolución del contenido de C de biomasa microbiana en los diferentes tratamientos durante el proceso de biorremediación. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.2 del Anexo

Los hidrocarburos actúan como una fuente carbonada para los microorganismos, lo que junto con las condiciones óptimas (oxigenación y humedad) para la degradación de los hidrocarburos que se han establecido durante la incubación, favorece considerablemente el desarrollo de la biomasa microbiana del suelo, lo cual, ha sido también observado por Raymond *et al.* (1980) y Marín (2005). Por este motivo, los suelos con hidrocarburos y adición de enmienda orgánica (biosólido granulado o compost) presentaban valores de  $C_{mic}$  significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los del respectivo tratamiento sin enmienda orgánica (Figura II.2). Los suelos con hidrocarburos y con aporte de enmienda orgánica eran los que mostraban mayores valores de  $C_{mic}$ , en particular, el tratamiento con biosólido granulado, con valores significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los del suelo tratado con compost. Esto puede ser debido, como ya hemos comentado con anterioridad, al aporte directo de microorganismos presentes en el biosólido, junto con una materia orgánica poco estabilizada y fácil de degradar por estos microorganismos, lo que incrementa su metabolismo, y en consecuencia, el tamaño de sus poblaciones.

#### Actividad microbiana global

Las enzimas *deshidrogenasas* son enzimas exclusivamente intracelulares presentes en la mayoría de los organismos, y su actividad, medida en el suelo, constituye un indicador del potencial oxidativo de la materia orgánica del mismo (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Gianfreda *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2007). Li *et al.* (2001) observaron en suelos de arrozales una correlación positiva entre la actividad deshidrogenasa y el nivel de contaminación de petróleo, lo que coincide con lo observado en nuestro ensayo, donde la actividad deshidrogenasa aumentaba al inicio del proceso de biorremediación en los suelos que contenían

hidrocarburos (Figura II.3). A lo largo del periodo experimental esta actividad iba disminuyendo hasta estabilizarse hacia el final del proceso de biorremediación (6 meses).



**Figura II.3.-** Evolución de la actividad deshidrogenasa ( $\mu\text{g INTF/g}$  de suelo hora) y del contenido de ATP ( $\text{ng/g}$  suelo) en los diferentes tratamientos durante el proceso de biorremediación. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.3 del Anexo

La actividad deshidrogenasa es un enzima muy importante en el mecanismo de degradación de los hidrocarburos, puesto que la oxidación biológica de compuestos orgánicos se realiza generalmente mediante procesos de deshidrogenación llevados a cabo por estas enzimas (Marín, 2004). Esta actividad es un parámetro indicador de la actividad microbiológica del suelo, siendo un término general, que incluye las reacciones metabólicas y la interacción entre la microflora y la microfauna en el suelo (Nannipieri *et al.*, 1996). Porello, se observa que los suelos con hidrocarburos y con adición de enmiendas orgánicas presentaban mayores valores de actividad al inicio del ensayo (Figura II.3), motivado por el aporte tanto de fuentes de carbono como de microorganismos exógenos. Los microorganismos del suelo que sobreviven a la presencia en el suelo de hidrocarburos derivados del petróleo y están capacitados para usar esta fuente de C, intervendrán también en su degradación, Por todo ello, el incremento observado en la actividad deshidrogenasa será proporcional al potencial de degradación de las moléculas de hidrocarburo presentes en el suelo. Así, se observa una tendencia similar de la actividad deshidrogenasa y del porcentaje de degradación de los hidrocarburos, que como vimos con anterioridad, sigue una pauta de evolución en dos fases: una inicial rápida, seguida de otra más paulatina.

El *adenosin trifosfato* (ATP) es un constituyente particular que se encuentra en el interior de las células de los microorganismos como una molécula energética, por lo que su medida dará una idea exacta del conjunto de células microbianas vivas y metabólicamente activas que existen en el ecosistema edáfico (Quevedo-Dioses, 2005). Según Jenkinson (1988), el contenido de ATP de un suelo es un índice de biomasa microbiana si las muestras son pre-incubadas bajo condiciones controladas durante 7-10 días antes de su determinación. Por otra parte, Eiland (1985) y Nannipieri *et al.* (1990), han indicado que el contenido de ATP determinado inmediatamente después de muestrear un suelo, a la temperatura ambiente de dicho suelo y

con su humedad, tal y como se ha llevado a cabo en el trabajo experimental de esta Memoria, representa únicamente la actividad microbiana o el estatus metabólico de los microorganismos del suelo en dichas condiciones. Por todo ello, esta medida junto con la de la respiración del suelo y la actividad deshidrogenasa nos darán una idea fiable del estatus metabólico de los microorganismos del suelo en función del tratamiento de biorremediación aplicado.

Los suelos con hidrocarburos, independientemente de la adición o no de enmienda orgánica, mostraron un incremento del contenido de ATP durante los primeros 2 meses del proceso de biorremediación (Figura II.3), debido al aporte de fuentes de carbono y, en su caso, de microorganismos presentes en las enmiendas aplicadas. Este comportamiento del contenido de ATP era paralelo a la fuerte degradación inicial de hidrocarburos observada y que evidencia, sin duda, la utilización de estos compuestos como sustratos para la obtención de energía metabólica. Una vez superada esta primera fase, con este pico de ATP a los dos meses, los valores de ATP iban disminuyendo, más bruscamente al principio y más paulatinamente a continuación, de modo que al final del periodo de incubación los valores de ATP tendían a igualarse en todos los suelos ensayados.

A lo largo de la incubación se observaron dos patrones diferentes de comportamiento, agrupándose por un lado los suelos sin aporte de hidrocarburos y por otro, los suelos con hidrocarburo siendo los niveles de ATP en los suelos con hidrocarburos significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los de los suelos sin hidrocarburos, los cuales mostraron una disminución gradual del contenido de ATP a lo largo del periodo de incubación (Figura II.3).

El significativo ( $p < 0,05$ ) incremento inicial en el contenido de ATP que se observa en los suelos con hidrocarburos, independientemente del aporte o no de enmienda orgánica, indica que estos hidrocarburos sirven de fuente carbonada a los microorganismos, estimulándose por tanto su actividad, lo que se traducirá en una disminución en el contenido de hidrocarburos.

En general, se observó un patrón de comportamiento muy similar entre la actividad deshidrogenasa y el contenido de ATP en todos los tratamientos (Figura II.3), lo cual es lógico ya que ambos parámetros son indicadores de la actividad microbiana existente en el suelo. Además, ambas moléculas son clave en el proceso metabólico de la fosforilación oxidativa que ocurre a nivel intracelular, principalmente durante la respiración de los microorganismos heterótrofos.

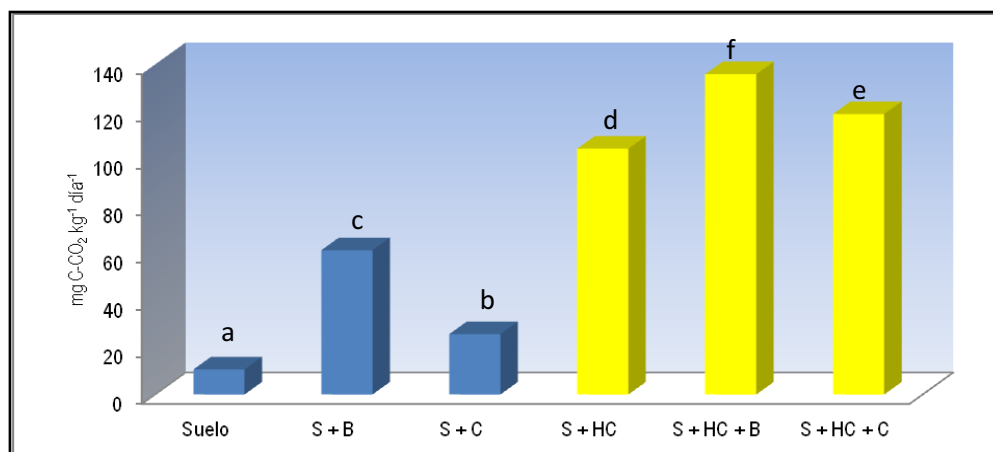
La *respiración microbiana del suelo* es también un fiel reflejo de la actividad microbiana del mismo. Dicho proceso refleja la potencial actividad biológica oxidativa sobre las materia orgánica del suelo, y se pone de manifiesto a través del desprendimiento de  $\text{CO}_2$  o el consumo de  $\text{O}_2$  por parte del metabolismo de los microorganismos existentes en el suelo, siendo así un parámetro ampliamente utilizado para medir el estado microbiológico general del suelo (Quevedo-Dioses, 2005; Bastida, 2008). Por todo ello, la respiración del suelo es una medida de la actividad metabólica de los microorganismos heterótrofos del suelo encargados

de degradar y mineralizar la materia orgánica presente en el mismo (Nannipieri *et al.*, 1990). Anderson (1982) define la respiración microbiana como el consumo de oxígeno o desprendimiento de CO<sub>2</sub> por bacterias, hongos, algas y protozoos, incluyendo el intercambio de gases, por el metabolismo de organismos tanto aeróbicos como anaeróbicos. La respiración ha demostrado ser un indicador sensible a cambios en el manejo del suelo, cobertura vegetal, enmiendas orgánicas, contaminación, etc. (García *et al.*, 2000; Caravaca y Roldán, 2003; Ros *et al.*, 2005; Liao y Xiao, 2007; Bastida, 2008)

Este parámetro proporciona una medida de la descomposición del carbono orgánico del suelo llevada a cabo por los microorganismos activos (Torstensson, 1997). No todos los sustratos orgánicos son utilizados por el conjunto de microorganismos del suelo como fuente energética, sino que un sustrato de carbono específico será degradado sólo por ciertas poblaciones de dicha comunidad microbiana (Anderson and Domsch, 1978, Torstensson, 1997). Así, es sabido que la medida de respiración del suelo, será diferente en función del tipo de compuesto hidrocarbonado presente en el suelo (Shi *et al.*, 2002, 2005).

Existe una gran controversia sobre las conclusiones a que se puede llegar después de analizar los valores de respiración microbiana de un suelo con hidrocarburo, ya que este parámetro no sigue una pauta fija de comportamiento en todos los ambientes. Así, encontramos trabajos como el de Dawson *et al.* (2007) en los que se observa una correlación negativa entre la actividad microbiana y la cantidad de hidrocarburos encontrados en el suelo, presentando los suelos sin hidrocarburos una tasa de respiración basal significativamente más alta que los suelos que contenían hidrocarburos. Por el contrario, Brohon *et al.* (2001) observaron mayores valores de respiración basal en los suelos que contenían hidrocarburos, lo que sugiere que en este caso, este tipo de compuestos hidrocarbonados puede servir como fuente de energía a los microorganismos, estimulando a las poblaciones microbianas del suelo, que serán las encargadas de degradarlos con su actividad metabólica.

En nuestro caso, como puede observarse en la Figura II.4, los valores de respiración basal (expresados como mg C kg<sup>-1</sup> suelo día<sup>-1</sup>), obtenidos a partir de las muestras del inicio del proceso de biorremediación, en un ensayo de respiración de 93 días, eran significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) en los suelos con hidrocarburos que en los suelos sin aporte de hidrocarburos. Asimismo, los suelos con hidrocarburos y enmendados, eran los que mostraban los mayores valores de respiración microbiana, siendo dentro de éstos el suelo enmendado con biosólido granulado el que presentaba el mayor valor, lo cual es atribuible a la mayor cantidad de sustratos carbonados fácilmente biodegradables aportados por esta enmienda en comparación con el compost. Estos datos nos hacen pensar que los hidrocarburos existentes en el suelo son efectivamente utilizados como fuente energética por los microorganismos del suelo, ya que no resultan tóxicos para ellos, bien por el tipo de hidrocarburo, bien por la concentración del mismo.



**Figura II.4.-** Respiración basal de de los diferentes tratamientos durante un periodo de biorremediación de 93 días. Letras iguales indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ )

En la Figura II.5, se observan los valores de respiración acumulativa obtenidos a partir de las muestras del inicio del proceso de biorremediación en un ensayo de respiración (incubación) de 93 días. Como puede observarse, el perfil de las curvas acumulativas de desprendimiento de CO<sub>2</sub> sigue en todos los casos la cinética característica del proceso de mineralización en dos fases, mostrando una primera fase (Fase I) de degradación rápida de los compuestos carbonados, con una pendiente elevada, seguida por una segunda fase, de menor pendiente (Fase II), de desprendimiento de CO<sub>2</sub> más gradual, y que se corresponde con el agotamiento de los compuestos de carbono más fácilmente degradables y la degradación de aquellos más recalcitrantes, con una ralentización de la actividad microbiana. En este sentido, se aprecia una clara diferencia entre los suelos con hidrocarburos y los que no contienen hidrocarburos, mostrando los primeros, independientemente de la enmienda, una mayor duración de la Fase I.

Esto también se observa, si ajustamos los valores acumulativos de C-CO<sub>2</sub> de este ensayo de respiración a una ecuación matemática, la cual proporciona una información más certera sobre la cinética de mineralización del carbono, lo que permitirá una mayor comprensión de la cinética de descomposición de los materiales orgánicos del suelo (Marín, 2004).



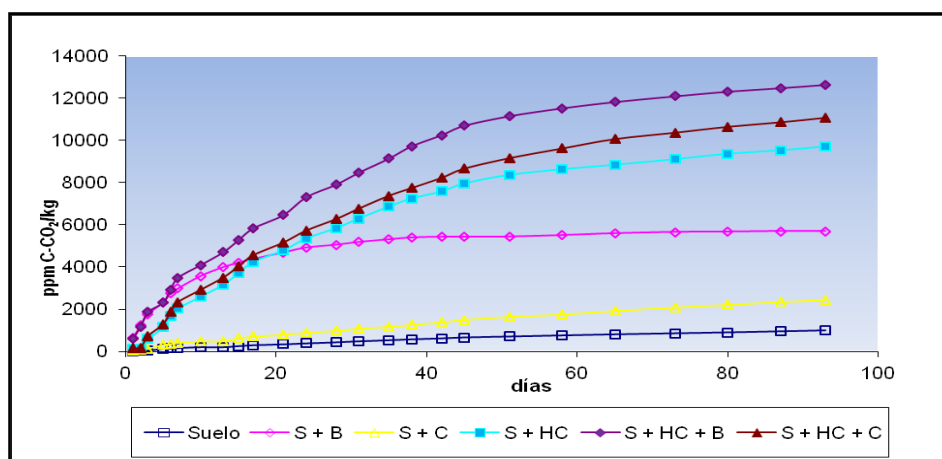


Figura II.5.- Respiración acumulativa de los diferentes tratamiento durante un periodo de incubación de 93 días

Existen muchos modelos matemáticos para el estudio de la cinética de mineralización de la materia orgánica (respiración) pero el modelo al que mejor se ajustan las curvas acumulativas de desprendimiento de CO<sub>2</sub> obtenidas, con un coeficiente de correlación entre 0,98 y 0,99 (Tabla II.5), es el modelo de ecuación de primer orden especial, dado por Jones (1984):

$$C=C_0 (1-e^{-kT}) + C_1,$$

donde

C es el carbono desprendido como C-CO<sub>2</sub>,

C<sub>0</sub> es el carbono que potencialmente puede ser mineralizado,

k representa la velocidad de descomposición y

C<sub>1</sub> representa la fracción de carbono que más fácil y rápidamente se mineraliza (Jones, 1984, Saviozzi et al., 1993).

Como se observa en la Tabla II.5, los datos tienen un óptimo ajuste al modelo no lineal de la ecuación de primer orden especial de Jones (1984) no existiendo diferencias notables entre los tratamientos ensayados.

Tabla II.5.- Coeficientes de correlación (r) del ajuste a la ecuación de Jones (1984), de los valores de desprendimiento de C-CO<sub>2</sub> de los distintos tratamientos.

Modelo: C=C <sub>0</sub> (1-e <sup>-kT</sup> ) + C <sub>1</sub>	S	S+B	S+C	S+HC	S+HC+B	S+HC+C
r	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99

El suelo con hidrocarburos tratado con biosólido granulado (S+HC+B) es el que mostraba mayor desprendimiento acumulativo de CO<sub>2</sub>, seguido, de mayor a menor, del suelo con hidrocarburos enmendado con compost (S+HC+C), suelo con hidrocarburos sin enmendar (S+HC), (S+B), (S+C) y por último el suelo

control sin hidrocarburos ni enmienda orgánica (S) (Figura II.5). Esto demuestra que tanto los hidrocarburos como la materia orgánica aportada a partir de las enmiendas son capaces de estimular a los microorganismos del suelo, que serán los encargados de biorremediar el mismo.

#### Actividades enzimáticas extracelulares (hidrolasas) del suelo

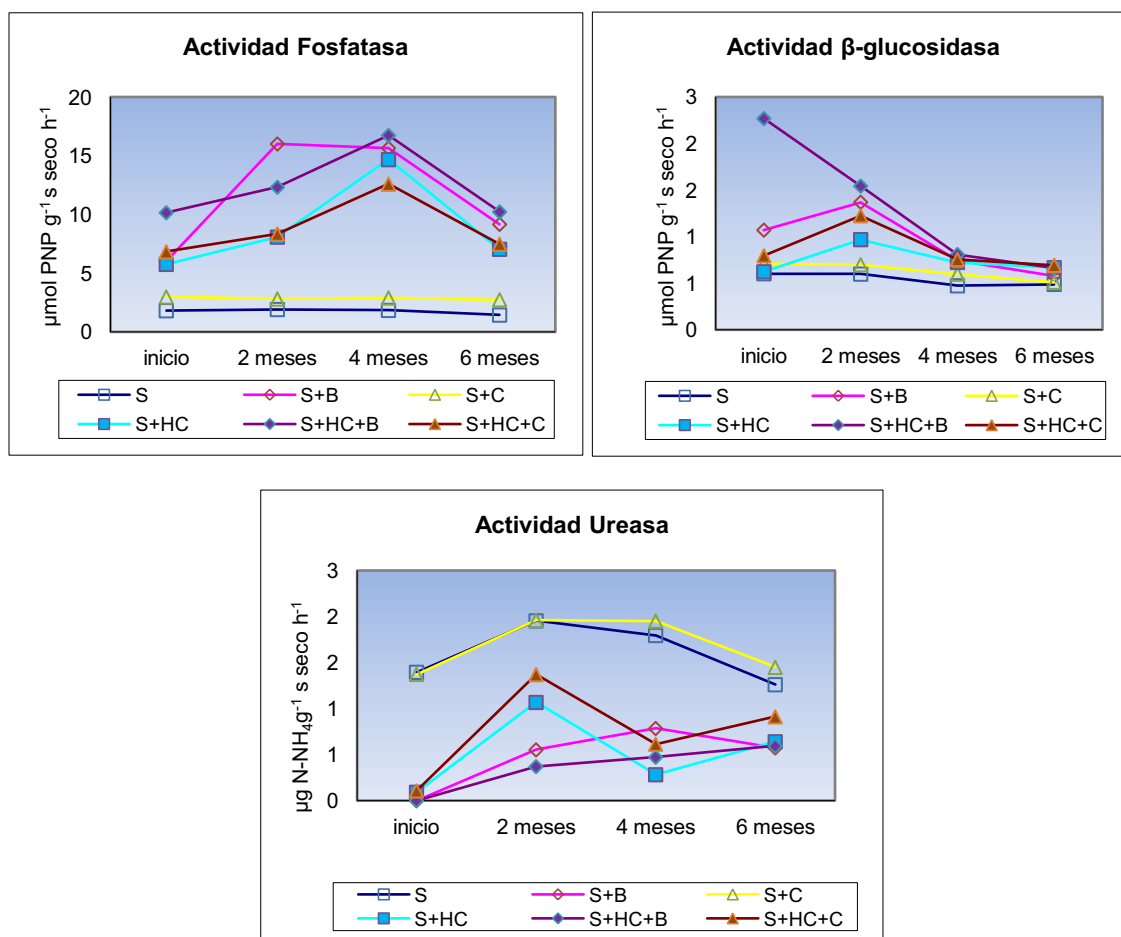
Las enzimas hidrolasas son catalizadoras biológicas de innumerables reacciones de hidrólisis que tienen lugar en el suelo, jugando un papel relevante en su funcionalidad (Burns, 1982) y aportando información sobre la capacidad potencial del suelo para llevar a cabo reacciones relacionadas con los ciclos de los nutrientes (Trasar-Cepeda *et al.*, 1998).

Algunas de estas hidrolasas forman parte indispensable del ciclo de nutrientes como el fósforo (*fosfatasas*), nitrógeno (*ureasa*) o carbono ( *$\beta$ -glucosidasa*), tratándose de enzimas extracelulares. Así, la actividad  $\beta$ -glucosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -glucosídicos de los productos de degradación de la celulosa por las celobiosas, obteniéndose glucosa. El producto de esta hidrólisis (glucosa) constituye una importante fuente de energía para el metabolismo microbiano (Tabatabai, 1982; Eivazi y Tabatabai, 1990). La ureasa es una enzima presente en muchas plantas superiores y en numerosos microorganismos, en particular en bacterias. La ureasa cataliza la hidrólisis de compuestos orgánicos tipo urea, obteniéndose como productos de la reacción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , estando por tanto considerada como una enzima clave en el ciclo del nitrógeno. El mecanismo de reacción se basa en la formación de una molécula de carbamato como producto intermedio, dado como producto final de la reacción  $\text{CO}_2$  y amoníaco (Tabatabai, 1982). Con respecto al ciclo de fósforo es clave la actividad fosfatasa, que designa la actividad de un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres o anhídridos del ácido fosfórico (Eivazi y Tabatabai, 1997; Speir y Ross, 1978).

La actividad de estas enzimas ha sido analizada en los suelos sometidos a los diferentes tipos de tratamientos de biorremediación en estudio. Taylor *et al.* (2002) mencionan dos razones para la medida de las actividades enzimáticas. En primer lugar, las actividades enzimáticas informan de la diversidad de procesos bioquímicos que puede tener lugar en el suelo. En segundo lugar, como indicadores de la calidad del suelo, las actividades enzimáticas pueden informar sobre el progreso de la degradación o recuperación de un suelo.

La actividad fosfatasa (Figura II.6) de todos los tratamientos excepto en el suelo control (S) y el control enmendado con compost (S+C), aumentaba durante los primeros meses de tratamiento alcanzando el valor máximo a los 4 meses, a partir de este pico, disminuía hasta llegar, al final de la biorremediación, a unos valores similares a los iniciales. El suelo con hidrocarburos enmendado con biosólido granulado (S+HC+B) presentaba valores de actividad fosfatasa más elevados y significativamente distintos a los del resto de tratamientos. Hay que indicar que los lodos de depuración de aguas residuales (biosólidos) se caracterizan

por una cierta concentración de compuestos orgánicos fosforados derivados de detergentes u otros productos orgánicos de síntesis que se vierten a los cauces o al alcantarillado. Estos compuestos orgánicos fosforados pueden funcionar como sustratos de esta enzima.



**Figura II.6.-** Evolución de la actividad fosfatasa, β-glucosidasa y ureasa en los diferentes tratamientos durante el proceso de biorremediación. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.4 del Anexo

Como puede observarse en la Figura II.6, los suelos con hidrocarburos presentaban a lo largo del proceso de biorremediación valores de actividad fosfatasa significativamente mayores que los del suelo sin hidrocarburos, lo que sugiere la presencia también en el lodo de refinería de compuestos fosforados que pueden actuar como sustratos de esta enzima. La excepción era el suelo sin hidrocarburos con adición de biosólido (S+B) que presentaba también valores significativamente más altos con respecto al control y al suelo sin hidrocarburos enmendado con compost (S y S+C). Este hecho puede ser debido al mayor contenido de compuestos fosforados que aporta el biosólido granulado en comparación con el compost. Independientemente de la presencia o no de hidrocarburos, los suelos enmendados mostraban mayor actividad fosfatasa que los suelos sin enmendar, observándose los mayores valores de actividad en el suelo con hidrocarburos enmendado con biosólido granulado, debido, como se acaba de comentar, a que esta

enmienda aporta una gran cantidad de compuestos fosforados susceptibles de ser sustratos de esta enzima.

La  $\beta$ -glucosidasa es una enzima relacionada con el ciclo del carbono que refleja el estado de la materia orgánica del suelo, y su actividad está ligada a los compuestos de carbono existentes. La actividad  $\beta$ -glucosidasa de los suelos en estudio incrementó en general, tanto con la incorporación al suelo de los hidrocarburos como con la adición de las enmiendas orgánicas (Figura II.6), no observándose grandes diferencias entre los tratamientos al final del proceso de biorremediación, si bien, la actividad  $\beta$ -glucosidasa de los suelos con hidrocarburos y de los suelos enmendados seguía siendo, en general, significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a la del suelo control (S), coincidiendo con lo observado por otros autores (Marín, 2004). Esto refleja el mayor aporte de fuentes de carbono presente en los suelos enmendados y también el que los hidrocarburos actúan como sustratos carbonados para los microorganismos. Esta actividad enzimática era mayor en el suelo contaminado enmendado con el biosólido granulado, puesto que éste aporta una gran cantidad de compuestos carbonados susceptibles de ser sustratos de esta enzima, lo que se ve reflejado en un mayor incremento de la actividad enzimática durante los dos primeros meses de la incubación, estabilizándose paulatinamente los valores a medida que transcurre el tiempo.

La actividad ureasa (Figura II.6), se comportaba de manera diferente a las anteriores actividades enzimáticas. Las enmiendas orgánicas aplicadas son ricas en amonio y la actividad ureasa se ve inhibida con la presencia de este compuesto ya que es el producto de la reacción que cataliza. Por este motivo la actividad ureasa era mayor en las muestras de suelo control (S) y suelo con aporte de compost (S+C), que son los que menos amonio incorporan al suelo.

Las actividades enzimáticas están influenciadas por la naturaleza de la materia orgánica y las condiciones del suelo (Rastin *et al.*, 1998), en nuestro caso por el aporte de lodo de refinería, la adición de las enmiendas orgánicas y los cambios en el suelo resultantes del proceso de landfarming.

### **Diversidad genética y funcional de la comunidad microbiana del suelo.**

El proceso de biorremediación requiere un buen conocimiento de las características fisicoquímicas de la zona contaminada, así como una descripción detallada de las poblaciones microbianas involucradas en los procesos fisiológicos de biodegradación de los hidrocarburos (Ros *et al.*, 2010). Aunque los hidrocarburos pueden estar sometidos a diferentes procesos tales como la adsorción, volatilización, fotólisis y degradación química, la degradación microbiológica es el proceso más importante (Haristah y Kaushik, 2009). Por esta razón se ha estimado conveniente el estudio de las comunidades microbianas implicadas en los tratamientos de biorremediación de suelos con hidrocarburos, aplicando diferentes técnicas.

El sistema comercial de Ecoplacas Biolog ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los perfiles fisiológicos a nivel de comunidad microbiana (diversidad funcional) (CLPP, Community Level Physiological

Profile) (Garland and Mills, 1991), y se basa en el establecimiento de la capacidad de las comunidades microbianas del suelo para metabolizar un rango de sustratos de carbono que varían en su complejidad estructural (Degens y Harris, 1997).

Aparte de la aplicación de los métodos dependientes de cultivo tradicionales, se vienen utilizando en las últimas décadas herramientas moleculares de análisis de la comunidad microbiana del suelo que son independientes del cultivo, con el fin determinar la diversidad de poblaciones microbianas en un determinado ecosistema edáfico sometido a unas condiciones concretas (Muyzer *et al.*, 1993). La clonación y la secuenciación del ADN extraído del suelo pueden ser también aplicadas al análisis de la estructura y de la composición de la comunidad microbiana que habita en el mismo (Kaiser *et al.*, 2001). Además, el método de la PCR a tiempo real, suministra una descripción cuantitativa de los grupos microbianos (Stubner, 2004; Ros *et al.*, 2009).

La utilización de técnicas moleculares independientes de cultivo, asociadas a la extracción de ADN del suelo, como son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida del paso por geles en gradiente de desnaturalización o de temperatura (DGGE/TGGE), polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP), o clonaje del gen que codifica el ARNr de la subunidad ribosómica 16S bacteriano (ARNr 16S) o de la subunidad 18S en el caso de hongos (ARNr 18S) ofrecen una rápida y sensible alternativa para el estudio de la estructura de las comunidades microbianas (Muyzer *et al.*, 1993). Sin embargo, la persistencia de los genes ribosómicos en los microorganismos metabólicamente inactivos nos indica que las comunidades analizadas incluyen tanto las especies activas como inactivas. Por ello, los perfiles de las comunidades microbianas basados en la extracción directa del ARN, es un método específico para determinar las especies o grupos microbianos que realmente están metabólicamente activos. Por tanto, combinando ambas aproximaciones podremos obtener más información sobre la estructura funcional de las comunidades microbianas.

Existen diversos métodos para la extracción de ARN, pero el utilizado con mayor frecuencia es el de Gips (ácido tiosanato de guanidina, fenol, sarcosyl) desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). Cada uno de los componentes juega un papel específico: el ácido tiosanato de guanidina es sumamente fuerte y tiene un poder desnaturalizante, el fenol, al estar acidificado, provoca que el ADN se acumule en la interfase entre la fase acuosa y la del fenol, dejando al ARN en la fase acuosa, y el sarcosyl que es un detergente muy potente ayuda a la lisis celular.

Una vez extraído el ARN, se aplica la metodología para llevar a cabo una transcripción reversa que permite pasar, en sentido inverso al dogma central de la biología molecular, el ARN a ADN. El primer paso es convertir el ARNm en ADN complementario (ADNc), por medio de la actividad de la reverso transcriptasa. Una vez tenemos ADNc, podemos utilizar las técnicas convencionales para estudiar el ADN (Eguarte *et al.*, 2007).

El objetivo de este ensayo ha sido evaluar, por medio de la combinación del análisis de los perfiles fisiológicos (CLPPs), y técnicas moleculares aplicadas en el análisis genómico del suelo, como la DGGE, PCR en tiempo real y clonación, los cambios producidos durante un proceso de biorremediación en la estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana del suelo a causa de; i) la presencia de hidrocarburos; y ii) la adición de biosólido granulado o compostado a estos suelos con hidrocarburos. Todo esto ampliará nuestro conocimiento en relación a la estructura, composición y funcionamiento de los microorganismos involucrados en los procesos de biorremediación.

Estos métodos, llamados independientes de cultivo, son capaces de detectar e identificar microorganismos directamente en el suelo sin cultivarlos ni aislarlos, ya que analizan su ADN o ARN. Se basan en la extracción de los ácidos nucleicos directamente de las matrices, los cuales posteriormente son analizados por métodos capaces de poner de relieve la diversidad microbiana. Así, mediante este estudio genómico, es posible determinar cuantas y cuales son las especies microbianas presentes en una muestra específica.

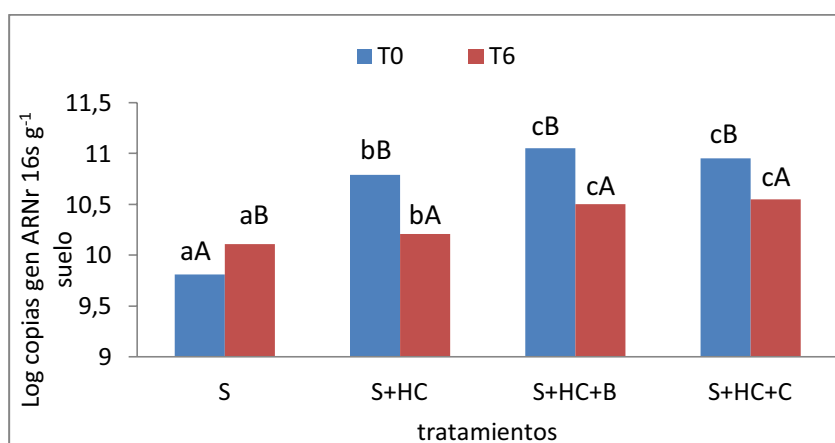
Este estudio se ha llevado a cabo sobre las muestras del inicio y final del proceso de biorremediación (6 meses de incubación) de los suelos con incorporación reciente de lodos de refinería, enmendados y sin enmendar, y el control. No hemos considerado necesario introducir los suelos enmendados sin hidrocarburos en este estudio puesto que el objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral es la biorrecuperación de un suelo con hidrocarburos, y nos interesa conocer la microbiología capaz de desarrollarse en estos suelos con presencia de hidrocarburos (con y sin enmiendas).

#### Análisis mediante PCR en tiempo real

Esta técnica viene descrita detalladamente en el apartado de Métodos analíticos de esta Memoria. No obstante, se indican a continuación los pasos seguidos para realizar este tipo de análisis molecular. En primer lugar, una vez extraído el ADN del suelo, se amplificaron mediante PCR en tiempo real los genes específicos de bacterias, utilizando los cebadores comerciales 338f-gc/907r para el gen 16S del ARNr.

La PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación de ADN. Para ello, emplea del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, al menos un par de cebadores universales específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza después de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR en tiempo real. Mediante esta técnica, se consigue suficiente cantidad de una porción de ADN bacteriano, en nuestro caso el gen 16S del ARNr, que es el representativo de las bacterias, lo que nos permite su cuantificación en las muestras de suelo.

Los resultados obtenidos después de la amplificación, mediante PCR en tiempo real, del ADN bacteriano (genes del ARNr 16S) extraído del suelo (Figura II.7) mostraron un incremento significativo ( $F=37,215$ ;  $p=0,000$ ) de la abundancia bacteriana con la contaminación reciente con hidrocarburos, siendo las medias para cada tratamiento significativamente diferentes y el incremento con relación al control sin hidrocarburos mayor en los suelos que habían recibido enmienda orgánica, estando en el rango de 10,2-11,2 en una escala logarítmica del número de copias del gen que codifica el ARNr 16S. Estos datos concuerdan con los mayores valores de biomasa microbiana encontrados en estos suelos (Figura II.2). Esto es explicable por el hecho de que el vertido de hidrocarburos en el suelo eleva los niveles de carbono orgánico, el cual, puede servir como sustrato para la actividad y el crecimiento microbiano (Bossert y Bartha, 1984; Marín *et al.*, 2005). Del mismo modo, la incorporación del biosólido al suelo con hidrocarburos junto con la aireación realizada, favorecía el incremento de la actividad microbiana, promoviendo el crecimiento de los microorganismos degradadores (Gallego *et al.*, 2001; Marín *et al.*, 2005), debido a los nutrientes y sustratos fácilmente biodegradables que incorpora la enmienda, lo que es clave para el éxito de los procesos de biorremediación.



**Figura II.7.-** Cuantificación de las bacterias totales en los diferentes tratamientos mediante PCR en tiempo real. Los valores se muestran sobre una escala logarítmica del número de copias del gen que codifica el RNA 16S g<sup>-1</sup> de suelo seco. Letras minúsculas diferente indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas con el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p<0,05$ ).

Asimismo, se apreció una variación significativa del recuento de bacterias totales mediante PCR en tiempo real, con el tiempo. Después de 6 meses de incubación se detectó un incremento en la abundancia bacteriana en el suelo control sin hidrocarburos lo cual es probablemente debido a las condiciones más favorables de oxigenación, humedad y temperatura a que se ve sometido este suelo durante la incubación. Contrariamente, la abundancia microbiana en los suelos con hidrocarburos disminuyó significativamente ( $F=82,445$ ,  $p=0,00$ ) con el proceso de biorremediación, lo cual es probablemente debido a la mineralización de los hidrocarburos y de los sustratos incorporados con la enmienda orgánica a lo largo de la incubación.

No obstante, la abundancia bacteriana en los suelos con hidrocarburos, especialmente en los que habían sido enmendados, seguía siendo superior a la del suelo control (Figura II.7).

#### Estudio del perfil fisiológico de las comunidades microbianas (CLPP)

El estudio del perfil fisiológico (CLPP) de la comunidad bacteriana se llevó a cabo mediante el método BIOLOG, desarrollado durante los años 90. Este método automatizado de detección rápida de la mineralización de diversas fuentes de C por parte de los microorganismos extraídos de un suelo, utiliza un sistema de microplacas con 96 pocillos. Cada uno de los pocillos contiene una única fuente de carbono, nutrientes básicos y un indicador colorimétrico (Garland y Mills, 1991). El conjunto de los pocillos presentes en las placas de BIOLOG, incluye tres réplicas de cada uno de los sustratos carbonados seleccionados para este estudio, lo cual aumenta la probabilidad de que el perfil fisiológico de las comunidades (CLPP) generado sea representativo de las muestras de suelo. Además, el número y diversidad de los sustratos contenidos en las placas son suficientes para discriminar los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas de las diferentes muestras ambientales estudiadas (Ros *et al.*, 2008).

A la hora de utilizar y evaluar los resultados obtenidos con esta técnica de BIOLOG hay que tener en cuenta sus limitaciones ya que la actividad catabólica que se desarrolla en los pocillos, es específica de determinados tipos de microorganismos aeróbicos no viéndose representado el total de la microbiota del suelo. Esto supone sólo un subconjunto de la comunidad microbiana total, un 1% aproximadamente (Tate *et al.*, 2000; Ros *et al.*, 2008). Aun así, podemos utilizar esta técnica para tener una visión global de la diversidad funcional, ya que aporta información útil respecto a la potencial actividad de la comunidad bacteriana que es capaz de crecer sobre el sustrato proporcionado (Braun *et al.*, 2010) y ha sido reconocida como una buena herramienta para la comparación de las comunidades bacterianas de los suelos (Ros *et al.*, 2006).

De acuerdo con Weber y Legge (2009) los sustratos situados sobre las placas del Biolog Ecoplate se dividieron en cinco grupos principales: ácidos carboxílicos, polímeros, carbohidratos, aminoácidos, compuestos fenólicos y aminas. En la Tabla II.6 se describe cuales son y cómo se distribuyen en una placa de Biolog.

El indicador colorimétrico que se utiliza es una sal de tetrazolium, con una elevada afinidad para oxidar el NADH. Cuando un microorganismo responde positivamente a la fuente de carbono que encuentra en el pocillo, genera NADH como intermediario metabólico; la sal de tetrazolium en su estado oxidado es incolora, pero al oxidar este NADH queda en estado reducido desarrollando un color rosáceo. Cuanto mayor es la respuesta microbiana a la fuente de carbono mayor cantidad de NADH se genera y mayor color se desarrolla. Una observación directa en placa nos permite saber las respuestas positivas que se han encontrado; sin embargo, esto debe ser cuantificado mediante espectrofotometría visible, quedando reflejado el potencial de actividad de la comunidad bacteriana que es capaz de crecer utilizando el sustrato



proporcionado (Braun *et al.* 2010). El sistema BIOLOG ha sido reconocido como una herramienta útil para establecer comparaciones entre comunidades bacterianas (Smalla *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 2006, Hueso, 2011), y para evaluar la diversidad funcional de las comunidades microbianas de suelos enmendados (Hu *et al.*, 2011).

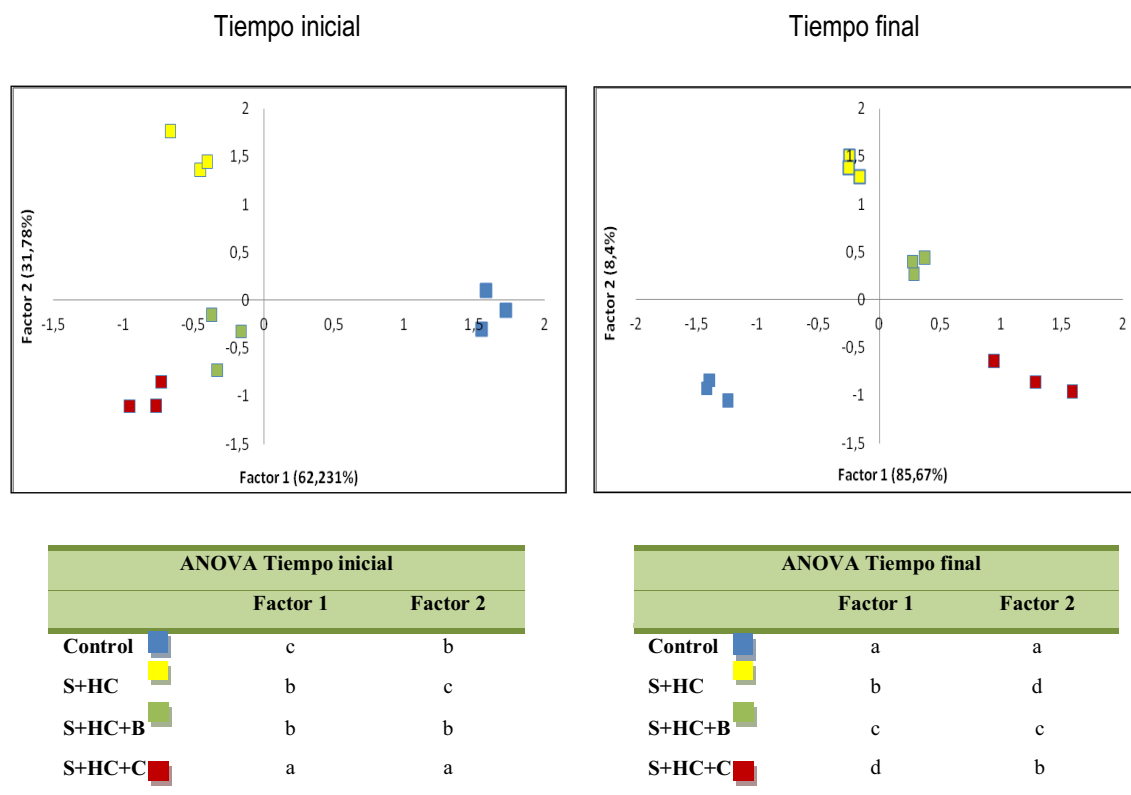
**Tabla II.6.-** Grupos de sustratos de carbono en las placas Biolog Ecoplate.

Pocillo	Nº ID	Fuente de C	Grupo
Pocillo 1	C0	Agua (blanco)	
Pocillo 2	C1	Acido Piruvico metil	Carbohidratos
Pocillo 3	C2	Tween 40	Polimeros
Pocillo 4	C3	Tween 80	Polimeros
Pocillo 5	C4	Alfa-ciclidexina	Polimeros
Pocillo 6	C5	Glicógeno	Polimeros
Pocillo 7	C6	D-celobiosa	Carbohidratos
Pocillo 8	C7	Alfa-D-lactosa	Carbohidratos
Pocillo 9	C8	Beta-metil-D-glucosido	Carbohidratos
Pocillo 10	C9	D-xilosa	Carbohidratos
Pocillo 11	C10	i-eritritol	Carbohidratos
Pocillo 12	C11	D-mannitol	Carbohidratos
Pocillo 13	C12	N-acetil-D-glucosamina	Carbohidratos
Pocillo 14	C13	D-glucosaminico	ácidos carboxilicos
Pocillo 15	C14	Glucosa-1-fosfato	Carbohidratos
Pocillo 16	C15	D,L-alfa-glicerol fosfato	Carbohidratos
Pocillo 17	C16	D-galactonico	ácidos carboxilicos
Pocillo 18	C17	D-galacturonico	ácidos carboxilicos
Pocillo 19	C18	2-Hidroxi benzoic o	Compuestos fenólicos
Pocillo 20	C19	4-Hidroxi benzoic o	Compuestos fenólicos
Pocillo 21	C20	Gamma-hidroxibutirico	ácidos carboxilicos
Pocillo 22	C21	Itaconico	ácidos carboxilicos
Pocillo 23	C22	Alfa-ketobutirico	ácidos carboxilicos
Pocillo 24	C23	D-malico	ácidos carboxilicos
Pocillo 25	C24	L-arginina	Aminoácidos
Pocillo 26	C25	L-asparagina	Aminoácidos
Pocillo 27	C26	L-fenilalanina	Aminoácidos
Pocillo 28	C27	L-serina	Aminoácidos
Pocillo 29	C28	L-treonina	Aminoácidos
Pocillo 30	C29	Acido Glicil-L-glutamico	Aminoácidos
Pocillo 31	C30	Feniletilamina	Aminas
Pocillo 32	C31	Putrescina	Aminas

Los datos correspondientes a los perfiles de utilización de las diferentes fuentes de carbono en las placas de BIOLOG por las comunidades bacterianas (CLPP) de los diferentes tratamientos y tiempos de muestreo, fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA) cuyo resultado se muestra en la Figura II.8.

El PCA de las muestras del inicio del proceso de biorremediación proporcionó dos factores, el factor 1, que explicaba el 62,23% de la varianza total de los valores y el factor 2, que explicaba el 31,78% de dicha varianza. Este análisis discriminaba tanto en función del factor 1 como del factor 2, entre el suelo control y el suelo con hidrocarburos (con o sin aporte de enmienda), lo que indica que la presencia de hidrocarburos

afecta a la funcionalidad de los microorganismos al inicio del ensayo (Figura II.8). El peso de las variables en cada uno de estos factores se muestra en Tabla II.7.



**Figura II.8.-** Análisis de componentes principales del perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP) de los diferentes tratamientos al inicio (a) y final (b) del proceso de biorremediación. En las tablas con los análisis estadístico ANOVA, para cada factor, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, el análisis de la varianza ANOVA aplicado a los valores de las puntuaciones del Factor 1, en el que los sustratos con mayor peso eran los compuestos carboxílicos, carbohidratos, fenólicos y aminas (Tabla II.7), estableció diferencias significativas entre el control sin hidrocarburos y el resto de tratamientos, mientras que las diferencias entre S+HC y S+HC+B no llegaban a ser significativas. El ANOVA aplicado a los valores de las puntuaciones del Factor 2 sin embargo, no estableció diferencias significativas entre el suelo control y el suelo con hidrocarburos enmendado con biosólido granulado (S+HC+B), aunque sí indicó diferencias significativas entre el control y los otros dos tratamientos (S+HC y S+HC+C), sugiriendo una diferente capacidad de las comunidades bacterianas de estos suelos para el consumo de aminoácidos y polímeros. Las diferencias que se observaban entre los tratamientos (S+HC, S+HC+B, S+HC+C) no siempre eran significativas, independientemente del tipo de factor, aunque sí se observaba que los suelos con hidrocarburos enmendados con compost se diferenciaban ligeramente de los otros dos tratamientos.

La aplicación del PCA a las muestras de suelo al final del proceso de biorremediación proporcionó también dos factores principales, el factor 1 que explicaba el 85,67% de la varianza total de los datos, y el factor 2,

que explicaba el 8,4% de la varianza. El análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los valores de las puntuaciones de estos Factores establecía diferencias significativas entre todos los tratamientos para ambos factores (Figura II.8).

Se observan diferencias en los suelos con hidrocarburos enmendados con biosólido (S+HC+B) entre el inicio y el final del proceso de biorremediación, aunque estas diferencias no son tan grandes como las observadas en el suelo control (Control) y las muestras con hidrocarburos y aporte de compost (S+HC+C). Sin embargo, en los suelos con hidrocarburos sin enmendar (S+HC) apenas existían diferencias antes y después del proceso de biorremediación. Esto pone de manifiesto, que existen grandes diferencias funcionales entre los microorganismos de los suelos con hidrocarburos, con y sin enmienda (S+HC, S+HC+B, S+HC+C) y el suelo control (Control), y entre los suelos enmendados y los no enmendados.

Esta diferenciación se observa desde el inicio del proceso y aunque siguen existiendo diferencias entre los tipos de tratamientos, se observa un cambio en la funcionalidad de los microorganismos con el tiempo, sobre todo en el suelo control y en el suelo con hidrocarburos enmendado con compost (S+HC+C).

Las diferencias en la utilización de sustratos carbonados para los diferentes tratamientos muestran las diversas capacidades metabólicas de las comunidades microbianas del suelo (Chakraborty et al., 2011), estableciendo las preferencias que las poblaciones microbianas muestran por las diferentes fuentes carbonadas en función del tratamiento que haya recibido el suelo.

En la Tabla II.7, se representa el peso que el tipo de sustrato tiene para cada factor del PCA en las muestras del inicio y final del proceso de biorremediación. En esta Tabla, para el tiempo inicial se observa que para el factor 1, son los ácido carboxílicos, carbohidratos, cuerpos fenólicos y aminas, los que más influyen en la diferenciación de las muestras, y para el factor 2, son principalmente los polímeros y aminoácidos. Al final del proceso, para el factor 1, son los ácidos carboxílicos los más influyentes, seguidos de los polímeros, compuestos fenólicos, carbohidratos, y aminoácidos, mientras que para el factor 2, son principalmente las aminas el sustrato más influyente, seguidas de los carbohidratos y aminoácidos.

Vemos como para el factor 1, que explica el mayor porcentaje de la varianza, existen diferencias entre el inicio y el final del proceso de biorremediación en cuanto al grupo de sustratos por el que tienen mayor afinidad los microorganismos del suelo. Así, se observa un gran incremento en la presencia de microorganismos degradadores de polímeros y aminoácidos al final del ensayo, a la vez que disminuye la afinidad de estos microorganismos por las aminas, lo que puede representar a microorganismos con un metabolismo afín a moléculas complejas o recalcitrantes, incluso, puede que exista en estos suelos otros residuos de origen petrolífero que pueden estar contribuyendo al tipo de microbiota que se desarrolla en ellos. Al final del ensayo se observa también para este factor1, que los ácidos carboxílicos tienen mucho

peso; según Kreitz y Anderson (1996) esto puede indicar la presencia de bacterias que metabolizan principalmente sustancias orgánicas, como son los hidrocarburos.

**Tabla II.7.-** Peso de las variables en cada uno de los dos factores proporcionados por en el análisis de componentes principales de los datos de BIOLOG al inicio y final del proceso de biorremediación, representados en la Figura II.8.

