Cod. Barras/ 247326

N.º R. ALEPH 1018832
N.º R. Bib. 5316
Signat. M/CI-40 Gómez

Biodisponibilidad. Concepto y Cuantificación.

Aplicación a Emplazamientos Contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

TRABAJO REALIZADO DURANTE EL
XL CURSO INTERNACIONAL DE
Edafología y Biología Vegetal.

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y
AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

GÓMEZ

M/CI-40
2003

César Gómez Lahoz. Julio de 2003.

José Julio Ortega Calvo, Director del trabajo

SEVILLA
CSIC
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGIA
BIBLIOTECA

Índice

Introducción **1**

El suelo como medio receptor de la contaminación. 1

Concepto de biodisponibilidad. 5

Evaluación de la biodisponibilidad 9

Procedimiento experimental. **11**

Materiales y reactivos. 11

Compuestos radioactivos. 11

Bacterias, medios y cultivos 11

Otros compuestos. 12

Procedimiento de adición del compuesto marcado y envejecimiento de las muestras 12

Experimentos de extracción con Tenax 14

Regeneración del Tenax y análisis de la cantidad desorbida. 14

Experimentos de mineralización. 15

Preparación del inóculo 16

Resultados y discusión. **17**

Resultados de mineralización 17

Mineralización en ausencia de sedimento 17

Mineralización en presencia del sedimento Ketelmeer 18

Mineralización en presencia del sedimento Valparanta 19

Resultados de desorción mediante extracción con Tenax 20

Desorción de los PAHs retenidos en el sedimento Ketelmeer. 20

Desorción de los PAHs retenidos en Valparanta. 21

Desarrollo del modelo.....22
El modelo biológico en ausencia de sedimento.....22
Interpretación de la mineralización mediante una cinética de orden 1 sencilla.....22
Interpretación de la mineralización mediante un modelo de formación de compuesto intermedio.....24
El modelo de desorción.....25
Interpretación de los resultados mediante un modelo lineal de dos y tres regiones.....25
Resultados.....27
El modelo de desorción / Biodegradación.....29
Desarrollo del modelo.....29
Resultados:.....31

Conclusiones.....34

Bibliografía.....36

Introducción

El suelo como medio receptor de la contaminación.

La presencia de contaminantes en la naturaleza representa una amenanza para la salud humana y para los ecosistemas. En este sentido es importante tener presente que la mencionada amenaza depende de dos factores relativamente independientes entre si; por una parte de la toxicidad de la sustancia en si misma y por otra de la probabilidad de que la sustancia en cuestión pueda entrar en contacto con la población que se ve amenazada, lo que puede tener lugar mediante el transporte del mismo en cualquiera de las fases móviles que constituyen el entorno, o mediante el contacto directo con el contaminante (ver figura 1)

Figura 1.- Rutas de exposición de las poblacions a la contaminación

El riesgo asociado a la presencia de estas sustancias en medios como el aire o el agua se cuantifica, normalmente, a través de la medida de su concentración en dichos medios y de modelos que representan los fenómenos que tienen lugar durante su transporte: dispersión, dilución, degradación, etc. A pesar de la complejidad de estos modelos, resultan considerablemente más simples que los necesarios para representar otros compartimentos del medio ambiente, como el suelo o los sedimentos.

Al pensar en el suelo como compartimento medioambiental podemos pensar que se trata del soporte sólido sobre el que se desarrolla buena parte de la actividad biológica. Esta perspectiva sería, sin embargo, muy pobre dada la gran importancia del suelo en otros aspectos. Para empezar, los suelos no consolidados (no rocosos) no son únicamente sólidos sino que una parte importante de los mismos se encuentra ocupada por fases fluidas, normalmente aire y agua, aunque en algunos casos pueden estar presentes otras fases líquidas (con frecuencia causantes de contaminación), denominadas fases líquidas no acuosas (NAPLs, Non-Aqueous Phase Liquids). En la figura 2 podemos ver como la porosidad de la mayor parte de los suelos se encuentra entre el 35 y el 55 % del volumen total del mismo. Existe, por lo tanto, una cierta capacidad de penetración de los contaminantes en el suelo, y de transporte a través del mismo, y por lo tanto existe riesgo de exposición a los contaminantes. Por otra parte, la movilidad de las

fases fluidas a través del suelo depende de forma muy directa de las características texturales del mismo, es decir, de la distribución del tamaño de las partículas que lo constituyen.

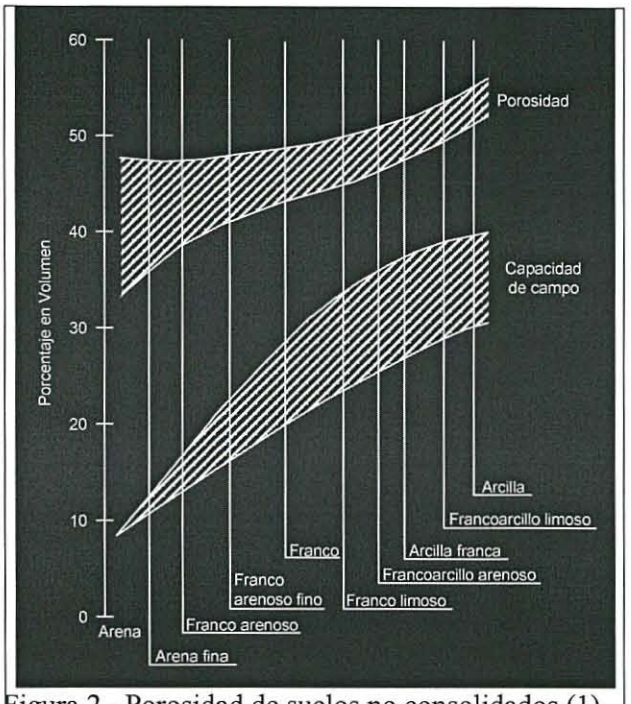


Figura 2.- Porosidad de suelos no consolidados (1).

Existen diversas clasificaciones texturales, pero en términos generales todas ellas diferencian tres tamaños principales de partícula que definen a la arcilla (< 2 μm), el limo (2 μm a 50 μm) y arena (50 μm a 2 mm), si bien los valores indicados pueden variar en función de la clasificación que se utilice. Los suelos se clasifican texturalmente a partir de las diversas proporciones existentes entre los diferentes tamaños de partícula, siendo una de las clasificaciones más habituales la que se recoge en el diagrama de la figura 3. La importancia que la textura (independientemente de la naturaleza química) tiene sobre las propiedades de transporte es doble: por un lado afecta a la permeabilidad del suelo a las fases fluidas de forma muy importante y por otro, determina el contacto entre las fases fluidas y la fase sólida, al establecer la superficie específica del suelo.

Como ejemplo de la **influencia sobre la permeabilidad** a las fases fluidas podemos considerar la velocidad de avance del agua a través de la zona saturada del suelo, es decir, la que se encuentra por debajo del nivel freático, con todos los huecos ocupados por el agua. Si, a modo de ejemplo, consideramos un caso en el que las aguas subterráneas descienden 1 m por km de avance (gradiente hidráulico), la velocidad que alcanzarían dichas aguas en un suelo arenoso oscilaría entre 10^{-5} y 10^{-8} m/s, es decir, entre 300 y 0,3 m por año respectivamente. Por su parte, si se tratara de un suelo arcilloso, las velocidades oscilarían entre 10^{-12} y 10^{-15} m/s, lo que traducido a magnitudes más fácilmente interpretables, representa que el avance de 1 mm requeriría periodos de entre 3 años y 3 milenios (elaboración propia a partir de

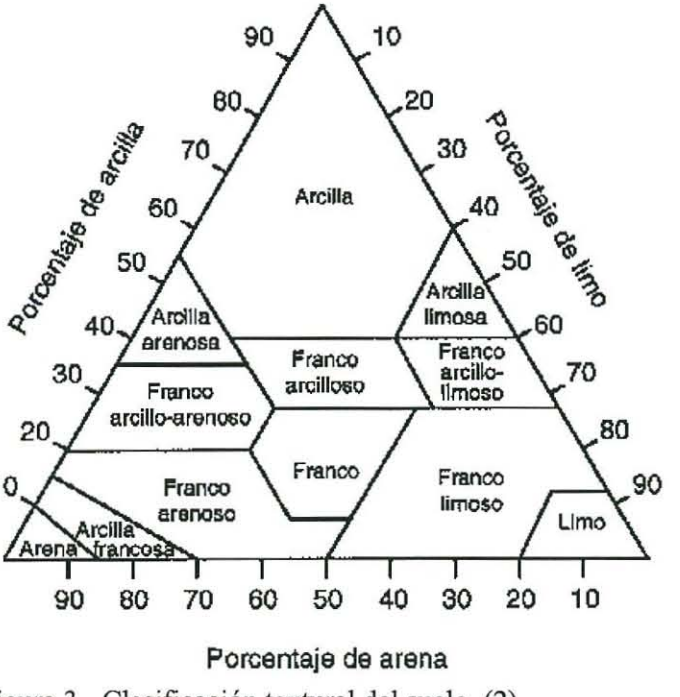


Figura 3.- Clasificación textural del suelo. (2)

datos de Freeze y Cherry, 3). Por ello se considera que la arcilla es impermeable. Es importante destacar que esto es así, a pesar de que el volumen de huecos total del terreno arcilloso, será, probablemente, mayor que el del suelo arenoso (ver figura 2), y la totalidad del volumen puede llenarse de agua en tiempos relativamente pequeños al actuar, en este caso, la succión capilar como fuerza impulsora del proceso (succión que puede representar tensiones hídricas (presiones negativas) muy superiores a las atmosféricas.

En cuanto a la influencia de la textura **sobre la superficie específica**, baste considerar que si, para poder efectuar una estimación, consideraramos que todas las particulas que constituyen el suelo tuvieran una geometría esférica, y básandonos en que todas ellas tengan el mayor de los tamaños correspondientes a su intervalo, la superficie expuesta sería de 15 cm^2/g, en el caso de la arena, y de 15.000 cm^2/g en el caso de la arcilla (2). (Evidentemente las partículas tendrán diferentes geometrías, pero la relación entre las superficies específicas se mantendría aproximadamente). Ello implica que la mayor parte de la actividad química del suelo (reactividad, capacidad de cambio, etc.) corresponderá a las arcillas, ya que esta actividad tiene carácter superficial.

Por otra parte, cuando se considera el suelo desde el suelo desde el punto de vista medioambiental, lo más frecuente es que se estudie la sección del mismo que se encuentra entre la superficie y la primera capa impermeable (ver figura 4. Si en esta zona excavaramos un pozo del que no extrajeramos agua el nivel del agua en el mismo marcaría lo que se conoce como nivel freático. Por debajo de este nivel, y hasta la capa impermeable, la totalidad de los huecos están ocupados completamente por el agua, y se conoce como región saturada. La zona en la que al menos parte de los huecos están ocupados por aire se conoce como región insaturada. Entre ambas zonas se presenta una zona que, a pesar de encontrarse por encima del nivel freático, tiene todos los huecos ocupados por el agua, debido a fuerzas de capilaridad, por lo que a esta región se la conoce, normalmente, como zona de succión capilar. El conjunto de la zona insaturada y de la de succión capilar constituyen lo que se denomina zona *vadosa* del suelo. Evidentemente, la complejidad del suelo puede ser considerablemente mayor que la descrita hasta aquí. Por ejemplo, en el suelo, pueden existir regiones impermeables dispersas en la zona vadosa que acumulen agua encima, generando zonas saturadas locales. Asimismo, la presencia de infraestructuras (canalizaciones, cables, zanjas, etc.), puede incrementar notablemente la complejidad del suelo y, paralelamente, los procesos que pueden experimentar los contaminantes (4).

Figura 4. Partes del suelo de interés desde el punto de vista de la contaminación del mismo.

Los procesos físicos y químicos que tienen lugar en esta región del suelo están en buena parte condicionados por el transporte de materia (y energía) necesario para que los mismos tengan lugar, como es fácil imaginar cuando se tienen en cuenta las velocidades como las que se señalaron en los párrafos anteriores. Sin embargo, los fenómenos que ocurren en este entorno son de enorme importancia, también para el desarrollo de toda la actividad biológica. Algunos datos al respecto, son muy reveladores: Por ejemplo, se estima que el 90 % de los procariontes viven en el subsuelo, y que la biomasa es del mismo orden que la biomasa vegetal (5).

A la hora de establecer el riesgo asociado a la contaminación del suelo, como en el caso de los demás compartimentos medioambientales, es necesario establecer las rutas por las que los contaminantes pueden entrar en contacto con la población que se quiere proteger. Sin embargo, de manera mucho más acentuada que la que podría tener lugar en otros medios, existe la posibilidad de que el contaminante se transfiera entre las diferentes fases que están presentes en el suelo (ver figura 5). Así, es posible el transporte entre las fases acuosa y gaseosa del suelo (relación gobernada por la ley de Henry), pero también entre cada una de estas y las diferentes fases sólidas que pudieran considerarse. Estas fases sólidas tienen diferente importancia en función de la naturaleza del contaminante que se esté estudiando. Así, la movilidad de iones metálicos en suelos, puede venir determinada por diferentes factores, tales como la capacidad de cambio catiónico del mismo, el pH del suelo, la presencia de carbonatos o, incluso, la presencia de otras sustancias disueltas en la fase acuosa, como agentes quelatantes. En cambio, para el movimiento de sustancias orgánicas apolares, resulta mucho más relevante la presencia de materia orgánica en el suelo, la naturaleza de la misma, así como otros factores tales como, por ejemplo, la presencia en la fase acuosa sustancias tensioactivas. Finalmente, tratandose de contaminación, no debe olvidarse que con frecuencia existirá una tercera fase móvil, constituida por la NAPL, la cual, además de desplazarse a través del lecho poroso, intercambiará materia con las restantes fases, constituyéndose, de hecho, en ocasiones, en un auténtico foco de contaminación.

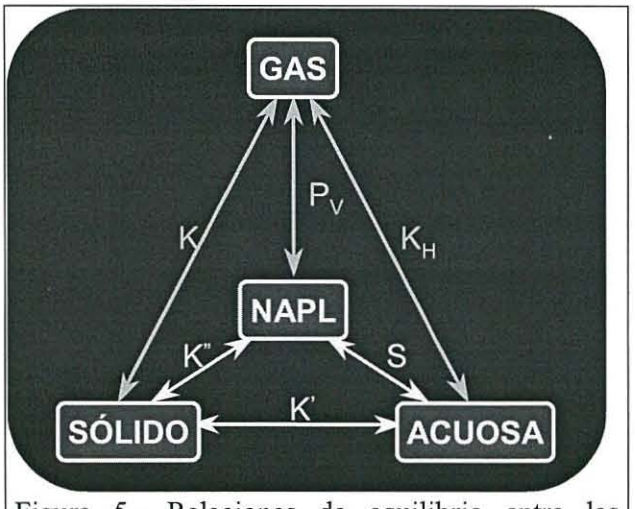


Figura 5.- Relaciones de equilibrio entre las diferentes fases del suelo.

Como consecuencia, los efectos que la presencia de contaminantes pueden causar dependen de la facilidad con la que estas sustancias pueden transferirse a los organismos vivos, y esta depende de multitud de factores (cantidad y naturaleza de la materia orgánica, composición de la materia inorgánica, estructura y textura, humedad, pH, potencial redox, ...) que además pueden sufrir modificaciones a lo largo del tiempo (6, 7, 8). Por otra parte, las técnicas de recuperación de emplazamientos contaminados se

encuentran afectadas por limitaciones similares, especialmente, aunque no únicamente, si se basan en procedimientos biológicos: No puede ser biodegradado aquello que no puede ser transferido hasta las inmediaciones (o el interior) de los microorganismos responsables de la biodegradación (9, 10).

