



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
Departamento de Química  
Maestría en Físicoquímica

**REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS  
CON FENANTRENO POR OXIDACIÓN QUÍMICA**

**NADIA MABEL VILLALBA VILLALBA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención  
del Grado de Máster en Físicoquímica con énfasis en Físicoquímica Ambiental

**SAN LORENZO – PARAGUAY**  
**JUNIO – 2013**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
Departamento de Química  
Maestría en Físicoquímica

**REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS  
CON FENANTRENO POR OXIDACIÓN QUÍMICA**

**NADIA MABEL VILLALBA VILLALBA**

Orientador: **Prof. Dra. VERÓNICA CECILIA MORA**  
Co – Orientador: **Prof. Dra. MARCELA VANESSA MARTIN**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención  
del Grado de Máster en Físicoquímica con énfasis en Físicoquímica Ambiental

**SAN LORENZO – PARAGUAY**  
**JUNIO – 2013**

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)  
DE LA BIBLIOTECA E INTERNET DE LA FACEN - UNA

Villalba Villalba, Nadia Mabel

Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química / Nadia Mabel Villalba Villalba.-- San Lorenzo: FACEN, 2013. i-xii, 94 h.; 30 cm.

Incluye bibliografías y anexos

Tesis (Máster en Fisicoquímica con énfasis en Fisicoquímica Ambiental). -- UNA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2013.

1. Suelos 2. Suelos – Degradación química 3. Permanganato de potasio 4. Peróxido de hidrógeno 5. Suelos contaminación 6. Oxidantes químicos 7. Tesis y disertaciones académicas. I. Título.

631.41/V711r

# **REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON FENANTRENO POR OXIDACIÓN QUÍMICA**

NADIA MABEL VILLALBA VILLALBA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Máster en Fisicoquímica con énfasis en Fisicoquímica Ambiental.

Fecha de aprobación: 27 de junio de 2013

## **MESA EXAMINADORA**

### **MIEMBROS:**

**Prof. Dra. Verónica Cecilia Mora**

*Universidad Nacional de La Plata, Argentina*

**Prof. Dr. Luis Alfredo Kieffer**

*Universidad Nacional del Litoral, Argentina*

**Prof. Dr. Javier Alcides Galeano Sánchez**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. MSc. Héctor Agustín Corrales Compagnucci**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

**Prof. MSc. Hugo Arnulfo Rojas Rojas**

*Universidad Nacional de Asunción, Paraguay*

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha 27 de agosto de 2013.

**Prof. Dr. Javier Alcides Galeano Sánchez**

Director de Postgrado, FACEN – UNA

*A mis padres:  
Eladia Villalba y Tranquilino Villalba,*

*a mis hermanos:  
Nora Villalba y Sergio Villalba,*

*y a mi novio:  
Rodolfo Acuña.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A las entidades que hicieron posible la realización de esta Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción por la logística e infraestructura y el espacio físico.

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por el apoyo económico para la realización de la Tesis.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI). Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por el espacio físico, el apoyo logístico e instrumental durante el desarrollo del trabajo de tesis.

Al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por el espacio físico e instrumental brindado para el desarrollo de los trabajos de investigación.

Al Programa de Movilidad de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo (AUGM) por la cobertura del traslado y la estadía en el extranjero.

A la Dra. Verónica Mora por haberme aceptado a trabajar en su grupo de investigación y dirigirme, también por la paciencia durante mi estadía y sobre todo su predisposición durante la redacción del trabajo de tesis y en todo momento.

A la Dra. Janina Rosso por abrirme las puertas de su grupo de investigación y haberme contactado con la Dra. Verónica Mora.

A la Dra. Marcela Martín por haberme aceptado bajo su codirección y sobre todo por la paciencia y predisposición durante la redacción de este documento y en todo momento.

A Marina por haberme ayudado con los experimentos durante mi estadía y aún después de ella.

A Dios por haberme dado la oportunidad de realizar este postgrado y haberme permitido viajar a conocer un nuevo mundo, el de la investigación y la ciencia, en la ciudad de La Plata – Argentina.

A mi familia; en especial a mis padres Eladia Villalba y Tranquilino Villalba por el apoyo incondicional de siempre; a mis hermanos Sergio Villalba y Nora Villalba por brindarme fuerzas y alegría en todo momento.

A mi fiel compañero, mi amado novio Rodolfo Acuña por el apoyo en todo momento y por la confianza y fe depositada en mí.

A la Dra. Norma B. Caballero por todo el apoyo brindado, el incentivo y sobre todo por enseñarnos a pensar y a luchar por nuestros ideales, por habernos demostrado que todo lo que se desea hacer se puede lograr y que sólo depende de nosotros mismos.

Al MSc. Danilo Fernández por toda la predisposición y ayuda incondicional en todo momento antes, durante y en la etapa final de este postgrado; sin la ayuda de quien no hubiese sido posible el desarrollo y la culminación exitosa de este trabajo gracias a todos los conocimientos brindados, el entrenamiento y sobre todo a la ayuda personalizada en cuanto a consultas y artículos científicos que nos ha facilitado.

A mis amigos/as y compañeros/as que me acompañaron durante esta etapa académica.

A mis amigos/amigas argentinos/as que hicieron de mi estadía en la ciudad de La Plata una experiencia científica y personal única e inolvidable.

A todos los que hicieron posible que hoy esté escribiendo esto.

*Muchas Gracias*

# REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON FENANTRENO POR OXIDACIÓN QUÍMICA

Autor: NADIA MABEL VILLALBA VILLALBA

Orientador: Prof. Dra. VERÓNICA CECILIA MORA

Co – Orientador: Prof. Dra. MARCELA VANESSA MARTÍN

## RESUMEN

La contaminación del suelo se encuentra en constante incremento debido al crecimiento de la población a nivel mundial, el cual propicia la producción y la liberación de compuestos de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en el ambiente. Se probaron varios oxidantes químicos en la búsqueda de métodos químicos alternativos que degraden eficientemente al fenantreno contenido en un suelo contaminado de dos años, en el cual la presencia de los oxidantes químicos promuevan la degradación del mismo sin afectar a la comunidad ni a la población microbiana nativa del suelo. Se hicieron seis tratamientos: persulfato de amonio (PSN), agregados sucesivos de persulfato de amonio (PSN Suc), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peróxido de hidrógeno catalizado con hierro complejado con etilendiamintetraacético (EDTA) ( $H_2O_2/Fe:EDTA$ ), persulfato de amonio catalizado con hierro complejado con EDTA (PSN/ $Fe:EDTA$ ) y permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ) contrastando con un control biológico. Los ensayos tuvieron un tiempo de duración de 28 días con las muestras incubadas a  $24 \pm 2$  °C. Se monitorearon las propiedades fisicoquímicas: pH, concentración del oxidante y del fenantreno utilizando espectrofotómetro UV-vis y HPLC respectivamente; conductividad eléctrica y humedad; también parámetros microbiológicos: recuentos de bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH; además, ensayos de toxicidad con semillas de lechuga *Lactuca Sativa* y análisis moleculares con técnicas de PCR y DGGE empleando un kit de extracción de DNA. Luego de los tratamientos estos sistemas se dejaron en incubadora para evaluar la capacidad de recuperación del suelo a 56 días de iniciado el tratamiento. Los ensayos con PSN,  $KMnO_4$  y PSN/ $Fe:EDTA$  mostraron ser más efectivos. Los primeros siete días corresponden a la degradación química, al finalizar los ensayos se alcanzó un 90% de oxidación. Estos son métodos adecuados para la eliminación del fenantreno (contaminante modelo) que parecen no provocar efectos negativos significativos sobre la comunidad microbiana del suelo.

**Palabras claves:** PAH, Fenantreno, degradación química, persulfato de amonio, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, comunidad microbiana, toxicidad, análisis molecular.



## REMEDIATION OF PHENANTHRENE-CONTAMINATED SOIL BY CHEMICAL OXIDATION

Author: NADIA MABEL VILLALBA VILLALBA

Advisor: Prof. Dra. VERÓNICA CECILIA MORA

Co – Advisor: Prof. Dra. MARCELA VANESSA MARTÍN

### SUMMARY

Soil contamination, one of the main natural resources is increasing year by year due to the global population growth. This promotes the production and release of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compounds (PAH) in the environment. In this work were tested several chemical oxidation compounds to find sustainable methods that efficiently degrade the Phenanthrene present in a 2 years contaminated soil. Where chemical compounds promote the degradation without affect the autochthonous microbial populations and the microbial community structure of the soil. Six different treatments: ammonium persulfate (PSN), successive additions of ammonium persulfate (PSN Suc), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydrogen peroxide catalyzed by ferrous ions and ethylenediaminetetraacetic (EDTA) as chelating agent ( $H_2O_2/Fe:EDTA$ ), ammonium persulfate catalyzed by ferrous ions and (EDTA) as chelating agent (PSN/ $Fe:EDTA$ ) and potassium permanganate ( $KMnO_4$ ) were carried out compared against a biological control. The assays were performed during 28 days with the samples incubated at  $24 \pm 2$  °C. During the treatment physicochemical properties like pH, oxidant concentration using an UV-Vis spectrophotometer, concentration of the contaminant using an HPLC-UV equipment, electrical conductivity, humidity; microbiological properties like cultivable heterotrophic and degrading bacterial counts; toxicity assay with *Lactuca Sativa* lettuce seeds, genetic diversity analysis of the soil bacterial community were determined. When each treatment ended the samples were kept inside the incubator for 28 days more to complete 56 days from the beginning of the treatment to evaluate the capacity of the soil to recuperate. The essays with PSN,  $KMnO_4$  and PSN/ $Fe:EDTA$  showed greater degradation, more than 90% into 28 days where the seventh days correspond to chemical degradation. They are suitable methods to remove Phenanthrene (pollutant model). These treatments seem do not produce significant negative effects on the soil microbial community.

**Keywords:** PAH, Phenanthrene, chemical degradation, ammonium persulfate, potassium permanganate, hydrogen peroxide, microbial community, toxicity, and genetic diversity analysis.

# INDICE

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo General.....	5
1.3.2. Objetivos Específicos.....	5
1.4. Hipótesis.....	5
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1. Antecedentes.....	6
2.2. Suelos.....	7
2.2.1. Descripción y características.....	7
2.2.2. Suelos contaminados.....	9
2.3. Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs).....	10
2.3.1. Fenantreno.....	12
2.4. Remediación.....	14
2.4.1. Biorremediación.....	14
2.4.2. Remediación química.....	17
2.4.3. Toxicidad del tratamiento.....	19
2.5. Oxidación química.....	20
2.5.1. Métodos avanzados de oxidación química in situ.....	20
2.5.2. Oxidante químico.....	24
2.6. Microbiología del suelo.....	31
2.6.1. Comunidades microbianas del suelo.....	31
2.7. Análisis molecular.....	36
2.7.1. Extracción de DNA de los microorganismos del suelo.....	37
2.7.2. Amplificación del DNA (PCR).....	37
2.7.3. DGGE ( <i>fingerprinting</i> de la comunidad).....	39
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>42</b>
3.1. Materiales.....	42
3.2. Métodos.....	42
3.2.1. Suelo - Toma de muestra.....	42
3.2.2. Suelo - Preparación de microcosmos.....	43
3.2.3. Tratamientos con oxidantes químicos.....	43
3.2.4. Análisis fisicoquímico del suelo.....	46
3.2.5. Análisis microbiológico del suelo.....	49
3.2.6. Análisis molecular.....	50
3.2.7. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga.....	52
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>

<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>72</b>
5.1. Conclusiones.....	72
5.2. Recomendaciones.....	73
<b>ANEXOS</b>	<b>74</b>
A. Materiales	74
B. Reactivos	76
C. Figuras	78
D. Preparación de reactivos	85
E. Glosario	88
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

1. Estructura molecular del fenantreno. ....	12
2. Valores de pH del suelo vs días. ....	53
3. Valores de Conductividad Eléctrica vs días. ....	55
4. Curvas de concentración de fenantreno normalizadas. ....	56
5. Espectros de absorción de PSN. ....	58
6. Porcentaje de Inhibición vs Días. ....	62
7. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con PSN. ....	65
8. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con $\text{KMnO}_4$ . ....	66
9. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con PSN/Fe:EDTA. ....	67
10. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con $\text{H}_2\text{O}_2$ . ....	67
11. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con $\text{H}_2\text{O}_2$ /Fe:EDTA. ....	67
12. Análisis por DGGE. ....	70
13. Análisis por DGGE. ....	71
14. Control Biológico. ....	78
15. Tratamiento con PSN. ....	78
16. Tratamiento con PSN Suc. ....	78
17. Tratamiento con $\text{H}_2\text{O}_2$ . ....	78
18. Tratamiento con $\text{H}_2\text{O}_2$ /Fe:EDTA. ....	79
19. Tratamiento con PSN/Fe:EDTA. ....	79
20. Tratamiento con $\text{KMnO}_4$ . ....	79
21. pH – metro y Conductímetro. ....	79
22. Espectrofotómetro UV-visible. ....	80
23. Equipo HPLC-UV. ....	80
24. Extracción de los microorganismos del suelo. ....	80
25. Preparación de la dilución (-1). ....	80
26. Diluciones seriadas. ....	81
27. Siembra de microorganismos en medio de cultivo R2A. ....	81
28. Espátula de Drigalsky. ....	81
29. Unidades formadoras de colonias (UFC). ....	81
30. Diluciones de bacterias degradadoras de PAH. ....	82
31. Policubetas para bacterias degradadoras de PAH. ....	82
32. Bacterias degradadoras de PAH. ....	82
33. Termociclador. ....	82
34. Cama para preparar geles para electroforesis. ....	83
35. Cuba electroforética. ....	83
36. Equipo DGGE-2401. ....	83
37. Documentador de imágenes. ....	83
38. Semillas de Lechuga <i>Lactuca Sativa</i> . ....	84
39. Siembra de semillas de lechuga. ....	84
40. Germinación de las semillas de lechuga. ....	84

## LISTA DE TABLAS

1. Los dieciséis PAHs contaminantes prioritarios para la US EPA y algunas de sus propiedades fisicoquímicas. ....	11
2. Resumen de propiedades físicas y químicas de fenantreno.....	12
3. Fuerza de los oxidantes. ....	17
4. Consideraciones para los tratamientos in situ con ISCO .....	21
5. Dosis de oxidantes utilizados.....	43
6. Tabla de los valores de los Log UFC/gTS y de los Log NMP/gTS para los distintos tratamientos a los 0, 7 y 28 días. ....	60
7. Resumen de los valores iniciales y finales de algunos de los parámetros.....	64

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>CE</b>	Conductividad Eléctrica
<b>CINDEFI</b>	Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales
<b>CONACYT</b>	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
<b>DGGE</b>	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (de las siglas en inglés Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico (de las siglas en inglés Deoxyribonucleic acid)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamintetra acético
<b>Fe</b>	Hierro
<b>Fe(II)</b>	Hierro en estado de oxidación (+2)
<b>HOC</b>	Compuestos Orgánicos Hidrofóbicos (de las siglas en inglés Hydrophobic Organic Compounds)
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (de las siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA</b>	Peróxido de hidrógeno catalizado con hierro complejado con EDTA
<b>INIFTA</b>	Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas
<b>ISCO</b>	Oxidación Química In Situ (de las siglas en inglés In Situ Chemical Oxidation)
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	Permanganato de potasio
<b>NMP</b>	Número Más Probable
<b>PAH</b>	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (de las siglas en inglés Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (de las siglas en inglés Polymerase Chain Reaction)
<b>PSN</b>	Persulfato de amonio
<b>PSN/Fe:EDTA</b>	Persulfato de amonio catalizado con hierro complejado con EDTA
<b>PSN Suc</b>	Persulfato de amonio con agregados sucesivos
<b>R2A</b>	Medio de cultivo R2 rico en Agar
<b>TS</b>	Tierra Seca
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UNLP</b>	Universidad Nacional de La Plata
<b>US EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (de las siglas en inglés United States Environmental Protection Agency)

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS

<b>Atm</b>	Atmósfera
<b>Cm</b>	centímetro ( $10^{-2}$ metro)
<b>G</b>	Gramo
<b>Kg</b>	kilogramo ( $10^3$ gramo)
<b>kPa</b>	Kilo Pascal ( $10^3$ Pascal)
<b>L</b>	Litro
<b><math>\mu</math>L</b>	microlitro ( $10^{-6}$ Litro)
<b>M</b>	Concentración Molar
<b>Mg</b>	miligramo ( $10^{-3}$ gramo)
<b>Min</b>	Minuto
<b>mL</b>	mililitro ( $10^{-3}$ Litro)
<b>Mm</b>	milímetro ( $10^{-3}$ metro)
<b>mM</b>	Mili Molar ( $10^{-3}$ Molar)
<b>mmHg</b>	Milímetro de mercurio
<b>mS</b>	milisiemens ( $10^{-3}$ Siemens)
<b><math>m^3</math></b>	metro cúbico
<b><math>\mu</math>m</b>	micrómetro ( $10^{-6}$ metro)
<b>Nm</b>	nanómetro ( $10^{-9}$ metro)
<b>Ppm</b>	Partes Por Millón
<b>V</b>	Voltio o Volt

# 1. INTRODUCCIÓN

La descontaminación de suelos crónicamente contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAH) para la recuperación de los mismos es uno de los principales objetivos perseguidos por los profesionales dedicados a disminuir los impactos ambientales (Schippers et al., 2000; Rivas, 2006; Ferrarese et al., 2008).

Los PAH constituyen un grupo prioritario de contaminantes ambientales, los cuales son contaminantes frecuentes presentes en suelos y sedimentos; además son de preocupación ambiental debido a sus efectos tóxicos, mutagénicos y/o sus efectos carcinogénicos (Mallick et al., 2007).

Los suelos crónicamente contaminados tienen impactos negativos sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres afectando el desarrollo de los seres vivos, el fenantreno es tóxico para algunas especies marinas porque causa respuesta inhibitoria en las membranas celulares debido a su fuerte naturaleza hidrofóbica (Ortiz, 2003).

Es por esto que se han realizado numerosos estudios para tratar de encontrar tecnologías que sean útiles, eficientes, accesibles y sobre todo aplicables a sistemas reales para la remoción y la degradación de estos contaminantes que están siendo generados y/o acumulados en el ambiente debido a sus propiedades físicas y químicas las cuales lo hacen persistentes en el ambiente.

El fenantreno es de la familia de los PAH, compuesto por tres anillos bencénicos fusionados en un modelo angular, posee dos regiones principales llamadas “región Bahía” y “región K” y es frecuentemente utilizado como sustrato modelo para estudios sobre metabolismo carcinogénico de los PAHs (Mallick et al., 2007).



La “región Bahía” se forma entre los carbonos 4 y 5, mientras que la “región K” se forma entre los carbonos 9 y 10. La importancia de estas regiones estriba en el hecho de que el ataque microbiológico es específico en alguna de ellas dependiendo del microorganismo y la enzima producida (Sanchez et al., 2010).

La velocidad de la biodegradación en la superficie está en general limitada por la cantidad de oxígeno como suplemento y por los factores relacionados a la biodisponibilidad tales como la solubilidad, la velocidad de disolución y de sorción (Wang et al., 1998).

La eficiencia de la biorremediación in situ en muchos sistemas podría encontrarse limitada a causa de la baja biodisponibilidad del contaminante, lo cual podría deberse a la baja solubilidad en agua o a la enorme magnitud de sorción a la matriz (Wang et al., 1998).

A lo largo de la historia se han investigado numerosas técnicas que tenían como objetivo incrementar la biodisponibilidad del contaminante para que estos puedan servir de sustratos a los microorganismos (Shippers et al., 2000).

La sorción de contaminantes hidrofóbicos por el suelo y la superficie de los sólidos es una limitación significativa para remediación de sitios contaminados empleando ISCO (Oxidación Química In Situ de las siglas en inglés), investigaciones más recientes, en busca de superar estas limitaciones, han empezado a utilizar otros reactivos como el persulfato activado.

El persulfato fue utilizado por el potencial que tiene para mejorar el tratamiento de contaminantes adsorbidos, un fenómeno que previamente ha sido observado con las reacciones catalizadas de  $H_2O_2$  (reactivos Fenton) (Teel et al., 2009).

Los microorganismos que degradan los hidrocarburos por su contenido de carbono y energía existen naturalmente en los suelos; sin embargo, la mayoría de las bacterias pueden metabolizar sólo una pequeña gama de hidrocarburos.

Se han informado que en suelos no contaminados con hidrocarburos sólo del 0,1 al 1% de los microorganismos autóctonos tienen la capacidad de degradar los hidrocarburos y que éstos una vez que han sido expuestos al petróleo, el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos que principalmente son bacterias y hongos, aumentan a través del enriquecimiento selectivo, la mutación o la transferencia de plásmidos. Los microorganismos superficiales viven en la mezcla de suelos y la mayoría se encuentran ligados a las partículas del suelo (Moyer et al., 1996).

El suelo es un recurso natural difícilmente renovable esencial para la sociedad, ya que proporciona las materias primas para toda actividad. Lejos de ser una capa residual y estática, un mero soporte para las plantas, constituye un ecosistema complejo y dinámico donde tienen lugar numerosos procesos físicos, químicos y biológicos. De los cuales dependen la fertilidad y la estructura del suelo y, en última instancia, la productividad de los cultivos. En tanto, la conservación y remediación de este recurso se considera prioritaria.

### **1.1. Planteamiento del problema**

Los PAHs son contaminantes ubicuos y se acumulan a diario en el ambiente, especialmente en el suelo debido a las actividades humanas, principalmente a través de la combustión de madera, petróleo, carbón, etc.

La biorremediación logra la recuperación del recurso suelo, pero requiere mayores tiempos que otras tecnologías y en el caso de suelos crónicamente contaminados está limitada por la baja disponibilidad de los PAH.

### **1.2. Justificación**

La contaminación es un problema mundial a gran escala por esta razón encontrar métodos eficientes y sustentables para la descontaminación de aguas residuales y de suelos se ha convertido en un importante desafío no solo tecnológico

sino también social, por su efecto sobre los seres vivos y sobre la calidad de vida de los seres humanos.

La eficiencia de la biorremediación in situ de muchos sistemas podría encontrarse limitada por la baja biodisponibilidad del contaminante debido a la baja solubilidad del mismo en agua o al alto grado en el que se encuentran absorbidos por la matriz.

La aplicación de oxidantes químicos a suelos contaminados con PAH se considera una estrategia efectiva para superar las limitaciones de la biorremediación, debido a la alta eficiencia en la eliminación del contaminante en un tiempo relativamente corto. Además permiten su combinación con tratamientos de biorremediación para lograr una completa recuperación del suelo (De Souza e Silva et al., 2009).

Es por esto que estudiar distintos métodos de oxidación química (persulfato, peróxido de hidrógeno, permanganato, etc.) sobre los suelos contaminados con PAH permitirá aplicar los oxidantes químicos como complemento de la biorremediación en la degradación de los contaminantes.

Se ha empleado al fenantreno como compuesto modelo para el estudio de la biodegradación de los PAH dado que: i) se encuentra en altas concentraciones en muestras ambientales contaminadas con este tipo de compuestos; ii) porque muchos de ellos contienen una característica estructural similar a la del fenantreno y que en ellas es carcinogénica; iii) además el fenantreno es uno de los PAH más pequeños y posee dos regiones: una región “bahía” y una región “K” en su molécula (Bezalel et al., 1996). La importancia de estas regiones estriba en el hecho de que el ataque microbiológico es específico en alguna de ellas dependiendo del microorganismo y la enzima producida (Sanchez et al., 2010).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Disminuir la cantidad de fenantreno en suelo contaminado de dos años utilizando métodos de oxidación química.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- a) Comparar la eficiencia de degradación del contaminante utilizando diferentes oxidantes químicos.
- b) Evaluar el impacto de los tratamientos sobre las comunidades microbianas y la toxicología del suelo.