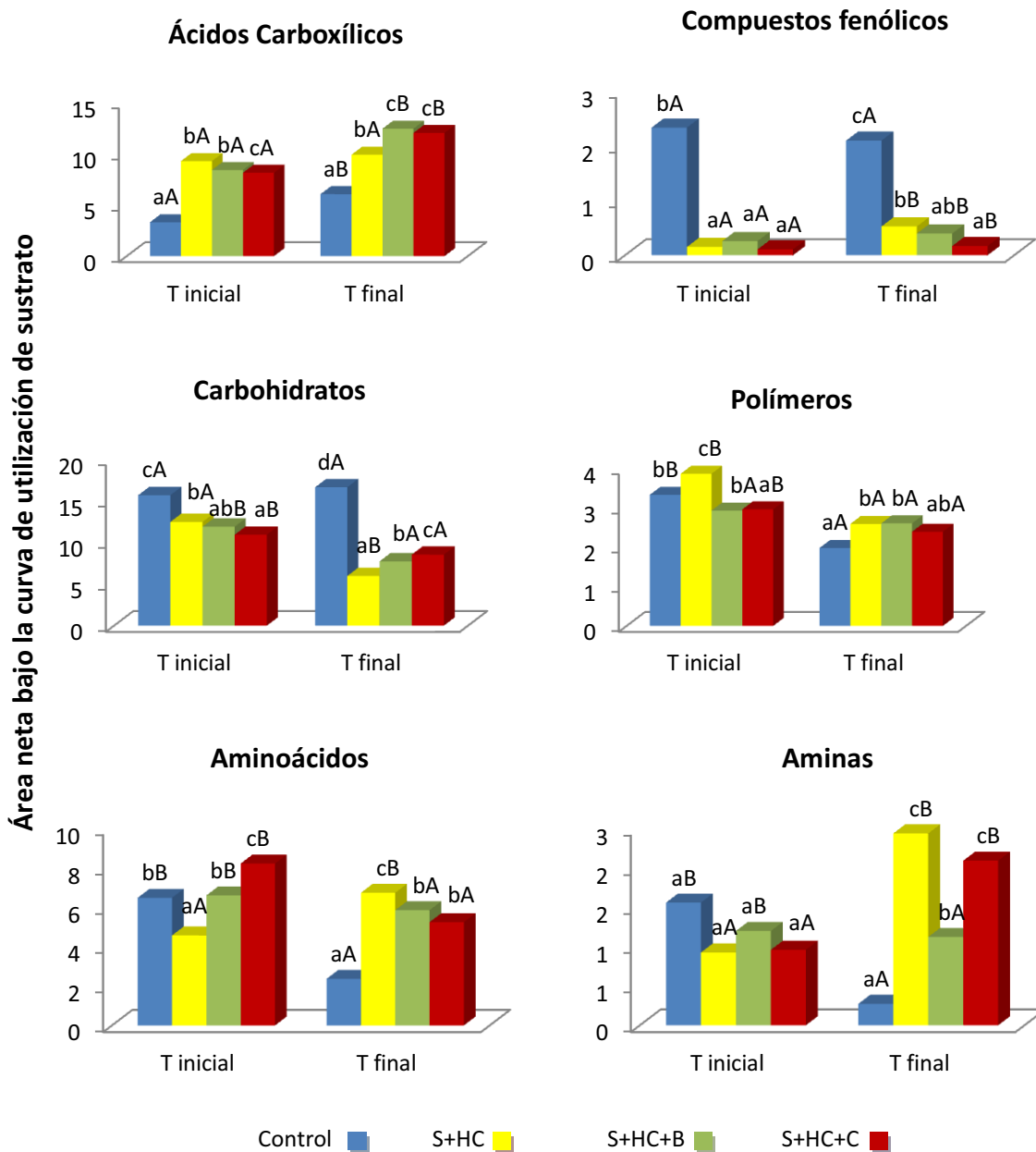
Tiempo inicial			Tiempo final		
Sustratos	F1	F2	Sustrato	F1	F2
Ac.carboxílicos	-0,950	0,269	Ac.carboxílicos	0,943	0,246
Polímeros	0,115	0,946	Polímeros	0,802	0,457
Carbohidratos	0,968	0,166	Carbohidratos	-0,710	-0,685
C. Fenólicos	0,982	-0,06	C. Fenólicos	-0,821	-0,512
Aminoácidos	-0,147	-0,948	Aminoácidos	0,714	0,672
Aminas	0,947	-0,098	Aminas	0,298	0,938

En la Figura II.9, se representa el consumo de cada grupo de fuente de carbono para cada tratamiento y el suelo control. Como puede observarse, existe una clara diferenciación entre el suelo control (sin hidrocarburos) y el resto de tratamientos. Aunque estas diferencias varían según el grupo de sustratos de carbono, parece que la aplicación de un lodo de refinería con hidrocarburos introduce especies microbianas especializadas en la degradación de algunas fuentes de C específicas.

Si se analizan uno a uno los grupos de sustrato, se pueden establecer diferencias significativas en la utilización de sustratos carbonados, entre los suelos con hidrocarburos enmendados y sin enmendar, para el tiempo inicial, cuando las fuentes de carbono analizadas son carbohidratos, polímeros y aminoácidos, y para el tiempo final cuando los sustratos carbonados analizados son ácidos carboxílicos, carbohidratos y aminoácidos, (Figura II.9). Se observa que el consumo de cada tipo de sustrato difiere en función del tratamiento y el tiempo de muestreo, y aunque estas diferencias no siempre son significativas, sí indican que los tratamientos han inducido diferencias funcionales entre los microorganismos.

No se observan grandes diferencias entre los suelos con distinta enmienda para la mayor parte de los grupos de sustratos, aunque cabe destacar una diferencia significativa, la reflejada para los carbohidratos y las aminas a tiempo final, donde el suelo enmendado con compost presenta valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más elevados que el enmendado con biosólido granulado.

Todos estos resultados ponen de relieve que es principalmente la presencia o no de hidrocarburos la que condiciona la utilización de las diversas fuentes de C por parte de los microorganismos, además de hacerlo también la incorporación o no de enmiendas, y en menor medida, el tipo de enmienda (biosólido fresco granulado o compost). Chakraborty *et al.* (2011), indicaron que la mayoría de los microorganismos del suelo son heterótrofos y que el tipo de fuente de carbono que consumen, determina la funcionalidad del suelo, y también el tamaño y actividad de la biomasa microbiana.



**Figura II.9.-** Cambios en el consumo de los diferentes grupos de sustratos de carbono para los distintos tratamientos y el suelo control después del proceso de biorremediación. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas con el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Este mismo hecho ocurre en nuestro ensayo en cuanto a la actividad de la biomasa microbiana, con la salvedad de que la presencia de los hidrocarburos hace que aparezca una selección de las poblaciones microbianas que preponderantemente van a degradar en mayor medida sólo algunos de los sustratos carbonados. Con respecto al tamaño de las poblaciones microbianas no ocurre lo mismo, puesto que a mayor cantidad de carbono, mayor será la actividad y el desarrollo de los microorganismos, por lo que el tamaño de la biomasa microbiana será también mayor, como ya se observó en la Figura II.2.

Bucher y Lanyon (2005) indicaron que la realización de un análisis de la utilización de sustratos por parte de la comunidad microbiana no consigue aportar una información clara sobre las diferencias que provoca en estas comunidades la diferente naturaleza de las enmiendas, por lo que en este sentido debemos utilizar otros parámetros complementarios.

Para obtener más información sobre el efecto de los tratamientos sobre el perfil fisiológico de utilización de fuentes de C de la comunidad microbiana, se calculó el índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ ), el cual se emplea para conocer la diversidad de comunidades biológicas. Su valor nos indica el grado de incertidumbre que existe para predecir la especie a la cual pertenece un individuo extraído aleatoriamente de la comunidad. Este índice es muy sensible a los cambios de abundancia de especies y por eso ha sido ampliamente utilizado. En nuestro estudio, se ha utilizado este índice como indicador de la diversidad metabólica de la comunidad, sustituyendo las especies "biológicas", por las especies químicas (formas de carbono a degradar), y la densidad de individuos por la intensidad de la degradación. Así, índices mayores indicarían la capacidad de degradar muchos sustratos diferentes con mucha eficiencia, y un índice bajo, justo lo contrario. Es decir, mediante el índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) podemos conocer la cantidad de sustrato consumido por los microorganismos y la equidad de la actividad de todos los sustratos utilizados (Magurran, 1988; Zak *et al.*, 1994).

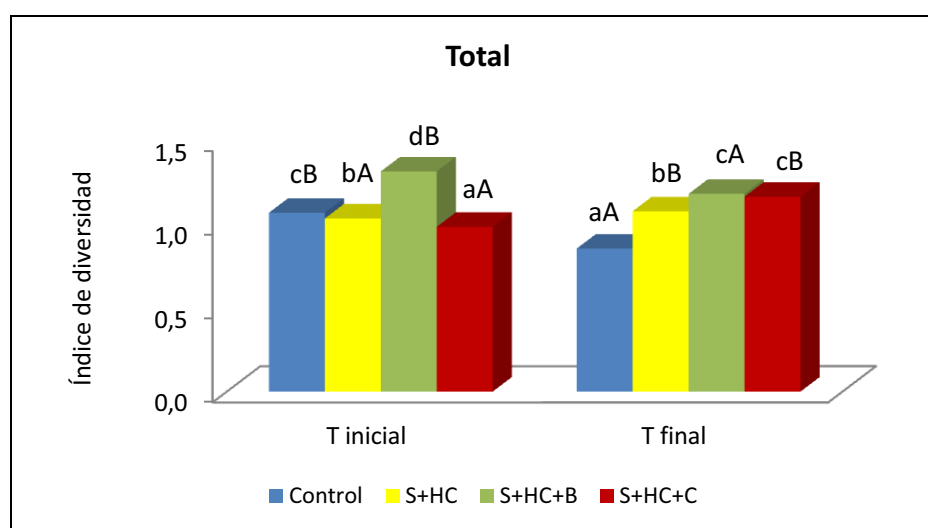
Este índice se calcula mediante la ecuación:  $H' = - \sum p_i (\ln p_i)$

donde

$p_i$  = cociente del valor de absorbancia corregida de cada una de las celdas vs suma de la absorbancia de todas las celdas (este cálculo se realiza con los datos transformados, no con los normalizados).

El suelo con hidrocarburos enmendado con biosólido, es el que presentaba al inicio del proceso de biorremediación el mayor índice de diversidad funcional, mientras que al final de dicho proceso todos los suelos con hidrocarburos mostraban mayor diversidad funcional que el suelo control, siendo los suelos con hidrocarburos enmendados los que mostraban los mayores valores de índice de diversidad, independientemente del tipo de enmienda aplicada (Figura II.10).

En estudios similares, Gómez *et al.* (2006), Hueso *et al.* (2012) y Frac *et al.* (2012), observaron que los suelos enmendados con biosólidos promueven la diversidad funcional originando una comunidad microbiana de mayor tamaño y actividad, mostrando una mayor diversidad fisiológica de utilización de fuentes de carbono totales, con respecto a los suelos sin enmendar. El aumento de la diversidad funcional microbiana observado por estos autores, es explicado por el incremento en el carbono disponible como consecuencia de la incorporación de enmiendas (Hu *et al.*, 2011).



**Figura II.10.-** Índice de la diversidad de Shannon para los suelos con distintos tratamientos y el suelo control. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas con el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

El efecto de las enmiendas orgánicas en la diversidad microbiana del suelo es ampliamente conocido puesto que las características de los sustratos de C de las enmiendas orgánicas son el factor clave que gobierna el crecimiento selectivo de algunas especies de microorganismos (Hu *et al.*, 2011). En nuestro estudio, al efecto de las enmiendas, hay que sumarle el de los hidrocarburos, que actúan también como sustratos para un grupo de microorganismos específicos.

La mayor diversidad catabólica observada en el suelo con hidrocarburos enmendado con biosólido granulado al inicio del ensayo se explica por el gran aporte, no solo de fuentes de carbono lábil, sino también de colonias microbianas activas. Fisk *et al.*, (2003), encontraron que la incorporación de sustratos de carbono fresco tiene más influencia sobre la comunidad microbiana que sobre los niveles de materia orgánica, aunque a lo largo del ensayo, parece que es la presencia de hidrocarburos la que produce mayor efecto sobre la diversidad funcional de las colonias microbianas, haciendo que los 3 tratamientos aplicados sobre el suelo con hidrocarburos: aireación (S+HC) y aireación más adición de biosólido granulado (S+HC+B) o compostado (S+HC+C) al final del ensayo tiendan a igualarse, aunque con pequeñas diferencias, dando valores de diversidad creciente en el siguiente orden: S+HC+B, S+HC+C (no siendo diferencias significativas entre ellos) y por último S+HC (siendo significativamente diferente al resto de tratamientos).

#### Análisis del gen del ARNr 16S por PCR-DGGE

Uno de los métodos moleculares más utilizados para determinar los perfiles de bandas de ADN extraído del suelo es la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), después de amplificar los

fragmentos del ADN del suelo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (método de la PCR). En la PCR-DGGE, los ácidos nucleicos son sometidos a amplificación con cebadores universales, que son capaces de amplificar, en teoría, todo el ADN o el ARN de microorganismos presentes en el ecosistema específico. En nuestro ensayo se han utilizado cebadores específicos para el gen que codifica el ARN ribosómico de la subunidad 16S, el cual es específico en bacterias. El amplicón obtenido por PCR estará constituido por una mezcla de diferentes productos de amplificación, es decir, un determinado número de copias de fragmentos de ADN extraído del suelo, que son más diferentes entre ellos si la diversidad microbiológica en la muestra es más compleja. Esta técnica permite la separación de una mezcla heterogénea de genes amplificados por PCR en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de formamida y urea en concentraciones crecientes en el sentido de la migración electroforética (Muyzer *et al.*, 1993).

Cuando las moléculas de ADN encuentran el gradiente desnaturalizante capaz de abrir parcialmente la doble hélice (desnaturalización), se produce un cambio en la movilidad electroforética de la molécula, que en un momento dado hará que se detenga por completo en el gel, formando lo que se conoce como banda electroforética. Dado que la desnaturalización del ADN depende de su secuencia, las diferentes moléculas de ADN tendrán una movilidad electroforética diferente y generarán cada una su banda. Con este enfoque, es posible diferenciar los microorganismos presentes en el mismo ecosistema, siempre y cuando presenten regiones de amplificación con secuencias diferentes.

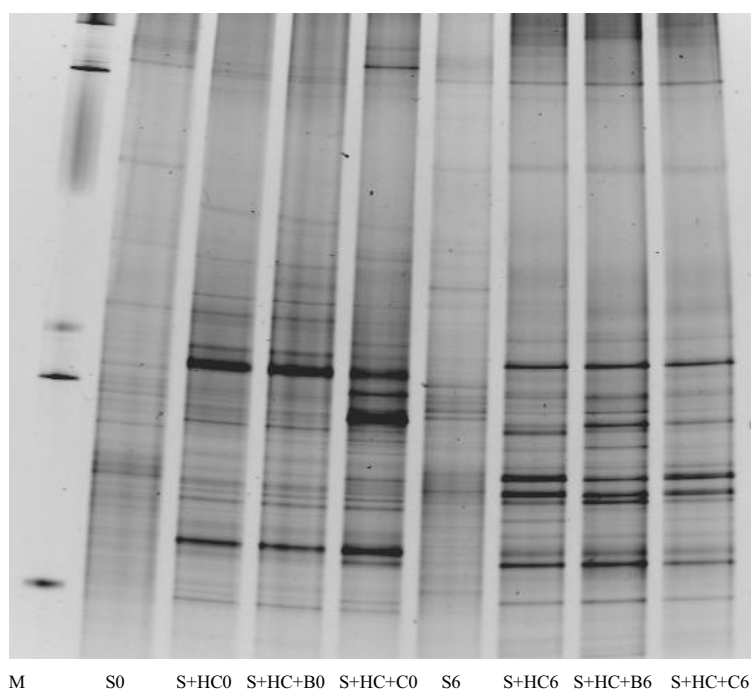
La estructura de la comunidad bacteriana de los diferentes tratamientos se refleja en la Figura II.11a, donde las bandas dominantes que aparecen en los tratamientos de biorremediación, muestran diferencias entre el tiempo inicial y el tiempo final (6 meses), independientemente del tratamiento de biorremediación.

En el análisis de agrupación, calculado usando el coeficiente de similitud de Dice, se ven las similitudes existentes entre los distintos tratamientos (Figura II.11b). Las muestras de suelo control, independientemente del tiempo de muestreo se agrupan en un único grupo en función de su similitud en el perfil de bandas obtenidos en la DGGE, demostrando más similitud entre ellas que con el resto de muestras de los tratamientos de biorremediación estudiados en este caso.

Cuando estudiamos los resultados obtenidos para los tratamientos de biorremediación, se observa que las muestras del tiempo inicial se agrupan separadas de las del final del proceso de biorremediación (6 meses).

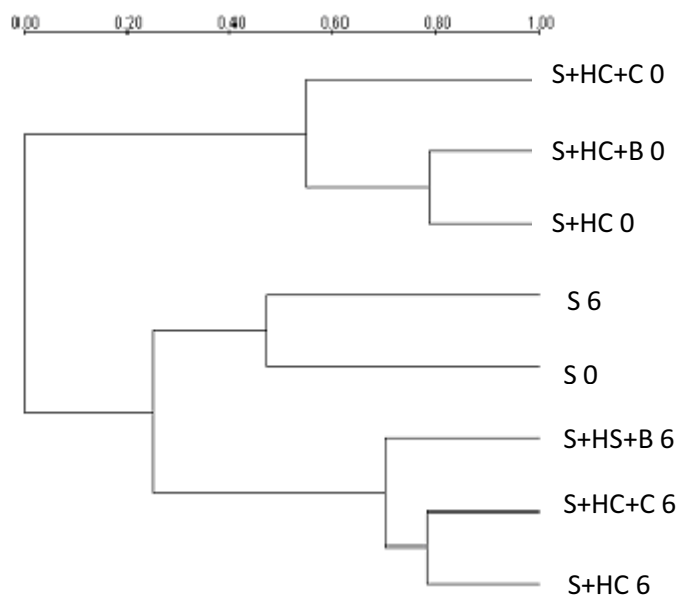


a)



b)

Coeficiente de similitud de Dice



**Figura II.11.**-(a) Comunidad bacteriana asociada con cada uno de los diferentes tratamientos, determinada por PCR-DGGE de los genes de ARNr 16S; 0 y 6 después del tratamiento indican el tiempo de muestreo. (b) Análisis de agrupación de las bandas de DGGE de las bacterias del suelo asociadas con los diferentes tratamientos. El coeficiente de similitud Dice fue aplicado al grupo mediante el método Ward. M: marcador.

Al inicio del proceso, el suelo con hidrocarburos enmendado con biosólido sin compostar (S+HC+B) mostraba más similitud con el suelo con hidrocarburos sin enmendar (S+HC) que con el suelo enmendado con compost (S+HC+C). Sin embargo, después de 6 meses de biorremediación es el suelo enmendado con

compost el que muestra similitud con S+HC, lo cual refleja el cambio estructural de la comunidad microbiana heterotrófica como respuesta a los sustratos de carbono (Choi y Dobbs, 1999), respecto al comienzo de la incubación (biorremediación).

Como conclusiones del análisis de la diversidad funcional y estructural de la comunidad microbiana del suelo sometido a los diferentes tratamientos ensayados en este experimento podemos decir que el tiempo de muestreo influye más en los cambios de funcionalidad y estructura de las comunidades bacterianas, que el tipo de enmienda usada en la biorremediación. Así, los perfiles de bandas dominantes encontrados después de 6 meses para todos los tratamientos de biorremediación, diferían de los encontrados al comienzo de la misma (inicio).

#### Obtención y análisis de las librerías de clones

Los fragmentos del ARNr 16S, amplificados anteriormente con PCR y separados en gel de electroforesis (DGGE), fueron clonados mediante el uso de *Escherichia coli*, lo que nos permitió obtener una librería de clones.

Los clones obtenidos se secuenciaron, y estas secuencias correspondientes a los clones de los fragmentos del ARNr 16S procedente de las muestras de suelo, se compararon con las secuencias previamente anotadas en las bases de datos, como la del NCBI (National Center for Biotechnology Information), con el fin de poder establecer a qué familia bacteriana correspondía cada una de estas secuencias.

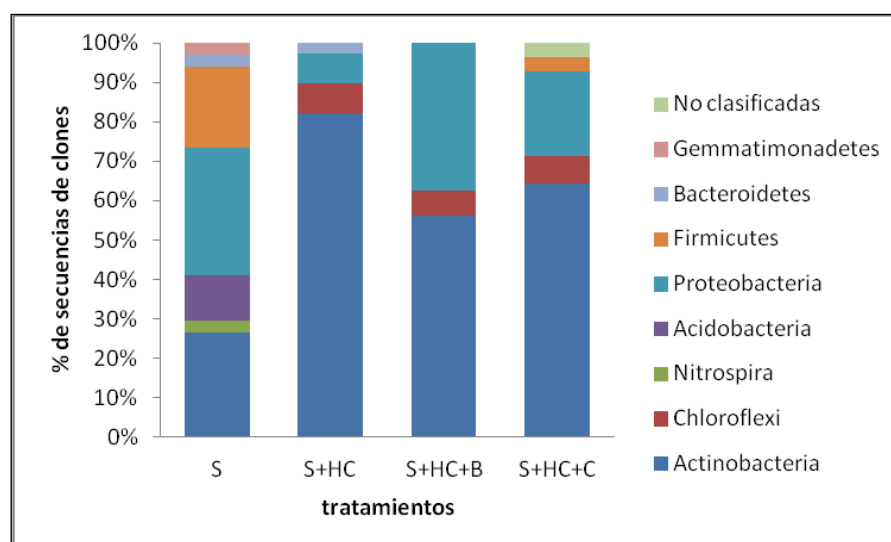
La afiliación filogenética de nuestra librería de clones se determinó con el Ribosomal Database Project (RDP), y los resultados obtenidos se describen y comentan a continuación.

En total, 117 clones mostraron un alto grado de similitud con secuencias clasificadas en ocho familias y un grupo de bacterias no clasificadas (Figura II.12). Proteobacterias (32,4%) (*Arenimonas*, *Microvirga*, *Rubellimicrobium* y *Azohydromonas*), Actinobacterias (26,5%) (*Pseudonocardia*, *Patulibacter*, *Marmoricola*, *Streptomyces*, *Solirubrobacter*) y Firmicutes (20,6%) (*Bacillus*, *Brevibacillus* y *Clostridium*) han sido los grupos dominantes que se encontraron en el suelo control. Las Actinobacterias era el grupo taxonómico dominante en los suelos biorremediados (56-82%), y Chloroflexi estaba presente (6-7%) solamente en los suelos biorremediados. En el suelo control se identificaron más familias (7) que en los suelos biorremediados (S+HC:4 familias; S+HC+B: 3 familias y S+HC+C: 5 familias).

El análisis de la estructura de la comunidad microbiana al final de la incubación (6 meses de biorremediación) mostró más *filum* (7) en el suelo control que en los suelos tratados (S+HC, S+HC+B y S+HC+C, entre 3-4 familias). Los *filum* con mayor abundancia en el suelo control, pertenecían a las Proteobacterias (*Arenimonas*, *Microvirga*, *Rubellimicrobium* y *Azohydromonas*), Actinobacterias (*Pseudonocardia*, *Patulibacter*, *Marmoricola*, *Streptomyces*, *Solirubrobacter*), Firmicutes (*Bacillus*, *Brevibacillus* y *Clostridium*) y Acidobacterias (Gp6, Gp7), seguidos de *Nitrospira*, *Bacteroidetes* y

Gemmatimonadetes. Sin embargo, en los tratamientos de biorremediación, los filum que aparecen en mayor abundancia son Actinobacterias, Proteobacterias y Chloroflexi seguidos de Firmicutes. Estos datos podrían indicar que en los ambientes con hidrocarburos está presente una diferente diversidad de especies microbianas (Magot, 2005 y Youssef *et al.*, 2009) y que la habilidad para utilizar sustratos hidrocarbonados la presentan una amplia variedad de géneros bacterianos (Bogan *et al.*, 2003). El filum Chloroflexi se observó únicamente en los tratamientos de biorremediación y se han identificado clones como *Sphaerobacter*.

Los filum dominantes en los tratamientos de biorremediación son Actinobacterias, aparentemente debido al estrés ambiental causado por los hidrocarburos, que permite únicamente el desarrollo de un número restringido de especies capaces de tolerar esas condiciones de estrés; resultados similares fueron observados por Abed *et al.*, (2002).



**Figura II.12.-** Distribución filogenética identificando los clones de la porción 16S del ARNr en los diferentes tratamientos al final del proceso de biorremediación. El tratamiento estadístico se muestra en la Tabla 5 del Anexo.

Los clones dominantes en los suelos biorremediados (S+HC, S+HC+B y S+HC+C) fueron Actinobacterias identificados como una variedad de Actinomycetales donde se incluyen *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Williamsia*, *Gardonia*, *Dietzia*, *Mycobacterium* y *Marmoricola*, microorganismos que muestran un gen múltiple que codifica enzimas que catabolizan los procesos catabólicos de hidrocarburos (Van Beilen *et al.*, 2005; Kloos *et al.*, 2006). Aunque muchos estudios revelan que los lugares contaminados con petróleo están dominados por bacterias Gram negativas (Venosa *et al.*, 2000; Röling *et al.*, 2004) como *Pseudomonas* o *Alcanivorax*, que dominan inicialmente los procesos de degradación rápida del petróleo (Kasai *et al.*, 2002), estudios recientes muestran que las bacterias Gram positivas, principalmente Actinobacterias, pueden ser dominantes durante los procesos de biorremediación de los hidrocarburos derivados del petróleo, debido a

su versatilidad metabólica y a su extendida presencia en suelos contaminados con pristano e hidrocarburos (Margesin *et al.*, 2003; Hamamura *et al.*, 2006; Quatrini *et al.*, 2008).

Chikere *et al.* (2009) aislaron Actinobacterias en la biorremediación de suelos contaminados tanto con hidrocarburos como con pristano demostrando que las Actinobacterias, están bien adaptadas a condiciones ambientales adversas tales como las de contaminación por hidrocarburos. Existe la hipótesis de que las Actinobacterias generalmente se adaptan a las condiciones de escasez de nutrientes y consecuentemente no fluctúan en respuesta al enriquecimiento por hidrocarburos (Quatrini *et al.*, 2008) que normalmente causa deficiencias nutricionales (Stroud *et al.*, 2007). Van Veen *et al.* (2007), postularon que el uso de microorganismos indígenas ya aclimatados siempre es preferible a degradadores externos inoculados. Algunos autores han indicado que la incorporación de enmiendas orgánicas a los suelos, cambia tanto la funcionalidad potencial como la estructura de la comunidad bacteriana (Ros *et al.*, 2006). Nuestros datos no muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los suelos biorremediados con enmiendas orgánicas (S+HC+B y S+HC+C) y los suelos biorremediados exclusivamente con aireación (S+HC) a lo largo del tiempo de incubación, pero sí existe una diferencia funcional y estructural entre todos los suelos tratados con biorremediación (S+HC, S+HC+B y S+HC+C) y el suelo control. Esto puede ser indicativo de que la presencia de hidrocarburos, es un factor más influyente en la diversidad funcional y estructural de la comunidad bacteriana, que la presencia o no de enmienda y el tipo de enmienda. Saison *et al.* (2006) e Innerebner *et al.* (2005) indicaron que las comunidades microbianas incorporadas con un compost no se ven reflejadas mediante su determinación directamente en el suelo, pero tiene un efecto indirecto, introduciendo cambios en la descomposición de la materia orgánica del suelo, la cual puede incrementar la actividad de las bacterias degradadoras de hidrocarburos que teóricamente son autóctonas de los lugares con hidrocarburos (Wu *et al.*, 2008). Estas bacterias poseen sistemas enzimáticos eficientes en la degradación de hidrocarburos así como genes que codifican enzimas catabólicas involucradas en la degradación de los mismos (Kyung-Hwa *et al.*, 2006; Majid *et al.*, 2008). *A partir de los resultados obtenidos en este ensayo de biorremediación en microcosmos, podemos concluir que la adición de enmiendas orgánicas incrementa la degradación de hidrocarburos conseguida con el landfarming (aireación), debido a la mayor estimulación del crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas del suelo que provocan dichas enmiendas.*

*Estos resultados han puesto también de relieve que los hidrocarburos aportados al suelo por el lodo de refinería pueden actuar como substratos carbonados para los microorganismos del suelo, conduciendo aun incremento de la comunidad bacteriana total, a una disminución de la diversidad microbiana y a un cambio funcional y estructural en dicha comunidad bacteriana, y que, si bien las enmiendas orgánicas producen cambios en la cantidad y diversidad de la comunidad bacteriana presente en el suelo con hidrocarburos, es la presencia de hidrocarburos más que la enmienda orgánica, la principal responsable de los cambios que se producen en dichas poblaciones microbianas. Asimismo, puede afirmarse que las especies bacterianas*

*Actinobacterias y Chloroflexi (Sphaerobacter) están directamente implicadas en los procesos de degradación de hidrocarburos.*

## **2) BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CON UN LARGO HISTORIAL DE RECICLADO DE LODOS DE REFINERÍA EN EL MISMO. ENSAYO A NIVEL DE CAMPO.**

El objetivo de este ensayo fue evaluar, por un lado, si la técnica de landfarming, eficaz en la biorremediación de suelos con aporte reciente de hidrocarburos procedentes de lodos de refinería y en condiciones de laboratorio, sigue siendo viable, en condiciones de campo, en suelos con una gran concentración de hidrocarburos recalcitrantes; y por otro, si la adición de biosólido o compost de biosólido a estos suelos incrementaba, o no, la eficacia de la técnica de landfarming en la degradación de estos hidrocarburos más recalcitrantes presentes en el suelo.

El lugar elegido para el desarrollo de este ensayo de biorremediación se encuentra en una zona perteneciente a la empresa Repsol Petróleo situada en el valle de Escombreras, Cartagena, en el sudeste de la Región de Murcia. Se trata de un área experimental dedicada desde hace más de 15 años a la investigación científica sobre la gestión adecuada y optimización del proceso de reciclado en el suelo de lodos de refinería, bajo la dirección del Grupo de Investigación de Enzimología y Biorremediación de Suelos y Residuos Orgánicos del CEBAS-CSIC. Los suelos de esta zona experimental muestran hidrocarburos no degradados por landfarming, derivados de aportes periódicos durante 12 años de lodos de refinería a los mismos. El clima en esta área es predominantemente semiárido, con una temperatura anual media de 19 °C y precipitaciones anuales en el rango de 200-250 mm, mayormente concentradas en primavera y otoño.

Antes de poder aplicar la técnica de landfarming *in situ* para sanear un suelo con este tipo de contaminación, se deben realizar una serie de ensayos previos en laboratorio, que nos permitan establecer la viabilidad de los protocolos a seguir. El ensayo de tratabilidad, comentado en el Capítulo I de esta Memoria, puso de manifiesto que el tratamiento de biorremediación con la técnica del landfarming era viable en este suelo ya que se constató que existen en el mismo, poblaciones microbianas capaces de acometer la degradación de los hidrocarburos. No obstante, es imprescindible tener un conocimiento lo más completo posible sobre los antecedentes del lugar que se quiere tratar, en relación tanto a la fuente de hidrocarburos (lodo de refinería), como del suelo que servirá de matriz para la degradación de estos hidrocarburos, así como de los materiales orgánicos (biosólido y compost de biosólido) que se adicionarán al suelo, para determinar cuáles serán las condiciones óptimas para la biodegradación de los hidrocarburos presentes en el suelo.

### **Antecedentes de la zona de estudio y caracterización del suelo y de los lodos de refinería aportados al suelo.**

El objetivo de esta actividad fue obtener un conocimiento, lo más completo posible, de los antecedentes del lugar que se quería descontaminar, con relación, tanto a los materiales potencialmente contaminantes que ha recibido el suelo (lodos de refinería), como a las características del suelo a tratar.

Para ello, se caracterizaron ampliamente 4 diferentes efluentes orgánicos (lodos de refinería) muestreados en distintas épocas del año, representativos de los lodos de refinería que se han venido incorporando periódicamente a los suelos de la zona experimental en estudio para su biorremediación, así como el propio suelo que durante años ha recibido estos efluentes. Asimismo, se consideró de interés el análisis de los lixiviados obtenidos en laboratorio mediante un ensayo en lisímetro, en proporción 10 litros de agua por kilo de lodo, a partir de estos lodos de refinería, con el fin de conocer la composición de los potenciales lixiviados que se podrían producir en la zona por efecto de las lluvias intensas. Estos lodos de refinería eran el resultado de la mezcla de los lodos generados en distintos procesos que tienen lugar en la refinería a lo largo de un tiempo determinado de actividad. Los datos correspondientes a estos análisis se muestran en las Tablas II.8 y II.9.

Los análisis realizados pusieron de manifiesto una cierta heterogeneidad en la composición de las muestras de lodos de refinería seleccionados, lo cual debe de considerarse como normal teniendo en cuenta la complejidad de las operaciones realizadas en los diferentes tratamientos a efectuar durante el proceso de refinado del petróleo crudo. La composición del lodo puede considerarse, por tanto, ligeramente variable y dependiente del tratamiento de refinado. Existe una clasificación para los residuos sólidos y semisólidos que se producen en una refinería, en función de las áreas de procedencia de los mencionados residuos. Así, se diferencian, los lodos procedentes del "área de proceso", lodos del "área de almacenamiento de crudo y productos blancos lixiviados" y lodos generados en las "áreas de servicios industriales", siendo distinta su composición. En el área de proceso de esta petroquímica se generan lodos que contienen sustancias catalizadoras agotadas, coque, lodos aceitosos, efluentes líquidos aceitosos y no aceitosos. En las áreas de almacenamiento y servicios industriales, se producen otros lodos y residuos, como la basura y las arenas (Marín, 2004). Actualmente en las refinerías se les da un pre-tratamiento a los lodos mediante técnicas de filtración, evaporación, centrifugación en fases, etc., para separar el material sólido con restos de hidrocarburo por un lado, y el agua por otro. Así se consigue concentrar el lodo aceitoso y disminuir su volumen.

Hay que indicar que la variabilidad observada en las analíticas realizadas a los lodos de refinería y sus lixiviados, no supone problema para que los resultados obtenidos puedan ser representativos de la generalidad de los mencionados lodos de refinería.

**Tabla II.8.-** Características de diferentes lodos de refinería semisólidos (75-80% de humedad). Concentraciones expresadas sobre peso seco del lodo.

PARÁMETRO	Lodo A	Lodo B	Lodo C	Lodo D	MÉTODO
pH (1:5, lodo:agua)	7,90	7,80	7,78	7,81	pH metro
Conduct. Eléctrica (dS/m) (1:5)	1,79	1,90	1,80	2,00	Conductímetro
Carbono Orgánico Total (g/Kg)	273	264	299	337	Analizador elemental
Cloruros (g/kg)	4,6	6,4	5,6	6,9	Extr.acuosa (det. HPLC)
Sulfatos (g/kg)	27,2	19,0	21,0	25,6	Extr.acuosa (det. HPLC)
Nitritos (mg/kg)	3,90	11,6	4,7	<0,5	Det. por HPLC
Fenoles (mg/kg)	356	476	387	478	Método espectrofotométrico
Amonio (mg/kg)	12,15	8,10	9,0	562	Extr. KCl (Electr. Selectivo)
Disolventes clorados (mg/kg)	<1	<1	<1	<0,2	Extr. Orgánica (det. CG)
Arsénico (mg/kg)	8,8	11,3	3,78	1,81	Digestión húmeda (AA)
Plomo (mg/kg)	111	115	122	67	Digestión húmeda (AA)
Mercurio (mg/kg)	<2	<1	<1	<1	Digestión húmeda (AA)
Cadmio (mg/kg)	<1	<2	<1	<2	Digestión húmeda (AA)
Niquel (mg/kg)	240	323	145	217	Digestión húmeda (AA)
Zinc (mg/kg)	530	437	324	523	Digestión húmeda (AA)
Cobre (mg/kg)	122	148	101	149	Digestión húmeda (AA)
Cromo (mg/kg)	121	186	154	61	Digestión húmeda (AA)
Hidrocarburos totales (g/kg)	221	259	248	240	Extr. Con Soxhlet

Estos lodos se caracterizan por presentar un alto contenido de hidrocarburos, así como de cloruros y sulfatos (Tabla II.8), hecho éste a tener en cuenta cuando estos lodos se adicionan al suelo, ya que una salinidad elevada, particularmente la derivada de cloruros y sulfatos, puede inhibir considerablemente el desarrollo y actividad de las poblaciones microbianas del suelo (García y Hernández 1996), lo que hará disminuir el potencial degradador de hidrocarburos de los microorganismos del suelo al que se adicionan. Presentan, asimismo, un alto contenido de carbono orgánico total que procede, en gran parte, de los hidrocarburos contenidos en el lodo. No se han detectado cantidades notables de disolventes clorados, pero sí elevadas cantidades de fenoles que, si no son controladas, pueden llegar a influir de forma negativa sobre la población microbiana degradadora de hidrocarburos (Concawe, 1980). También la presencia de metales pesados es característica de estos lodos (Osuji y Onojake, 2004), siendo el Zn, Ni y Pb los que aparecen en mayor concentración. El Zn, aun siendo el metal mas abundante, es considerado como esencial para los microorganismos, por lo que no resulta demasiado tóxico (Moreno *et al.*, 2009) Además, las concentraciones detectadas no superan en ningún caso los niveles límites aceptados en los lodos de depuración de aguas residuales que se van a destinar a uso agrícola (Directiva Europea 86/278/EEC).

**Tabla II.9.-** Características de los lixiviados correspondientes a los lodos incluidos en la Tabla II.6. Concentraciones expresadas sobre kg de materia seca (lodo).

PARÁMETRO	Lodo A	Lodo B	Lodo C	Lodo D	MÉTODO
pH(1:5)	6,45	6,53	6,67	6,44	pH metro
Conduc. Eléctrica (dS/m) (1:5)	3,1	3,4	3,7	3,6	Conductivímetro
COT (g/Kg)	0,5	0,6	0,5	0,3	Analizador elemental
Cloruros (g/kg)	0,7	0,8	0,7	0,6	Extr. acuosa (cromat. iónica)
Sulfatos (g/kg)	1,1	1,2	0,9	1,1	Extr. acuosa (cromat. iónica)
Nitritos (mg/kg)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	Det. Por HPLC
Fenoles (mg/kg)	19,0	13,0	11,0	12,0	Método espectrofotométrico
Amonio (mg/kg)	244,6	311,3	257,4	260,4	Extr. KCl (Electr. Selectivo)
Disolventes clorados (mg/kg)	<1	<1	<1	<1	Extr. Orgánica (det. CG)
Arsénico (mg/kg)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	ICP óptico
Plomo (mg/kg)	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	ICP óptico
Mercurio (mg/kg)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	ICP óptico
Cadmio (mg/kg)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	ICP óptico
Niquel (mg/kg)	4,88	5,00	4,78	5,02	ICP óptico
Zinc (mg/kg)	2,42	2,06	3,12	2,76	ICP óptico
Cobre (mg/kg)	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	ICP óptico
Cromo (mg/kg)	0,09	0,06	0,07	0,08	ICP óptico
Hidrocarburos totales (mg/kg)	66,0	39,0	56,0	43,0	Extr. con Soxhlet

La presencia de estos metales no debe resultar inhibitoria para los microorganismos de la zona, puesto que se encuentran en concentraciones inferiores a aquellas consideradas como dosis tóxicas a nivel ecológico (Moreno *et al.*, 2002 y 2003), además de mantenerse en todos los casos por debajo de los niveles límites establecidos para el uso agrario de lodos de depuración de aguas residuales, aunque es cierto que el aporte de lodos de refinería de forma reiterativa puede elevar considerablemente el nivel de metales en el suelo (Marín, 2004).

El análisis de los lixiviados de estos lodos, ha puesto de relieve el contenido de una cierta cantidad de hidrocarburos y de altas cantidades de fenoles y sulfatos (Tabla II.9). Asimismo, ha puesto de manifiesto que el elemento metálico más abundante, al igual que ocurría en los lodos, es el Zn, seguido por el Ni. Esto podría suponer un potencial riesgo de contaminación de aguas subterráneas por continuas adiciones de lodos, por lo que se debe tener en cuenta la recogida y tratamiento de los lixiviados para evitar una contaminación medioambiental. No obstante, dada la escasez de lluvias en la zona de estudio y la baja permeabilidad de los suelos de esta zona, el riesgo de lixiviación es bastante escaso, a pesar de ello se colocaron piezómetros para determinar la potencial lixiviación de estos metales pesados y de otros contaminantes a capas profundas del suelo, sin encontrarse problemas en este sentido, posiblemente debido a la baja movilidad de estos contaminantes en este tipo de suelo (pH alcalino, alto contenido en arcillas y carbonato cálcico). También se realizó un estudio geológico de la zona, en el que se determinó que el nivel freático se encontraba muy distante de la zona de aplicación del landfarming.



Según indica Thavamani *et al.* (2012), la co-presencia de metales e hidrocarburos puede dar lugar a una selección de especies de microorganismos capaces de sobrevivir a la presencia de ambos contaminantes por lo que la diversidad microbiana disminuye en suelos con ambos contaminantes. Sin embargo, Máthé *et al.*, (2012) indicaron que esta disminución de la diversidad microbiana era mayor en presencia únicamente de hidrocarburos que cuando se encuentran presentes tanto hidrocarburos como metales pesados. Son muchos los trabajos que indican que la biorremediación de contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos, se ve afectada negativamente por la presencia de metales, aunque se ha demostrado que existen consorcios bacterianos capaces de sobrevivir en presencia de ambos contaminantes y conseguir una buena degradación de los hidrocarburos (Thavamani *et al.*, 2012).

El suelo de la zona de experimentación donde se han venido depositando estos lodos de refinería presenta, como era de esperar, un alto contenido de hidrocarburos, y una conductividad eléctrica elevada (Tabla II.10).

**Tabla II.10.-** Características del suelo de la zona de experimentación empleado en este estudio. Los datos corresponden al valor medio de 5 muestras de suelo (0-30 cm).

PARÁMETROS	VALOR
pH (1:25)	7,35
Conductividad eléctrica (CE) (1:5), dS/m	2,5
Contenido de hidrocarburos totales, (%)	5,0
Carbono orgánico total, (%)	7,4
Nitrógeno total, (g/kg)	2,2
Carbono hidrosoluble, (mg/kg)	593
Carbohidratos solubles, (mg/kg)	61
Fenoles, (mg/kg)	164
Fósforo total, (g/kg)	0,6
Potasio total, (g/kg)	4,6
K asimilable, (g/kg)	0,19
Ca asimilable, (g/kg)	4,31
Mg asimilable, (g/kg)	0,58
Na asimilable, (g/kg)	52,9
Carbonatos totales, (g/kg)	153
Caliza activa, (g/kg)	72,7
Cu, (mg/kg)	68
Zn, (mg/kg)	422
Pb, (mg/kg)	144
Ni, (mg/kg)	48
Cd, (mg/kg)	<2,5
Cr, (mg/kg)	20

El alto contenido de carbonatos del suelo propicia un valor de pH neutro, debido a la capacidad tamponadora de este tipo de compuestos, en el cual se verán favorecidos los procesos de actuación de los microorganismos sobre los hidrocarburos, ya que se encuentra dentro del intervalo óptimo de pH, entre 6 y

8, según recomienda la EPA (1993), para que el proceso biodegradativo que pretendemos realizar mediante el landfarming, se desarrolle con éxito (Dibble and Bartha, 1979; Marín, 2004). Este pH neutro inhibe, asimismo, la movilidad de los metales también presentes en el suelo (EPA, 1993).

Los microorganismos obtienen parte de los nutrientes que necesitan de la fracción mineral del suelo, por lo que se debe tener en cuenta la composición del mismo para acometer un proceso de landfarming. Los nutrientes que necesitan los microorganismos son principalmente macronutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio; y micronutrientes como el hierro, manganeso, zinc y cobre. En este sentido, el suelo a tratar muestra un potencial nutricional débil, tal y como corresponde a suelos de zonas semiáridas, pobres en materia orgánica, y con escasa cobertura vegetal.

Esto nos hace pensar que la adición de biosólido (compostado o no) antes del proceso de landfarming posiblemente favorecerá la degradación de los hidrocarburos existentes en el suelo, ya que además de aportar materia orgánica (C orgánico), biomasa microbiana y enzimas, este material orgánico aporta nutrientes minerales, lo que favorecerá el desarrollo de las poblaciones autóctonas del suelo (Hutchinson et al., 2001). Así, Margesin (2007) observó que suelos contaminados con hidrocarburos, enmendados con fertilizantes orgánicos ricos en N, P y K, mostraban un nivel de degradación de hidrocarburos totales derivados del petróleo (HTP) del 74%, 65%, 54% y 40% dependiendo de que el nivel inicial de contaminación del suelo, fuese de 2500, 5000, 10.000, o 20.000 mg/kg de HTP, respectivamente.

El suelo utilizado en este estudio presentaba un contenido de HTP de 50.000 mg/kg, aproximadamente, siendo en su mayoría recalcitrantes (Marín, 2004), puesto que se trata de hidrocarburos que proceden de lodos de refinería depositados desde hace años en la zona experimental, la cual ha recibido un tratamiento de biorremediación previo a nuestro ensayo, por lo que han desaparecido los hidrocarburos más sencillos y fáciles de degradar. Los hidrocarburos totales representan todos los compuestos de dichos hidrocarburos, incluyendo aquellos pesados difíciles de determinar por cromatografía, así como los más recalcitrantes. En esta componente se incluyen, por lo tanto, a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, naftalenos, fenantrenos, y parte de los hidrocarburos pesados (C>18). Aunque en este ensayo en campo analizaremos algunos componentes específicos, en general realizaremos una monitorización de la concentración de HTP.

### **Diseño Experimental**

Una vez caracterizada la zona a descontaminar y establecida la posibilidad de realizar con éxito el proceso de landfarming, se procedió a la demarcación y preparación de las parcelas experimentales en la zona de estudio. Se establecieron 12 parcelas de 6 x 10m (60m<sup>2</sup>) con los siguientes tratamientos:

- 3 parcelas sin tratamiento alguno, a fin de estimar la degradación de hidrocarburos conseguida mediante atenuación natural (AN) y que servirá de referencia para evaluar la eficacia del tratamiento de landfarming.

- 3 parcelas con adición de 180 t/ha de biosólido granulado que serán sometidas a landfarming (B+LF),
- 3 parcelas con adición de 180 t/ha de compost de biosólido que serán sometidas a landfarming (C+LF)
- 3 parcelas sin adición de enmienda orgánica pero a las que se aplicará la técnica de landfarming (LF)



**Foto II.1.-** Fotografías correspondientes a diferentes fases de la adición de los materiales orgánicos a las parcelas experimentales y la homogenización del suelo con las enmiendas.

La dosis de biosólido y compost empleada fue la establecida como idónea para este tipo de suelo en el experimento de microcosmos descrito en el Capítulo I de esta Memoria. Tanto el biosólido como el compost de biosólido se esparcieron sobre la superficie de las parcelas a la dosis óptima establecida (180 t/ha), homogeneizándose con el suelo de la parcela mediante arado, utilizando para ello un tractor provisto de subsolador de profundidad (1-1.5m). Igualmente, en todas las parcelas excepto las parcelas en atenuación natural, se procedió periódicamente al movimiento de tierra (arado de profundidad), lo cual se considera imprescindible para que esta técnica de landfarming sea efectiva, con el fin de oxigenar el suelo de las parcelas y de mezclar en profundidad los materiales orgánicos con el suelo en aquellas parcelas que habían recibido enmienda orgánica. La experiencia adquirida por el grupo en estudios anteriores de landfarming con lodos de refinería de petróleo nos llevó a establecer que la aireación (arado) mensual era la frecuencia más aconsejable en este proceso, ya que mantiene una óptima relación entre costos y eficiencia.

Ya que la humedad es un factor fundamental para conseguir una actividad elevada de las poblaciones microbianas capaces de degradar hidrocarburos, y dado que las condiciones semiáridas imperantes en la zona determinan niveles muy bajos de humedad en el suelo, las parcelas se regaron por aspersión, cuando fue necesario, a fin de mantener el nivel de humedad mínimo del 30% establecido como necesario en el experimento pertinente realizado en microcosmos (Capítulo I de esta Memoria), para garantizar el mantenimiento de la actividad microbiana del suelo. Las características del biosólido granulado y compostado empleado en este ensayo se indicaron en la Tabla I.2.

Después de la incorporación de las enmiendas orgánicas y la primera aireación y homogenización, se tomaron muestras de suelo para el análisis de diversos parámetros (punto inicial), volviendo a muestrear las parcelas cada 2 meses durante los 8 meses que duró el proceso de landfarming. Para el muestreo, de cada parcela se tomaron tres muestras de los 0-20 cm superficiales, estando cada una de ellas constituida por seis sub-muestras de 150 cm<sup>3</sup>, las cuales se mezclaron para obtener la mezcla compuesta. En total, cada parámetro se analizó en 6 muestras (mezcla de 6 sub-muestras) para cada tratamiento.

En los suelos de las diferentes parcelas se determinó al inicio y a los 4 y 8 meses de biorremediación el contenido de n-alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>36</sub>); asimismo, al inicio y a los 2, 4, 6 y 8 meses de biorremediación se determinó el contenido de hidrocarburos totales (HTP). Además, se midieron una serie de parámetros indicadores de la calidad microbiológica del suelo tales como: carbono orgánico total (COT), respiración microbiana, carbono de biomasa microbiana, contenido de ATP, y actividades enzimáticas deshidrogenasa, fosfomonoesterasa alcalina, ureasa y β-glucosidasa, así como parámetros indicadores de fitotoxicidad en el medio edáfico (bioensayo de germinación con cebada y césped). Asimismo, al inicio y final del proceso de biorremediación, se llevó a cabo un estudio de diversidad estructural de la comunidad microbiana usando diversos métodos moleculares, con el fin de evaluar cómo afecta tanto el tratamiento de landfarming por sí sólo como este mismo tratamiento junto con adición de materiales orgánicos, al estatus de las poblaciones microbianas existentes en el suelo.

Para estudiar la biodiversidad estructural, se utilizaron técnicas moleculares como PCR, con las que se consigue amplificar el gen que codifica el ARNr de la sub-unidad 16S, de las moléculas de ADN extraídas directamente de la muestra de suelo, siendo dicho gen representativo de la comunidad bacteriana desde el punto de vista filogenético. Los amplicones conseguidos mediante PCR, son separados en un gel de electroforesis (DGGE) que genera distintas bandas en función de la secuencia y tamaño del fragmento de ADN de que se trate, cada una de las cuales representa y diferencia a distintos tipos de grupos y especies bacterianas presentes en la muestra. Es una técnica rápida y fácil de preparar que permite procesar varias muestras simultáneamente (Viñas, 2005), y permite estudiar los cambios de poblaciones bacterianas en los distintos tratamientos y tiempos de muestreo. En una segunda fase, se utilizaron técnicas de clonación del gen del ARNr 16S en *Escherichia coli*, para después secuenciar este gen y así construir librerías de clones

que nos permitiesen estudiar con mayor profundidad y precisión la composición y estructura de la comunidad bacteriana.

### **Evolución del contenido de hidrocarburos**

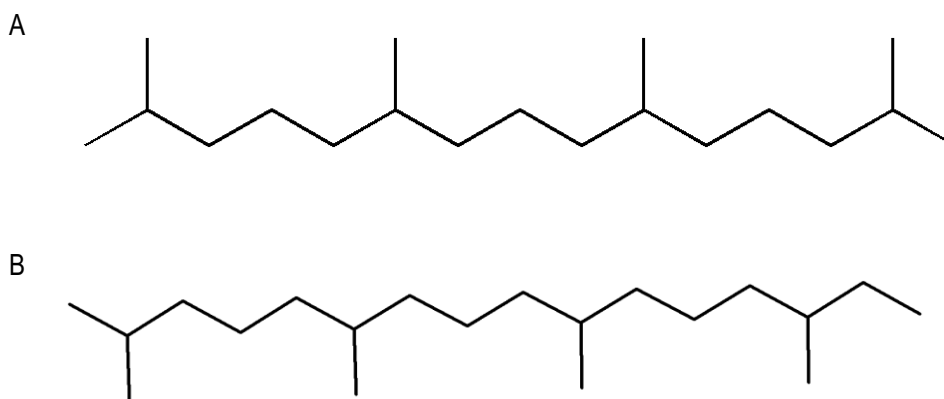
Como ya se ha indicado, la fuente de hidrocarburos del suelo de la zona experimental, ha sido el reciclado, durante más de 12 años, de lodos de refinería de petróleo con un contenido de hidrocarburos de entre 20 y 26 %, lo que supone que son unos lodos de refinería con una elevada concentración de hidrocarburos, y su tratamiento mediante landfarming (Marín, 2004). Las bacterias degradadoras de hidrocarburos, están involucradas en la descomposición de los compuestos orgánicos mediante su biotransformación en metabolitos menos complejos o hasta su mineralización completa en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Haritash y Kaushik, 2009), sin embargo, la naturaleza exacta de los hidrocarburos remanentes en el suelo no es del todo conocida; probablemente están compuestos por cadenas ramificadas de alcanos, policíclicos saturados (naftalenos) y aromáticos, los cuales pueden tener cadenas laterales de alquilo (Jorgensen *et al.*, 2000).