Concepto de biodisponibilidad.

Todo ello ha llevado al desarrollo del concepto de biodisponibilidad (11), que resulta de interés tanto para el establecimiento del riesgo asociado a la contaminación, como para el establecimiento del límite máximo de eficacia de la limpieza a través de lo que se ha denominado "biorremediación". Hace ya bastantes años que quedó claro que no sería posible ni técnica ni financieramente tratar todos los emplazamientos contaminados hasta dejarlos sin restos de contaminación (5, 12). De hecho, a pesar del esfuerzo económico realizado por la mayor parte de los países desarrollados para la recuperación de emplazamientos contaminados, en la UE se estima que aproximadamente el 75-90 % de los suelos contaminados que se excavan se transportan a vertedero sin posterior tratamiento (13). Sin embargo la nueva directiva europea sobre vertederos impedirá la práctica totalidad de estos vertidos. Por ello, sería deseable que, tanto los límites de contaminación que requieren intervención, como los valores de concentración residual aceptables después de un proceso de limpieza se establecieran atendiendo a este tipo de consideraciones, con la finalidad de poder dedicar los recursos limitados a aquellos emplazamientos que suponen una mayor amenza para las poblaciones que se desea proteger. En este sentido, una primera aproximación consiste en utilizar diferentes conceptos de "suelo limpio" para determinar los niveles a alcanzar después de una recuperación, dependiendo de cuál vaya a ser el uso futuro del emplazamiento. Así, por ejemplo, Holanda a modificado su legislación pasando de una normativa "multifuncional" (que exigía que el suelo quedara apto para cualquier uso que se hiciera del mismo), a una normativa que tiene en cuenta el uso presente del emplazamiento. En la figura 6 puede verse la distribución de objetivos de la actualidad.

No obstante, estas consideraciones se basan con frecuencia en concentraciones totales en el suelo, sin considerar las diferentes formas en las que el contaminante puede estar presente. Sería deseable que los límites de contaminación exigibles estuvieran relacionados con el riesgo que la presencia de dichos contaminantes representa. Sin embargo, limitaciones técnicas y falta de conocimiento preciso sobre cuáles son los mecanismos que influyen en la mayor o menor biodisponibilidad de los contaminantes provoca que, en la práctica totalidad de los casos, tanto los límites para establecer la prioridad de actuación, como los valores que se deben alcanzar al finalizar el proceso de limpieza, estén basados más en la concentración total del contaminante en el suelo o sedimento que en una medida real del riesgo asociado a su presencia.

La importancia que el tiempo transcurrido desde que ocurrió el vertido tiene sobre la biodisponibilidad es una dificultad añadida a la posible determinación del riesgo en base a la medida de concentraciones totales de contaminación combinadas con las características físicas y químicas del emplazamiento. En 2000 Alexander (15) señalaba "A medida que persisten (o envejecen) en el suelo los compuestos orgánicos se hacen progresivamente menos disponibles para su asimilacion por los organismos, para ejercer efectos nocivos, o para su biodegradación o bioremediación por microorganismos. Esta biodisponibilidad decreciente no está reflejada en los métodos usados de análisis químico de suelos disponibles para la determinación de las concentraciones de contaminantes orgánicos. Como consecuencia, estos métodos sobreestiman la exposición, y por lo tanto los riesgos, de la presencia de compuestos tóxicos en emplazamientos contaminados".

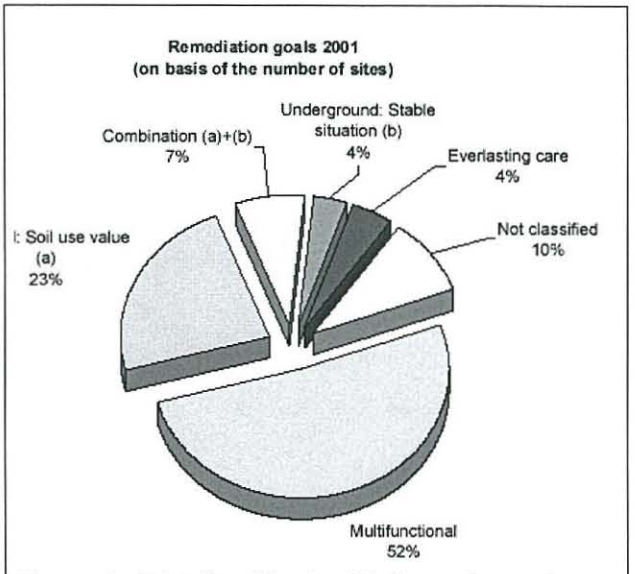


Figura 6.- Distribución de objetivos alcanzados en Holanda hasta 2001 (**14**).

En determinados aspectos, la necesidad del estudio de la disponibilidad relativa de forma conjunta al establecimiento de la concentración, no es novedoso. Por ejemplo, en lo que se refiere a los pesticidas, el estudio sobre la prolongación del efecto derivado de su uso, así como de la no persistencia excesiva de los mismos en la naturaleza, ha sido objeto de estudio durante varias décadas. Asimismo, en lo que se refiere a la presencia de metales pesados en el suelo, el estudio sobre las diferentes formas en que se encuentra presente, además de la cuantificación total de los mismos, lleva efectuándose desde hace ya varios años, existiendo algunos protocolos para lo que se ha denominado "especiación", con un reconocimiento que, si bien no es universal, se encuentran bastante generalizados (16, 17).

Sin embargo, el concepto de biodisponibilidad solamente tendrá utilidad en la medida en que tenga una definición clara, y pueda ser cuantificado. Existen definiciones tales como la dada en la norma ISO / WD 11074 "Biodisponibilidad es el grado en el que un compuesto químico presente en la matriz del suelo puede ser absorbido o metabolizado por humanos o receptores ecológicos o se encuentra disponible para la interacción con sistemas biológicos". A partir de esta definición diferentes usuarios podrían alcanzar diferentes valores de biodisponibilidad, ya que hay muchos aspectos definidos de forma ambigua, empezando por la ausencia del concepto de tiempo en la definición. Es conveniente efectuar una aproximación cuantitativa a este concepto, como la que se efectúa en el trabajo de Bosma et al. (11), si bien, ni siquiera este concepto cuantitativo cubre de manera satisfactoria todos los aspectos que se

encuentran relacionados con el establecimiento del riesgo, ya que este depende siempre de múltiples factores que interaccionan.

El concepto cuantitativo de biodisponibilidad (11) se desarrolla a partir de la constatación de que un incremento en la capacidad de la conversión microbiológica no conlleva un incremento de la velocidad de biotransformación del contaminante de interés cuando la transferencia de materia es un factor limitante, lo que parece constituir más la regla que la excepción en la contaminación del suelo. De esta forma, los contaminantes se hacen no disponibles cuando la velocidad de transferencia de materia es cero (como en el caso de los residuos ligados por enlaces covalentes). El hecho es que los contaminantes y los microorganismos capaces de degradarlos tienen una distribución espacial diferente en la escala microscópica, siendo precisa la difusión del contaminante desde su emplazamiento hasta el del microorganismo para que aquel pueda ser asimilado y degradado. Existen algunos microorganismos que presentan propiedades quimiotácticas, y pueden desplazarse siguiendo el gradiente químico "buscando" la fuente de contaminación (18). Asimismo, es posible que los microorganismos sean capaces de aumentar su población (o simplemente su actividad metabólica) en las proximidades de los lugares donde se encuentra el contaminante (19). Finalmente es posible que los microorganismos sean capaces de generar sustancias tensioactivas que faciliten la solubilización de las sustancias que requieren para su actividad biológica. Sin embargo, es frecuente que, o bien debido a la naturaleza refractaria del contaminante, o bien a su baja concentración, la capacidad transformadora de la comunidad microbiológica apenas se vea modificada por la presencia del propio contaminante (10).

Por ello, una descripción relativamente adecuada de la situación sería aquella en la que la velocidad de transformación por parte del microorganismo es lo suficientemente elevada como para generar en su entorno una zona de concentración pequeña de contaminante, lo que a su vez genera un gradiente de concentraciones entre los poros contaminados y la superficie de las células. La velocidad q_z ($M\ T^{-1}$) con la que el contaminante es transformado puede establecerse a partir de la ecuación de Michaelis-Menten, como

$$q_c = q_{max} \frac{C_c}{K_m + C_c} \tag{1}$$

A concentraciones bajas ($C_c << K_m$), la cinética de la biotransformación es, esencialmente, de orden 1 con respecto a la concentración de contaminante, siendo la relación q_{max}/K_m el coeficiente cinético. Esta es la razón por la cual las cinéticas de orden 1 se usan con frecuencia para la descripción de los procesos de biodegradación en el suelo, sin tener en cuenta que dicha cinética de orden 1 puede estar causada por una transferencia de materia limitante (20, 21). Por otra parte la cantidad de contaminantes que difunden hasta una célula o una microcolonia, q_d ($M\ T^{-1}$), está determinado por la diferencia entre la concentración en la

zona contaminada C_d ($M\ L^{-3}$) y la concentración en la superficie de la célula C_c ($M\ L^{-3}$), que actúa como fuerza impulsora, y una constante cinética de transferencia, k ($L^3\ T^{-1}$) :

$$q_d = k(C_d - C_c) \tag{2}$$

Dicha constante cinética de transferencia puede, con frecuencia, calcularse como el producto de un área superficial (L^2) y un coeficiente de transferencia ($L\ T^{-1}$), que a su vez es la relación entre el coeficiente de difusión efectiva D_{eff} ($L^2\ T^{-1}$) del compuesto de interés en la matriz, y la distancia de difusión δ (L). Bajo condiciones de estado estacionario ($q_d = q_c$), las 2 ecuaciones anteriores pueden combinarse para obtener una expresión de la cantidad de contaminante que es transformdo por el efecto combinado de la transferencia de materia y de la actividad microbiológica, q ($M\ T^{-1}$):

$$q = q_{max} \frac{C_d + K_m + q_{max}\, k^{-1}}{2\, q_{max}\, k^{-1}} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4\, C_d\, q_{max}\, k^{-1}}{(C_d + K_m + q_{max}\, k^{-1})^2}} \right) \tag{3}$$

Esta ecuación se conoce como ecuación Best. Si para simplificar la notación definimos C* como

$$C^* = C_d\, (C_d + K_m + q_{max}\, k^{-1})^{-1} \tag{4}$$

observamos que cuando C* = 1, la velocidad de conversión alcanza su máximo ($q = q_{max}$), o lo que es lo mismo, el contaminante se encuentra completamente disponible para la biodegradación. Valores inferiores de C* indican que la biodisponibilidad es inferior. La importancia relativa de la transferencia de materia con respecto a la actividad intrínseca de la célula puede ser cuantificada mediante el número adimensional de biodisponibilidad

$$Bn = \frac{k}{(q_{max}/K_m)}\,. \tag{5}$$

de tal forma que cuando exista control preferente de la transferencia de materia se obtendrán valores inferiores a la unidad de este número mientras que valores superiores a 1 indicarán que el control reside en la actividad microbiológica. El concepto es sencillo y útil, pero lógicamente tiene limitaciones importantes, que deben estar presentes cuando se utilice. Por ejemplo, es posible que la población microbiana no sea estable y que aumente o disminuya dependiendo de la velocidad de suministro del contaminante. Asimismo es posible que sean otros los factores limitantes, como por ejemplo, la velocidad de transferencia del aceptor de electrones, o que se produzca un control simultáneo de ambos transportes desde diferentes interfases (20).

Los procedimientos de estudio de la biodisponibilidad basados en la asimilación por organismos superiores (desde lombrices a niños pequeños), que incorporan directamente el suelo a su sistema

digestivo, no siempre son posibles, y desde luego pueden resultar costosos y requerir excesivo tiempo de laboratorio. Es deseable disponer de procedimientos físicos y químicos que permitan predecir de forma más rápida y económica la fracción biodisponible.

Evaluación de la biodisponibilidad.

La extracción exhaustiva de los contaminantes de la matriz del suelo no se correlaciona de manera suficientemente satisfactoria con el riesgo que dicho contaminante representa para la población que se desea proteger (22). Como consecuencia, en principio, se hacen necesarios los ensayos biológicos directos para establecer la toxicidad, que permiten efectuar predicciones precisas, pero estos resultan excesivamente costosos y requieren mucho tiempo de ensayo. Se hace necesario, por lo tanto, desarrollar procedimientos de análisis químicos que permitan efectuar las predicciones relativas a la biodisponibilidad. Los estudios más exhaustivos en este sentido, realizados con moléculas orgánicas, se han efectuado con pesticidas (23), encontrándose que las mejores correlaciones entre la toxicidad de los herbicidas y los insecticidas y se obtenía cuando se lleva a cabo el "análisis del agua del poro" del suelo.

En la actualidad se están desarrollando otros protocolos, y buena parte del trabajo que se presenta aquí persigue establecer la correlación entre las cinéticas del transporte en condiciones abióticas y la velocidad de asimilación de los sustratos por parte de los microorganismos. La velocidad de desorción desde la matriz del suelo hacia la fase acuosa, cuando se trabaja con compuestos de baja solubilidad requiere, generalmente, la retirada eficaz del contaminante de la fase acuosa para poder seguir la cinética del proceso. Ello, en el caso de los contaminantes volátiles, suele efectuarse mediante el arrastre de los mismos con una corriente gaseosa que permite mantener la concentración en la fase acuosa en nivéles próximos a cero y, al mismo tiempo, no alterar las propiedades de ninguna de las dos fases que se están estudiando. En el caso de los compuestos menos volátiles esto no es factible, como tampoco lo es la utilización de líquidos orgánicos no miscibles, ya que no se puede garantizar que no se altere la interfase sedimento/agua por la presencia del líquido orgánico. La solución reside en la utilización de extracción en fase sólida (SFE; Solid-Phase extraction). Estas fases sólidas actúan como un sumidero "infinito". El objetivo es retirar de la fase acuosa el contaminante que se encuentra disuelto (en el "agua del poro") y, mediante la posterior separación del sólido y análisis de la cantidad de contaminante en él retenido, establecer la concentración de contaminante que se encuentra biodisponible. Los sólidos más utilizados son el Tenax (24, 26, 27), resinas XAD (28) y membranas C-18.

De forma alternativa se ha propuesto la utilización del procedimiento de extracción con disolventes, pero utilizando condiciones de extracción suaves, de forma que se extraíga únicamente la fracción biodisponible. Otra alternativa es emplear la desorción térmica asocida a un detector (por ejemplo, espectrómetro de masas), para lograr predecir las cinéticas de desorción en condiciones ambientales a

partir de experimentos que transcurran a velocidades notablemente mayores (29). Finalmente se han propuesto combinaciones de algunas de las técnicas anteriores (24).

En este trabajo se estudia la velocidad relativa de la desorción de fenantreno y pireno en condiciones abióticas, mediante la técnica de desorción tenax, con respecto a la correspondiente a la velocidad de mineralización por parte de microorganismos conocidos y capaces de llevar a cabo dicha mineralización, en dos sedimentos naturales que tienen un significativo historial de contaminación por parte de este y de otros compuestos.

Procedimiento experimental.

Materiales y reactivos.

Compuestos radioactivos.

Los compuestos marcados con carbono-14, fenantreno-9-^{14}C y pireno-4,5,9,10-^{14}C, se obtuvieron de la firma Sigma Aldrich, con una pureza radioquímica > 98 %, y con 13.1 mCi/mmol y 58,7 mCi/mmol respectivamente. La medida de la radioactividad se efectúa mediante un Contador de Centelleo modelo Beckman Coulter LS 6500. El líquido de centelleo, suministrado por Beckman Coulter, es ready safe excepto en el caso de las muestras obtenidas por oxidización, que emplean como líquido de centelleo el mismo que se utiliza para recoger el $^{14}CO_2$: Carbon-14 cocktail de R. J. Harvey Instruments.