### **1.4. Hipótesis**

La aplicación de un oxidante químico a un suelo contaminado de dos años de atenuación natural resulta en la degradación completa del fenantreno por oxidación química y no afecta a la población microbiana presente en el suelo.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Antecedentes**

La velocidad de descomposición de compuestos orgánicos de los suelos por los microorganismos es una función de tres variables: 1- la biodisponibilidad del compuesto químico para los microorganismos que los pueden degradar; 2- la cantidad de los mismos y 3- el nivel de actividad (Vecchioli et al., 1990).

Además, el contenido de materia orgánica y arcilla, el nivel de humedad, la temperatura, el pH, la aireación y el estado de nutrientes, son importantes como factores conductores y moderadores (Vecchioli et al., 1990).

Una forma de mejorar la biodegradación de compuestos orgánicos es inocular el suelo con microorganismos que son conocidos por metabolizar los compuestos químicos rápidamente (Goldstein et al., 1985).

Pero se han informado sobre éxitos y fracasos cuando las especies capaces de degradar un compuesto en medios de cultivos son agregados a muestras de ambientes naturales (Goldstein et al., 1985).

También se han investigado diferentes formas de biodisponibilizar el contaminante, por ejemplo: Wang et al. (1998), propusieron agregar agentes surfactantes a suelos contaminados con fenantreno para aumentar la solubilidad de este contaminante en la fase acuosa logrando así una eficiente biodegradación de fenantreno en comparación con el tratamiento sin agentes surfactantes.

Así mismo, se han realizado estudios para evaluar la posibilidad de desarrollar el crecimiento de bacterias a escala de laboratorio capaces de degradar hidrocarburos en suelos para mejorar la biodegradación utilizando las bacterias autóctonas del suelo (Vecchioli et al., 1990).

La biodegradación de PAHs de bajo peso molecular por bacterias ha sido informada por varios autores pero en el caso de PAHs de elevado peso molecular se ha demostrado que son más recalcitrantes para la degradación biológica. Se han utilizado solventes de baja toxicidad para solubilizar los PAHs y mejorar el contacto con las bacterias, pero una completa remediación de suelos crónicamente contaminados es aún difícil de lograr utilizando sólo procesos de biorremediación (Ferrarese et al., 2008).

Los suelos crónicamente contaminados actualmente son descontaminados por desorción térmica luego de una excavación a un costo muy elevado. La biorremediación podría ser aplicada para niveles bajos de contaminación pero requiere de largos periodos de tratamientos para lograr una degradación total del contaminante; en cambio los procesos avanzados de oxidación química in situ (ISCO, por sus siglas en inglés), los cuales degradan los contaminantes por reacciones químicas, se han estudiado como una alternativa para la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes en el suelo; esto incluye reacciones Fenton, Ozono, persulfato de potasio y permanganato de sodio o de potasio (Rivas, 2006).

La oxidación química puede ser aplicada en combinación con la biorremediación. Varios autores han encontrado que la oxidación puede mejorar la biodegradabilidad de los PAHs, de ahí que la aplicación de los procesos de pre oxidación química ha superado la biodegradación de estos (Ferrarese et al., 2008).

## **2.2. Suelos**

### **2.2.1. Descripción y características**

En su significado tradicional, el suelo es el medio natural para el desarrollo de las plantas terrestres, ya sea que tenga o no horizontes discernibles.

El suelo cubre a la superficie terrestre como un continuo, excepto en áreas con afloramientos rocosos, de congelamiento perpetuo, en aguas profundas, o sobre los hielos de los glaciares estériles. En ese sentido, el suelo tiene un espesor que está determinado por la profundidad de enraizamiento de las plantas.

El suelo, es un cuerpo natural que comprende a sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases que se encuentran en la superficie de las tierras, que ocupa un espacio y se caracteriza por uno o ambos de los horizontes o capas que se distinguen del material inicial como resultado de adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia o por la habilidad de soportar plantas en un ambiente natural.

Esta definición es una ampliación de la versión de la Taxonomía de Suelos publicada en el año 1975, para incluir a los suelos de las áreas de la Antártica donde la pedogénesis ocurre pero el clima es demasiado severo para permitir el desarrollo de plantas superiores. (USDA, 2010).

Los suelos reconocidos de la provincia de Buenos Aires corresponden a cinco órdenes del sistema de clasificación “Taxonomía de Suelos” y son los siguientes: Molisoles, Alfisoles, Entisoles, Aridisoles y Vertisoles.

A continuación se realiza la descripción general de los molisoles los cuales fueron empleados para el presente estudio, destacando sus características principales, su distribución y relación con el paisaje.

**Molisoles:** son básicamente suelos negros o pardos que se han desarrollado a partir de sedimentos minerales en climas templado húmedo a semiárido, aunque también se presentan en regímenes fríos y cálidos con una cobertura vegetal integrada fundamentalmente por gramíneas.

La incorporación sistemática de los residuos vegetales y su mezcla con la parte mineral ha generado en el transcurso del tiempo un proceso de oscurecimiento del suelo por la incorporación de materia orgánica, que se refleja más profundamente en la parte superficial, la que se denomina epipedón mólico. Este orden es el que abarca la mayor superficie dentro de la provincia y se encuentra asociado con una gran diversidad de paisajes (CITAB – Suelos).

### **2.2.2. Suelos contaminados**

Las áreas contaminadas generan problemas para la gestión urbana porque devalúan los sitios ubicados a sus alrededores y tienen un efecto negativo sobre la

imagen de la ciudad a los ojos de los inversionistas y la opinión pública, favoreciendo de esta forma a los depósitos clandestinos de residuos y a la ocupación irregular de la tierra.

Varias áreas han sido contaminadas por la actividad industrial debido a la mala gestión de los desechos, a la incorrecta manipulación de las sustancias químicas, materia prima, subproductos o producto final, causantes de accidentes; y el derrame de materiales contaminantes e incluso una inadecuada legislación (Houk, 1992; Dua et al., 2002).

Los efluentes del petróleo contienen fracciones de hidrocarburos volátiles, algunos de los cuales son tóxicos para la salud humana como el benceno, tolueno y el xileno; y además otros compuestos aromáticos. Es por esto que la adopción de acciones correctivas para la descontaminación de estas áreas es necesaria (Rinaldi y Da Silva, 2011).

Un área es considerada contaminada solamente cuando las concentraciones de los elementos o sustancias en el ambiente de interés representan un riesgo para la salud pública demandando de esta forma una intervención. Para el tratamiento de estas áreas, específicamente suelos contaminados varias tecnologías y metodologías necesitan ser aplicadas (Rinaldi y Da Silva, 2011).

La remediación de suelos contaminados es un problema significativo porque estos son un medio muy complejo y la mayoría de los contaminantes se encuentran absorbidos. El incremento de la contaminación de suelo por compuestos orgánicos ha promovido el desarrollo y la aplicación de varios procesos de remediación (Romero et al., 2011).

Debido a sus propiedades hidrofóbicas, los PAHs tienden a permanecer fuertemente adsorbidos dentro de la materia orgánica del suelo durante varios años, convirtiéndose de esta forma en un lugar de almacenamiento de estos compuestos que son una amenaza para suelos y aguas superficiales (De Sousa e Silva et al., 2009).



Por estas propiedades características forman micro contaminantes en el ambiente, para los cuales el aire, el agua y la vegetación actúan como sumideros o depósitos, aunque el inventario preliminar de los PAHs en el Reino unido mostró que el suelo es el mayor depósito de estos compuestos (Gan et al., 2009).

El tratamiento de suelos contaminados con PAH es un gran desafío. Los suelos crónicamente contaminados en la actualidad son descontaminados por desorción térmica luego de la excavación a un costo energético muy elevado (De Sousa e Silva et al., 2009).

Experimentos con suelos contaminados en el momento de los ensayos a escala del laboratorio nos permite estudiar la oxidación en condiciones experimentales controladas antes de investigarlos en muestras reales de suelos contaminados.

De Sousa e Silva et al. (2009) empleó al fenantreno como modelo de PAH porque es uno de los compuestos que está presente en elevadas concentraciones en suelos de las antiguas plantas de coque.

### **2.3. Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)**

Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAHs) son un grupo de moléculas orgánicas compuestas por la fusión de los anillos del benceno los cuales son clasificados dentro del grupo de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (HOCs, de las siglas en inglés Hydrophobic Organic Compounds) (Ferrarese et al., 2008).

Los PAHs son los mayores componentes del petróleo crudo, creosota, alquitrán de hulla y desechos de la combustión de petróleo; desechos de la gasificación del carbón, de la incineración de desechos industriales y han recibido mucha atención desde que se conoció que son potencialmente mutagénicos o carcinogénicos para los seres humanos y para otros microorganismos (Seo y Bishop, 2007).

Estos compuestos químicos son formados como resultado de la combustión incompleta del carbón, de derivados del petróleo y de la madera; y se encuentran entre los contaminantes más frecuentes de suelos y sedimentos (Bavel, 2006).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA, de las siglas en inglés United States Environmental Protection Agency) ha clasificado a dieciséis de los PAHs como contaminantes prioritarios, basados en la toxicidad, en la exposición potencial de los seres humanos, en la frecuencia de aparición en los sitios de desechos peligrosos.

De los dieciséis PAHs la US EPA considera a los siguientes siete compuestos: benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluorantreno, benzo(k)fluorantreno, diben(a,h)antraceno y indeno(1,2,3-cd)pireno como posibles carcinógenos humanos (Bojes y Pope, 2007), Tabla 1, en la cual se puede apreciar que aquellos que se consideran carcinogénicos para los humanos son los que tienen mayor peso molecular.

La toxicidad de los PAHs depende exclusivamente de la estructura, tanto que los isómeros podrían variar desde no tóxicos hasta extremadamente tóxicos (Campro Scientific, Biomarker Focus, 2010).

Tabla 1. Los dieciséis PAHs contaminantes prioritarios para la US EPA y algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)	Estructura (número de anillos)	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/L)	Presión de Vapor (mmHg)
Naftaleno	2	128,17	31	$8,89 \times 10^2$
Acenafteno	3	154,21	3,8	$3,75 \times 10^3$
Acenaftileno	3	152,20	16,1	$2,90 \times 10^2$
Antraceno	3	178,23	0,045	$2,55 \times 10^5$
Fenantreno	3	178,23	1,1	$6,80 \times 10^4$
Fluoreno	3	166,22	1,9	$3,24 \times 10^3$
Fluorantreno	4	202,26	0,26	$8,13 \times 10^6$
<i>Benzo(a)antraceno</i>	4	228,29	0,011	$1,54 \times 10^7$
<i>Criseno</i>	4	228,29	0,0015	$7,80 \times 10^9$
Pireno	4	202,26	0,132	$4,25 \times 10^6$
<i>Benzo(a)pireno</i>	5	252,32	0,0038	$4,89 \times 10^9$
<i>Benzo(b)fluorantreno</i>	5	252,32	0,0015	$8,06 \times 10^8$
<i>Benzo(k)fluorantreno</i>	5	252,32	0,0008	$9,59 \times 10^{11}$
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	6	278,35	0,0005	$2,10 \times 10^{11}$
<i>Benzo(g,h,i)perileno</i>	6	276,34	0,00026	$1,00 \times 10^{10}$
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	6	276,34	0,062	$1,40 \times 10^{10}$

### 2.3.1. Fenantreno

El fenantreno (Figura 1) es un PAH de bajo peso molecular que está compuesto de tres anillos bencénicos (Irwin, 1997).

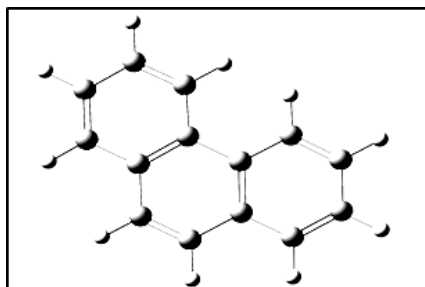


Figura 1. Estructura molecular del fenantreno.

En la Tabla 2 se presenta el resumen de las propiedades físicas y químicas del fenantreno (Irwin, 1997).

Tabla 2. Resumen de propiedades físicas y químicas de fenantreno.

CAS N° (Chemical Abstract Service)	85-01-8
Peso Molecular	178,2 g/mol
Color	Incoloro
Estado físico	Forma plana, cristales, hojuelas
Punto de Fusión	100 °C
Punto de Ebullición	340 °C
Olor	Suave olor aromático
Solubilidad en agua	1,2 -1,3 mg/L a 25 °C: soluble en benceno, etanol, éter, tolueno, tetracloruro de carbono y disulfuro de carbono.
Coeficientes de partición:	
Log $K_{ow}$ *	4,45 – 4,57
Log $K_{oc}$ **	4,15 – 4,36
Presión de Vapor a 25 °C	$6,8 \times 10^{-4}$ mmHg
Constante de Ley de Henry a 25 °C	$2,56 \times 10^{-5}$ atm.m <sup>3</sup> /mol
Factor de conversión	1ppm=7,3 mg/m <sup>3</sup> 1mg/m <sup>3</sup> =0,137 ppm

\* $K_{ow}$  Coeficiente de partición del compuesto orgánico en octanol - agua.

\*\* $K_{oc}$  Coeficiente de partición de carbono orgánico en suelo.

Fuente: USACHPPM. Document No: 39-EJ1138-01K (2006).

El ser humano puede estar expuesto al fenantreno porque existe naturalmente en el ambiente y también resulta como producto de las actividades humanas.

Pueden provenir de los gases generados por el transporte automotor, de la quema de carbón o del alquitrán de hulla, asfalto; o a través de la aspiración de humos de tabaco o cigarrillos; como también por la ingestión de alimentos cultivados

en suelos contaminados con hidrocarburos (Agency for Toxic Substances and Disease Registry- USEPA Phenanthene).

A pesar de no ser mutagénico ni carcinogénico es tóxico para algunas especies marinas. El fenantreno causa respuesta inhibitoria en las membranas celulares debido a su fuerte naturaleza hidrofóbica y su baja biodisponibilidad se suele atribuir a su ubicación inaccesible para los microorganismos dentro de la matriz orgánica (Ortiz et al., 2003).

Aunque las eficiencias de remoción de fenantreno reportadas son mayores al 90%, la mineralización (conversión a  $\text{CO}_2$  más  $\text{H}_2\text{O}$ ) es generalmente baja; con valores más altos de 25 – 50% y valores menores de 5% utilizando bacterias y hongos bajo distintas condiciones (Ortiz et al., 2003).

## **2.4. Remediación**

### **2.4.1. Biorremediación**

Suelos contaminados de miles de sitios alrededor de los Estados Unidos, han sido tratados utilizando procesos naturales sin la ayuda de la ingeniería para mejorarlos, tratando así más de 15.000 áreas.

El uso de procesos naturales como parte de la remediación de un sitio es llamada “atenuación natural”. Algunos de los procesos que se producen pueden transformar contaminantes a formas menos tóxicas para inmovilizarlos reduciendo los riesgos. Tales procesos de transformación e inmovilización resultan de las reacciones biológicas, químicas y físicas que tienen lugar en la superficie.

Estas reacciones pueden incluir la biodegradación por microorganismos en la superficie, las cuales ocurren naturalmente por reacciones químicas y sorción geológica en la superficie. A pesar del aumento en el empleo de estos procesos, la inclusión de la atenuación natural en plantas de tratamiento de desechos en los sitios de remediación puede ser controversial especialmente en sitios grandes en los cuales las actividades públicas están involucradas. Los miembros de las comunidades cercanas al sitio de contaminación en general creen que la atenuación natural es un proceso que no realiza ninguna acción.

Estas controversias son enriquecidas por la dificultad desde una perspectiva científica en la determinación sobre si las aparentes pérdidas de contaminantes son debidas a su transformación natural en formas menos peligrosas, a la dilución o a la transferencia a otro medio ambiente.

La inclusión de la dilución y la volatilización en la definición de atenuación natural se han añadido a la controversia debido a la objeción filosófica de utilizar la dilución como una forma de remediación de la contaminación

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) y sus colegas a nivel estatal están recibiendo un aumento de números de propósito para el uso de la atenuación natural en el lugar o en conjunto con los sistemas de ingeniería para la descontaminación de una amplia variedad de contaminantes incluyendo compuestos químicos clorados, metales explosivos y radionúclidos; además de la gasolina y otros combustibles.

Aunque la atenuación natural ha sido bien documentada como un método para el tratamiento de compuestos del petróleo como el Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno (BTEX), actualmente no se ha establecido como tratamiento para los casos más comunes de contaminación de aguas subterráneas.

Los procesos de atenuación natural son específicos para cada contaminante, en el cual cada uno es único y presentan diferentes procesos ambientales que afectan su destino. Por lo tanto hacer generalizaciones que se puedan aplicar a todos los contaminantes es inapropiado.

Especial importancia tiene la diferencia entre contaminantes orgánicos e inorgánicos; aunque en la atenuación natural las reacciones pueden convertir completamente a algunos contaminantes en dióxido de carbono y agua y ellos, también pueden alterar la movilidad de metales pero no pueden destruirlos (The National Academy Press, 2011).

El principio más importante de la biorremediación es que los microorganismos (principalmente las bacterias) pueden ser utilizados para degradar a los contaminantes o transformarlos en formas menos peligrosas. Los

microorganismos actúan contra los contaminantes sólo cuando ellos tienen acceso a una variedad de materiales; compuestos que los ayudan a generar energía y nutrientes para construir más células.

En unos pocos casos las condiciones naturales del sitio contaminado provee todos los materiales esenciales en una enorme y suficiente cantidad como para que la biorremediación ocurra sin la intervención humana, un proceso llamado biorremediación intrínseca.

En la mayoría de los casos la biorremediación requiere de la construcción de sistemas de ingeniería para suministrar materiales con microorganismos estimulados un proceso llamado ingeniería de biorremediación. Esta se basa en la aceleración de las reacciones de degradación deseadas gracias al mejoramiento en el crecimiento de más microorganismos, optimizando el ambiente en el cual los organismos deben llevar a cabo las reacciones de destoxificación.

Un factor crítico en la decisión de si la biorremediación es apropiada para la remediación de un sitio es si los contaminantes son susceptibles a la biodegradación por los organismos en dicho sitio (o si los microorganismos podrían ser agregados exitosamente). Aunque existen microorganismos que pueden destoxificar a una amplia gama de contaminantes, algunos compuestos son más fáciles de degradar que otros.

En general, los compuestos más fácilmente degradados en la superficie son los hidrocarburos del petróleo, pero las tecnologías para la estimulación del crecimiento de los organismos para degradar una amplia gama de otros contaminantes están surgiendo y han sido probados en el campo exitosamente.

La conveniencia de un sitio para la biorremediación depende no solo de la biodegradabilidad del contaminante sino también de las características geológicas y químicas del sitio. Los tipos de condiciones de los sitios que favorecen la biorremediación difieren para la biorremediación intrínseca y para la ingeniería de biorremediación.

Para la biorremediación intrínseca la clave está en las características del sitio como el flujo de aguas superficiales a través de las estaciones del año, la presencia de minerales que pueden prevenir los cambios de pH; y las altas concentraciones de oxígeno, nitrato, sulfato e iones férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Para la ingeniería de biorremediación las características claves del sitio son la permeabilidad de la superficie a los fluidos, la uniformidad del mismo y las concentraciones residuales de contaminantes en fase no acuosa relativamente bajas.

En el momento de decidir si en un determinado sitio es conveniente para aplicar la biorremediación es importante tener presente que solo un conjunto de características del sitio no favorecerá la biorremediación de todos los contaminantes. Por ejemplo: ciertos compuestos solo pueden ser degradados en ausencia de oxígeno, sin embargo la degradación de otros requiere de la presencia de este gas.

Además de todo esto se debe considerar como el sistema de biorremediación podría actuar bajo condiciones variables y no perfectamente conocidas. Un tratamiento que funciona óptimamente bajo condiciones específicas sin embargo podría ser inapropiado para la biorremediación in situ. Frecuentemente este tipo de remediación es combinada junto con tecnologías de tratamientos no biológicos como por ejemplo con la remediación química.

La biorremediación in situ, el uso de microorganismos para la remoción de los contaminantes en determinados sitios es potencialmente más económico, rápido y seguro que otros métodos de descontaminación. Pero también es dudosa debido a la incertidumbre, la controversia y la desconfianza (The National Academy Press, 1993).

#### **2.4.2. Remediación química**

La tecnología de oxidación química está basada en el poder oxidante de los compuestos químicos específicos. A través de los procesos de oxidación los contaminantes de aguas subterráneas son degradados a dióxido de carbono y agua. Algunos oxidantes son más fuertes que otros y es común calcular la fuerza relativa para todos los oxidantes teniendo como referencia al cloruro.

En la Tabla 3 se presenta la lista de las fuerzas relativas de los oxidantes más comunes.

Tabla 3. Fuerza de los oxidantes.

<b>Especies químicas</b>	<b>Potencial de oxidación estándar (Volts)</b>	<b>Fuerza relativa (Cloruro= 1)</b>
Radical hidroxilo (OH <sup>•</sup> )*	2,8	2,0
Radical sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>•-</sup> )	2,5	1,8
Persulfato de sodio	2,0	1,5
Peróxido de hidrógeno	1,8	1,3
Permanganato (Na/K)	1,7	1,2
Cloruro	1,4	1,0

\*Este radical puede ser formado cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se descompone.

Fuente: Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater, 2005.

Todos los oxidantes que se listan en la Tabla 3 tienen suficiente poder oxidante para remediar la mayoría de los contaminantes orgánicos. El potencial estándar es una referencia general útil de la fuerza de un oxidante, pero estos valores no indican como estos oxidantes se comportarán en las condiciones de campo.

Los factores que juegan un rol importante a la hora de determinar si un oxidante reaccionará o no con cierto contaminante en el campo son: la estequiometría, la cinética y la termodinámica. A micro escala, la cinética o la velocidad de reacción es sin embargo la más importante.

En realidad las reacciones deberían ser consideradas termodinámicamente favorables si se parte como base de los valores del potencial de oxidación estándar que podrían no ser prácticos en las condiciones de campo.

Las velocidades de las reacciones de oxidación son dependientes de varias variables que deben ser consideradas simultáneamente incluyendo la temperatura, el pH, concentración de los reactivos, catalizadores, reacción de los subproductos y las impurezas de los sistemas (como por ejemplo: la materia orgánica natural que puede actuar como “desactivador” de los oxidantes, ya que el oxidante reacciona con ésta en lugar de hacerlo con el contaminante).

Para degradar efectivamente un contaminante el oxidante debe entrar en contacto con la molécula del mismo. Idealmente la técnica de distribución debería asegurar que el oxidante sea uniformemente dispersado a través del área a ser tratada.



Algunas de las formas más estables del contaminante pueden ser oxidadas sólo por los oxidantes fuertes, pero estos también son consumidos rápidamente en la superficie limitando de esta manera la distancia a la que el oxidante pueda viajar. Los oxidantes menos reactivos son más estables y pueden ser transportados a más grandes distancias en la superficie (ITCR, 2005).

### **2.4.3. Toxicidad del tratamiento**

Además de la demostración de la eficacia del tratamiento, también es necesario demostrar que la biodegradación o la remediación química no producen intermediarios tóxicos y que este método de remediación evita los efectos ecológicos no deseados. Se deben implementar formas de medir el contenido de estos compuestos en la zona a ser remediada para prevenir la migración de los mismos fuera de la zona de tratamiento (Balba et al., 1998).