Así, la proporción de hidrocarburos recalcitrantes detectada en el suelo después de varios años de landfarming, obtenida a partir de los análisis realizados de estos hidrocarburos en el suelo estudiado es variable (un 99,8% del total, aproximadamente), consistiendo fundamentalmente en hidrocarburos saturados (parafinas) e hidrocarburos aromáticos (olefinas, alquíl-bencenos, naftalenos, fenantrenos etc.), lo que pone de manifiesto que los hidrocarburos más ligeros y fáciles de degradar han sido ya degradados, y nos encontramos con un suelo enriquecido en hidrocarburos más pesados y de más difícil degradación. Esto se explica porque el aporte de hidrocarburos a la zona experimental no es reciente, sino que los lodos de refinería se han venido añadiendo periódicamente al suelo durante más de 12 años, habiendo recibido el suelo, como ya se ha indicado, un tratamiento de biorremediación (landfarming) previo al estudio actual, por lo que gran parte de los hidrocarburos más fácilmente biodegradables (alcanos saturados con cadenas de bajo número de C) que suponen el 53% de los hidrocarburos totales iniciales, habrán sido degradados por los microorganismos, quedando el suelo enriquecido en los hidrocarburos más recalcitrantes. No obstante, se ha considerado de interés el estudio no sólo de la evolución con el proceso de biorremediación del contenido de HTP, sino también de la fracción de hidrocarburos menos recalcitrantes como los n-alcanos de cadenas inferiores a 36 átomos de carbono.

#### *Evolución de los n-alcanos*

Una forma de complementar los resultados analíticos de HTP es realizar un seguimiento de la biorremediación por medio del análisis de los hidrocarburos que se conocen normalmente como *biomarcadores* o *trazadores*. Los hidrocarburos biomarcadores han sido de gran utilidad en la evaluación de la efectividad de la biorremediación de vertidos de petróleo, particularmente cuando se utilizan métodos de

degradación de residuos de petróleo en los que intervienen microorganismos (Ortiz *et al.*, 2003). Existen varios tipos de biomarcadores, algunos, como los hidrocarburos alifáticos, se han utilizado para evaluar la biorremediación en sus primeras fases después de una contaminación con petróleo. Los isoprenoides *pristano* y *fitano* (Figuras II.12 A y B), son alcanos ramificados de 19 y 20 átomos de C respectivamente.



**Figura II.12.-** Fórmula estructural del pristano (A) y fitano (B)

Considerados los isoprenoides más abundantes en el petróleo, y con una degradación lenta, siendo incluso más estables que los alcanos lineales (parafínicos) (Prinik *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1992) y por este motivo el estudio de la evolución del cociente n-C17/pristano o n-C18/fitano se ha empleado en algunos estudios para estimar la degradación microbiana de los alcanos lineales; pero en seguimientos de degradación de hidrocarburos a corto plazo, solamente se han podido utilizar como biomarcadores durante las primeras semanas del vertido (Bragg *et al.*, 1994).

Sin embargo, para estudios de biorremediación a más largo plazo o en presencia de bacterias degradadoras de alcanos ramificados, el contenido total de fitano o de pristano por sí solo, se puede emplear como marcador o trazador interno, al igual que el del n-C<sub>18</sub> (Ortiz *et al.*, 2003). Puesto que en nuestro ensayo de biorremediación trabajamos con hidrocarburos recalcitrantes donde predominan los hidrocarburos más difíciles de degradar como los alcanos ramificados, utilizaremos por sí solos los mencionados alcanos como referencia.

Como se puede apreciar en la Figura II.13, estos biomarcadores (contenido de fitano, pristano y n-C<sub>18</sub>) reflejan la efectividad de la técnica de landfarming en la degradación de alcanos ramificados y n-alcanos más recalcitrantes, y que esta degradación tiene lugar mayormente en los 4 primeros meses del proceso de biorremediación.

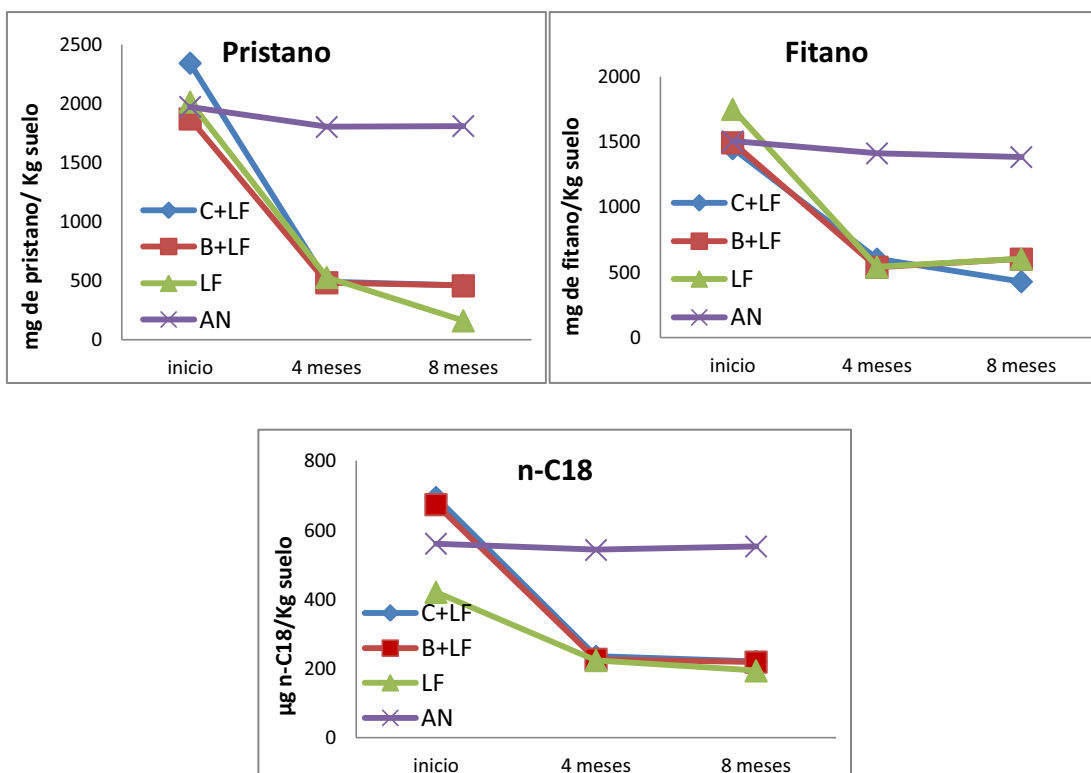


Figura II.13.- Evolución de los contenidos de fitano, pristano y alcanos n-C18 durante el proceso de landfarming en los diferentes tratamientos en estudio. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.6 del Anexo.

En la Figura II.14 se muestran los porcentajes de degradación de los isoprenoides fitano y pristano durante los 8 meses de biorremediación. En ella, se pone de manifiesto, asimismo, que la degradación tiene lugar mayormente en los 4 primeros meses, ya que las diferencias entre los valores a los 4 y 8 meses son pequeñas.

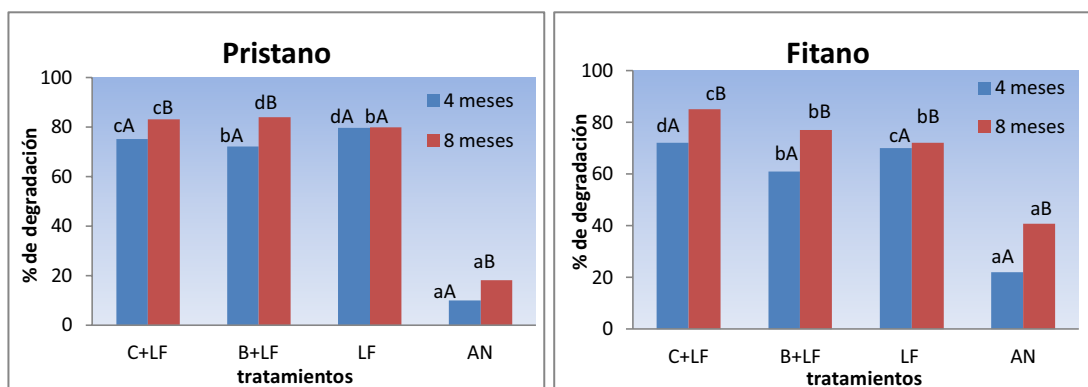


Figura II.14.- Porcentaje de degradación de pristano y fitano con los diferentes tratamientos en estudio después de 4 y 8 meses de landfarming. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

El contenido de hidrocarburos alifáticos totales ( $C_{10}$ - $C_{36}$ ) en estos suelos era bajo, del orden de ppb constituyendo tan solo una pequeña porción de los hidrocarburos totales presentes en el suelo. En la Figura II.15 se muestra el porcentaje de degradación de estos hidrocarburos ( $C_{10}$ - $C_{36}$ ) alcanzado en los suelos de los diferentes tratamientos después de 4 y 8 meses de biorremediación. Asimismo, en la Tabla II.9 se muestran los porcentajes de degradación de diferentes grupos de hidrocarburos alifáticos conseguidos con los diferentes tratamientos en los mismos puntos de muestreo del proceso de biorremediación.

**Tabla II.9.-** Porcentaje de degradación de n-alkanos ( $C_{10}$ - $C_{36}$ ) con los diferentes tratamientos en estudio después de 4 y 8 meses de landfarming.

Grupo de hidrocarburos	4 meses de landfarming				8 meses de landfarming			
	LF	B+LF	C+LF	AN	LF	B+LF	C+LF	AN
<b>C&lt;12</b>	42,53 b	N.D.	42,59 b	0 a	43,02 b	N.D.	56,05 c	0 a
<b>C<sub>13</sub>-C<sub>18</sub></b>	24,78 b	50,81 d	47,91 c	3,06 a	42,63 b	60,13 d	55,35 c	3,06 a
<b>C<sub>19</sub>-C<sub>28</sub></b>	53,16 d	22,96 b	38,49 c	0 a	55,47 c	22,96 b	76,05 d	0 a
<b>C<sub>29</sub>-C<sub>36</sub></b>	34,75 c	63,39 d	22,45 b	0 a	34,75 c	69,10 d	22,45 b	0 a

Para cada grupo de hidrocarburos, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ). N.D. indica no detectado.

Como puede observarse, el nivel más alto de degradación de las diferentes fracciones n-alkanos, ocurre también durante la primera fase de 4 meses siendo los porcentajes de degradación significativamente diferentes entre los distintos tratamientos tanto a los 4 como a los 8 meses de biorremediación. Después de 8 meses de biorremediación la mayor degradación de los n-alkanos  $C_{10}$ - $C_{36}$  se observó en el tratamiento con biosólido (55%), seguido del tratamiento con compost (50%) y el tratamiento de landfarming sin enmienda (41%) (Figura II.15).

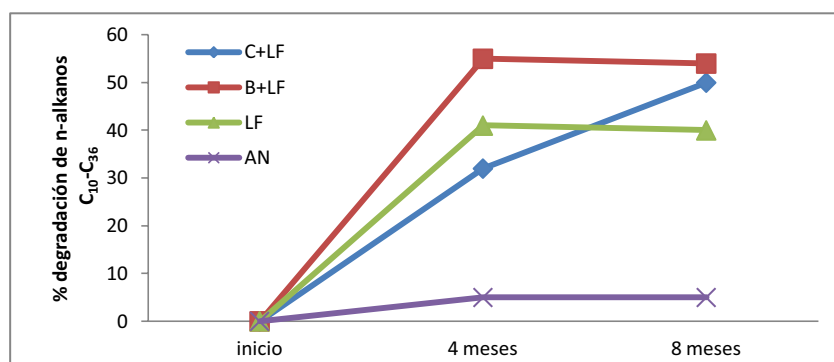
En cuanto a la influencia del tiempo en el porcentaje de degradación de los hidrocarburos, solamente se observaron diferencias significativas entre el nivel de degradación conseguido a los 4 y a los 8 meses, en aquellos suelos que habían recibido compost como enmienda, lo cual, puede ser debido a que el efecto que ejerce el compost sobre las poblaciones microbianas es más paulatino y a largo plazo, que cuando se aporta biosólido sin compostar, debido a la mayor estabilidad de la materia orgánica contenida en el compost (García *et al.*, 2002).

La degradación de alcanos totales en el suelo en atenuación natural era muy escasa mientras que la aplicación de la técnica de landfarming ha permitido, en todos los casos, la degradación de una proporción considerable de los alcanos presentes en el suelo (Tabla II.9).

La degradación de alcanos era mucho mayor en los suelos bajo landfarming que habían recibido la incorporación de enmienda orgánica (biosólido granulado o compostado), observándose pocas diferencias aunque estadísticamente significativas, entre los niveles de degradación de alcanos conseguidos con cada



una de estas enmiendas. Shahsavari *et al.* (2013), observaron también mayor tasa de degradación de hidrocarburos en suelos que habían incorporado residuos de plantas como enmiendas frente a los suelos control sin enmiendas.



**Figura II.15.-** Porcentaje de degradación de n-alcános C<sub>10</sub>-C<sub>36</sub> con los diferentes tratamientos en estudio después de 4 y 8 meses de landfarming. Los resultados de ANOVA se muestran en la Tabla A.7 del Anexo.

Al igual que con los anteriores indicadores de biorremediación, se observa que la degradación de este tipo de hidrocarburos tiene lugar principalmente en los primeros 4 meses de landfarming, siendo la intensidad de degradación de alcanos mucho menor en meses posteriores. Esto se explica por la menor proporción de hidrocarburos fácilmente biodegradables que va quedando en el medio a medida que los microorganismos los van utilizando como fuente carbonada, aumentando en el suelo la proporción de aquellos hidrocarburos más difíciles de degradar por los microorganismos, con lo que la velocidad de degradación disminuye.

Esto concuerda, como veremos más adelante, con la disminución que se observa en la actividad metabólica global de los microorganismos a medida que avanza el proceso de landfarming. Trabajos como el de Wu *et al.* (2013), coinciden en estas observaciones, donde suelos con hidrocarburos, enmendados con dos tipos de compost, mostraban tasas de degradación de hidrocarburos mayores que los suelos no enmendados y esta degradación tenía lugar principalmente durante los 3 primeros meses de una incubación de 8 meses en total.

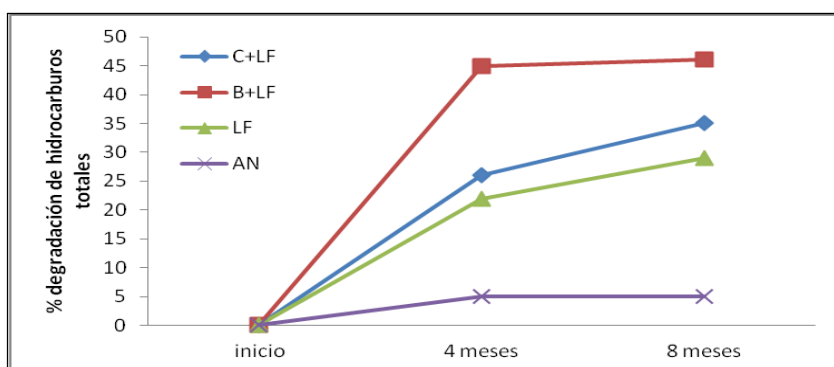
Como se ha comentado anteriormente, en todos los tratamientos la mayor degradación tenía lugar durante los primeros 4 meses. Esta observación sugiere la existencia de una comunidad bacteriana activa en este periodo (Kaplan and Kitts, 2004; Katsiveka *et al.*, 2005), capaz de degradar en primer lugar los hidrocarburos más sencillos, y que su actividad puede quedar inhibida pasada la primera etapa (después de los 4 meses iniciales aproximadamente), por una disminución de la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Alexander, 2000), la acumulación de metabolitos tóxicos derivados de los hidrocarburos (Casellas *et al.*, 1997), o el enriquecimiento en compuestos más recalcitrantes (Sabaté *et al.*, 2004). Tampoco la naturaleza exacta de los hidrocarburos remanentes es del todo conocida, probablemente consiste en alcanos con cadenas ramificadas, hidrocarburos aromáticos policíclicos condensados (naftalenos) y aromáticos, algunos

de los cuales pueden tener cadenas alquil (Jorgensen et al., 2000) y siendo todos ellos mas difíciles de degradar.

#### Evolución del contenido de hidrocarburos totales (HTP)

El contenido de HTP en el suelo identifica todos los hidrocarburos extractables al cloroformo de una muestra, abarcando a los distintos grupos que forman los hidrocarburos en general (aromáticos, alifáticos, etc.). En la Figura II.16 se muestran los porcentajes de degradación de hidrocarburos totales conseguidos con los diferentes tratamientos ensayados.

De nuevo se pone de manifiesto la eficacia de la técnica de landfarming para la biorremediación de suelos con hidrocarburos, mostrando los suelos sometidos a landfarming porcentajes de degradación de hidrocarburos totales muy superiores a los del suelo en atenuación natural, en el que el porcentaje de degradación de hidrocarburos totales conseguido en 8 meses era muy bajo (5 %). El porcentaje de degradación de hidrocarburos después de los 8 meses de landfarming osciló entre un 31% en el suelo sin enmienda orgánica, y un 46% en el suelo con adición de biosólido granulado (Figura II.16).



**Figura II.16.-** Porcentaje de degradación de los hidrocarburos totales con los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.8 del Anexo.

Los datos mostrados en la Figura II.16, independientemente del tratamiento, se ajustan a la ecuación de Vecchioli (1998):

$$C_t = a e^{-kt} + b,$$

Esta ecuación representa dos fases de la degradación de hidrocarburos en el suelo, una degradación inicial rápida de la fracción más lábil de los hidrocarburos, seguida de una fase lenta en la que se degradarán los más recalcitrantes. Así, observamos que en todos los tratamientos de biorremediación, el proceso de degradación de los hidrocarburos totales del suelo, siguió un patrón de degradación similar, en el cual puede diferenciarse claramente las dos fases indicadas anteriormente: una fase rápida inicial, con una duración de

4 meses, que se corresponde con la descomposición de los hidrocarburos más lábiles, y una segunda fase más lenta, durante la cual comienzan a degradarse los hidrocarburos más recalcitrantes (Figura II.16).

Con la incorporación de enmiendas orgánicas se trata de incentivar a los microorganismos involucrados en la degradación de los hidrocarburos y de esta manera conseguir mejorar los porcentajes de degradación, así como favorecer la desorción de los hidrocarburos de la matriz del suelo y hacerlos más biodisponibles. Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto a los beneficios de incorporar enmiendas orgánicas a los suelos con hidrocarburos para mejorar su biorremediación, puesto que no en todos los casos se han observado resultados positivos. Así, Schaefer y Juliane (2006), en un experimento en el que se incorporaron residuos orgánicos industriales (residuos de café, hortícolas y de la producción de cerveza) a suelos con hidrocarburos, no observaron cambios en cuanto a la degradación de hidrocarburos con respecto a los suelos control. Rhykerd *et al.* (1995), Bradock *et al.* (1997) y Gallego *et al.* (2001) indicaron también que los tratamientos con enmiendas orgánicas no ejercían un efecto positivo sobre la degradación de hidrocarburos, atribuyendo este hecho al exceso de salinidad producido por la incorporación de nutrientes o debido a la cantidad significativa de substratos orgánicos aportados con las enmiendas orgánicas, que los microorganismos prefieren como fuente de nutrientes y energía por encima de los hidrocarburos, que son más difíciles de biodegradar. Sin embargo, en otros trabajos como el de Wu *et al.* (2012), se observaron importantes incrementos en la degradación de hidrocarburos (de hasta el 90% de los hidrocarburos totales) con la incorporación al suelo de dos tipos de composts. También los trabajos de Lee (2007) y Adesodun, (2007) pusieron de relieve una mayor reducción del contenido de hidrocarburos en los suelos a los que incorporaron diversos tipos de enmiendas orgánicas con respecto a sus controles. Resultados similares fueron observados por Adesodun y Mbagwu (2008) y Lee *et al.* (2008) en suelos con hidrocarburos enmendados con compost de estiércol de corral y de cerdo, respectivamente.

En nuestro estudio (Figura II.16), se observó un mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos en los tratamientos con enmienda orgánica adicionada en una dosis de 180 t ha<sup>-1</sup>. El mayor porcentaje de degradación (45%) de los hidrocarburos totales durante la fase inicial se observó en los suelos tratados con adición de biosólido granulado, seguido de los tratados con compost y los no enmendados (27% y 22% respectivamente). En la segunda fase, la tasa de degradación fue menor que en la primera. Después de 8 meses de biorremediación el tratamiento con biosólido granulado presentó los porcentajes de degradación más altos (46%), seguidos de los tratamientos con compost (36%) y sin enmendar (31%).

La mayor tasa de biodegradación observada en los suelos tratados con aporte de biosólido, puede ser debida a los altos contenidos en nutrientes (N y P) que presenta esta enmienda (Tabla I.2) y que son aportados al suelo. El tratamiento con adición de compost mostró menor degradación de hidrocarburos que el tratamiento con biosólido, probablemente debido a los complejos que forman los hidrocarburos con la materia orgánica del compost (Swindoll *et al.*, 1998) que los hacen menos biodisponibles y a la menor cantidad de substratos fácilmente degradables que se aportan con el compost.

Esta dinámica de degradación de los hidrocarburos observada, concuerda con estudios anteriores como el de Marín *et al.* (2004) o Morelli *et al.* (2005), en ambos trabajos se indican unos porcentajes de degradación altos del orden del 80% y 77-92%, respectivamente. Estos porcentajes de degradación son superiores a los observados en este estudio, lo cual puede explicarse por el hecho de que en el ensayo de campo realizado en este trabajo, los hidrocarburos existentes en el suelo son en su mayor parte, aquellos más recalcitrantes y difíciles de movilizar, ya que se trata de suelos con un aporte reiterado de lodos de refinería, desde hace más de 12 años y que han sufrido un proceso de landfarming previo a este ensayo. Margesin *et al.* (2000) y Langbehn y Steinhart (1995) entre otros, indican que durante un proceso de landfarming, como el que han sufrido los suelos que estudiamos en este trabajo, en primer lugar se degradan más rápidamente los hidrocarburos lábiles y con estructura mas sencilla, quedando en una etapa de degradación más lenta, aquellos más complejos y por tanto menos biodisponibles para ser biodegradados, como pueden ser los aromáticos, cicloalcanos condensados, etc., por lo que el porcentaje y dinámica de degradación, aplicando landfarming exclusivamente en estos suelos, será menor del que se ha observado en lugares donde esta técnica se ha aplicado en suelos donde se han incorporado hidrocarburos más lábiles.

### **Evolución de las características del suelo durante el proceso de landfarming**

Con objeto de evaluar no sólo la biodegradación de los hidrocarburos existentes en el suelo, sino cómo se ve afectada la actividad microbiológica de los suelos donde se realiza el mencionado proceso de landfarming, se monitorizaron una serie de parámetros abióticos y microbiológicos indicadores de la calidad del suelo durante dicho proceso.

#### Conductividad eléctrica y pH

El pH es un parámetro importante del suelo ya que afecta a la disponibilidad de los nutrientes y al desarrollo y la actividad biodegradadora de los microorganismos. Muchas bacterias heterotróficas y hongos necesitan un pH cercano a la neutralidad para desarrollarse, aunque los hongos son, en general, más tolerantes a condiciones de acidez (Atlas, 1988). En el rango de pH entre 6-7,5 los nutrientes se encuentran disponibles para la planta y los microorganismos, y además, estos últimos pueden desarrollarse con normalidad. Los suelos con hidrocarburos utilizados en este ensayo de campo, mostraban valores de pH ligeramente inferiores a los del suelo control, no afectando la adición de las enmiendas orgánicas al valor de este parámetro (Tabla II.10).

Además, todos los suelos con hidrocarburos y con tratamiento de *landfarming*, tenían unos valores de pH dentro del rango (6-9) que la EPA (1993) considera como óptimos para el desarrollo de la biorremediación. Los valores iniciales de pH en estos suelos oscilaban entre 7,1 y 7,6 sufriendo una ligera variación, que no era significativa, a lo largo de los 8 meses de landfarming.

**Tabla II.10.-** Evolución de los valores de pH y conductividad eléctrica (CE) en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming.

Tratamiento	pH				
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
Suelo+Compost	7,2 bA	7,3 bBC	7,5 cD	7,3 aB	7,4 aCD
Suelo +Biosólido	7,1 aA	7,2 aB	7,3 aC	7,3 aC	7,4 aD
Suelo sin enmienda	7,1 aA	7,3 bB	7,4 bC	7,4 bC	7,4 aC
Atenuación Natural	7,6 cA	7,6 cA	7,8 dB	7,6 cA	7,6 bA
Control	8,6 dD	8,0 dB	8,4 eC	7,8 dA	7,8 cA
Tratamiento	Conductividad Eléctrica, dS/cm				
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
Suelo+Compost	2,7 cA	3,7 dB	2,9 bA	2,5 bcA	2,6 cA
Selo +Biosólido	3,4 dB	3,4 cB	3,3 bAB	2,7 cA	2,8 cA
Suelo sin enmienda	2,7 cAB	3,7 dC	2,8 bB	2,5 bcA	2,5 cA
Atenuación Natural	2,1bAB	3,3 bC	2,8 bBC	2,3 bAB	1,8 bA
Control	0,3 aA	0,6 aC	0,6 aC	0,4 aB	0,8 aD

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

El valor de conductividad eléctrica (CE) es un fiel reflejo del contenido de sales solubles de un suelo. Como puede apreciarse en la Tabla II.10 todas las parcelas en estudio presentaban inicialmente valores muy elevados de CE (entre 2,7 y 3,4 dS m<sup>-1</sup>) muy superior al del suelo control sin hidrocarburos (0,3-0,8 dSm<sup>-1</sup>), lo que es sin duda debido a la gran cantidad de sales aportadas al suelo con las adiciones frecuentes de lodos de refinería. Estos valores de CE en algunos casos sobrepasaban el umbral establecido para considerar a un suelo como salino (2 dS/m). Según indica la EPA (1993) valores entre 2 y 4 dS m<sup>-1</sup> pueden resultar inhibitorios para la actividad microbiana. La salinidad de los suelos, actúa como factor limitante para el correcto desarrollo de los microorganismos que alberga, afectando no sólo a la actividad de los microorganismos y su crecimiento, sino también a la composición de la comunidad microbiana (Llamas *et al.* 2008), lo que indica que no todas las especies o grupos presentan la misma tolerancia al potencial osmótico de estos suelos con altas concentraciones de sales (Mandeeel 2006). Chowdhury (2011) observó una disminución de la biomasa microbiana y una variación de la estructura de las comunidades microbianas en suelos con hidrocarburos debido a su salinidad. Todo esto, pone de relieve la importancia de este parámetro para determinar un óptimo desarrollo del proceso de biorremediación.

Los valores de conductividad tendían a disminuir con el tiempo, pero sólo ligeramente ya que el clima semiárido que impera en la zona no propicia el lavado de sales por efecto de las lluvias, al ser éstas muy escasas. El control de este parámetro es necesario cuando se aplica la técnica de landfarming, ya que un exceso de sales puede inhibir la actividad y el desarrollo de los microorganismos encargados de la degradación de los hidrocarburos, por lo que habrá que controlar que no se rebasen ciertos límites. García y Hernández, (1996), confirmaron que un exceso de salinidad ejerce un efecto negativo sobre las poblaciones microbianas y su actividad, principalmente cuando la salinidad era causada por cloruros o sulfatos.

Por otra parte, el contenido de sales es también un factor limitante en el desarrollo de la mayor parte de las especies vegetales (Chowdhury, 2011), hecho a tener muy en cuenta a la hora de abordar la técnica de fitorremediación prevista en esta zona, y la revegetación de la misma, ya que habrá que buscar especies que, aparte de adaptarse a un medio con presencia de hidrocarburos, sean resistentes a la salinidad existente, aunque la adición de enmiendas orgánicas, posiblemente pueda amortiguar los efectos negativos de la concentración de las sales aportadas por los lodos de refinería sobre la comunidad microbiana del suelo y sobre las plantas (Ros *et al.*, 2003).

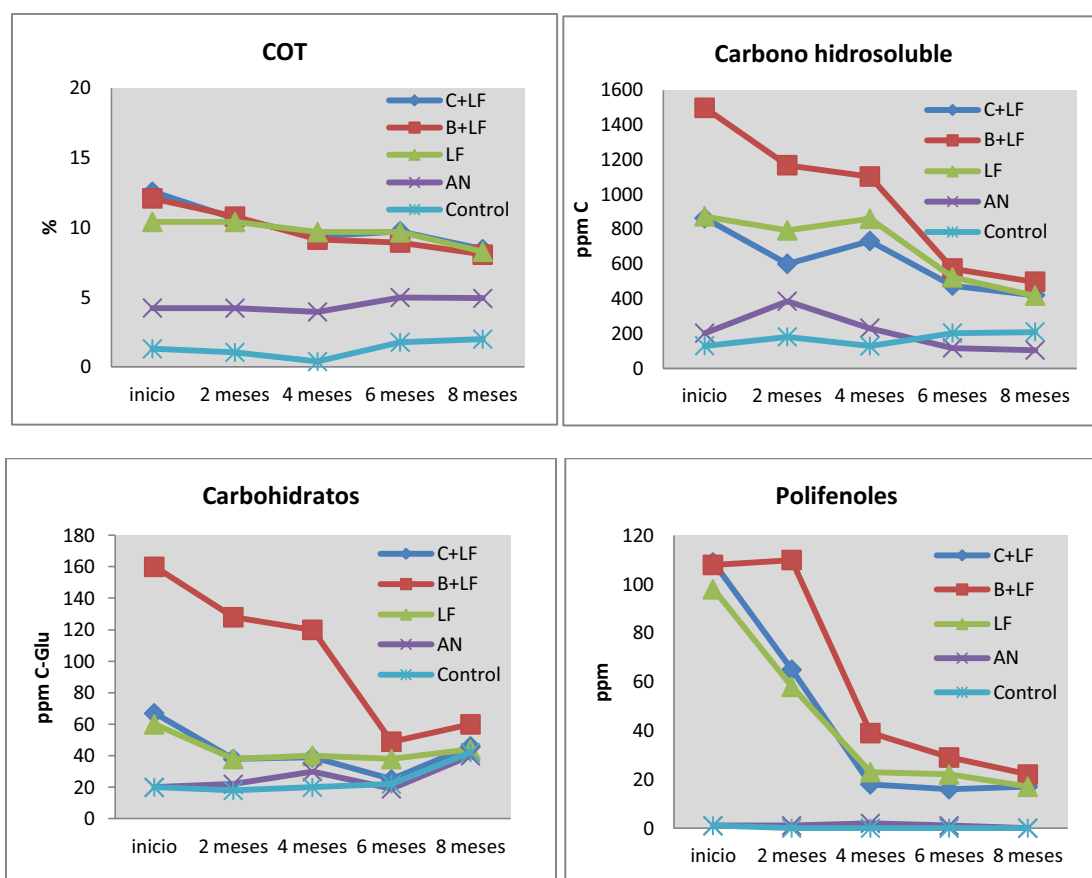
### Evolución del carbono y sus fracciones

El carbono orgánico total (COT) incluye todos aquellos compuestos orgánicos susceptibles de ser oxidados en los diferentes procesos que tienen lugar en el suelo. Este parámetro se incluye dentro del conjunto de parámetros que se deben determinar cuando queremos conocer la calidad de un suelo. Sabemos que el contenido en carbono orgánico del suelo (materia orgánica) y su fertilidad, están estrechamente relacionados, de ahí el interés del mencionado parámetro. Sin embargo, este hecho no siempre es cierto, pues cuando existe en el suelo un contaminante orgánico, el valor del COT aumentará, lo cual no es sinónimo de mejora de la calidad de ese suelo.

Los valores de COT obtenidos (Figura II.17) reflejan claramente que los hidrocarburos aportados a estos suelos con los lodos de refinería incorporan carbono orgánico oxidable al mismo, mostrando todas las parcelas con hidrocarburos valores de COT muy superiores a los del suelo control como ocurre en otros trabajos como el de Dawson *et al.* (2007).

Tenemos que tener presente que el carbono procedente de los hidrocarburos formará parte, sin duda, del carbono oxidable que medimos en este caso. La adición de biosólido granulado y compost a este suelo con hidrocarburos incrementó inicialmente el contenido de COT del mismo ya que estos materiales contienen una considerable cantidad de materia orgánica. Con el tiempo, la materia orgánica añadida y la que ya posee el suelo se va mineralizando observándose a partir de los 4 meses de experimentación una disminución del COT en los suelos tratados con landfarming, llegando a tener valores semejantes de COT en todas las parcelas sometidas a landfarming, independientemente de que hayan recibido o no aporte de enmienda orgánica (Figura II.17), esto mismo fue observado en otros trabajos como los de Ceccanti *et al.* (2003) y Riffaldi *et al.* (2005).

En el suelo control sin hidrocarburos, que no han recibido ningún aporte exógeno de materia orgánica, apenas varían los valores de COT, lo que indica lo poco reactiva a procesos de mineralización que es la escasa materia orgánica autóctona de este suelo.



**Figura II.17.-** Evolución del contenido de carbono orgánico total (%), y de las diferentes fracciones de carbono hidrosoluble (mg/kg suelo) en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de biorremediación. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla 9 del Anexo

Las fracciones más lábiles de carbono (carbohidratos solubles en agua y carbono hidrosoluble) pueden constituir una de las fuentes de energía más inmediatas para los microorganismos (Cook y Allan, 1992), y sus niveles constituyen el reflejo de la actividad microbiana potencial del suelo (García y Hernández, 2000).

Esta fracción hidrosoluble del carbono es una fracción muy dinámica en el suelo, ya que si bien es degradada con gran facilidad por los microorganismos, lo que contribuye a su disminución en el medio, está también demostrado que en el suelo tienen lugar procesos de síntesis de estos compuestos por parte de los microorganismos, además de ser factible su producción durante la degradación de compuestos orgánicos más complejos.

En la Figura II.17 se muestran los contenidos de C hidrosoluble total, así como los contenidos de las fracciones de carbohidratos y fenoles hidrosolubles, las cuales, forman parte de esta fracción de C hidrosoluble. Como puede observarse, la presencia en el suelo de hidrocarburos incrementa el contenido de estas fracciones hidrosolubles de carbono, presentando todos los suelos con hidrocarburos contenidos superiores a los del suelo control, como se observó en el trabajo de Marín *et al.* (2005) y de Bouchez *et al.* (1996). Este hecho se debe a que el lodo de refinería incorpora al suelo una pequeña proporción

hidrocarburos solubles en agua, que se incluyen en la fracción hidrosoluble de carbono (Marín, 2004). También es destacable que el tratamiento de landfarming de estos suelos con hidrocarburos favorece un incremento de C hidrosoluble en los mismos, posiblemente debido, por un lado, a que se crean las condiciones adecuadas (humedad y oxigenación) para la transformación de los hidrocarburos o la materia orgánica aportada por los lodos de refinería, y por otro, a que el tratamiento de los suelos mediante landfarming con arado profundo e irrigación permite la liberación de la materia orgánica soluble de los agregados del suelo, que según indicaron Mikkonen *et al.* (2012), está fuertemente adherida a la fracción más fina del suelo junto con los hidrocarburos, lo que dificulta la movilidad de estas moléculas.

La adición de biosólido granulado a estos suelos con hidrocarburos incrementaba, asimismo, el contenido de estas fracciones ya que este residuo orgánico contiene una materia orgánica poco estabilizada y por tanto, con un elevado contenido de fracciones de carbono fácilmente biodegradables (fracciones hidrosolubles de carbono). Sin embargo, el compost de biosólido, que posee una materia orgánica mucho más estabilizada debido al proceso de compostaje a que ha sido sometido el biosólido, no altera el contenido de estas fracciones en el suelo. Los microorganismos, que deben mantener una elevada actividad, usarán preponderantemente esta fracción de carbono hidrosoluble como fuente energía, de ahí el descenso de dicha fracción a lo largo del proceso de landfarming. Resultados similares se muestran en el trabajo de Riffaldi *et al.* (2005) en el que se comparan suelos sin hidrocarburos y suelos con hidrocarburos con y sin adición de compost, observando una disminución del valor del C hidrosoluble a lo largo del tiempo. Estos resultados también están en consonancia con los resultados mostrados por Ceccanti *et al.* (2003) en un estudio de biorremediación de suelos con hidrocarburos. No obstante, en el muestreo realizado a los 8 meses, los suelos con hidrocarburos enmendados con biosólido continuaban mostrando mayor contenido de carbono hidrosoluble que el suelo control. Este hecho puede ser interpretado en el sentido de que aún existen compuestos orgánicos lábiles capaces de promover la actividad de los microorganismos degradadores de los hidrocarburos.

#### Parámetros microbiológicos y bioquímicos del suelo.

El objetivo de este estudio ha sido determinar cómo se veía afectada la calidad microbiológica del suelo, en este ensayo en campo, por la presencia de hidrocarburos, así como los cambios que sufren los parámetros indicativos de esta calidad (microbiológicos y bioquímicos) con los tratamientos de biorremediación establecidos en este suelo (landfarming con y sin aporte de material orgánico). El conocimiento de la calidad biológica de estos suelos es fundamental para poder establecer si conservan poblaciones microbianas activas y con una funcionalidad específica para la degradación de los hidrocarburos incorporados a dichos suelos.

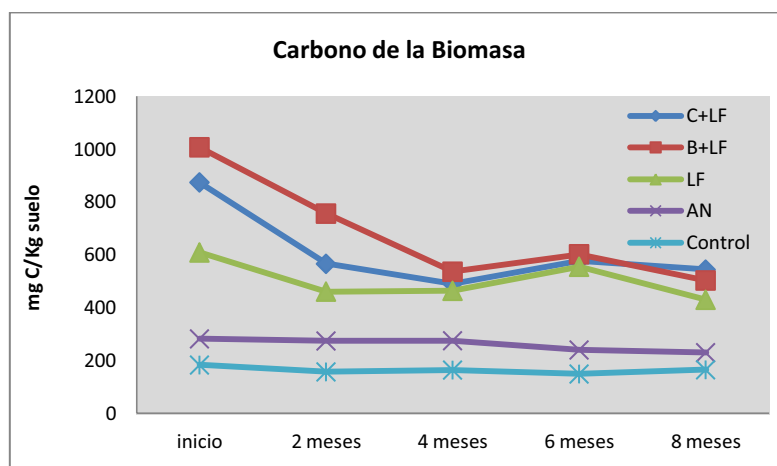


### Biomasa microbiana

Como puede observarse en la Figura II.18, la aplicación de la técnica de landfarming estimula el desarrollo de las poblaciones microbianas presentes en el suelo, presentando inicialmente todos los suelos sometidos a landfarming valores de carbono de biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ) superiores a los del suelo en atenuación natural, no sometido a landfarming (AN) y al suelo control, concordando con los resultados obtenidos para el COT.

Esto es explicable por el hecho de que esta técnica de biorremediación crea las condiciones más idóneas para el desarrollo microbiano mediante la oxigenación y humectación que proporciona al suelo. Este mayor desarrollo microbiano favorecerá la degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo ya que estos microorganismos utilizarán dichos hidrocarburos como sustrato carbonado para su metabolismo. Por otro lado, los suelos con hidrocarburos, con o sin aporte de enmienda, presentaban en todos los casos, un incremento de  $C_{mic}$ , lo que demuestra que la presencia de estos hidrocarburos, no solo no afecta negativamente a este parámetro sino que es capaz de estimular el desarrollo de las poblaciones microbianas (Caravaca y Roldán 2003).

La incorporación de enmienda orgánica (biosólido o compost de biosólido) incrementaba aún más el desarrollo de estas poblaciones microbianas con respecto al suelo en landfarming sin incorporación de enmienda, lo que concuerda con el trabajo de Lee *et al.* (2008), particularmente en el caso en el que se aplica el biosólido granulado.



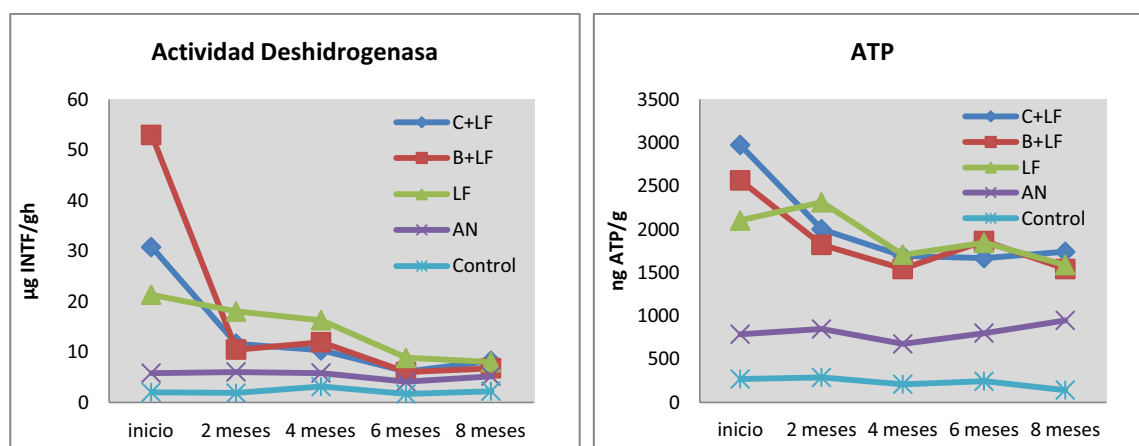
**Figura II.18.-** Evolución de los valores de carbono de biomasa microbiana en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.10 del Anexo.

El incremento de  $C_{mic}$  es consecuencia tanto de la estimulación de las poblaciones autóctonas del suelo, debido a los nutrientes y fuentes de carbono biodegradable que estos materiales incorporan al suelo, como de la propia biomasa microbiana también existente en ellos y que pasa a engrosar la que ya habita en el suelo. A lo largo del proceso de landfarming se observó una disminución de este parámetro (Figura II.18) que

es debida a la desaparición del medio de aquellos sustratos más fácilmente biodegradables a medida que los microorganismos los van degradando, quedando enriquecido el suelo en hidrocarburos más pesados y difíciles de degradar, con lo que el desarrollo de las poblaciones microbianas se ve frenado. No obstante, los valores de  $C_{mic}$  de los suelos bajo landfarming seguían siendo superiores a los del suelo en atenuación natural y el control después de 8 meses de landfarming, tal como observaron Lee *et al.* (2008).

#### Actividad microbiana global

Como ya se ha indicado anteriormente, parámetros como el contenido de ATP o la actividad deshidrogenasa son buenos indicadores de la actividad metabólica global de las poblaciones microbianas presentes en el suelo, y en este caso nos servirán como indicadores de la biodegradación potencial de los hidrocarburos presentes en el mismo. El ATP es un compuesto común en todos los seres vivos y su misión principal es la de actuar como molécula energética, utilizado en todos los procesos celulares bien como coenzima o sustrato (Eiland, 1985); por su parte, la deshidrogenasa es un complejo enzimático que interviene en las reacciones redox del metabolismo celular, por tanto es un enzima intracelular. La actividad deshidrogenasa de los suelos viene determinada por diferentes sistemas deshidrogenasas, los cuales se caracterizan por presentar una alta especificidad de sustratos. Estos sistemas son parte integral de los microorganismos, y a ello se debe su empleo para medir la actividad catabólica en el suelo (Bastida *et al.*, 2010).



**Figura II.19.-** Evolución de los contenidos de ATP y de actividad deshidrogenasa en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.11 del Anexo.

Tanto el contenido de ATP como la actividad deshidrogenasa experimentaron un acusado incremento con la aplicación de la técnica de landfarming (Figura II.19), siendo este incremento aún mayor en los suelos con adición de enmiendas orgánicas, particularmente en el caso del biosólido granulado, lo cual es indicativo de la gran reactivación de la actividad de las poblaciones microbianas existentes en el suelo como

consecuencia de la aireación y humectación proporcionada con el landfarming y del aporte orgánico realizado. Este comportamiento parece estar estrechamente relacionado con el  $C_{mic}$  (Marín, 2005).

Esta mayor actividad microbiana detectada en los suelos enmendados, podría llevar, en principio a una mayor degradación de hidrocarburos en estos suelos. Sin embargo, la actividad microbiana, estimada por la actividad deshidrogenasa y el contenido de ATP del suelo, tiende a igualarse con el paso del tiempo en los diferentes suelos bajo landfarming.

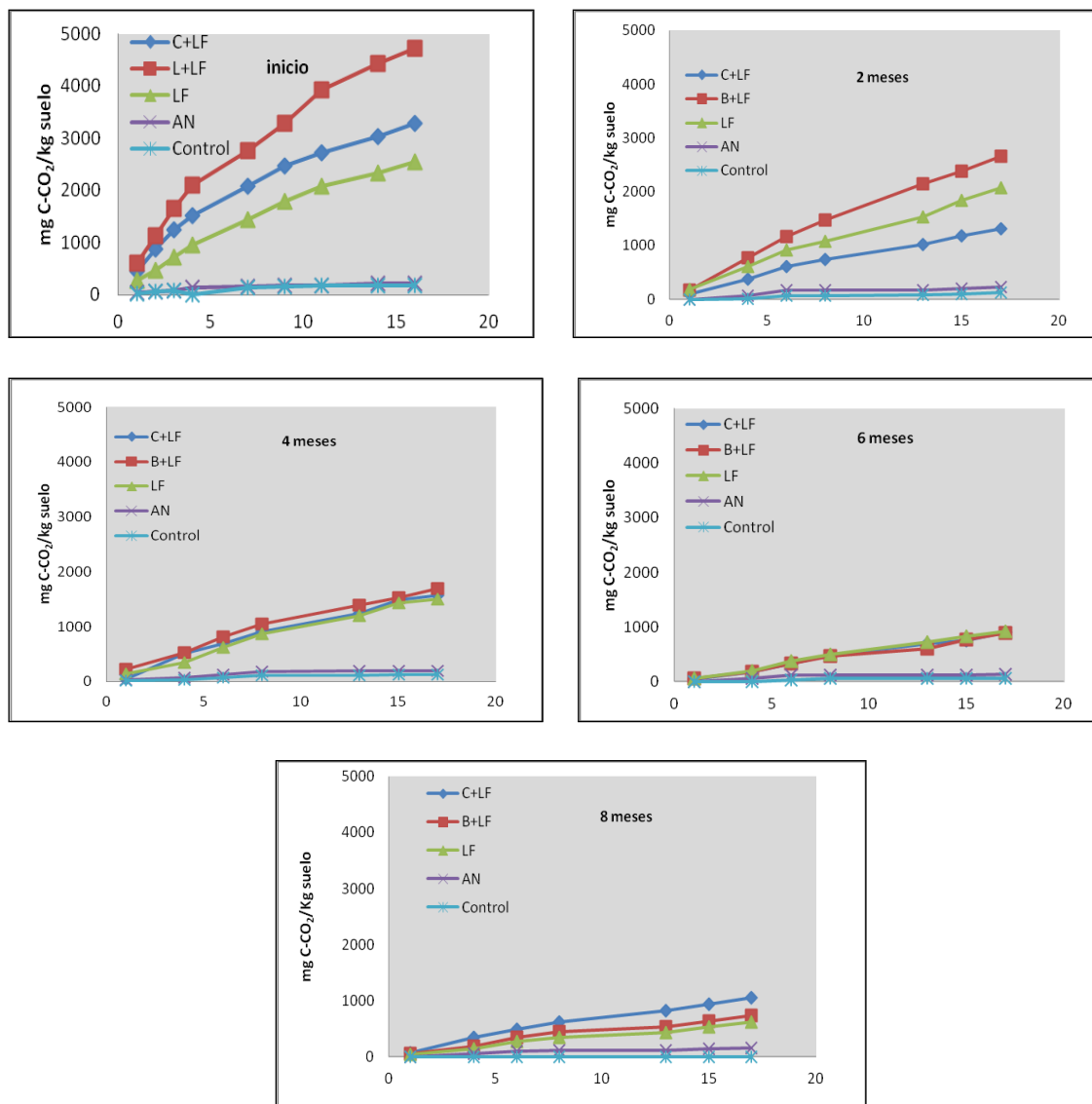
No obstante, a pesar de que se observa una disminución de los valores de estos dos parámetros a lo largo del landfarming, los suelos sometidos a esta técnica muestran durante toda la experimentación valores de ATP y actividad deshidrogenasa superiores a los de los suelos en atenuación natural o a los del suelo control (Figura II.19), lo cual estará directamente relacionado con el menor contenido de sustratos de C fácilmente biodisponibles de estos suelos (Debosz et al., 1999).

Existen diversos trabajos en los que se pone de manifiesto la relación entre la actividad deshidrogenasa del suelo y el contenido de hidrocarburos del mismo. Sin embargo, existe cierta controversia a este respecto ya que algunos autores como Megharaj *et al.* (2000) y Dawson *et al.* (2007) ha encontrado una correlación negativa entre este parámetro y los niveles de hidrocarburos, mientras que Trasar-Cepeda *et al.* (2000) y Margesin *et al.* (2000) encontraron lo contrario, coincidiendo con lo observado por nosotros en este estudio, en el que la actividad deshidrogenasa se ve incrementada en los suelos con hidrocarburos en relación a los suelos que no contenían hidrocarburos. La oxidación biológica de compuestos orgánicos como los hidrocarburos, se debe en gran parte a la deshidrogenación llevada a cabo por la enzima deshidrogenasa (Casida *et al.*, 1964). De hecho, está establecido, que el mecanismo más probable de degradación de los hidrocarburos es a través de reacciones redox que tienen lugar intracelularmente y en las que intervienen las deshidrogenasas sintetizadas por los microorganismos (Howard, 1972; Riffaldi *et al.*, 2005).

Como ya se ha indicado en el apartado 1) de este capítulo, la medida de la *respiración microbiana* se ha empleado, al igual que los parámetros anteriores, para estimar la actividad metabólica de los microorganismos del suelo, así como para estudiar la cinética de mineralización de la materia orgánica (Anderson, 1982). En nuestro ensayo, la determinación de este parámetro puede resultar esencial para evaluar si efectivamente los microorganismos del suelo están degradando los hidrocarburos presentes en el mismo. Si ello es así, parece claro que la actividad microbiana debería de ser elevada, y la respiración de todos los microorganismos implicados en la biodegradación también se verá lógicamente favorecida. En caso contrario, la actividad microbiana se verá mermada, al no disponer los microorganismos de fuentes carbonadas asequibles que puedan utilizar como fuente de energía, con lo que la respiración disminuirá.

En la Figura II.20 se muestran las curvas de desprendimiento acumulativo de C en forma de dióxido de carbono ( $C-CO_2$ ), en los distintos tiempos de muestro, del suelo de las diferentes parcelas en estudio durante un periodo de incubación de 20 días en condiciones controladas de humedad y temperatura (ver

materiales y métodos), ya que la respiración microbiana es altamente dependiente de estos parámetros (Leiros *et al.*, 1999).