Bacterias, medios y cultivos.

Novosphigobium sp LH128WT, microorganismo utilizado en los ensayos de mineralización de fenantreno, fue aislado mediante un método de enriquecimiento en agua (32). Por su parte, la *Mycobacterium* sp VM 552, fue utilizada en los experimentos de mineralización de pireno. Ambos microorganismos fueron amablemente suministrados por D. Springael (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek, Mol. Belgica). Las dos cepas fueron mantenidos de forma rutinaria en el medio "Bélgica", conteniendo un 0,2 % en peso del PAH correspondiente. Dicho "**medio Bélgica**" está compuesto por $CaCl_2$(22 mg/L) $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ [80 mg/L], Fe[III] CitratoNH_4 (4.8 mg/L), $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (0.2 g / L), Na_2SO_4 (0.420 g / L), TRIS (6 g / L), NaCl (4.67 g / L), KCl (1.5 g / L) y como solución traza, se añadió 1 ml /L de una solución stock de microelementos para obtener concentraciones finales de $ZnSO_4.7H_2O$ (0.13 g/L), $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ (0.098 g/L) , H_3BO_3 (0.061 g/L) , $CoCl_2.6H_2O$ (0.19 g/L), $Cl_2Cu.2H_2O$ (0.017 g/L), $NiCl_2.6H_20$ (0.023 g/L) y $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0.047 g/L). El pH del medio se ajustó a 7.0 con HCl 3N.

Los experimentos de mineralización y de desorción se llevaron a cabo utilizando la misma disolución acuosa de "**medio de mineralización**" conteniendo KH_2PO_4 (0.9 g/L), K_2HPO_4 (0.1 g/L), NH_4NO_3 (0.1 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0.1 g/L), $CaCl_2$ (0.080 g/L), $FeCl_3.6H_2O$ (0.01 g/L) y 1 ml/L de un stock de microelementos para obtener concentraciones finales de 0.0014 g /L para $Na_2MoO_4.2H_2O$ y 0.002 g /L para cada uno de los siguientes compuestos: $Na_2B_4O_7.10H_2O$, $ZnSO_4.H_2O$, $MnSO_4.H_2O$ y $CuSO_4.5H_2O$.

Este medio presenta un valor de pH de 5,8, lo que permite el desprendimiento prácticamente instantáneo del CO_2 formado a partir del ácido carbónico.

Otros compuestos.

Para el mantenimiento de los cultivos bacterianos se utilizaron los correspondientes PAHs sin marcar, que fueron obtenidos de la casa Sigma. Las condiciones abióticas se consiguieron utilizando azida de sodio, suministrada por la casa Sigma. Las extracciones se efectuaron con Tenax® TA (polímero poroso basado en el óxido de 2,6-difenil-*p*-fenileno, suministrado en pequeñas partículas esféricas 60-80 mesh; 177-250 μm), de la casa Chrompak. Los disolventes utilizados para la regeneración del mismo fueron acetona (Scharlau) y Hexano (Panreac), ambos de calidad "para análisis", además de agua de calidad milli-Q.

Los sedimentos utilizados en los ensayos proceden del lago Ketelmeer (K3) Holanda, y del lago Valparanta (Finlandia). Las características de estos sedimentos están publicadas en trabajos independientes (30, 31). En términos generales el sedimento Ketelmer es un sedimento de textura muy fina y alto contenido en meteria orgánica, mientras que el Valparanta es un sedimento arenoso. Ambos sedimentos fueron secados mediante evaporación en estufa a 40 °C, y tamizados a través del tamiz de 2 mm. Posteriormente fueron conservados en refrigerador a 4 °C.

Vista del Lago Ketelmeer.

Procedimiento de adición del compuesto marcado y envejecimiento de las muestras.

Después de el correspondiente estudio bibliográfico, se selecciono la azida de sodio como agente inhibidor de la actividad biológica, al considerarse que este compuesto no altera las características físicas del medio fase acuosa-sedimento, y puede ser lavado de forma eficaz. (25). Sobre tubos de centrífuga de vidrio, con cierre de tapón roscado, que se complementaba con papel de aluminio y teflón para evitar la adsorción sobre el tapón, se añade 1 g del sedimiento objeto de estudio, y 12 ml del mismo medio en el que se va a llevar a cabo la mineralización (medio de mineralización descrito en el apartado Bacterias, medios y cultivos.), pero conteniendo una concentración 10^{-2} M de azida de sodio para evitar la actividad microbiológica durante el periodo en de envejecimiento de las muestras. Asimismo, estas disoluciones contenían concentraciones conocidas del compuesto marcado correspondiente, concentraciones que

normalmente se encontraban ligeramente por debajo del 50 % de la solubilidad. En estos tubos el espacio de cabeza de los tubos es inferior a 1 cm^3, por lo que no es probable que se produjeran pérdidas significativas por volatilización. Asimismo se utilizaron tubos con el mismo cierre y la misma disolución para comprobar que las pérdidas por adsorción son, asimismo, no significativas. Finalmente, la eficacia de la inhibición de la actividad microbiológica se comprobó mediante la utilización de tubos en condiciones similares, pero con únicamente 5 ml de fase acuosa, y utilizando para el cierre trampas de sosa que pudieran recoger el posible $^{14}CO_2$ que se produjera, no habiéndose recogido en ningún caso proporciones superiores al 2 % de la puesta inicialmente.

A la finalización del periódo de envejecimiento se procede al lavado de la azida mediante 4 ciclos de centrifugación, separación de la fase clarificada, y resuspensión en medio de mineralización exento de azida de sodio. Con el objeto de mantener idénticas condiciones en los experimentos de extracción con Tenax (en los que se pretende preservar las condiciones abióticas), las muestras destinadas a estos ensayos fueron sometidas a los mismos ciclos de centrifugado y resuspensión, pero utilizando medio de mineralización con azida de sodio (10^{-2} M). Como puede verse en la figura 7, en la que se encuentran representados los resultados obtenidos en ensayos efectuados para este fin, el proceso de lavado de la azida es eficaz. Así, el comportamiento de las muestras sometidas a tres o más ciclos de cenrifugación (2 o más lavados) era idéntico al ser inoculadas y efectuar los experimentos de mineralización.

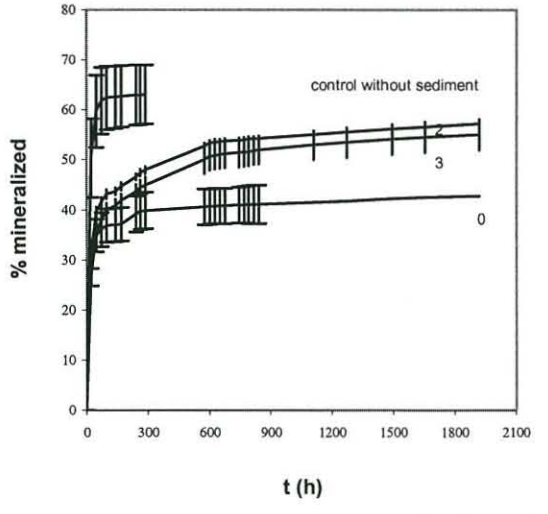


Figura 7.- Resultados de mineralización de fenantreno en presencia del sedimento Ketelmeer para distinto nº de lavados.

La concentración inicial del sedimento se establece mediante un balance de materia en el que se mide toda la radioactividad recuperada, es decir, la contenida en las disoluciones de lavado de la azida, la recuperada en los experimentos de mineralización o de extracción con Tenax, y finalmente la medida de la residual en el sedimento, lo que se efectúa mediante oxidización. Esta se llevo a cabo utilizando un aparato Harvey Biological Oxidizer OX 600, en condicones de 900 °C en el horno de combustión, 680 °C en la zona de catalisis, y 360 ml/min de oxígeno durante el periódo de oxidación, que fue en todos los casos de 4 minutos. En experimentos independientes se comprobó que estas condiciones de operación permiten recuperaciones superiores al 95 %. Por otra parte, la medida de la radioactividad total añadida sobre los tubos permite efectuar un balance, estableciéndose que la recuperación estuvo comprendida en todos los casos entre el 80 y el 120 %.

Experimentos de extracción con Tenax.

El procedimiento de extracción con Tenax está basado en el desarrollado por Cornelissen (27), si bien algunos aspectos están modificados para aprovechar las facilidades de análisis que permite el análisis mediante contador de centelleo.

Después del último ciclo de centrifugado de las muestras de sedimentos, se desecha la fase clarificada y se resuspende el pellet, trasvasándose la totalidad del sedimento (1 g) a embudos de decantación de 250 mL, utilizando como líquido de arrastre una disolución acuosa de composición idéntica a la que se emplea en los ensayos de mineralización (medio de mineralización del apartado Bacterias, medios y cultivos.) pero conteniendo azida de sodio (10^{-2} M). Seguidamente se añaden 1,5 g de Tenax, se cierra el embudo de decantación con tapón de vidrio y se asegura el cierre con teflón y cinta aislante. El embudo se mantiene en agitador orbital a 120 rpm. Periódicamente se renueva el Tenax, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

Después de 1 minuto sin agitación en el que se permite la separación parcial de las fases (el sedimento Valparanta, dado su carácter arenoso se separa suficientemente bien en este tiempo; el sedimento Ketelmeer sigue presentando turbidez aún después de 1 h de sedimentación), se abre el embudo de decantación recogiéndose en un segundo embudo la fase acuosa y la mayor parte del sedimento. El tenax queda adherido a las paredes del embudo superior. Inmediatamente se añaden 1,5 g de Tenax regenerado (ver siguiente apartado) sobre el embudo inferior y se agita para asegurar que prosigue la desorción. Seguidamente, para lavar el sedimento que pudiera haber quedado retenido sobre el Tenax en el embudo superior, se añaden 8 ml de medio de mineralización con azida, se agita y se deja sedimentar durante 5 minutos. Se recoge la fase sólida sedimentada junto con 1 ml aproximadamente de fase acuosa sobre el embudo inferior, y se repite el ciclo de agitación/sedimentación 3 veces. Finalmente se permite la salida de la fase acuosa que aún queda en el embudo superior hasta el inferior.

Aproximadamente entre 1 y 2 ml de fase acuosa quedan mojando el Tenax, por lo que la repetición del proceso produce una ligera acumulación de fase acuosa en el embudo inferior. Para evitar la misma, cada cinco extracciones se recogen alrededor de 40 ml de fase acuosa en 4 tubos de centrífuga, se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos y se desecha el clarificado, a excepción de alrededor de 5 ml que se utilizan para resuspender los pellets y devolver el sedimento al correspondiente embudo de decantación.

Regeneración del Tenax y análisis de la cantidad desorbida.

Sobre el Tenax que permanece en el embudo se añaden 40 ml de hexano, se cierra con el correspondiente tapón de vidrio asegurando el cierre con Teflón y cinta aislante y se deposita sobre el agitador orbital

donde permanece a 120 rpm durante al menos 24 h. Al añadir el hexano se observa la separación de la fase acuosa que permanecía mojando al Tenax.

Después de este periodo se separa el Tenax del hexano mediante un filtro de celulosa (Albet, 150). La fase acuosa que permanecía en el embudo se separa de forma previa a la filtración. El hexano se recoge, se mide su volumen por si hubiera habido pérdidas por evaporación, y se recoge una aliquota de 1 ml para la medida de la concentración por centelleo. Seguidamente se lava el tenax que se encuentra sobre el papel de filtro mediante 3 adiciones de 5 ml cada una de acetona. Estás adiciones permiten arrastrar, además, el Tenax que hubiera quedado en el embudo de decantación. La fase acuosa retirada antes de la filtración se incorpora después del 2º lavado de acetona. El líquido así recogido presenta dos fases: se recoge 1 ml de cada una de ellas para la medida de la radioactividad y se procede a la medida de los volúmenes correspondientes.

Posteriormente se añade de forma secuencial agua (milli-Q), acetona y hexano. Se efectúan tres lavados con cada uno de estos disolventes, empleando 15 ml en cada lavado. Se agrupan los líquidos procedentes de los tres lavados de cada disolvente, se mide el volumen recogido y se recoge una aliquota de 1 ml para medir su actividad en el contador de centelleo. De esta forma se ha establecido que, de forma aproximada, la proporción de compuesto marcado que se recoge con cada una de estas fases es de 62 % con el hexano inicial, 14 % con los primeros 15 ml de acetona, 2 % con los 45 ml de agua milli-Q, 20 % con los 45 ml de acetona, y, finalmente un 2 % con los 45 ml de hexano. El proceso permite asegurar que la concentración residual de compuesto marcado en el Tenax es no detectable en el contador de centelleo. La regeneración termina mediante el secado del Tenax en estufa durante 24 h a 70 ºC.

En este caso, la comparación entre la radioactividad añadida sobre las muestras y la recuperada, incluyendo la residual en el sedimento, efectuada de forma similar a lo indicado en el apartado "Procedimiento de adición del compuesto marcado y envejecimiento de las muestras.", permite establecer que las recuperaciones están comprendidas entre el 92 y el 111 % de la inicial.

Experimentos de mineralización.

Los ensayos de mineralización se llevan a cabo en matraces erelenmeyer de 250 ml, empleando 1 g del sedimento correspondiente, conteniendo PAH al haber sufrido la adición, el periodo de envejecimiento y, finalmente, el proceso de lavado de la azida, tal y como se ha descrito en el apartado "Procedimiento de adición del compuesto marcado y envejecimiento de las muestras.". De forma alternativa se pueden realizar experimentos en ausencia de sedimento, mediante la incorporación de la cantidad de ^{14}C-PAH a la disolución correspondiente de medio de mineralización descrito en "Bacterias, medios y cultivos". En ambos casos se emplea un volumen de 70 ml del mencionado medio. Una vez trasvasada la totalidad de la disolución y del sedimento al correspondiente erlenmeyer se añade la cantidad de inóculo determinada

(1 ml por defecto) sobre cada matraz, preparado tal y como se describe en el siguiente apartado. Finalmente, se tapan los erlenmeyer con tapones recubiertos con teflón, que llevan incorporado las trampas de sosa, con un dispositivo que permite recoger y renovar periódicamente las disoluciones de NaOH 0,5 M.

Preparación del inóculo.

Todo lo que se describe a continuación se lleva a cabo con material estéril y en campana de flujo laminar. Un cultivo de 1 L del medio Bélgica (descrito en el apartado "Bacterias, medios y cultivos") de la bacteria correspondiente, cuando se encuentre en la fase exponencial del crecimiento de los microorgaanismos, se filtra a través de placa porosa (nº 4) para eliminar los restos de PAH sólido de la disolución, recogiéndose el filtrado en otro matraz de 2 L, que se mantiene en agitación durante 24 h más para permitir que los microorganismos eliminen la práctica totalidad del sustrato que todavía pudiera estar disuelto. Finalmente, para garantizar la no incorporación de otros sustratos al proceder a la inoculación de los microorganismos, se procede al lavado del inóculo. Para ello se reparte la totalidad del cultivo (1 L) en 6 tubos de centrífuga (de 250 ml) y se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos. El líquido clarificado se desecha y se arrastran los pellets utilizando alrededor de 30 cm^3 de medio de mineralización hasta un único tubo de centrífuga. Se repite el proceso de centrifugado, rechazo del clarificado y redispersión 2 veces más, con la salvedad de que la última vez se procederá a la dispersión en el volumen que se estime que va a ser necesario para proceder a la inoculación de los matraces (1 ml por matraz, salvo que se indique otra cantidad).