El cambio de concentración de PAH con el tiempo es generalmente utilizado para evaluar la efectividad del biotratamiento y para determinar su punto final, pero datos adicionales tales como el cambio de la comunidad bacteriana y su eco toxicidad también podrían dar una valiosa información para el monitoreo del tratamiento biológico (Lors et al., 2010).

La toxicidad antes y después del proceso de remediación se puede medir empleando ensayos específicos, con este propósito se pueden realizar utilizando plantas o con equipos analizadores de toxicidad.

En los ensayos realizados con plantas se evalúan: el efecto de suelos contaminados sobre el crecimiento y la germinación de especies cotiledóneas o monocotiledóneas y la habilidad de este suelo para mantener el crecimiento de los mismos (Balba et al., 1998).

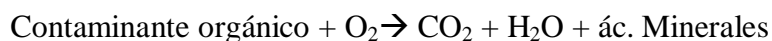
## 2.5. Oxidación química

### 2.5.1. Métodos avanzados de oxidación química in situ o Métodos ISCO

La Oxidación Química In Situ (ISCO, de las siglas en inglés In Situ Chemical Oxidation) es una innovadora tecnología de tratamiento en la cual los oxidantes químicos son inyectados en el sitio contaminado para oxidar los contaminantes.

Los beneficios de la tecnología ISCO son: la habilidad que tienen los oxidantes químicos para oxidar los contaminantes; la reducción del tiempo total del tratamiento; la posibilidad de tratar áreas contaminadas sin perturbar el sistema y la eliminación del costo de excavación y manipulación de suelos contaminados (Killian et al., 2007).

Estos sitios contaminados son generalmente aguas subterráneas y suelos; el propósito de esta tecnología es transformar el contaminante en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, y en el caso que el compuesto contenga heteroátomos, ácidos inorgánicos, como se puede observar en la reacción siguiente (García et al., 2009):



Habitualmente se emplean cinco oxidantes en este tipo de tecnologías: ozono (O<sub>3</sub>), permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>), peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroxidisulfato (o persulfato) de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) y peróxido de calcio (CaO<sub>2</sub>) (García et al., 2009).

La tecnología ISCO ofrece varias ventajas sobre las tecnologías convencionales de tratamiento tales como el bombeo y la inyección. Por ejemplo, esta tecnología no genera grandes volúmenes de materiales de desecho que deben ser depositados y/o tratados. La misma también es implementada en un periodo de tiempo mucho más corto.

Ambas ventajas deberían resultar en el ahorro de material, monitoreo y mantenimiento. Esta tecnología también tiene varias limitaciones y estas no deberían ser consideradas una fórmula mágica para cada sitio.

Además la aplicación de ésta, en realidad puede interrumpir otras remediaciones. Por ejemplo su utilización sobre un sitio que es beneficiado por la deshalogenación reductiva natural puede temporalmente alterar la geoquímica del sistema que facilita el proceso (ITCR, 2001).

#### **2.5.1.1. Usos apropiados y aplicables de la tecnología ISCO**

La oxidación química in situ es útil para la reducción de masa en los sitios de origen, para la intercepción de plumas de contaminación y la remoción de los contaminantes libres. Cada oxidante químico es efectivo para distintos contaminantes.

Se han utilizado sustancias químicas para remediar contaminaciones por solventes clorados, hidrocarburos poliaromáticos y los productos del petróleo (por ejemplo tetracloroetileno, tetracloroetano, cloruro de vinilo, Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno - BTEX) como también naftaleno.

La conveniencia del uso de las tecnologías ISCO en un determinado sitio depende de que el oxidante y el sistema de distribución del mismo sea el más adecuado para la aplicación en la zona de contaminación, teniendo en cuenta las condiciones del lugar del tratamiento. Por ejemplo el permanganato no es efectivo contra los BTEX, mientras que el peróxido y el ozono sí lo son.

Esto requiere de una cuidadosa caracterización y previa selección. La oxidación depende del logro de un contacto adecuado entre el oxidante y el contaminante. No tener en cuenta la heterogeneidad de la superficie puede resultar en contaminantes no tratados.

Los reactivos aplicados pueden ser consumidos por la materia orgánica natural o por el hierro disuelto (en vez de ser consumidos por los contaminantes), comprometiendo así la efectividad de la remediación. En resumen los factores más críticos para el éxito son:

- 1- La efectividad, la habilidad de controlar la reacción ISCO con los contaminantes y;

2- La efectividad en la distribución de los reactivos en la zona a ser tratada.

Las ventajas más importantes de ISCO incluyen su relativo bajo costo y la rapidez de la reacción, sin embargo el diseño del tratamiento debe explicar la peligrosidad de los compuestos químicos y el potencial de vigorosas reacciones incontroladas en la superficie, lo cual ocurre con el reactivo Fenton (ITCR, 2001).

En la Tabla 4 se presentan las consideraciones para los tratamientos in situ utilizando ISCO.

Tabla 4. Consideraciones para los tratamientos in situ con ISCO

<b>Compuestos tratables:</b> Alcanos clorados, hidrocarburos poliaromáticos y productos de petróleo.		
<b>Materia orgánica natural:</b> Cualquier especie reducida en el sistema puede ejercer una demanda para el oxidante. La materia orgánica de origen antropogénico e inorgánicos reducidos son de particular importancia.		
<b>Permeabilidad:</b> Se prefiere alta permeabilidad; pero son factibles para permeabilidad baja con el uso de técnicas de distribución de oxidación avanzada, tales como la mezcla profunda de suelo.		
<b>Profundidad de aplicación:</b> Con el uso de técnicas de distribución, la profundidad no es generalmente una limitación.		
<b>Efectos potenciales:</b> Evolución del gas, subproductos tóxicos, resolubilización de metales y reducción de la biomasa.		
<b>Otros factores:</b> pH optimo y características de degradación para cada oxidante; los mismos son los siguientes:		
	<b>Reactivo Fenton</b>	<b>Permanganato</b>
<b>pH</b>	Se prefiere pH bajo de 2 a 4, pero son factibles a pH cercanos a la neutralidad.	Se prefiere pH cercanos al neutro entre 7 y 8, pero es efectivo en un amplio rango de pH.
<b>Degradación</b>	De fácil degradación por contacto con suelos y aguas subterráneas.	El oxidante es muy estable.

Fuente: Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater, 2001.

### 2.5.1.2. Datos geológicos y químicos necesarios

Los parámetros que necesitan ser conocidos son:

- **Masa del contaminante.** Estimación de la masa del contaminante incluyen la presencia en la fase libre (disponible). Hay que tratar de estimar con precisión la masa del contaminante en fase acuosa y en fase no acuosa. Tal estimación es

esencial para determinar la dosis química necesaria y para la elección de los puntos de distribución del oxidante.

- **Materia orgánica natural.** La materia orgánica natural en el suelo y en aguas subterráneas podría consumir el oxidante y por lo tanto pueden ser utilizados para estimar la dosificación química. Para los suelos con altos volúmenes de materia orgánica, la oxidación química sola podría no ser una tecnología económica.
- **El pH del suelo y de aguas superficiales.** Los valores de pH son necesarios para verificar la conveniencia del uso de un oxidante, específicamente si la zona contaminada se altera por el agregado de un oxidante químico para adaptarse a una tecnología de oxidación. El pH debería ser medido para establecer las condiciones de referencia.
- **Clasificación del suelo.** Una evaluación cualitativa del suelo, incluyendo la heterogeneidad, es necesaria para evaluar la aplicabilidad de un oxidante. Por ejemplo para los suelos arcillosos la mayoría de las tecnologías de tratamiento podrían ser desfavorables ya que el contacto de los oxidantes con el contaminante estaría limitado por difusión. Basado en la evaluación cualitativa del suelo, el valor de la porosidad del mismo se debe tener en cuenta y utilizarlo para la estimación de velocidad en aguas subterráneas. El grado de heterogeneidad del medio influencia sobre el modo de aplicación del oxidante.
- **Conductividad.** Este parámetro es importante para establecer las condiciones de referencia para luego monitorear y cartografiar la extensión de la “zona de reacción”.
- **Contenido de hierro en suelos y aguas superficiales.** El contenido inicial de hierro en el suelo y aguas superficiales deberían ser medidas para estimar la dosis requeridas de hierro. Si la presencia inicial del hierro es ignorada, existe un potencial de sobredosificación de hierro y entonces se reduce la permeabilidad debido a la formación de óxidos de hierro después del tratamiento.

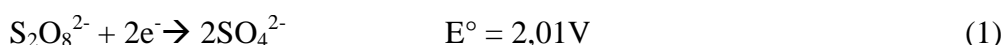
También la presencia de elevadas concentraciones de hierro (específicamente en forma de hierro ferroso) actúa como “desactivador de los radicales hidroxilos” formados a partir de la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ocurriendo así las reacciones indeseables que pueden no oxidar a los compuestos orgánicos que se quieren degradar. Los iones hierro deberían ser determinados junto con otros metales (ITCR, 2001).

## 2.5.2. Oxidante químico

### 2.5.2.1. Persulfato

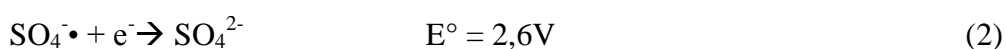
El anión persulfato (S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>) aunque es un oxidante fuerte reacciona lentamente con muchos compuestos orgánicos. Las velocidades de oxidación de los radicales anión sulfato son marcadamente más altas que la del persulfato en una amplia gama de condiciones experimentales. La destrucción de la materia orgánica iniciada por el radical sulfato ha ganado interés entre las tecnologías ISCO (García et al., 2009).

El anión persulfato (S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>) es un agente oxidante con un potencial de reducción de 2,01 V. La reducción del anión persulfato resulta en la producción de dos aniones sulfatos mediante la siguiente reacción (Latimer, 1952):

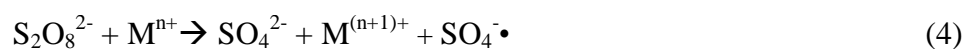


Las reacciones con iones persulfato son lentas; para aumentar la rapidez de la misma se busca activar al persulfato; es decir se forman radicales sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-•</sup>) a partir de éstos iones, de modo a obtener reacciones más rápidas.

Este radical formado de esta forma es un agente oxidante muy fuerte con un potencial de reducción de 2,6V (Eberson, 1987).



El persulfato es capaz de formar el radical sulfato a través de tres mecanismos: térmica (3) (Pugh, 1999), metal activado (4) (Walling et al., 1978) y radiólisis (5) (Neta et al., 1977).



Solamente el fluoruro (3,06 V) y el radical hidroxilo (2,70 V) tienen potenciales de oxidación más altos.

La generación de radicales aniones sulfato,  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ , a partir del anión persulfato puede activarse químicamente vía metales de transición como describe la ecuación química (4) (García et al., 2009).

En el trabajo realizado por Kilian et al. (2007) el persulfato fue activado con hierro (II), en el cual el radical sulfato se forma como se describe en la siguiente ecuación (Kolthoff et al., 1951):



Sin embargo, si se encuentra presente un exceso de hierro, este puede reaccionar con el radical sulfato como lo describe la siguiente ecuación (Kolthoff et al., 1951):



La ecuación general es la siguiente (House, 1962):



En un estudio realizado por Liang et al. (2004) empleando al anión persulfato como oxidante químico, se demostró que el agregado de hierro (II) en pequeñas dosis en forma secuencial era mucho más eficiente que con el agregado de hierro (II) en una única dosis.

Como la rápida oxidación y la precipitación del ión hierro ferroso podría hacer inactivo al  $\text{Fe}^{2+}$ , los agentes complejantes fueron previamente utilizados para

superar esta limitación y de esta forma mantener a este ion metálico en solución (Usman et al., 2012a; Usman et al., 2012b).

Debido a esto fue que en los ensayos realizados por Killian et al. (2007) en el que se utilizó al anión persulfato como oxidante químico, se empleó el agregado de hierro (II) en forma secuencial en unos casos y en otros acomplejados con ácido cítrico antes de la adición.

Se empleó al ácido cítrico como agente complejante por ser un agente quelante tetradentado no tóxico, el cual forma un complejo con el hierro (II) en una relación de (1:1) (Killian et al., 2007).

#### **2.5.2.2. Peróxido de hidrógeno. Reactivo Fenton**

Los procesos de remediación química en los que se emplea al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como agente oxidante involucran la generación de radical libre hidroxilo (OH•) y la oxidación directa con peróxido de hidrogeno. Este compuesto químico es un efectivo agente oxidante, el cual puede ser distribuido a profundidad usando un cilindro de permeabilidad, técnicas de mezclado de suelos o la inyección de agua.

El hierro es el más frecuentemente utilizado y cuando este es mezclado con peróxido de hidrogeno la mezcla se conoce como reactivo Fenton; el cual es empleado debido a la producción de radicales hidroxilos. La reacción básica es la siguiente:



Estos radicales sirven como un agente oxidante no específico, efectivo y muy poderoso. Varias reacciones ocurren durante la oxidación de un contaminante y tanto el hierro ferroso (Fe<sup>2+</sup>) como el hierro férrico (Fe<sup>3+</sup>) pueden reaccionar con el peróxido para producir radicales oxidantes (ITCR, 2001).

El proceso Fenton es de actuación relativamente rápida tomando solo horas o días. Los contaminantes son tratados in situ y convertidos en compuestos inocuos y/o en compuestos de origen natural como por ejemplo: H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e iones



haluros (cuando entre las sustancias contaminantes se encuentran presentes compuestos halogenados).

El lado beneficioso de esta tecnología es que la biodegradación aeróbica de contaminantes puede beneficiarse por la presencia de  $O_2$  generado durante la descomposición de  $H_2O_2$  en el caso de que la aplicación de grandes cantidades de oxidante es necesaria.

La utilidad del reactivo Fenton puede estar limitada por la baja permeabilidad del suelo, trazado incompleto del sitio a tratar, superficies heterogéneas y suelos fuertemente alcalinos donde los iones carbonato pueden actuar como desactivadores de los radicales libres (ITCR, 2001).

En un estudio realizado por Bavel (2006) se demostró que la degradación de PAH más efectiva se obtuvo al utilizar el reactivo Fenton, con el cual se alcanzó una eficiencia de degradación del 40 al 86%, mientras que empleando como oxidante químico al ozono se logró una eficiencia de degradación del 10 al 70%.

El proceso Fenton está limitado por el valor óptimo de pH (~ 3) requerido para inhibir la precipitación del  $Fe^{2+}$  y por la producción de grandes cantidades de sedimento de hidróxido férrico. En los sistemas del suelo tales valores de pH resultan en un impacto negativo sobre las propiedades del suelo, en la cualidad del mismo y en la subsecuente incompatibilidad con la vegetación o la biodegradación.

Se está estudiando como extender el rango de aplicabilidad al valor de pH natural del suelo y de esta forma producir radicales hidroxilos para lograr una degradación eficiente de contaminantes orgánicos a valores de pH cercanos a la neutralidad. Las alternativas que están siendo probadas son utilizando minerales de hierro o agentes complejantes (Usman et al, 2012). Estos últimos, por ejemplo: ácido cítrico, ciclodextrinas, EDTA, catecol, pueden ser utilizados para incrementar la disponibilidad del  $Fe^{2+}$  (Ferrarese, 2008).

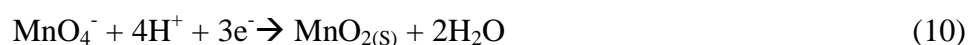
### 2.5.2.6. Permanganato

El permanganato ( $\text{MnO}_4^-$ ) es un agente oxidante con potencial de oxidación estándar de 1,7 V (Ferrarese et al., 2008) con alta afinidad para oxidar compuestos orgánicos que contienen enlaces dobles carbono-carbono, grupos aldehídos o grupos hidroxilos (ITCR, 2001).

El empleo de este oxidante químico se ha informado ser efectivo en la remediación de varios compuestos de hidrocarburos y se lo ha utilizado ampliamente en las acciones de remediación in situ y ex situ en los últimos años (Ferrarese et al., 2008); en el tratamiento de contaminantes en agua potable y en aguas residuales. Más recientemente se lo ha empleado en la remediación de sitios (suelos y aguas subterráneas) con desechos peligrosos mediante técnicas de inyección de permanganato tanto en estado sólido como en solución acuosa (U.S. Department of Energy, 1999).

Este oxidante persiste por largos periodos y es capaz de migrar en materiales poco permeables y alcanza aún mayores distancias en un medio poroso (García et al., 2009).

En sistemas acuosos esta sal genera iones permanganatos los cuales siguen la reacción de descomposición de la siguiente forma:



La estequiometría y la cinética de la oxidación de permanganato en sitios contaminados pueden ser muy complejas al igual que numerosas reacciones en las que puede participar el manganeso debido a sus múltiples estados de valencias y formas minerales. La reacción de oxidación primaria para el permanganato se da en las ecuaciones 11- 14. Estas hemirreacciones son útiles por dos propósitos:

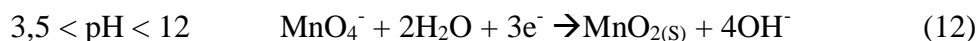
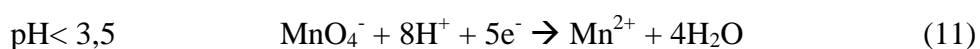
- Para evaluar los requerimientos estequiométricos del oxidante para una completa mineralización del contaminante vía balance de transferencia de electrones y,

- Para determinar los posibles productos de reacción ambientalmente significativas.

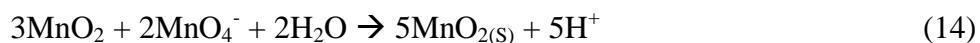
Por ejemplo, la hemirreacción para el permanganato bajo condiciones ácidas involucra la transferencia de 5 electrones como se muestra en la ecuación 11, donde el  $Mn^{2+}$  es uno de los productos. En el rango de pH de 3,5-12, la hemirreacción involucra la transferencia de 3 electrones como muestra la ecuación 12 con la formación de  $MnO_2$  sólido como producto primario de la reacción.

A altos valores de pH (>12) la transferencia de un solo electrón ocurre según la ecuación 13 produciendo  $MnO_4^{2-}$ .

En estas tres reacciones el manganeso es reducido desde  $Mn^{7+}$  a  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{4+}$  y  $Mn^{6+}$  ecuaciones 11, 12 y 13, respectivamente. La ecuación 12 representa la típica reacción bajo condiciones ambientales y lleva a la formación del dióxido de manganeso sólido.



Los cationes de  $Mn^{2+}$  formados bajo condiciones altamente ácidas de pH ( $pH < 3,5$ ) pueden ser oxidados por exceso de iones de permanganato (sin reaccionar) y formar óxidos que precipitan en el ambiente. Sin embargo el  $MnO_2$  también es natural y lentamente reducido para dar  $Mn^{2+}$ . Estas reacciones se muestran en las ecuaciones 14 y 15.



Las ecuaciones 11 y 15 son significativas desde una perspectiva regulatoria puesto que dentro de un largo tiempo en condiciones fuertemente ácidas podrían resultar en elevadas concentraciones de  $Mn^{2+}$ . El pH inicial de la superficie, la masa

de permanganato que reaccionó y la capacidad buffer de la superficie influenciará en la posibilidad de que esto ocurra.

Las reacciones de descomposición del permanganato, también pueden ocurrir, pero a velocidades apreciables solo a valores extremadamente altos de pH.

La velocidad de degradación de los compuestos orgánicos por permanganato en ausencia de materia orgánica u otros compuestos reductores depende de la concentración de ambos, del contaminante y del permanganato; y pueden ser descritos por una cinética de segundo orden. Es importante tener conocimiento sobre la velocidad de degradación del contaminante que es afectada por la presencia de especies competitivas tales como la materia orgánica y especies minerales reducidas. La velocidad de reacción es también dependiente de la temperatura (ITRC, 2005).

Hasta hace poco tiempo el permanganato había recibido sólo una pequeña atención como posible oxidante de los PAH debido a su inhabilidad para atacar a los anillos bencénicos, sin embargo ensayos realizados a escala de laboratorio demostraron que la oxidación de estos compuestos de hidrocarburos pueden ocurrir a través de distintas reacciones químicas para diferentes especies de PAH, dependiendo de la estructura molecular (por ejemplo: de la presencia de anillos aromáticos o de enlaces dobles carbono-carbono) (Ferrarese et al., 2008).

Esta tecnología es una buena alternativa, factible y necesaria para los sitios donde el trastorno físico de los suelos contaminados no es deseable. Utilizar permanganato también puede ser más económico que las tecnologías alternativas tales como la mezcla profunda del suelo; debido a que grandes volúmenes de suelo, pueden ser tratados con múltiples dosis de oxidantes y permite la introducción de grandes volúmenes de solución de oxidante (U.S. Department of Energy, 1999).

El dióxido de manganeso ( $MnO_2$ ) es un mineral natural que también se encuentra en el suelo. Si la precipitación del mismo en los suelos es excesivo como consecuencia de la utilización en la remediación química, puede reducir la permeabilidad de estos, limitando así la inyección de oxidantes acuosos.

Aunque el dióxido de manganeso es insoluble en aguas superficiales, éste puede ser reducido a manganeso divalente ( $Mn^{2+}$ ) soluble en condiciones de pH bajos o condiciones redox. El efecto de esta reacción con altos niveles de manganeso disuelto en las áreas de tratamiento inmediato hasta el momento no ha sido estudiado (ITCR, 2001).

El bajo rendimiento del permanganato es frecuentemente atribuido a la inyección de un volumen inadecuado de oxidante para que entre en contacto con la zona a tratar, la no uniformidad en la distribución causada por la baja permeabilidad de las zonas, la heterogeneidad del sitio; y el consumo excesivo del oxidante por material superficial natural (ITCR, 2005).

## **2.6. Microbiología del suelo**

### **2.6.1. Comunidades microbianas del suelo**

Los microorganismos (bacterias, virus, algas, hongos y protozoos) son omnipresentes y tienen influencia en la mayoría de los ambientes. La presencia de estos organismos es fundamental para todos los ecosistemas. Los microorganismos son ubicuos en el ambiente y están representados por la diversidad de sus poblaciones y comunidades.

Uno de los microorganismos más representativos son las bacterias; ellas son de tamaño muy pequeño; son organismos simples cuyo material genético no se encuentra encerrado por una membrana celular. Basados en esta organización celular, las bacterias son clasificadas como procariotas e incluyen a las eubacterias y a las arqueobacterias.

Aunque son clasificados como bacterias, los actinomicetos merecen una mención especial; estos microbios procariotas consisten en una larga cadena de células simples, las cuales les permiten existir en forma filamentosa.

Los actinomicetos son importantes productores de antibióticos y además cumplen un rol fundamental en la biodegradación de compuestos orgánicos

complejos y también son los que producen geosmina, una sustancia química que es la responsable del olor característico de la tierra.

Las bacterias se encuentran en todas partes inclusive se las puede encontrar en las condiciones más extremas debido a que han evolucionado su capacidad de rápido crecimiento, metabolismo y reproducción, así como la habilidad de utilizar una diversa gama de sustancias orgánicas e inorgánicas como fuente de carbono y energía.

Estos organismos son considerados como la forma de vida más simple; tan solo un gramo de suelo puede contener  $10^{10}$  o más bacterias. Estas son de vital importancia para la vida en la Tierra debido a su función en la mayoría de los ambientes.

Algunas de sus actividades más importantes incluyen los procesos biogeoquímicos, el ciclo de los nutrientes en el suelo, biorremediación, enfermedades de seres humanos y plantas, interacciones plantas – microbios, tratamientos de desechos municipales y la producción de importantes drogas incluyendo los antibióticos.