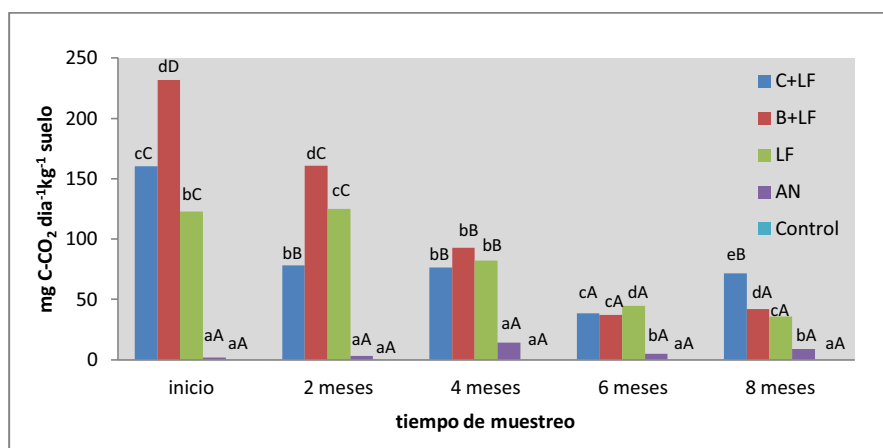
**Figura II.20.-** Curvas acumulativas de desprendimiento de C-CO<sub>2</sub> en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming. LF: Landfarming; B+LF: biosólido granulado seguido de landfarming; C+LF: compost de biosólido seguido de landfarming; AN: atenuación natural.

Como puede observarse, los suelos de las parcelas sometidas al proceso de landfarming mostraban mayores valores de respiración que el suelo control o el suelo con hidrocarburos no sometido a landfarming (suelo en atenuación natural), lo cual pone de relieve que los hidrocarburos incorporados al suelo con la adición de lodos de refinería están siendo degradados por los microorganismos del mismo (Brohon *et al.*, 2001), que los están utilizando como fuente carbonada para su propio desarrollo, aumentando su actividad y por tanto su respiración (Riffaldi *et al.*, 2005).

La respiración se vió notablemente incrementada en los suelos con adición de biosólido granulado o compost, debido, como ya se ha comentado anteriormente, a la gran cantidad de sustratos lábiles aportados al suelo con estos materiales, particularmente en el caso del biosólido granulado. Estos sustratos serán utilizados, junto con los hidrocarburos más biodegradables como fuente energética por los microorganismos del suelo, incrementando su actividad.

Con el tiempo, se observa (Figura II.21) una disminución de los valores de respiración ( $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) en todos los tratamientos de landfarming tendiendo a igualarse la tasa de respiración de los suelos enmendados y sin enmendar, si bien los valores en las muestras con tratamiento de landfarming, son siempre superiores a los del suelo en atenuación natural y el control.

Esta menor actividad respiratoria nos indica de nuevo, que los hidrocarburos más ligeros ya han sido degradados, y el suelo se ha enriquecido en aquellos hidrocarburos más recalcitrantes (Pinto *et al.*, 2007) y difíciles de ser utilizados por los microorganismos como fuente de energía, lo que hace que la actividad de los mismos disminuya, y por tanto su respiración. Este comportamiento es más evidente en los suelos con hidrocarburos y con adición de enmiendas orgánicas, lo que sugiere que el efecto beneficioso de estas enmiendas es menos pronunciado en los procesos de biorremediación de compuestos más recalcitrantes, tal y como observó Hencklein (2005) estudiando la biodegradabilidad de los lodos de refinería.



**Figura II.21.-** Tasa de Respiración de los suelos de los diferentes tratamientos en cada tiempo de muestreo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

Aunque la respiración está directamente relacionada con la actividad microbiana, puede que los microorganismos que vean su actividad incrementada no sean los responsables de la degradación de los hidrocarburos. Precisamente por este hecho Margesín *et al.* (2000) indicaron que el estudio exclusivo de la cuantificación de los microorganismos no nos proporciona información de la eficiencia de los mismos; por

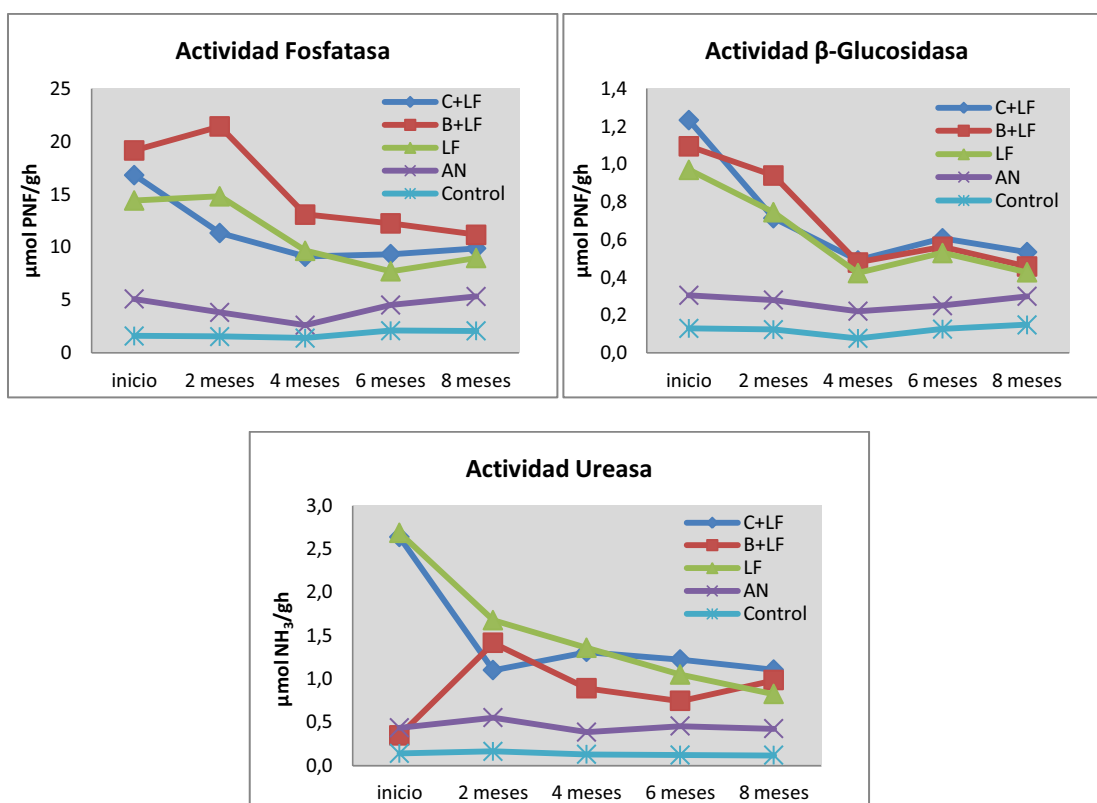
este motivo no debemos relacionar el tamaño de la comunidad microbiana con su potencial de biodegradación de los hidrocarburos.

#### Actividad bioquímica específica (hidrolasas)

Como ya se ha indicado anteriormente, la  $\beta$ -glucosidasa es una hidrolasa que interviene en el ciclo del carbono y actúa en la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de la celobiosa (disacárido), que es el producto de la degradación enzimática de la celulosa; por tanto, esta enzima interviene en la última fase de la degradación de la celulosa para dar glucosa (Alef y Nannipieri, 1995) y se la considera integrante del complejo enzimático de las celulasas. La hidrólisis de estos sustratos juega un papel muy importante en la producción de sustratos fácilmente disponibles para obtener energía para los microorganismos del suelo (Eivazi y Zakaria, 1993). A su vez, el término *fosfatasa* se utiliza ampliamente para designar, a un amplio grupo de enzimas que catalizan la transformación de fósforo orgánico en inorgánico, haciéndolo por tanto asimilable para las plantas. De ahí la gran importancia de esta enzima en suelo. La presencia de la enzima fosfatasa en suelos tiene un origen microbiano, aunque en muchas ocasiones es temporal y se pierde con rapidez (Ros, 2000). La fosfatasa es una enzima tanto intra- como extra-celular, siendo la fracción extracelular menos sensible a las condiciones ambientales que afectan al estado fisiológico de los microorganismos (Nannipieri et al., 1996), debido a que esta enzima se encuentra inmovilizada y protegida en los complejos húmico-arcillosos del suelo. Por último, la *ureasa* es una enzima hexamérica extracelular que cataliza la hidrólisis de la urea o sustratos de tipo ureico a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , estando por tanto íntimamente relacionada con el ciclo del nitrógeno (Marín, 2004).

Todos los suelos con hidrocarburos mostraban inicialmente, mayores valores de actividad de estas tres hidrolasas, que el suelo control, como se observa en la Figura II.22, lo cual es indicativo del aporte de los sustratos específicos de estas enzimas tanto con el lodo de refinería como con las enmiendas orgánicas (biosólido granulado y compost) y/o de que la estimulación microbiana producida por la adición de una fuente carbonada (hidrocarburos), utilizable por los microorganismos, estimula una mayor síntesis de enzimas hidrolíticas que actúan sobre los sustratos ya existentes en el suelo.

La actividad de estas tres hidrolasas se vio, en general, notablemente incrementada en los suelos sometidos a landfarming (Figura II.22), presentado los suelos bajo landfarming valores de actividad superiores en todos los casos a los del suelo en atenuación natural, lo cual es probablemente debido al mayor desarrollo microbiano que tiene lugar en los suelos como consecuencia del landfarming, además de favorecer, este tratamiento de biorremediación de suelos, la liberación de sustratos orgánicos específicos de estas hidrolasas.



**Figura II.22.-** Evolución de las actividades enzimáticas en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.12 del Anexo

Los suelos con incorporación de biosólido (granulado o compostado) presentaban mayor actividad fosfatasa y  $\beta$ -glucosidasa que el suelo sin enmienda orgánica (LF). Sin embargo, los suelos con biosólido granulado (B+LF) mostraban inicialmente una fuerte inhibición de la actividad ureasa, debido a la gran cantidad de amonio que contiene esta enmienda, y que provoca una inhibición feed-back de esta enzima al ser el amonio el producto del proceso hidrolítico catalizado por la enzima. A los 2 meses este valor incrementaba, pero siempre por debajo de los valores de actividad de las muestras con landfarming sin enmienda (LF).

En cuanto a la evolución con el tiempo de la actividad enzimática de las hidrolasas aquí estudiadas, ésta muestra el mismo patrón de disminución de la actividad metabólica global de los microorganismos, debido al agotamiento progresivo de los sustratos, tal como vimos en el ensayo de microcosmos y de acuerdo con los trabajos de otros autores como Ceccanti *et al.* (2003) y Riffaldi *et al.* (2005).

### Análisis de las comunidades microbianas implicadas en la biodegradación de hidrocarburos

Durante el último siglo y especialmente durante los últimos 20 años, se han incrementado y desarrollado las metodologías para el estudio de la diversidad microbiana existente en la biosfera (Viñas, 2005), desde las técnicas más clásicas dependientes de cultivo, a las más modernas, denominadas técnicas moleculares

independientes de cultivo, puesto que nos permiten conocer la diversidad microbiana directamente de una muestra sin necesidad de cultivarla previamente.

Para conocer cuáles son las unidades formadoras de colonias (UFCs), de bacterias y hongos, presentes en las muestras de suelo, recurrimos a una metodología dependiente de cultivo. Son técnicas que precisan del cultivo en medio sólido o líquido de un extracto de la muestra. En concreto, se utilizó la técnica de cultivo en placa en medios selectivos sintéticos de laboratorio, que permite el crecimiento de bacterias o de hongos, dependiendo del medio de cultivo que se utilice en la placa. Estas placas, sembradas en condiciones de esterilidad, con las distintas diluciones de los extractos de la muestra de suelo, se incuban a 25 °C y pasados 3 y 7 días, se cuentan las colonias de hongos y bacterias, respectivamente, que se han desarrollado en ellas. El número de colonias contadas representa las UFCs.

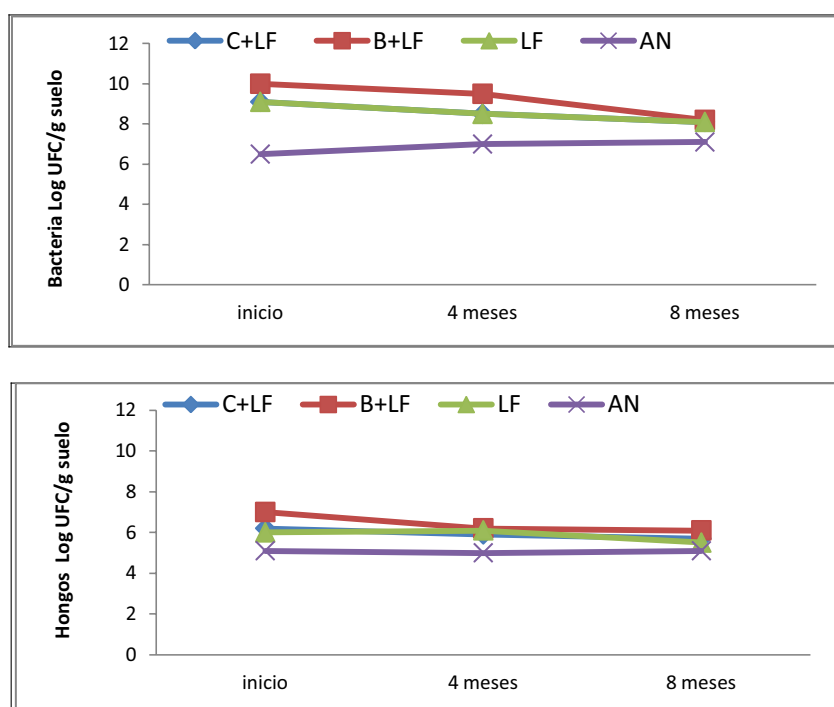
Esta técnica nos permite conocer las UFCs de bacterias y hongos pero con la limitación de que solamente el 0,3% de los microorganismos del suelo son cultivables (Torsvik *et al.*, 1990), por lo que los estudios clásicos de diversidad microbiana basados exclusivamente en este tipo de técnicas, exploran solo una mínima parte de la diversidad total real presente en el suelo (Amann *et al.*, 1995). Por este motivo se complementa el estudio de biodiversidad con el uso de técnicas moleculares independientes de cultivo como las ya descritas en el Capítulo II.

El principal objetivo de este estudio, ha sido evaluar el efecto de la presencia de hidrocarburos de tipo recalcitrante sobre las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo bajo condiciones semiáridas, y determinar cómo afecta el proceso de landfarming, con y sin la adición a este suelo con hidrocarburos recalcitrantes de biosólido, granulado o compostado, a dichas comunidades microbianas.

#### Monitorización de las unidades formadoras de colonias (UFCs) de bacterias y hongos

Las UFCs de bacterias y hongos se midieron únicamente en los suelos con hidrocarburos, puesto que el principal interés en este caso era conocer el estado de estas colonias en los suelos con presencia de estos compuestos, y comprobar la influencia sobre los microorganismos, del tratamiento de biorremediación aplicado. Las UFCs de bacterias y hongos, se vieron afectadas de modo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) por el tipo de tratamiento, diferenciándose notablemente las muestras en atenuación natural, que presentaron valores menores al resto de tratamientos (Figura II.23). Maletic *et al.* (2012), también observaron un mayor número de UFCs al inicio de un ensayo de biorremediación, en suelos tratados con landfarming con respecto a suelos sin tratamiento. A lo largo del ensayo esta diferencia se mantiene, pero los suelos tratados con landfarming disminuyen su valor de UFCs aunque siempre son superiores a los del suelo sin tratamiento.





**Figura II.23.-** Evolución de la abundancia de bacterias y hongos en los diferentes tratamientos durante el proceso de biorremediación. UFCs: unidades formadoras de colonias. Los resultados del ANOVA se muestran en la Tabla A.13 del Anexo

El tratamiento con adición de biosólido presentó mayor abundancia de bacterias y hongos ( $p < 0,05$ ) que el resto de los tratamientos a lo largo del proceso de biorremediación, en particular durante los cuatro primeros meses. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones microbianas de los suelos con aporte de compost y las del suelo en landfarming sin aporte de enmienda a lo largo de todo el proceso de biorremediación.

En cuanto a la evolución de las UFCs a lo largo del proceso de biorremediación, se observó un decrecimiento significativo del número de colonias de bacterias y hongos en los suelos que habían recibido tratamiento de biorremediación (landfarming con y sin enmienda), mientras que en el suelo en atenuación natural el número de colonias de hongos se mantuvo constante a lo largo del ensayo y el de bacterias experimentó un ligero pero significativo aumento a los 4 meses, que se mantuvo hasta el final, aunque los valores eran siempre significativamente inferiores a los observados en los tratamientos con landfarming (Figura II.23).

Al inicio del proceso de biorremediación, la población de bacterias en los suelos tratados incrementó de 2 a 3 órdenes de magnitud con respecto al suelo en atenuación natural (Figura II.23a).

En la población de hongos, en los suelos con adición de biosólido (B+LF) es donde se observó un mayor incremento con respecto a las parcelas en atenuación natural (AN), de 2 órdenes de magnitud, mientras que

en los suelos con landfarming (LF) y en los enmendados con compost (C+LF) el incremento fue de 1 orden de magnitud (Figura II.23b). Después de 8 meses de biorremediación, tanto las bacterias como los hongos eran un orden de magnitud mayor en los tratamientos de biorremediación que en el suelo en atenuación natural (Figura II.23).

#### Análisis de las comunidades microbianas mediante DGGE

Los análisis de DGGE, se utilizaron para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos ensayados sobre la diversidad genética y la dinámica de las comunidades bacterianas y fúngicas de los suelos en estudio (Figuras II.24 y 25), realizándose estos análisis en los suelos tratados con landfarming y el control, al inicio y final del proceso de biorremediación. Para conocer en más profundidad la diversidad microbiológica asociada al proceso de biorremediación, también se incluyeron en este análisis una muestra de biosólido granulado y otra de biosólido compostado, lo que nos aportará información acerca de la procedencia de los microorganismos encontrados en el suelo. Podremos conocer que parte de los microorganismos que encontramos en el suelo proviene de las enmiendas y cuales son endémicos del suelo, así como cuáles de ellos contribuyen a la biorremediación del suelo.

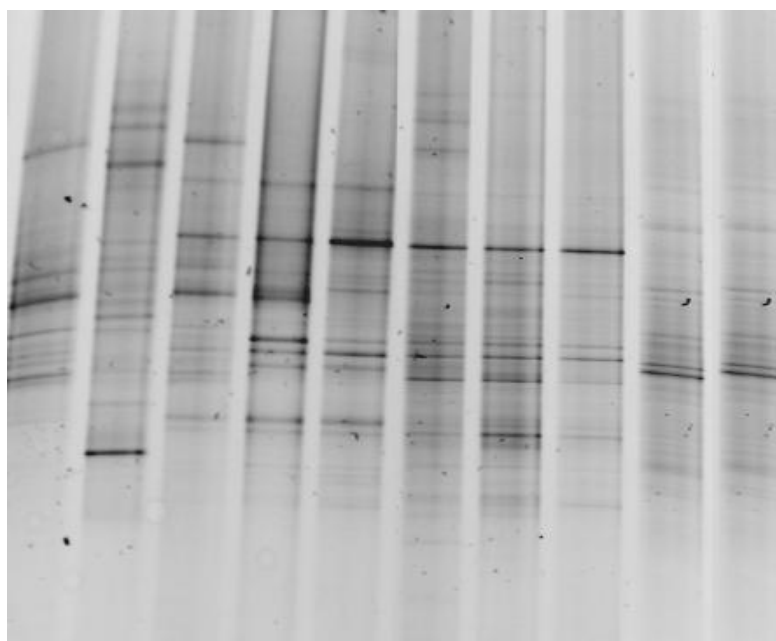
El análisis de agrupación, de los perfiles de bandas de los fragmentos de ADN de la comunidad de bacterias (genes ARNr 16S) obtenidos por DGGE (Figura II.24), mostró que el tratamiento control, al igual que ocurría en el experimento de microcosmos, se agrupaba lejos del resto de los tratamientos, independientemente de tiempo de muestreo, lo que sugiere una gran diferencia entre los suelos con hidrocarburos y los que no contienen hidrocarburos (Figura II.24b).

El biosólido granulado se agrupaba separadamente del suelo con hidrocarburos enmendado con este biosólido, indicando diferencias en la comunidad bacteriana de esta enmienda con respecto al suelo enmendado con este mismo biosólido y sometido a landfarming, independientemente del tiempo de muestreo (Figura II.24b). De forma contraria, el compost mostró una comunidad bacteriana similar a la del suelo enmendado con dicho compost, al final del proceso de biorremediación (Figura II.24b).

En general, la comunidad bacteriana de los diferentes tratamientos de biorremediación experimentaba cambios durante dicho proceso, independientemente del tratamiento de biorremediación llevado a cabo (Figura II.24b).

Al inicio del proceso, todos los tratamientos mostraban perfiles de bandas de DGGE muy similares, lo que puede ser debido a que predominan las comunidades bacterianas autóctonas del suelo, adaptadas a la presencia del hidrocarburo. Al final del ensayo, la estructura de la comunidad bacteriana variaba, observándose una agrupación más cercana de las enmiendas y los suelos enmendados con compost (perfiles de bandas muy similares).

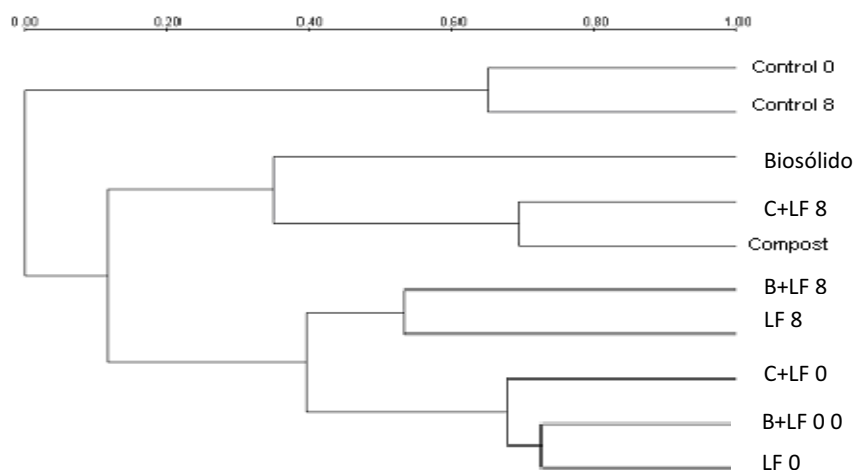
(a)



Compost Biosólido C+LF0 B+LF0 LF0 C+LF8 B+LF8 LF8 Control 0 Control 8

(b)

Coeficiente de similitud de Dice



**Figura II.24.-** Patrones de bandas de los fragmentos de ADN correspondientes al gen del ARNr 16S obtenidos mediante DGGE (a); y análisis de agrupación (Método Ward, utilizando el coeficiente de similitud de Dice) realizado sobre dichos patrones de bandas (b) en los diferentes tratamientos ensayados. La numeración 0 y 8 después del nombre de cada uno de los tratamientos (LF, B+LF y C+LF) representan el tiempo de muestreo (inicial y final).

Esto nos indica que a lo largo del ensayo algunas de las colonias bacterianas incorporadas al suelo con el biosólido granulado o compostado, han sido capaces de desarrollarse en el suelo en presencia del hidrocarburo y competir con los microorganismos autóctonos.

En el suelo tratado con incorporación de compost, el cual aporta al mismo una materia orgánica estabilizada, y por tanto de degradación lenta, se favorece el desarrollo de las bacterias presentes en las enmiendas. Existe una gran controversia a este respecto puesto que todavía es materia de debate la eficacia de la incorporación de microorganismos exógenos en el proceso de biorremediación (Philp y Atlas, 2005).

Así, mientras que en trabajos como el de Puglisi *et al.* (2007), se indica que el aporte de compost disminuye la concentración de hidrocarburos en el suelo debido a la acción biodegradadora de los microorganismos nativos del compost, otros trabajos indican que la disminución de los hidrocarburos se debe a los microorganismos autóctonos del suelo (Rivelli *et al.*, 2013), que se ven favorecidos por el aporte de co-substratos orgánicos que incorpora el compost.

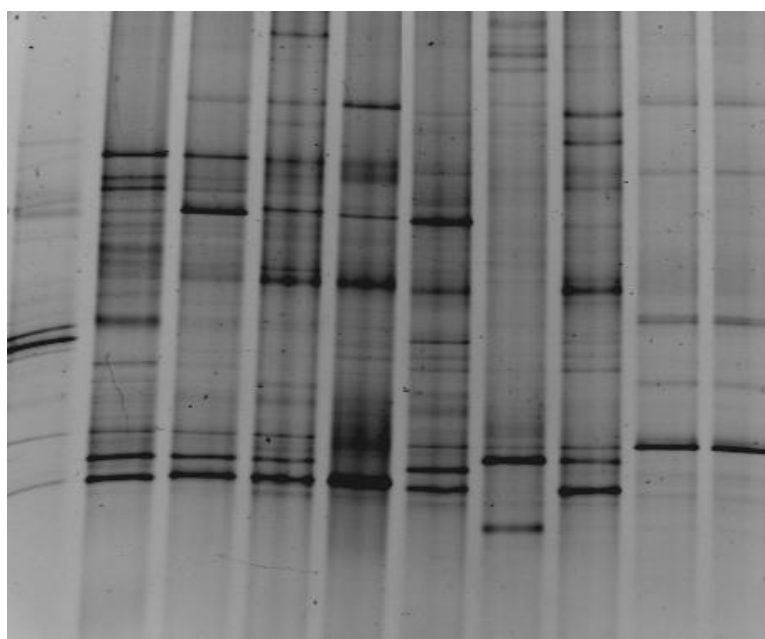
El análisis de similitud de los perfiles de bandas de los fragmentos de ADN de la comunidad fúngica (genes ARNr 18S), obtenidos por DGGE, mostró que, tanto al inicio como al final del periodo experimental, el suelo control mostraba menos bandas predominantes que el resto de tratamientos con lo cual se agrupaba separadamente, indicando una clara diferencia entre las comunidades fúngicas de los suelos con hidrocarburos y las de los suelos que no contenían hidrocarburos (Figura II.25b).

De forma similar a lo que se observó para las comunidades bacterianas, el biosólido granulado, mostraba comunidades fúngicas diferentes a las de los suelos enmendados con este mismo biosólido, mientras que el compost, al comienzo del ensayo, se agrupaba con los suelos tratados tanto con el aporte de compost como de biosólido granulado (Figura II.25b).

La comunidad fúngica variaba a lo largo del ensayo, independientemente del tipo de tratamiento, mostrando el perfil de las bandas DGGE de todos los suelos contaminados sometidos al proceso de landfarming un cambio en la comunidad fúngica después de 8 meses de biorremediación, (Figura II.25b).

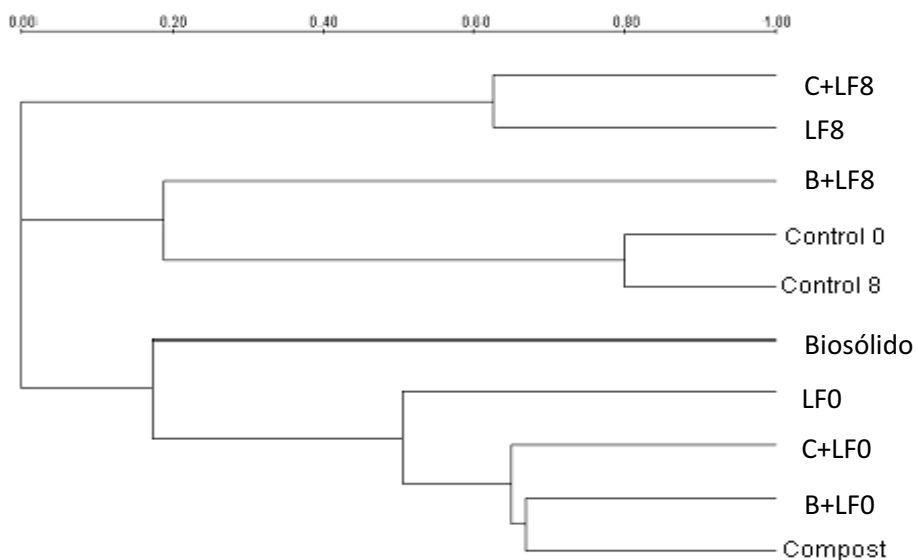
El que las enmiendas, sobre todo el compost, se agrupen al inicio del ensayo cerca de los suelos sometidos a tratamiento sugiere que inicialmente existe aporte de hongos de las enmiendas al suelo. Sin embargo, al final del ensayo esta similitud de los perfiles de bandas de DGGE desaparece, lo que nos puede indicar que la comunidad fúngica aportada por el biosólido granulado o compostado no ha sido capaz de desarrollarse en presencia del hidrocarburo y frente a la competencia de los hongos autóctonos, mejor adaptados a las condiciones adversas. Este hecho ha sido también observado por otros autores, tales como Al Fantorussi y Aghatos (2005) y Franzzetti *et al.* (2009), por lo que hipotizamos que los hongos presentes en las muestras tratadas al final del ensayo son los autóctonos del suelo.

(a)



Biosólido Compost C+LF0 B+LF0 LF0 C+LF8 B+LF8 LF8 Control 0 Control 8

(b) Coeficiente de similitud de Dice



**Figura II.25.-** Patrones de bandas de los fragmentos de ADN correspondientes al gen del ARNr 18S obtenidos mediante DGGE (a); y análisis de agrupación (Método Ward, utilizando el coeficiente de similitud de Dice) realizado sobre dichos patrones de bandas (b) en los diferentes tratamientos ensayados. La numeración 0 y 8 después del nombre de cada uno de los tratamientos (LF, B+LF y C+LF) representan el tiempo de muestreo (inicial y final).

### Filogenética y análisis de la escisión de las bandas

Para realizar el estudio filogenético y el análisis de la escisión de las bandas obtenidas mediante PCR-DGGE, es preciso secuenciar los fragmentos de ADN correspondientes a los genes ARNr 16S y 18S (específicos para bacterias y hongos respectivamente). Para ello, los fragmentos extraídos o escindidos de las bandas del gel DGGE que se consideraron de interés, fueron purificados y amplificados mediante PCR utilizando los cebadores adecuados. Estos amplicones se secuenciaron en un secuenciador 3130 (Applied Biosystem) utilizando cebadores universales específicos para los genes que codifican los ARNr 16S y 18S.

El análisis de las homologías entre las secuencias obtenidas y las secuencias de las bases de datos, se llevó a cabo *online* mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) (Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias finales, se alinearon y se compararon con secuencias obtenidas en el Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### *Comunidad bacteriana*

De acuerdo con Yu y Morrison (2004) se recomiendan las regiones V3-V5 del gen que codifica el ARNr de la subunidad 16S, para realizar el análisis filogenético por medio de DGGE y la posterior identificación de secuencias. Con la alineación de secuencias recuperadas de bandas dominantes de gel DGGE de bacterias, se identificaron las secuencias correspondientes a Actinobacterias (Actinomycetales) (53,33%), Proteobacterias ( $\beta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias) (20%), Firmicutes (6,66%), Chloroflexi (6,66%) y bacterias no clasificadas (13,32%) (Tabla II.11).

El suelo control, independientemente del tiempo de muestreo, mostró 4 bandas dominantes (21, 22, 23 y 24) las cuales no estaban presentes en los suelos con hidrocarburos, por lo que las bacterias representadas por estas bandas no deben estar implicadas en el proceso de biorremediación puesto que no han sido capaces de desarrollarse en presencia del hidrocarburo. Dos de esas bandas (23 y 24) representan a Actinobacterias (Actinomycetales), mientras que las otras (21 y 22) representan a Proteobacterias ( $\beta$ -proteobacterias). Cinco de las 15 bandas dominantes (9, 12, 14, 15 y 18) estaban presentes en las muestras de todos los tratamientos de biorremediación, independientemente del tiempo de muestreo, por lo que deducimos que las bacterias representadas por estas bandas, están implicadas en el proceso de biorremediación de los suelos con hidrocarburos, y pertenecen a los *filum* Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacterias.

Las bandas 8 y 11 representan a bacterias no clasificadas. La banda 8, únicamente se observó en el compost y en los suelos enmendados con compost (tanto al inicio como al final del proceso de biorremediación), mientras que la banda 11, se observó, además de en el compost, en los suelos tratados con compost y en los suelos tratados con biosólido, ambos en el tiempo inicial.

**Tabla II.11.-** Análisis de secuencia de las bandas escindidas del patrón de bandas DGGE obtenido de la fracción 16S del ARNr de bacterias

Suelo	Bandas DGGE	Secuencias coincidentes (Número de acceso)	(%) cobertura / (%) Similitud	Grupo filogenético
Control 0 Control 8	21	<i>Beta-proteobacterium</i> (EU499550)	57/98	Proteobacteria; Beta-proteobacteria
Control 0 Control 8	22	<i>Rhodocyclales bacterium</i> (EU043549)	100/91	Proteobacteria; Beta-proteobacteria
Control 0 Control 8	23	<i>Arthrobacter</i> sp. SC17Y (AM983505)	81/99	Actinobacteria; Actinomycetales
Control 0 Control 8	24	<i>Arthrobacter</i> sp. AM9T (AM983498)	93/99	Actinobacteria; Actinomycetales
LF0-LF8	20	<i>Chloroflexi bacterium</i> (AB265898)	100/98	Chloroflexi
C+LF 0-8 B+LF8 LF8	19	<i>Mycobacterium brumae</i> (AF480576)	100/100	Actinobacteria; Actinomycetales
C+LF 0-8 B+LF 0-8 LF0-LF8	18	<i>Nocardiooides</i> sp. CM24C3 (AM936824)	99/87	Actinobacteria; Actinomycetales
C+LF0 B+LF0 LF0	17	<i>Dietzia</i> sp. ice-oil-71 (DQ533972)	100/99	Actinobacteria; Actinomycetales
C+LF0 B+LF0 LF0	13	<i>Microbacterium</i> sp. DB-3 (EU439403)	100/99	Actinobacteria; Actinomycetales
C+LF 0-8 B+LF 0-8 LF0-LF8	15	<i>Microbacterium arborescens</i> (AM711565)	100/98	Actinobacteria; Actinomycetales
C+LF8 B+LF 0-8 LF0-LF8	14	<i>Arthrobacter</i> sp. TD3 (EF468655)	99/99	Actinobacteria; Actinomycetales
C+LF0 B+LF0 Compost	11	uncultured bacterium (EU215319)	96/99	Bacterias no clasificadas
C+LF 0-8 B+LF 0-8 LF0-LF8	12	<i>Chromatiales bacterium</i> (AM935143)	100/100	Gammaproteobacteria
C+LF 0-8 B+LF 0-8 LF0-LF8	9	<i>Planomicrobium</i> sp. QD9 (FJ263010)	99/97	Firmicutes
C+LF 0-8 Compost	8	Uncultured bacteria (AY332553)	99/97	Bacterias no clasificadas

Según estas observaciones, las bacterias no clasificadas representadas por las bandas 8 y 11, proceden de las enmiendas, principalmente del compost. Las representadas por la banda 8 son bacterias capaces de desarrollarse en presencia de hidrocarburos, en contra de lo que ocurre con las bacterias representadas por la banda 11, cuya presencia desaparece en el tiempo final presumiblemente debido al impacto causado por la presencia de hidrocarburos en estas bacterias.

Las bandas 17 y 19, representan a Actinomycetales. La banda 17 se observó en todos los tratamientos al inicio de la biorremediación, pero desaparecía después de los 8 meses, lo que indica que, aunque en principio es capaz de sobrevivir en presencia de hidrocarburos, durante el proceso de biorremediación desaparecen, posiblemente debido a la competencia que otros grupos bacterianos ejercen sobre las

bacterias representadas por esta banda 17, mientras que la banda 19 se observaba en todos los tratamientos de biorremediación después de 8 meses, pero sólo los suelos enmendados con compost mostraban esta banda al inicio del proceso.

El hecho de que las bacterias representadas por la banda 19, no aparezcan al inicio puede ser debido a que se encuentren en concentraciones mínimas no detectables, pero que sean favorecidas por el aporte de materia orgánica estabilizada que incorpora el compost, y por el proceso de landfarming, por este motivo al final del ensayo aparecen en todos los tratamientos, lo que puede indicar que sean autóctonas del suelo y que estén implicadas en el proceso de biorremediación. La banda 20, aparecía sólo en los suelos con hidrocarburos, particularmente después de los 8 meses de biorremediación y representa a Chloroflexi. Estas bacterias que deben ser autóctonas del suelo y afines al hidrocarburo, estarán implicadas en la degradación de los mismos, y se habrán visto favorecidas por el proceso de biorremediación (con o sin enmienda), ya que se encuentran al final del ensayo en los suelos con hidrocarburos, independientemente de que haya habido aporte de enmienda orgánica o no.

Los *filum*, Actinobacteria y Proteobacteria, estaban presentes en todos los casos, mientras que Firmicutes y Chloroflexi únicamente se observaron en los tratamientos de biorremediación, lo que está en concordancia con lo observado en el ensayo de microcosmos. Actinobacteria estaba representada en mayor grado en los tratamientos con biosólido y los suelos con hidrocarburos no enmendados (en un 66,6% de las bandas DGGE dominantes), que en los suelos tratados con compost (60%) y el suelo control (50%), mientras que las secuencias que representan Proteobacteria, se encontraron con mayor frecuencia en los suelos control (50%), que en los tratamientos de biorremediación [ C+LF (10%) y B+LF y LF (11%)] (Tabla II.12).

#### *Comunidad fúngica*

En el caso de los hongos, se identificaron un total de 13 bandas dominantes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 13, 9, 14, 17, 11 y 10) en el gel DGGE, y las secuencias correspondientes estaban representadas por Ascomycota (en un 46,25% de las bandas dominantes seleccionadas), hongos no clasificados (46,15%), y Eucariotas (7,7%) (Tabla II.13). Estos tres grupos se observaron en todos los tratamientos.

El número relativo de microorganismos pertenecientes a Ascomycota era mayor en el suelo tratado con biosólido (55,5%) y en el control (50%), que en el tratado con compost (42,86%) y en el suelo con hidrocarburos sin enmienda (37,5%). Las secuencias de los hongos no clasificados eran más numerosas en los controles y suelos no enmendados (50%), que en los suelos tratados con biosólido (33,33%) y compost (42,86%) (Tabla II.2), mientras que únicamente aparecieron Eucariotas en los tratamientos de biorremediación (Tabla II.13).



**Tabla II.12.-** Prevalencia (% relativo) de las diferentes clases de bacterias y hongos en las secuencias de las bandas dominantes observadas mediante DGGE en el control y los tratamientos.

Comunidad bacteriana(%) / Tratamientos	Control	C+LF	B+LF	LF
Proteobacteria	50	10	11.11	11.11
Actinobacteria	50	60	66.66	66.66
Firmicutes	-	10	11.11	11.11
Otros	-	20	11.11	11.11
Comunidad fúngica(%) / Tratamientos	Control	C+LF	B+LF	LF
Ascomycota	50	42.86	55.55	37.50
Hongos no clasificados	50	42.86	33.33	50
Otros	-	14.28	11.12	12.5

Las secuencias (bandas 1, 2, 3 y 4) de los tratamientos control pertenecen a Ascomycota y hongos no clasificados, y sólo la banda 1 era común para todos los tratamientos y tiempos, y enmiendas orgánicas, ya sea el biosólido granulado o el compost (Tabla II.13). La banda 12, únicamente aparecía en los tratamientos con biosólido y la banda 7 en los tratamientos con biosólido y el tratamiento sin enmienda, al final del proceso de biorremediación. Ambas bandas pertenecen al *filum* Ascomycota. La banda 13 pertenece al *filum* Ascomycota y aparece en el compost y en los suelos tratados con compost al inicio y final del proceso de biorremediación y al inicio en el tratamiento con biosólido.

Entendemos que los hongos que aparecen al final del ensayo, pero no al inicio del mismo ni en las enmiendas, pertenecen a los autóctonos del suelo y que se ven favorecidos tanto por el proceso de landfarming como por el aporte de las enmiendas.

La banda 14 representa a hongos no clasificados y únicamente aparece en los tratamientos con compost independientemente del tiempo de muestreo, así como en los tratamientos de landfarming tanto con adición de biosólido como sin enmienda al inicio del proceso, y en las enmiendas orgánicas. Estos hongos, aunque se pueden encontrar en el suelo, son aportados en mayor medida por las enmiendas orgánicas, y sólo son capaces de sobrevivir al ensayo en los suelos donde se aporta compost. La presencia de la materia orgánica estabilizada que incorpora el compost, puede ser la causa de la supervivencia de estos hongos.

La banda 9 y la banda 6, que representan a Eucariotas y Ascomycotas respectivamente, aparecen en todos los tratamientos, independientemente del tiempo de muestreo, excepto en el tratamiento con biosólido, en el que desaparecen durante el proceso de biorremediación. Ambas bandas, fueron también encontradas tanto en el biosólido como en el compost (Tabla II.13), por lo que deben representar a hongos implicados en el proceso de biorremediación presentes en el suelo tanto de forma autóctona como aportados por las enmiendas.

**Tabla II.13.-** Análisis de la secuencia de las bandas dominantes escindidas del patrón de bandas DGGE obtenido de la fracción 18S del ARNr de hongos

Suelo	Bandas DGGE	Secuencias coincidentes (Número de acceso)	(%) Cobertura/(%) Similitud	Grupo filogenético
Control 0 Control 8 CS0-CS8 B+LF0-8 LF0-LF8 Compost Biosólido	1	<i>Fusarium sp.</i> MBS1 (FJ613599)	94/99	Ascomycota
Control 0 Control 8	2	Uncultured fungus (AY275186)	73/95	Hongos no clasificados
Control 0 Control 8	3	<i>Alternaria petroselini</i> (AY154685)	91/95	Ascomycota
Control 0 Control 8	4	Uncultured fungus (EU733622)	95/99	Hongos no clasificados
C+LF 0-8 B+LF0 LF0-LF8 Compost Biosólido	6	<i>Ochroconis gallopava</i> IFM 52605 (AB125284)	97/99	Ascomycota
LF8 B+LF 8	7	<i>Eleutherascus lectardii</i> (DQ062997)	100/99	Ascomycota
B+LF8	12	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> strain NCPF 2177 (AY083220)	100/99	Ascomycota
C+LF 0-8 B+LF 0 Compost	13	<i>Graphium tectonae</i> (U43907)	98/99	Ascomycota
C+LF 0-8 B+LF0 LF0-LF8 Compost Biosólido	9	clon eucariota (EF024080)	95/94	Eukaryota
C+LF 0-8 B+LF 0 LF0 Compost Biosólido	14	clon fúngico BAQA64 (AF372718)	98/97	Hongos no clasificados
C+LF 0 B+LF 0 LF0 Compost Biosólido	17	Clon fúngico 18S3-47 (EU733622)	98/97	Hongos no clasificados
C+LF 0 B+LF 0 LF0-LF8	11	Hongo del suelo (EU647859)	93/90	Hongos no clasificados
LF8	10	clon fúngico T3-IV-3a-21 (EF628893)	97/94	Hongos no clasificados

Las bandas 10 y 17, pertenecen a hongos no clasificados. La banda 10 aparecía en los suelos sin enmienda al final del proceso, y la banda 17, en todos los tratamientos de biorremediación al inicio del proceso, pero desaparecía durante el proceso de biorremediación. Esta banda se encontró también en el biosólido y el compost.

La banda 11, pertenece también a hongos no clasificados y aparecía en los tratamientos sin enmienda, independientemente del tiempo de muestreo, mientras que en los tratamientos con compost y biosólido, únicamente aparecía al inicio del proceso. Los hongos encontrados en las enmiendas y en los suelos donde se han incorporado dichas enmiendas no siempre son capaces de sobrevivir en presencia de los

hidrocarburos, por ese motivo no se encuentran al final del ensayo en los suelos tratados con enmiendas, mientras que aquellos que se encuentran en los suelos tratados sin enmienda que entendemos que son autóctonos del suelo y adaptados a las condiciones adversas del mismo, suelen aparecer también al final del ensayo.

La aparición de una banda representante de Eucariotas que no pertenecen ni a hongos ni a bacterias, mostró que ese cebador (FR1GC/FF390) no es tan específico como Vainio y Hantula (2000) asumían.

La presencia del mayor número de microorganismos apropiados y los efectos sinérgicos entre hongos y bacterias (Johnsen *et al.*, 2005), es la clave para el éxito de la biorremediación (Chang y Devinny, 2000). El aumento de las poblaciones de bacterias y hongos observado al inicio del proceso de biorremediación en los suelos con hidrocarburos, con enmienda y sin enmienda, con respecto al suelo control, puede ser explicado por el hecho de que tanto los hidrocarburos existentes en el suelo tras la incorporación periódica de lodos de refinería como las enmiendas orgánicas, proporcionan sustratos que actúan como fuente de C y nutrientes para los microorganismos. A medida que esos sustratos desaparecen durante el proceso de biorremediación, debido a la mineralización de los materiales más fácilmente degradables, esas comunidades microbianas disminuyen también, si bien, las poblaciones microbianas continúan siendo más abundantes en estos suelos que en el suelo control. Wellman *et al.* (2001) y Rhykerd *et al.* (1999), indicaron que la incorporación de enmiendas orgánicas a suelos con hidrocarburos incrementaba las poblaciones microbianas de los mismos, lo cual coincide con la elevada población bacteriana y fúngica observada en los tratamientos con biosólido con respecto a los suelos sin enmienda. Sin embargo, los tratamientos con compost, mostraron niveles de las poblaciones microbianas similares a los obtenidos en los suelos sin enmienda, lo que puede ser debido a que los compost, aportan una menor fuente de nitrógeno y metabolitos (Castellanos y Pratt, 1981; García *et al.*, 1994). También aportan al suelo una materia orgánica más estabilizada y menos carbono orgánico hidrosoluble, con lo cual el suelo contiene menos recursos a corto plazo, para el crecimiento de dichas poblaciones microbianas.

Van der Waarde *et al.* (1995) y Margesin *et al.* (2000), asumieron que los cambios en el número de microorganismos son indicativos de una estimulación del proceso de biorremediación, pero no representan una medida precisa de la biodegradación actual y de la eficacia de la población. También es bien conocido, que sólo una pequeña parte de los microorganismos del suelo pueden ser aislados y cultivados en laboratorio (Tyson y Banfield, 2005). El análisis de la secuencia de las bandas dominantes obtenidas mediante la DGGE, refleja la composición de las comunidades microbianas dominantes, incluyendo los miembros no cultivables (Gelsomino *et al.*, 1999). El presente estudio ha revelado que la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas, cambiaba a lo largo del proceso de biorremediación en comparación con el control y que estas diferencias varían en función del tiempo de muestreo. El *filum* más observado fue Actinobacteria (B+LF y LF 66,6%, y C+LF 60%), que consiste en una variedad de Actinomycetales, que

incluye a las especies *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Microbacterium* y *Mycobacterium*, cuya capacidad para degradar hidrocarburos derivados del petróleo es bien conocida (Margesin *et al.*, 2003; Kloos *et al.*, 2006). La división de hongos más frecuentemente observada fue Ascomycota (B+LF, 55.5%; C+LF, 42,86%; LF, 37,5%). Viñas *et al.* (2005) y Liew y Jong (2008), mostraron resultados similares en suelos con hidrocarburos y petróleo sin refinar, respectivamente. Este efecto, puede ser causado por la incorporación de lodos de refinería durante más de 12 años, lo que habrá favorecido la selección de los grupos microbianos más adaptados a vivir en ambientes con hidrocarburos (Wu *et al.*, 2008).

Es importante enfatizar, que las comunidades fúngicas en los tratamientos con biosólido, mostraron un perfil diferente al final del ensayo, donde las bandas predominantes fueron: i) la banda 1 con un 99% de similitud con *Fusarium sp.*, que de acuerdo con Viñas *et al.* (2005), tiene capacidad para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos; ii) la banda 12 con 99% de similitud con *Scopulariopsis brevicaulis*; y iii) la banda 7 con 99% de similitud con *Eleutherascus lectardi*, formando parte de Ascomycota. Estas bandas dominantes pueden ser asociadas con la alta degradación de los hidrocarburos más recalcitrantes, observada en los tratamientos con biosólido como enmienda.

Saison *et al.* (2006) e Innerebner *et al.* (2005), indicaron que la adición de las comunidades microbianas presentes en los composts no deja unas trazas microbianas directas en el suelo, pero sí tiene un efecto indirecto sobre los cambios en la descomposición de la materia orgánica del suelo. En nuestro experimento, los análisis de DGGE mostraron que el compost puede tener una comunidad bacteriana similar a la del suelo enmendado con compost al final del ensayo (Tabla II.13).

La banda 8, representa a bacterias no clasificadas, con un 97% de similitud a las bacterias encontradas en una mezcla de paja con compost de estiércol de vaca (Green *et al.*, 2004), apareciendo tanto en el compost como en el suelo enmendado con compost (C+LF) (Figura II.25a y Tabla 13). El análisis DGGE realizado sobre la comunidad fúngica, muestra algunas bandas que aparecen en el biosólido granulado y compostado, y en todos los tratamientos del suelo (bandas 1, 6 y 13, estrechamente relacionadas con Ascomycota y las bandas 9, 14 y 17, relacionadas con bacterias no clasificadas y Eucariotas). Estas observaciones, sugieren que estas bandas provienen de las enmiendas orgánicas y/o del lodo de refinería, sin embargo, sería necesario llevar a cabo un análisis más detallado con otras herramientas moleculares como ADN/ARN SIP o clonación, para justificar si el biosólido granulado o compostado deja huella en las comunidades microbianas del suelo.