Para conseguir obtener concentraciones de biomasa reproducibles se procede al cálculo de la concentración del inóculo por dos procedimientos independientes. Por una parte se mide la densidad óptica a 600 nm (usando un espectrofotómetro Genesys 10, de Spectronic Unicam) y por otra se procede al recuento de Unidades Formadoras de Colonias (CFUs), mediante el procedimiento de diluciones sucesivas en placas. El primer procedimiento permite una medida aproximada muy rápida, mientras que el segundo procedimiento permite alcanzar mayor precisión, pero requiere el tiempo necesario para que crezcan las colonias, que puede llegar a ser de 3 o 4 días. Una vez medida la concentración del inóculo se procede a su dilución para alcanzar concentraciones semejantes en todos los experimentos, habiéndose empleado aproximadamente $2{,}5 \cdot 10^7$ CFU/ml.

Resultados y discusión.

Resultados de mineralización

Mineralización en ausencia de sedimento

En ausencia de sedimento se han llevado a cabo experimentos utilizando diferente concentración inicial de sustrato y diferente cantidad de inóculo. En la figura 8 están representados los resultados obtenidos para masas de fenantreno comprendidas, aproximadamente, entre 200 y 1600 ng. Asimismo se han efectuado ensayos adicionales empleando la máxima cantidad de sustrato y variando la concentración de microorganismos en un orden de magnitud. En la misma figura están representados los resultados en términos relativos. De forma inmediata, puede observarse que la velocidad de mineralización relativa no depende, al menos en forma muy significativa, ni de la concentración inicial de biomasa ni de la concentración inicial de sustrato. Puesto que puede suponerse que la velocidad de desprendimiento de CO_2 tiene una relación directa con la de desaparición de sustrato, se concluye que el proceso tiene lugar siguiendo una cinética de orden 1 con respecto al contaminante PAHs.

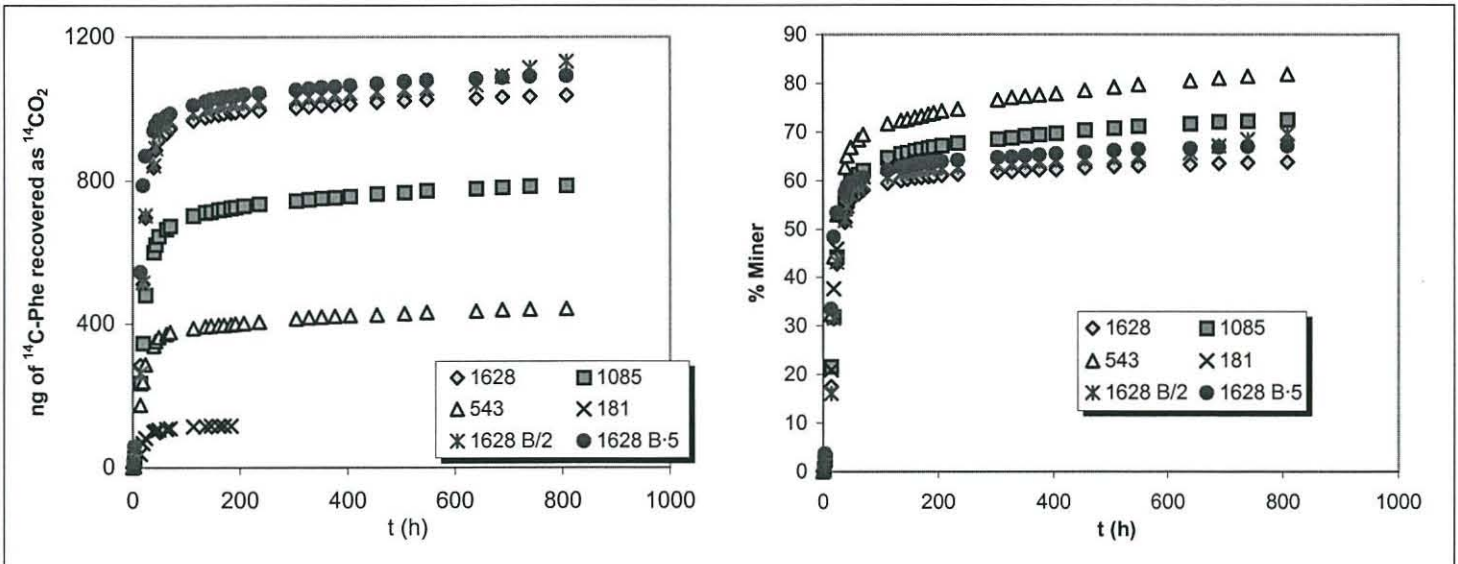


Figura 8.- Mineralización de ^{14}C-Phe por LH-128, en ausencia de sedimento. En leyenda masas iniciales en ng.

Asimismo, se han llevado a cabo experimentos de mineralización de pireno en ausencia de sedimento con los resultados representados en la figura 9. En ellos puede comprobarse que el comportamiento, en términos cualitativos es similar al correspondiente a la figura anterior.

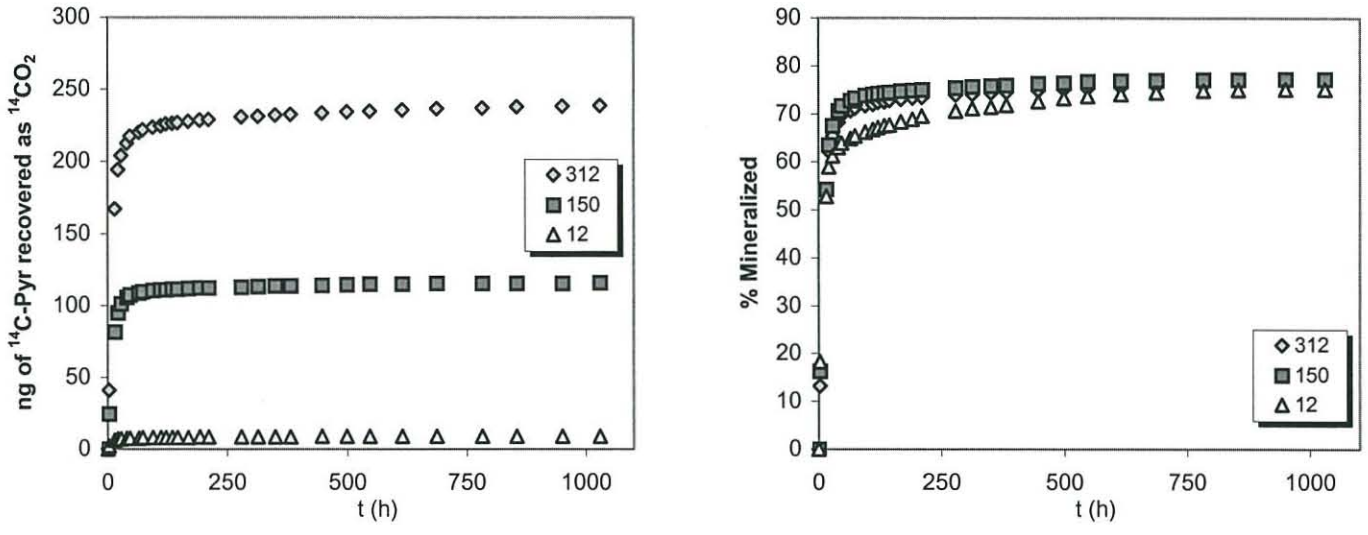


Figura 9 VM-552 .- Mineralización de ^{14}C-Pyr por VM-552 en ausencia de sedimento. En leyenda masas iniciales en ng

Mineralización en presencia del sedimento Ketelmeer.

Los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo con diferentes concentraciones iniciales de fenantreno marcado retenido en el sedimento K3, después de 1 semana de contacto, y empleando inoculaciones de LH 128. se encuentran representados en la figura 10. En la figura 11 se encuentran representados los resultados obtenidos con pireno. Como puede apreciarse, también en presencia de sedimento, cuando se representan en términos relativos con respecto a la concentración inicial de contaminante, los resultados son muy similares, lo que implica que los procesos que tienen lugar deben ser de orden 1 con respecto a esta variable. Más adelante se propone un mecanismo que permite explicar estos procesos.

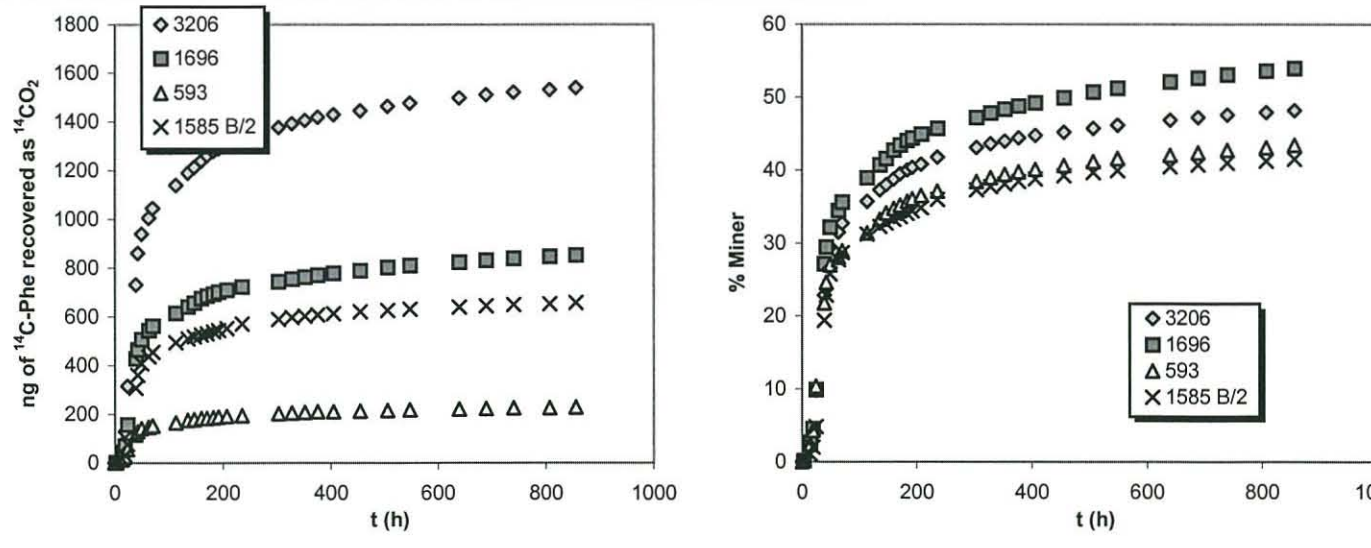


Figura 10.- Mineralización de ^{14}C-Phe por LH-128, retenido en el sedimento Ketelmeer. En leyenda masas iniciales en ng

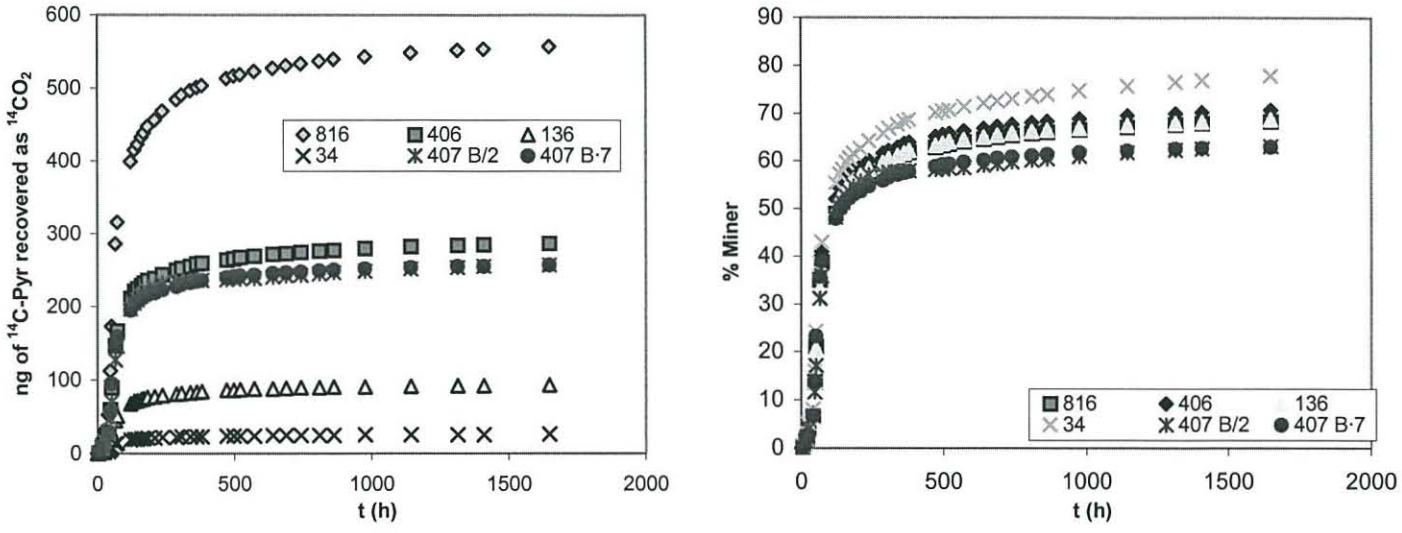


Figura 11.- Mineralización de ^{14}C-Pyr por VM-552, retenido en el sedimento Ketelmeer.
En leyenda masas iniciales en ng

Mineralización en presencia del sedimento Valparanta.

Como en el caso de los resultados presentados en el apartado anterior, los experimentos realizados con fenantreno (figura 12) y con pireno (figura 13) como contaminantes marcados incorporados al sedimento Valparanta indican que el proceso es independiente de la concentración inicial por lo que puede deducirse que los procesos que tienen lugar, básicamente, obedecen a (o están controlados por) cinéticas de orden 1 con respecto a la concentración del PAHs objeto de estudio.

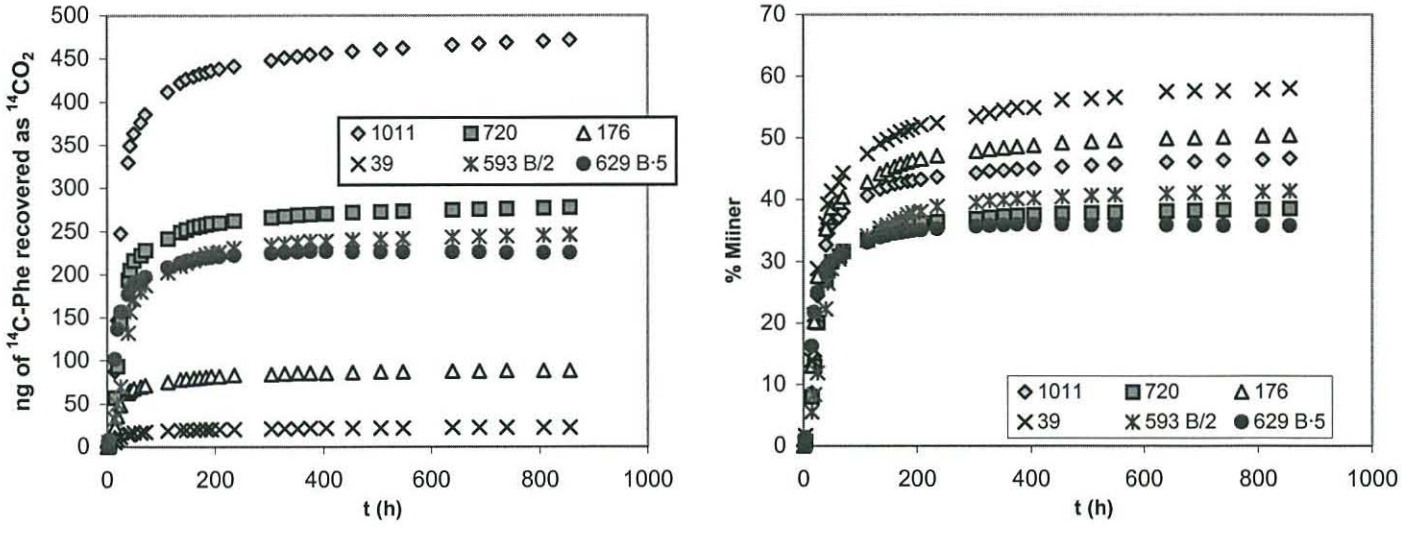


Figura 12.- Mineralización de ^{14}C-Phe por LH-128, retenido en el sedimento Valparanta.
En leyenda masas iniciales en ng.