La salud de un suelo está íntimamente ligada a su población microbiana. Cuando el suelo comienza a sufrir estrés la estructura de las poblaciones y comunidades microbianas reflejan la tensión inducida en el ambiente. Los factores primarios que afectan a la ecología microbiana de un suelo y la de cualquier ambiente incluyen a los factores abióticos naturales como la temperatura, luz, aireación, nutrientes, materia orgánica, pH; y factores bióticos como la competencia, depredación y la habilidad de utilizar las fuentes de carbono disponibles.

Conocer cómo interactúan las comunidades microbianas con su ambiente es crucial cuando se pretende hacer un estudio de los suelos; esto significa que no se puede analizar un suelo sin tener en cuenta las interacciones de la vida de los organismos que habitan en el mismo (Pepper et al., 2004).

### **2.6.1.1. Bacterias heterótrofas cultivables en R2A**

La clasificación de los distintos tipos de suelos se basa en sus propiedades químicas, físicas y no se tienen en cuenta sus propiedades microbiológicas. Esto se debe principalmente a que las propiedades químicas y físicas se definen y miden más rápidamente que sus propiedades microbiológicas.

Se estima que menos del 1% de los microorganismos presentes en el suelo son capaces de crecer en un medio de cultivo; por lo que estos representan solo una pequeña parte de la población microbiana total, las cuales corresponden solamente a las bacterias cultivables. Es por esto que es difícil caracterizar a un determinado suelo por sus propiedades microbiológicas.

Aquellos organismos que no pueden ser cultivados se conocen como organismos “viables pero no cultivables”. También existen otros obstáculos que no permiten realizar la caracterización de los suelos en base a sus propiedades microbiológicas y esto se debe a la enorme diversidad de microorganismos presentes en cualquier tiempo en tan solo 1 gramo de suelo, esto tiene origen en la amplia gama de capacidades fisiológicas y las dramáticas variaciones de la población que pueden existir en el mismo sitio; y también es consecuencia de su rápida fluctuación resultado de la influencia humana durante el muestreo. Típicamente los análisis microbiológicos incluyen la determinación del número de microorganismos como de su biomasa.

El número de microorganismos se realiza a través del recuento de Bacterias Heterótrofas Cultivables, los cuales se siembran en placas que contienen medios de cultivos. Estos recuentos son obtenidos a partir de la extracción y dilución en solución fisiológica (Anexo D) posterior siembra de una muestra que permite el crecimiento de microbios específicos resultando en la formación de colonias (Unidades Formadoras de Colonias; UFC).

Estos procedimientos son generalmente empleados para bacterias. La dilución de la muestra ambiental (generalmente de suelos) es necesaria debido a la gran cantidad de microorganismos asociados a ella.

La siembra de la muestra ambiental diluida permite el crecimiento discreto de colonias en un medio de cultivo sólido. Se parte del conocimiento de que cada colonia crece a partir de la presencia de una sola célula, entonces el número de colonias en la placa puede ser relacionado con el número original de microbios en la muestra ambiental teniendo en cuenta el factor de dilución para los cálculos de las muestras.

El recuento de las bacterias heterótrofas cultivables da una idea de la salud de un suelo, así como también la disponibilidad de nutrientes orgánicos en el mismo. Este concepto se basa en que a mayor concentración de microorganismos heterótrofos cultivables más saludable es el suelo.

De manera similar la disponibilidad de los nutrientes orgánicos en el suelo a menudo pueden estar directamente relacionados con el recuento de bacterias heterótrofas cultivables.

Dos clases de medios de cultivo pueden ser utilizados para esta técnica: medio de cultivo rico en nutrientes y medio de cultivo pobre en nutrientes. El medio de cultivo pobre en nutrientes también es llamado medio mínimo y contiene el 75% menos de los ingredientes del medio de cultivo rico en nutrientes. Un ejemplo de un medio de cultivo mínimo es el R2A agar (Anexo D), en el que en general se obtiene el crecimiento de un elevado número de colonias (Pepper et al., 2004).

Las técnicas de recuento de bacterias en placas con agar presentan varias limitaciones, particularmente cuando se encuentran presentes microorganismos no cultivables (Balba et al., 1998).

#### **2.6.1.2. Bacterias degradadoras de PAH**

Se ha observado que en la mayoría de los casos a medida que el nivel de estrés aumenta (por ejemplo aquel inducido por el agregado de un compuesto químico tóxico al suelo), la diversidad taxonómica de las comunidades microbianas en ese suelo cambian. Esto es debido, principalmente, al proceso de selección natural de estos organismos que procesan elementos genéticos que les confieren alguna clase



de ventaja en relación a este factor de estrés. El origen de estos podría deberse al cambio genético que estos sufren.

Estos nuevos organismos pueden producir una gran variedad de genes biodegradadores que pueden ser utilizados en las transformaciones de los contaminantes; o podrían desarrollar mecanismos de resistencia que le permiten al microbio sobrevivir en presencia de ese factor de estrés. Las poblaciones microbianas seleccionadas por tal contaminación son en general consideradas benéficas porque podrían ser responsables en la destoxificación del ambiente contaminado.

Estas poblaciones microbianas o el aislamiento de estos microorganismos son de actual interés en el campo de la biorremediación.

Aunque estos se consideran beneficiosos muchos microorganismos autóctonos que son naturalmente beneficiosos y no poseen una ventaja genética que les permita sobrevivir en la presencia de un contaminante, no superan el periodo de adaptación y como no se encuentran aptos para competir entonces son eliminados de la comunidad microbiana disminuyendo de esta forma la diversidad de los mismos (Pepper et al., 2004).

La contaminación de suelos y sedimentos por hidrocarburos, frecuentemente, induce un gran cambio en el número de bacterias degradadoras de hidrocarburos. El número total de estos microorganismos pueden ser determinados por el método del NMP (Número Más Probable) aplicado a los cultivos en microplacas; en los estudios de remediación el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos específicos es de gran interés (Jahnsen y Henriksen, 2009).

Los recuentos de las bacterias degradadoras de PAHs pueden ser realizados en ensayos de cultivos, en el cual se emplean como medio de cultivo al Medio Mineral Líquido (Anexo D); y como fuente de carbono y energía Solución patrón de PAH para Bacterias Degradadoras (Anexo D).

Los recuentos de bacterias degradadoras de PAHs proveen información adicional sobre el potencial de biodegradación que posee un suelo en particular. El

porcentaje de estas bacterias respecto al recuento de bacterias heterótrofas cultivables frecuentemente refleja la extensión de la aclimatación de los microorganismos y la actividad de degradación de los mismos en un sitio contaminado con estos hidrocarburos. (Balba et al., 1998)

- **Número Más Probable**

El método del NMP es un método y una herramienta útil para los microbiólogos y sirve para estimar la concentración de microorganismos viables en una muestra por promedio del crecimiento de las réplicas en un medio líquido en las diluciones seriadas y es particularmente útil con muestras que contienen material particulado que interfieren con los métodos de enumeración en los recuentos en placas.

El medio de cultivo líquido nutritivo mantendrá el crecimiento de los microorganismos y se tornará turbio. Este patrón de crecimiento (positivo) versus no crecimiento (negativo) puede proveer información como la reflexión del error de muestreo.

Por ejemplo si una réplica del tubo recibe la dilución de la muestra que contiene bacteria celular, el tubo se tornará turbio. Su vecino una réplica idéntica podría no recibir ninguna bacteria en su muestreo debido a que en la toma de muestra no se tomó ninguna bacteria y no se pondrá turbio.

Esta información es importante sobre todo para número bajo de microorganismos. Esta precisión se puede aumentar diluyendo el inóculo y comparando todos los tubos en las diluciones seriadas. Esta es la base del método del NMP (también conocido como múltiples tubos, tubos de dilución, o método de dilución de tubos).

Este método puede ser empleado para estimaciones semicuantitativos de la capacidad de la promoción del crecimiento en medio líquido y en una estimación de precisión para alternar los métodos microbiológicos (Sutton, 2010).

## **2.7. Análisis molecular**

Numerosas técnicas de biología molecular permiten evaluar la diversidad de comunidades microbianas. En las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas moleculares basadas en el análisis de la diversidad genética de los microorganismos, normalmente del operón ribosomal, que han permitido la evaluación detallada de la composición de las comunidades microbianas (incluyendo organismos procariotas y eucariotas, sean autótrofos o heterótrofos).

Para ello se toman muestras de las comunidades cuya diversidad se desea estudiar, y se realiza una extracción y purificación del DNA (de las siglas en inglés *ácido desoxirribonucleico*) para proceder a la amplificación, utilizando la técnica de *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR), de fragmentos seleccionados del operón ribosomal mediante el uso de cebadores específicos (*primers*) de las secuencias de este operón para los microorganismos cuya diversidad se pretende determinar.

La elección de cebadores específicos puede ir dirigida a la detección de microorganismos de diversos niveles taxonómicos (desde cepas de una especie hasta reinos). Los fragmentos de DNA amplificados corresponden a los diferentes microorganismos presentes en la muestra cuyo DNA coincida con la secuencia de los cebadores utilizados para la secuencia génica diana.

En la segunda etapa, se trata de determinar las variaciones en las secuencias del DNA amplificado, para con ello desvelar la diversidad microbiana; esto puede ser utilizando varias técnicas y una de ellas es la separación electroforética, la cual proporciona una separación visual de la mezcla de DNA (*fingerprinting*) en función del polimorfismo en la secuencia (DGGE) o de la longitud de los fragmentos. Una de las técnicas más comúnmente utilizada es la *electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante* (DGGE) (Sabater et al., 2009).

### **2.7.1. Extracción de DNA de los microorganismos del suelo**

Los pasos principales para la extracción del DNA de los microorganismos consisten en la homogeneización de la muestra, la ruptura celular para liberar el DNA y la eliminación de los componentes del extracto que no sean ácidos nucleicos

(proteínas, polisacáridos, etc.). Para tal efecto en la mayoría de los casos se cuenta con reactivos adquiridos en forma de kits de extracción y purificación de DNA preparados comercialmente (Sabater et al., 2009).

## **2.7.2. Amplificación del DNA (PCR)**

### **2.7.2.1. PCR**

La técnica de la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) consiste en la multiplicación in vitro de secuencias específicas de DNA utilizando la actividad enzimática de la DNA-polimerasa.

Generalmente la secuencia amplificada suele ser la del gen que codifica para 16S rDNA (en los procariotas) y para el 18S rDNA (en los eucariotas).

El DNA extraído de las muestras, correspondiente a toda comunidad, se amplifica de forma selectiva mediante cebadores selectivos que se eligen en función del grupo taxonómico cuyo DNA se pretenda amplificar.

Son necesarios cebadores de iniciación en ambos lados de la cadena de DNA (cebador directo – *forward primer* y reverso – *reverse primer*), cuyas temperaturas de hibridación deben ser similares.

Las condiciones a aplicar en el termociclador, referentes a la desnaturalización, a la hibridación de los cebadores al extremo 3' de cada hebra y a la elongación de la hebra, tales como el número de ciclos, temperaturas y los tiempos de incubación y rampas de incremento de éstas, son específicas para cada cebador y secuencia a amplificar.

Para la amplificación, se parte del extracto de DNA previamente cuantificado que se conserva congelado. Se prepara la mezcla de polimerización (normalmente, los reactivos se adquieren ya preparados, en cuyo caso las cantidades a añadir serán las que especifique el fabricante) y después se le adiciona el DNA extraído para llevarlo al termociclador y se lo somete al proceso de polimerización (opciones de amplificación en función de los cebadores) (Sabater et al., 2009).

### **2.7.2.2. Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado**

Luego se debe comprobar que se ha obtenido la amplificación y que el tamaño del DNA amplificado es correcto mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8 – 2) % con tampón TAE 1X (Anexo D), utilizando un marcador de tamaño de tinción del gel con bromuro de etidio u otros tintes (por ejemplo, SYBR) y observación con luz ultravioleta.

Una vez obtenido el DNA amplificado y comprobado que el proceso ha funcionado correctamente, el extracto se congela a -80°C hasta su utilización. El producto de la amplificación puede ser utilizado para la separación electroforética que proporciona el *fingerprinting* de la comunidad, o incluso para la secuenciación directa (Sabater et al., 2009).

### **2.7.3. DGGE (*fingerprinting* de la comunidad)**

La electroforesis es una herramienta bioanalítica usada tanto en investigación básica como en los protocolos para el diagnóstico y/o el aislamiento y la identificación de biomoléculas de alto peso molecular. La separación se basa en la movilidad diferencial de macromoléculas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico a través de un gel (Mikkelsen y Cortón, 2011).

La *electroforesis en gel con gradiente químico desnaturizante* (DGGE), generalmente usando urea y formamida para desnaturizar, al igual que su equivalente de desnaturización con gradiente de temperatura (TGGE), se utiliza de manera rutinaria para estudios cualitativos y semicuantitativos de la diversidad de comunidades microbianas.

Los productos de amplificación son separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida en función de las diferencias en sus secuencias, que determinan patrones diferentes de desnaturización y con ello la migración. En la DGGE la separación del DNA es función de las características de desnaturización de la doble hélice de DNA. La carrera electroforética se realiza en una cubeta vertical en la que se coloca un gel de poliacrilamida entre un gradiente desnaturizante.

En ella se obtiene un patrón de bandas característico de la comunidad (*fingerprinting*). Además se puede obtener información taxonómica con la escisión de las bandas, su re amplificación, y la secuenciación de los productos de esa nueva amplificación, o bien mediante análisis de hibridación con oligonucleótidos marcados específicos para determinados taxones.

En la DGGE se deben considerar las condiciones de la carrera electroforética y la dificultad de comparación de los patrones cuando aparecen muchas bandas, lo que puede hacer necesaria la realización de diversos geles y combinaciones de muestras.

Cuando el número de bandas es grande, diferentes fragmentos de DNA podrían migrar juntos, limitando de esta manera la sensibilidad de la técnica (Sabater et al., 2009).

#### **2.7.3.1. Gel de poliacrilamida**

Los geles de poliacrilamida son preparados por la reacción de la acrilamida (monómero) con N,N'-metilenbis(acrilamida) (entrecruzante, también llamada simplemente bisacrilamida) en presencia de un catalizador y de un iniciador.

Los iniciadores incluyen el persulfato de amonio y el persulfato de potasio, donde el anión  $S_2O_8^{2-}$  se descompone en dos radicales  $SO_4^{\cdot-}$  mientras que el catalizador comúnmente utilizado es tetrametiletilendiamina (TEMED,  $(CH_3)_2N(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ), que reacciona con el radical sulfato para producir una especie radical libre de larga vida.

El tamaño de poro de un gel de poliacrilamida controla la movilidad y la resolución de los componentes de la muestra debido al efecto de tamizado que producen los poros del gel en las especies moleculares.

El tamaño del poro puede ser controlado variando las concentraciones totales del monómero y del entrecruzante, respectivamente (Mikkelsen y Cortón, 2011).

### **2.7.3.2. Gel de agarosa**

La agarosa es un polímero lineal de D-galactosa y de 3,6-anhidrogalactosa que se purifica de algunas algas marinas.

La agarosa contiene cerca de 0,04% de sulfato, se puede disolver en agua hirviendo y forma un gel continuo cuando se enfría por debajo de los 38°C; la estructura del gel es mantenida por uniones tipo puente de hidrógeno.

Como con los geles de poliacrilamida, la concentración de agarosa en el gel determina el tamaño medio de poro.

Los tamaños de poro son mucho más grandes con agarosa que con los geles de poliacrilamida, por lo que cuando es necesario separar y cuantificar ácidos nucleicos o proteínas demasiado grandes se utilizan los geles de agarosa (Mikkelsen y Cortón, 2011).

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.1. Materiales**

Para la realización de los ensayos experimentales se utilizaron equipos, instrumentos y materiales; los cuales se listan en el Anexo A; los mismos incluyen materiales para análisis fisicoquímicos, microbiológicos y moleculares. Los reactivos utilizados para los ensayos se encuentran listados en el Anexo B.

### **3.2. Métodos**

#### **3.2.1. Suelo - Toma de muestra**

Se empleó una muestra proveniente del proyecto de investigación del grupo dirigido por la Dra. Teresa del Panno y la Dra. Irma Morelli. La misma fue preparada bajo las siguientes condiciones:

La muestra seleccionada para el estudio fue un suelo no contaminado de un área cercana a la ciudad de La Plata, Argentina (34°50' S, 58°10' O).

Ésta fue analizada en el Laboratorio de Ciencias del Suelo en la Universidad Nacional de La Plata y mostró las siguientes propiedades fisicoquímicas: un valor de pH de 6,6; 4,67% de carbono orgánico (método de Walkley-Black); 8,05% de materia orgánica del suelo ( $OM(\%)=1,724 \times C(\%)$ ); 3,890 mg/kg de nitrógeno total (digestión húmeda y evaluación por el método Micro Kjeldahl); 4,0 mg/kg fósforo disponible (método n° 1 Bray Kurtz), conductividad eléctrica de  $3,3 \pm 0,3 \text{ dSm}^{-1}$  (en un extracto de pasta saturada) y  $(109,9 \pm 0,9)$  ppm de Fe (extraído con EDTA y determinado de acuerdo con el método EPA 7950).



Las muestras se tomaron de la siguiente manera, primero se buscó un lugar donde no se observara contaminación por residuos sólidos, luego se descartó la primera capa del suelo y se tomó muestra de no más de (10–15) cm de profundidad. Se guardó en bolsas de poliestireno y se llevó al laboratorio. Luego la misma fue tamizada con una malla de 2mm.

Luego del procesado de las muestras de suelo, se colocó la tierra en recipientes adecuados para su almacenamiento. Se contaminó la tierra artificialmente con 10.000 ppm de fenantreno y se dejó en incubadora a 20°C durante 6 meses. Luego se humedeció, se volvió a contaminar varias veces y se dejó a 5°C durante 18 meses. De esta manera se obtuvo tierra contaminada de dos años con atenuación natural.

Para iniciar el estudio se tomó la tierra contaminada artificialmente y se humedeció agregándole agua destilada hasta obtener una humedad del 22,5%, luego se la dejó estabilizar durante 48 horas a 4°C.

### **3.2.2. Suelo - Preparación de microcosmos**

Cada microcosmo consistió en 270 gramos de tierra contaminada con atenuación natural contenidos en frascos de vidrio de 500 mL con tapas no herméticas. Los mismos fueron incubados durante 28 días a  $(24 \pm 2)$  °C; tiempo durante el cual se llevaron a cabo los tratamientos químicos a temperatura y humedad controladas.

### **3.2.3. Tratamientos con oxidantes químicos**

#### **3.2.3.1. Cálculo de la dosis de los oxidantes**

Las dosis de oxidante químico es la cantidad mínima de esta sustancia necesaria para degradar un mol del contaminante a dióxido de carbono y agua. Y se calcula a partir de los electrones que pone en juego el oxígeno para tal fin.

En el caso del Fenantreno, para degradar un mol de este compuesto son necesarios 66 moles de electrones, la ecuación es la siguiente:



Se puede observar la cantidad de moles de electrones necesarios para lograr la mineralización de un mol de fenantreno es de 66 moles de electrones (19). Con este valor y teniendo en cuenta cuantos electrones ponen en juego cada oxidante se obtienen los valores de las dosis teóricas que se encuentran en la Tabla 5; además se detallan las dosis empleadas en el desarrollo de los ensayos.

Tabla 5. Dosis de oxidantes utilizados

Oxidante	Mol de electrones que ponen en juego por mol de oxidante	Dosis empleada	Dosis mínima (Teórico)
PSN	2	0,63 ± 0,08	1:33
H2O2	2	1,3 ± 0,3	1:33
H2O2/Fe:EDTA	2	1,3 ± 0,3	1:33
PSN/Fe:EDTA	2	0,63 ± 0,08	1:33
KMnO4	3	0,63 ± 0,08	1:22

En los ensayos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA se empleó una mayor dosis de este oxidante. Se realizó de esta manera porque se supuso que no afectaría las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo, ya que el peróxido, en el caso que haya excedente, se descompone en oxígeno y agua.

### 3.2.3.2. Persulfato de Amonio (PSN)

Para los ensayos experimentales se prepararon tres microcosmos por cada condición:

Los microcosmos **A**, **B** y **C** (Figura 14, Anexo C) se tomaron como control biológico a los cuales no se les realizó agregado de oxidante.

A cada uno de los microcosmos **D**, **E** y **F** (Figura 15, Anexo C) se le agregaron 1,50 gramos de persulfato de amonio (PSN) equivalentes a 8,25 g PSN/1000 g TS (Tierra Seca) (Mora et al., 2012) teniendo en cuenta la humedad determinada experimentalmente durante el ensayo y la cantidad de tierra húmeda existente en cada microcosmo.

A los microcosmos **G**, **H** e **I** (Figura 16, Anexo C) se les realizaron Agregados Sucesivos del oxidante químico persulfato de amonio (PSNSuc) cada tres días, cuyas cantidades fueron calculadas a partir de la cantidad de tierra húmeda disponible y teniendo en cuenta la humedad de dicho sistema con el objetivo de agregar una cantidad equivalente a 8,25 g PSN/1000 g TS cada tres días.

#### **3.2.3.3. Peróxido de Hidrógeno y Peróxido de Hidrógeno catalizado con Fe(II): EDTA**

A cada uno de los microcosmos **M**, **N** y **O** (Figura 17, Anexo C) se le agregó 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30% (P/V) equivalentes a  $8,82 \times 10^{-3}$  moles de peróxido de hidrógeno. Calculados a partir de los moles de peróxido de hidrógeno equivalentes a los moles contenidos en 8,25 g PSN/1000 g TS.

A cada uno de los microcosmos **P**, **Q** y **R** (Figura 18, Anexo C) se les agregó previamente un catalizador Fe(II) complejo con EDTA en proporción Fe(II):EDTA de (1:1,2) (Saelee y Bunyakan, 2012), luego se agregó 1 mL de peróxido de hidrógeno equivalentes a  $8,82 \times 10^{-3}$  moles de peróxido de hidrógeno; obteniéndose de esta forma las proporciones de oxidante: Fe(II):EDTA de (21:1:1,2).

#### **3.2.3.4. Persulfato de Amonio activado con Fe(II): EDTA y Permanganato de Potasio**

A los microcosmos **AD**, **AE** y **AF** (Figura 19, Anexo C) se agregó una solución de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  complejo con EDTA en relación (1:1,2) de metal: agente complejante (Saelee y Bunyakan, 2012).

Luego se agregó persulfato de amonio (PSN) equivalentes a 8,25 g PSN/1000 g TS, teniendo en cuenta la humedad determinada experimentalmente durante el ensayo y la cantidad de tierra húmeda existente en cada microcosmo.

A cada uno de los microcosmos **AG**, **AH** y **AI** (Figura 20, Anexo C) se agregaron 0,8237 gramos de permanganato de potasio equivalentes en moles de electrones a 8,25 g PSN/1000 g TS (Mora et al., 2012).

### **3.2.4. Análisis fisicoquímicos del suelo**

#### **3.2.4.1. Porcentaje de humedad**

En recipientes adecuados (sin tapa) previamente identificados correspondiente a cada uno de los microcosmos se pesaron aproximadamente 5 gramos de suelo; los mismos se colocaron en estufa a  $(105 \pm 5)$  °C durante 24 horas, luego de transcurrido ese tiempo se determinó el peso final hasta obtener peso constante y se procedió al cálculo del porcentaje de humedad del suelo.

#### **3.2.4.2. pH del suelo**

##### **▪ pH1:1**

Se tomaron muestras de cada uno de los microcosmos y se pesaron aproximadamente 5 gramos de cada una de ellas en un recipiente adecuado con tapa previamente identificados.

Se le agregaron 5 mL de agua bidestilada, se realizó el mezclado utilizando un Vortex, se agitó la muestra durante 5 minutos empleando un Shaker, luego se dejó decantar por 1 hora, y se midió el pH de la solución sobrenadante utilizando un electrodo de vidrio (Figura 21, Anexo C). Se registraron los resultados (Método EPA - 9045D).