*De este experimento de campo en suelos con un largo historial de aporte de lodos de refinería se deduce que estos hidrocarburos, más recalcitrantes, siguen actuando como fuente de carbono para los microorganismos del suelo siempre que se den las condiciones adecuadas de pH, conductividad eléctrica, humedad y aireación.*

*Los parámetros bioindicadores de la calidad microbiológica del suelo, han puesto de manifiesto una mayor estimulación de la comunidad microbiana en los suelos con hidrocarburos tratados con landfarming, y que la adición de altas dosis de enmiendas orgánicas incentiva aún más la degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo, debido a la mayor estimulación del tamaño y actividad de las poblaciones microbianas del suelo que provocan. Esto es particularmente notable, cuando se trata de una enmienda con materia orgánica poco estabilizada, rica en sustratos de C biodegradables y nutrientes (como es el caso del biosólido granulado).*

*En cuanto a las comunidades microbianas (bacterianas y fúngicas) detectadas en el suelo, se ha puesto de relieve que en los suelos con hidrocarburos existen microorganismos específicos, adaptados a ese medio, capaces de metabolizar dichos hidrocarburos. También puede afirmarse que si bien las enmiendas orgánicas aportan ciertos microorganismos detectables en los suelos enmendados después del proceso de biorremediación, la principal función de las enmiendas, no es aportar microorganismos al suelo, sino favorecer con el aporte de fuentes carbonadas, el desarrollo de aquellas colonias autóctonas del suelo con capacidad de degradar los hidrocarburos. Asimismo, se puede concluir que tanto las Actinobacterias y las bacterias pertenecientes a Chloroflexi y Firmicutes, como como los hongos Ascomycota, juegan un papel muy importante en la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes existentes en estos suelos y que estos grupos microbianos se encuentran de forma autóctona en los suelos con hidrocarburos aunque pueden verse favorecidos por el aporte de las enmiendas orgánicas.*



## **CAPITULO III**

# **DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS MEDIANTE EL USO DE PLANTAS: 1) FITORREMEDIACIÓN 2) REVEGETACIÓN**





## DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS MEDIANTE EL USO DE PLANTAS EN LA ZONA TRATADA

La fitorremediación es una técnica de biorremediación “in situ” de bajo coste, que puede ser apropiada para la restauración de suelos contaminados con petróleo (Sang *et al.*, 2008). Puede ser definida como el uso de plantas para eliminar los contaminantes del suelo o disminuir su toxicidad, a través del efecto estimulante de sus exudados radiculares sobre la actividad de los microorganismos de la rizosfera, (Cunningham *et al.*, 1996). Las plantas o la microflora asociada a las plantas, pueden transformar ciertos hidrocarburos en formas no tóxicas (Cunningham y Berti, 1993; Cunningham *et al.*, 1995). Durante el metabolismo normal de las plantas, las raíces exudan a la rizosfera compuestos orgánicos e inorgánicos que estimulan el número y la actividad metabólica de los microorganismos asociados a las raíces, favoreciendo la degradación de los compuestos tóxicos orgánicos (Kuiper, 2004; Palmroth, 2007). Así, Palmroth *et al.*, (2002), en suelos con hidrocarburos sembrados con *Zea mays*, *Vicia faba* o *Medicago sativa L* observaron un 56% de incremento de degradación de los hidrocarburos en la rizosfera, con respecto a los suelos no cultivados. Después de un vertido de petróleo en el suelo, aparecen nuevos substratos disponibles para los microorganismos, siendo las bacterias y hongos los microorganismos dominantes que descomponen los hidrocarburos del petróleo (Siddiqui y Adams, 2002). Algunos estudios indican que el recuento microbiano aumenta en los suelos con hidrocarburos y que la vegetación aumenta el efecto biodegradador de hidrocarburos por parte de los microorganismos (Palmroth, M., 2002). El importante papel de los microorganismos en la fitorremediación está ampliamente reconocido (Anderson *et al.*, 1993; Doni *et al.*, 2012) y aunque algunas plantas pueden secuestrar y degradar algunos tipos de contaminantes orgánicos del suelo, la degradación del contaminante *in situ* por los microorganismos de la rizosfera asociados a las raíces es probablemente el mecanismo más importante durante la fitorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos (Dickinson y Rutherford, 2006).

Actualmente, el uso de plantas y sus microorganismos asociados para degradar los hidrocarburos presentes en el suelo está ganando muchos adeptos como técnica de recuperación de suelos (van der Lelie *et al.*, 2001; Arthur *et al.*, 2005). Dentro del campo de la fitorremediación, la rizorremediación es considerada como el primer mecanismo responsable de la degradación de los hidrocarburos del suelo (Hutchinson *et al.*, 2003; Yateem *et al.*, 2007). La rizorremediación se define, como la aceleración de la degradación de los contaminantes orgánicos en el suelo, como consecuencia del aumento de la actividad biodegradadora de los microorganismos de la rizosfera (Shaw y Burns, 2005).

La adición de enmiendas orgánicas a los suelos con hidrocarburos puede fomentar el crecimiento y la actividad microbiana, favoreciendo la degradación de los hidrocarburos. Residuos orgánicos como el biosólido fresco o compostado son considerados como una fuente de nutrientes, enzimas y microorganismos (Ros *et al.*, 2003; Tejada *et al.*, 2006; Bastida *et al.*, 2007). Esto los hace ser apropiados para su uso en los procesos de degradación de los contaminantes orgánicos puesto que al adicionarlos al suelo incrementarán la población microbiana (bioaugmentación), estimularán la actividad de los

microorganismos autóctonos del suelo (bioestimulación), aumentarán la concentración de enzimas, ayudarán a mantener la humedad del suelo y mejorarán las características estructurales del mismo. Sin embargo, aunque existen numerosos estudios sobre el efecto beneficioso de la adición de enmiendas orgánicas sobre la calidad de suelos no contaminados y el crecimiento de las plantas (Mabuhay *et al.*, 2006; López-Pineiro *et al.*, 2007), la información existente sobre la eficacia de estas enmiendas en la degradación de hidrocarburos durante los procesos de biorremediación y fitorremediación de suelos con hidrocarburos es escasa.

Asimismo, existe poca información disponible sobre la eficacia de las diferentes familias de plantas o de especies individuales en la degradación de los hidrocarburos, particularmente en suelos semiáridos. Para que una determinada especie vegetal sea adecuada para su uso en fitorremediación, dicha planta debe poder adaptarse al medio con un alto contenido en hidrocarburos, y además, debe poder adaptarse a las condiciones adversas del clima semiárido existentes en la zona de estudio (escasez de precipitaciones y altas temperaturas).

Mediante los ensayos que describimos a continuación, se ha podido establecer qué especies vegetales son más adecuadas para su empleo en procesos de fitorremediación de suelos con hidrocarburos tras un proceso de landfarming y en clima semiárido. Estos ensayos han servido también para seleccionar las especies vegetales a utilizar para revegetar las parcelas donde se aplicaron las técnicas de landfarming. Esta revegetación servirá para proporcionar una continuidad en la biorremediación a largo plazo de los suelos con hidrocarburos (Panchenko *et al.*, 2002), disminuyendo, al mismo tiempo, el impacto paisajístico que pueda tener sobre la zona el reciclado controlado en el suelo de los lodos de refinería, como sistema de gestión de los mismos.

Para la consecución de estos objetivos se planteó someter estos suelos con hidrocarburos a un proceso de fitoestimulación (ensayándose la incidencia de la incorporación o no de biosólido de depuradora granulado o compostado en su eficacia), mediante la siembra de semillas de especies vegetales con gran desarrollo radicular (a fin de promover una gran actividad microbiana en la rizosfera que favorezca la degradación de los hidrocarburos), y capaces de desarrollarse en presencia de hidrocarburos y condiciones de sequía.

## **INVENTARIO ECOLOGICO DE LAS ESPECIES COLONIZADORAS DE LA ZONA**

El inventario ecológico de las especies vegetales colonizadoras de la zona en estudio nos permitió evaluar la estructura de la comunidad local de plantas, así como estimar la posibilidad de recolección de semillas para el ensayo de revegetación. El inventario de vegetación se centró en las especies dominantes desde el punto de vista estructural. En la Imagen III.1 se muestra el área experimental dónde se realizaron los ensayos de campo. En rojo se muestra la zona dedicada a experimentación científica, en la cual, se han

establecido las parcelas de estudio empleadas en este trabajo de Tesis Doctoral y en azul, la zona dónde se ha realizado el inventario de vegetación.

En la zona de inventario existen tres tipos básicos de formación. La formación dominante es un aulagar de 1.5 m dominado por *Calicotome intermedia*.

*Calicotome intermedia* es la especie ampliamente dominante, pero también se encuentran numerosos individuos de *Rhamnus lycioides* (espino negro), *Chamaerops humilis* (palmito), *Olea europaea* (acebuche), *Rhamnus alaternus* (aladierno), *Osyris quadripartita* (bayón), *Ficus carica* (higuera), *Genista umbellata* y *Asparagus albus*.

En las partes más bajas existen ejemplares de *Salsola oppositifolia*. Se trata en resumen, de una comunidad característica de las áreas costeras térmicas de las inmediaciones de Cartagena dónde las condiciones de humedad son relativamente favorables, sobre todo si se las compara con zonas más interiores.



**Foto III.1.** Área de estudio. En rojo se delimita el área de las parcelas experimentales. En azul la zona de vegetación seminatural inventariada. Con flechas se indican dos formaciones singulares: vegetación en barranco que se aprecia claramente por su mayor densidad (flechas amarillas) y manchas de *Atriplex halimus* de color más claro en áreas más perturbadas (flechas grises).

Una segunda formación se encuentra en el barranco. Ésta es básicamente similar a la formación ya descrita pero con dos peculiaridades, en primer lugar, la densidad de vegetación es mucho mayor, tal y cómo se aprecia claramente en la Imagen III.1, evidentemente existe una mayor disponibilidad hídrica; en segundo

lugar, la mayoría de los individuos de *Chamaerops humilis* y *Rhamnus alaternus* se concentran en esta zona ya que son especies que tienen mayores exigencias hídricas.



Foto III.2.- *Atriplex halimus*

Finalmente, existen pequeñas zonas dominadas por el arbusto *Atriplex halimus* (Imagen III.1). En la imagen se reconocen por su color más grisáceo-azulado, su textura de grano más fino y estar presentes en zonas más removidas (con signos evidentes de abancalamiento). *Atriplex halimus* es una especie tolerante en cierto grado a la salinidad, sequía, temperaturas extremas y a la alteración del terreno (Mattia *et al.*, 2005), y es probable que se encuentre instalado sobre zonas que por alguna razón han sido más perturbadas que la zona circundante. Estos motivos hacen que se haya considerado esta especie como la más adecuada de las presentes en la zona, para ser utilizada en las parcelas de estudio, ya que en general, la fitorremediación debe ser regida por el uso de plantas indígenas, especialmente las que crecen en sitios contaminados (Lopez-Martinez *et al.*, 2002).

A partir de estas bases entre el final de la primavera y el comienzo del otoño se recogieron semillas de *Atriplex halimus* para realizar siembras controladas en los ensayos en microcosmos y en las parcelas experimentales (revegetación).

### 1) FITORREMEDIACIÓN A NIVEL DE MICROCOSMOS CON Y SIN APORTE DE ENMIENDAS ORGÁNICAS

Los ensayos de fitorremediación a nivel de microcosmos se llevaron a cabo con el objetivo de optimizar este proceso de fitorremediación (fitoestimulación) en suelos con un tratamiento previo de landfarming, y establecer, al mismo tiempo, qué especies vegetales son más adecuadas, en zonas semiáridas, para su empleo en procesos de revegetación de suelos con hidrocarburos tras un tratamiento de biorremediación. Es importante encontrar la especie vegetal adecuada para degradar un compuesto orgánico concreto, y aunque existen modelos matemáticos que nos indican que especies de plantas son adecuadas (Thoma *et al.*, 2003), en general, el uso de fitorremediación para un lugar específico, es empírico y basado en estudios preliminares en laboratorio (Kirkpatrick *et al.*, 2006; Euliss *et al.*, 2007; Basumatary *et al.*, 2012).

Verificaremos, si el desarrollo de determinadas plantas, contribuye a la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes remanentes en el suelo y si esta degradación se ve incrementada o no, por el aporte de materia orgánica.

**a) Selección de las especies vegetales más adecuadas para desarrollarse en un suelo con hidrocarburos (ensayo de germinación).**

La eficiencia de la técnica de fitorremediación, depende de la naturaleza físico-química del contaminante (Sang-Hwan *et al.*, 2007), las condiciones medioambientales y el tipo de suelo (Labud *et al.*, 2007), y varía considerablemente según el tipo de especie vegetal que se utilice (Olson *et al.*, 2008). Por este motivo es importante seleccionar una planta adecuada, que pueda desarrollarse con normalidad en el ambiente donde se realizará el ensayo de campo y que sea capaz de incentivar la degradación de los hidrocarburos allí presentes.

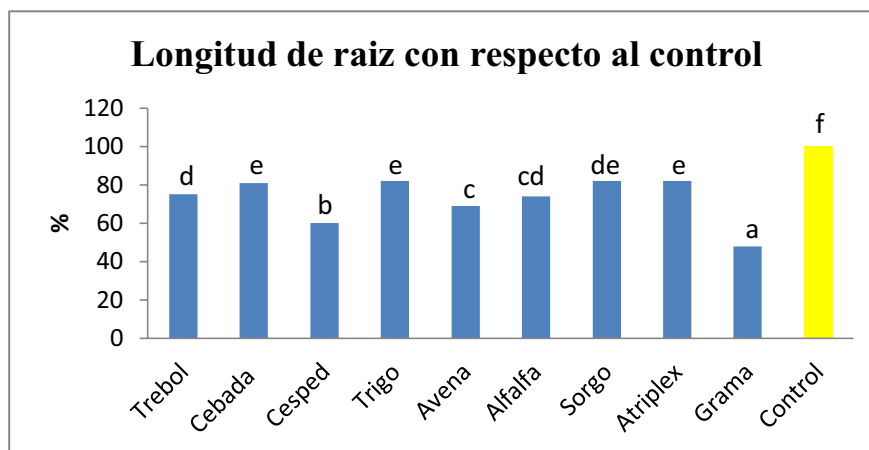
La distinta sensibilidad de las plantas a la toxicidad de los hidrocarburos, es bien conocida (Crafts y Reiber, 1948; Currier, 1951; Baker, 1970; Warner *et al.*, 1983; Gauvrit y Cabanne, 1993; Chaîneau *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2002). Por este motivo, se llevó a cabo un ensayo de germinación con semillas procedentes de una amplia gama de especies vegetales que de acuerdo con la bibliografía existente habían mostrado ser eficaces en procesos de fitodegradación de hidrocarburos, a fin de seleccionar las más idóneas para el tipo concreto de hidrocarburos existente en el suelo a tratar.

Las especies vegetales ensayadas fueron las siguientes:

*Atriplex halimus* (atriplex), *Ordeum vulgare* (cebada), *Avena sativa* (avena), *Cynodon dactylon* (bermuda grass, grama), *Lolium perenne* (césped), *Triticum sativum* (trigo), *Medicago sativa* (alfalfa), *Sorghum vulgare* (sorgo) y *Trifolium arvense* (trébol).

En placas Petri con 15g de suelo de la zona en estudio (con presencia de hidrocarburos recalcitrantes) se sembraron por sextuplicado 15 semillas de cada especie vegetal, humedeciendo el suelo convenientemente y manteniendo las placas en cámara de germinación, a 28 °C y 5 días de oscuridad, hasta la germinación de las semillas, y posteriormente en cámara de crecimiento, en condiciones controladas de luz (16h día, 8 h noche) humedad ambiente (80%/60%, día/noche) y temperatura (24°C/18°C, día/noche), durante 20 días. Después de este tiempo se evaluó el porcentaje de germinación, índice de germinación y la longitud de tallo y raíz de cada una de las plántulas germinadas. De este modo se podía establecer no sólo la capacidad de las semillas de estas especies vegetales para germinar en este suelo, sino la potencial supervivencia de la plántula germinada en presencia de hidrocarburos.

En la Figura III.1 se muestra el porcentaje de crecimiento medio de raíz de las plántulas, de las diferentes especies vegetales, germinadas sobre el suelo con hidrocarburos en relación a la longitud de raíz de las plántulas desarrolladas sobre un suelo control sin hidrocarburos.



**Figura III.1.-** Longitudes relativas (en %) de las raíces de las plántulas germinadas sobre el suelo con hidrocarburos en relación a la de las plantas germinadas en el suelo control (longitud relativa del 100 %). Barras con la misma letra indican valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse en la Figura III.1, las especies vegetales que mejor comportamiento mostraron en relación al desarrollo radicular fueron el atriplex, el sorgo, la cebada y el trigo, no presentando diferencias significativas entre ellas. La grama (bermuda grass) mostró un desarrollo radicular significativamente inferior al del resto de especies vegetales ensayadas. Todas las semillas sometidas a este estudio mostraron un crecimiento radicular significativamente inferior en el suelo con hidrocarburos que en el suelo control, lo que indica que en mayor o menor medida, dependiendo del tipo de semilla, los hidrocarburos afectaban al crecimiento de estas plantas.

Este parámetro es un factor de gran importancia para el ensayo que nos ocupa ya que el desarrollo radicular está estrechamente relacionado con el desarrollo y actividad de diversas especies microbianas a nivel de la rizosfera, las cuales contribuirán a la degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo (Maqbool *et al.*, 2012). Es de prever que cuanto mayor sea la superficie rizosférica mayor será la actividad microbiana que se desarrollará en el suelo, y por tanto, los procesos de degradación de hidrocarburos tendrán lugar con mayor intensidad.

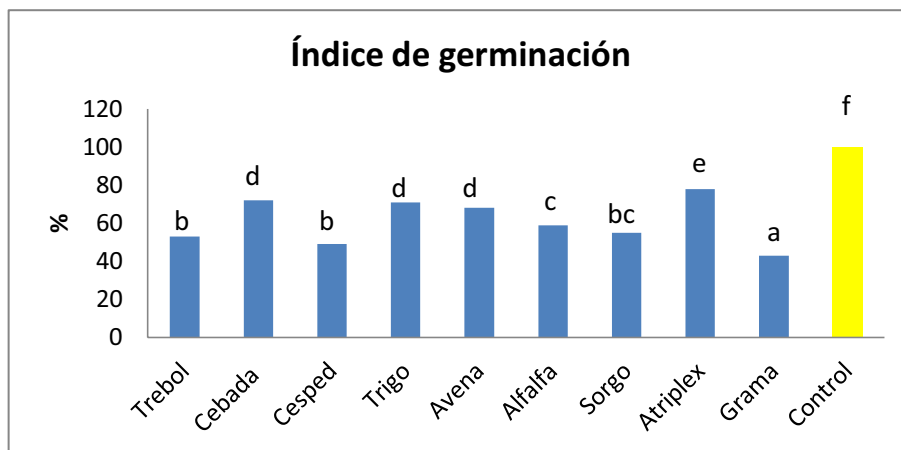
Para obtener una visión más global sobre la capacidad de estas especies vegetales para desarrollarse sobre el suelo contaminado, se determinó el Índice de Germinación, que es un índice que engloba el efecto del contaminante tanto sobre la capacidad de germinación de la semilla como sobre la elongación de las raíces de la plántula germinada. Este índice se determina de acuerdo con la fórmula propuesta por Zuconi *et al.*, (1985):

$$IG = \% \text{ germinación} \times L_m/L_c$$

donde:

- % germinación es el porcentaje de semillas germinadas en el suelo en estudio con respecto al suelo control,
- $L_m$  es la media de la longitud de las raíces de las semillas germinadas en el suelo en estudio
- $L_c$  es la media de la longitud de las raíces de las semillas germinadas en el control

En la Figura III.2 se muestran los valores medios de Índice de Germinación (IG) obtenidos para las diferentes especies vegetales ensayadas. Para la determinación de este índice se tomó como referencia la germinación en un suelo control sin hidrocarburos, a cuyos valores de porcentaje de germinación se le asignó el valor de 100%.



**Figura III.2.-** Índice de germinación (%) sobre el suelo con hidrocarburos de las semillas de las diferentes especies vegetales ensayadas. Barras con la misma letra indica valores que no son significativamente diferente de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse, la presencia de hidrocarburos ejerció un efecto negativo sobre la germinación de las semillas de todas las especies vegetales ensayadas, variando la magnitud de este efecto fitotóxico en función del tipo de planta. Adam et al., (2002), indicaron que la sensibilidad a la contaminación por hidrocarburos puede variar incluso dentro de los miembros de una misma familia de plantas, de ahí la importancia de probar cada una de ellas.

De acuerdo con este índice de germinación, la especie que menos se veía afectada por la toxicidad de los hidrocarburos presentes en el suelo era el atriplex siendo el IG de las semillas de esta especie significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al del resto de semillas ensayadas. Le seguían en tolerancia a la presencia de hidrocarburos la cebada, el trigo y la avena que no mostraron diferencias significativas entre los valores de su IG.

Basándonos en estos resultados, las especies vegetales seleccionadas para llevar a cabo el experimento de fitorremediación fueron el atriplex, la cebada, y una mezcla de semillas de trigo, césped y avena.

### **b) Ensayo de fitorremediación**

El objetivo de este estudio fue, por una parte, el establecer si la fitorremediación resulta una estrategia eficaz para la recuperación de suelos con hidrocarburos de carácter recalcitrante y por otra, evaluar si la adición de enmienda orgánica (biosólido de depuradora granulado o compostado), incrementa la eficacia de esta fitorremediación, estimulando la actividad de las poblaciones microbianas en la rizosfera de ese suelo y consecuentemente, la degradación de los hidrocarburos.

Además, mediante el uso de las plantas que prueben en este estudio, ser más resistentes a la presencia de hidrocarburos existente en los suelos tratados, se procederá posteriormente a revegetar la zona de estudio, con el fin de conseguir implantar una cubierta vegetal estable que reduzca el posible impacto paisajístico causado en dicha zona, y que, al mismo tiempo, favorezca la degradación de los hidrocarburos remanentes.

Para este estudio se utilizaron diferentes especies vegetales: *Atriplex halimus*, (atriplex) perteneciente a la familia *Chenopodiaceae*, *Ordeum vulgare* (cebada) perteneciente a la familia de las *Poaceae*, y una mezcla de *Triticum sativum* (trigo), césped (*Lolium perenne*) y *Avena sativa* (avena), pertenecientes también a la familia *Poaceae*. Estas especies de plantas fueron seleccionadas en función de los resultados obtenidos en el ensayo de germinación previo. El atriplex, fue seleccionado además por ser un matorral perenne muy resistente, adaptado a las condiciones de clima árido y salinidad, que, además de ser una especie indígena de la zona a tratar, se desarrolla bien en suelos marginales, lo que hace a esta especie vegetal una excelente candidata para su uso en procesos de fitorremediación y revegetación en suelos de zonas semiáridas.

Sobre 2 kg de suelo de las parcelas sin enmendar, tratadas anteriormente mediante la aplicación de la técnica de landfarming (suelo del tratamiento LF), colocado en contenedores apropiados, se aplicaron las siguientes dosis de biosólido (S+B) y compost (S+C) en peso fresco: 0, 30, 60, y 90 t/ha, sembrándose a continuación en cada tratamiento por cuadruplicado, las semillas de las especies vegetales seleccionadas. También se prepararon contenedores con este mismo suelo pero sin enmendar y sin sembrar, que fue utilizado como un segundo control. Los suelos se humedecieron convenientemente y se dispusieron en una cámara de cultivo en condiciones controladas de luz (16 horas de luz y 8 de oscuridad), temperatura (24 °C de día y 15 °C de noche) y humedad ambiente (60% día, 80% noche). Las plantas se dejaron crecer durante cuatro meses, al cabo de los cuales se cortaron a nivel del suelo determinándose los pesos de biomasa vegetal fresca y seca a 65 °C. Asimismo, al final del ensayo, se determinó en el suelo la actividad metabólica global de los microorganismos a nivel de rizosfera, mediante la medida de la actividad



deshidrogenasa, carbono de la biomasa microbiana, respiración y ATP en los suelos de los diferentes tratamientos, y se analizó el contenido total de hidrocarburos.

Los suelos utilizados en este ensayo contienen hidrocarburos recalcitrantes, puesto que, como ya hemos mencionado anteriormente, han sido añadidos a estos suelos mediante el aporte de lodos de refinería, desde hace un largo periodo de tiempo y además, han sido sometidos previamente a un tratamiento de biorremediación mediante landfarming. Ciertas propiedades del hidrocarburo, como el tiempo de envejecimiento, el contenido en materia orgánica e inorgánica, la solubilidad acuosa, la polaridad, hidrofobicidad, lipofilia y la estructura molecular, son algunos de los factores que afectarán al éxito de la fitorremediación en la degradación de dicho hidrocarburo (Reid *et al.*, 2001). Se ha visto también, que el grado de fitotoxicidad varía en función de la complejidad del hidrocarburo; en estudios realizados con gasolina de serie, keroseno, diesel y aceites pesados, se observó que las fracciones más lábiles, bien debido a su mayor volatilidad o por la presencia de compuestos menos tóxicos, causaban menos daños a largo plazo a las plantas, que las fracciones pesadas (Crafts y Reiber, 1948).

#### Rendimiento de biomasa vegetal

En general, las enmiendas orgánicas (biosólido y compost de biosólido), incrementaron el rendimiento en biomasa de las plantas cultivadas con respecto a los suelos sin enmienda orgánica, en las tres dosis ensayadas, si bien este incremento no siempre era estadísticamente significativo (Tabla III.1).

**Tabla III.1.-** Producción de biomasa vegetal (gramos) después de 4 meses de crecimiento de la planta (peso seco)

Tratamiento	Cebada	Mezcla de semillas	Atriplex
S	5,20 ab	2,84 ab	0,26 a
S + B 30t/ha	4,52 a	2,93 ab	1,04 c
S + B 60t/ha	4,89 a	3,24 c	1,40 d
S + B 90t/ha	6,10 c	2,22 a	1,02 c
S + C 30 t/ha	6,48 c	3,03 bc	0,34 ab
S + C 60t/ha	6,26 c	2,80 ab	0,37 ab
S + C 90t/ha	5,95 c	3,34 c	0,58 b

*Para cada especie vegetal, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).*

La menor respuesta a la enmienda orgánica se observó en el tratamiento con mezcla de semillas, siendo incluso superior la producción de biomasa vegetal en el suelo control que con alguna de las dosis ensayadas (S+B 90 t/ha) aunque estas diferencias no eran estadísticamente significativas. No obstante, se observó un efecto positivo de la enmienda sobre el rendimiento de estas plantas en los tratamientos con el biosólido a dosis de 60 t/ha (S+B 60t/ha) y el compost a dosis de 90 t/ha (S+C 90 t/ha) sin diferencias significativas entre ellos.

Con respecto al efecto de la dosis de aplicación sobre el rendimiento vegetal, sólo se observaron pequeñas diferencias entre dosis en los suelos enmendados con compost (S+C) para cada una de las especies vegetales ensayadas, si bien, la biomasa producida tendía a incrementar con la dosis en el caso de la mezcla de semillas y del atriplex, mientras que con la cebada ocurría lo contrario, la producción vegetal disminuía con el aumento de la dosis de compost, aunque estas diferencias no eran estadísticamente significativas.

En los suelos enmendados con biosólido (S+B), la dosis más elevada (90 t/ha) produjo rendimientos de biomasa estadísticamente superiores a los obtenidos con las otras dosis en los cultivos de cebada, mientras que los rendimientos mayores de atriplex y de mezcla de semillas se observaron en los suelos que recibieron 60 t/ha de biosólido (Tabla III.1). Esto sugiere que de las especies vegetales anteriores, la cebada es probablemente la más tolerante a la elevada cantidad de amonio y sales que aporta el biosólido granulado cuando se aplica en su dosis más alta.

#### Degradación de los hidrocarburos procedentes del petróleo

La concentración inicial de hidrocarburos totales en el suelo tratado con landfarming empleado en este estudio, era de 20,6 g/kg. En los suelos que no habían recibido enmienda ni habían soportado crecimiento vegetal, la contaminación de hidrocarburo disminuyó a 18,5 g/kg, lo que representa un porcentaje de degradación del 10,2%. En los suelos no enmendados pero con crecimiento vegetal, la tasa de degradación de hidrocarburos más alta se observó en los suelos tratados con cebada (22,98%), seguido por los suelos cultivados con el atriplex (12,62%) y los suelos cultivados con la mezcla de semillas (9,22%) (Tabla III.2). Según observamos con estos datos, es claro que determinadas especies de plantas son más efectivas que otras en la estimulación de la degradación de los hidrocarburos (Olson *et al.*, 2007).

**Tabla III.2.-** Porcentaje de degradación de hidrocarburos con los diferentes tratamientos después de 4 meses de crecimiento vegetal.

Tratamiento	Cebada	Mezcla de semillas	Atriplex
S	22,98 c	9,22 b	12,62 b
S + B 30t/ha	24,52 cd	17,48 c	28,80 cd
S + B 60t/ha	28,48 d	22,33 d	28,80 c
S + B 90t/ha	15,53 b	39,32 e	22,33 c
S + C 30 t/ha	22,01 c	15,05 c	39,32 d
S + C 60t/ha	26,05 cd	17,48 c	40,13 d
S + C 90t/ha	29,13 d	20,71 d	40,13 d
S.P. (Sin planta)	10,20 a	10,20 a	10,20 a

Para cada tratamiento, la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

Los exudados radiculares y las enzimas secretadas en la rizosfera de la planta, determinan el crecimiento y actividad de los microorganismos asociados a las raíces, los cuales están implicados en la degradación de los hidrocarburos (Gaskin y Bertham, 2010). Estos exudados y enzimas, varían en función de la especie vegetal, lo que explica el diferente efecto fitorremediador de las especies vegetales ensayadas. Olson *et al.* (2007), en un estudio realizado con 18 especies de plantas pertenecientes a 8 familias diferentes, encontraron que entre las diferentes familias ensayadas, Poaceae junto con Asteraceae y Geraniaceae, eran las más efectivas en la estimulación de la degradación de los hidrocarburos, sin que las diferencias entre las distintas especies de una misma familia fuesen estadísticamente significativas.

En la biorremediación de compuestos orgánicos, como son los hidrocarburos, basada en la degradación por la estimulación microbiana en la rizosfera, la fertilización es esencial para el éxito. La aplicación de una fertilización adecuada, puede reducir la competencia entre los microorganismos y las plantas por la limitación de nutrientes en los suelos, dando lugar a un aumento en la tasa de degradación de los hidrocarburos del petróleo (Hutchinson *et al.*, 2001).

La incidencia de las enmiendas orgánicas en la degradación de los hidrocarburos difería en función de la especie vegetal y del tipo de enmienda. En cualquier caso, el efecto fitorremediador de las diferentes especies vegetales ensayadas se veía incrementado con la incorporación al suelo de ambas enmiendas orgánicas (biosólido y compost) cualquiera que fuese la dosis de aplicación

Para la misma dosis de aplicación, el tratamiento con biosólido era, en general, más efectivo que el de compost, consiguiendo una mayor degradación de hidrocarburos en los suelos donde se plantó mezcla de semillas y en los que se plantó cebada. Sin embargo, en los suelos con *atriplex*, los mejores resultados se obtuvieron con la adición de compost, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas dosis de aplicación de compost.

Hubiese sido de esperar, que la combinación del tipo de raíz y del patrón de exudados, cuando se cultiva una mezcla de semillas, produjese una mayor estimulación en las comunidades microbianas, seguida de un aumento en la eficacia del proceso de fitorremediación en comparación con el tratamiento con una sola especie vegetal. Sin embargo, en este ensayo, en los suelos donde se cultivó una mezcla de semillas, se observó una menor degradación en comparación con los tratamientos con cebada o *atriplex* (excepto cuando se aplicaba biosólido a 90t/ha). Este hecho, coincide con lo observado por otros autores (Banks *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2006). Phillips *et al.* (2009), observaron una mayor reducción de los hidrocarburos, en un suelo tratado únicamente con centeno silvestre o hierba de trigo alto, que en el mismo suelo tratado con una mezcla de los dos anteriores y avena. Algunos autores han indicado que determinadas plantas, pueden incrementar la extractabilidad química de compuestos fuertemente adheridos (como los hidrocarburos) en suelos contaminados, debido a la acción de surfactantes de origen microbiano o vegetal, y de los exudados de las plantas, que afectan a las propiedades físico-químicas del suelo (Joner *et al.*, 2002;

Liste y Prutz, 2006). Las interacciones entre las mezclas de plantas, pueden haber alterado los "inputs" procedentes tanto de los microorganismos como de las plantas, incrementando la desorción de hidrocarburos, lo que podría conducir a una subestimación de la degradación de los mismos en los tratamientos con mezcla de semillas (Phillips *et al.*, 2009).

De acuerdo con la hipótesis planteada en este trabajo, la adición de enmiendas orgánicas, incrementó la eficacia de la fitorremediación en la degradación de los hidrocarburos, en todos los tipos de plantas ensayadas. Sin embargo, la magnitud de este incremento dependía de la especie vegetal, el tipo de enmienda (biosólido granulado o compostado) y de la dosis de aplicación. Así, en suelos enmendados con biosólido, la mayor tasa de degradación de hidrocarburos, se observó en los suelos con mezcla de semillas a dosis de 90 t/ha (39%), mientras que en los enmendados con compost, la mayor tasa de degradación de hidrocarburos se observó en suelos con cultivo de atriplex en cualquiera de las dosis ensayadas (entre 39 y 40%).

#### Parámetros bioquímicos y microbiológicos del suelo

Tradicionalmente, se ha hecho mucho énfasis, en las propiedades físicas y químicas como indicadores de la salud del suelo, pero en las últimas décadas, las propiedades microbiológicas están tomando mayor importancia debido a su sensibilidad y capacidad de proporcionar información que integra a varios factores ambientales (Mijangos *et al.*, 2006). Las propiedades del suelo que proporcionan información acerca de la biomasa, actividad y diversidad de las comunidades microbianas del suelo, han demostrado tener un gran potencial para la valoración de la efectividad de los procesos de fitorremediación (Hernandez-Allica *et al.*, 2006; Epelde *et al.*, 2009a, b).

Las enmiendas orgánicas mejoran las propiedades físicas, nutricionales y microbiológicas del suelo, las cuales estimularán el crecimiento de las plantas y por tanto el desarrollo del sistema radicular, favoreciendo la existencia de una mayor actividad microbiana rizosférica en el suelo (García *et al.*, 2001; Ros *et al.*, 2003). Además, este tipo de enmienda orgánica proporciona un gran aumento de nutrientes, enzimas y microorganismos, que contribuirán a aumentar la degradación de los hidrocarburos. La actividad y el tamaño de las poblaciones microbianas de la rizosfera fueron evaluadas mediante el *carbono de la biomasa microbiana* ( $C_{mic}$ ) y otros parámetros indicadores de la actividad metabólica microbiana global, tales como la *actividad deshidrogenasa*, *respiración* del suelo y contenido de *ATP*.

El carbono de biomasa microbiana es un parámetro empleado con frecuencia como indicador de la calidad del suelo y es utilizado para estimar el tamaño de las poblaciones microbianas existentes en un suelo. Este parámetro engloba tanto a los microorganismos que se encuentran activos como a los que se encuentran en estado latente en el suelo (esporulados) y ha demostrado ser un indicador sensible a cambios en el manejo del suelo, contaminación, cobertura vegetal, adición de enmiendas, etc. (Balota *et al.*, 2003; García *et al.*,

2005; Ros *et al.*, 2006; Bastida *et al.*, 2006; Saison *et al.*, 2006). En el caso que nos ocupa, y ya que las poblaciones microbianas existentes en el suelo serán las encargadas de degradar los hidrocarburos presentes en el mismo, un buen nivel de biomasa microbiana será indicativo de una potencial capacidad para que los hidrocarburos presentes en dicho suelo sean degradados.

Muchas poblaciones microbianas del suelo pueden encontrarse en estado latente (Joergensen y Emmerling, 2006), formando esporas, al verse afectadas por determinados factores, ya sean de origen antrópico o naturales. Por ello, como se ha indicado anteriormente, el carbono de biomasa microbiana es un reflejo del tamaño de las poblaciones microbianas pero no de su actividad ya que este parámetro no discrimina entre las poblaciones que están activas y las que se encuentran esporuladas, En este sentido, Landi *et al.* (2000) indicaron que los términos biomasa microbiana y actividad microbiana son diferentes, y que los cambios que suceden en el suelo pueden ser más rápidamente detectados por medidas de actividad microbiana que por medidas de biomasa microbiana. Por tanto, si queremos saber la actividad microbiana existente en el suelo tendremos que recurrir a parámetros tales como el contenido de ATP, la respiración microbiana o la actividad deshidrogenasa, que reflejan la actividad global existente en el ecosistema.

La mejoría en las propiedades del suelo se verá reflejada en los altos valores que presentan estos parámetros en los suelos enmendados con respecto a los suelos no enmendados. La alta actividad y tamaño de las poblaciones microbianas observada en suelos enmendados con biosólido granulado en comparación con los suelos enmendados con el compost, es atribuible a la mayor cantidad de sustratos biodegradables que proporciona el biosólido, siendo una gran parte de ellos, sustratos que desaparecen durante el proceso de compostaje.

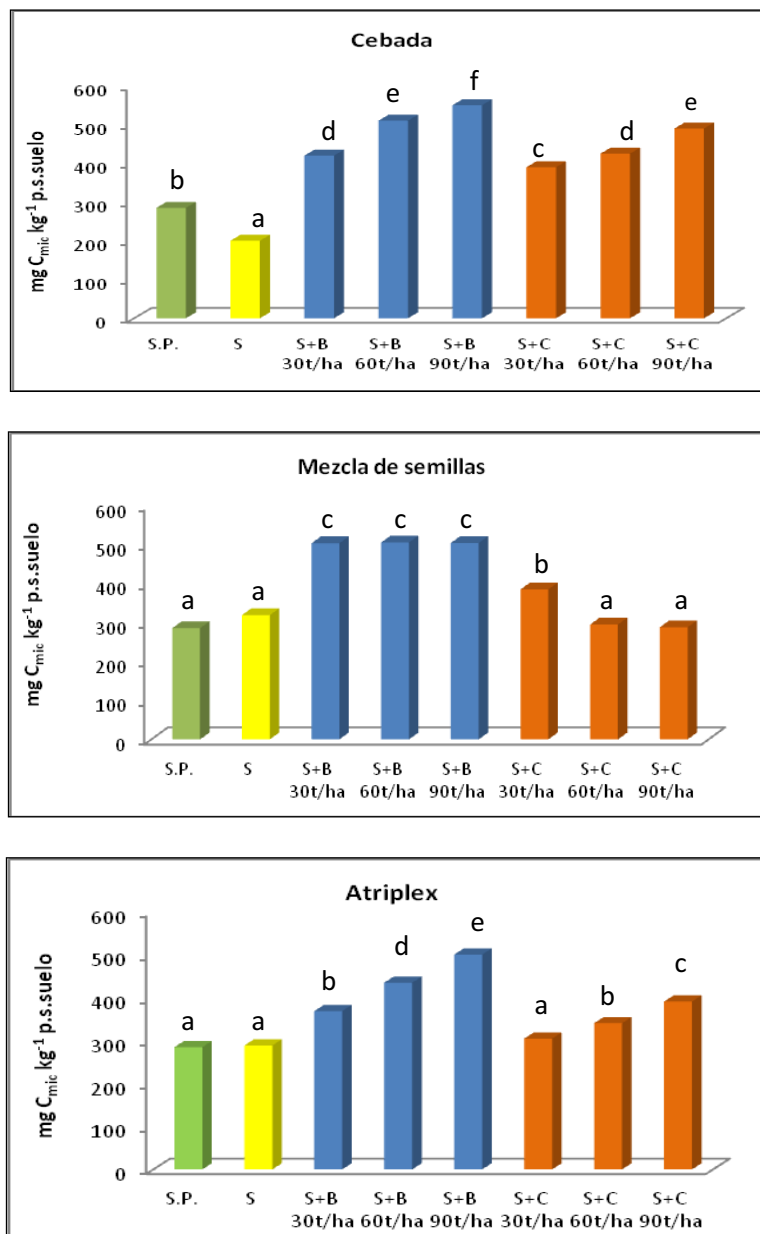
En general, el crecimiento vegetal estimuló el crecimiento de la biomasa microbiana del suelo, mostrando los suelos no enmendados pero con desarrollo vegetal mayores valores de  $C_{mic}$  que los suelos sin enmienda y sin cultivo vegetal (Figura III.3).

Por otro lado, la adición de enmiendas orgánicas estimuló el crecimiento de la biomasa del suelo, siendo los valores de  $C_{mic}$ , en general, mayores en suelos con enmienda que en los no enmendados independientemente del tipo de especie vegetal cultivada (Figura III.3). El valor del  $C_{mic}$  incrementaba con la dosis, aunque no siempre de manera significativa. Aunque el patrón de comportamiento ha sido similar para ambas enmiendas orgánicas, el biosólido granulado resultaba más efectivo que el compost, en el incremento del tamaño de las poblaciones microbianas del suelo (Figura III.3).

Los suelos con vegetación, mostraron valores más altos de actividad microbiana que los no cultivados, debido a la presencia de superficies adicionales para la colonización microbiana y de compuestos orgánicos liberados por las raíces de las plantas (Delorme *et al.*, 2001).

Al margen de este incremento debido a la vegetación e independientemente de la especie vegetal, la actividad microbiana en la rizosfera de los suelos enmendados era, en general, más elevada que en los

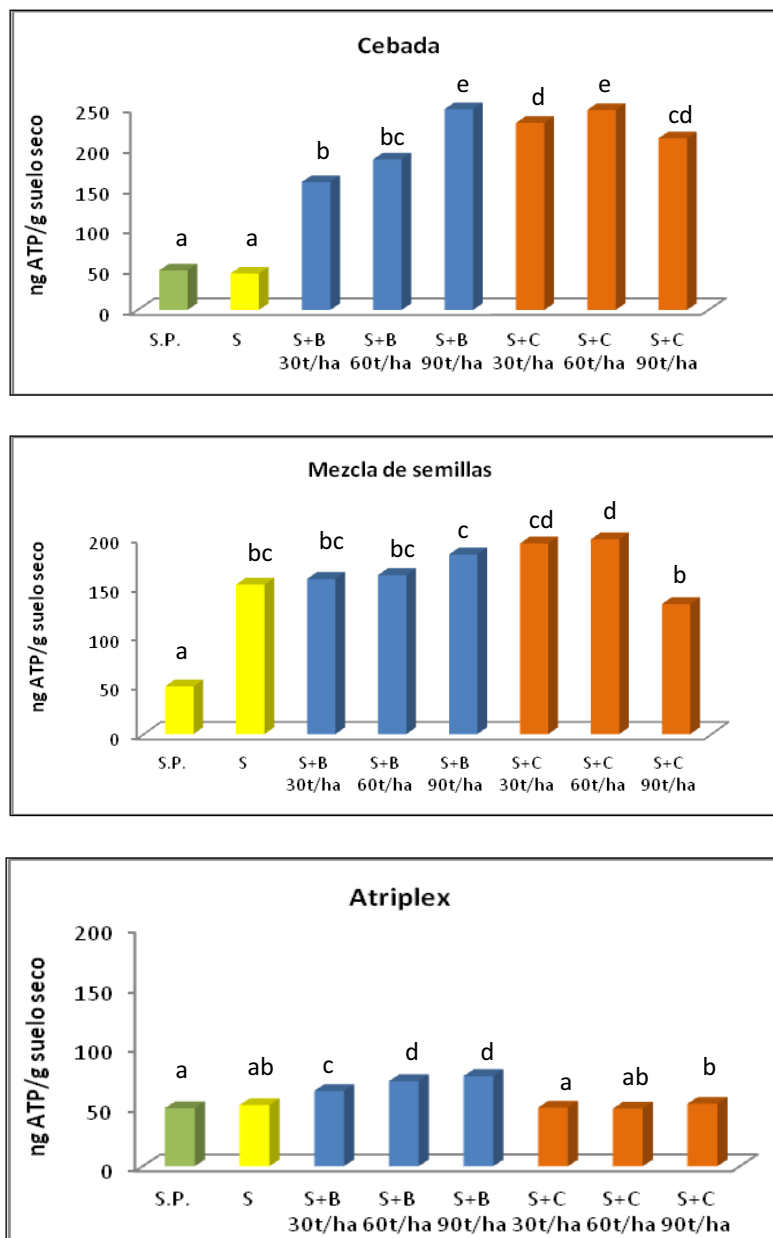
suelos sin enmienda. El suelo tratado con biosólido, mostró para todas las plantas, valores de contenido de ATP, actividad deshidrogenasa y respiración del suelo, significativamente mayores que los de los suelos sin enmienda y los de los suelos enmendados con compost en la mayor parte de los casos (Figuras III.4, 5 y 6). En general, el valor de estos parámetros tendía a incrementar con la dosis de aplicación de la enmienda.



**Figura III.3.-** Carbono de la biomasa microbiana ( $\text{C}_{\text{mic}}$ ) ( $\mu\text{g/g soil}$ ) en los suelos 4 meses después de la germinación. S.P.: suelo sin enmienda y sin planta; S: suelo sin enmienda y con planta; S+B y S+C: suelo con biosólido y con compost, respectivamente. Para cada tipo de planta, barras con la misma letra indica valores que no son significativamente diferente de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

El efecto del compost sobre la actividad microbiana del suelo, era menos acusado que el del biosólido. Sin embargo, los suelos enmendados con compost mostraban valores mayores de actividad deshidrogenasa

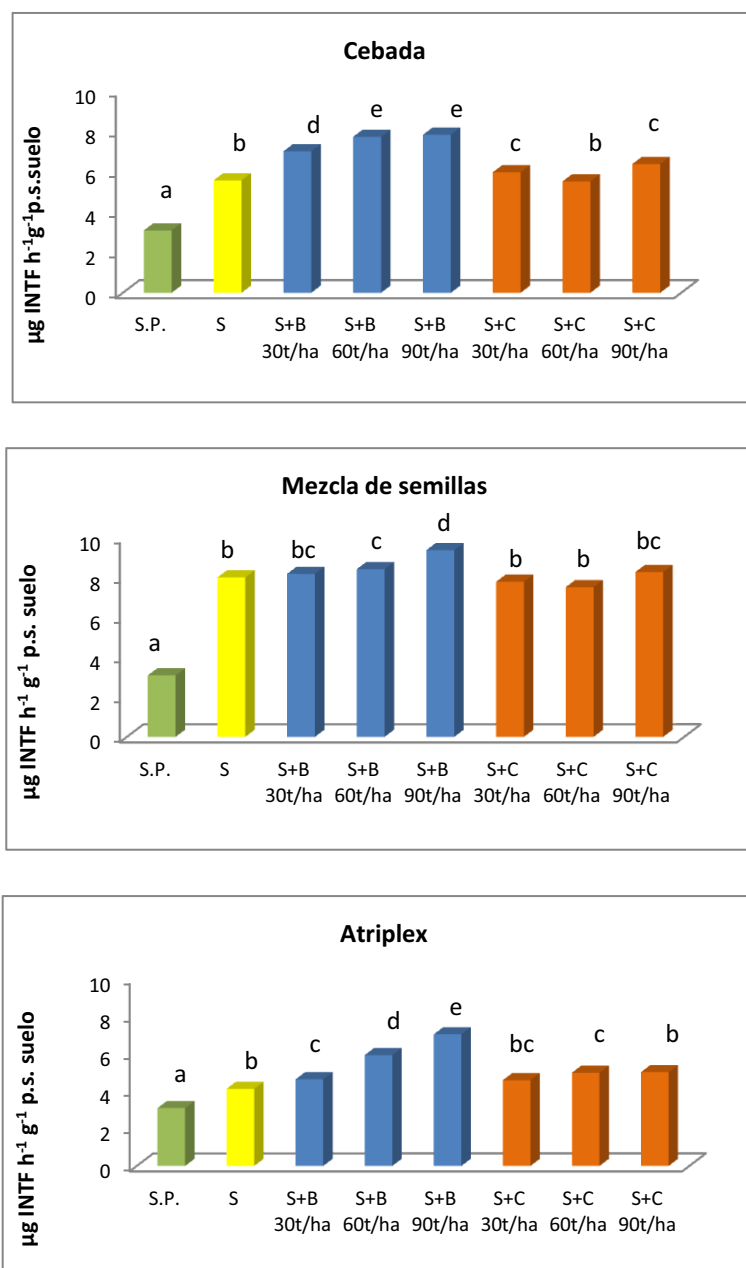
(Figura III.5) y ATP (Figura III.4), que los suelos no enmendados, aunque estas diferencias no siempre eran estadísticamente significativas.



**Figura III.4.-** Contenido de ATP en los suelos 4 meses después de la germinación. S.P.: suelo sin enmienda y sin planta; S: suelo sin enmienda y con planta; S+B y S+C: suelo con biosólido y con compost, respectivamente. Para cada tipo de planta, la misma letra indica los valores que no son significativamente diferente de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la medida de respiración basal del suelo (Figura III.6), los suelos enmendados con compost, con todas las especies de plantas ensayadas, mostraron valores mayores de respiración basal que los suelos sin enmienda, aunque en los suelos con cultivo de cebada o atriplex, las diferencias únicamente eran estadísticamente significativas cuando el compost se adicionaba a dosis de 90 t/ha.

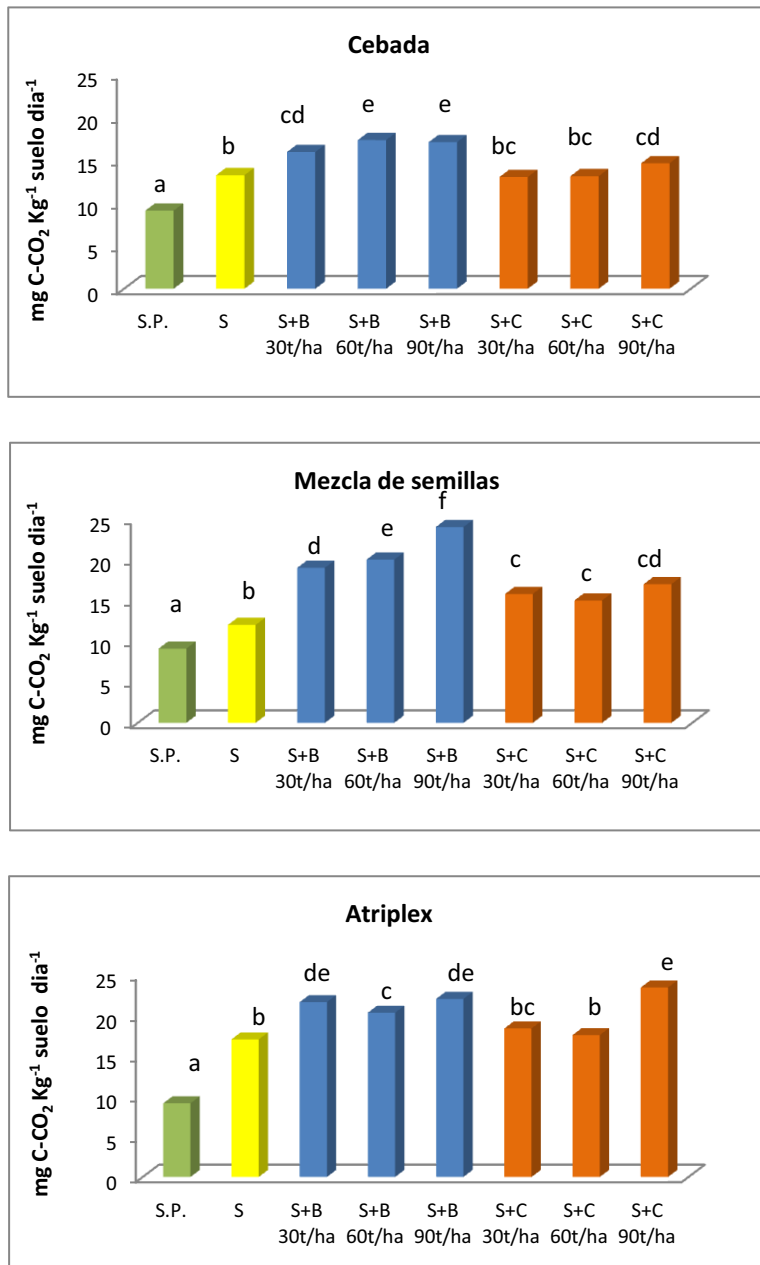
En los suelos no enmendados, el porcentaje de degradación de los hidrocarburos estaba correlacionado positivamente ( $p < 0,05$ ) con la producción de biomasa aérea de la planta y con la respiración basal obtenida, mientras que en ninguno de los suelos enmendados se observó correlación positiva entre la degradación de los hidrocarburos y la producción de biomasa vegetal aérea (Tabla III.3).