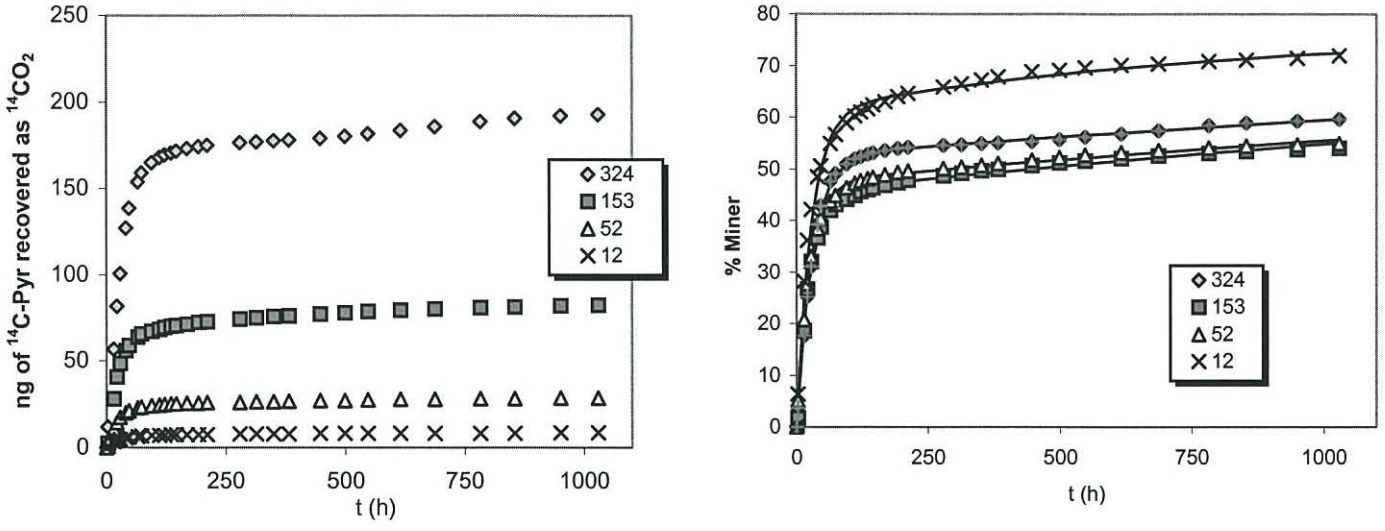


Figura 13.- Mineralización de ^{14}C-Pyr por VM-552, retenido en el sedimento Valparanta. En leyenda masas iniciales en ng

Resultados de desorción mediante extracción con Tenax

Desorción de los PAHs retenidos en el sedimento Ketelmeer.

Los resultados de los experimentos de desorción llevados a cabo con los dos sustratos y los dos sedimentos están representeados en las siguientes figuras. Junto a la recuperación porcentual están representados para cada uno de ellos llos valores de ln(S/S°) frente al tiempo. Si la desorción fuera de orden 1 con respecto al sustrato retenido esta última representación debería ser una recta. Puede apreciarse que ello no es así, pero, al mismo tiempo, parecen distinguirse algunos tramos rectos en estas representaciones, por lo que la desorción se representará más adelante utilizando un modelo de 2 o más regiones lineales.

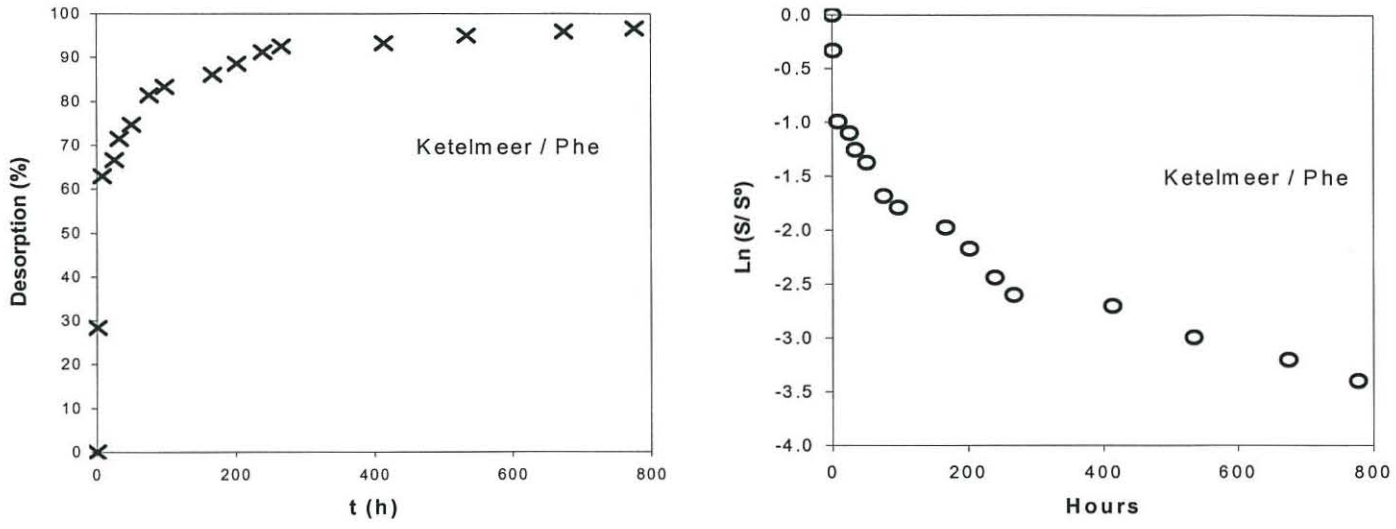


Figura 14.- Desorción de ^{14}C-Phe mediante extracción Tenax de sedimento Ketelmeer.

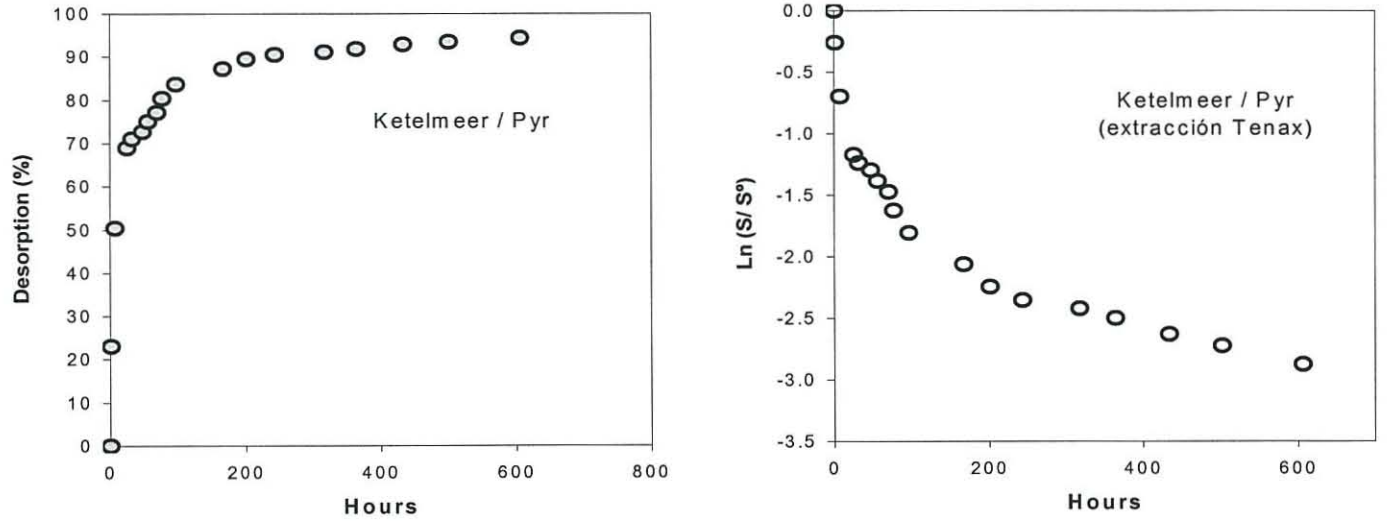


Figura 15.- Desorción de ^{14}C-Pyr mediante extracción Tenax de sedimento Ketelmeer.

Desorción de los PAHs retenidos en Valparanta.

Puede verse que en términos cualitativos el comportamiento es semejante al observado en el caso de Ketelmeer. En cambio existen notables diferencias cuantitativas, como cabía esperar de dos sedimentos de naturaleza tan diferenciada.

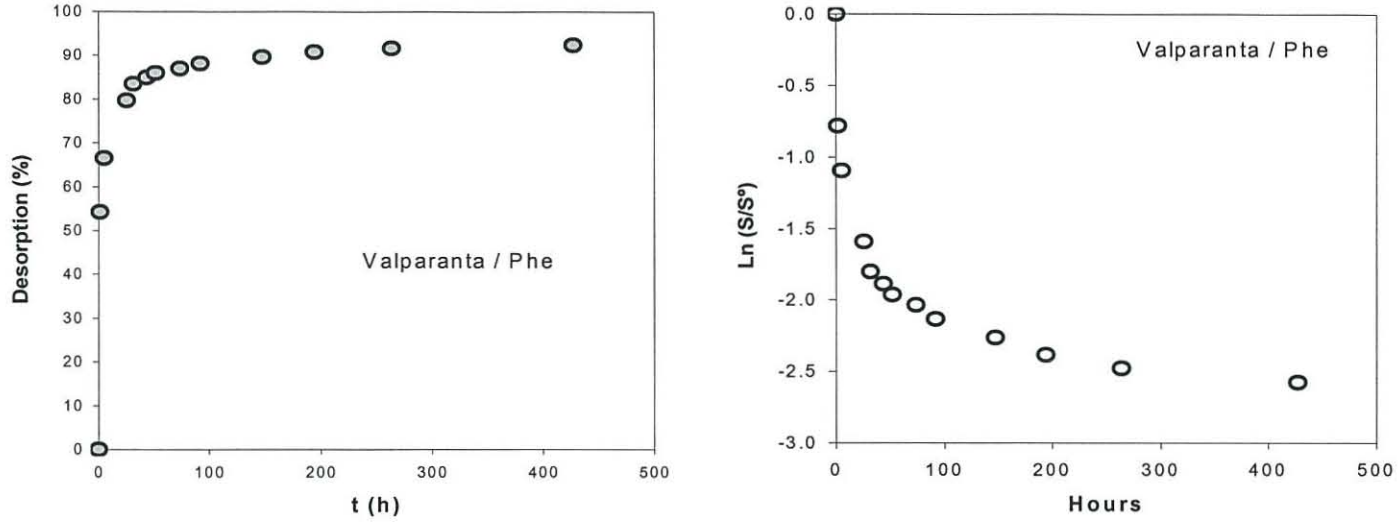


Figura 16.- Desorción de ^{14}C-Phe mediante extracción Tenax de sedimento Valparanta.

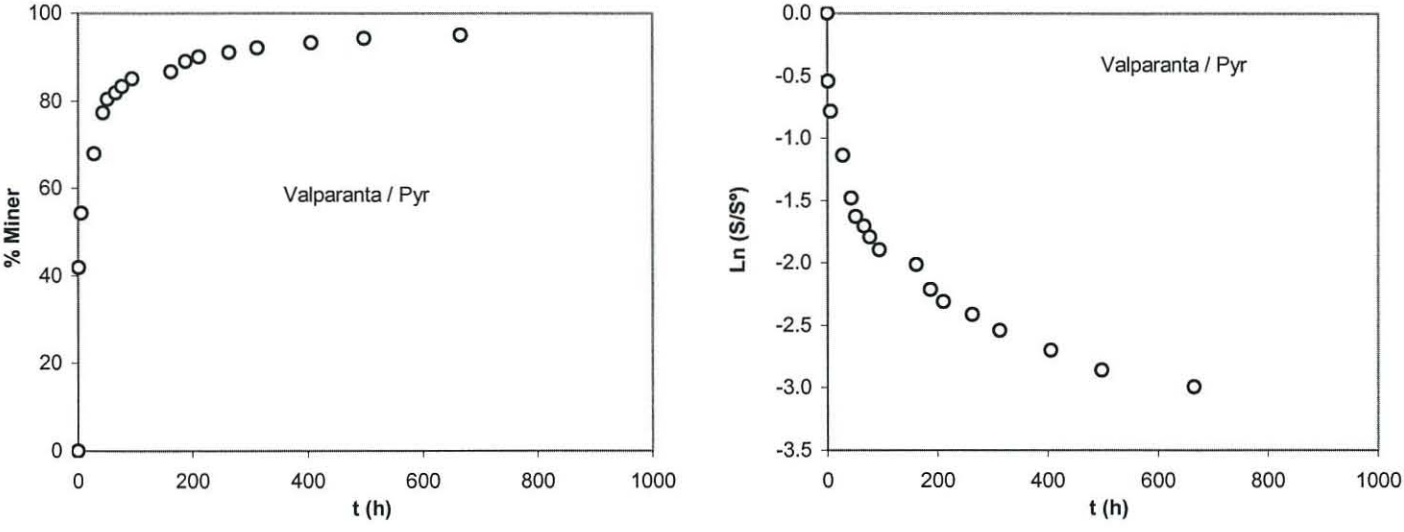


Figura 17.- Desorción de ^{14}C-Pyr mediante extracción Tenax de sedimento Valparanta.

Desarrollo del modelo

El modelo biológico en ausencia de sedimento

Interpretación de la mineralización mediante una cinética de orden 1 sencilla

En principio cabe esperar, en el caso de un sustrato poco soluble como los PAHs, que la cinética de la mineralización se comporte conforme a la cinética de Michaelis-Menten (ver ecuación 1, pg. 7) para concentraciones considerablemente inferiores a las de K_m, y por lo tanto se observe una cinética de orden 1 con respecto al sustrato. Por otra parte no cabe esperar, dada la relativamente alta relación inicial

biomasa/sustrato, un crecimiento significativo de la biomasa, por lo que es razonable comenzar proponiendo un modelo en el que el contaminante (S) desaparezca según:

$$\frac{d\,S}{dt} = -\,k_1\,S \qquad (6)$$

(En esta y las siguientes expresiones las letras mayúsculas representan concentraciones del respectivo compuesto; Si no se incorpora superíndice la concentración se refiere a la fase acuosa).

Teniendo en cuenta que una parte del sustrato se mineralizará con formación de CO_2, una parte del ^{14}C que se encuentra en el sustrato se recuperará como $^{14}CO_2$ por lo que, si denominamos (1– **a** ; 0 < **a** < 1) a la fracción que se mineraliza, y consideramos que la velocidad de formación de $^{14}CO_2$ está controlada por la de etapa inicial de desaparición del sustrato, obtenemos el **modelo lineal**:

$$\frac{d\,M(CO_2)}{dt} = (1-a)\,V\,k_1\,S \qquad (7)$$

donde $M(CO_2)$ es la masa de ^{14}C-PAH que se recupera como $^{14}CO_2$ en las trampas y V el volumen de la disolución. El ajuste de los resultados obtenidos en el apartado "Mineralización en ausencia de sedimento" a una ecuación de este tipo permite obtener los resultados representados en la figura 18, en la que la línea continua representa los resultados del modelo, para los parámetros que se indican en el pie de la figura.