##### **▪ pH1:5**

Se pesaron aproximadamente 1 gramo de muestra, se le agregó 5 mL de agua bidestilada y se realizó el mismo procedimiento anterior (Método EPA - 9045D).

### **3.2.4.3. Conductividad eléctrica específica del suelo (CE)**

- **CE1:1**

De cada uno de los microcosmos se pesaron aproximadamente 5 gramos de muestra en recipientes adecuados con tapa previamente identificados, se le agregaron 5 mL de agua bidestilada, se realizó el mezclado utilizando un Vortex, se agitó la muestra durante 5 minutos empleando un Shaker, luego se dejó decantar por 1 hora, y se midió la CE de la solución sobrenadante utilizando para el efecto un electrodo de conductividad (Figura 21, Anexo C). Se registraron los resultados (Método EPA - 9050A).

- **CE1:5**

En el caso en que la conductividad de las muestras (CE1:1) sobrepasaron el valor máximo de conductividad eléctrica que el equipo podía medir se procedió a la dilución de la muestra correspondiente de la siguiente manera: para el efecto se pesaron aproximadamente 1 gramo de muestra, se le agregó 5 mL de agua bidestilada y se realizó el mismo procedimiento anterior (Método EPA - 9050A).

### **3.2.4.4. Concentración de persulfato**

Se pesaron aproximadamente 5 gramos de muestra de cada uno de los microcosmos en recipientes adecuados con tapa previamente identificados, se le agregaron 5 mL de agua bidestilada, se realizó el mezclado utilizando un Vortex, se agitó la muestra durante 5 minutos empleando un Shaker, luego se dejó decantar por 1 hora.

Se tomó la solución sobrenadante y se filtró a través de membrana de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

De este filtrado se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se colocó en un matraz de 10 mL, al cual se le agregó 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla de (0,05 g  $\text{NaHCO}_3$  + 1,0 g KI en 10 mL de agua bidestilada) y se llevó a volumen final con agua bidestilada, se agitó empleando un Vortex y se esperó 15 minutos.

Utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Figura 22, Anexo C) se leyeron las muestras entre 200 y 400 nm empleando celdas de cuarzo, se registraron y tomaron los valores de la absorbancia a 352 nm.

Para calcular la concentración del mismo en las muestras se construyó una curva de calibración. Para ello se prepararon patrones de Persulfato de Sodio, la solución madre se preparó por pesada directa del mismo y las diluciones sucesivas o seriadas se realizaron empleando pipetas automáticas (Liang et al., 2008 (Método modificado)). Límite de detección: 0,05 g Persulfato por Kg de Tierra Seca.

#### **3.2.4.5. Concentración de fenantreno**

En recipientes adecuados, previamente identificados y con tapa se pesaron 1 gramo de muestra de cada uno de los microcosmos y se agregaron 10,0 mL de Acetato de Etilo.

El fenantreno se extrajo por sonicación utilizando un baño ultrasónico Testlab Ultrasonic TB04TA, 40 kHz, 160 W durante 1 hora, después se centrifugaron por 10 minutos y se filtraron empleando filtro de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Se colocaron en viales debidamente identificados y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  a 5°C en el equipo de Cromatografía HPLC- UV (Figura 23, Anexo C), con detector de arreglo de diodos (marca Waters), e inyección automática, la columna utilizada fue Symmetry C<sub>18</sub> (tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm).

Se corrieron las muestras con solventes de corrida compuestos de solución acuosa H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM más metanol con flujo constante de 1mL/min. Las áreas se registraron a 250,9 nm.

Para calcular la concentración de fenantreno en las muestras se construyó una curva de calibración para la cual se preparó una solución madre por pesada directa y luego se realizaron diluciones sucesivas (Mora et al., 2012 (Método modificado)).

Para los patrones se preparó una solución madre de concentración de 100 ppm, a partir de las cuales se prepararon soluciones de 80, 60, 40 y 20 ppm.

### **3.2.5. Análisis microbiológico del suelo**

#### **3.2.5.1. Bacterias heterótrofas cultivables**

Se pesaron 10 gramos de tierra y se trasvasaron a un matraz Erlenmeyer conteniendo 90 mL de solución fisiológica (Anexo D) previamente esterilizados por autoclave (Anexo D) (solución de concentración -1) (Figura 24, Anexo C). Se agitaron durante 30 minutos a 30°C.

Se tomó 100 µL de la solución (-1) y se lo colocó en un tubo Eppendorf® conteniendo 900 µL de solución fisiológica y se agitó utilizando un Vortex (solución de concentración -2) (Figura 25, Anexo C).

De esta solución de concentración (-2) se tomó nuevamente 100 µL y se repitió el procedimiento anterior, se siguió el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución (-6) (Figura 26, Anexo C).

Se sembraron por duplicado 100 µL de cada una de las diluciones en placas de Petri conteniendo medio de cultivo R2A (Anexo D), (Figura 27, Anexo C). Se distribuyó la muestra cuidadosamente utilizando una espátula de Drigalsky (Figura 28, Anexo C).

Se incubaron las muestras a  $(24 \pm 2)$  °C durante 7 días, pasado ese tiempo se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Las placas tomadas como válidas fueron aquellas que presentan entre 30 y 300 UFC (Figura 29, Anexo C). Se calcularon las UFC por mL de muestra (Reasoner y Geldreiche, 1985).

### **3.2.5.2. Bacterias degradadoras de PAH**

Se pesaron 10 gramos de tierra y se trasvasaron a un matraz Erlenmeyer conteniendo 90 mL de solución fisiológica previamente esterilizados por autoclave (solución de concentración -1). Se agitaron durante 30 minutos a 30 °C (Figura 24, Anexo C).

Se tomaron 100 µL de la solución (-1) y se colocaron en un tubo Eppendorf® conteniendo 900 µL de solución fisiológica y se agitaron utilizando un Vortex (solución de concentración -2). De esta solución de concentración (-2) se tomó nuevamente 100 µL y se repitió el procedimiento anterior, se siguió el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución (-6) (Figura 30, Anexo C).

Se emplearon policubetas (Microtiter fondo plano bolsa unitaria) (Figura 31, Anexo C) en las cuales a cada pocillo se incorporaron 20 µL de solución patrón (mezcla de PAH en pentano; Anexo D) con 180 µL de medio mineral líquido (Anexo D), a las cuales se agregó 20 µL de las diluciones seriadas (1/10) por octuplicado (Bogardt y Hemmingsen, 1992).

Estas muestras se incubaron a  $(24 \pm 2)$  °C durante 21 días. Al finalizar este periodo se registraron los pocillos positivos en los cuales se observaron coloración amarillo–naranja a marrón debido a la acumulación de los productos parciales de oxidación de los sustratos poliaromáticos (Figura 32, Anexo C).

Con los datos obtenidos se calculó el valor de Log del Número Más Probable (NMP) por gramo de suelo seco, mediante un programa de computadora que acepta la combinación de réplicas y diluciones en tablas.

Los resultados se expresaron como Log del NMP de bacterias degradadoras de PAH por gramo suelo seco (Lors et al., 2010).



### **3.2.6. Análisis molecular**

#### **3.2.6.1. Extracción de DNA de los microorganismos presentes en el suelo**

Para la extracción de DNA de los microorganismos presentes en la muestra de suelo se realizaron sobre aproximadamente 1,0 g de muestra siguiendo los pasos descritos en el manual del Kit OMEGA (Anexo D).

Los extractos de DNA obtenidos se colocaron en tubos estériles adecuados y se guardaron en el congelador a -80°C hasta el momento de la amplificación.

#### **3.2.6.2. Amplificación del extracto de DNA - PCR**

Para la amplificación del DNA extraído se procedió a la preparación de la mezcla para la reacción de polimerización en cadena.

El 16S rDNA fue amplificado utilizando primers para eubacteria 341F (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCCTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') (Mora et al., 2012).

La reacción de PCR contenía 2 µL de DNA, 0,12 µL de polimerasa Taq, 6,0 µL de buffer, 2,4 µL de dNTPs, 0,6 µL de albúmina, 12,88 µL de agua bidestilada estéril y 3,0 µL de cada uno de los primers completando un volumen total de 30,0 µL de mezcla.

La amplificación fue realizada en el Termociclador (Figura 33, Anexo C) usando el programa de PCR. Este incluía un paso inicial de desnaturalización por 4 minutos a 95°C, el primer paso del ciclo a 94°C por 30 segundos; 62°C por 40 segundos y 1 minuto a 72°C (10 ciclos) seguidos por pasos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C y 72°C por 1 minuto (25 ciclos). La extensión final fue llevada a cabo a 72°C durante 10 minutos.

El producto de la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa. Este gel se preparó agregando 0,36 g de agarosa en 30 mL de buffer TAE 1X (Anexo D), el cual se fundió empleando un microondas.

El gel se colocó en una cama para preparar geles para electroforesis (Figura 34, Anexo C) y se lo dejó solidificar.

Una vez terminado la preparación del gel se colocó en una cuba electroforética (Figura 35, Anexo C), se lo cubrió con suficiente buffer TAE 1X y se sembró 5  $\mu$ L de cada una de las muestras. Se empleó un voltaje de 100 V y las muestras corrieron durante 30 minutos.

Cuando terminó la corrida se retiró de la cuba electroforética y se lo tiñó con una solución de bromuro de etidio por unos minutos, luego se retiró el exceso enjuagando el gel con agua y el mismo se observó bajo la luz ultravioleta.

### **3.2.6.3. DGGE**

La DGGE se realizó utilizando el equipo DGGE-2401 (C.B.S Scientific Co., Del mar, CA, USA) (Figura 36, Anexo C). Para el mismo, el producto de amplificación de la PCR fue sembrado directamente en gel de poliacrilamida 6% (P/V) (acrilamida N,N'-metilen-bisacrilamida, 37,5:1).

El gel contenía un gradiente desnaturizante lineal de (40 – 75) % (100% del desnaturizante corresponde a 7M de urea y 40% (P/V) de formamida). La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X (40 mM Tris (pH 8,1), 20 mM de ácido acético, 1mM de Na<sub>2</sub>EDTA) a una temperatura de 60 °C.

Una pre-corrída fue llevada a cabo a 50 V durante 30 minutos, seguida por la corrida principal a un voltaje constante de 100 V durante 16 horas.

Luego de la electroforesis el gel fue teñido durante 30 minutos con SYBR Gold al cual se fotografió con un sistema de documentación de imágenes (Bio – Rad; Hercules, CA, USA) (Figura 37, Anexo C).

### **3.2.7. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca Sativa*. Efecto en la germinación**

Se prepararon diluciones de muestras de suelo de cada uno de los microcosmos pesando 30 g de suelo en recipientes adecuados y se agregaron 30 mL de agua destilada (Sol. 100%), se agitó y se dejó reposar por aproximadamente 5 minutos. A partir de esta solución madre (100%) se realizaron diluciones al 50, 25, 10 y 5%.

De cada una de estas soluciones de 100, 25, 10 y 5%, se sembraron 5 mL en una placa de Petri de 100 mm de diámetro, la cual contenía papel de filtro de 90 mm de diámetro de porosidad adecuada y de buena capacidad de retención del líquido.

Se agregó 20 semillas de lechuga (*Lactuca Sativa* Lechuga variedad mantecosa) (Figura 38, Anexo C) a cada una de las placas que contenían la muestra. Se prepararon dos blancos empleando 5 mL de agua destilada y se procedió de la misma forma que para las muestras (Figura 39, Anexo C).

Una vez completado el procedimiento de la siembra de semillas, se colocaron las mismas en la incubadora a 24°C durante 120 horas (5 días) al abrigo de la luz.

Terminado el periodo de exposición se realizó el conteo del número de semillas que germinaron normalmente considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula (Figura 40, Anexo C) y las mismas se registraron para calcular el porcentaje de inhibición en la germinación (Sobrero, 2004 (Método modificado)).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 2 se presenta como varían los valores de pH de cada sistema en el transcurso del tiempo de acuerdo al tipo de tratamiento aplicado: PSN, PSN Suc,  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2/Fe:EDTA$ , PSN/ $Fe:EDTA$ ,  $KMnO_4$  y el control biológico: BioD.

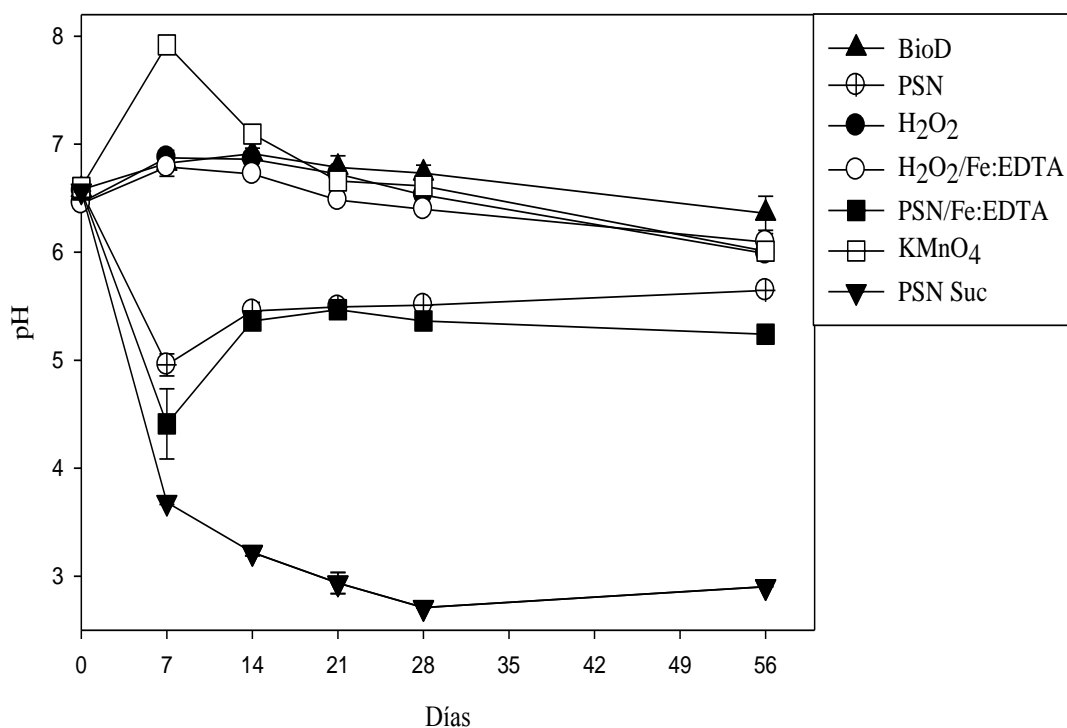


Figura 2. Valores de pH del suelo vs días.

Se puede apreciar que en los sistemas tratados con  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2/Fe:EDTA$  los valores de pH no varían con respecto al control biológico (BioD).

El sistema tratado con  $KMnO_4$  presenta un aumento de pH a un valor de 7,92 a los 7 días del ensayo.

Este mismo comportamiento en el aumento del pH lo observaron Sirguy et al. (2008) y fue atribuido por estos autores al incremento del área de superficie específica y a la capacidad de intercambio catiónico en relación a la precipitación del dióxido del manganeso.

Sin embargo en los días posteriores los valores de este parámetro se mantuvieron sin variaciones significativas con respecto al BioD.

En cuanto a los sistemas tratados con PSN y PSN/Fe:EDTA se observa un brusco descenso en los valores de pH al inicio del tratamiento. Luego de los 7 días del ensayo, hay un pequeño aumento del mismo.

La capacidad buffer del suelo logró contrarrestar la perturbación que han realizado estos oxidantes, lo cual permitió que se restablezca el valor de pH manteniéndose en valores entre 5 y 6 en la etapa final de los tratamientos.

En el caso correspondiente al tratamiento con el agrado sucesivo de persulfato de amonio (PSN Suc) se observa que a partir del día 7 del tratamiento el pH se encuentra en valores por debajo de 4, llegando a un pH de 2,7 el día 28.

Este mismo comportamiento fue observado en ensayos realizados por Mora et al. (2012) en el cual este fenómeno se atribuye a la ruptura de la capacidad buffer del suelo por el agregado de elevadas concentraciones de este oxidante, por lo que el sistema no logra recuperarse, obteniéndose de esta forma un suelo fuertemente ácido al término de este tratamiento.

El incremento de la concentración de amonio y la absorción de la misma por las partículas presentes en el suelo que tienen como consecuencia la liberación de protones gracias al fenómeno de intercambio iónico también podrían ser la causa la baja de los valores de pH (Rengel, 2003).

En ensayos realizados por Liang et al. (2007) suponen que el descenso del pH podría ser resultado de la descomposición de los iones persulfato.

En la Figura 3 se observa como varían los valores de la conductividad eléctrica de cada sistema para los diferentes tratamientos aplicados y el control biológico durante el periodo del ensayo.

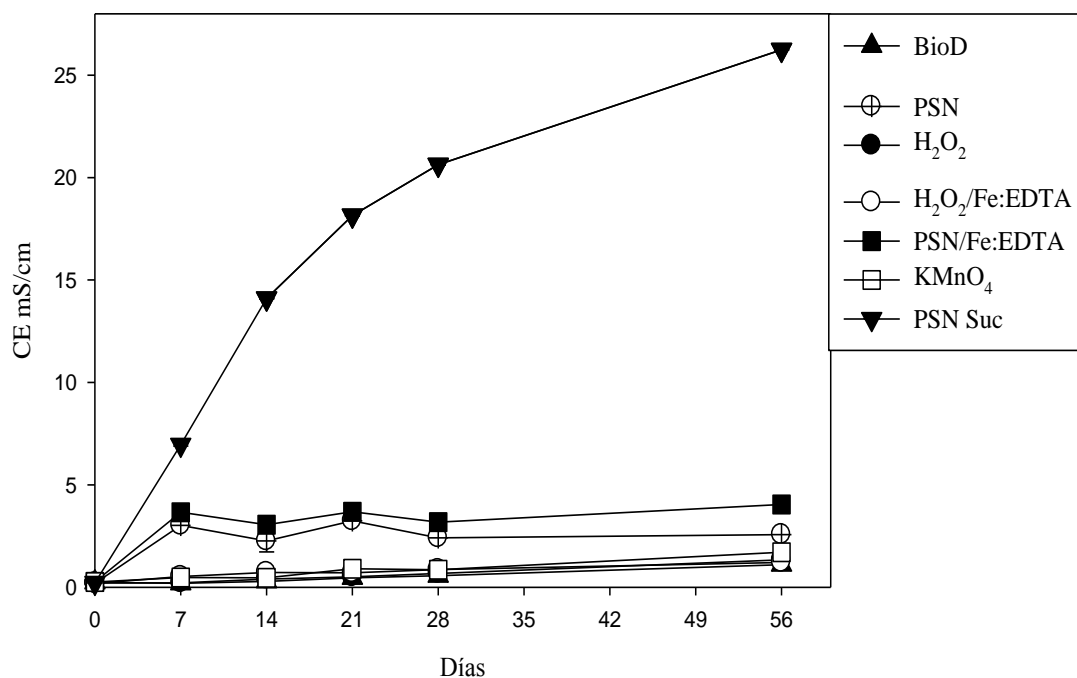


Figura 3. Valores de Conductividad Eléctrica vs días.

Los sistemas tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA y KMnO<sub>4</sub> no presentan cambios en los valores de CE y se comportan de manera similar al BioD.

Con respecto a los sistemas tratados con PSN y PSN/Fe:EDTA presentan un pequeño aumento en la CE con respecto al BioD.

El uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA y KMnO<sub>4</sub> en las cantidades agregadas en estos sistemas parecen no afectar de forma apreciable las propiedades fisicoquímicas del suelo, ya que el pH y la CE durante los tratamientos presentan valores comparativos con los del control biológico.

En el tratamiento con PSN Suc se observa un aumento brusco en los valores de la CE los cuales se incrementan durante el transcurso del tratamiento.

A partir del día 14 del tratamiento los valores de CE fueron medidos en diluciones (1:5). Es de esperar que los valores de CE aumenten porque se estuvo incorporando iones al sistema cada tres días durante el periodo del ensayo.

Este fenómeno observado trae aparejado un aumento de la salinidad del sistema como consecuencia del agregado de concentraciones elevadas de persulfato de amonio (Mora et al., 2012).

El aumento de la salinidad afecta a la composición de la comunidad microbiana del suelo y la solubilidad del fenantreno en la fase acuosa evidenciadas en los valores elevados de los porcentajes de inhibición en la germinación de las semillas de lechuga (Mora et al., 2012).

En la Figura 4 se muestran las curvas normalizadas de las concentraciones de fenantreno de cada uno de los distintos tratamientos aplicados durante el periodo del estudio.

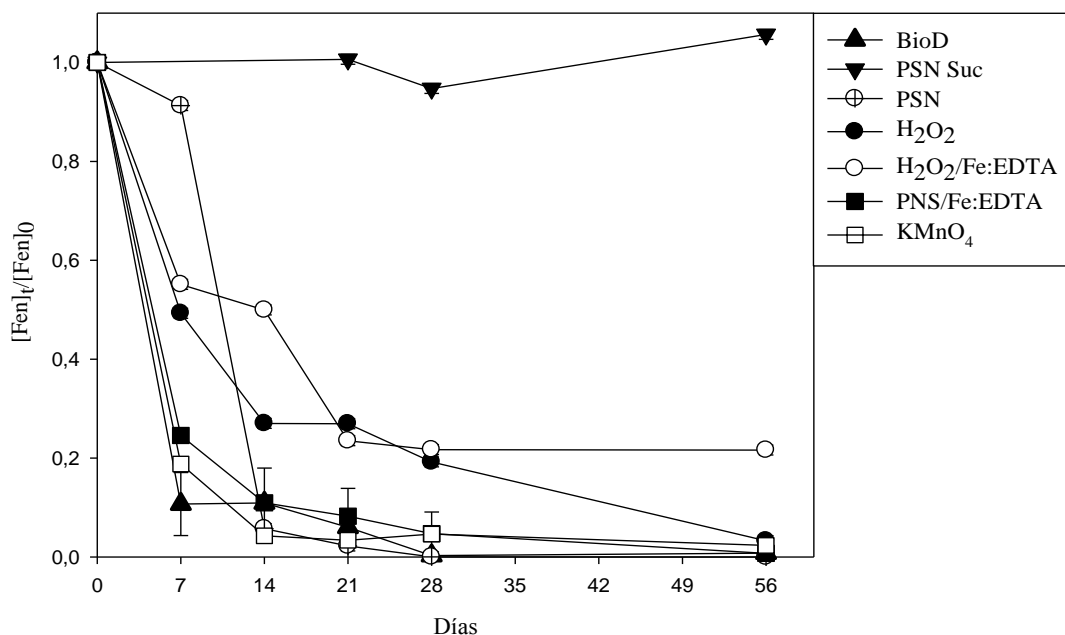


Figura 4. Curvas de concentración de fenantreno normalizadas.

Se puede observar que el ensayo BioD es el que mayor degradación (mayor al 80% a los 7 días) ha tenido en menos tiempo.

Esto se debe a que a pesar de haber atenuado el suelo durante dos años, el contaminante, igualmente, quedó biodisponible, es decir accesible a las bacterias.

Debido a esto, el control biológico se usará como blanco de los otros tratamientos; es decir nos indica las condiciones normales de este suelo.

El objetivo de esta tesis es comparar entre si los tratamientos químicos, y decidir entre ellos cual sería la mejor opción en el caso que la biorremediación no pueda degradar más el contaminante.

En el sistema PSN Suc no se logró la degradación del fenantreno, puesto que 56 días después de haber iniciado el tratamiento, se encontraba aún 100% de la concentración inicial de este.