**Figura III.5.-** Actividad deshidrogenasa en suelos 4 meses después de la germinación. S.P.: suelo sin enmienda y sin planta; S: suelo sin enmienda y con planta; S+B y S+C: suelo con biosólido y con compost, respectivamente. Para cada tipo de planta, barras con la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).



En los suelos enmendados, la correlación entre la degradación de los hidrocarburos y los parámetros microbiológicos estudiados, variaba en función del tipo de cultivo. Así, en los suelos en los que se cultivó cebada o atriplex, únicamente se observó una correlación positiva con la respiración basal, mientras que en los que se cultivó mezcla de semillas se observó correlación positiva con la actividad deshidrogenasa, el carbono de la biomasa microbiana y la respiración basal (Tabla III.3).



**Figura III.6.-** Respiración basal en suelos 4 meses después de la germinación. S.P.: suelo sin enmienda y sin planta; S: suelo sin enmienda y con con planta; S+B y S+C: suelo con biosólido y con compost, respectivamente. Para cada tipo de planta, barras con la misma letra indica valores que no son significativamente diferente de acuerdo con el test Tukey (p<0,05).

A causa del carácter recalcitrante de los hidrocarburos involucrados en este estudio, será improbable que su consumo y transporte al interior de las plantas pueda contribuir a su desaparición; la estimulación de la degradación de estos hidrocarburos será debida al aumento del crecimiento microbiano y de su actividad metabólica (Doni *et al.*, 2012), debido a la liberación de exudados radiculares. Sin embargo, la falta de correlación entre la biomasa vegetal aérea y la degradación de los hidrocarburos (Tabla III.3), podría sugerir que otros factores aparte de los exudados radiculares, están contribuyendo a la degradación de los hidrocarburos cuando a los suelos contaminados se les ha adicionado enmienda orgánica.

También debemos tener en cuenta, que aunque no siempre existe una relación directa entre el desarrollo de la biomasa vegetal aérea y la radicular, el sistema radicular proporciona una superficie mucho más amplia que la raíz principal para la colonización de los microorganismos (Anderson *et al.*, 1993) y es, esta densidad de la rizosfera la que proporciona unas condiciones idóneas para la fitorremediación (Adam *et al.*, 2002).

**Tabla III.3.-** Coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significación entre el porcentaje de degradación de los hidrocarburos y la producción de la biomasa vegetal y los diferentes parámetros microbiológicos.

Tratamientos	Biomasa vegetal aérea	Actividad deshidrogenasa	C <sub>mic</sub>	Respiración basal
Suelos sin enmienda (n=12)	r =0,6959 p< 0,0120	NS	NS	r= 0,6780 p< 0,0154
Suelos enmendados con cultivo de cebada (n=21)	NS	NS	NS	r= 0,6261 p< 0,0024
Suelos enmendados con cultivo de mezcla de semillas(n=21)	NS	r= 0,7357 p< 0,0001	r= 0,4959 p< 0,0222	r= 0,7052 p< 0,0004
Suelos enmendados con cultivo de atriplex (n=21)	NS	NS	NS	r= 0,4663 p< 0,0333

La correlación positiva encontrada entre la degradación de hidrocarburos y el carbono de la biomasa microbiana, así como la correlación encontrada entre esta degradación y la actividad deshidrogenasa y el contenido de ATP, confirman el papel fundamental que juegan las enmiendas orgánicas en el aumento de la degradación de los hidrocarburos, mediante la estimulación del tamaño y actividad de las poblaciones microbianas del suelo, a través de los nutrientes, microorganismos y enzimas que estos proporcionan al medio.

*Podemos concluir, que la fitorremediación es un tratamiento efectivo para suelos con alto contenido de hidrocarburos recalcitrantes, y que el tratamiento con mezcla de plantas es menos efectivo que el empleo de una sola planta para degradar este tipo de hidrocarburos, particularmente en presencia de enmienda orgánica. La adición de biosólido compostado o granulado a los suelos mejora la eficacia de este proceso en la degradación de los hidrocarburos, tanto mediante la estimulación del crecimiento vegetal como mediante*

*el incremento de la actividad y tamaño de los microorganismos asociados a las raíces. Sin embargo, esta mejora dependerá de la especie vegetal, y del tipo y dosis de la enmienda orgánica. Así, la adición de biosólido sin compostar ofrece mejores resultados que la adición de compost en el caso de la mezcla de semillas y ocurre lo contrario en los suelos donde se sembró *Atriplexhalimus*, donde la mayor degradación de los hidrocarburos se obtuvo empleando compost como enmienda. Asimismo, las dosis más bajas de aplicación son preferibles a las más altas cuando la enmienda es biosólido sin compostar, sin embargo, cuando se trata de biosólido compostado resulta más efectiva la dosis más alta, independientemente de la especie vegetal utilizada para la fitorremediación.*

*Es de destacar la alta eficacia de la fitorremediación del *Atriplexhalimus* en presencia de biosólido compostado (40% de degradación de hidrocarburos), ya que esta planta es endémica en ambientes semiáridos, estando adaptada a estas condiciones climatológicas adversas pudiendo ser por tanto, una buena opción para ser usada en programas de fitorremediación de suelos con presencia de hidrocarburos recalcitrantes en ambientes semiáridos.*

## **2) ENSAYO DE REVEGETACIÓN A NIVEL DE CAMPO**

### **Implantación de una cubierta vegetal estable y resistente a la presencia de hidrocarburos, para la revegetación de la zona tratada.**

El clima semiárido imperante en el área mediterránea donde se encuentra la zona de estudio, induce una escasa cubierta vegetal y por tanto un *input* de materia orgánica bajo, que determina un desarrollo pobre de la estructura del suelo (Díaz *et al.*, 1994). La presencia de una cubierta vegetal estable juega un papel clave en la protección del suelo frente a la erosión (Morgan, 1986; Mena, 2001), la cual implica la pérdida de la fracción orgánica del horizonte superficial del suelo, con el deterioro, no sólo de las cualidades físicas del suelo, sino también de los microorganismos que forman parte de él y que son imprescindibles, como ya hemos visto a lo largo de esta Memoria, para que exista un equilibrio en el suelo y se desarrollen de forma correcta los procesos de biorremediación.

En este ensayo, se planteó como objetivo evaluar el desarrollo de diversas especies vegetales, sembradas en las parcelas tratadas previamente con landfarming con o sin enmienda (utilizadas en el Capítulo II.2 de esta Tesis) y su capacidad de adaptación a las condiciones semiáridas existentes en la zona. Puesto que algunas de las parcelas, donde tuvo lugar la siembra de semillas de las especies seleccionadas, habían sido tratadas con aporte de enmiendas (biosólido granulado o compostado), podremos evaluar la incidencia en el desarrollo vegetal, de la presencia de estas enmiendas en el suelo.



**Foto III.3.-** Vista general de las parcelas experimentales antes de la siembra.

Después del proceso de landfarming, cada uno de los triplicados de las parcelas existentes por tratamiento (sin adición de enmienda orgánica, y con adición de biosólido o compost de biosólido), se dividió en 3 subparcelas de unos 20 m<sup>2</sup>, disponiéndose así de 9 subparcelas por tratamiento. En cada una de las 3 subparcelas establecidas por parcela, se sembraron las diferentes especies vegetales seleccionadas a partir del ensayo anterior: cebada, atriplex y una mezcla de semillas, que englobaba la mezcla de semillas utilizada en el anterior ensayo de fitorremediación en microcosmos (trigo, avena y césped) junto con semillas de especies vegetales recogidas en el área de experimentación, de las encontradas en el inventario de la zona como especies ya adaptadas a las condiciones adversas de la zona (*oxalis*, *roseta*, *solanum*, y *ditriquia*).

La siembra de semillas se realizó a finales de Septiembre ya que dadas las condiciones climáticas de la zona, ésta es la fecha más apropiada para ello. La vegetación desarrollada se dejó crecer, realizando un seguimiento periódico del desarrollo vegetal mediante la medición de la densidad de la cobertura vegetal a los 2, 4, 12 y 22 meses de la siembra.

Sabemos que la humedad es un factor fundamental para conseguir una actividad elevada en las poblaciones microbianas capaces de degradar hidrocarburos y vital para el desarrollo de las plantas, puesto que la reducción de las precipitaciones o el aumento de las temperaturas aceleran la degradación del suelo por medio de un menor desarrollo de la cubierta vegetal, que influye en la actividad microbiológica del suelo, en los ciclos de los nutrientes y en el contenido de de carbono orgánico del mismo (Ojima *et al.*, 1995).

Por ello, dado que las condiciones semiáridas imperantes en la zona determinan niveles muy bajos de humedad en el suelo, se adicionó agua a las parcelas, mediante aspersion, cuando fue necesario, a fin de mantener un nivel de humedad mínimo para garantizar el mantenimiento de la actividad microbiana del suelo y el crecimiento de la vegetación.

El objetivo principal de este experimento de campo era, además de integrar la zona contaminada en el paisaje, proporcionar las condiciones adecuadas para favorecer la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes presentes en el suelo, mediante la creación en el mismo, a través de la implantación de vegetación, de un sistema rizosférico que estimulase la actividad de las poblaciones microbianas autóctonas del suelo capaces de seguir degradando los hidrocarburos remanentes presentes en él.



**Foto III.4.-** Detalle de la aparición de las primeras plántulas germinadas en las parcelas experimentales.

### Cobertura vegetal

Durante el periodo experimental se instaló en la zona una cubierta vegetal estable y densa, lo cual es de gran importancia para la conservación de estos suelos ya que, como indicaron García y Hernández (2000), para suelos semiáridos, la vegetación que cubre estas zonas produce una biomasa aérea que al morir e incorporarse al suelo, aumenta la biomasa microbiana del mismo, y se favorecen los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes importantes (C, N y P).

Las especies vegetales que se desarrollaron con mayor éxito, fueron aquellas seleccionadas, de entre las que estaban adaptadas a la zona: *atriplex*, y algunas de las incorporadas en la mezcla de semillas (*oxalis*, *roseta*, *solanum*, y *ditriquia*). Las sub-parcelas donde se sembró la cebada, fueron invadidas en los primeros meses por las especies autóctonas de la zona, impidiendo el crecimiento de la misma, por lo que

procedimos a estudiar la vegetación espontánea desarrollada en estas subparcelas, haciéndole el mismo seguimiento que al resto.



**Foto III.5.-** Detalle del crecimiento de *Atriplex halimus* (izqda.) y *Oxalis pes-caprae* (dcha.).

La cobertura vegetal de estas parcelas, fue evaluada durante el primer año de desarrollo desde que se sembraron las semillas, mediante el uso de una maya de 1x1m, dividida en 81 cuadrados. Esta maya se sitúa de forma aleatoria sobre distintos puntos de la parcela de muestreo, y se cuenta el número de cuadrados en los que aparece vegetación, el porcentaje de cobertura vegetal total se calcula, dividiendo los cuadrados con vegetación entre los 81 cuadrados totales y multiplicando este resultado por 100. También se identificaron y contaron las especies vegetales que aparecían en las cuadrículas y la altura de las mismas. Las medidas de densidad de cobertura vegetal total e identificación de especies dominantes se realizaron a los 2, 4, 12 y 22 meses de la siembra.

**Tabla III.4.-** Evolución del porcentaje de cobertura vegetal total desarrollada en las subparcelas a lo largo de los 22 meses de monitorización.

Tratamiento	Tratamiento vegetal	Porcentaje cobertura global			
		2 meses	4 meses	12 meses	22 meses
<b>C+LF</b>	<i>Atriplex</i>	43,4 eA	62,8 gB	72,0 iC	68,0 eC
	Mezcla de semillas	6,5 bA	44,9 fB	47,4 fC	61,3 dD
	Vegetación espontánea	15,5 dA	33,5 eC	56,0 gC	66,9 eD
<b>B+LF</b>	<i>Atriplex</i>	39,5 eA	65,0 gD	61,6 hC	55,1 cB
	Mezcla de semillas	3,4 aA	2,5 aA	20,0 dB	35,3 bC
	Vegetación espontánea	11,4 cA	11,5 cA	41,4 eC	22,2 aB
<b>LF</b>	<i>Atriplex</i>	9,5 bB	4,7 aA	14,1 bB	33,1 bC
	Mezcla de semillas	1,3 aA	9,0 bB	17,9 cC	32,2 bD
	Vegetación espontánea	11,9 cA	19,6 dB	10,0 aA	36,4 bC

Para cada tiempo de medida (letra minúscula) y tratamiento vegetal (letra mayúscula), la misma letra indica valores que no son significativamente diferentes de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse en la Tabla III.4, al inicio del proceso de revegetación en las parcelas donde se utilizaron enmiendas orgánicas (biosólido granulado o compostado) el desarrollo de las plantas era mayor

que en aquellas en las que el suelo se había tratado únicamente con landfarming. Esta diferencia se mantuvo a lo largo de los casi dos años de seguimiento llevado a cabo en las parcelas.

Entre las parcelas con enmiendas orgánicas, también se observaron diferencias dependiendo del tipo de enmienda aplicada, y estas diferencias se hicieron más notables y estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), a partir de la tercera medición (12 y 22 meses), desarrollándose la vegetación mucho más en las parcelas en las que se utilizó el compost como enmienda, que en las que se utilizó el biosólido granulado.

Entre las diferentes especies vegetales sembradas en cada parcela, también se observaron diferencias significativas, sobre todo en los primeros muestreos. Estas diferencias, aunque se mantenían a lo largo del tiempo se fueron haciendo cada vez menos significativas. La mezcla de semillas fue la vegetación que se desarrolló con mayor dificultad, seguida de la vegetación espontánea y por último el *atriplex*, que sigue siendo la especie vegetal que mejor se adapta a estas condiciones, independientemente de la parcela en la que se aplique, si bien debemos señalar que la cobertura global del *atriplex* alcanzó los mayores valores en las parcelas enmendadas con compost, seguida de las parcelas enmendadas con biosólido, y por último en aquellas que no recibieron enmienda.

Estos resultados ponen de manifiesto que tanto el tratamiento de biorremediación que haya recibido el suelo (landfarming con o sin adición de enmiendas orgánicas, y el tipo de enmienda), como las especies vegetales sembradas, influyen en el desarrollo de una cubierta vegetal estable, destacando el cultivo de *atriplex halimus* sobre el resto de especies vegetales en los suelos enmendados, principalmente cuando se utiliza compost como enmienda.



**Foto III.6.-** Sub-parcela con vegetación espontánea (izqda) y Sub-parcela con *atriplex* (dcha)

En el ANOVA realizado a los valores de cobertura vegetal, sobre los que se evalúan los efectos de factores tales como: i) el tipo de tratamiento que ha recibido el suelo (T. Suelo), es decir, landfarming sin y con enmienda orgánica (biosólido fresco o compostado); ii) el tratamiento vegetal (T. Vegetal), que hace referencia al tipo de especie vegetal sembrada; iii) situación de la subparcela dentro de la zona de experimentación (Situación); y iv) la interacción entre el tratamiento vegetal y el tratamiento del suelo, para

conocer como afectan al desarrollo de las diferentes especies vegetales, se observó que 2 meses después de la siembra, la cobertura vegetal desarrollada en cada subparcela era fuertemente dependiente ( $P=0,001$ ) del tratamiento vegetal que había recibido. En el segundo tiempo de muestreo (4 meses), esta tendencia comienza a cambiar, observándose una mayor dependencia de la cobertura vegetal desarrollada, de la situación de la parcela dentro de la zona de experimentación ( $P=0,000$ ), que del tipo de vegetación aplicada al mismo ( $P=0,025$ ) y de la interacción entre el tratamiento del suelo y el tratamiento vegetal ( $P=0,049$ ).

A partir del tercer muestreo (12 meses), apareció un cambio en la influencia de los factores que afectaban al desarrollo de la cobertura vegetal, observándose únicamente el efecto de la situación que la parcela ocupa dentro de la zona experimental ( $P=0,012$  a los 12 meses y  $P=0,001$  a los 22 meses) sobre la cobertura vegetal. El resto de dependencias con la cobertura global que se observaban en los anteriores muestreos desaparecía con el tiempo, lo que indica que a largo plazo el tipo de tratamiento sufrido por el suelo afecta de una manera menos sensible al desarrollo vegetal que en un primer momento.

**Tabla III.5.-** Valores de significancia (p) obtenidos en el ANOVA realizado con los valores de cobertura vegetal en función de 4 factores, para cada tiempo de muestreo. Variable dependiente: cobertura global.

Factores	Valores de p			
	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$
T. Suelo	0,250	0,313	0,182	0,386
T. Vegetal	0,001	0,025	0,413	0,616
Situación	0,236	0,000	0,012	0,001
T.Suelo*T.Vegetal	0,292	0,049	0,811	0,860

*A partir de estos resultados podemos concluir que utilizando principalmente, especies vegetales adaptadas a la zona, como es el *Atriplex halimus*, y aplicando compost como enmienda orgánica a los suelos tratados con landfarming, conseguiremos que las plantas se desarrollen con éxito al inicio y a medio/largo plazo. De esta manera quedará instaurada una cubierta vegetal estable, que además de integrar estas zonas en el paisaje y proporcionar unas condiciones óptimas para promover la rizorremediación, protegerá al suelo frente a la erosión y mantendrá una calidad en el suelo que posibilitará una dinámica de autoprotección del mismo frente a posibles procesos degradativos.*



## **6.CONCLUSIONES GENERALES**



## CONCLUSIONES GENERALES

El Objetivo de esta Memoria de Tesis Doctoral, ha sido la optimización y evaluación de la eficacia de dos técnicas de biorremediación (landfarming y fitorremediación), como instrumentos para la recuperación de un suelo semiárido con presencia de hidrocarburos recalcitrantes procedentes de lodos de refinería, así como la incidencia de la incorporación de enmiendas orgánicas (un biosólido fresco tratado térmicamente y un compost de biosólido) en la eficacia de estas técnicas y la posibilidad de instaurar una cubierta vegetal estable en la zona tratada, para eliminar el impacto paisajístico y favorecer la continuidad del proceso de recuperación del suelo. Estas técnicas se han ensayado tanto en microcosmos (en un suelo con incorporación recientemente lodo de refinería), como en campo (en un suelo con alta proporción de hidrocarburos recalcitrantes procedentes de un largo historial de reciclado en los mismo de lodos de refinería mediante tratamiento de landfarming).

Como **Conclusión General** de esta Memoria de Tesis Doctoral se puede indicar que *el uso de landfarming, seguido de fitorremediación, como técnicas complementarias de biorremediación, resulta eficaz para el tratamiento de suelos con hidrocarburos recalcitrantes procedentes del reciclado en los mismos de lodos de refinería y que la adición de enmiendas orgánicas, en concretoo biosólido granulado y compost de biosólido, mejora la eficacia de dichas técnicas, debido, principalmente, al aporte de fuentes carbonadas al suelo que incentivan el desarrollo de las poblaciones microbianas autóctonas del mismo, adaptadas a la presencia de los hidrocarburos y por tanto, responsables de la metabolización de los mismos. Asimismo, se puede concluir que es la presencia de hidrocarburos más que la técnica de biorremediación o la presencia de enmienda orgánica, el factor determinante de los cambios que se producen en las poblaciones microbianas del suelo, siendo las Actinobacterias y miembros Ascomycota, así como Chloroflexi y Firmicutes los principales responsables de la metabolización de los hidrocarburos presentes en el suelo. Por último se puede concluir que es posible la revegetación de las zonas birremediadas, particularmente cuando se realiza con incorporación de enmienda orgánica siendo las especies vegetales autóctonas las más idóneas para este fin, destacando el buen comportamiento del *Atriplex halimus* en ambientes semiáridos.*

Como **Conclusiones Específicas** podemos citar las siguientes:

En los ensayos de optimización del proceso de landfarming con y sin aporte de enmiendas orgánicas, realizados en microcosmos, se ha puesto de manifiesto que:

- Los microorganismos necesitan que exista como mínimo una humedad equivalente al 30% de la capacidad de retención hídrica del suelo para mantener su actividad degradadora de hidrocarburos en un nivel adecuado.

- La adición de biosólido o compost de biosólido resulta efectiva para incrementar la degradación de hidrocarburos recalcitrantes cuando se realiza a dosis elevadas, por encima de 180 t/ha.
- La adición de nutrientes no mejora la degradación de hidrocarburos cuando el suelo contiene ya un contenido suficiente de los mismos.

A partir del ensayo de biorremediación realizado en un suelo con aporte reciente de hidrocarburos procedentes de lodos de refinería, se puede concluir que:

- La incorporación de las enmiendas orgánicas estimula el desarrollo y actividad de las poblaciones microbianas del suelo, incrementando en consecuencia la degradación de los hidrocarburos. Se presenta así el aporte de enmiendas como una buena opción para mejorar la eficacia del proceso de landfarming.
- La presencia de hidrocarburos conduce a un incremento en la comunidad bacteriana y fúngica total, una disminución de la diversidad microbiana y a un cambio funcional y estructural en la comunidad bacteriana y que estos cambios persisten en el tiempo después del proceso de biorremediación, independientemente del tratamiento que haya recibido el suelo y del grado de degradación de los hidrocarburos.

Los ensayos de biorremediación en campo, en suelos con un largo historial de reciclado de lodos de refinería, han puesto de relieve que:

- Altas dosis de enmiendas orgánicas, (el biosólido granulado a corto plazo y el compost a medio/largo plazo), son capaces de incentivar la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes presentes en estos suelos, debido a la estimulación que estas enmiendas provocan en el aumento del tamaño y actividad de las poblaciones microbianas autóctonas del suelo, ya adaptadas a la presencia del hidrocarburo recalcitrante.
- La presencia de hidrocarburos introduce cambios en las comunidades microbianas (bacterianas y fúngicas) del suelo, desarrollándose en los suelos con hidrocarburos de poblaciones microbianas específicas capaces de metabolizar los hidrocarburos recalcitrantes.
- Al igual que se observó para los suelos con menor proporción de hidrocarburos recalcitrantes, *Actinobacterias* y *Ascomycota* son los grupos bacterianos y fúngicos, respectivamente, más abundantes en los suelos biorremediados, indicando que estos grupos juegan un papel fundamental en la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes.
- Otros grupos bacterianos como *Chloroflexi* y *Firmicutes*, aunque menos abundantes, juegan también un papel fundamental en la degradación de los hidrocarburos, siendo específicos de los suelos con hidrocarburos.

- La técnica de fitorremediación, se presenta como un tratamiento eficaz como complemento al landfarming, para la degradación de los hidrocarburos recalcitrantes.
- El aporte de enmiendas orgánicas mejora la eficacia de la técnica de fitorremediación, tanto por el aumento del desarrollo vegetal como por el aumento del tamaño y actividad de los microorganismos asociados a sus raíces.
- Las dosis más adecuadas de enmienda orgánica para optimizar el proceso de fitorremediación variará en función de la especie vegetal.
- El *Atriplex halimus* ha sido la especie vegetal con la que mejores índices de degradación de hidrocarburos se han obtenido en los ensayos de fitorremediación en microcosmos, particularmente en suelos enmendados con compost, por lo que puede ser considerada como una buena opción para ser usada para la fitorremediación de suelos con hidrocarburos recalcitrantes.

El ensayo de revegetación en campo ha puesto de manifiesto que:

- A pesar de los hidrocarburos remanentes en el suelo después del proceso de landfarming, es posible llevar a cabo la revegetación de la zona tratada, particularmente en los suelos con enmienda, utilizando especies autóctonas adaptadas a las condiciones climáticas de dicha zona. En este sentido, el *Atriplex halimus* ha mostrado ser una especie idónea para ser empleada en la revegetación de zonas biorremediadas en ambientes semiáridos.



## **7.MÉTODOS ANALÍTICOS**





## **TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

En los ensayos de microcosmos la toma de muestra de suelo fue destructiva, tomándose para análisis en cada tiempo de muestreo tres contenedores por tratamiento.

En el ensayo de campo, en cada uno de los muestreos se tomaron, de forma aleatoria, tres muestras de cada una de las parcelas o tratamientos. Cada una de estas muestras procedía de la mezcla y homogeneización de 6 sub-muestras tomadas de al azar a lo largo de toda la parcela haciendo un recorrido en zig-zag. Las muestras se tomaron en los 15 cm superiores del suelo. En todos los casos las muestras de suelo se tamizaron a través de un tamiz de 2 mm de luz de malla para realizar la medida de los parámetros físico-químicos y químicos, el resto se pasaron por un molino mezclador MM400 Retsch y fueron conservadas en la cámara a 4 °C hasta su análisis. Para los análisis moleculares las muestras fueron guardadas a -20 °C.

## **DETERMINACIÓN DE LA COBERTURA VEGETAL**

Para la determinación de la cobertura vegetal total se utilizó una maya de 1x1m dividida en 81 cuadrados. Esta maya se situaba de forma aleatoria sobre distintos puntos de la parcela, registrándose el número de cuadrados en los que aparecía vegetación. Asimismo, se identificaban y contaban las especies vegetales que aparecían en cada cuadrado y la altura de las mismas.

El porcentaje de Cobertura Total (CT) de la parcela se determinó dividiendo todos los cuadrados con presencia de vegetación (N) entre el número total de cuadrados (81) y multiplicando este resultado por 100:

$$CT(\%) = (N/81) \times 100$$

## **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS**

### **Análisis granulométrico y textural**

#### Principio

Se determina la cantidad de sólidos en suspensión midiendo su densidad con un hidrómetro (Bouyoucos, 1962).

#### Reactivos

Peróxido de hidrógeno

Éter etílico

Disolución dispersante: hexametáfosfato sódico (37 g), carbonato sódico (8 g) y agua (hasta un litro).

### Procedimiento

Se toma una muestra de 40 g de suelo a la que se añaden 10 ml de peróxido de hidrógeno para destruir los coloides orgánicos, añadiendo agua cuando es necesario para romper espumas y se calienta en baño de agua hasta destrucción de la materia orgánica, y eliminación del exceso de reactivo. En los suelos con conductividad eléctrica en extracto acuoso 1:5 mayor de  $1 \text{ dS m}^{-1}$  será necesario efectuar lavados sucesivos hasta eliminar las sales, para evitar la floculación de los coloides. Este lavado se realiza sobre un embudo Buchner con papel de filtro de poro fino ayudado de vacío. Una vez eliminadas la materia orgánica y las sales, el suelo se pasa a una botella de litro y medio, se enrasa a  $300 \text{ cm}^3$  y se añaden  $50 \text{ cm}^3$  de disolución dispersante, agitando toda la noche a 120 rpm en agitador rotatorio.

La suspensión del suelo se pasa a una probeta de un litro y se agita con una varilla durante un minuto para que la mezcla sea lo más homogénea posible. Inmediatamente después de terminar la agitación se introduce el hidrómetro, realizando la medida a los 40 segundos (valor que expresa la cantidad de limo+arcilla que contiene la muestra). Esta misma operación se repite exactamente a las dos horas y la medida que se obtiene proporciona el porcentaje de arcilla. Por diferencia entre ambas medidas se obtiene el porcentaje de limo, y por diferencia con la primera medida a 100, el de arena.

### **Textura**

A partir de los porcentajes obtenidos en el apartado anterior para arena, limo y arcillas, y mediante el diagrama de texturas propuesto por el U.S.D.A. (1951), se clasifica el suelo en el tipo textural correspondiente.

### **Humedad**

#### Principio:

Determinación del porcentaje de agua contenido en la muestra húmeda.

#### Procedimiento:

Se pesan de 1-1.5 g de la muestra en un pesa-sustancias previamente tarado, y se seca en estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 horas. A continuación se enfría en un desecador y se pesa. Esta operación se realiza en sucesivas ocasiones hasta obtener un peso constante.

La pérdida de peso se da como humedad, expresada en tanto por ciento de muestra en las condiciones operativas.

## **Cenizas**

### Principio:

Determinación por calcinación de la muestra a 750 °C.

### Procedimiento:

Se pesa una cantidad de muestra seca a 105 °C en un crisol previamente tarado y se calcina a 750 °C en una mufla durante 4 horas. Se enfría en desecador y se pesa. Esta cantidad referida al peso seco inicial de la muestra, se expresa como contenido en cenizas (%).

## **pH**

Se prepara un extracto acuoso con relación sólido líquido 1:5 por agitación mecánica durante 2 horas. Sobre este extracto se realiza la medida de pH utilizando un pH-metro Crison, modelo GLP 21+.

## **Conductividad eléctrica**

El extracto preparado para la medida de pH, se somete a un proceso de centrifugado y filtrado del que se obtiene el sobrenadante claro al que se le mide directamente la conductividad con un conductímetro Crison, modelo GLP 31+.

## **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS:**

### **Carbonatos totales y caliza activa**

#### Principio:

Los carbonatos y la caliza activa del suelo se establecieron por la reacción de éstos con ácido clorhídrico en un dispositivo cerrado y medida del volumen de CO<sub>2</sub> desprendido, mediante un calcímetro tipo Bernard, en condiciones de presión y temperatura constantes, el volumen de gas producido es proporcional al contenido calizo del suelo.

#### Procedimiento:

Para los carbonatos se pesan 0,2 g de suelo (P) en Erlenmeyers apropiados para el calcímetro, que disponen de un tubo central en el que se coloca un volumen de HCl diluido (1:1). Se coloca el Erlenmeyer en el calcímetro ajustando el cero de la columna de medida del mismo. Agitando suavemente se pone en contacto el ácido con el suelo y se va descendiendo la rama móvil del calcímetro para mantener el nivel de líquido igual en las dos ramas. En estado estacionario anotamos la medida (L).

El mismo proceso se realiza para el blanco, es decir 0,1 g de CaCO<sub>3</sub> (P') y se anota la nueva medida (L'). El porcentaje de carbonatos totales del suelo (carbonato cálcico equivalente) vendrá dado por la ecuación:

$$\% \text{CaCO}_3 \text{ equivalente} = 100 * L * P' / L' * P$$

### **Carbono orgánico total**

#### Principio:

Oxidación del carbono orgánico con dicromato potásico en medio ácido, y posterior valoración con sal de Mohr del exceso de dicromato, según el método Yeomans y Bremner (1989).

#### Reactivos:

Dicromato potásico 1 N

Ácido sulfúrico concentrado

Sulfato de hierro (III) y amonio 6-hidrato (sal de Mohr) 0,5 N.

Ácido fosfórico concentrado

Indicador: difenilamina al 0,5% en ácido sulfúrico

#### Procedimiento:

Se pesan, 0,1 g de muestra si se trata de un material orgánico y 0,5 g si se trata de suelo, y se añaden 5 ml de dicromato potásico 1N y 7,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se colocan en la estufa a 170 °C durante media hora y una vez frío, se añaden 5 ml de ácido fosfórico concentrado y agua destilada hasta un volumen de 50 ml aproximadamente. A continuación se valora el exceso de dicromato con sal de Mohr 0,5 N en presencia del indicador. El punto final es el cambio de color de azul a verde. Paralelamente se preparan blancos en frío y en caliente (media hora en estufa a 170 °C).

El porcentaje de carbono orgánico total oxidable (COT) se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\% \text{COT} = (A) \times (N \text{ sal de Mohr}) \times (0,003) \times 100 / (\text{g de muestra})$$

Siendo:

$$A = [(BC-S) \times (BF-BC) / BF] + (BC-S)$$

BC = ml de sal de Mohr gastados por el blanco caliente

BF = ml de sal de Mohr gastados por el blanco frío

S = ml de sal de Mohr gastados por la muestra

N = Normalidad de sal de Mohr.

### **Materia orgánica**

Para suelos, el contenido de materia orgánica se calcula multiplicando el contenido de carbono orgánico total del suelo por el factor 1,728.

Para las enmiendas orgánicas, el contenido en materia orgánica se determina por calcinación (materia orgánica volátil).

Procedimiento:

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la determinación de cenizas. La diferencia a 100 del porcentaje de cenizas del material, nos dará el porcentaje de materia orgánica volátil del mismo.

### **Nitrógeno total**

Principio:

La medida del nitrógeno total se realizó con un analizador de Nitrógeno FLASH 1112 SERIES (Termo Finningan). La muestra pasa por un horno de grafito a 900 °C en el cual el nitrógeno pasa a óxidos de nitrógeno  $N_2O_x$  (en total son cinco los óxidos de nitrógeno que se forman). Estos óxidos de nitrógeno siguen circulando por medio de un gas portador (helio) hasta llegar a un tubo de reducción formado por virutas de cobre en un detector de conductividad eléctrica, transformando esta concentración de nitrógeno en una señal eléctrica.

### **Nitrógeno amónico**

Principio:

Obtención del amonio extraíble mediante agitación mecánica de la muestra con disolución de cloruro potásico 2N, provocando el desplazamiento del ion amonio de los lugares de cambio por los iones potasio (Bremner, 1965). El amonio extraído, se determinó con electrodo selectivo de amonio.

Reactivos:

Cloruro potásico 2 N

Hidróxido sódico 10 M

Procedimiento:

La extracción se realiza en la proporción sólido líquido 1:10 mediante agitación mecánica durante 1 hora. Se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos y se toma 1 ml del extracto que se lleva a 10 ml con agua destilada. Se mide con electrodo selectivo de amonio, para lo cual se añade en el instante antes de la lectura 0,1 ml de hidróxido sódico 10 M.

### **Nitrógeno nítrico**

#### Principio:

Obtención del nitrógeno extraíble mediante agitación mecánica de la muestra con agua desionizada a 40°C y determinación de los nitratos en un cromatógrafo iónico HPLC.

#### Reactivos:

Agua destilada

Nitrato sódico

#### Procedimiento:

Se realiza una extracción de la muestra con agua desionizada en la proporción 1:20 (sólido:líquido). Se agita en baño de agua a 40°C durante 4 horas, se centrifuga y se filtra con papel de filtro lavado a los ácidos. Se hace una dilución adecuada de la muestra con agua desionizada, calidad HPLC, y se inyecta en el cromatógrafo iónico previamente calibrado con una disolución de  $\text{NaNO}_3$  recientemente preparada, que contenga 4 mg/kg de  $\text{NO}_3^-$ .

### **Nitrógeno total (Kjeldahl)**

#### Principio:

Método Kjeldahl modificado por Bremner y Mulvaney (1982)

#### Reactivos:

Ácido sulfúrico concentrado

Mezcla catalizadora: Selenio metálico (polvo) 10 %, Sulfato de cobre 25 %, Sulfato potásico 65 %

Hidróxido sódico 10 M

#### Procedimiento:

Pesar 1 g de muestra de suelo seco en tubos Kjeldahl, añadir 0,8 g de mezcla catalizadora y 3 ml de ácido sulfúrico concentrado calentado a 360 °C en bloque digestor durante dos horas. A continuación se filtra el contenido del tubo de digestión a un matraz aforado de 100 ml, se lava cuidadosamente con agua destilada para recoger todo el contenido, y se enrasa. Se agita, se toma 0,5 ml, se añaden 0,9 ml de agua destilada y se mide con electrodo selectivo de amonio, para lo cual se añade en el momento de la medida 0,1 ml de hidróxido sódico 10 M.

### **Fósforo total, potasio total y metales pesados**

#### Principio:

Para la determinación de estos parámetros, las muestras deben ser previamente digeridas.

La analítica se basa en el principio de mineralización de la muestra por vía húmeda con  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y con utilización de radiación electromagnética (microondas).

#### Reactivos:

$\text{HNO}_3$

$\text{H}_2\text{O}_2$

#### Procedimiento:

La muestra se debe mineralizar por vía húmeda en microondas, para ello, se sitúa en el interior de un vaso de teflón de alta presión debidamente seco. El peso que se toma de muestra es de  $0,1-0,2 \pm 0,0005$  g. Una vez añadidos los reactivos de digestión (1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 4 ml de  $\text{HNO}_3$ ), se introduce en el microondas con una rampa de temperatura final de 20 minutos a  $220^\circ\text{C}$ . Este mineralizado, una vez frío, se introduce en un matraz aforado de 25 ml donde se enrasa a dicho volumen con agua milliQ, y se guarda en botella de poliestireno para su almacenamiento en nevera y posterior análisis. A partir del extracto obtenido se determina el fósforo y potasio totales, y los metales pesados mediante una determinación cuantitativa mediante el ICP-OES (Inductively coupled plasma- optical emission spectrometer).

El ICP-OES es una técnica de análisis multielemental que utiliza una fuente de plasma de acoplamiento inductivo para disociar los átomos o iones que constituyen la muestra, excitándolos a un nivel donde emiten luz de una longitud de onda característica. Un detector mide la intensidad de la luz emitida y calcula la concentración de ese elemento en la muestra. El plasma es un gas ionizado, eléctricamente neutro y confinado en un tubo de descarga.

### **Fósforo extraíble**

#### Principio:

Para la determinación de este parámetro, se debe preparar una extracción de la muestra siguiendo el método Olsen.

#### Reactivo:

Bicarbonato sódico 0,5 M a pH 8,5

Ácido clorhídrico 0,1N

Hidróxido sódico 0,1N

Agua ultrapura.

Procedimiento:

El reactivo extractante se prepara pesando 42 g de bicarbonato sódico, se disuelve con agua ultrapura y se ajusta el pH a 8,5 con HCl 0,1N ó NaOH 0,1N. Se enrasa a 1 litro con agua ultrapura.

Se colocan en frasco de agitación 5 g de muestra, 100 ml de bicarbonato sódico 0,5 M a pH 8,5. A continuación, se agita mecánicamente durante media hora, se centrifuga a 3000 rpm durante 12 minutos y se filtra, obteniendo así el extracto para medir fósforo extraíble. Este se determina cuantitativamente por el ICP-OES.

### **Potasio, calcio y magnesio asimilable**

Principio:

Desplazamiento mediante amonio de los cationes de cambio

Para la determinación de este parámetro, se debe preparar una extracción de la muestra.

Reactivos:

Acetato amónico 1N a pH 7

Procedimiento:

Se colocan 5 g de muestra y 100 ml de acetato amónico a pH 7 en frascos de agitación. A continuación se agitan mecánicamente durante dos horas, se centrifuga a 3000 rpm durante 12 minutos y se filtra, obteniendo así el extracto para medir cuantitativamente K, Ca y Mg asimilables por el ICP-OES.

### **Cloruros, Sulfatos y Nitritos**

Principio:

Extracción acuosa y medida de los aniones por HPLC. La cromatografía de intercambio aniónico se basa en el equilibrio de intercambio entre una fase sólida que contiene grupos sulfónicos o carboxílicos (para la separación de cationes) o grupos amino cuaternarios o primarios (para la separación de aniones).

Reactivos:

Eluyente: biftalato de potasio 6 mM y pH 4,2

Procedimiento:

Extracción durante 4 horas de los aniones solubles presentes en la muestra mediante agua destilada en la relación 1/20 (sólido/líquido), centrifugando y filtrando el extracto a continuación. En este extracto, o en una



dilución adecuada del mismo, se miden los aniones por HPLC en columna de aniones. Se ha utilizado una bomba para HPLC Alltech Modelo 426 acoplada a un detector de conductividad Alltech 550. La columna es una columna aniónica Allsep. Como eluyente se emplea un ácido débil (biftalato de potasio 6 mM, pH 4,5). El eluyente debe ser previamente desaireado y se pasa por la columna a una velocidad de 1 mL/min hasta obtener una línea de base estable. Se inyectan muestras de 40 mg/Kg de  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^-$  y se registran los tiempos de salida de cada pico. Posteriormente se inyecta una mezcla de estos aniones, en partes iguales y se analiza la separación de picos.

Se realiza una curva de calibrado con muestras conteniendo 10, 20, 40, 60 y 80 mg/kg de  $\text{Cl}^-$ . Para cada concentración se calcula el área bajo pico.

### **Hidrocarburos totales y disolventes clorados**

Determinación del contenido total de hidrocarburos (volátiles y no volátiles) en las muestras de suelo con presencia de lodos de refinería, y en los lodos de refinería, mediante extracción con cloroformo.

#### Principio:

El método se basa en la determinación por gravimetría previa extracción con cloroformo de los hidrocarburos totales y grasas presentes en la muestra.

El gel de sílice tiene la propiedad de adsorber los materiales polares. Si se mezcla una solución de hidrocarburos y materiales grasos en cloroformo con gel de sílice, los ácidos grasos son extraídos de forma selectiva de la solución. Los materiales no eliminados por adsorción al gel de sílice son considerados hidrocarburos.

#### Reactivos:

Sodio sulfato

HCl 1:1 N

Hexano 95 %

Gel de sílice

Cloroformo

#### Procedimiento:

Se pesan 10 g de muestra seca en un cartucho de papel de filtro y se introduce el cartucho en el soxhlet. Cogemos un matraz de fondo plano previamente pesado y secado a 105 °C. Antes de juntar el soxhlet con el matraz, se pone en el matraz unos 30 ml de cloroformo. Una vez ajustado el soxhlet al matraz, se le va añadiendo cloroformo por la parte de arriba del soxhlet hasta la primera sifonada. Se pone el conjunto en el sistema de refrigeración y se realiza la extracción con cloroformo en caliente durante 6 horas o hasta que el

líquido del soxhlet este transparente. Se concentra en el rotavapor el matraz hasta sequedad. Se introduce el matraz en la estufa a 75 °C durante unos 90 minutos, para eliminar el resto de disolvente. Enfriamos el matraz en el desecador durante 1 hora y pesamos en balanza analítica (P1), con esto obtenemos el contenido en grasas. A continuación añadimos 50 ml de cloroformo al matraz anterior y 3 g de gel de sílice. Se tapa el matraz y se agita en un agitador magnético durante 5 minutos. Se filtra la solución en papel de filtro y se lava con 10 ml de disolvente (hexano), recogiendo el líquido en un matraz seco previamente pesado (Pv'). Se concentra el contenido del matraz en el rotavapor. Secamos en estufa y se deja enfriar en el desecador. Por último pesamos (P2).

Los cálculos se realizan para la materia seca según las siguientes ecuaciones:

$$\text{g/100g de GRASAS} = [(P1 - Pv)/g \text{ muestra}] \times 100$$

$$\text{Hidrocarburos (mg/kg)} = [(P2 - Pv')/g \text{ muestra}] \times 100$$

donde:

P1 = Peso en g del matraz después de concentrar la extracción con cloroformo

Pv = Peso en gramos del matraz (1) vacío y seco.

P2= Peso del matraz seco con hidrocarburos

Pv' = Peso en gramos del matraz (2) vacío y seco

La suma de los hidrocarburos totales y las grasas serán los disolventes clorados.

### **Hidrocarburos lineares**

#### Reactivos:

Hexano 95%

Acetona

#### Procedimiento:

Se realiza una extracción de hidrocarburos en una bomba de teflón con una mezcla de disolventes orgánicos hexano:acetona 1:1, en microondas durante 10 minutos a máxima potencia.

Una vez enfriado el extracto a temperatura ambiente se concentra la muestra y se cambia el disolvente por hexano puro. Este extracto se purifica hasta obtener un volumen final de 1 ml.

Los hidrocarburos lineares de la muestra se determinan en un cromatógrafo gases-masas.

### **Fracciones de materia orgánica lábil (sustancias no húmicas)**

#### Principio:

Obtención un extracto acuoso en la relación sólido líquido (1:5) y determinación sobre este extracto del carbono soluble en agua y de los carbohidratos y compuestos fenólicos solubles contenidos en esta fracción utilizando los métodos correspondientes que se describen a continuación.

#### Reactivos:

Agua destilada

#### Procedimiento:

El extracto se obtiene mediante agitación mecánica durante 2 horas de 10g de muestra y 50 ml de agua destilada. A continuación se centrifuga a 3400 rpm durante 15 minutos y por último se filtra.

### **Carbono hidrosoluble**

Determinación del carbono orgánico contenido en el extracto acuoso, mediante analizador de C en muestras líquidas Analytic jena multi N/C 3100.

### **Carbohidratos hidrosolubles**

#### Principio:

Utilización del reactivo antrona para determinación de carbohidratos según el método de Brink *et al.* (1960).

#### Reactivos:

Reactivo antrona (0,2% en ácido sulfúrico concentrado). Se prepara en el momento en el que se va a utilizar.

#### Procedimiento:

A 1ml del extracto acuoso de suelo se le añaden 4 ml del reactivo antrona, se agita y se calienta en baño a 80 °C durante 10 minutos. Después se enfría en hielo y se lee en espectrofotómetro a 630 nm. Se realiza una recta de calibrado utilizando distintas concentraciones de tartrato de glucosa. Los datos se expresan en mg de C de glucosa g<sup>-1</sup> de suelo.

### **Compuestos fenólicos**

#### Principio:

Determinación de los fenoles contenidos en el extracto hidrosoluble por modificación del método de Folin (Kuwatsuka y Shindo, 1973)

**Reactivos:**

Carbonato sódico al 3,7%

Reactivo Folin-Ceocaltin

Sulfato de cobre II al 0,06%

**Procedimiento:**

A 0,5 ml del extracto acuoso se añade 3,5 ml de carbonato sódico al 3,7% (el precipitado que se pueda formar se elimina por filtración) y 0,5 ml de sulfato de cobre II al 0,06%. Se agita y se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añade 0,5ml de reactivo Folin (1:4) y se agita. Se deja 15 minutos en reposo y se mide la absorbancia en espectrofotómetro a 578 nm. La proporción de sustancias fenólicas se calcula mediante una recta patrón con fenol.

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS:****Ensayo de respiración (medida del desprendimiento de CO<sub>2</sub>).****Principio:**

Determinación del desprendimiento de C-CO<sub>2</sub> por los microorganismos, durante la incubación del suelo en un sistema cerrado. El CO<sub>2</sub> desprendido es medido en un analizador de gases IR (Hernández y García 2003).

**Procedimiento:**

En frascos con cierre hermético, de 125 cm<sup>3</sup> provistos de tapón con septum, que permita pinchar para extraer gas, se introducen 30 g de suelo humedecido con agua destilada al 60 % de su capacidad de retención hídrica. Se cierra herméticamente el frasco y se coloca en incubación a 28 °C. Periódicamente (diariamente al inicio) se extrae una alícuota de gas del interior del frasco cerrado mediante una jeringuilla con aguja, y se inyecta en el analizador IR para medir el CO<sub>2</sub> contenido en el mismo. A continuación, se destapan los frascos media hora para renovar la atmósfera de aire contenida en el mismo y evitar problemas de anaerobiosis. Después de este tiempo, se cierran de nuevo y se vuelven a incubar hasta la medida siguiente. La calibración del aparato se realiza con CO<sub>2</sub> gas al 10% de concentración o con aire exento de CO<sub>2</sub>.

**Cálculo:**

Las unidades del analizador de gas vienen expresadas como % CO<sub>2</sub>, pero la lectura obtenida hay que referirla al volumen del frasco empleado en la incubación de la muestra. Si A es la lectura de CO<sub>2</sub> obtenida en el analizador, entonces

Volumen de CO<sub>2</sub> presente en el frasco (litros) = (125 - V muestra de suelo) x 10<sup>-3</sup> x A / 100 = (125 - V muestra de suelo) x A x 10<sup>-5</sup>

Para calcular los mg de C-CO<sub>2</sub> en ese volumen de gas, se utilizará la ecuación general de los gases.

$$P \times V = n \times R \times T$$

Por lo que los moles de CO<sub>2</sub> presentes serán:

$$N = PV / RT = P (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 10^{-5} / R T$$

Donde:

P = Es la presión, que en este caso consideramos igual a 1 atmósfera.

V = Es el volumen que ocupa el gas en el interior del frasco calculado como se indicó antes.

R = 0,082.

T = Temperatura en grados Kelvin (273 + 28°C en este caso).

Teniendo en cuenta que se han utilizado 30 g de suelo, los moles de CO<sub>2</sub> desprendidos por kilo serían

$$\text{Moles de CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ de suelo} = (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 10^{-2} / 30 R T$$

Y dado que un mol de CO<sub>2</sub> equivale a 12g de C-CO<sub>2</sub>, y considerando la duración del ensayo

$$\text{C-CO}_2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1} = (125 - V \text{ muestra de suelo}) \times A \times 4 / R T \times t$$

Siendo t el tiempo, en días, durante el que se ha producido el desprendimiento de CO<sub>2</sub> medido.

### **Carbono de biomasa microbiana**

#### Principio:

La fumigación con cloroformo provoca la muerte de las células microbianas del suelo por la rotura de las membranas celulares, con lo que el contenido citoplasmático de dichas células microbianas es vertido al suelo, de donde puede ser extraído con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, pudiendo ser cuantificados los distintos componentes del mismo (C, N, P). Por ello, este método consta de tres fases: fumigación con cloroformo libre de etanol (Jenkinson y Powlson, 1976), extracción con K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M (Vance *et al.*, 1987) y determinación analítica del C de la biomasa microbiana.

#### Reactivos:

Cloroformo lavado

Sulfato potásico 0,5 M

### Procedimiento:

3 g de suelo tamizado y humedecido al 60 % de su capacidad de retención hídrica, se incuban en frascos abiertos de 150 cm<sup>3</sup> en la oscuridad durante 24 horas, al cabo de las cuales, se añaden 0,17 ml de cloroformo lavado y se mantienen cerrados durante 30 minutos; seguidamente se añaden 12 ml de sulfato potásico 0,5 M y se agita mecánicamente durante 1 hora. A continuación, se centrifuga a 3400 rpm durante 8 minutos y se filtra. Paralelamente se preparan también controles sin cloroformo. Al extracto obtenido se le pasa aire durante 2 minutos para eliminar el cloroformo y sobre dicho extracto se mide el carbono. El carbono se midió en un analizador de C para muestras líquidas Shimadzu TOC-5050.

El contenido del carbono del extracto es transformado en carbono de la biomasa microbiana mediante la fórmula:

$$C \text{ de la biomasa microbiana} = C \text{ del extracto} \times 2,66$$

El carbono de biomasa microbiana de la muestra vendrá dado por la diferencia entre el carbono de la muestra fumigada con cloroformo y el de la muestra no fumigada.

### **Contenido de adenosín 5' trifosfato (ATP)**

#### Principio:

Extracción del ATP contenido en el suelo con un extractante adecuado. Una vez extraído el ATP del suelo se procede a su cuantificación mediante un test de bioluminiscencia en el cual se produce una reacción de catálisis enzimática en la que interviene el ATP, y cuyo resultado es la emisión de luz, siendo ésta proporcional a la concentración de ATP en el suelo (método de extracción y determinación de Webster et al., 1984, modificado por Ciardi y Nannipieri, 1990).

#### Reactivos:

Solución extractante A (500 ml): 3,724 g EDTA, 60,6 g Urea, 100 ml DMSO (dimetil-sulfóxido), 100 g adenosina y 22,625 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Disolver cada uno de los reactivos en este orden y no añadir el siguiente hasta que se haya disuelto el precedente. Preparar la solución extractante inmediatamente antes de su uso ya que después de 15 minutos precipita.

Solución Tampón (1000 ml): 24,23 g Tris (hidroximetil)-aminometano, 1,49 g EDTA, 3,22 g de acetato de magnesio tetrahidratado, ajustando el pH a 10,3 con NaOH 1M.

Sistema Luciferina-Luciferasa liofilizada (Monitoring Reagent) diluida en 0,1 M Tris-Acetato, 2 ml EDTA, pH 7,75.

Estándares de ATP. Se hace una dilución 0,98 mg de ATP en 200 ml.