Como puede verse el modelo permite un buen ajuste del periodo inicial, pero predice una estabilización en la producción del CO_2 que no se corresponde con los resultados experimentales. De éstos, parece deducirse que existe alguna otra fuente de producción de CO_2 que es considerablemente más lenta pero que persiste cuando la mineralización de sustrato ha finalizado.

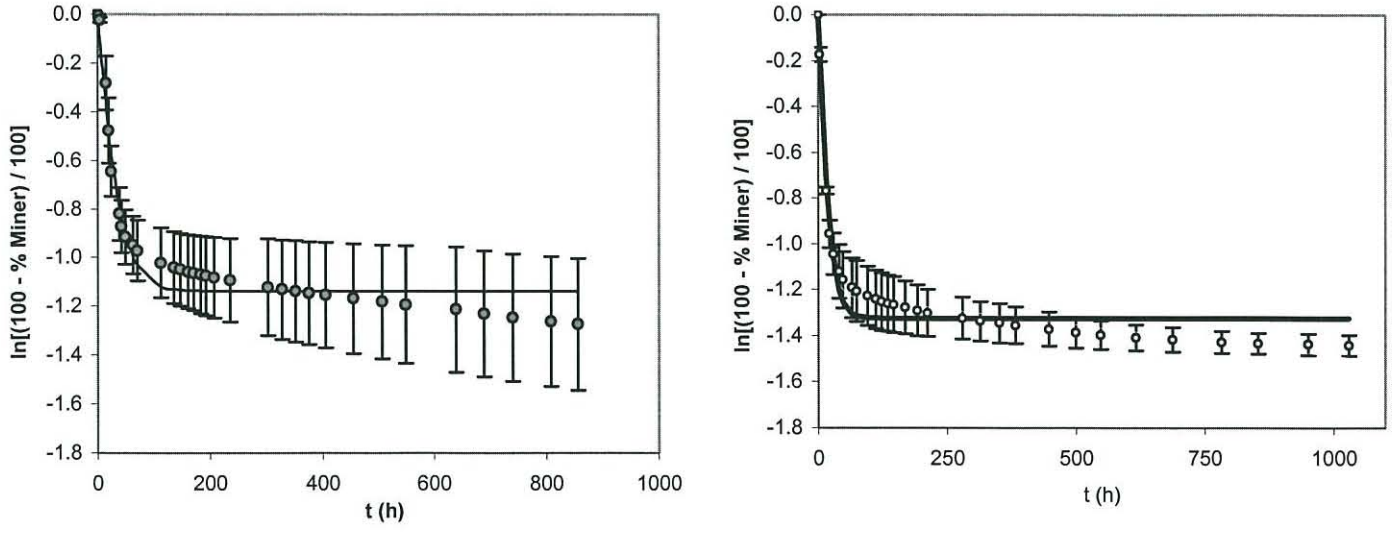


Figura 18.- Ajuste de los resultados de mineralización en ausencia de sedimento al modelo lineal; (Phe: a = 0,32; k = 4,15· 10^{-2} h^{-1}) (Pyr: a = 0,264 ; k = 7.73· 10^{-2} h^{-1})

Interpretación de la mineralización mediante un modelo de formación de compuesto intermedio.

Por esta razón el modelo anterior se ha complementado con otro en el que la fracción de sustrato que no se mineraliza de forma directa da lugar a la formación de otros compuestos (probablemente biomasa) que denominamos genéricamente X, y que una vez formados pueden ser oxidados según un proceso más lento para formar $^{14}CO_2$, es decir,

$$S \xrightarrow{k_1} (1-a)\, CO_2 + a\, X$$

$$X \xrightarrow{k_2} CO_2 \qquad (8)$$

Las ecuaciones diferenciales correspondientes a un modelo de este tipo serían:

$$\frac{dS}{dt} = -k_1 S \qquad (9)$$

$$\frac{dX}{dt} = A\, k_1 S - k_2 X \qquad (10)$$

$$\frac{d\,M(CO_2)}{dt} = V\cdot\ [(1-A)\, k_1 S + k_2 X] \qquad (11)$$

La forma integrada de estas ecuaciones, suponiendo que inicialmente solamente tenemos sustrato y no existe compuesto intermedio ni CO_2, lo cual es evidente cuando se trabaja con sustrato marcado y solamente se sigue la cinética de ^{14}C, es la siguiente (33):

$$S = S^o \exp(-k_1 t) \tag{12}$$

$$X = S^o A k_1 \left(\frac{\exp(-k_1 t)}{k_2 - k_1} + \frac{\exp(-k_2 t)}{k_1 - k_2} \right) \tag{13}$$

$$M(CO_2) = S^o V \left[(1 - A)(1 - \exp(-k_1 t)) + A \left(1 - k_2 \frac{\exp(-k_1 t)}{k_2 - k_1} - k_1 \frac{\exp(-k_2 t)}{k_1 - k_2} \right) \right] \tag{14}$$

El ajuste de estas ecuaciones a los datos experimentales de desprendimiento de $^{14}CO_2$ en ausencia de sedimento permite obtener simultáneamente los valores de A, k_1 y k_2. Sin embargo, con la finalidad de evaluar de forma más precisa lo que ocurre en las etapas más lentas del proceso, se considera más conveniente efectuar el ajuste minimizando la suma de los cuadrados de la diferencia de los logaritmos de los valores del modelo y de los experimentales.

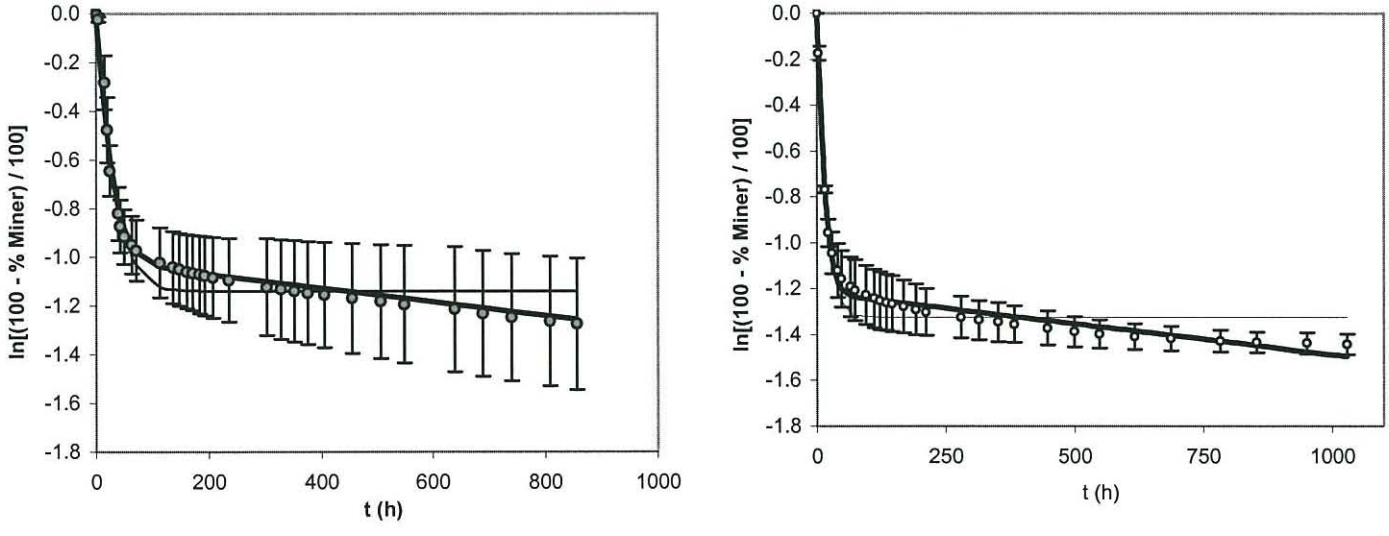


Figura 19.- Ajuste de los resultados de mineralización en ausencia de sedimento al modelo de compuesto intermedio;

El modelo de desorción

Interpretación de los resultados mediante un modelo lineal de dos y tres regiones.

Se ha demostrado que la capacidad de sorción del Tenax es adecuada para utilizarse como sumidero de los compuestos que se desorben de un sedimento (35, 36). La afinidad del Tenax por los compuestos orgánicos es similar (del orden de 10^5 L/kg) a la de la materia orgánica de los sedimentos, pero su masa es mucho mayor (1,5 g de Tenax por 1 g de sedimento, con un contenido de materia orgánica de pocas unidades porcentuales). Además la concentración del compuesto de interés en el Tenax permanece en valores relativamente bajos en comparación con los de la materia orgánica porque el Tenax se renueva muchas veces a lo largo del experimento. Todo ello permite suponer que los PAHs una vez desorbidos del

sedimento son retenidos de forma cuantitativa por el Tenax, y, por lo tanto, no existe la posibilidad de que se readsorban en el sedimento, o la cantidad que se readsorbe puede considerarse despreciable.

En el caso de que existan dos regiones en el sedimento con cinéticas de desorción lineales, si la concentración en el sólido la expresamos en (μg PAH/g suelo) y la de la fase acuosa en (μg PAH/cm^3 fase acuosa), y M representa la masa de sólido (g) y V el volumen de fase acuosa (cm^3), puede describirse la desorción por:

$$S^S_{fast} \xrightarrow{k_{fast}} S\ (M/V) \tag{15}$$

$$S^S_{slow} \xrightarrow{k_{slow}} S\ (M/V) \tag{16}$$

En el caso de que fuera necesario, se puede incorporar una tercera región de forma similar:

$$S^S_{very\ slow} \xrightarrow{k_{very\ slow}} S\ (M/V) \tag{17}$$

En estas expresiones la concentración en cada una de las fracciones del sólido está referida a la unidad de masa total del sólido.

$$S^S = \sum_j S^S_j \qquad j = (\text{fast ; slow ; very slow}). \tag{18}$$

donde, siempre que las concentraciones en el sólido se encuentren en equilibrio entre si, puede definirse la fracción de sedimento que tiene un determinado comportamiento en cuanto a la velocidad de desorción, F_j, como

$$F_j = \frac{S^S_j}{S^S}; \qquad \text{evidentemente, } \sum_j F_j = 1 \tag{19}$$

En general, puede suponerse que la condición de equilibrio entre las fases se satisface en las condiciones iniciales, después de que el contaminante lleva en contacto con el sedimento el suficiente tiempo, pero ello no tiene por qué ser así y puede ser la justificación de los diferentes valores aparentes de F_j obtenidos en el mismo sedimento y el mismo contaminante. El valor de los F_j también puede estar afectado, en principio, por la presencia de otros contaminantes en el caso de que la adsorción tenga lugar de forma competitiva entre los distintos sustratos. En este caso es más probale que las isotermas de retención sean no lineales.

Asumiendo que en los instantes iniciales las distintas fracciones del sedimento se encuentran en equilibrio entre si, la correspondiente ecuación cinética resultante es, en forma integrada:

$$S_t^S = S_o^S \cdot \sum_j F_j \cdot \exp(-k_j t) \tag{20}$$

En donde S_t^S y S_o^S son las concentraciones totales en el sólido a tiempo t y en las condiciones iniciales. Con objeto de conseguir estudiar las distintas regiones del sólido, dando la correspondiente importancia a cada región, el ajuste se efectúa minimizando el sumatorio de los cuadrados de las diferencias de los logaritmos de los cocientes entre los valores a tiempo t y los iniciales, es decir:

$$\text{mínimo de } \sum \left[\ln\left(S_t^S / S_o^S \right)_{exper.} - \ln\left(S_t^S / S_o^S \right)_{teor.} \right]^2 \tag{21}$$

Resultados

En las figuras siguientes puede observarse el ajuste tanto en escala natural como en escala logarítmica al modelo de tres regiones (5 parámetros de ajuste). En el caso de los ensayos efectuados con fenantreno y Ketelmeer por un lado y de pireno y Valparanta por otro se ha incluido la representación correspondiente al ajuste de 2 regiones (3 parámetros), quedando claro que un ajuste satisfactorio requiere el empleo de las tres regiones. Por su parte la tabla resumen con los valores de los parámetros de ajuste puede verse seguidamente.

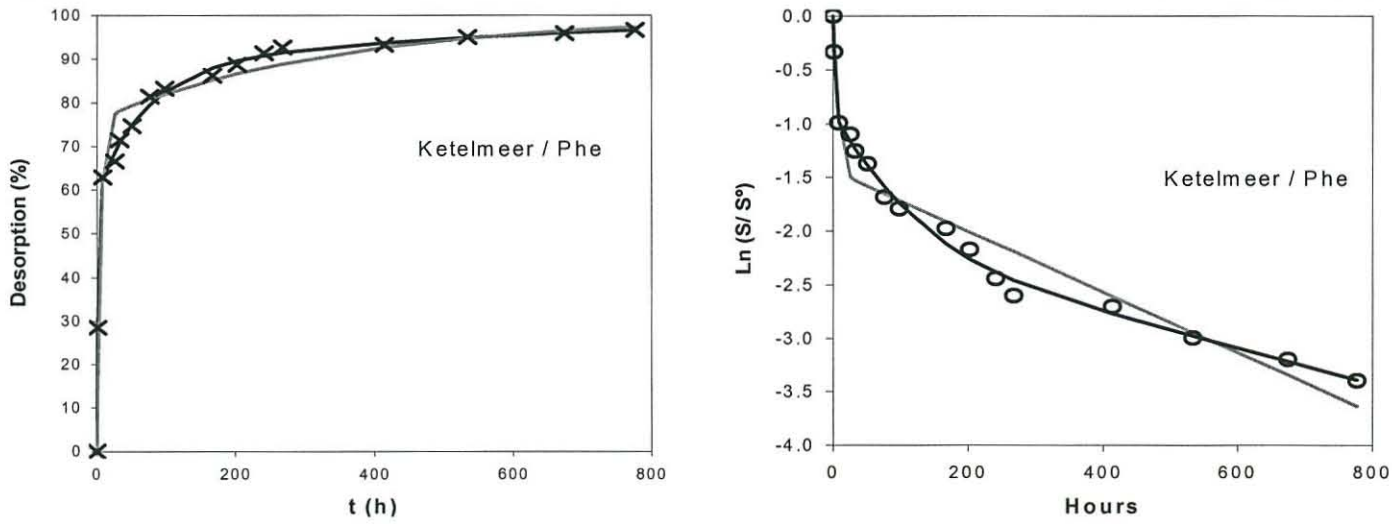
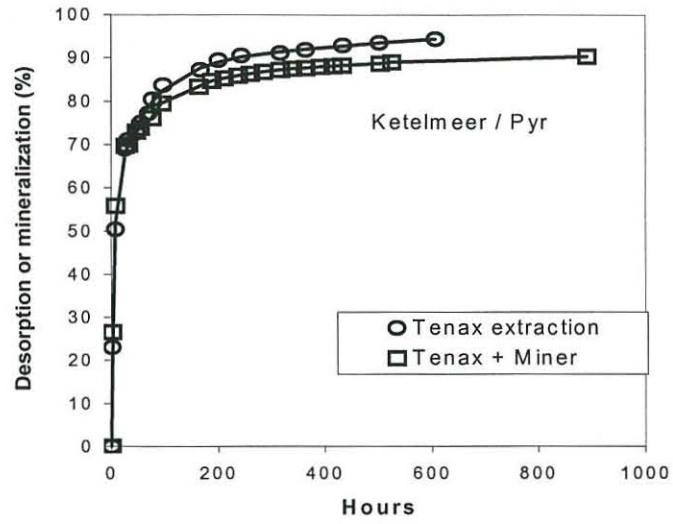


Figura 20.- Resultados de la desorción Tenax de fenantreno retenido en Ketelmeer.