Esto podría deberse a que el PSN, en vez de oxidar al fenantreno, haya reaccionado con la matriz orgánica del suelo y además como su agregado trae aparejado condiciones muy ácidas las bacterias degradadoras de PAH no hayan sobrevivido, por lo tanto la metabolización de estos hidrocarburos fue despreciable. Cambios bruscos de pH y conductividad llevan a un impacto negativo sobre los procesos de biorremediación.

Los sistemas  $H_2O_2$  y  $H_2O_2/Fe:EDTA$  (cuya dosis oxidante/contaminante fue superior a los otros tratamientos) en general describen comportamientos similares entre sí, ya que al día 7 del tratamiento ambos degradan aproximadamente el 50% del fenantreno presente.

Pero difieren en que el sistema  $H_2O_2$  logra una degradación de casi 100% a los 56 días y el de  $H_2O_2/Fe:EDTA$  logra la degradación de aproximadamente 80%.

No muestran mejoría respecto de los otros tratamientos, esto se puede deber a que un exceso de radicales  $OH^\bullet$ , hayan atacado a la materia orgánica del suelo y no al contaminante, ya que estos radicales son agentes oxidantes fuertes no selectivos (Ferrarese et al., 2008).



Estos autores suponen que elevadas concentraciones de estos oxidantes pueden promover un autoconsumo de los mismos dando como resultado una menor eficiencia en la oxidación del compuesto a ser degradado.

En la Figura 5 se puede observar los espectros obtenidos en la determinación de persulfato de amonio (PSN).

Este espectro es resultado de la formación del complejo de los iones persulfato presentes en una solución acuosa de los mismos, con los iones yoduro en presencia de bicarbonato de sodio.

Los espectros corresponden a un patrón de PSN y a los extractos acuosos de las muestras de 7 días de los tratamientos con PSN y PSN suc.

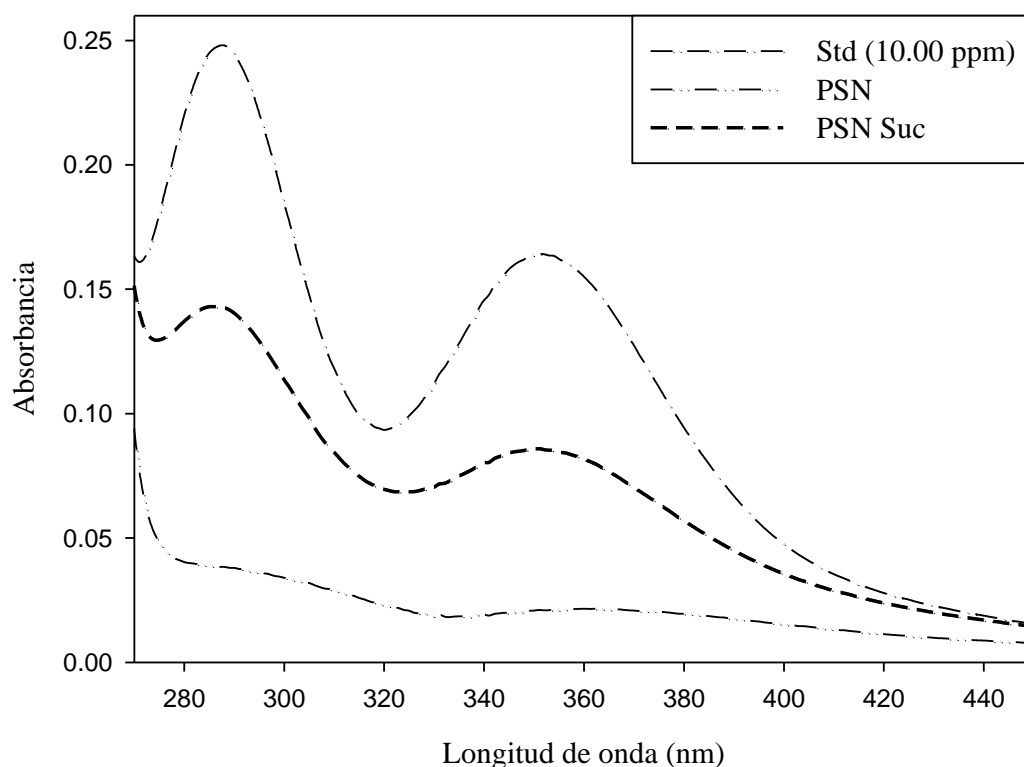


Figura 5. Espectros de absorción de PSN.

Se observa además que, hay una cantidad apreciable de PSN en la muestra de PSN Suc pero no así en la de PSN puesto que no presenta la banda de 352 nm (similar a la del estándar).

Se puede decir entonces que todo el persulfato se consumió durante esos primeros siete días del tratamiento. Por lo cual, la degradación del contaminante a tiempos mayores es debido a la biodegradación.

Volviendo a la Figura 4 se puede decir que en el caso de PSN, la degradación a los 7 días fue del 10% (degradación química), ya no se encuentra persulfato en los sistemas; a la misma conclusión llegaron Mora et al. (2012).

Luego de este tiempo la biorremediación es la responsable de la oxidación del 90% del contaminante.

Se puede concluir que a pesar de las perturbaciones fisicoquímicas que sufre el suelo por el agregado de PSN, los microorganismos no parecen ser afectados.

Las tendencias de los sistemas  $\text{KMnO}_4$  y PSN/Fe:EDTA demuestran que los dos tratamientos tienen el mismo comportamiento que el BioD a partir del día 7.

En cambio, el sistema tratado con PSN el día 7 del tratamiento contiene aún más del 90% de la concentración inicial del fenantreno, el cual a partir del día 14 se comporta de manera similar al BioD.

En la Tabla 6 se listan los valores de los Log UFC/gTS correspondientes a los recuentos de las Bacterias heterótrofas cultivables y los valores de los Log NMP/gTS correspondientes a los recuentos de las Bacterias degradadoras de PAH; a los días 0, 7 y 28 de los ensayos de acuerdo a los distintos tipos de tratamientos aplicados a los sistemas.

Tabla 6. Tabla de los valores de los Log UFC/gTS y de los Log NMP/gTS para los distintos tratamientos a los 0, 7 y 28 días.

Tratamiento	Log UFC/gTS			Log NMP/Gts		
	Día 0	Día 7	Día 28	Día 0	Día 7	Día 28
BioD	8,9 ± 0,2	9,0 ± 0,5	8,4 ± 0,2	4,5 ± 0,9	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1
PSN	8,5 ± 0,2	8,4 ± 0,2	8,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	4,4 ± 0,6
PSN Suc	8,5 ± 0,2	6,4 ± 0,7	5,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1	0,56 ± 0,01
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9,2 ± 0,1	9,2 ± 0,1	8,1 ± 0,1	4,2 ± 0,3	4,2 ± 0,2	5,3 ± 0,6
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe:EDTA	9,2 ± 0,1	9,3 ± 0,1	8,5 ± 0,1	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,2	7,6 ± 0,7
PSN/Fe:EDTA	9,1 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,3 ± 0,2	6,2 ± 0,9	7,6 ± 0,2	3,6 ± 0,4
KMnO <sub>4</sub>	9,1 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,4 ± 0,1	6,2 ± 0,9	6,7 ± 0,7	4,3 ± 0,3

Para los tratamientos PSN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA, PSN/Fe:EDTA y KMnO<sub>4</sub>, el recuento de las bacterias heterótrofas cultivables fueron similares a los del BioD durante el periodo de los ensayos.

El uso de estos oxidantes en las dosis aplicadas no parece afectar a los microorganismos. Sin embargo no fue así para el tratamiento con PSN Suc sobre el cual se puede decir en términos generales que la cantidad de oxidante agregado en este tratamiento químico resulta tóxico para las bacterias presentes en el suelo.

Esto podría ser debido a los altos valores en la conductividad eléctrica provocado por el exceso de iones; y/o también sería como resultado de los valores extremadamente bajos de pH del suelo, los cuales afectan marcadamente el crecimiento y el desarrollo de los microorganismos en esas condiciones y por ende la actividad microbiológica del suelo que sería la principal causa por la cual no se obtuvo la degradación del fenantreno en el tratamiento con PSN Suc.

A los 28 días del tratamiento con PSN Suc, en el sistema hay muy pocas bacterias degradadoras de PAH. En cuanto al sistema tratado con PSN, el mismo presenta valores de Log NMP/gTS similares al BioD dentro del error experimental. Por lo cual el agregado sucesivo de este oxidante químico en las cantidades suministradas al sistema resulta ser tóxico para los microorganismos.

Se sabe que solo un pequeño porcentaje de las bacterias heterótrofas cultivables son capaces de degradar hidrocarburos específicos lo que hace que la densidad de la población de estos microorganismos especializados sea baja. Al estar expuestos al estrés oxidativo estas bacterias degradadoras de PAH no sobreviven porque ellas están genéticamente diseñadas para sobrevivir en presencia de hidrocarburos pero no para adaptarse a condiciones extremas de salinidad y acidez del suelo.

El mismo efecto tóxico se puede observar sobre la germinación de las semillas de lechuga, a las cuales el tratamiento con PSN Suc provoca un 100% de inhibición en la germinación de las mismas (Figura 6).

Los sistemas tratados con  $H_2O_2$  y  $H_2O_2/Fe:EDTA$  presentan valores de Log NMP/gTS próximos a los encontrados en el BioD, excepto en el día 28 del tratamiento, en el cual se puede observar un mayor valor de este parámetro. Como supusimos antes de realizar estos ensayos las dosis empleadas de estos oxidantes químicos no afectaron significativamente las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas pero tampoco mejoraron la degradación de fenantreno.

Se puede concluir que para un tratamiento durante 28 días los agentes oxidantes más efectivos son: el PSN/Fe:EDTA,  $KMnO_4$  y el PSN; los cuales a partir del día 14 degradan más del 90% de la concentración inicial del fenantreno sin afectar significativamente el número de la población microbiana del sistema.

En la Figura 6 se observan los porcentajes de inhibición en la germinación de semillas de lechuga *Lactuca Sativa* para cada sistema durante el periodo de tratamiento.

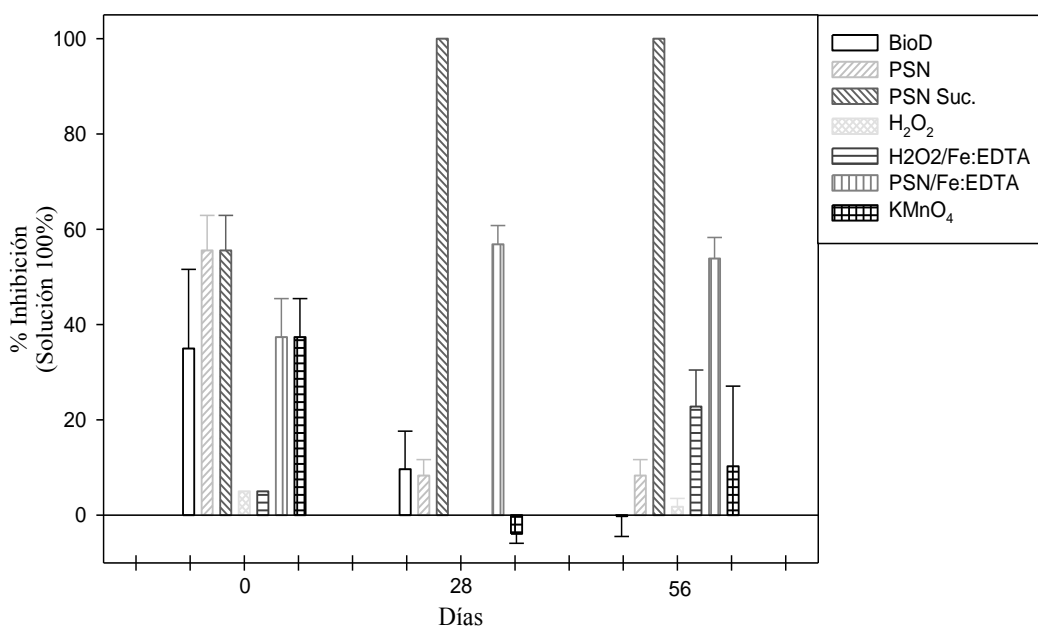


Figura 6. Porcentaje de Inhibición vs Días.

Los porcentajes de inhibición correspondientes a las soluciones 100% de cada sistema en los días 0, 28 y 56 muestran que el BioD no presenta porcentajes de inhibición mayores al 35% durante el periodo del tratamiento.

En cuanto al tratamiento con PSN Suc se ve que presentó un 100% de inhibición en la germinación de las semillas los días 28 y 56, le siguen en orden decreciente el tratamiento con PSN/Fe:EDTA. Esto podría ser debido al contenido elevado de iones, también se podría deber a los valores muy bajos del pH del suelo o directamente por la presencia del fenantreno en concentraciones elevadas que resultan tóxicas para las semillas.

Los sistemas tratados con PSN y  $\text{KMnO}_4$  presentan inhibición en el día inicial (donde solo estaba presente el fenantreno), pero en el día 56 de los ensayos presentan porcentajes de inhibición menores al 10%.

En el caso del tratamiento con  $\text{KMnO}_4$ , en el día 28 del mismo se presenta una estimulación en la germinación de las semillas. En ensayos llevados a cabo por Sirguy et al. (2008) los efectos positivos fueron atribuidos a la disminución de la hidrofobicidad del suelo y la subsecuente disponibilidad del agua.

El tratamiento con PSN presenta un porcentaje de inhibición menor al 10%. Esto se puede deber a los valores de pH menores a los valores correspondientes al pH natural del suelo que es próximo a la neutralidad.

En la Tabla 7 se dan los valores de algunos parámetros para los diferentes tratamientos aplicados.

Tabla 7. Resumen de los valores iniciales y finales de algunos de los parámetros.

Tratamiento	Inicial (0 días)				Final (28 días)				
	pH	CE (mS/cm)	Log UFC/gTS	Log NMP/gTS	pH	CE (mS/cm)	Log UFC/gTS	Log NMP/Gts	% Fenantreno degradado
<b>BioD</b>	6,6 ± 0,5	0,18± 0,03	8,9 ± 0,2	4,5 ± 0,9	6,6 ± 0,5	0,52 ± 0,04	8,4 ± 0,2	4,4 ± 0,1	99,7 ± 0,1
<b>PSN</b>	6,6 ± 0,5	0,20± 0,03	8,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	5,5 ± 0,5	2,41 ± 0,07	8,5 ± 0,1	4,4 ± 0,6	99,9 ± 0,1
<b>PSN Suc.</b>	6,6 ± 0,5	0,22± 0,01	8,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	2,7 ± 0,5	20,63 ± 0,05	5,1 ± 0,1	0,56 ± 0,01	5,5 ± 0,1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	6,5 ± 0,5	0,21± 0,01	9,2 ± 0,1	4,2 ± 0,3	6,5 ± 0,5	0,67 ± 0,05	8,1 ± 0,1	5,3 ± 0,6	80,8 ± 0,1
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe: EDTA</b>	6,5 ± 0,5	0,19± 0,01	9,2 ± 0,1	4,1 ± 0,3	6,4 ± 0,5	0,86 ± 0,03	8,5 ± 0,1	7,6 ± 0,7	78,3 ± 0,1
<b>PSN/Fe: EDTA</b>	6,6 ± 0,5	0,26± 0,03	9,1 ± 0,1	6,2 ± 0,9	5,4 ± 0,5	3,18 ± 0,03	8,3 ± 0,2	3,6 ± 0,4	95,3 ± 0,1
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	6,6 ± 0,5	0,25 ± 0,02	9,1 ± 0,1	6,2 ± 0,9	6,6 ± 0,5	0,86± 0,08	8,4 ± 0,1	4,3 ± 0,3	95,4 ± 0,1

En base a los valores de los parámetros físicos, químicos, microbiológicos y toxicológicos obtenidos antes y después de haber aplicado cada tratamiento se pudo evaluar la efectividad y conveniencia de utilizar este método para cumplir con el objetivo de la descontaminación del suelo y sobre todo su remediación; es decir, si este suelo luego de pasar por todos los procesos de oxidación son capaces de seguir manteniendo la vida y el desarrollo de los microorganismos.

Como se pueden observar en la Tabla 7, se comparan los valores correspondientes a cada sistema antes de comenzar con los ensayos y se los comparan con los valores obtenidos a los 28 días del tratamiento.

En el ensayo con PSN no hubo cambios significativos en los recuentos tanto de bacterias heterótrofas cultivables (Figura 7) como los de las bacterias degradadoras; pero si un leve descenso en el valor del pH que no produjo efectos negativos sobre los microorganismos presentes logrando así casi el 100% de la degradación del fenantreno. Sin embargo se produjo un aumento considerable en el valor de la conductividad eléctrica lo cual no afecto el crecimiento y desarrollo de los microorganismos en este sistema.

En el día inicial del tratamiento presentó un porcentaje de inhibición de aproximadamente 60%, el cual disminuyó a menos del 10% durante y al término del tratamiento donde se constató que la degradación de fenantreno ocurrió casi en la totalidad.

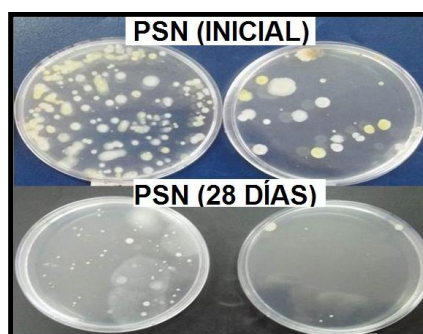


Figura 7. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con PSN.

A pesar que el valor de las bacterias heterótrofas cultivables no varió durante el ensayo, lo que sí cambio fue la diversidad ya que al principio, se



encontraban presentes colonias blancas y amarillas, que tenían morfologías distintas; las cuales yo no se encuentran presentes en la muestra al término del tratamiento.

El número de las bacterias degradadoras mostró un pequeño aumento respecto al número de las mismas en el estado inicial de los ensayos; esto demostraría que el agregado de este oxidante, en las condiciones de este ensayo y en la concentración empleada, no afectó el desarrollo y crecimiento de las mismas permitiendo a estos microorganismos degradar el fenantreno.

En el tratamiento de  $\text{KMnO}_4$  no se produjeron cambios apreciables en cuanto al pH y la CE. Los recuentos de las bacterias heterótrofas y las bacterias degradadoras no disminuyeron. En la Figura 8 se puede observar que la diversidad no ha cambiado. Los valores de los recuentos para las bacterias heterótrofas cultivables y degradadoras de PAH no mostraron cambios significativos en los valores de estos recuentos con respecto a los del BioD.

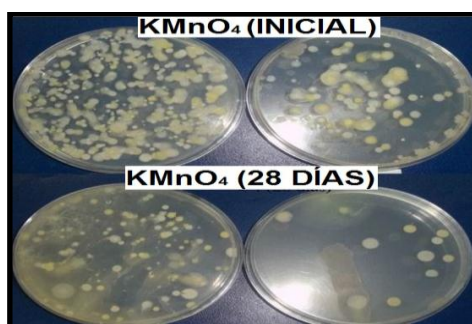


Figura 8. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con  $\text{KMnO}_4$ .

Se obtuvo un porcentaje de degradación de fenantreno de más del 95% de la concentración inicial. El porcentaje de inhibición en los días iniciales del tratamiento fue de casi un 40% lo que al final del tratamiento resultó en una estimulación para la germinación de las semillas que pudo ser resultado de la degradación del fenantreno.

En los ensayos con PSN/Fe:EDTA se produjo un descenso leve del pH, de los recuentos de las bacterias heterótrofas y en especial de las bacterias degradadoras. Esto pudo deberse a la disminución del pH, también se produjo un aumento en los valores de la CE lo que también pudo influir en la disminución de los recuentos de estas bacterias.

A pesar de estos cambios se obtuvo un buen porcentaje de degradación del fenantreno el cual era uno de los objetivos principales del trabajo. Este oxidante provoca sobre las semillas un porcentaje de inhibición en la germinación de las mismas de más del 60%.

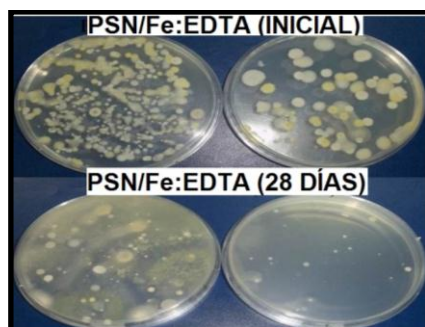


Figura 9. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con PSN/Fe:EDTA.

En cuanto al empleo de los oxidantes  $H_2O_2$  y  $H_2O_2/Fe:EDTA$  también resultan en un porcentaje de degradación importante del fenantreno. En ambos casos los cambios en el pH, la CE y los valores de los recuentos son despreciables a lo largo de todo el tratamiento. Sin embargo en los Figuras 10 y 11 se puede apreciar que la diversidad ya no es la misma que al comienzo de los ensayos.

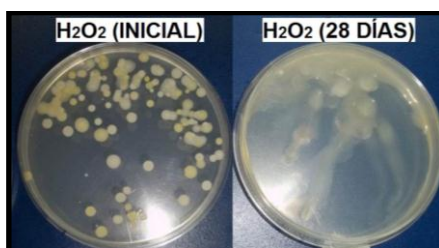


Figura 10. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con  $H_2O_2$ .

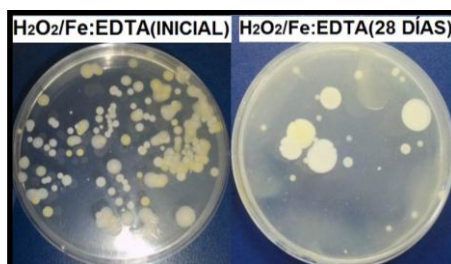


Figura 11. Bacterias heterótrofas cultivables. Tratamiento con  $H_2O_2/Fe:EDTA$ .

Estos dos ensayos demostraron no ser tóxicos para la germinación de las semillas puesto que no provocaron porcentajes de inhibición apreciables lo cual es bueno porque con estos tratamientos se logra la recuperación del suelo.

Por último el ensayo empleando PSN Suc es el que más afecta las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo ya que modifica en gran medida el pH, la CE y los recuentos de las bacterias tanto las heterótrofas cultivables como las degradadoras.

También presenta extremada toxicidad para las semillas provocando en ellas 100% de inhibición en la germinación de las mismas. Además de todo esto no degrada al fenantreno como era de esperarse y su empleo provoca modificaciones en las comunidades y poblaciones microbianas.

Los análisis de PCR – DGGE nos demuestran que los microorganismos presentan pequeñas diferencias en sus bandas respecto a las del control biológico; esto es evidencia de la selección natural de estas bacterias para adaptarse al factor de estrés introducido en el ecosistema del suelo, lo que permitió que ellas puedan adecuarse a las nuevas condiciones e hizo que la diversidad de las poblaciones de las mismas cambien tal y como se muestra en las Figuras 12 y 13.

En la Figura 12 las calles pertenecen a los siguientes tratamientos:

O5 (28 días), N3 (14 días).	Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
I3 (14 días)	Tratamiento con PSN Suc
L5 (28 días), L3 (14 días), J1 (inicial)	Control biológico
B5 (28 días), B3 (14 días), B1 (inicial)	
C+ (Control positivo)	Patrón positivo de la DGGE

En la Figura 13 las calles corresponden a:

N3 (14 días).	Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
P3 (14 días)	Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe:EDTA
AH3 (14 días), AI5 (28 días)	Tratamiento con KMnO <sub>4</sub>
AF5 (28 días), AD3 (14 días)	Tratamiento con PSN/Fe:EDTA
AB5 (28 días), AA3 (14 días) y AA1 (inicial)	Control biológico

En las fotografías de los geles de la DGGE de las Figuras 12 y 13 se observan las bandas (**BB**) de los fragmentos de DNA de los microorganismos presentes en cada sistema de los cuales se pudo lograr la amplificación y obtener una concentración suficiente de DNA para este análisis.