### Procedimiento:

Pesar 1 g de suelo seco en tubos de 30 ml y añadir 20 ml de la solución extractante A. La suspensión se agita en baño a 4 °C durante 30 minutos. La mezcla se filtra a través de papel de filtro lavado al ácido. Si no se puede medir inmediatamente el ATP, se puede congelar la mezcla a -15 °C hasta que se mida. Para medir en el luminómetro necesitamos obtener un volumen de 0,8 ml entre el extracto y el tampón para obtener un pH de mezcla comprendido entre 7,45 y 7,75. De esta mezcla se toma una cantidad conocida (generalmente 50 µl), se introduce en la cubeta del luminómetro y se leen las unidades de luz relativas. A continuación, se adiciona a dicha cubeta un volumen igual (50 µl) de la mezcla luciferina-luciferasa, se agita suavemente y se vuelven a medir las unidades de luz. La luz se mide en el luminómetro usando un modo de integración de periodos de 10 segundos.

Después de cada determinación se añade estándar interno de ATP (por ejemplo 10µl. que según la dilución corresponde a una adición de 50,7 ng) y se mide de nuevo en luminómetro la emisión de luz.

El contenido de ATP se obtiene mediante la siguiente relación:

$$\text{ATP} = (B - A) \times D \times D' / (C \times G)$$

donde:

A = valor del extracto tamponado

B = valor después de añadir la luciferina-luciferasa

C = valor después de añadir el estándar interno

D = cantidad de ATP estándar interno añadido (50,7 ng)

D' = diluciones que se realizan para medir

G = factor referente al peso del suelo

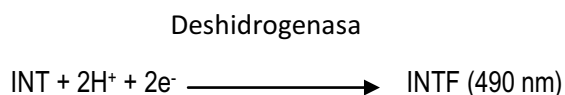
El ATP se expresa en ng ATP g<sup>-1</sup> suelo seco.

### **Determinación de Actividades Enzimáticas:**

#### **Actividad deshidrogenasa**

##### Principio:

La determinación de esta actividad se llevó a cabo según el método de Trevors et al. (1982) modificado por García et al., (1993), cuyo principio se basa en la estimación del idonitrotetrazolio formazán (INTF) formado por reducción cuando el suelo es incubado con 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) como aceptor de electrones, en ausencia de tampón.

**Reactivos:**

Aceptor de electrones: cloruro de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil 5- feniltetrazolio (INT) 0,4%.

Metanol

Acetona

Iodonitrotetrazolio formazano (INTF)

**Procedimiento:**

A un gramo de muestra tamizada a 2 mm se le añade 0,4 ml de agua destilada y 0,2 ml de INT (al 0,4% peso-volumen). A continuación se deja incubar a 20 °C en completa oscuridad durante 20 horas. Se adicionan 10 ml de metanol y se agita vigorosamente durante 2 minutos, filtrando a continuación. Se preparan paralelamente unos controles sin INT, en los que a 1 g de suelo se le añade 0,6 ml de agua. El extracto se lee en espectrofotómetro, a 490 nm, y se expresa como mg INTF/g suelo hora.

La recta patrón se realiza con INTF en distintas concentraciones.

**Actividad ureasa****Principio:**

Medida con electrodo selectivo de amonio, del amonio producido por descomposición del sustrato de urea adicionado (Nannipieri *et al.*, 1980).

**Reactivos:**

Tampón fosfato 0,1 M (pH 7)

Urea (1,6 g en 25 ml)

Hidróxido sódico 10 M

**Procedimiento:**

A 0,5 g de muestra se le añaden 2 ml de tampón fosfato y 0,5 ml de disolución de urea. Es necesario preparar al mismo tiempo control sin adición de urea. Se incuba durante una hora y media a 30 °C en baño de agua, llevando a continuación el volumen de 10 ml con agua destilada. Se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos y se mide el amonio producido en la reacción mediante un electrodo selectivo de amonio.



### Actividad fosfatasa alcalina

#### Principio:

El método se basa en la determinación espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado de color amarillo en medio básico, cuando el suelo es incubado con el sustrato artificial p-nitrofenil fosfato (Tabatabai, 1994).

#### Reactivos:

Solución Stock: Disolver 12,2 g de Tris-hidroximetilaminometano (THAM), 11,6 g de ácido maléico, 14 g de ácido cítrico y 6,28 g de ácido bórico en agua destilada. Añadir 488 ml de NaOH de 1 M y enrasar a 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.

Tampón universal modificado (MUB) pH 11,0: Tomamos 200 ml de la solución stock y la llevamos hasta pH 11,0 con NaOH.

Paranitrofenil fosfato (PNF) 0,025 M

Hidróxido sódico 0,5 M

Paranitrofenol

#### Procedimiento:

A 0,5 g de suelo (0,2 g de residuos orgánicos) se adicionan 2 ml de tampón MUB de pH 11,0 y 0,5 ml de p-nitrofenilfosfato. Se incuba en baño a 37 °C durante 1 hora. Las muestras se enfrían en un baño de hielo a 4-5 °C durante 15 minutos para detener la reacción. Se añaden 0,5 ml de cloruro cálcico 0,5 M y 2 ml de hidróxido sódico 0,5 M agitando bien para que la suspensión se mezcle completamente. Después de centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos se filtra y se mide la intensidad del color de los filtrados en un espectrofotómetro a 400 nm.

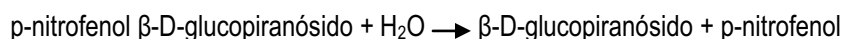
Paralelamente se preparan controles para los que se añade el sustrato justamente después de la incubación y antes de enfriar.

Para calcular el contenido de p-nitrofenol se prepara una recta con patrones de p-nitrofenol de concentraciones entre 0 y 250 µg/ml.

### Actividad β-glucosidasa

#### Principio:

El método descrito se basa en la determinación colorimétrica del p-nitrofenol liberado por la acción de la β-glucosidasa después de incubar el suelo con sustrato β-D-glucopiranosido, en medio tamponado a pH 6, durante 1 hora a 37 °C (Tabatabai, 1994).



### Reactivos:

Solución Stock: igual que para la determinación de la actividad fosfatasa

Solución Tampón MUB-HCl pH 6: Mezclar 200 ml de solución stock con 500 ml HCl 0,1 M y enrasar a un litro con agua destilada.

Solución Tampón THAM-NaOH pH 12 (solución extractante): pesar 12,2 g de THAM [Tris-hidroximetilaminometano], disolver en aproximadamente 800 ml de agua; ajustar con NaOH 0,5 M hasta pH 12 y enrasar a un litro con agua destilada.

P-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG) 0,05 M

Cloruro cálcico 0,5 M

Hidróxido sódico 0,5 M

P-nitrofenol

### Procedimiento:

A 0,5 g de suelo se le añaden 2 ml de tampón MUB-HCl de pH 6 y 1 ml de agua. Añadir 0,5 ml de sustrato a las muestras, e incubar muestras y controles a 37 °C durante 1 hora. A continuación se adiciona el sustrato a los controles y se interrumpe la reacción con un baño de hielo durante 15 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo se adiciona en el mismo orden 0,5 ml de cloruro cálcico 0,5 M y 2 ml de solución extractante (THAM-NaOH, pH 12). Agitar y filtrar el contenido de todos los tubos. Paralelamente se realiza una curva patrón con p-nitrofenol. Medir la absorbancia de los filtrados a 400 nm después de haber ajustado el equipo a cero con la solución de referencia que son dos blancos que llevan el mismo procedimiento que los controles y las muestras.

### **Enumeración de la comunidad de bacterias y hongos totales. Unidades formadoras de colonias (UFC).**

Las unidades formadoras de colonias (UFC) de los hongos y bacterias cultivables han sido determinadas por siembra de diluciones seriadas del extracto de la muestra.

La extracción de la muestra se prepara con una solución Ringer en agar de dextrosa de patata (PDA 40 g/l y Rosa Bengala 50 mg/l) modificado con estreptomycin 100mg/l para hongos y en Agar Tryptic Soy (TSA 4 g/l, Agar 15 g/l, Nistatina 50 mg/l), para bacterias. El recuento de colonias de hongos y bacterias (UFC) por gramo de suelo seco se realiza a los 3 y 7 días de incubación respectivamente a 25 °C.

## **DETERMINACIÓN DE DIVERSIDAD MICROBIANA**

### **Extracción de ADN y condiciones de la (reacción en cadena de la polimerasa (PCR)).**

El ADN total se extrae de las muestras de suelo, usando el Kit Fast DNA Spin para suelo (BIO 101, USA), siguiendo las instrucciones de fabricación. El ADN es cuantificado con un biofotómetro Eppendorf y guardado a -20°C hasta su uso.

Las secuencias de los genes de ARN ribosómico fueron amplificadas por PCR con un set de cebadores adquiridos a TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH. FR1-gc/FF390 (Vainio y Hantula, 2000) y 338f-gc/907r (Muyzer et al., 1993), fueron empleados para amplificar las secuencias de hongos y bacterias respectivamente.

Se añade una cola de-GC (5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG3') en el extremo 5' para mejorar la separación de los productos de PCR mediante electroforesis en gradiente de desnaturalización (DGGE) (Muyzer et al., 1993). La PCR se realizó en un termociclador Thermal Cycler (TAKARA) en un volumen final de 25 µl, donde cada mezcla de reacción contenía una concentración final de 1 x tampón de PCR; 0,1 mg/ml albúmina de suero bovino (BSA, 5 mg/ml); 0,2 mM de la mezcla de dNTPs; 0,2 µM de cada cebador, 1 U de ADN polimerasa (1U/ µl, Biotools, B&M Labs, S.A.); 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM TMA y 1 µl de extracto de ADN 1:10.

El ADN de hongos fue amplificado mediante un paso de desnaturalización inicial (8 minutos a 94 °C), seguido por 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 94 °C), anillamiento (45 segundos a 50 °C), elongación (1 minuto a 72 °C) y un último paso de elongación final (10 min a 72 °C).

El ADN bacteriano fue amplificado mediante un paso de desnaturalización inicial (3 min a 95 °C), seguido por 35 ciclos de desnaturalización (1 min a 95 °C), anillamiento (1 min a 57 °C), elongación (1 min a 72 °C) y un último paso de elongación final (10 min a 72 °C). Los productos de amplificación son analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % (w/v) y tinción con bromuro de etilo (10 mg/ml).

### **Electroforesis en gradiente de desnaturalización (DGGE)**

Veinte µl de los productos de PCR de las muestras son analizados por DGGE, usando el detector de mutación universal DCODE™ (Bio-Rad laboratorios, Inc.). Usando un gel de poliacrilamida al 7 % [30 % acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) (Protogel, diagnóstico nacional)], con un gradiente de desnaturalización vertical de 40 % [2,69 M urea, 16 % (v/v) formamida] al 70 % [4,71 M urea, 28 % (v/v) formamida]. La electroforesis se realizó a temperatura constante de 60 °C, primero 10 min a 200 V, seguido 16 h a 75 V en 1 x tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). El gel se tiñó con tinción de plata (SYBR Gold, Invitrogen) (siguiendo las instrucciones del fabricante y observando bajo luz ultravioleta).

Las imágenes de los geles de DGGE son analizadas usando el software Quantity One (versión 4,5, Bio-Rad laboratorios, Inc.). El resultado de los perfiles de bandas de ADN es analizado por el coeficiente de similitud Dice (Dice, 1945) y el algoritmo de agrupación de Ward (Ward, 1963) para calcular el dendograma de cada DGGE, considerando una banda cuando su intensidad sea  $> 10^{-15}$ .

### **Clonaje y análisis de las secuencias.**

Los productos de la PCR para la comunidad bacteriana y fúngica, fueron clonados mediante el kit TA Cloning Dual promotor (pCR® II) usando las células competentes de *E.coli* TOP10F (Invitrogen).

Para analizar los clones, una pequeña cantidad de las células se añaden directamente a una mezcla de PCR descrito anteriormente y posteriormente es cargada en la DGGE. Los plásmidos con diferente patrón de bandas de DGGE son purificados con el kit GenElute™ PCR Clean up (Sigma, Alemania) y secuenciados con el cebador 338f (Muyzer *et al.*, 1998) usando un secuenciador 3130 (Applied Biosystems). Todas las secuencias son depositadas en el banco NCBI con número de acceso: JF901578-JF901700.

La afiliación filogenética es determinada con el Ribosomal Database Project (RDP). Se verificó la posible presencia de secuencias quiméricas utilizando el programa Bellerophon (Cole *et al.*, 2005).

### **PCR cuantitativa en tiempo real**

Las muestras de ADN de suelo son sometidas a esta técnica para la cuantificación de bacterias con los cebadores 338f/907r. Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 10  $\mu$ l usando un termociclador LightCycler™ (Roche Applied Science, Alemania). La mezcla para la reacción contenía una concentración final de 0,3  $\mu$ M de cada cebador, 0,5 mg/ml de BSA, 1 x kit Quantimix Easy Syg y 2  $\mu$ l de muestra de ADN (dilución 1/20). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial (10 min a 95 °C,) seguida por 40 ciclos de amplificación (10s a 95 °C, 10s a 54 °C y 30s a 72 °C). La detección con producto de fluorescencia es llevada a cabo después de cada ciclo durante 1s a 80 °C para evitar la fluorescencia de señales inespecíficas. La curva estándar se construye con amplificaciones de PCR del gen 16S del ARNr de cultivo de bacterias puro de acuerdo con Yergeau *et al.* (2007).

### **Determinación del perfil fisiológico de las comunidades microbianas (Community level physiological profiling). BIOLOG**

#### Principio:

La diversidad funcional microbiana se estableció mediante el estudio de los patrones de utilización por los microorganismos de diferentes sustratos carbonados, siguiendo la técnica de BIOLOG.

Las Eco Placas utilizadas presentan 31 pocillos en triplicado con distintos sustratos de carbono, más un pocillo como blanco para cada réplica. El tetrazolio presente en las placas es reducido con NADH producto de la actividad microbiana dando lugar a una coloración morada. La tasa y la extensión de formación de color morado en cada pocillo indican la tasa y la extensión a la que ocurre la respiración microbiana utilizando el sustrato presente en el citado pocillo.

#### Reactivos:

Incubador refrigerado

Balanza analítica

Agita tubos

Pipetas de volumen variable

Lector de microplacas

Agitador de vaivém

Autoclave

Tubos falcon esterilizados

Placas petri de vidrio

Agua miliQ

#### Procedimiento:

Inicialmente se procede a auto-clavar el material durante 20 minutos a 120 °C (agua miliQ, puntas de pipetas y placas petri). Seguidamente se pesa el equivalente en fresco de 1 g de muestra de suelo y se le añaden 10 ml de agua calidad MilliQ en los tubos falcon esterilizados. Se agita 1 hora en agitador de vaivém a 150 rpm durante 15 min a 4 °C. A continuación se centrifuga el extracto a 15000 g durante 10 min. Posteriormente y mediante la determinación de la densidad óptica de cada muestra mediante la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm, se realizan las diluciones necesarias de cada muestra hasta obtener lecturas similares de densidades ópticas de los extractos con el fin de obtener extractos, con un contenido similar de biomasa microbiana. Una vez determinada la dilución de la muestra se procede a realizar la siembra de cada una de ellas en las placas que contienen las diferentes fuentes de carbono. Para ello, ayudándonos de una pipeta multicanal se siembra 100 µl de inóculo de muestras en cada uno de los pocillos. A continuación, se realiza la primera lectura de las densidades ópticas a  $\lambda=595$  nm en lector placas Multiskan Ascen; esta lectura se considera como tiempo 0. Después, se incuban a 28 °C en oscuridad y se leen periódicamente, cada 12 horas (el periodo de lectura puede variar en función del tipo de muestra). La lectura óptica se realizará hasta que al menos 10 celdas tengan una absorbancia  $> 2,0$  a  $\lambda=595$  nm.

A partir de las densidades ópticas obtenidas por el lector de placas se realizan los siguientes cálculos:

$$\text{Datos transformados (DT)} = DO_{T_x} - DO_{T_0}$$

donde:

$T_0$  = lecturas iniciales, sustraídas para eliminar el background generado por el color de los sustratos y suspensión bacteriana.

$T_x$  = lecturas de las densidades para cada uno de los tiempos.

De esta forma se transforman los datos con el fin de evitar resultados negativos.

$$\text{Datos Normalizados (DN)} = DT / AWCD$$

donde:

DT = Dato transformado (según 6.2.)

AWCD (Average Well Colour Development) =  $\Sigma$  densidad óptica de los datos transformados para cada una de las réplicas por tiempo / 31 ( $n^\circ$  sustratos diferentes de carbono).

Con ello se consigue minimizar el efecto de la posible heterogeneidad en el contenido de biomasa microbiana en el inóculo inicial, ya que los parámetros cinéticos no son independientes de la densidad del inóculo (biomasa microbiana) y por ello necesitan ser normalizados antes de realizar el análisis estadístico.

### **Curva de Crecimiento Sigmoidal**

Con los Datos Normalizados (DN) se realiza una curva de crecimiento sigmoidal AWCD (para  $\lambda=595$  nm) vs Tiempo (hrs). Con las diferentes muestras sometidas a estudio enfrentadas en dicha curva, se pretende encontrar un punto de crecimiento comparable entre ellas. Para ello se escogen valores de AWCD que pueden oscilar entre 0,2-0,6.

Con los datos correspondientes al punto seleccionado (datos normalizados) se realizará a continuación el correspondiente Análisis de Componentes Principales (PCA) para determinar si existen diferencias significativas en los patrones de comportamiento de las muestras.

### **Índice de Diversidad de Shannon (H)**

Evalúa la diversidad funcional de la comunidad microbiana. Este índice abarca tanto riqueza de sustratos como uniformidad

$$H = -\sum p_i (\ln p_i)$$

Donde  $p_i$  = ratio valor absorbancia corregida de cada una de las celdas vs suma de la absorbancia de todas las celdas (este cálculo se realiza con los datos transformados, no con los normalizados).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos químicos, físico-químicos y bioquímicos han sido analizados mediante el software estadístico SPSS 19.0. Para el análisis estadístico se han utilizado dos análisis ANOVA de una vía, uno para el factor “tiempo” y otro para el factor “tratamiento”. En los casos con significancias estadísticas, se seleccionó el test de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey, al nivel de significación de  $p < 0,05$ , para determinar las diferencias significativas entre las medias.

Las imágenes del gel DGGE se analizaron con el software Quality One (Versión 4.5, Bio-Rad laboratorios, Inc.). El resultado de los perfiles de las bandas de ADN se analizaron con el coeficiente de similitud Dice (Dice, 1945) utilizándose el algoritmo de agrupación de Ward (Ward, 1963) para calcular el dendograma del gel DGGE, considerando una banda donde su intensidad era  $> 10^{-15}$ .

CLPPs ha sido analizado con componentes principales (PCA) y los valores de las dos principales componentes para cada uno de los sujetos han sido analizados mediante ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Tukey usando el SPSS 19.0.

Los datos de la abundancia bacteriana y el índice de diversidad (H, S) de CLPPs y la abundancia bacteriana han sido sometidos a un ANOVA usando el SPSS 19.0.

La riqueza ha sido calculada como el número de sustratos de C oxidados (S), y el índice de Shannon-Weaver (H: Diversidad) ha sido calculado según se indica:  $H = -\sum p_i (\ln p_i)$ , donde  $p_i$  es el ratio de actividad de cada sustrato ( $A_i$ ) de la suma de actividades de todos los sustratos ( $\sum A_i$ ).





## **8.BIBLIOGRAFÍA**



**Abed, R.M.M., Safi, N.M.D., Koster, J., de Beer, D., El-Nahhal, Y., Rullkotter, J., García-Pichel, F., 2002.** Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1674-1683.

**Acar, Y.B., Alshwabkeh, A.N., 1993.** Principles of electrokinetic remediation. *Environmental Science and Technology*, 27 (13): 2638-2647.

**Adam, G., Duncan, H., 2002.** Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*, 120: 363-370.

**Adams-Schroeder, R.H., Dominguez-Rodríguez, V.I. y García-Hernandez, L., 1999.** Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra*. 17(2): 159-174.

**Adesodun, J.K., Mbagwu, J.S.C., 2007.** Distribution of heavy metals and hydrocarbon contents in an alfisol contaminated with waste-lubricating oil amended with organic wastes. *Bioresource Technology* 99: 3195-3204.

**Adesodun, J.K., Mbagwu, J.S.C., 2008.** Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings. *Bioresource Technology*, 99: 5659-5665.

**Aggarwal, P.K., Means, J.L., Hinchee, R.E., Headington, G.L., and Gavaskar, A.R., 1990.** Methods to Select Chemicals for In-Situ Biodegradation of Fuel Hydrocarbons. Air Force Engineering and Services Center, Tyndall AFB, FL.

**Ahn, J.H., Kim, M.C., Limn J.S., Lee, G.T., Yun, J.K., Kim, T., Kim, T., Ka, J.O., 2006.** Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbon. *Journal Microbiological. Biotechnology*, 16: 704-715.

**Alef, K., Nannipieri, P., 1995.** Methods in applied soil microbiology and biochemistry, Academic Press, London, 576 pp.

**Alexander, M., 1991.** Introduction to soil microbiology. Wiley and Sons, New York, 467 pp.

**Alexander, M., 1994.** Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego.

**Alexander, M., 2000.** Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants, *Environmental Science and Technology*. 34, 4259-4265.

**Alias, L.J., Ortiz, R., 1983.** Mecanismos y procesos de degradación del suelo con especial referencia a las condiciones ambientales mediterráneas. En: Albadalejo, J., Stocking, M.A., Díaz, E. (Eds.) Soil degradation and rehabilitation in Mediterranean environmental conditions. CSIC, Madrid, pp. 47-68.

- Alloway, B.J., 1995.** The mobilization of trace elements in soil. En: Contaminated soil. 3er International conference on the biochemistry of trace elements. (Ed) INRA, París, pp.525.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A., Zang, J., Zang, Z., Miller, W., Lipman, D.L., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- Alvadalejo, J., Diaz, E., 1990.** Degradación y regeneración del suelo en el litoral mediterráneo español: experiencias en el proyecto Lucdeme. En: Albadalejo, J., Stocking, M.A., Diaz, E. (Eds.) *Soil degradation and rehabilitation in Mediterranean environmental conditions*, CSIC, Madrid, pp. 191-214.
- Alvarez, J.A., Ramos, E., Fernández, B., Nuñez, A., 2001.** Gestión de residuos sólidos petrolizados. *Petróleo Internacional*. ASM news, EUA.
- Amann, R.I., Lidwig, W., Schleifer, K.H., 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individuals microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*., 59: 143-169.
- Amellal, N., Portal, J., Berthelin, J., 2001.** Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry*, 16(14): 1611-1619.
- Anderson, J.P.E., 1982.** Soil respiration. In: Page, A.L. (Ed.), *Methods of soil Analysis: Part 2:Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, Madison, W.I., pp.831-871.
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1978.** A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 215-221.
- Anderson, T.A., Guthrie, E., Walton, B., 1993.** Bioremediation on the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 27: 2630-2636.
- Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T., 1993.** Bioremediation in the rhizosphere.,*Environmental Science and Technology*, 27: 2630-2636.
- Arthur, E., Rice, P., Anderson, T., Baladi, S., Henderson, K., 2005.** Phytoremediation- an overview. *Critical Reviews in Plant Science*, 24: 109-22.
- Atlas, R.M., 1988.** *Microbiology fundamentals and Applications*. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 352-353.
- Atlas, R.M., Pramer, D., 1990.** Focus in bioremediation. *ASM news* 56:7.

**Ayuso, M., Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T., 1996.** Evaluation of urban wastes for agricultural use. *Soil Science Plant Nutrition*, 4: 105-111.

**Baker, J.M., 1970.** The effects of soil on plants. *Environmental Pollution*, 1: 27-44.

**Balota, E.L., Colozzi, A., Andrade, D.S., Dick, R.P. 2003.** Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. *Biology and Fertility of Soils*, 38: 15-20.

**Banks, M., Schwab, P., Liu, B., Kulakow, P., Smith, J., Kim, R., 2003.** The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil: A field assessment. *Phytoremediation*, Berlin, Springer, 78: 75-97.

**Barrutia, O., Garbisu, C., Epelde, L., Sampedro, M.C., Goicolea, M.A., Becerril, J.M., 2011.** Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. *Science of the total environment*, 409: 4087-4093.

**Bastida López, F., 2008.** Procesos de degradación y recuperación de suelos en zonas semiáridas. Establecimiento de un índice de degradación biológica de suelos (IDBS). Tesis Doctoral. Universidad de Cartagena.

**Bastida, F., Kandeler, E., Moreno, J.L., Ros, M., García, C., Hernández, T., 2008.** Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semi-arid climate. *Applied Soil Ecology* 2008:318-329.

**Bastida, F., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C. 2006.** Microbiological activity in a soil 15 years after its revegetation. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2503-2507.

**Bastida, F., Nicolás, C., Moreno, J.L., Hernández, M.T., García, C., 2010.** Tracing changes in the microbial community of a hydrocarbon-polluted soil by culture-dependent proteomics. *Pedosphere* 20 (4): 479-485.

**Basumatary, B., Saikia, R., Bordoloi, S., 2012.** Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *Journal of Environmental Biology*, 33: 891-896.

**Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A., Mastronicolis, S.K., 2010.** Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Letters in Applied Microbiology* 52: 275-280.

**Bogan, B.W., Lahner, L.M., Sullivan, W.R., Paterek, J.R., 2003.** Degradation of polycyclic aromatic and straight-chain aliphatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 230-239.

**Bollag, J.M., Bollag, W.B., 1995.** Soil contamination and feasibility of biological remediation. En: *Bioremediation Science and Applications*. H.D. Skipper, R.F. Turco (eds). Soil Science Society of America Journal. Special publication 43. Madison Wisconsin, USA, pp. 1-13.

**Bonmatí, M., Jiménez, P., Álvarez, H., Calero, E., Juliá, M., Morillo, M., Nuñez, E., 2000.** Evolución de actividades enzimáticas en el proceso restaurador de dos suelos procedentes de la exploración de canteras de Cataluña utilizando altas dosis de lodos de depuradora. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds), *Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España*. CEBAS-CSIC, pp. 209-293.

**Bossio, D.A., Scow, K.M., 1995.** Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4043-4050.

**Bossert, I., Bartha, R., 1984.** The fate of petroleum in soil ecosystems. En: *Petroleum Microbiology*. R.M. Atlas (ed.). Macmillan Publishing Co., New York. Pp. 434-476.

**Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P., 1996.** The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balance for bacterial degradation of model compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 556-561.

**Bradock, J.F., Ruth, M.L., Catterall, P.H., Walworth, J.L., McCarthynd, K.A., 1997.** Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soil: implications for nutrient-amended bioremediation. *Environmental Science and Technology*, 31: 2078-2084.

**Bragg, J.R., Prince, R.C., Harner, E.J., Atlas, R.M., 1994.** Effectiveness of bioremediation from the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368: 413-418.

**Braibant, C., 2004.** Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Informe de práctica de especialidad. Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

**Brand, F.S., Jax, K., 2007.** Focusing the meaning(s) of resilience: resilience as a descriptive concept and a boundary object. *Ecology Society*, 12: 23.

**Braun, B., Böckelmann, U., Grohmann, E., Szewzyk, U., 2010.** Bacterial soil communities affected by water-repellency. *Geoderma*, 158: 343-351.

**Bremner, J.M., 1965.** Inorganic forms of nitrogen. En: Methods of Soil analysis, Part 2. Agronomy 9. Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., and Clark, F.E. (eds). American Society of Agronomy, Madison, pp. 1179-1237.

**Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982.** Nitrogen-total. En: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H., Miller and D.R. Keeny, 2<sup>nd</sup> Edition. American Society of Agronomy, Madison, pp. 595-622.

**Brink, R.H., Dubar, P., Linch, D.L., 1960.** Measurement of carbohydrates in soil hydrolysates with anthrone. Soil Science, 89: 157-166.

**Brohon, B., Delolne, C., Gourdon, R., 2001.** Complementary of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. Soil Biology and Biochemistry 33: 883-891.

**Bucher, A.E., Lanyon, L.E., 2005.** Evaluating soil management with community-level physiological microbial profiles. Applied Soil Ecology, 29: 59-71.

**Bundy, J.G., Paton, G.I., Campbell, C.D., 2002.** Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. Journal of Applied Microbiology, 92: 276-288.

**Burd, G., Ward, O.P., 1996.** Bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on agar plates: the role of biosurfactants. Biotechnol. Tech., 10: 371-374.

**Burns, R.G. 1982.** Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. Soil Biology and Biochemistry, 14: 423-427.

**Campbell, C.A., Zenyner, R.P., 1993.** Soil organic matter as influenced by crop rotations and fertilization. Soil Science Society of American Journal, 57: 1034-1040.

**Canet R., Albiach, R., Pomares, F., 2000.** Los índices de calidad biológica como herramienta de diagnóstico de la fertilidad del suelo en agricultura ecológica. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds), Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España. CEBAS-CSIC, pp. 11-39.

**Caravaca, F., Roldán, A., 2003.** Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. Geoderma 117:53-61.

**Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J.M., Solanas, A.M., 1997.** New metabolites in the degradation of fluorine by *Arthrobacter* sp. Strain F101. Applied Environmental Microbiology, 63: 819-826.

**Casida, L.E.jr., Klein, D.A., Santoro, T., 1964.** Soil dehydrogenase activity. Soil Science, 98: 371-376.

- Castellanos, J.Z., Pratt, P.F., 1981.** Mineralization of manure nitrogen-correlation with laboratory indexes. *Soil Science Society of American Journal*, 45: 354-357.
- Castro Gutierrez, V.M., Rodriguez Rodríguez, C.E., Vargas Azofeifa, I., 2012.** Hydrocarbon degrading microflora in a tropical fuel-contaminated aquifer: Assessing the feasibility of PAH bioremediation. *International journal of environmental research*, 6: 345-352.
- Castro, J., 2006.** Short delay in timing of emergence determines establishment success in *Pinus sylvestris* across microhabitats. *Annals of botany*, 98: 1233-1240.
- Cauwenberghe, L.V., and Roote, D.S., 1998.** In Situ Bioremediation," Technology Overview Report, TO-98-01, Groundwater Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburgh, PA.
- Ceccanti, B., García, C., Masciandaro, G., Macci, C., Carmignani, A., Filareto, A., 2003.** Il ruolo dei lombrichi (*Eisera fetida*) nella bioremediation di un suolo contaminato da idrocarburi. Convegno SISS Qualità del suolo, impatto antropico e qualità dei prodotti agricoli, Siena 9-12 giugno 2003.
- Cerniglia, C.E., 1992.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351-358.
- Chaîneau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J., 1997.** Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*, 26: 1478-1483.
- Chakraborty, A., Chakrabarti, K., Chakrabarty, A., Ghosh, S., 2011.** Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biology and Fertility of Soil*, 47: 227-233.
- Chang, S.H., Devinny, J.S., 2000.** Bioaugmentation for soil bioremediation. In: Wise, D.L., Trantolo, D.J., Cichon, E.J., Inyang, H.I., Stottmeister, U. (Eds.), *Bioremediation of contaminated soil*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Chanyasak, V., Yoshida, T., Kubota, H., 1980.** Chemical-components in gel chromatographic fractionation of water extract from sewage-sludge compost. *Journal of Fermentation Technology*, 58: 533-539.
- Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., Chikere, B.O., 2009.** Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, 8: 2535-2540.
- Choi, K.H., Dobbs, F.C., 1999.** Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 36: 203-213.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction, *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.



- Chowdhury, N., Nakatani, A.S., Setia, R., Marschner, P., 2011.** Microbial activity and community composition in saline and non-saline soils exposed to multiple drying and rewetting events. *Plant Soil*, 348:103-113.
- Ciardi, C., Nannipieri, P., 1990.** A comparison of methods for measuring ATP in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 725-727.
- Clark, L., 1995.** Hydrocarbon pollution control and remediation of groundwater: a brief review. *Quarterly Journal of Engineering Geology* 28: S93-S100.
- Cole, C., Leide, J.E., Large, A., Beheshti, J., Brooks, M., 2005.** Putting in together online: information need identification for the domain novice user. *Journal of American Society for Information Science and Technology*, 56(7): 684-694.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., 2005.** The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acid Research*, 33: 294-296.
- Concawe. 1980.** Sludge farming: a technique for the disposal of oily refinery wastes. CONCAWE, Brussels, Belgium.
- Cook, B.D., Allan, D.L., 1992.** Dissolved organic matter in old field soils: total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:585-594.
- Cookson, J.T., 1995.** *Bioremediation Engineering Design and Application*, McGraw-Hill, New York.
- Costa, F., García, C., Hernández, M.T., y Polo, A., 1991.** Residuos orgánicos. Manejo y utilización. CEBAS-CAJAMURCIA de p. 181.
- Crafts, A.S., Reiber, H.G., 1948.** Herbicidal properties of soil. *Hilgardia*, 18(2): 77-156.
- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996.** Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56: 55-114.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., 1993.** Remediation of contaminated soil with green plants: an overview. *In vitro Cellular Development Biology*. 29:207-212.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang J.W., 1995.** Phytoremediation of contaminated soils. *Trands in Biotechnology*, 13: 393-397.
- Currier, H.B., 1951.** Herbicidal properties of benzene and certain methyl derivatives. *Hilgardia*, 20(2): 383-406.

- Dawson, J.J.C., Godsiffe, E.J., Thompson, I.P., Ralebitso-Senior, T.K., Killham, K.S., Paton, G.I., 2007.** Application of biological indicator to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 164-177.
- Debosz, K., Rasmussen, P.H., Pedersen, A.R., 1999.** Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soil: effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology*, 13:209-218.
- Degens, B.P., Harris, J.A., 1997.** Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1309-1320.
- Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., Chaney, R.L., 2001.** Influence of the zinc hyperaccumulator *Thalasspi caerulescens* J. and C. Presl and the nonmetal accumulator *Trifolium pretense* L. on soil microbial populations. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 773-776.
- Demque, D.E., Biggar, K.W., Heroux, J.A., 1997.** Land treatment of diesel contaminated sand. *Canadian Geotechnical Journal* 34: 421-431.
- DeNittis, M., Querol, A., Zanoni, B., Minati, J.L., Ambrosoli, R., 2010.** Possible use of biologic methodology for monitoring yeast presence in alcoholic fermentation for wine-making. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1199-1206.
- Díaz, E., Roldán, A., Lax, A. y Albadalejo, J., 1994.** Formation of stable aggregates in degraded soils by amendment with urban refuse and peat. *Geoderma* 63: 277-288.
- Dibble, J.T., Bartha, R., 1979.** Effects of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied Environmental Microbiology*. 37:729-739.
- Dice, L.R., 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Dickinson, S.J., Rutherford, P.M., 2006.** Utilization of biosolids during the phytoremediation of hydrocarbons contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 35: 982-991.
- Doni, S., Macci, C., Perizzi, E., Arenella, M., Ceccanti, S., Masciandaro, G., 2012.** *In situ* phytoremediation of a soil historically contaminated by metals, hydrocarbons and polychlorobiphenyls. *Journal of Environmental Monitoring*, 14: 1383-1390.
- Doran, F.W., Jones, A.J., Arshad, M.A., Gilley, J.E., 1999.** Determinants of soil quality and health. En: Lal, R (Ed). *Soil Quality and Soil Erosion*. CRC Press, Florida. 39-57.

**Doran, J. W. and Safley, M. 1997.** Defining and assessing soil health and sustainable productivity. En: Pankhurst, C.E., Doube, B.M. and Gupta, V.V.S.R. (eds.), *Biological indicators of soil health*. CAB International, pp. 1-28.

**Doran, J., Zeiss, M., 2000.** Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15: 3-11.

**Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994.** Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W., Coleman, S.C., Bezdicsek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Pub 34. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 3-21.

**Dorronso, C., Barahona, E., 2004.** Degradación del suelo. Tema 10.15 pp. Disponible en: <http://edafologia.ugr.es/conta/Tema10.html>

**Duarte, G., Soares, A., Seldin, L., Araujo, W., Van Elsas, J., 2001.** Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Applied and Environmental Microbiology* 67(3): 1052-1062.

**Eguarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X., 2007.** *Ecología Molecular*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología Universidad Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

**Eiland, F., 1985.** Determination of adenosine triphosphate (ATP) and adenylate energy charge (AEC) in soil and use of adenine nucleotides as measures of soil microbial biomass and activity. *Danish Journal of Plant and Soil Science*, 1777:1-193.

**Eiland, F., Klamer, M., Lind, A.M., Leth, M., Baath, E., 2001.** Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. *Microbial Ecology*, 41: 272-280.

**Eivazi, F. y Zakaria, A., 1993.**  $\beta$ -Glucosidasa activity in soils amended with sewage sludge. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 3:155-161.

**Eivazi, F., Tabatabai, M.A. 1977.** Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 167-172.

**Eivazi, F., Tabatabai, M.A. 1990.** Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 891-897.

**El Fantorussi, S., Agathos, S.N., 2005.** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Curr Opin in Microbiology*, 8: 268-275.

**Enning, Z., Crawford, R., 1995.** Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* 6: 127-140.

- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P., 2007.** Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 190-205.
- EPA, 1993.** Bioremediación using the land treatment concept. Office of Research and Development, Washintong, DC 20480. EPA/600/R-92/164.
- EPA. 2004.** How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites:a guide for corrective action plan reviewers. (EPA 510-B-94-003, EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002), EPA documents.
- Epelde, L., Becerril, J.M., Mijangos, I., Garbisu, C., 2009b.** Evaluation of the efficiency of a phytostabilization process with biological indicators of soil health. *Journal of Environmental Quality*, 41: 2041-2041.
- Epelde, L., Mijangos, I., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2009a.** Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1788-94.
- Ercoli, E., Galvez, J., 2001.** Tratamiento biológico ex situ de residuos semisólidos de oleoductos. Laboratorio de Bioprocesos; De Cuyo, Argentina.
- Ercoli, E., Galvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., y Bauzá, J., 2000.** Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo, Congreso de producción 2000. III Workshop Latinoamericano sobre aplicaciones de la Ciencia en la Ingeniería de Petróleo. Puerto Iguazú. Argentina.
- Euliss, K., Ho, C., Scuwab, A.P., Rocks, S., Banks, K., 2008.** Greenhouse and field assessment of phytoremediation for petroleum contaminants in a riparian zone. *Bioresource technology*, 99: 1961-1971.
- Ezeonu, C.S., Chukwuma, S., 2010.** Impact of soluble metal salts and crude oil contaminants on wáter retention capacity of soil and protein content of *Zea mays*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9 (5): 885-891.
- Falatko, 1991.** Effects of biologically reduced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. MS Thesis Virginia Polytecnic Institute and State University, Blackburg, VA.
- Falcón, L., Valera, A., 2007.** Extracción de ácidos nucleicos. En: Eguiarte,L., Souza, V.,Aguirre, X.,(Eds.) *Ecología Molecular*, México, pp. 499-516.
- FAO, 1997.** Land quality indicators and their use in sustainable agriculture and rural development. *Land Water Bull*, 5. Rome.

**Felipo, M.T., Garau, M.A., 1987.** La contaminació del sol. Process de degradació del medi edàfic i de l'entorn. Quaderns d'Ecologia Aplicada, 12. Serv. Ded. Amb. Dip. Barcelona.

**Fisk, M.C., Ruether, K.F., Yavitt, J.B., 2003.** Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 591-602.

**Flores, N. y col., 2001.** Utilización de lodos residuales en la restauración de suelos contaminados con hidrocarburos. VI Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Pachuca; México.

**Föstner, U., 1995.** Risk assessment and technological options for contaminated sediments- a geochemical perspective. *Marine and freshwater research*, 46: 113-127.

**Frac, M., Oszust, K., Lipiec, J., 2012.** Community Level Physiological Profiles (CLPP), Characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. *Sensors*, 12: 3253-3268.

**Franzetti, A., Caradda, P., Ruggeri, C., La Colla, P., Tamburini, E., Papacchini, M., Bestetti, G., 2009.** Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil bioremediation technologies. *Chemosphere*, 75: 810-807.

**Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002.** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4: 634-643.

**Gallego, J.L.R., Loredo, J., Llamas, J.F., Vazquez, F., Sanchez, J., 2001.** Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, 12:325-335.

**García, C. y Hernández, M.T., 1996.** Influence of salinity on the biological and biochemical activity of calcicorthid soil. *Plant and Soil*.178: 255-263.

**García, C., 1990.** Estudio del compostaje de residuos orgánicos. Valoración agrícola. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

**García, C., Hernández, M.T., 2000.** Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España. Eds. C.García y M.T.Hernández, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain, 352.

**García, C., Hernández, M.T., Costa, F., 1992.** Variation in some chemical parameters and organic matter in soils regenerated by the addition of municipal solid-waste. *Environmental Management*, 16: 763-768.

**García, C., Hernández, M.T., Costa, F., 1994.** Biochemical parameters in soils generated by the addition of organic wastes. *Waste Management and Research*, 12: 457-466.

**García, C., Hernández, M.T., Costa, F., Ayuso, M., 1992.** Evaluation of the manurity of municipal wastes compost using simple chemical parameters. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*.23:1501-1512.

**García, C., Hernández, M.T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 1993.** The dehydrogenasae activity of soils: an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallargo, J.F. (Ed.). XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry, Salamanca.

**García, C., Hernández, M.T., Roldán, A., Albadalejo, J., Castillo, V., 2000.** Organic amendement and mycorrhizal inoculation as a practice in aforesation of soil with *Pinus halepensis* Miller: effect on their microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1173-1181.

**García, C., Hernández, M.T., Roldán, A., Martín, A., 2002.** Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under mediterranean climate. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 634-642.

**García, C., Hernández, M.T., Ros, M., 2003.** Determinación del Adenosín 5´ Trifosfato (ATP) del suelo. En *Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. C. García, F. Gil, T. Hernández y C. Trasar (eds). Pp. 285-309.

**García, C., Moreno, D.A., Ballester, A., Blázquez, M.L., Gonzalez, F., 2001.** Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering*, 14(9): 997-1008.

**García, C., Roldán, A., Hernández, T. 2005.** Ability of different plant species to promote microbiological processes in semiarid soil. *Geoderma*, 124: 193-202.

**García, J.M., 2006.** Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova-Publicación científica issn: 1794-2470, vol.4, Nº5: 1-116.*

**García, M.G., Infante, C., López, L., 2012.** Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agentes estructurantes. *Bioagro v.24 n.2, Barquisimeto, issn 1316-3361.*

**García-Navarro, A., 2001.** Curso de Gestión y conservación del suelo. Degradación del suelo. Área de edafología y química agrícola, Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura. Disponible en: <http://unex.cs/edafo/>

**García-Villaraco, A., Probanza, A., Gutierrez, F.J., Ramos, B., Lucas, J.A., 2009.** Characterization of the rhizosphere microbial community from different *Arabidopsis thaliana* genotypes using phospholipids fatty acids (PLFA) analysis. *Plant and Soil* 329, 1-2, 315-325.

**Garland, J.L., Turner, S.P., Hawkesworth, C.J., 1996.** Shifts in the source of Parana basalts through time, *Lithos*, 37: 223-243.

**Garland, J.L., 1997.** Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 24: 223-230.

**Garland, J.L., Mills, A.L., 1991.** Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2361-2369.

**Garland, J.L., Mills, A.L., Young, J.S., 2001.** Relative effectiveness of kinetic analysis use single point readings for classifying environmental samples based on community level physiological profiles (CLPP). *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1059-1066.

**Gaskin, S.E., Bentham, R.H., 2010.** Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Science Total Environmental*, 408: 3683-8.

**Gauvrit, C., Cabanne, F., 1993.** Oils for weed control: uses and mode of action. *Pesticide Science*, 37: 147-153.

**Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, C., Cacco, G., van Elsas, J.D., 1999.** Assesement of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal Microbiology Methods*, 38: 1-15.

**Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrska, A., Palumbo, G., Colombo, C., 2005.** Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341: 265-279.

**Gómez, J., Solar, D.R., Pazos, M., Sanroman, M.A., 2006.** Appliedicability of *Corioloopsis rigida* for biodegradaction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biorechnology Letters*, 28: 1013-1017.

**Grayston, S.J., Shenquiang, W., Campbell, C.D., Edwards, A.C., 1998.** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 369-378.

**Green, S.J., Michel Jr., F.C., Hadar, Y., Minz, D., 2004.** Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 115-123.

**Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001.** Funtional stability substrate, utilitation and biological indicators of soil following environmental impacts. *Applied Soil Ecology*, 16: 49-61.

**Hackett, C.A., Griffiths, B.S., 1997.** Statistical analysis of the time-course of Biology substrate utilization. *Journal Microbiology Methods*, 30: 63-69.

**Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M., Inskeep, W.P., 2006.** Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 6316- 6324.

**Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N., 2007.** Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. *Chemosphere*, 70:135-143.

**Haristah and Kaushik, 2009.** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169:1-15.

**Harmsen, J., 1991.** Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soil. In: Olfenbittel, R.F.H. (Ed.), *On Site Bioremediation Process for Xenobiotic and Hydrocarbons treatment*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA, pp. 255-272.

**Hawkes, C.V., DeAngelis, K.M., Firestone, M.K., 2007.** Root interactions with soil microbial communities and processes. In: Cardon ZG, Whitbeck JL (eds) *The rhizosphere. An ecological perspective*. Elsevier, pp 1-30.

**Hencklein, F.A., 2005.** Estabilização de "landfarming" de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de carbono. Rio Claro, Brasil ( final term-paper. Instituto de Biociencias, Unesp-Rio Claro).

**Hernandez, A., Castillo, H., Damaris, O., Arras, A., Lopez, J., Sanchez, E., 2010.** Effect of vermicompost and compost on lettuce production, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70: 583-589.

**Hernandez, D., L., Hobbie, S., 2010.** The effects of substrate composition, quality, and diversity on microbial activity. *Plant and Soil*, 335: 397-411.

**Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Zárate, O., Garbisu, C., 2006.** Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. *Plant Soil*, 281: 147-58.

**Herrick, J.E., Brown, J.R., Tugel, A.J., Dhaver P.L., Havstad K.M., 1999.** Application of soil quality to monitoring and management: paradigms from rangeland ecology. *Agronomy Journal*, 94: 3-11.

**Holling, C.S., Gunderson, L.H., Peterson, G.D., 2002.** Sustainability and panarchies. In: Gunderson LH, Holling CS (eds) *Panarchy: understanding transformations in human and natural systems*. Island Press, Washington, pp 63-102.

**Howard, P.J.A., 1972.** Problems in the estimation of biological activity in soil. *Oikos*, 23: 230-240.



**Hu, J., Lin, X., Wang, J., Dai, J., Chen, R., Zhang, J., Wong, M.H., 2011.** Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soil and Sediments*, 11: 271-280.

**Hueso Martos, S. 2011.** Influence of drought organic matter and microbiological properties of a semiarid soil. Biomarkers of its recuperation. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena.

**Hueso, S., García, C., Hernández, T., 2012.** Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 50: 167-173.

**Hutchinson, S.L., Banks, M.K., Schwab, A.P., 2001.** Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizers. *Journal Environmental Quality*, vol.30.

**Hutchinson, S.L., Schwab, A.P., Banks, M.K., 2003.** Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the rhizosphere. In: McCutcheon, S., Schnoor, J., editors. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc. p. 355-86.

**Innerebner, G., Knapp, B., Vasara, T., Romantschuck, M., Insam, H., 2005.** Traceability of ammonia-oxidizing bacteria in compost treated soils. *Soil Biol.Biochem.*, 38: 1092-1100.

**Insam, H., 1997.** A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. En: *Microbial Communities: Functional Versus Structural Approaches*, Insam H y Rangger A, (Eds.), Springer-Verlag, Berlin.

**Insam, H., Goberna, M., 2004.** Use of Biolog of the community level physiological profiles (CLPP) of environmental samples. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas LD (eds) *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer, Dordrecht, pp 853-860.

**Jenkinson, D.S., 1988.** Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. En: Wilson, K. (Ed.) *Advances in Nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. C.A.B. International, Wallingford, pp. 368-386.

**Jenkinson, D.S., 1992.** La materia orgánica del suelo: Evolución. En: *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. Ed. Alan Wild.Mundi-Prensa.

**Jenkinson, D.S., Powelson, D.S., 1976.** The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. *Soil Biology and Biochemistry*, 8: 167-177.

**Joergensen, R.G., Emmerling, C. 2006.** Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 295-309.

**Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005.** Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133: 71-84.

**Joner, E.J., Corgie, S.C., Amellal, N., Leyval, C., 2002.** Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a stimulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 859-864.

**Jones, A., 1984.** Estimation of an active fraction soil nitrogen. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 15: 23-32,

**Jorgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.M., 2000.** Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107: 245-254.

**Kaifer, M.J., Aguilar, A., Arana, A., Balseiro, C., Torá, I., Caleyá, J.M., Pijls, C., 2004.** Guía de tecnologías de recuperación de suelos contaminados. Comunidad de Madrid, Consejería de medio ambiente y ordenación del territorio. Madrid. 175 pp.

**Kaiser, F.G., Frick, J., Stoll-Kleemann, S., 2001.** Accuracy of self-reports: Validating the general ecological behavior scale. *Diagnostica*, 47: 88-95.

**Kaplan, C., Kitts, C.L., 2004.** Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied Environmental Microbiology*, 70:1777-1786.

**Karlem, D.L., Ditzer, C.A., Andrews, S.S., 2003.** Soil quality: why and how?. *Geoderma*, 114: 145-156.

**Kasai, Y., Kishira, H., Harayama, S., 2002.** Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic released in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5625-5633.

**Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B., 1998.** Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Applied Environmental Microbiology*, 64:359-362.

**Katsivela, E., Moore, E.R.B., Maroukli, D., Strompl., C., Pieper, D., Kalogerakis, N., 2005.** Bacterial community dynamics during in situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. *Biodegradation*, 16: 169-180.

**Kennedy, I.R., 1992.** Acid soil and acid rain. Research studies press. John Wiley and Sons. Taunton.

**Kibblewithe, M.G., Ritz, K., Swift, M.J., 2008.** Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 363: 685-701.

**Kirpatrick, W.D., White P.M. Jr., Wolf, D.C., Thoma, G.L., Reynolds, C.M., 2006.** Selecting plants and nitrogen rates to vegetable crude oil-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 8: 285-297.

**Kloos, K., Munch, J.C., Schloter, M., 2006.** Microbial activity in an acid resin deposit: Biodegradation potential and ecotoxicology in an extremely acidic hydrocarbons contamination. *Environmental Pollution*, 144: 136-144.

**Knox, A.S., Gamberinger, A.P., Adriano, D.C., Kolka, R.K., Kaplan, D.I., 1999.** Sources and practices contributing to soil contamination. *Bioremediation of contaminated soils. Agronomy Monograph*, 37.

**Kuiper, I., Legendijk, E., Bloemberg, G., Lugtenberg, B., 2004.** Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17: 6-15.

**Kuwatsuka, S., Shindo, H., 1973.** Behavior of phenolic substances in the decaying process of plant. Identification and quantitative determination of phenolic acids in rice straw and its decayed products by gas chromatography. *Soil Science and Plant Nutrition*, 19: 219-227.

**Kyung-Hwa, B., Byung-Dae, Y., Hee-Mock, O., Hee-Sik, K., In-Sook, L., 2006.** Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Nocardia sp.* H17-1. *Geomicrobiology Journal*, 23: 253-259.