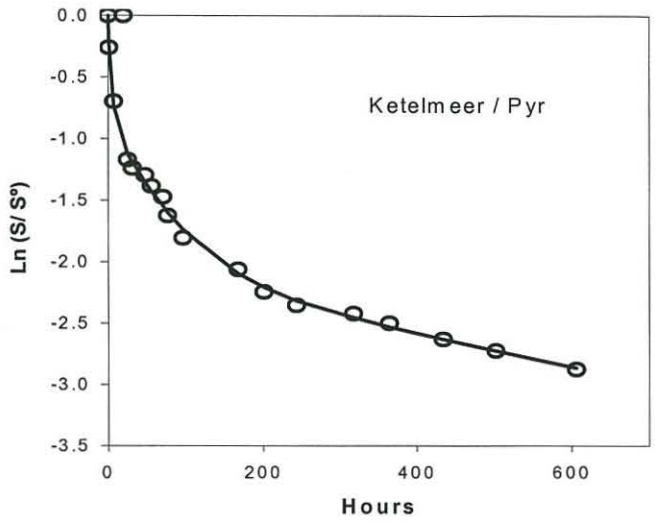
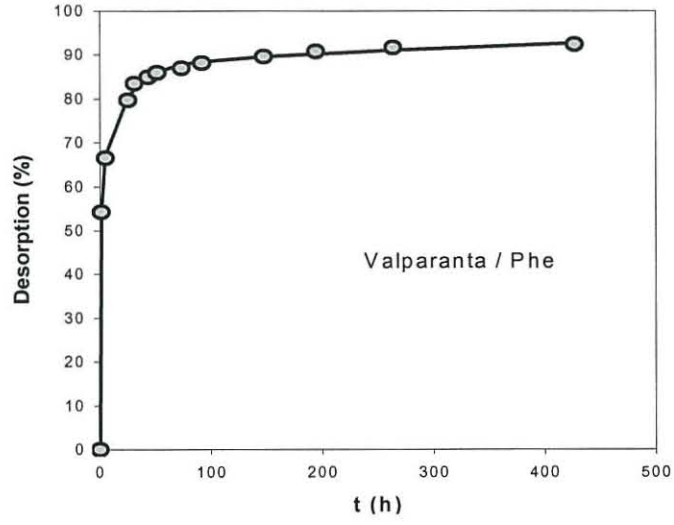


Figura 21.- Resultados de la desorción Tenax de pireno retenido en Ketelmeer.



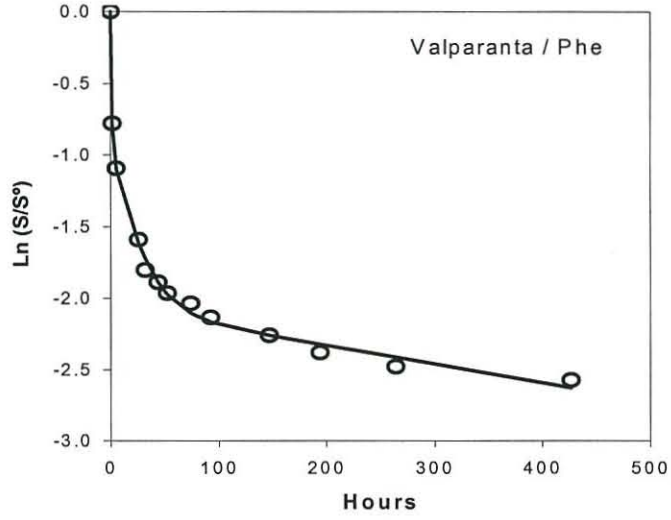
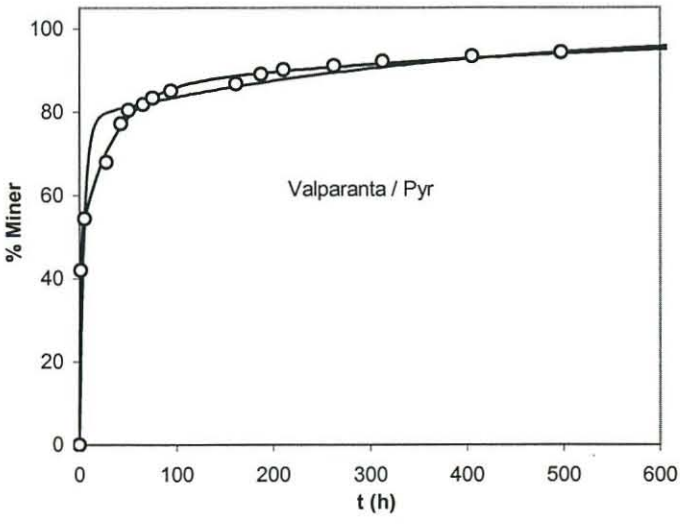


Figura 22.- Resultados de la desorción Tenax de fenantreno retenido en Valparanta.



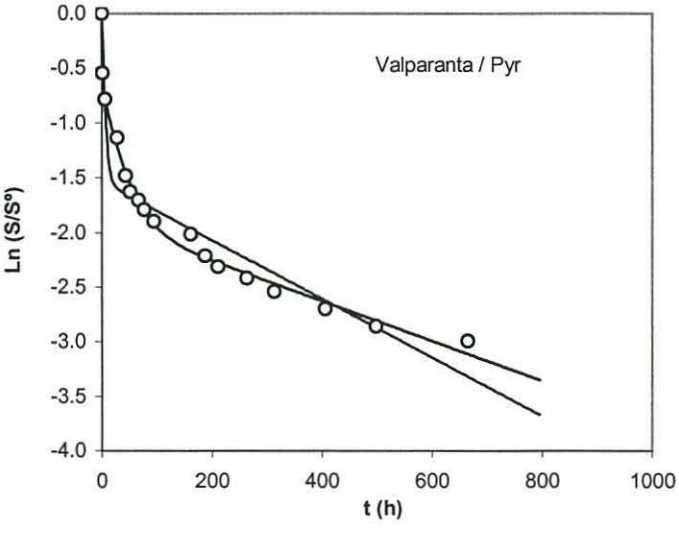


Figura 23.- Resultados de la desorción Tenax de pireno retenido en Valparanta.

Tabla resumen de los resultados del ajuste del modelo de tres regiones a la desorción Tenax

Sed / PAH	F			k (h^{-1})			K
	Fast	Slow	V. Slow	Fast	Slow ($\cdot\ 10^2$)	V. Slow ($\cdot\ 10^3$)	(cm^3/g)
Ket / Phe	0.599	0.277	0.124	0.635	1.41	1.67	226.1
Ket / Pyr	0.571	0.300	0.129	0.263	1.62	1.34	594.4
Valp /Phe	0.608	0.266	0.126	1.68	4.82	1.29	17.80
Valp Pyr	0.486	0.365	0.150	1.34	3.07	1.82	82.97

El valor de la constante de reparto está obtenida a partir de los valores de las concentraciones en las fases acuosa y sólida después del periodo de envejecimiento, obteniéndose la concentración de la fase sólida mediante el balance de materia correspondiente al total añadido y el que permanece en la fase acuosa.

El modelo de desorción / Biodegradación

Desarrollo del modelo

El modelo de desorción presentado en el apartado anterior es aplicable a la extracción con Tenax y se apoya en que la concentración en la fase acuosa es en todo momento prácticamente nula. No obstante, en el caso de que las velocidades de desorción y de mineralización fueran comparables, habría que tener en cuenta que la concentración en la fase acuosa no sería nula. En principio se aplicará el modelo completo en el que se supone que la cinética de desorción es reversible. En función de los resultados obtenidos se procederá a efectuar las simplificaciones que se consideren convenientes.

$$S_j^S \underset{k'_j}{\overset{k_j}{\rightleftarrows}} S\ (M/V) \tag{22}$$

$$K_j = \frac{S_j^S}{S} = \frac{S^S F_j}{S} = K F_j = \frac{k'_j V}{k_j M} \tag{23}$$

Los coeficientes cinéticos están pues definidos desde el punto de vista del sólido. En estas ecuaciones está implicito que los tres compartimentos en los que se divide el suelo para su estudio tienen comportamiento lineal, y que, por lo tanto, puede descomponerse en tres equilibrios independientes, $K_i = F_i K$.

El sustrato, una vez disuelto está disponible para la biodegradación, que transcurrirá de forma idéntica a lo observado en ausencia de sedimento.

$$S \xrightarrow{k_1} (1 - A)\ CO_2 + A\ X \tag{24}$$

$$X \xrightarrow{k_2} CO_2 \tag{25}$$

Las ecuaciones diferenciales para este modelo, teniendo en cuenta que los compartimentos del sedimento no son capaces de intercambiar sustrato entre ellos, y que por lo tanto se vacían (o se llenan) de forma independiente, serían las siguientes:

Si se parte de una situación alejada del equilibrio, podemos definir, ξ_j , como una medida de la distancia al equilibrio entre la fase acuosa y la región j del sedimento.

$$\xi_j = \frac{S\, F_j K}{S_j^S} \tag{26}$$

en este caso,

$$\frac{d\, S_j^S}{dt} = -\, k_j\, S_j^S\, (\, 1 - \xi_j\,) \tag{27}$$

$$\frac{d\, S}{dt} = \frac{M}{V} \sum_j \left(k_j\, S_j^S\, (1 - \xi_j) \right) \; - k_1\, S \tag{28}$$

$$\frac{d\, X}{dt} = A\, k_1\, S - k_2\, X \tag{29}$$

$$\frac{d\, M(CO_2\,)}{dt} = V \cdot \; [(1 - A)\, k_1\, S + k_2\, X\,] \tag{30}$$

La solución analítica de un modelo como el anterior es, si existe, probablemente muy complicada, por lo que se procede a la resolución numérica. Las condiciones de contorno son las siguientes:

1º) El sustrato en el sedimento se encuentra, antes de la inoculación, repartido entre los diferentes compartimentos del suelo, y estas se encuentran en equilibrio entre sí:

$$t = 0 \;\Rightarrow F_j\; S^S = S_j^S \tag{31}$$

$$\sum_j F_j \; = 1$$

2º) En el momento de comenzar el experimento, la fase acuosa se encuentra libre de sustrato:

$$t = 0 \Rightarrow S = 0 \tag{32}$$

Ello se debe al hecho de que el sedimento se somete a los mismos ciclos de lavado de la azida. Esta suposición, en cierta medida, resulta contradictoria con la anterior. Es probable que una mejor aproximación se alcanzara modificando la condición inicial de la fase sólida para, de forma aproximada, incorporar a cada fracción la parte que se estime que se ha extraído con los ciclos de lavado. En todo caso, para el sedimento Ketelmeer, en el que la concentración en el sólido es mucho mayor que en la fase acuosa, estas diferencias no deben tener importancia.

La resolución se efectúa mediante un procedimiento de integración simple en Excel. En el mismo se utiliza la forma integrada de las ecuaciones (27), suponiendo que el parámetro de aproximación al equilibrio, ξ, no varía mucho durante el incremento de tiempo:

$$\left(S_j^S\right)_{t+\Delta t} = \left(S_j^S\right)_t \exp\left(-k_j\,(1-\xi_j)_t\,\Delta t\right) \tag{27'}$$

Por su parte la variación de la concentración de la fase acuosa puede obtenerse como el sumatorio de lo procedente de la fase sólida menos lo que desaparece por biodegradación, integrando este último de forma numérica.

$$S_{t+\Delta t} = S_t + \left(\frac{M}{V}\sum_j\left(S_{j,t}^S - S_{j,t+\Delta t}^S\right) - k_1\,S_t\right)\Delta t \tag{33}$$

Resultados:

Inicialmente se ha supuesto que los valores de los parámetros que describen el proceso biológico pueden ser obtenidos a partir del ajuste de los resultados experimentales correspondientes a los ensayos sin sedimento. Por su parte, los valores de los parámetros que describen el proceso de desorción, en principio, se obtuvieron mediante el ajuste de los resultados experimentales de mineralización en presencia de sedimento, presentados en el apartado "Resultados de mineralización". Ello ha permitido obtener, por ejemplo, resultados como los que se observan en la siguiente tabla, que corresponde a los experimentos efectuados con pireno en el sedimento de Valparanta:

S^S Inicial (ng/g)	F_{fast}	F_{slow}	F_{vs}	k_{fast} (h^{-1})	k_{slow} (10^2 h^{-1})	k_{vs} (10^4 h^{-1})
324	0.722	0.020	0.258	0.109	2.68	1.22
153	0.642	0.000	0.358	0.168	---	2.31
52	0.600	0.090	0.311	0.462	13.83	0.78
12	0.800	0.130	0.070	0.400	0.77	0.10

Pueden observarse considerables dierencias en los valores de los parámetros, a pesar de que los resultados experimentales obtenidos son prácticamente idénticos (ver figura 13) cuando se expresan en términos relativos, lo que, en principio, debería conducir a parámetros similares. Sin embargo parece evidente que existen conjuntos de parámetros diferentes que conducen a resultados similares, debido, con toda probabilidad, al elevado número de parámetros de ajuste utilizado.

Por ello, se ha propuesto una aproximación diferente para la interpretación de los resultados. La misma consiste en la comparación de los resultados experimentales con los que se obtendrían en el caso de que los procesos biológicos y físicos transcurran de forma independiente. Es decir, si los microorganismos no ejercen ninguna influencia sobre el proceso de desorción, los resultados podrán ser anticipados por un modelo como el descrito anteriormente utilizando los parámetros obtenidos, por una parte, a partir de los experimentos de desorción con tenax en condiciones abióticas, y por otra, los experimentos de mineralización del sustrato en ausencia de sedimento. Los primeros facilitan los 5 coeficientes de las cinéticas de desorción, mientras que los segundos permiten obtener los tres parámetros que caracterízan el proceso biológico (**k_1**, **k_2** y **a**). A este modelo se ha denominado, "modelo de procesos independientes".

En las siguientes figuras 24 y 25, pueden verse los resultados así obtenidos. Como puede apreciarse, los resultados parecen indicar que en el caso del sedimento Valparanta el modelo de procesos independientes predice adecuadamente el comportamiento del sistema, especialmente en lo relativo a las etapas iniciales. Ello indica que, probablemente, los microorganismos no ejercen ninguna acción sobre el sustrato retenido, y proceden a la mineralización de la fracción disuelta, facilitando que la desorción prosiga hasta quedar el sedimento prácticamente libre de sustrato. Es necesario estudiar con mayor profundidad por qué, en cambio, los valores de estabilización difieren de los predichos por el modelo.