En la Figura 12 como es de esperarse todos los controles biológicos [L5 (28 días), L3 (14 días), J1 (inicial), B5 (28 días), B3 (14 días) y B1 (inicial)] presentan las mismas bandas (BB1, BB3 y BB4).

Los microorganismos presentes en cada sistema con su tratamiento no presentan bandas cuyas diferencias con las del control sea muy marcada. Estas diferencias con respecto a las de las calles de B1 (inicial) y B3 (14 días) son las (BB2, BB5 y BB6). Estos tratamientos corresponden al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: O5 (28 días) y N3 (14 días); pero son similares a las bandas del Control biológico: L5 (28 días), L3 (14 días), J1 (inicial) y B5 (28 días).

En la Figura 13 las bandas (BB7, BB8, BB9 y BB10) están presentes tanto en los controles biológicos [AB5 (28 días), AA3 (14 días) y AA1 (inicial)] como en los sistemas tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> N3 (14 días), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA: P3 (14 días), PSN/Fe:EDTA: AF5 (28 días) y AD3 (14 días); en los ensayos con KMnO<sub>4</sub>: AH3 (14 días) y AI5 (28 días).

El agregado de estos oxidantes al suelo no provoca cambios importantes en la estructura del DNA de los mismos, a excepción de las correspondientes a microorganismos presentes en el sistema tratado con PSN Suc. Los fragmentos de DNA de los microorganismos de este tratamiento solo presentan las bandas (BB3 y BB4) del I3 (14 días) en común pero muy tenues con respecto a los controles biológicos.

Se puede decir que gran parte de los microorganismos presentes antes del tratamiento seguían presentes luego del término de la misma en todos los ensayos realizados excepto con el PSN Suc.

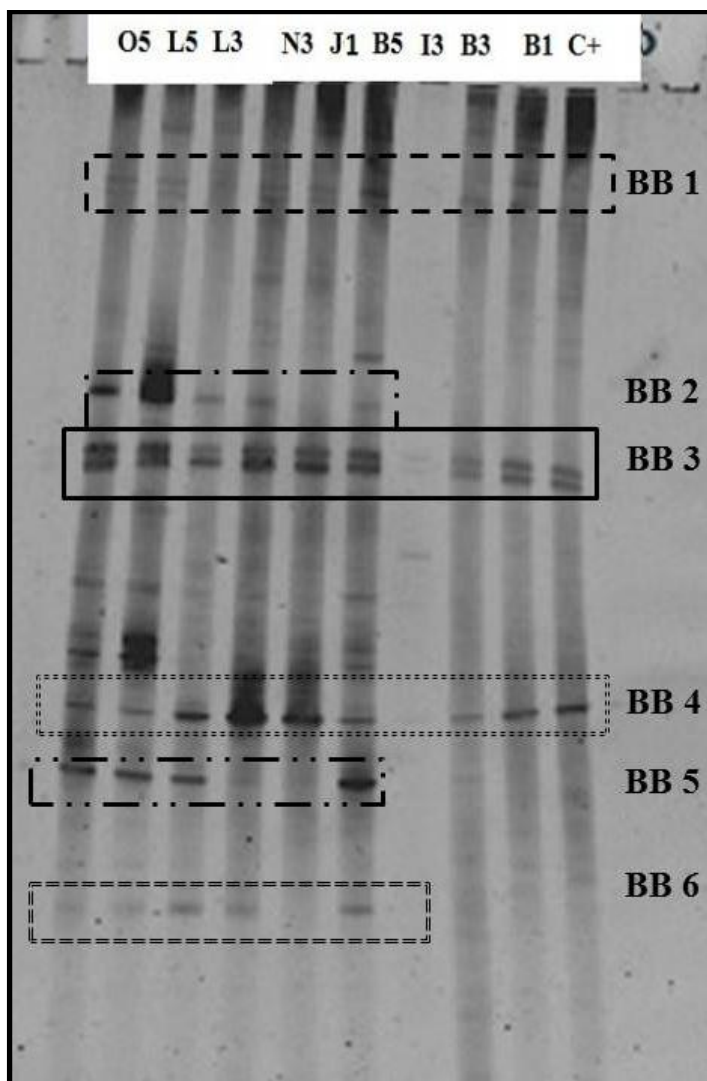


Figura 12. Análisis por DGGE.

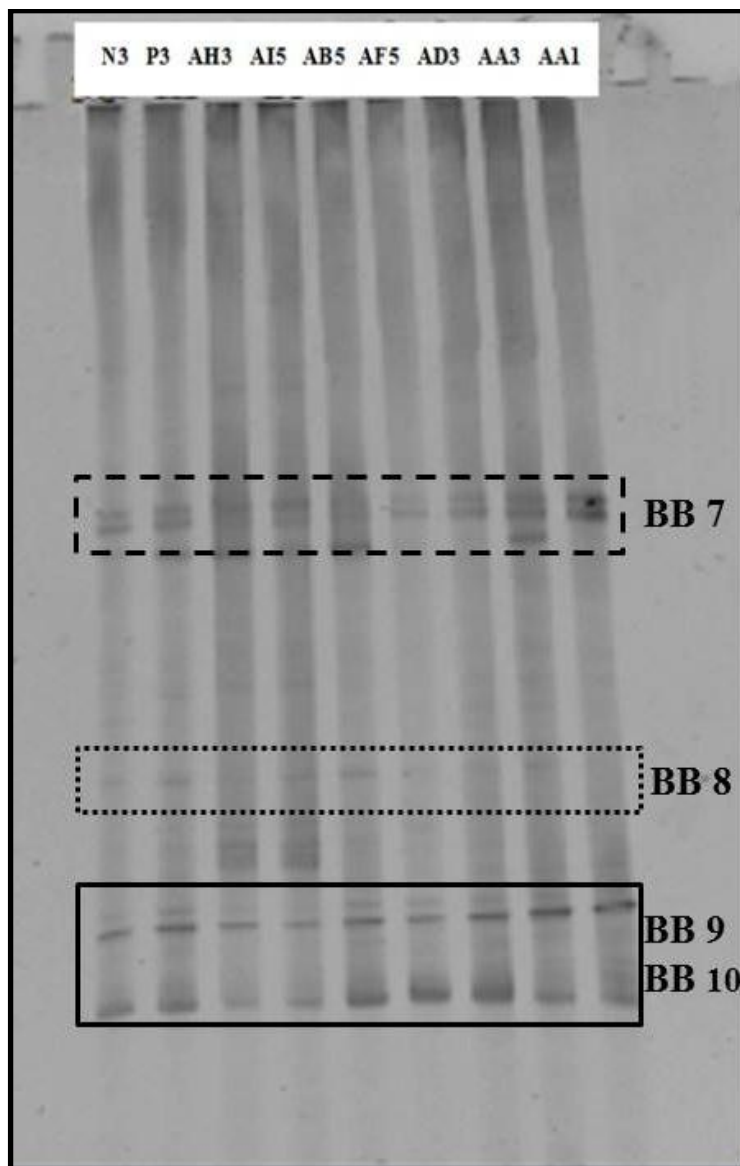


Figura 13. Análisis por DGGE.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se avanzó respecto de la información de literatura en la aplicación de técnicas oxidativas para la degradación de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

Los ensayos con PSN, KMnO<sub>4</sub> y PSN/Fe:EDTA fueron los que mostraron mayor degradación, por lo que son métodos adecuados para la degradación de fenantreno (contaminante modelo).

En todos los tratamientos se atribuye la degradación química solo durante los primeros 7 días. La degradación del fenantreno durante los siguientes días del tratamiento fue resultado de la degradación microbológica, los cuales no afectan de forma apreciable a las propiedades del suelo.

Los tratamientos empleando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe:EDTA con las dosis utilizadas en el estudio, también degradan al fenantreno pero no son muy eficientes. Estos tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí en la capacidad de degradación del fenantreno. La ventaja que tienen es que no producen cambios fisicoquímicos y microbológicos marcados en el suelo.

En el tratamiento de agregado sucesivo de PSN no se logró la degradación del fenantreno presente en el suelo. Por lo tanto, no es un método adecuado ya que además se modificaron marcadamente las propiedades fisicoquímicas y microbológicas del sistema como resultado de: (i) la disminución de los valores de pH (acidificación del suelo); lo cual trae consigo el crecimiento de hongos que compiten con las bacterias en la utilización de los nutrientes presentes en el suelo y (ii) un incremento en los valores de conductividad eléctrica (exceso de iones) lo que provoca la muerte de algunos de estos microorganismos.

A pesar de intentar restablecer las condiciones iniciales del suelo en forma natural luego del tratamiento; como consecuencia de la ruptura de la capacidad buffer propia del suelo, esto ya no fue posible.

A partir de experimentos microbiológicos, ensayos de toxicidad y análisis molecular fue posible obtener información útil para la evaluación del efecto de los tratamientos oxidativos sobre los cambios que provocan en la comunidad microbiana propia del suelo.

## **5.2. Recomendaciones**

Se deberían seguir realizando ensayos empleando al peróxido de hidrogeno para aumentar la eficiencia de degradación del fenantreno, puesto que la dosis utilizadas de este oxidante no provocan cambios apreciables en la calidad y la toxicología del suelo.

A partir de estos resultados se obtiene varias alternativas para continuar con la investigación. Debido a que los tratamientos dependen de la matriz del suelo y siendo la del suelo paraguayo diferente a la utilizada en esta tesis, sería importante realizar los experimentos con tierra autóctona. Evaluando parámetros químicos y microbiológicos de forma tal de poder elegir el mejor tratamiento con el menor impacto.

Luego de estudiar la degradación química del fenantreno, se podría emplear una mezcla de PAH y de esta forma ir ampliando los posibles compuestos a ser degradados por estos oxidantes químicos. Por lo que trabajar con una familia de compuestos permite relacionar las variaciones de la estructura química con la reactividad para un determinado mecanismo de reacción.



# ANEXOS

## A. Materiales

### Equipos e Instrumentos

- Conductímetro – Multi-parameteranalyser. Consort C830
- pH-metro - Multi-parameteranalyser. Consort C830
- Cromatógrafo HPLC Waters
- Baño de Ultrasonido Testlab TB04TA, 40 kHz, 160 W
- Espectrofotómetro Shimadzu UV - 1800
- Centrífuga Modelo Presvac DSC.16 RV
- Balanza KERN 822 Cap. Max. 210 g; d: 0,001 g
- Balanza Analítica Denver Instrument Cap. Max 210g; d: 0,1 mg
- Shaker – Agitador M-23 VICKING
- Vortex Heidolph Reax 2000
- Incubadora AMBI-HI-LO CHAMBER N°.3554-31 – Frío - Calor
- Banco de Flujo Laminar Modelo Bellows Marca MAG
- Autoclave Vz
- Baño Termostático Modelo Masson II Marca Vicking
- Pipetas automáticas: P10 (1 – 10 µL) Marca HTL; P200 (20 – 200 µL) Marca Gilson; P1000 (100 – 1000 µL) Marca HTL; P5000 (1 – 5 mL) Marca HTL.
- Lupa eléctrica Marca Lutz Ferrando
- Controlled Environment Incubator Shaker Marca Psycro Therm
- Refrigerated Super speed Centrifuge Modelo Sorvall RC-5B Marca Du Pont. Rotor SM - 24
- Estufa de secado Marca LUT
- Agitador Magnético Termostático Modelo IKAMAG RH; Marca JANKE & KUNKEL GMBH & CO:KG
- E.N.Z.A TM Soil DNA Isolation Kit D5625 – 02, Marca OMEGA Biotek
- Micro jeringa de vidrio de 10 µL Hamilton 80300. Reno, Nevada USA
- Micro jeringa de vidrio de 100 µL Hamilton 80600. Reno, Nevada USA
- Termociclador Master cycler® Eppendorf® AG. 22331 Hamburg
- Fuente de corriente y cuba electroforética Bio-Rad. Power PAC 200
- Equipo DGGE – 2401 (C.B.S Scientific Co., Del mar, CA, USA)
- Equipo documentador de imágenes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Microcentrífuga Modelo Spectrafuge 24 D Marca Labnet

### Materiales para análisis fisicoquímicos

- Frascos de vidrio de 500 y 1000 mL
- Tubos Falcon con tapa de 15 y 50 mL
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 500 mL
- Matraces aforados de 5,00, 10,00 y 25,00 mL
- Pipetas graduadas de 5,0 y 10,0 mL
- Frascos color caramelo con tapa de 50 mL
- Gradillas
- Pesa objetos (navecillas)

- Pipetas automáticas (20 – 200  $\mu\text{L}$ , Marca GILSON); (100 – 1000  $\mu\text{L}$  Marca HTL) y (1 – 5  $\mu\text{L}$  Marca HTL)
- Cubetas de Cuarzo
- Viales para HPLC Agilent
- Filtros Millipore
- Filtros de Nylon 0,45  $\mu\text{m}$  OSMONIC, Inc.
- Filtros de Celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  OSMONIC, Inc.
- Jeringa de vidrio
- Jeringa de plástico
- Micro jeringa de vidrio

### **Materiales para análisis microbiológicos**

- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL
- Probetas de 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 mL
- Tubos Eppendorf® de 1,5 y de 2 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Microtiter fondo plano bolsa unitaria (Policubetas)
- Frascos color caramelo de 50, 120 y 1000 mL
- Placas de Petri de vidrio y de plástico
- Tips (Puntas 20 – 200  $\mu\text{L}$ ), (Puntas 100 – 1000  $\mu\text{L}$ ) y (Puntas 1 – 5  $\mu\text{L}$ )
- Algodones plegados
- Papel de filtro cualitativo en plancha
- Gradillas para microtubos
- Pinza de metal
- Microcentrífuga Modelo Spectrafuge 24D Marca Labnet
- Mechero Bunsen
- Espátula de Drigalsky
- Trípode
- Tela de amianto
- Vaso de precipitado de 600 y 1000 mL

### **Materiales para análisis molecular**

- Burbuja para equilibrar
- Cama para preparar gel de agarosa
- Peine de 8 y 20 calles
- Pipetas automáticas de 1, 10, 20 y 100  $\mu\text{L}$
- Tips (Puntas de 1, 10, 20 y 100  $\mu\text{L}$ )
- Guantes sin polvo
- Mechero Bunsen
- Tubos Eppendorf® para PCR

## B. Reactivos

Nombre	Fórmula	Tipo	PM (g/mol)	Marca
Persulfato de Sodio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$	p.a	238,1	Merck
Persulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	p.a	228,20	Anedra
Fenantreno	$\text{C}_6\text{H}_4\text{CH:CHH}_4\text{C}_6$	p.a	178,22	Carlo Erba
Bicarbonato de Sodio	$\text{NaHCO}_3$	p.a	84,0	J.T. Baker
Ioduro de Potasio	KI	p.a	166,01	Biopack
Metanol	$\text{CH}_3\text{OH}$	HPLC	32,04	J.T.Baker
Ácido fosfórico	$\text{H}_3\text{PO}_4$	p.a	98,00	Riedel-de Haëd
Acetato de Etilo	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	p.a	88,11	Anedra
Cloruro de Sodio	$\text{NaCl}$	p.a	58,44	Anedra
Fosfato bibásico de potasio anhidro	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	p.a	174,18	Anedra
Fosfato monobásico de amonio	$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	p.a	115,03	Anedra
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	p.a	134,14	Cicarelli
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4$	p.a	120,49	Rhodia
Nitrato de potasio	$\text{KNO}_3$	p.a	101,10	Anedra
Extracto de levadura	---	p.a	---	Biokar
Proteosa peptona (peptona de caseína)	---	p.a	---	Biokar
Casamino (Casein Hydrolysate Acid)	---	p.a	---	Oxoid
Glucosa (Dextrosa Anhidra)	---	p.a	180,16	Anedra
Almidón soluble	---	p.a	---	Anedra
Ácido Pirúvico sal sódica	$\text{CH}_3\text{COCOONa}$	p.a	110,4	Anedra
Agar Agar Polvo	---	p.a	---	Parafarm
Urea	$\text{NH}_2\text{CONH}_2$	Ultrapure Bioreagent	60,06	J.T.Baker

Formamida deionizada	CH <sub>3</sub> NO	Biología Molecular	45,04	AppliChem
Acrilamida	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	p.a	71,08	Merck o Sigma
Tris	---	Biología Molecular	121,14	AppliChem
Ácido Acético Glacial	CH <sub>3</sub> COOH	p.a	60,05	Dorwil
EDTA sal sódica	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	p.a	372,24	Anedra
Antraceno	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH:C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> :CH	p.a	178,22	Carlo Erba
Fluoreno	---	p.a	166,22	Aldrich
Dibenzothiopheno	---	p.a	184,26	Aldrich
Pentano	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	p.a	72,15	Dorwil
Detergente neutro	---	Uso ind.	---	Biopack
Isopropanol	CH <sub>3</sub> CHOHCH <sub>3</sub>	p.a	60,10	Dorwil
Sulfato de Sodio Anhidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	p.a	142,04	Carlo Erba
Agarose Na	Specially purified for gel electrophoresis of nucleic acid.			Científica Nacional
Cloruro de Potasio	KCl	p.a	74,55	Biopack
Peróxido de Hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30% P/V (100 Vol)	34,01	Biopack
Permanganato de Potasio	KMnO <sub>4</sub>	p.a	158,03	Anedra

## C. Figuras



Figura 14. Control Biológico.



Figura 15. Tratamiento con PSN.



Figura 16. Tratamiento con PSN Suc.



Figura 17. Tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Figura 18. Tratamiento con  $H_2O_2/Fe:EDTA$ .



Figura 19. Tratamiento con  $PSN/Fe:EDTA$ .

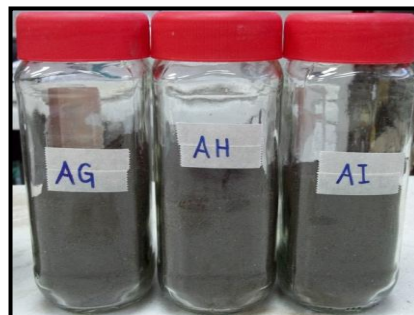


Figura 20. Tratamiento con  $KMnO_4$ .



Figura 21. pH – metro y Conductímetro.



Figura 22. Espectrofotómetro UV-visible.



Figura 23. Equipo HPLC-UV.



Figura 24. Extracción de los microorganismos del suelo.



Figura 25. Preparación de la dilución (-1).



Figura 26. Diluciones seriadas.



Figura 27. Siembra de microorganismos en medio de cultivo R2A.

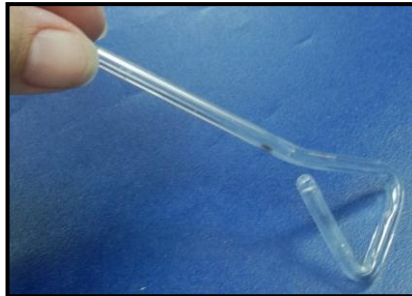


Figura 28. Espátula de Drigalsky.

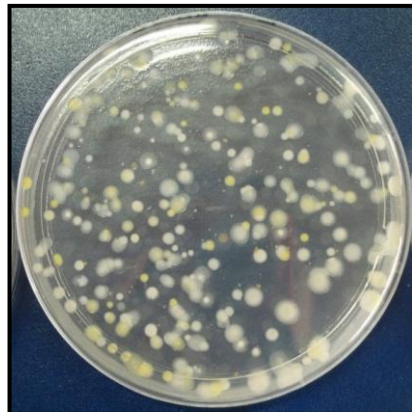


Figura 29. Unidades formadoras de colonias (UFC).



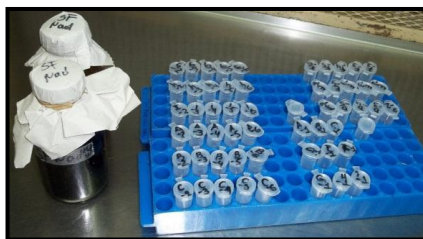


Figura 30. Diluciones de bacterias degradadoras de PAH.



Figura 31. Policubetas para bacterias degradadoras de PAH.

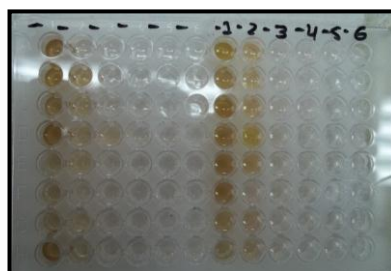


Figura 32. Bacterias degradadoras de PAH.



Figura 33. Termociclador.



Figura 34. Cama para preparar geles para electroforesis.



Figura 35. Cuba electroforética.

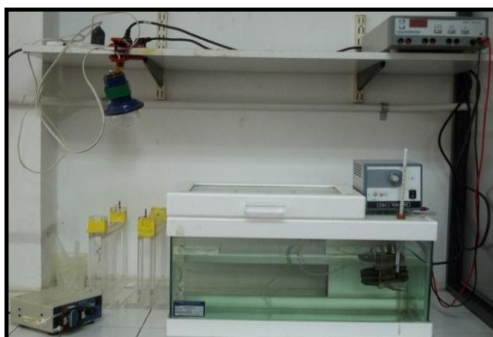


Figura 36. Equipo DGGE-2401.



Figura 37. Documentador de imágenes.

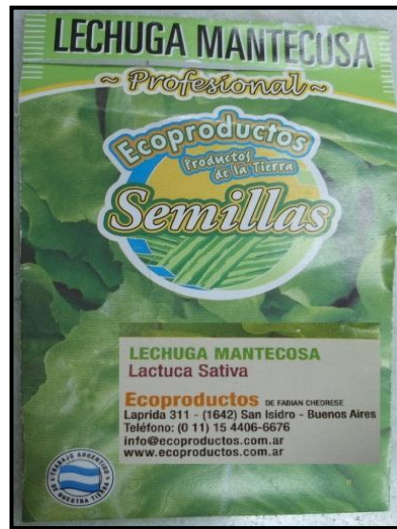


Figura 38. Semillas de Lechuga *Lactuca Sativa*.

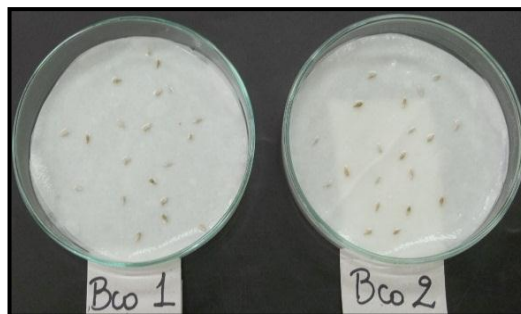


Figura 39. Siembra de semillas de lechuga.



Figura 40. Germinación de las semillas de lechuga.

## D. Preparación de reactivos

### ▪ Medio Mineral Líquido

<b>Composición</b>	<b>g/1000 mL</b>
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,2
KNO <sub>3</sub>	3,0
Agua Destilada	pH: 7,0 (ajustar con NaOH o HCl al 10%).

(Schippers et al, 2000)

### ▪ Solución Fisiológica 0,85% (P/V)

<b>Composición</b>	<b>g/100 mL</b>
NaCl	0,85

### ▪ Medio de Cultivo R2A

<b>Composición</b>	<b>g/ 1000 mL</b>
Extracto de Levadura	0,5
Proteosa peptona	0,5
Casamino	0,5
Glucosa	0,5
Almidón Soluble	0,5
Ácido Pirúvico	0,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
MgSO <sub>4</sub>	0,005
Agar Agar polvo	15,0

(Reasoner y Geldreich, 1985)

- **Esterilización**

Todos los materiales, las soluciones y los medios de cultivo para los ensayos microbiológicos y los ensayos moleculares se esterilizaron previamente en autoclave a 121°C y 103 kPa durante 20 minutos (Reasoner y Geldreich, 1985).