**Labrador Moreno, J., 2001.** La materia orgánica en los agroecosistemas. Ed. Mundi-Prensa.

**Labul, V., García, C., Hernandez, T., 2007.** Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863-1871.

**LaGrega, M.D., Buckingham, P.L., Evans, J.C., 1996.** Gestión de residuos tóxicos, Mc. Graw Hill, Madrid.

**Lal, R., 1997.** Degradation and resiliencie of soil. *Philos Trans R Soc B*, 353: 997-1010.

**Lal, R., 2011.** B.P. Singh *et al.* (eds.) Soil Health and climate change, *Soil Biology*, 29. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

**Landi, L., Renella, G., Moreno, J.L., Falchini, L., Nannipieri, P. 2000.** Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-D-Glutamic acid respiration and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 32: 8-16.

**Langbehn, A., Steinhart, H., 1995.** Biodegradation studies of hydrocarbons in soil by analysing metabolites formed. *Chemosphere*, 30: 855-867.

**Launen, L., Pinto, L., Wiebe, C., Kiehlman, E., Moore, M., 1995.** The oxidation of pyrene and benzopyrene by non basidiomycete soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 477-488.

- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990.** Microbial-degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54: 305-315.
- Lee, H., Puppala, D., Choi, E.Y., 2007.** Targeted degradation of the aryl hydrocarbon receptor by the PROTAC approach: A useful chemical genetic tool. *Chembiochem*, 8: 2058-2062.
- Lee, SH., Oh, BI., Kim, Jg., 2008.** Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology* 99: 2578-2587.
- Leiros, M.C., Trasar-Cepeda, C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 1999.** Dependence of mineralization of soil organic matter on temperature and moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:327-335.
- Li J.B., Huang, G.H., Zeng, G.M., 2001.** An integrated decision support system for the management of petroleum-contaminated sites. *Journal of Environmental Science and Health Part a Toxic/hazardous Substances and Environmental Engineering*, 36: 1163-1186.
- Liao, M., Xiao, X.M., 2007.** Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 21-223.
- Liew, P.W.Y., Jong, B.C., 2008.** Application of rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of microbial diversity in Malaysian crude oil. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 18: 815-820.
- Liste, H.H., Prutz, I., 2006.** Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*, 62: 1411-1420.
- Liu, WX., Lou, YM., Teng, Y., Li, ZG., 2010.** Phytoremediation of oilfield sludge after prepared bed bioremediation treatment. *International journal of phytoremediation* 12 (3): 268-278.
- Llamas, D.P., Gonzales, M.D., Gonzales, C.I., Lopez, G.R., Marquina, J.C., 2008.** Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35:1411-1418.
- Lobo, M.C., 1985.** Biodegradación y humificación del sarmiento de la vid. Caracterización agrobiológica de los compost obtenidos. Tesis Doctoral. Facultad de ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 203p.
- Lobo, M.C., Sastre, I., Vicente, M., 2000.** Las enzimas como medida del impacto ambiental en los suelos. En: García,C., Hernández, T. (Eds). *Investigación y perspectivas de la enzimología de suelos en España*. CEBAS-CSIC, España: pp. 297-352.

**Logan, A., Halcrow, K., Toascrik, T., 1990.** UV excitation-fluorescence in polyp tissue of certain scleractinian corals from Barbados and Bermuda. *Bull Mar Science*, 46: 807-813.

**Lopez de Mesa JB, Quintero G., Jaimes DC., Gutierrez SM., García JM., 2006.** Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova-Publicación Científica vol.4.* 82-90.

**Lopez Martinez, S., Gallegos Martinez, M.E., Perez Flores, L.J., Gutierrez Rojas, M., 2002.** Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(2): 91-100.

**Lopez Martinez, S., Gallegos Martinez, M.E., Perez Flores, L.J., Gutierrez Rojas, M., 2008.** Contaminated soil phytoremediation by *Cyperus laxus* Lam. cytochrome P450 Erod-activity induced by hydrocarbons in roots. *International Journal of Phytoremediation*, 10: 289-301.

**Lopez Piñeiro, A., Murillo, S., Barreto, C., Muñoz, A., Rato, J.M., Albarrán, A., 2007.** Changes in organic matter and residual effect of amendment with two phase olive-mill waste on degraded agricultural soil. *Science of the Total Environmental*, 378: 84-9.

**Lovley, D.R., 2003.** Cleaning up with genomics: Applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews. Microbiology*, 1 (1):35-44.

**Mabuhay, J.A., Nakagoshi, N., Isagi, Y., 2006.** Soil microbial biomass, abundance and diversity in a Japanese red pine forest: first year after fire. *Japanese Forest Research*, 11: 165-173.

**Macías, F., 1993.** Contaminación de suelos: algunos hechos y perspectivas. En: Ortiz, R. (Ed.) *Problemática geoambiental y desarrollo (Tomo I)*. Ponencia de la V reunión nacional de geología ambiental y ordenación del territorio. Pp. 53-74.

**Magdoff, F., 2001.** Concept, components and strategies of soil health in agroecosystems. *J Nematol*, 33: 169-172.

**Magot, M., 2005.** Indigenous microbial communities in oil fields. B Ollivier, M.Magot (Eds.), *Petroleum Microbiology*, ASM Press, Washington, DC, pp. 21-33.

**Magurran, A.E., 1988.** Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, New Jersey, pp. 179.

**Majid, Z., Mnouchehr, V., Sussan, K.A., 2008.** Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH I, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere*, 72: 905-909.

- Maletic, S., Roncevic, S., Dalmacija, B., Agbaba, J., Watson, M., Tubic, A., Perovic, S.U., 2012.** Characterisation of weathered petroleum hydrocarbons during a landfarming bioremediation study. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(11): 1671-1682.
- Mandeel, Q.A., 2006.** Biodiversity of the genus *Fusarium* in saline soil habitats. *J Basic Microbiology*, 46:480-494.
- Maqbool, F., Wang, Z.Y., Xu, Y., Zhao, J., Gao, D.M., Zhao, Y.G., Bhatti, Z.A., Wing, B.S., 2012.** Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *Journal of Hazardous Materials*, 237: 262-269.
- Margesin, R., Haemmerle, M., Tschierko, D., 2007.** Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53: 259-269.
- Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C.W., Whyte, L.G., 2003.** Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F., 2000.** Monitoring of bioremediation by biological activities. *Chemosphere*, 40:339-346.
- Marín, A., 2004.** Biorremediación, mediante técnicas biológicas, de hidrocarburos contenidos en lodos de refinería. Experiencias en clima semiárido. Tesis doctoral. Departamento de química agrícola, geología y edafología. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Universidad de Murcia.
- Marín, J.A., Hernández, T., García, C., 2005.** Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soilmicrobial activity. *Environmental Research*. 98:185-195.
- Marín, J.A., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 2006.** Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge. *Bioresource Technology*.
- Martínez-Mena, M., Alvarez Rogel, J., Castillo, V. y Albadalejo, J., 2002.** Organic carbon and nitrogen losses influenced by vegetation removal in a semiarid mediterranean soil. *Biogeochemistry* 61: 309-321.
- Máthé, I., Benedek, T., Táncsics, A., Palatinszky, M., Lányi, S., Márialigeti, K., 2012.** Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 73: 41-49.
- Mattia, C., Bischetti, G.B., Gentile, F., 2005.** Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species. *Plant and Soil*, 278: 23-32.

- McBride, M.B., 1994.** Environmental Chemistry of Soil. New York Oxford University Press, Oxford.
- Medaura, M.C., Ércoli, E.C., 2008.** Bioconversion of petroleum hydrocarbons in soil using apple filter cake. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 427-432.
- Megharaj, M., Kantachote, D., -singleton, I., Naidu, R., 2000.** Effects of long-term contamination of DDT on soil microflora with special reference to soil algae and algal transformation of DDT. Environmental Pollution, 109: 35-42.
- Mena, E., 2001.** Compostaje de lodos de depuración urbana; una adecuada estrategia para su reciclado en el suelo. Tesina de Licenciatura. Departamento de química agrícola, geología y edafología. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Universidad de Murcia
- Mena, E., 2008.** Estabilización de lodos EDAR mediante compostaje en pilas móviles y en reactor vertical. Uso de los compost resultantes como bioenmienda orgánica. Tesis Doctoral. Departamento de química agrícola, geología y edafología. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Universidad de Murcia.
- Mijangos, I., Pérez, R., Albizu, I., Garbisu, C., 2006.** Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. Enzyme and Microbial Technology, 40: 100-6.
- Mikkonen, A., Hakala, K.P., Lappi, K., Kondo, E., Vaalama, A., Suominen, L., 2012.** Changes in hydrocarbon groups, soil ecotoxicity and microbiology along horizontal and vertical contamination gradients in an old landfarming field for oil refinery waste. Environmental Pollution, 162: 374-380.
- Miller, G.C., Hebert, V.R., Miller, W.W., 1989.** Effect of sunlight on organic contaminants at the atmosphere-soil interface. In "Reactions and movement of organic chemicals in soil" SSSA Special Publication N°22, 99-110.
- Millioli, V.S., Servulo, E-L.C., Sorbal, L.G.S. and De Carvalho, D.D., 2009.** Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the Effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. Global NEST Journal, 11 (2): 181-188.
- Mohammed-Azizi, F., Dib, S., Boufatit, M., 2011.** Algerian montmorillonite clay as adsorbent for the removal of aniline from the aqueous system. Desalination and Water Treatment, 30: 1-3.
- Morelli, I.S., Del Panno, M.T., De Antoni, G.L., Paineira, M.T., 2005.** Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation, 55: 271-278.

- Moreno, J.L., 1997.** Uso de compost de lodo de depuradora para la mejora de la calidad de suelos de zonas áridas. Efecto de su contaminación metálica. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Moreno, J.L., Bastida, F., Ros, M., Hernández, M.T., García, C., 2009.** Soil organic carbon buffers heavy metal contamination on soil semiarid soils: Effects of different metal threshold levels on soil microbial activity. *European journal of soil biology*, 45: 220-228.
- Moreno, J.L., García, C., Hernández, M.T., 2002.** Toxicity of cadmium to soil microbial activity: effect of sewage sludge addition to soil on the ecological dose. *Applied Soil Ecology*, 21: 149-158.
- Moreno, J.L., García, C., Hernández, M.T., 2003.** Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *European Journal of soil Science*, 54: 377-386.
- Morgan R.P.C. 1986.** Soil erosion and conservation. Longman, London.
- Mueller, J.G., Resnick, S.M., Shelton, M.E., Pritchard, P.H., 1992.** Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. *Journal of Industrial Microbiology*.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001.** Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60:193-207.
- Murphy, J. And Riley, J.P., 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chimica Acta*, 27: 31-36.
- Muyzer, G., De Waal, E.D., Uitterlinder, A.G., 1993.** Profiling of complex microbial populations by denaturalizations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoe*, 73: 127-141.
- Nannipieri, P., Cecanti, B., Grego, S., 1990.** Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J-M., G. Stotzky, G. (Eds), *Soil Biochemistry*, Vol. 6. Marcel Dekker., New York, pp. 293-355.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S., Matarese, E., 1980.** Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbón and nitrogen from soil. *Soil Science Society of American Journal*, 44: 1011-1016.
- Nannipieri, P., Greco, S., Ceccanti, B., 1990.** Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J.M., Stotzky, G. (Eds.). *Soil Biochemistry*, vol.6. Marcel Dekker, New York. Pp. 293-356.



**Nannipieri, P., Sastre, I., Landi, L., Lobo, M.C., Pietramellara, G., 1996.** Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 28:107-112.

**Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002.** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. En: *Enzymes in the Environment*, Burns RG y Dick R, (Eds.), pp. 1-33, Marcel Dekker, New York.

**Niemi, G.J., 1987.** Structure features associates with degradable and persistent compounds. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 6. Pergamon Journal, Ltd, Elmsford, New York.

**Obbard, J.P., NG, K.L., Xu, R., 2004.** Bioremediation of petroleum contaminated beach sediments: use of crude palm oil and fatty acids to enhance indigenous biodegradation. *Water Air Soil Pollut.* 157:149-161.

**Ojima, D.S., Staffor-Smith, M. y Beardsley, M., 1995.** Factors affecting carbon storage in semiarid and arid ecosystems. In: Squires V.R. (ed.) *Combating global warning by combating land degradation*. UNEP, Nairobi, Kenya, pp. 60-68.

**Olsen, S.R., Cola, C.V., Watanabe, F.S., Alan, L.A., 1954.** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *USDA Circular* 939.

**Olson, P.E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N.M., Pilon-Smits, E., Reardon, K.F., 2008.** Effects of agronomic practices on phytoremediation of an aged PAH-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 37: 1439-1446.

**Olson, P.E., Castro, A., Joern, M., Du Teau, N.H., Pilon-Smits, E.A.H., Reardon, K.F., 2007.** Comparison of plant families in a greenhouse phytoremediation study on an aged polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 36(5): 1461-1469.

**Ortiz, I., Sanz, J., Dorado, M., Villar, S., 2007.** Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Ed. Universidad de Alcalá. Dirección General de Universidades e Investigación. D.L. M-5.839-2007.

**Ortiz, J.E., García, M.J., Rodríguez, J.L., 2003.** Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 351: 41-45.

**Osuji, L.C., Onojake, C.M., 2004.** Trace heavy metal associated with crude oil: a case study of Ebocha-8 oil-spill-polluted site in Niger Delta, Nigeria. *Chemistry and Biodiversity*, 11: 1708-1715.

**Palmroth, M.R.T., Koskinene, P.E.P., Kaksonen, A.H., Munster, U., Pichtel, J., Puhakka, J.A., 2007.** Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. *Biodegradation*, 18: 769-782.

**Palmroth, M.R.T., Pichtel, J., Puhkka, J., 2002.** Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. *Bioresource Technology*, 84: 221-228.

**Panchenko, L., Turkovskaya, O., Volkov, M., Muratova, A., Dubrovskaya, Y., Pleshakova, Y., Pozdnyakova, N., 2002.** Large-scale *in situ* bioremediation of oil-sludge. In: Proceeding of 3<sup>rd</sup> international conference on oil pollution: prevention, characterization, clean technology (Eds.: Hupka), Gdańsk-Wrzeszcz, Poland, Gdansk, University of Technology, 1: 9-16.

**Pardo Castro, J.L., Perdomo Rojas, M.C., López de Mesa, J., 2006.** Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo- a nivel laboratorio. *Nova- Publicación científica*, issn: 1794-2370, vol.2, N°2: 1-108.

**Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T., 1999.** Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 1-6.

**Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T., Moreno, J.L., Ros, M., 2000.** Soil microbial activity as a biomarkers of degradation and remediation processes. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1887-1883.

**Perry, J.J., 1979.** Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiology Review*. 43:59-72.

**Peters, R.W., 1999.** Chelate extraction of heavy metals from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 66:151-210.

**Phillips, L., Greer, G., Farrell, R., Germida, J., 2009.** Field scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatment. *Applied Soil Ecology*, 42(1): 9-17.

**Phillips, L., Greer, G., Germida, J., 2006.** Culture based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatment on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2823-2833.

**Philp, J.C., Atlas, R.M., 2005.** Bioremediation of contaminated soils and aquifers. In: Atlas RM, Philp J (eds) *Bioremediation*, ASM press, Washington DC.

**Pinto Mariano, A., Galdes Kataoka, A.P., De Franceschi de Angelis, D., Marcos Bonotto, D., 2007.** Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 346-353.

**Powlson, D.S., Brookes, P.C., Christensen, B.T., 1987.** Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic-matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 159- 164.

- Prinik, M.P., Atlas, R.M., Bartha, R., 1997.** Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes* normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology*, 119: 868-878.
- Puglisi, E., Cappa, F., Fragoulis, G., Trevisan, M., Del Re, A.A.M., 2007.** Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soil. *Chemosphere*, 67: 548-556.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S., Piglia, A.M., 2008.** Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 251-259.
- Quevedo Dioses, M., 2005.** Procesos de degradación y contaminación de suelos en zonas semiáridas. Incidencia sobre su actividad microbiana. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Rastin, N., Rosenplatter, K., Hüttermann, A., 1998.** Seasonal variation of enzyme activity and their dependence on certain soil factors in a beech forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 20:637-642.
- Raymond, R.L., Hudson, J.O., Jamison, V.M., 1980.** American Institute of Chemical Engineers Symposium, 75: 340-356.
- Reed, B.E., Carriere, P.C., Moore, R., 1996.** Flushing of a Pb(II) contaminated soil using HCl, EDTA and CaCl<sub>2</sub>. *Journal of Environmental Engineering*, 122 (1):48-50.
- Reid, B.J., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000.** Bioavailability of persistent organic pollutants in soil and sediments –a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollutant*, 108: 103-112.
- Rhykerd, R.L., Crews, B., McInnes, K.J., Weaver, R.W., 1999.** Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil contaminated soil. *BioresourceTechnology*, 67: 279-285.
- Rhykerd, R.L., Weaver, R.W., McInnes, K.J., 1995.** Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. *Environmental Pollution*, 90: 127-130-
- Riddech, N., Klammer, S., Insam, H., 2002.** Characterisation of microbial communities during composting of organic wastes. *Microbiology of Composting*, 43-51.
- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Palumbo, S., Saviozzi, A., 2005.** Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 170:3-15.
- Rivelli, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Cordini, S., Bestetti, G., 2013.** Persistence and degrading activity of free and immobilized allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Biodegradation*, 24: 1-11.

**Robinson, S.L., Novak, J.T., Widdowson, M.A., Crosswell, S.B., Fetterolf, G.J., 2003.** Field and laboratory evaluation of the impact of tall fescue on polyaromatic hydrocarbon degradation in an aged creosote-contaminated surface soil. *Journal of Environmental Engineering*, 129:232-240.

**Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Fratepietro, F., Swannell, R.P.J., Daniel, F., Head, I.M., 2004.** Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on an mudflat beach contaminated with buried oil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2603-2613.

**Rontani, J.F., Bosser-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C., Giusti, G., Faure, R., 1985.** Analytical study of Asthart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere* 14:1413-1422.

**Ros, M., 2000.** Recuperación de suelos agrícolas abandonados mediante el reciclaje en los mismos de residuos orgánicos de origen urbano. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

**Ros, M., Goberna, M., Pascual, J.A., Klammer, S., Insam, H., 2008.** 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *Journal of Microbiological Methods*, 72: 221-226.

**Ros, M., Hernández, M.T., García, C., 2003.** Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 463-469.

**Ros, M., Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T., Insam, H., 2006.** Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 3443-3452.

**Ros, M., Pascual, J.A., Moreno, J.L., Hernández, M.T., García, C., 2009.** Evaluation of microbial community activity, abundance and structure in a semiarid soil under cadmium pollution at laboratory level. *Water Air and Soil Pollution*, 203: 229-242.

**Ros, M., Rodríguez, I., García, C., Hernández, T., 2010.** Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology*. 101: 6916-6923.

**Roy, S., Labelle, S., Mehta, P., Mihoc, A., Fortin, N., Masson, C., Leblanc, R., Châteauneuf, G., Sura, C., Gallipeau, C., Olsen, C., Delisle, S., Labrecque, M., Greer, C.W., 2005.** Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. *Plant Soil*, 272: 277-290.

**Sabaté, J., Viñas, M., Solanas, A.M., 2004.** Laboratory-scale bioremediation experiment on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 19-25.

- Saison, C., Degrange, V., Oliver, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., Le Roux, X. 2006.** Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology*, 8: 247-257.
- Sang-Hwan, L., Seokho, L., Dae Yaeon, K., Jeong-gyu, K., 2007.** Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient condition. *Journal of Hazardous materials*, 143: 65-72.
- Saterbak, A., Toy, R.J., Wong, D.C.L., McMain, B.J., Williams, M.P., Dornm P.B., Brzuzy, L.P., Chain, E.Y., Salanitro, J.P., 1999.** Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ.Toxicol. Chem.* 18: 1591-1607.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Riffaldi, R., 1993.** Mineralization parameters from organic materials added to soil as a function of their chemical composition. *Bioresource Technology*, 45: 131-135.
- Schaefer, M., Juliane, F., 2007.** The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. *Applied soil ecology* 36: 53-62.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C., 2003.** Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture Ecosystem and Environment*, 98: 255-262.
- Schoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H., 1995.** Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Science Technology*, 29: 318-323.
- Shahsavari, E., Adetutu, E., Anderson, P., Ball, A., 2013.** Plant residues- A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 443: 766-744-
- Shailubhai, K., 1986.** Treatment of petroleum industry oil sludge in soil. *Trends in biotechnology*, 4(8): 202-206.
- Shaw, L.J., Burns R.G., 2005.** Rhizodeposits of *Trifolium pretense* and *Lolium perenne*: their comparative effects on 2,4-D mineralization in two contrasting soil. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 995-1002.
- Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R.F., Konopka, A.E., 2002.** Association of microbial community composition and activity with lead, chromium and hydrocarbon contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3859- 3866.
- Shi, W., Bischoff, M., Turco, R.F., Konopka, A.E., 2005.** Microbial catabolic diversity in soils contaminated with hydrocarbons and heavy metals. *Environmental Science and Technology*, 39: 1974-1979.
- Siddiqui, S., Adams, W.A., 2002.** The fate of diesel hydrocarbons in soil and their effect on the germination of perennial ryegrass. *Environmental Toxicology*, 17: 49:62.

- Skipper, H.D., Turco, R.F., 1995.** Bioremediation: science and application. Soil Science Society of America, Madison, W.I. Special Publication, 43.
- Smalla, K., Sessitch, A., Hartmann, A., 2006.** The Rhizosphere: 'Soil compartment influenced by the root'. Microbiology Ecology, 56: 165.
- Smalla, K., Wachterndorf, U., Heuer, H., Liu, W.T., Forney, L., 1998.** Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by bacterial communities. Applied and Environmental Microbiology, 64: 1220-1225.
- Spair, T.W., Ross, D.J. 1978.** Soil phosphate and sulphate. En Burns, R.G. (Ed.). Soil enzymes. Academic Press, London, pp. 198-235.
- Speir, T.W., Ross, D.J., 1978.** Soil phosphatase and sulphatase. In: Soil Enzymes, Burns RG (Eds.) pp 197-250. Academic Press: New York.
- Stevenson, F.J., 1982.** Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions. Wiley Interscience Publications. John Wiley and Sons, New York.
- Stroud, J.L., Paton, G.I., Semple, K.T., 2007.** Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. Journal of Applied Microbiology, 102: 1239-1253.
- Stubner, S., 2004.** Quantification of Gram-negative sulphate-reducing bacteria in rice field soil by 16S rRNA gene-targeted real time PCR. Journal of Microbiological methods, 57: 219-230.
- Suni, S., Koskinen, K., Kauppi, S., Hannula, E., Rynänen, T., Aalto A., Jänheimo, J., Ikävalko J., Romantschuk, M., 2007.** Removal by sorption and *in situ* biodegradation of oil spills limits damage to marine biota: a laboratory simulation. Jstor. Ambio, vol. 36, N° 2/3, pp.173-179.
- Suthersan, S.S., 1997.** Remediation Engineering: Design Concepts. Lewis Publishers. Boca Raton, FL.
- Swindoll, C.M., Hartten, A.S., Wood, K.N., Lee, M.D., Bishop, A.L., Lawrence, W.J., Davis, K.L., Conner, J.M., 1998.** Natural remediation of organic and metal constituents at a chemical manufacturing facility. In Situ and On site Bioremediation, 4(2): 137-142.
- Syldat, C., Wagner, F., 1987.** Production of Biosurfactants. En: Biosurfactants and Biotechnology. N.Kosaric (ed). Marcel Dekker, Inc. New York. Pp.89-120.
- Tabatabai, M.A. 1982.** Soil enzymes. En: Page, A.L. (Ed.). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2<sup>nd</sup> edition. Soil Science Society of America, Inc, Madison, Wisconsin, USA. Pp. 775-833.

**Tabatabai, M.A., 1994.** Soil Enzymes. En: Methods of Soils Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical properties. En: Weaver, R.W., Angles, J.S. and Bottomley, P.S. (eds). Soil Science Society of America, Madison, pp. 775-833.

**Tate, P.T., Shin W.S., Jackson, W.A., Pardue, J.H., 2000.** Bioremediation of an experimental oil spill in a salt marsh. International Wetlands and Remediation Conference, 33-40.

**Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G., 2002.** Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biology and Biochemistry, 34: 387-401.

**Tejada, M., Hernández, M.T., García, C., 2006.** Application of two organic amendments on soil restoration: Effects on the soil biological properties. Journal of Environmental Quality, 35: 1010-1017.

**Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R., 2012.** Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to poly-aromatic hydrocarbons and heavy metals. Journal of Environmental Management, 99: 10-17.

**Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R., 2012.** Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. Biodegradation, 23: 823-835.

**Thomas J.C., Davies, E.C., Malick, F.K., Endreszl, C., Williams, C.R., Abbas, M., Petrella, S., Swisher, K., Perron, M., Edwards, R., Ostenkowski, P., Urbanczyk, N., Wiesend, W.N., Murray, K.S., 2003.** Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soil. Biotechnology Progress, 19: 273-280.

**Thomas, J.M., and Ward, C.H., 1989.** In Situ Bioremediation of Organic Contaminants in the Subsurface," Environ. Sci. Technol., 23: 760-766.

**Torstensson, L., 1997.** Microbial assays in soil. In: Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (Eds.), Soil Ecotoxicity, CRC Lewis Publishers, London, pp. 207-233.

**Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., 1990.** High diversity of DNA of soil bacteria. Applied Environmental Microbiology, 56: 782-787.

**Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F., Seoane, S., 1998.** Towards a biochemical quality index for soil: an expresión relating several biological and biochemical properties. Biology and Fertility of Soil, 26: 100-106.

**Trevors, J.T., Mayfield, C.I., Inniss, W.E., 1982.** Measurement of electron transport systems (ETS) activity in soil. Microbial Ecology, 8: 163-168.

- Tyagi, M., da Fonseca M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R., 2011.** Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22: 231-241.
- Tyson, G.W., Banfield, J.F., 2005.** Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends Microbiology*, 13: 411-415.
- Uribe-Hernández, R., Juárez-Méndez, C.H., Montes de Oca, M.A., Palacios-Vargas, J.G., Cutz-Pool, L., Mejía-Recarmier, B.E., 2010.** Collembola (Hexapoda) as quality bioindicators of the hydrocarburans polluted soils in Southeastern Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81: 153-162.
- USEPA, 1991.** Understanding Bioremediation: A Guidebook for Citizens," EPA/540/2-91/002, Office of Research and Development, Washington, D.C.
- Vainio, E.J., Hantula, J., 2000.** Direct analysis of Wood-inhabiting funge using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res*, 104: 927-936.
- Van Beilen, J.B., Smith, T.H., Roos, F.F., Brunner, T., Balada, S.B., Rothlisberger, M., Witholt, B., 2005.** Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *Journal Bacteriology*, 187: 85-91.
- Van Benschoten, J.E., Matsumoto, R.R., Young, W.H., 1997.** Evaluation and analysis of soil washing for seven lead-contaminated soil. *Journal of Environment Engineering (ASCE)*, 123 (3):217-224.
- Van der Lelie, D., Schwitzguebel, J., Glass, D., Vangronsveld, J., Baker, A., 2001.** Assesing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environmental Science Biochemistry*, 35: 446-52.
- Van der Waarde, J.J., Dijkhuis, E.D., Henssen, M.J.C., Keuning, S., 1995.** Enzyme assays as indicators for bioremediation. In: Hinchee, R.E., Douglas, G.S., Ong, S.K., (Eds.), *Monitoring and Verification of Bioremediation*. Battelle Press, pp. 59-63.
- Van Veen, J.A., J.A.W. Morgan, J.A.W., Whipps, J.M., 2007.** Methodological approaches to the study of Carbon flow and the associated microbial population dynamics in the rhizosphere. In: "The Rhizosphere", Eds R.Pinton, Z. Varanini and P.Nannipieri. Publ by CRC Press, Boca Raton, pp. 371-399
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987.** An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 703-707.
- Vecchiloi, G.I., Constanza, O.R., Morelli, I.S., Del Panno, M.T., Paineira, M.T., Benavidez, M.H., 2000.** Bio-remediación como alternativa a la incineración de residuos con hidrocarburos aromáticos polinucleares. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental.



- Vecchioli, G.I., 1998.** Degradación de mezclas complejas de hidrocarburos en suelo. Ph.D.Thesis. Universidad Nacional de la Planta. La Planta. Argentina.
- Venosa, A.D., Stephen, J.R., Macnaughton, S.J., Chang, Y., With, D.C., 2000.** Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. In *Microbial Biosystems: New Frontiers* ed. Bell, C.R., Brylinsky, M. and Johnson-Green, P., pp. 767-773.
- Vidal, J., Perez-Sirvent, C., Martinez-Sanchez, M.J., 2004.** Origin and behaviour of heavy metals in agricultural Cacic Fluvisols in semiarid conditions. *Geoderma*, 121: 257-270.
- Vidali, M. 2001.** Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 1163-1172.
- Viñas Canals, M., 2005.** Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona.
- Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H., 1998.** Microbiological aspects of surfactants use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8: 401-417.
- Walker, B., Sayer, J., Andrew, N.L., Campbell, B., 2010.** Should enhanced resilience be an objective of natural resource management research for developing countries. *Crop Science*, 50: 510-519.
- Walker, B., Salt, D., 2006.** Resilience thinking: sustaining ecosystems and people in a changing world. Island Press, Washington.
- Walker, B.H., Holling, C.S., Carpenter, S.C., Kinzig, A.P., 2004.** Resilience adaptability and transformability. *Ecology and Society*, 9: 5.
- Walker, J.D., Colwell, R.R., 1975.** Some effects of petroleum on stuarine and marine microorganism. *Canadian Journal Microbiology* 21:305-313.
- Ward, D.M., Brock, T.D., 1978.** Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environment. *Applied Environmental Microbiology*, 35:353-359.
- Ward, J.H., Jr., 1963.** Hierarchical groupint to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58: 236-244.
- Warner, M.L., Sauer, E.H., Carlile, D.W., 1983.** Barley growth in coal liquid and diesel liquid fuels from coal and oil: a comparison of potential toxic effects on barley. *Water, Air and Soil Pollution*, 22: 47-55.
- Weber, J., Karczewska, A., Drozd, J., Licznar, M., Licznar, S., Jamroz, E., Kocowicz, A., 2007.** *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 1294-1302.

- Weber, K. P. and Legge, R. L., 2009.** One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. *Journal of Microbiological Methods*, 79 (1): 55-61
- Webster, J., Hampton, G., Leach, F., 1984.** ATP in soil: a new extractant and extraction procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 335-342.
- Webster, J.J., Hampton, G.J., Leach, F.R., 1984.** ATP in soil: a new extractant and extraction procedure. *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 335-342.
- Wellman, D.E., Ulery, A.L., Barcellona, M.P., Duerr-Auster, S., 2001.** Animal waste-enhanced degradation of hydrocarbon-contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination Journal*, 10: 511-523.
- White, P.M., Wolf, D.C., Thomas, G.J., Reynolds, C.M., 2006.** Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon in a crude oil-contaminated soil. *Water Air Soil Pollution*, 169: 207-220.
- Whyte, L.G., Greer, C.W., 2005.** Molecular techniques for monitoring and assessing soil bioremediation. In: Margesin, R., Schinner, F. (Eds.), *Manual for Soil Analysis-Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*, Soil Biology, vol. 5. Springer-Verlag, Berlin, pp. 201-231.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993.** Bioremediation of soil contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Environmental pollution* 81:229-249.
- Wu, G., Kechavarszi, C., Sui, H., Pollard, S., Coulon, F., 2013.** Influence of mature compost amendment on total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*, 90: 2240-2246.
- Wu, G., Kechavarzi, C., Li, X., Sui, H., Pollard, S.J.T., Coulon, F., 2012.** Influence of mature compost amendment on total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. *Chemosphere*, 90: 2240-2246.
- Wu, Y., Luo, Y., Ni, J., Liu, W., Teng, Y., Li, Z., 2008.** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilina sp.*: degradation and microbial community analysis. *Biodegradation*, 19: 247-257.
- Yateem, A., Al-Sharrah, T., Bin-Haji, A., 2007.** Investigation of microbes in the rhizosphere of selected grasses of rhizoremediation of hydrocarbon-contaminated soil. *Soil and Sediment Contamination*, 16: 269-280.
- Yeomans, J., Bremner, J.M., 1989.** A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19: 1467-1476.

**Yergeau, E., Newsham, K.K., Pearce, D.A., Kowalchuk, G.A., 2007.** Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology*, 9: 2670-2682.

**Youssef, N., Elshahed, M.S., McInerney, M.J., 2009.** Microbial processes in oil fields: Culprits, problems, and opportunities. *Advances in Applied Microbiology*, 66: 141-251.

**Yu, Z., Morrison, M., 2004.** Comparisons of different hypervariable regions of RRS genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4800-4806.

**Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., Bertoldi, M., 1985.** Phytotoxins during the stabilisation of organic matter, In: *Composting of Agricultural and other wastes*, Grassie J.K.R. (Ed.) Elsevier, London, UK, pp: 73-86.

**Zak, D.R., Tilman, D., Parmenter, R.R., Rice, C.W., Fisher, F.M., Vose, J., Milchunas, D., Martin, C.W., 1994.** Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology*, 75: 2333-2347.



## **9. ANEXO**



**TABLAS DE DATOS Y ESTADISTICA CORRESPONDIENTES A LAS FIGURAS DE LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTA MEMORIA DE TESIS DOCTORAL**

**Tabla A.1.-** Evolución del contenido de COT, y de las diferentes fracciones de C hidrosoluble en los diferentes tratamientos en estudio durante el experimento de incubación (Correspondiente a la Figura II.1).

	<b>COT (%)</b>			
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	0,83 aB	1,02 aC	0,94 aBC	0,69 aA
<b>S+B</b>	2,82 cBC	3,05 cC	2,91 bB	1,43 bA
<b>S+C</b>	1,37 bA	1,88 bBC	2,18 bC	1,72 bAB
<b>S+HC</b>	6,67 dA	9,38 dC	8,13 cB	6,55 cA
<b>S+HC+B</b>	10,04 eB	10,44 eB	9,59 dB	7,45 dA
<b>S+HC+C</b>	10,46 fC	10,69 eC	10,76 dB	7,86 dA
	<b>Carbohidratos (mg C-Glu kg<sup>-1</sup> suelo)</b>			
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	26,96 aD	23,06 aC	11,03 aA	14,29 aB
<b>S+B</b>	155,44 dD	72,37 bC	33,42 bA	41,23 cB
<b>S+C</b>	35,32 aD	26,36 aC	15,40 aA	19,00 bB
<b>S+HC</b>	66,69 bA	91,22 cC	88,57 cB	61,26 dA
<b>S+HC+B</b>	176,59 eC	155,57 eB	148,02 eB	112,56 fA
<b>S+HC+C</b>	78,62 cA	115,18 dC	97,36 dB	68,75 eA
	<b>C hidrosoluble (mg C kg<sup>-1</sup> suelo)</b>			
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	82,22 aC	65,60 aB	34,24 aA	78,28 aB
<b>S+B</b>	1181,35 eC	332,14 bB	177,91 bA	216,42 cA
<b>S+C</b>	163,89 bC	101,92 aA	95,17 abA	139,67 bB
<b>S+HC</b>	869,76 cA	1609,78 cC	1272,51 cB	1259,40 dB
<b>S+HC+B</b>	1933,35 fC	1977,37 fC	1454,18 dB	1335,03 eA
<b>S+HC+C</b>	987,13 dA	1878,74 dC	1374,15 dB	1313,00 eB
	<b>Polifenoles (mg kg<sup>-1</sup> suelo)</b>			
	Inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	4,122 aC	0,000 aA	0,186 aA	1,651 aB
<b>S+B</b>	159,005 cB	12,280 bA	10,807 bA	11,242 cA
<b>S+C</b>	9,090 aD	0,404 aA	3,886 aB	7,171 bC
<b>S+HC</b>	117,020 bD	79,478 cC	60,285 cB	45,161 dA
<b>S+HC+B</b>	217,624 dD	115,845 dC	80,575 dB	62,063 fA
<b>S+HC+C</b>	169,763 cC	83,494 cB	61,677 cA	55,303 eA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.2.-** Evolución del contenido de C de biomasa microbiana en los diferentes tratamientos en estudio durante el experimento de incubación (Correspondiente a la Figura II.2).

Carbono de la Biomasa ( $mg C_{mic} kg^{-1} suelo$ )						
	S	S+B	S+C	S+HC	S+HC+B	S+HC+C
<b>Inicio</b>	433,42 dD	395,31 cB	206,48 aC	358,58 bB	693,11 eB	377,31 cA
<b>2 meses</b>	0,00 aA	262,22 bA	145,11 aA	414,69 cC	641,88 dA	621,61 dBC
<b>4 meses</b>	42,18 aB	394,68 dB	169,88 bB	330,08 cA	753,49 fB	647,81 eC
<b>6 meses</b>	95,18 aC	383,00 cB	151,83 bAB	566,11 dD	724,84 fB	604,27 eB

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.3.-** Evolución de la actividad deshidrogenasa ( $\mu g$  INTF/g de suelo hora) y del contenido de ATP (ng/g suelo) en los diferentes tratamientos en estudio durante el experimento de incubación (Corresponde a la Figura II.3).

Deshidrogenasa ( $\mu g$ INTF $g^{-1} suelo h^{-1}$ )				
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	2,605 aB	2,102 aC	2,433 aA	2,143 aA
<b>S+B</b>	9,719 dD	6,916 bC	9,595 bB	6,270 cA
<b>S+C</b>	3,114 bB	2,389 aC	3,943 aA	3,353 bA
<b>S+HC</b>	2,310 aA	20,317 cD	15,874 cC	17,037 dB
<b>S+HC+B</b>	3,292 cB	22,862 eD	12,385 eC	12,707 dA
<b>S+HC+C</b>	3,992 bA	23,202 dC	16,993 dB	15,931 dA
ATP (ng ATP $g^{-1} suelo$ )				
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	200,78 bC	233,68 aA	44,49 aBC	35,83 aB
<b>S+B</b>	913,12 eB	696,02 bA	347,58 bB	110,20 cA
<b>S+C</b>	282,43 cB	318,34 aA	58,92 aB	62,83 bB
<b>S+HC</b>	174,90 aA	1838,22 cD	870,19 dB	245,43 fC
<b>S+HC+B</b>	486,26 cA	3174,17 cdC	1261,28 cB	263,94 dB
<b>S+HC+C</b>	301,91 dA	2321,26 dC	1065,12 eB	268,03 eB

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Tabla A.4.-** Evolución de la actividad fosfatasa,  $\beta$ -glucosidasa y ureasa en los diferentes tratamientos en estudio durante el experimento de incubación (Corresponde a la Figura II.4)

<b>Fosfatasa (<math>\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}</math>)</b>				
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	1,808 aB	1,909 aB	1,833 aB	1,436 aA
<b>S+B</b>	6,005 cdA	16,011 eC	15,649 cC	9,165 dB
<b>S+C</b>	2,975 bB	2,803 bAB	2,889 aAB	2,734 bA
<b>S+HC</b>	5,754 cA	8,076 cB	14,675 bC	7,038 cAB
<b>S+HC+B</b>	10,152 eA	12,32 dB	16,743 dC	10,226 eAB
<b>S+HC+C</b>	6,824 dA	8,335 cC	12,589 bD	7,475 cB
<b>B-Glucosidasa (<math>\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}</math>)</b>				
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	0,601 aB	0,597 aB	0,471 aA	0,487 aA
<b>S+B</b>	1,069 cC	1,368 eD	0,743 cB	0,579 bA
<b>S+C</b>	0,709 aB	0,697 bC	0,596 bB	0,510 aA
<b>S+HC</b>	0,622 aA	0,967 cC	0,722 cB	0,666 cAB
<b>S+HC+B</b>	2,266 dC	1,542 fB	0,807 dA	0,659 cA
<b>S+HC+C</b>	0,794 bB	1,224 dC	0,754 cdAB	0,692 cA
<b>Ureasa (<math>\mu\text{mol N-NH}_4 \text{g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}</math>)</b>				
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses
<b>S</b>	1,396 cA	1,956 cB	1,797 cB	1,261 dA
<b>S+B</b>	0,000 aA	0,552 aB	0,785 bB	0,573 aB
<b>S+C</b>	1,373 cA	1,961 cB	1,953 cB	1,450 eA
<b>S+HC</b>	0,092 bA	1,068 dD	0,282 aB	0,641 bC
<b>S+HC+B</b>	0,000 aA	0,370 aB	0,472 bBC	0,592 abC
<b>S+HC+C</b>	0,107 bA	1,371 bD	0,614 bB	0,912 cC

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.5.-** Distribución filogenética identificando los clones de la porción 16S del ARNr en los diferentes tratamientos al final del proceso de biorremediación. (Corresponde a la Figura II.11)

	<b>S</b>	<b>S+HC</b>	<b>S+HC+B</b>	<b>S+HC+C</b>
<b>Actinobacteria</b>	9 a	32 c	9 a	18 b
<b>Chloroflexi</b>	0 a	3 c	1 ab	2 ab
<b>Nitrospira</b>	1 b	0 a	0 a	0 a
<b>Acidobacteria</b>	4 b	0 a	0 a	0 a
<b>Proteobacteria</b>	11 c	3 a	6 b	6 b
<b>Firmicutes</b>	7 c	0 a	0 a	1 b
<b>Bacteroidetes</b>	1 b	1 b	0 a	0 a
<b>Gemmatimonadetes</b>	1 b	0 a	0 a	0 a
<b>No clasificadas</b>	0 a	0 a	0 a	1 b

Letras iguales indican valores que no son significativamente diferente de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.6.-** Evolución de los contenidos de fitano, pristano y alcanos n-C18 durante el proceso de landfarming en los diferentes tratamientos en estudio después de 4 y 8 meses de landfarming. (Corresponde a la Figura II.13)

	Pristano			
	C+LF	B+LF	LF	AN
<b>Inicio</b>	2342,6 aA	1871,3 aA	2014,6 aA	973 aA
<b>4 meses</b>	493 aB	485 aB	530 aB	1803 bA
<b>8 meses</b>	463 bB	459 bB	162,5 aC	1811 cA
	Fitano			
	C+LF	B+LF	LF	AN
<b>Inicio</b>	1448,34 aA	1493,12 aA	1748,92 aA	1504,29 aA
<b>4 meses</b>	603,4 aB	540,9 aB	542,2 bA	1412 bA
<b>8 meses</b>	430,7 aC	602,7 bB	604,2 bB	1384 cA
	n-C <sub>18</sub>			
	C+LF	B+LF	LF	AN
<b>Inicio</b>	694,5 cA	673,94 Ac	420,73 aB	561,2 bA
<b>4 meses</b>	235,9 aB	227,3 aB	223,74 aB	542,94 bA
<b>8 meses</b>	220,5 aC	219,2 aB	193,9 aB	553,3 bA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.7.-** Porcentaje de degradación de n-alcanos C<sub>10</sub>-C<sub>36</sub> con los diferentes tratamientos en estudio después de 4 y 8 meses de landfarming. (Corresponde a la Figura II.15).

	% degradación de n-alcanos C <sub>10</sub> -C <sub>36</sub>			
	C+LF	B+LF	LF	AN
<b>Inicio</b>	0 A	0 A	0 A	0 A
<b>4 meses</b>	32 bB	55 dB	41 cB	5 aB
<b>8 meses</b>	50 cC	54 dB	40 bB	5 aB

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.8.-** Porcentaje de degradación de los hidrocarburos totales con los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de landfarming después de 4 y 8 meses. (Corresponde a la Figura II.16)

	% degradación de hidrocarburos totales			
	C+LF	B+LF	LF	AN
<b>Inicio</b>	0 A	0 A	0 A	0 A
<b>4 meses</b>	26 cB	45 dB	22 bB	5 aB
<b>8 meses</b>	35 cC	46 dB	29 bC	5 aB

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.9.-** Evolución del contenido de carbono orgánico total y de las diferentes fracciones de carbono hidrosoluble en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de biorremediación en campo (Correspondiente a la Figura II.17)

<b>COT (%)</b>					
	inico	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	12,6 dD	10,6 eC	9,4 cB	9,7 cB	8,4 cA
<b>B+LF</b>	12,1 cC	10,8 cAB	9,1 cBC	8,9 cABC	8,1 cA
<b>LF</b>	10,4 c	10,4 dB	9,7 cB	9,7 cB	8,3 cA
<b>AN</b>	4,2 cB	4,2 bA	3,9 bA	5,0 bA	4,9 bA
<b>Control</b>	1,3 aC	1,0 aB	0,4 aA	1,8 aD	2,0 aE
<b>Carbohidratos (mg C-Glu kg<sup>-1</sup> suelo)</b>					
	inico	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	67,1 bC	38,0 bB	39,5 aB	25,2 aA	46,1 aB
<b>B+LF</b>	160,3 cB	128,1 cB	120,3 bB	49,1 cA	60,5 bA
<b>LF</b>	60,4 bC	38,4 bAB	40,1 aA	38,6 bA	44,3 aB
<b>AN</b>	20,1 aA	22,0 aA	30,2 aB	19,3 aA	40,7 aC
<b>Control</b>	20,2 aA	18,3 aA	20,0 aA	22,6 aA	42,2 aB
<b>C hidrosoluble (mg C kg<sup>-1</sup> suelo)</b>					
	inico	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	863,2 cE	601,8 cC	732,2cD	476,7 cB	421,0 cA
<b>B+LF</b>	1498,5 dC	1168,3 eB	1103,7 eB	574,2 dA	498,5 dA
<b>LF</b>	874,6 aD	793,2 bB	860,0 dD	523,3 cB	418,4 cA
<b>AN</b>	202,7 bC	386,5 bB	231,3 bA	117,1 bA	104,1 bA
<b>Control</b>	130,1 aB	181,0 aB	128,1 aA	203,7 aB	210,9 aC
<b>Polifenoles (mg kg<sup>-1</sup> suelo)</b>					
	inico	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	109,0 cC	65,4 dB	18,1 cA	16,3 bA	17,1 bA
<b>B+LF</b>	108,3 cD	110,2 eE	39,2 eC	29,6 dB	22,3 cA
<b>LF</b>	98,6 bD	58,1 cC	23,1 dB	22,2 cAB	17,3 bA
<b>AN</b>	0,7 aBC	1,4 bB	2,4 bC	0,8 aBC	0,0 aA
<b>Control</b>	1,0 aB	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.10.-** Evolución de los valores de carbono de biomasa microbiana ( $C_{mic}$ ) en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de biorremediación en campo (Correspondiente a la Figura II.18)

	Carbono de la Biomasa ( $mg C_{mic} kg^{-1} suelo$ )				
	C+LF	B+LF	LF	AN	Control
<b>Inicio</b>	874 dA	1007 eBC	609 cA	282 bA	183 aA
<b>2 meses</b>	566 dAB	756 eC	461 cAB	274 bA	157 aA
<b>4 meses</b>	491 dBC	536 eAB	464 cAB	275 bA	164 aA
<b>6 meses</b>	578 dC	602 eABC	555 cB	240 bA	149 aA
<b>8 meses</b>	544 eC	503 dA	430 cAB	230 bA	165 aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.11.-** Evolución de los contenidos de ATP y de actividad deshidrogenasa en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de biorremediación en campo (Correspondiente a la Figura II.19)

	Deshidrogenasa ( $\mu g INTF g^{-1} suelo h^{-1}$ )				
	inico	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	30,760 dC	11,636 cB	10,300 bAB	6,064 cA	8,225 bAB
<b>B+LF</b>	52,981 eC	10,472 cB	11,922 bB	6,004 cA	6,768 bA
<b>LF</b>	21,332 cD	17,996 dC	16,281 cB	8,806 dA	7,986 bA
<b>AN</b>	5,806 bB	6,036 bB	5,831 aB	4,098 bA	5,191 abA
<b>Control</b>	2,000 aA	1,840 aA	3,116 aB	1,681 aA	2,225 aA

	ATP ( $ng ATP g^{-1} suelo$ )				
	inico	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	2974,5 eC	2001,1 cB	1691,5 aA	1666,7 cA	1739,2 cA
<b>B+LF</b>	2565,5 dB	1820,7 cA	1541,9 aA	1864,4 dA	1541,0 cA
<b>LF</b>	2101,3 cC	2311,6 dD	1707,0 aAB	1843,1 dB	1587,1 cA
<b>AN</b>	787,6 bB	848,3 bB	676,0 aA	801,1 bB	948,0 bC
<b>Control</b>	270,0 aA	287,9 aA	210,0 aA	244,1 aA	142,7 aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.12.-** Evolución de las actividades enzimáticas en los diferentes tratamientos en estudio durante el proceso de biorremediación en campo (Correspondiente a la Figura II.22)

<b>Fosfatasa (<math>\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}</math>)</b>					
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	16,817 dA	11,342 bB	9,100 bB	9,345 dB	9,894 cdB
<b>B+LF</b>	19,147 fA	21,422 cA	13,081 cB	12,253 eB	11,168 dB
<b>LF</b>	14,418 cAB	14,813 bA	9,658 bAB	7,724 cB	8,980 cAB
<b>AN</b>	5,109 bB	3,834 aAB	2,620 aA	4,534 bB	5,341 bB
<b>Control</b>	1,600 aA	1,543 aA	1,400 aA	2,100 aB	2,090 aB
<b>B-Glucosidasa (<math>\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}</math>)</b>					
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	1,233 bB	0,713 cA	0,490 cA	0,607 dA	0,534 cA
<b>B+LF</b>	1,094 abC	0,940 dB	0,479 cA	0,562 cdA	0,458 bcA
<b>LF</b>	0,970 abD	0,745 cC	0,423 cA	0,529 cB	0,427 bAB
<b>AN</b>	0,305 abA	0,280 bA	0,221 bA	0,250 bA	0,300 bA
<b>Control</b>	0,130 aA	0,123 aA	0,077 aA	0,126 aA	0,148 aA
<b>Ureasa (<math>\mu\text{mol N-NH}_4 \text{g}^{-1} \text{suelo h}^{-1}</math>)</b>					
	inicio	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	2,636 cB	1,101 cA	1,311 cA	1,223 dA	1,106 eA
<b>B+LF</b>	0,348 abA	1,416 cdA	0,891 bB	0,746 cB	0,986 dB
<b>LF</b>	2,683 cD	1,676 dC	1,358 cB	1,049 dA	0,826 cA
<b>AN</b>	0,436 bAB	0,553 bB	0,385 aA	0,457 bAB	0,426 bAB
<b>Control</b>	0,140 aA	0,163 aB	0,130 aA	0,121 aA	0,120 aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A.13.-** Evolución de la abundancia de bacterias (a) y hongos (b) en los diferentes tratamientos durante el proceso de biorremediación en campo (Correspondiente a la Figura II.23)

<b>Bacterias</b>			
	Inicio	4 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	9,1 bC	8,5 bB	8,1 bA
<b>B+LF</b>	10 cB	9,5 cB	8,2 bA
<b>LF</b>	9,1 bB	8,5 bB	8,1 bA
<b>AN</b>	6,5 aA	7 aB	7,1 aB
<b>Hongos</b>			
	Inicio	4 meses	8 meses
<b>C+LF</b>	6,2 bB	5,9 bA	5,7 bA
<b>B+LF</b>	7,0 cB	6,2 cA	6,1 cA
<b>LF</b>	6,0 bB	6,1 bcA	5,5 bA
<b>AN</b>	5,1 aA	5,0 aA	5,1 aA

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a un tiempo dado y letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en el tiempo para un mismo tratamiento de acuerdo con el test Tukey ( $p < 0,05$ ).