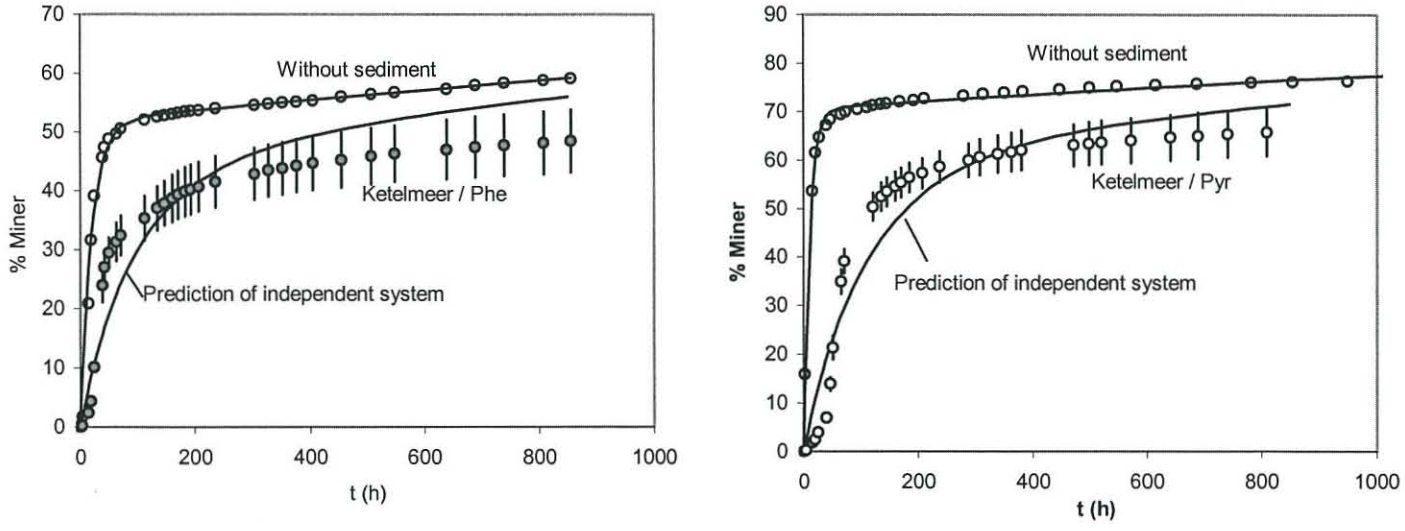


Figura 24.- Resultados experimentales y predichos por el modelo de sistemas independientes para el sedimento Ketelmeer.

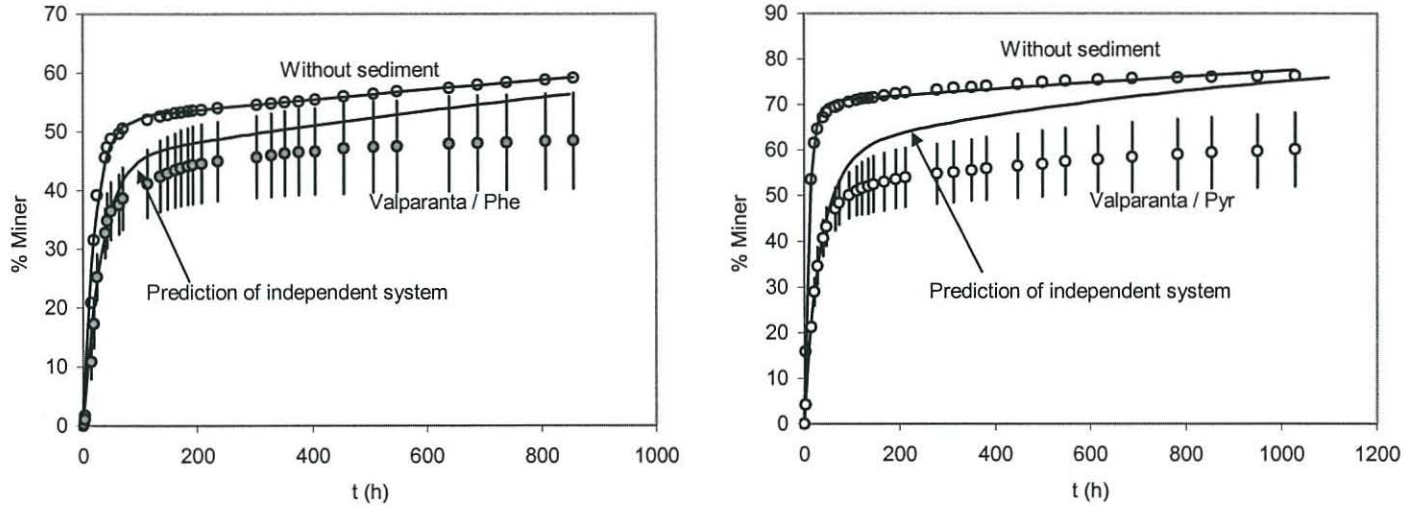


Figura 25.- Resultados experimentales y predichos por el modelo de sistemas independientes, para el sedimento Valparanta.

Con respecto a los resultados obtenidos con el sedimento Ketelmeer, tanto para el fenantreno, con *Novosphigobium* sp LH128WT, como para el pireno con *Mycobacterium* sp VM 552, se observa que el proceso tiene lugar de manera más rápida a lo que se deduce de las predicciones del modelo de procesos independientes. Ello es consecuencia, probablemente, de que los microorganismos actúan sobre el proceso de desorción incrementando la velocidad. Esta acción puede tener lugar, por ejemplo, por una importante localización de los microorganismos en las inmediaciones de la zona de retención que incremente los gradientes de difusión. Parece claro que en el caso de que la capacidad de retención sea pequeña el efecto no resulta significativo, por lo que el comportamiento de los dos sedimentos es diferente a pesar de utilizarse los mismo sustratos y los mismos microorganismos.

Conclusiones

- El sistema de adición del sustrato sobre el sedimento, utilizando disoluciones con azida de sodio, permite controlar el efecto del envejecimiento de los contaminantes objeto de estudio (fenantreno y pireno), sobre los dos sedimentos estudiados, manteniendo la masa total de los PAHs en el sistema constante a lo largo del proceso.

- El sedimento puede ser lavado del contenido de azida, posibilitando el posterior estudio de los procesos biológicos mediante un moderado número de ciclos de centrifugado y separación del clarificado. Ello permite poder comparar los procesos abióticos y biológicos con fiabilidad.

- La cinética de desorción de los contaminantes de los sedimentos puede estudiarse con el procedimiento de desorción con Tenax. Los resultados así obtenidos se ajustan bien a un modelo lineal de tres regiones. El sedimento Ketelmeer, con mayor contenido en materia orgánica, retiene mayor proporción de contaminante que el sedimento Valparanta, como se deduce del valor de las constantes de reparto obtenidas. No obstante, los valores de F_j son semejantes en ambos sedimentos, mientras que los coeficientes cinéticos son algo superiores en el caso de Valparanta, a excepción de las fracciones muy lentas, que tienen valores semejantes.

- El estudio de la mineralización de las disoluciones acuosas de los contaminantes en ausencia de sedimento, mediante el seguimiento de la evolución de $^{14}CO_2$ permite establecer un modelo en el que el sustrato es utilizado por el microorganismo siguiendo una cinética de Michaelis-Menten, pero requiere la incorporación de algún fenómeno adicional que justifique la recuperación de $^{14}CO_2$ a mayores velocidades de las previstas por este modelo cuando los tiempos de experimentación son largos (superiores a 2 semanas). Se ha propuesto la formación de un compuesto intermedio que se mineraliza a su vez siguiendo una cinética de orden 1 resultando un ajuste muy satisfactorio. Todo ello para concentraciones iniciales de sustrato que difieren en casi dos órdenes de magnitud.

- El estudio de la mineralización de fenantreno y pireno retenidos sobre los sedimentos objeto de estudio indica que el proceso también es independiente de la concentración inicial contenida en el sedimento. Se ha elaborado un modelo según el cual el contaminante retenido debe pasar en primer lugar a la fase acuosa para, posteriormente, ser utilizado por los microorganismos. Este modelo resulta con 8 parámetros independientes, existiendo diferentes conjuntos de parámetros que predicen el mismo comportamiento.

- De forma alternativa al ajuste de los parámetros, se han empleado los valores de los 3 parámetros obtenidos de la mineralización en ausencia de sedimentos y los 5 parámetros obtenidos de la desorción Tenax, para compararlos con los resultados experimentales, lo que correspondería a un sistema en el que el proceso de biodegradación en la fase acuosa y el de desorción desde el sedimento a la fase acuosa resultan independientes (modelo de procesos independientes). Los resultados de este modelo coinciden de forma satisfactoria con los obtenidos experimentalmente utilizando el sedimento Valparanta. Los resultados obtenidos con Ketelmeer, en cambio, indican que la mineralización tiene lugar de forma más rápida que la predicha por el modelo. Ello parece indicar que, para este sedimento, los microorganismos actúan sobre el sedimento incrementando la velocidad de desorción.

Bibliografía.

1.- Pedersen, T.A. y Curtis, J.T., 1991, ***Soil Vapor Extraction Technology Reference Handbook***. EPA/504/2-91/003.

2.- Alexander, M., 1980. ***Introducción a la microbiología del suelo***. AGT Editor SA:

3.- Freeze, R.A. y Cherry, J.A., 1979, ***Groundwater*** Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, NJ.

4.- Rodríguez-Maroto, J.M.; García-Delgado, R.A.; García-Herruzo, F. y Gómez-Lahoz, C., 1993, *La contaminación del suelo*. Ingeniería Química, año, XXV, nº 294, 267-272. Septiembre.

5.- Mertens, B. y Verstraete, W. 2003. *The living Soil* en 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, CONSOIL, GENT (BÉLGICA)..

6.- Alexander, M., 1991, ***Introduction to Soil Microbiology***. Krieger Publishing Company.

7.- Bossert, I. y Bartha, R, 1984, *The fate of petroleum in Soil Ecosystems*, en **Petroleum Microbiology**, R. M. Atlas, ed., MacMillan Pub, New York.

8.- Mc Carty, P. L.; Rittman, B. E. y Bouwerm E. J., 1984, *Microbial Processes Affecting Chemical Transformations in Groundwater* en **Groundwater Pollution Microbiology**. G. Bitton y C. P. Gerba, eds., John Wiley and SOns, Inc., New York.

9.- Rodriguez-Maroto, J.M. y Gómez-Lahoz, C., 1995, *Bioventing* en **Modeling of in situ Techniques for Treatment of Contaminated Soils. Soil vaor extraction, Sparging, Bioventing.** D.J. Wilson editor. Technomic Publishing.

10.- Schwarzenbach., R. P.; Gschwend, P. M. y Imboden, D. M., 1993, *Biological transformation reactions*. en **Environmental Organic Chemistry** John Wiley & Sons, Inc.

11.- Bosma, Tom P.; Middledorp, Peter J. M.; Schraa, Gosse y Zehnder, Alexander J. B., 1996, *Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability*. Environ. Sci. & Technol., **31**, 248-252.

12.- IHOBE, 1994. ***Política de Protección del Suelo en la Comunidad Autónoma del País Vasco: Motivos y Estrategias. Avance del Plan Director***. Dpto. de Urbanismo, Medio Ambiente y Vivienda del Gobierno Vasco.

13.- Lowe, J.; Vijgen, J. y Summersgill; M., 2003, *Regulatory systems for the control of land remediation processes*. 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, CONSOIL, Gent (Bélgica). 2003.

14.- Versluijs, K.W. y Otte, P.F., 2003, *Monitoring remedial actions: a check on policy goals.* 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, CONSOIL, Gent (Bélgica). 2003.

15.- Alexander, M., 2000. *Aging, bioavailability and overestimation of risks from environmental pollutants*. Environ. Sci. Technol. **34**, 4259-4265.

16.- Rodríguez-Maroto, J.M.; Vereda-Alonso, C.; Gómez-Lahoz, C.; García-Herruzo, F. y García-Delgado, R.A., 2001, *A column study of soil contamination by lead: Influence of pH and carbonate content. I. Experimental results* J. Environ. Sci. Health **A36** (4) 437-46

17.- Rodríguez-Maroto, J.M.; Gómez-Lahoz, C.; Vereda-Alonso, C.; García-Delgado, R.A. y García-Herruzo, F. 2001, *A column study of soil contamination by lead: Influence of pH and carbonate content. I. Mathematical Model*. J. Environ. Sci. Health **A36** (6) 1015-1026.

18.- Or tega-Calvo, J.J.; Marchenko, A.I.; Vorobyov, A.V. y Borovick, R.V., 2003, "Chemotaxisin polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated form coal-tar- and oil polluted rhizospheres", FEMS Microbiology Ecology **44** 373-381.

19.- García-Junco, M.; Gómez-Lahoz, C.; Niqui-Arroyo, J. L. y Ortega-Calvo, J.J., 2003, *Biosurfactant- and Biodegradation-Enhanced Partitioning of Polycylic Aromatic Hydrocarbons form Non-Aqueous Phase Liquids*. Environ. Sci. & Technol, **37** (13) 2988-2996.

20.- Gómez-Lahoz, C. Rodriguez-Maroto, J.M. y Wilson, D. J., 1994, *Biodegradation Phenomena during Soil Vapor Extraction. A high Speed Non-equilibrium model.* Separ Sci. Technol., **29** (4) 429-463.

21.- Gómez-Lahoz, C. Rodriguez-Maroto, J.M. y Wilson, D. J., 1994, *Biodegradation Phenomena during Soil Vapor Extraction. Sensitivity Studies for Single Substrate Systems.* Separ Sci. Technol., **29** (5) 557-578.

22 Harmsen, J.; Eijsackers, H.J.P.; Römkens, P.F.A.M. y Rulkens, W.H., 2003, *Bioavailability: From qualitative concept to quantitative measurements.* 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, CONSOIL, Gent (Bélgica)., 2003.

23.- Ronday, R.A.; Kammen-Polman, M.M.; Dekker, A.; Houx, N.W.H. y Leistra, M., 1997, *Persistence and toxicological effects of pesticides in top soil: Use of equilibrium partitioning theory.* Environ. Toxicol. Chem., **16**, 601-607.

24.- Cornelissen. G.; van Noort, P.C.M.; Parsons, J.R.; y Govers, H.A.J., 1997, *Temperature dependence of slow adsorption kinetics of organic compounds in sediments.* Environ. Sci. & Technol., **31**, 454-460.

25.-de Maagd, P.G.J. ; Sinnige, T.L. y Schrap, M., 1998, *Sorption coefficients of polycyclic aromatic hydrocarbons for two lake sediments : Influence of the bactericide sodium azide* Environ. Toxicol Chem., **17**, 1899-1907.

26.- Cornelissen, G.; Rigterink, H.; Ferdinandy, M. M.A. y van Noort, P.C.M., 1998, *Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of bioremediation.* Environ. Sci. & Technol., **32** (7) 966-970.

27.- Cornelissen, G.; 1999, ***Mechanism and consequences of slow desorption of organic compounds from sediments***. Ph.D. Thesis. Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA). Lelystaad, Holanda.

28.- Northcott, G.L. y Jones, K.C., 2001, *Partitioning, extractability and formation of Nonextractable PAH residues in soil. 2. Effects on compound dissolution behavior.* Environ. Sci. Technol, **35**, 1111-1117.

29.- Ghosh, U.; Talley, J.W. y Luthy, R.C., 2001, *Particle scale investigation of PAH desorption kinetics and thermodynamics from sediment* Environ. Sci. & Technol., **35**, 3468-3478.

30.- http://www.rdij.nl/rdij/projecten/ketelmeer/index_uk.htm

31.- http://www.science.uva.nl/research/ibed/Abacus/

32.- Bastiaens, L.; Springael, D.; Wattiau, P.; Harms, H.; de Watchter, R.;Verachtert, H. y Diels, L., 2000, (=) Appl. Environ. Microbiol., **66**, 1834-1843.

33. Levenspiel, O., 1981, ***Ingeniería de las reacciones químicas***. Editorial Revertém S.A.

34.- Lahlou, M. y Ortega-Calvo, J.J., 1999, *Bioavailability of labile and desorption-resistant phenanthrene sorbed to montmorillonite clay containing humic fractions.*

35.- Pignatello, JJ., 1990. *Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. I. Formation of residual fractions*. Environ. Toxicol. Chem., **9** 1107-1115

36.-Cornelissen, G.; van Noort, P.C.M. y Govers, H.A.J K., 1997, *Desorption kinetics of chlorobenzenes, PAHs and PCBs: sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity* Environ. Toxicol. Chem. **16** 1351-1357.