- **Preparación de Soluciones para DGGE**

- **Solución de acrilamida – bisacrilamida 40%**

Se pesó acrilamida 38,930 g y bisacrilamida 1,070 g. Se transfirió a un vaso de precipitado. Se adicionó agua destilada y se agitó con una barra magnética hasta completar disolución. Se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua destilada.

- **Solución 0%**

En un matraz aforado de 100 mL colocar: 2,5mL de solución de TAE 40X a pH 7,4. Se agregó 15 mL de solución de acrilamida–bisacrilamida. Se llevó a volumen con agua destilada.

- **Solución 80%**

En un vaso de precipitado se colocó: 2,5 mL de solución de TAE 40X a pH 7,4. Se agregó 15 mL de solución de acrilamida–bisacrilamida. Se agregó 33,8 g de Urea y 32 mL de Formamida. Se adicionó agua destilada y se agitó con una barra magnética hasta disolución total. Se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada.

- **Buffer TAE 40X (para 500 mL)**

Se pesó 96,8 g de Tris, 7,445 g de EDTA. Se agregó 22,85 mL de Ácido Acético Glacial. Se agregó agua destilada hasta alcanzar 500 mL.

- **Buffer TAE 1X (para 1000mL)**

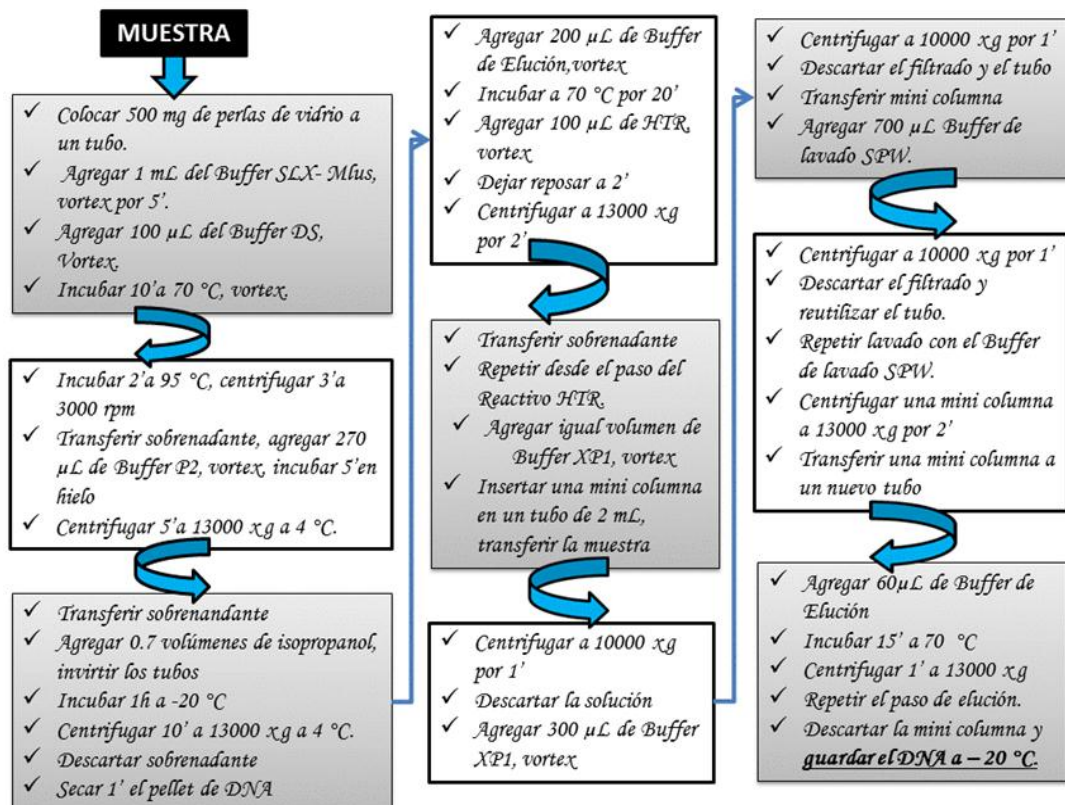
Se preparó a partir de la dilución del Buffer TAE 40X; para esto se tomó del mismo 25,0 mL y se llevó a 1000 mL con agua destilada.

▪ **Solución patrón de PAH para Bacterias Degradadoras**

Se pesó: 0,025 g de fenantreno, 0,0125 g fluoreno, 0,0125 g antraceno y 0,0121 g diobenzotiofeno. Se trasvasaron a un matraz aforado de 25 mL, se agregó pentano, se disolvió totalmente empleando un vortex. Luego de la disolución total se llevó a volumen con pentano.

▪ **Extracción de DNA de Suelo**

**Protocolo de Soil DNA Isolation Kit**



## E. Glosario

**Buffer:** Es un sistema constituido por un ácido débil y su base conjugada o por una base y su ácido conjugado que tiene capacidad "tamponante", es decir, que puede oponerse a grandes cambios de pH en una disolución acuosa.

**Cebadores (primers):** oligonucleótidos que son cada uno complementarios a cada una de las dos hebras del DNA. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de dieciocho a veintidós, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico, de las siglas en inglés; ácido nucleico que contiene la información genética de un ser vivo y que está presente en algunos virus, en las células procariotas y en el núcleo de las células eucariotas.

**dNTPs:** son monómeros denominados desoxirribonucleótidos trifosfato, los cuales están ligados entre sí mediante uniones de azúcar – fosfato, que constituyen el esqueleto del DNA. Sustrato para polimerizar nuevo DNA.

**Espátula de Drigalsky:** Espátula de vidrio o acero inoxidable con cabezal recto o curvo para trabajos bacteriológicos que sirve para depositar microorganismos mono celulares o de muy pocas células sobre placa de Agar y repartirlos de forma uniforme sobre la misma.

**Génica diana:** Diana: sinónimo lugar. Representación de los lugares (dianas) de restricción contenidos en una secuencia de DNA.

**Microcosmo:** Es una réplica unitaria experimental que contiene muestra de suelo en el cual se mide la respuesta de especies bióticas y donde por lo menos una de las especies bióticas es más grande que la microbiológica.

**Operón:** En las bacterias, los genes son agrupados en operón; grupos de genes que codifican las proteínas necesarias para llevar a cabo la coordinación, función tales como la biosíntesis de un determinado aminoácido.

**Pedogénesis:** Proceso de desarrollo del suelo.

**Polimerasa Taq:** DNA polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70°C.

**Termociclador:** un equipo que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para contrarlar la temperatura necesaria para cada etapa de reacción que conforman un ciclo.

**Toxicidad:** Propiedad fisiológica o biológica que determina la capacidad de una sustancia química para causar perjuicio o producir daños a un organismo vivo por medios no mecánicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. "Phenanthrene". En: "USEPA – Division of Toxicology". Disponible:<http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/minimize/factsheets/phenanth.pdf>. (Consultado: 2012, Setiembre 29).
- BALBA, M., AL-AWADHI, N, AL-DAHER, R. 1998. "Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation". En: "Journal of Microbiological Methods", vol. 32, pp.155–164.
- BAVEL, B. V. 2006. "Comparison of Fenton's Reagent and Ozone Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aged Contaminated Soils". En: "Journal of Soils and Sediments", núm. 4, vol. 6, pp. 208–214.
- BEZALEL L., HADAR Y., FU P.P., FREEMAN J.P., CERNIGLIAC.E. 1996 "Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*". En: "Applied and Environmental Microbiology", num. 7, vol. 62, pp.2547–2553.
- BOGARDT, A.H., HEMMINGSEN, B.B. 1992. "Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites". En: "Applied Environmental Microbiology", vol. 58, pp. 2579–2582.
- BOJES, H. K., POPE, P. G. 2007. "Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas". En: "Regulatory Toxicology and Pharmacology", núm.3, vol. 47, pp.288–295.
- Campro Scientific. 2010. "Priority PAHs, Biomarker Focus". Germany. Disponible: <http://www.campro.eu/PDF/Brochures/Flyer-CHIRON/2009-09-BMF-40-PAHs.pdf> (Consultado: 2013, Enero 23).
- CITAB - "Suelos". En: "Centro de Investigaciones Territoriales y Ambientales Bonaerenses". Disponible: <http://www.bancoprovincia.com.ar/citab/estadisticas/02%20MEDIO%20GEOGRAFICO/0202%20SUELOS.pdf>. (Consultado: 2012, Julio 23).
- DE SOUZA E SILVA, P. T., DA SILVA, V. L., NETO, B. B. Y SIMONNOT, M. 2009. "Potassium permanganate oxidation of phenanthrene and pyrene in contaminated soils". En: "Journal of Hazardous Materials", num. 2 - 3, vol.168, pp. 1269–1273.
- EPA - METHOD 9045D.SOIL AND WASTE pH.(Revisión 4, Noviembre 2004). Disponible: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/9045d.pdf>. (Consultado: 2012, Mayo 10).



- EPA - METHOD 9050A. SPECIFIC CONDUCTANCE. (Revisión 1, Diciembre 1996). Disponible: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/9050a.pdf>. (Consultado: 2012, Mayo 10).
- E.Z.N.A.® Soil DNA kit. Manual Revision. January 2012. OMEGA Bio – Tek. Innovations in nucleic acid isolation. Inc, Nacross, G.A, USA. Disponible: <http://www.omegabiotek.com/files/resource/Handbook/40071700.pdf>. (Consultado: 2012, Mayo 5).
- FERRARESE, E., ANDREOTTOLA, G., OPREA, I. A. 2008. "Remediation of PAH-contaminated sediments by chemical oxidation". En: "Journal of Hazardous Materials", num. 1, vol. 152, pp. 128–139.
- GAN, S., LAU EV, N. G. 2009. "Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)". En: "Journal of Hazardous Materials", vol. 172, pp. 532–549.
- GARCÍA, F., MORA, V., CARLOS, L., VERCHER, R. y AMAT, A. M. 2009. "Métodos Térmicos y Fotoquímicos". Autores Varios. "Procesos químicos y fotoquímicos ambientalmente benignos para la degradación de efluentes acuosos industriales", 1ra ed., Valencia, Marfil S.A. pp. 117-126.
- GOI, A., TRAPIDO, M. Y KULIK, N. 2009. "Contaminated Soil Remediation with Hydrogen Peroxide Oxidation". En: "World Academy of Science, Engineering and Technology", vol. 52. Disponible: <http://www.waset.org/journals/waset/v52/v52-30.pdf>. (Consultado: 2012, Noviembre 28).
- GOLDSTEIN, R. M., MALLORY, L. M., Y ALEXANDER, M. 1985. "Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation". En: "Applied and Environmental Microbiology", num. 4, vol. 50, pp. 977–983.
- HULING, S. G. y PIVETZ, B. E. "In-situ Chemical Oxidation USEPA/600/R-06/072, 28 July". En: "United States - Environmental Protection Agency". Disponible: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=2000ZXNC.PDF>. (Consultado: 2012, Noviembre 18).
- IRWIN, R. J., MOUWERIK, M. V., STEVENS, L., SEESE, M. D. y BASHAM, W. "Environmental Contaminants Encyclopedia Entry". En: "National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the Federal Government as an Electronic Document (Projected public availability on the internet or NTIS: 1998)". Disponible: <http://nature.nps.gov/hazardssafety/toxic/phenanth.pdf>. (Consultado: 2012, Setiembre 3).
- "ITCR - Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater". 2001. En: "The Interstate and Regulatory Council In Situ Chemical Oxidation Team", 1st ed., Enero de 2001. Disponible: <https://www.google.com.py/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&so>

urce=web&cd=2&ved=0CDgQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.itrcweb.org%2FGuidance%2FGetDocument%3FdocumentID%3D44&ei=ZP04UZy1N5DY9QT\_hYDACg&usg=AFQjCNG\_5b1UFHEMqB7JQ8-7krt5f-1uMQ.  
(Consultado: 2012, Noviembre 10).

- "ITRC - Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater". 2005. En: "The Interstate and Regulatory Council In Situ Chemical Oxidation Team", 2<sup>nd</sup> ed., Enero de 2005. Disponible: [www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=44](http://www.itrcweb.org/Guidance/GetDocument?documentID=44). (Consultado: 2012, Noviembre 19).
- JOHNSEN, A. R, HENRIKSEN, S. 2009. "Microplate MPN-enumeration of monocyclic- and dicyclic-aromatic hydrocarbon degraders via substrate phase-partitioning". En: "Biodegradation", vol. 20, pp.591–591.
- KILLIAN, P. F., BRUELL, C. J., LIANG, C., MARLEY, M. C. 2007. "Iron (II) Activated Persulfate Oxidation of MGP Contaminated Soil". En: "Soil & Sediment Contamination", num. 6, vol. 16, pp.523–537.
- LENS, P., GROTEHUIS, T., GRZEGORZ, M. y TABAK, H. "Soil and Sediment Remediation. Mechanisms, technologies and applications", 1st ed. IWA. London. Seattle. Disponible en: [http://www.iwapublishing.com/pdf/contents/isbn1843391007\\_contents.pdf](http://www.iwapublishing.com/pdf/contents/isbn1843391007_contents.pdf). (Consultado: 2012, Noviembre 28).
- LIANG, C., BRUELL, C. J., MARLEY, M. C., y SPERRY, K. L. 2004. "Persulfate oxidation for in situ remediation of TCE. II Activated by ferrous ion with and without a persulfate-thiosulfate redox couple". En: "Chemosphere", num. 9, vol. 55, pp.1213-1223.
- LIANG, C., WANG, Z-S, BRUELL, C. J. 2007. "Influence of pH on persulfate oxidation of TCE at ambient temperatures". En: "Chemosphere", vol 66, pp.106–113.
- LIANG, C., HUANG, C., MOHANTY, N., KURAKALVA, R. M. 2008. "A rapid spectrophotometric determination of persulfate anion in ISCO". En: "Chemosphere", num. 9, vol. 73, pp.1540–1543.
- LORS, C., RYNGAERT, A., PÉRIÉ, F., DIELS, L., DAMIDOT, D. 2010. "Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil". En: "Chemosphere", vol. 81, pp.1263–1271.
- MALLICK, S., CHATTERJEE, S., DUTTA, T. K. 2007. "A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(2'-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid". En: "Microbiology", num. 7, vol. 153, pp. 2104–2115.
- MIKKELSEN, S. R., CORTÓN, E. 2011. "Principios de Electroforesis" En: Mikkelsen, Susan R., Cortón, Eduardo (ed). "Química bioanalítica. Métodos y teoría analítica para el laboratorio de biología molecular, farmacia y bioquímica", 1ra ed, Eudeba, Argentina.

- MOORE, P. 2005. "PCR: Replicating success". En: "Nature", num. 7039, vol.435, pp.235–238.
- MORA, V., MADUEÑO, L., PELUFFO, M., DEL PANNO, T., MORELLI, I., ROSSO, J.2012. "Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous chemical and biological degradation processes". En: "Artículos CONICET. Carrera de Investigador Científico y Tecnológico". Disponible: [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=29342&articulos=yes&detalles=yes&art\\_id=1376577](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=29342&articulos=yes&detalles=yes&art_id=1376577). (Consultado: 2012, Diciembre 5).
- MOYER, E. E., OSTENDORF, D. W., RICHARDS, R. J. y GOODWIN, S. 1996. "Petroleum Hydrocarbon Bioventing Kinetics Determined in Soil Core, Microcosm, and Tubing Cluster Studies". En: "Groundwater Monitoring and Remediation", num. 1, vol. 16, pp. 141-153.
- NAM, K., RODRIGUEZ, W., y KUKOR, J. J.2001."Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction".En: "Chemosphere", num. 1, vol. 45, pp. 11–20.
- ORTIZ, I., AURIA, R., SIGOILLOT, J.-C., REVAH, S. O. 2003."Enhancing Phenanthrene Biomineralization in a Polluted Soil Using Gaseous Toluene as a Cosubstrate".En:"Environmental Science Technology", num. 4, vol. 37, pp. 805–810.
- PEPPER, I. L, RENSING, C., GERBA, C. P. 2004. "Environmental Microbial Properties and Processes". En: Janick, F., Artiola, Ian L., Pepper y Mark L. Brusseau (eds). "Environmental Monitoring and Characterization", Burlington: Academic Press,pp. 263–280. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120644773500163>.
- REASONER, D. J., GELDREICH, E. 1985."A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water".En: "Applied Environmental Microbiology", num. 1, vol. 49, pp. 1–7.
- RENGEL, Z.2003. "Handbook of Soil Acidity". Editorial CRC Press, pp. 159-160. Disponible: [http://books.google.com.py/books?id=uLiKWeQ\\_aC8C&pg=PA157&lpg=PA157&dq=soil+buffer+capacity&source=bl&ots=AGRZvL4j4l&sig=6SJQL-bEidre2uTNIqMzrIPkqU8&hl=es-419&sa=X&ei=pWBvUamuBYbW8gSMoYH4Aw&ved=0CCEQ6AEwAjkK#v=onepage&q=soil%20buffer%20capacity&f=false](http://books.google.com.py/books?id=uLiKWeQ_aC8C&pg=PA157&lpg=PA157&dq=soil+buffer+capacity&source=bl&ots=AGRZvL4j4l&sig=6SJQL-bEidre2uTNIqMzrIPkqU8&hl=es-419&sa=X&ei=pWBvUamuBYbW8gSMoYH4Aw&ved=0CCEQ6AEwAjkK#v=onepage&q=soil%20buffer%20capacity&f=false). (Consultado: 2013, Abril 17).
- RINALDI, A, DA SILVA, M. 2011."Degradation of BTX in Contaminated Soil by Using Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and Potassium Permanganate (KMnO<sub>4</sub>)".En:"Water, Air, & Soil Pollution", vol. 217, pp.245–254.
- RIVAS, F. J. 2006. "Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments".En: "Journal of Hazardous Materials", num. 2, vol. 138, pp. 234–251.

- ROMERO, A., SANTOS, A., CORDERO, T., RODRÍGUEZ-MIRASOL, J., ROSAS J. M., VICENTE, F. 2011. "Soil remediation by Fenton-like process: Phenol removal and soil organic matter modification". En: "ChemicalEngineeringJournal", vol. 170, pp. 36–43.
- SABATER, S., ELOSEGUI, A., Fundación BBVA. 2009. Separata Capítulo 11. "La biota de los ríos: los microorganismos heterotróficos". En: "Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Bilbao: Fundación BBVA". Disponible: [http://www.fbbva.es/TLFU/microsites/ecologia\\_fluvial/pdf/cap\\_12.pdf](http://www.fbbva.es/TLFU/microsites/ecologia_fluvial/pdf/cap_12.pdf). (Consultado: 2012, 14 de Junio).
- SAELEE, R., BUNYAKAN, C. 2012. "Degradation Kinetics of Fe-EDTA in Hydrogen Sulfide Removal Process". En: "ISRN ChemicalEngineering", vol. 2012, pp.1–8.
- SANCHEZ, R. M., RODRIGUEZ, T. M., LEAL, E., CRUZ, C. M. y ESPARZA, F. J. 2010. "Determinación de subproductos de biotransformación del fenantreno por *Mucorrouxii* IM-80". En: "Segundo Congreso, 2010, Cancún, Q Roo – Mexico". Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA). Resumen, pp. 310. Disponible: <http://www3.inecol.edu.mx/solabiaa/>. (Consultado: 2013, Marzo 12).
- SCHIPPERS, C., GEßNER, K., MÜLLER, T., y SCHEPER, T. 2000. "Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture". En: "Journal of Biotechnology", num. 3, vol.83, pp. 189–198.
- SEO, Y., BISHOP, P. L. 2007. "Influence of Nonionic Surfactant on Attached Biofilm Formation and Phenanthrene Bioavailability during Simulated Surfactant Enhanced Bioremediation". En: "Environmental Science and Technology", num. 20, vol. 41, pp. 7107–7113.
- SIRGUEY, C., DE SOUZA E SILVA, P. T., SCHWARTZ, C. y SIMONNOT, M. O. 2008. "Impact of chemical oxidation on soil quality". En: "Chemosphere", num. 2, vol. 72, pp. 282–289.
- SOBRERO, M. C., RONCO, A. 2004. "Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga". En: Morales, G. C. (ed.). "Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones", 1ra ed, IMTA, México. Disponible en: [http://web.idrc.ca/es/ev-84466-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://web.idrc.ca/es/ev-84466-201-1-DO_TOPIC.html) (Consultado: 2012, Julio 20).
- SUTTON, S. 2010. "The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification and Validation". En: "Journal of Validation Technology", num. 3, vol. 16, pp. 35-38. Disponible: [http://www.microbiol.org/wp-content/uploads/2010/12/Sutton.jvt\\_16.3.pdf](http://www.microbiol.org/wp-content/uploads/2010/12/Sutton.jvt_16.3.pdf). (Consultado: 2013, Marzo 09).

- TEEL, A. L, CUTLER, L. M, WATTS, R.J. 2009. "Effect of sorption on contaminant oxidation in activated persulfate systems". En: "Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering", vol. 44, pp.1098–1103.
- The National Academy Press. 1993."In situ Biorremediation". "When does it work?".En "The National Acedemy of Sciences", 1993.Disponible: <http://books.nap.edu/catalog/2131.html>. (Consultado: 2013, Marzo 13).
- The National AcacemyPress. 2011."Natural Attenuation for Groundwater Remediation".En "The National Academy of Sciences", 2011.Disponible: <http://www.nap.edu/catalog/9792.html>. (Consultado: 2013, Marzo 12).
- USDA – United States Department of Agriculture. "Keys to Soil Taxonomy". En: "Natural Resources Conservation Service", 10° ed., Washington, DC., 2010. Disponible: [ftp://ftp-fc.sc.egov.usda.gov/NSSC/Soil\\_Taxonomy/keys/2010\\_Keys\\_to\\_Soil\\_Taxonomy.pdf](ftp://ftp-fc.sc.egov.usda.gov/NSSC/Soil_Taxonomy/keys/2010_Keys_to_Soil_Taxonomy.pdf). (Consultado: 2012, Julio 23).
- U.S. Department of Energy. "In Situ Chemical Oxidation Using Potassium Permanganate". En: "Subsurface Contaminants Focus Area", Setiembre de 1999. Disponible: [http://www.clu-in.ogr/download/contaminatfocus/dnapl/treatment\\_Technologies/DOE-EM-0496.pdf](http://www.clu-in.ogr/download/contaminatfocus/dnapl/treatment_Technologies/DOE-EM-0496.pdf). (Consultado: 2012, Setiembre 29).
- USMAN, M., FAURE, P., RUBY, C., HANNA, K.2012a. "Application of magnetite-activated persulfate oxidation for the degradation of PAHs in contaminated soils". En: "Chemosphere", vol. 87, pp.234–240.
- USMAN, M., FAURE, P., RUBY, C., HANNA, K. 2012b. "Remediation of PAH-contaminated soils by magnetite catalyzed Fenton-like oxidation". En: "Applied Catalysis B: Environmental", vol. 117–118, pp.10–17.
- VECCHIOLI, G. I., DEL PANNO, M. T., y PAINCEIRA, M. T.1990."Use of selected autochthonous soil bacteria to enhanced degradation of hydrocarbons in soil". En:"Environmental Pollution", num. 3, vol. 67, pp.249–258.
- WANG, J. M., MARLOWE, E. M., MILLER-MAIER, R., BRUSSEAU, M. L. 1998. "Cyclodextrin-Enhanced Biodegradation of Phenanthrene".En: "Environmental Science and Technology", num.13, vol.32, pp. 1907–1912.