

En este trabajo se ha realizado un estudio químico analítico y microbiológico para establecer la evolución y el impacto que produce la presencia de contaminantes emergentes (bisfenol A, parabenos y β -bloqueantes) cuando se introducen en el medio ambiente. Las matrices seleccionadas para el estudio son el lodo de depuradora, el compost obtenido a partir del lodo y los suelos agrícolas enmendados con el compost. Se ha validado metodología analítica para cuantificar los compuestos objeto de estudio en las matrices citadas. Se ha estudiado el efecto del compostaje de los lodos sobre la calidad del compost final, así como la lixiviación y degradación de los contaminantes. Se ha evaluado la microbiota del suelo –con y sin compost– y de los contaminantes para aislar y seleccionar microorganismos capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía.



Biodegradación de **CONTAMINANTES ORGÁNICOS** en suelo agrícola enmendado con compost procedente de EDAR urbanas

Por **A. ZAFRA GÓMEZ**. Profesor Titular de Universidad. Universidad de Granada, Departamento de Química Analítica. [e-mail: azafra@ugr.es]. **B. JUÁREZ JIMÉNEZ**. Profesora contratada doctora de Universidad. **F. J. CAMINO SÁNCHEZ**. Investigador. **A. S. CANTARERO MALAGÓN**. Técnico de investigación. **J. L. VÍLCHEZ QUERO**. Catedrático de Universidad.



Latinstock

La producción de fangos en las Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDAR) es una consecuencia inevitable de la sociedad actual de consumo, siendo éstos una importante fracción de los desechos orgánicos urbanos generados por el hombre. En Europa se producen más de 8 millones de toneladas al año de este tipo de residuos^[1,2]. Por tanto, su manejo representa un problema creciente que requiere solución, siendo esencial encontrar alternativas seguras, sostenibles y manejables desde el punto de vista medioambiental.

Actualmente, las principales rutas de eliminación de los lodos EDAR son la aplicación a la tierra previo tratamiento, el almacenamiento en vertede-

ros, la incineración y el vertido al mar^[1,2]. El reciclado y compostaje para su uso en agricultura es una alternativa atractiva en lo que se refiere al impacto ambiental y desde el punto de vista económico, ya que es capaz de convertir un producto nocivo para el medio ambiente en otro de valor añadido. De hecho, es considerada como la opción más favorable a nivel internacional, ya que contribuye de manera positiva al reciclado de nutrientes del suelo mejorando su fertilidad^[3,4].

El compostaje consiste en la descomposición biológica de la materia orgánica bajo condiciones aeróbicas controladas para transformarlo en un producto final estable, excelente para el enmendado de suelos agrícolas. El proceso es

facilitado por microorganismos y, en general, involucra elevadas temperaturas como resultado del calor producido de naturaleza biológica. La figura 1 esquematiza el proceso.

El principal obstáculo para el uso de este material en agricultura es su contenido en metales pesados y contaminantes orgánicos (macro y microcontaminantes). El contenido de los primeros está ya regulado por numerosas reglamentaciones de forma que puede ser fácilmente controlado^[3-6]. En relación a los contaminantes orgánicos, a lo largo de los últimos años se ha desarrollado una extensa investigación, enfocándose la atención sobre todo a los llamados «contaminantes orgánicos prioritarios y persistentes» regulados por la legislación, de forma que las concentraciones permitidas y encontradas en los lodos EDAR han disminuido notablemente. Sin embargo, en los últimos años se ha generado una importante inquietud a nivel global en relación a un nuevo grupo más extenso de compuestos de muy diversa naturaleza. Son los llamados «contaminantes emergentes». De ellos se conoce muy poco con respecto a su persistencia; evolución en aguas, suelos agrícolas y sedimentos; mecanismos de degradación; transferencia a la cadena trófica; y sus efectos sobre los ecosistemas y la salud humana. Aunque el control sobre estas sustancias se ha ido desarrollando a medida que ha ido avanzando el conocimiento científico sobre ellas, y a pesar del apoyo internacional al reciclado de lodos y su uso en suelos agrícolas, la aceptación de esta práctica ha creado un gran recelo y muchos países, como Suiza, han rehusado aceptarla.

En la actualidad hay descritas más de 50 millones de sustancias químicas, de las cuales aproximadamente 150.000 están registradas en la *European Chemicals Agency* para su uso industrial^[7]. Dada la imposibilidad de estudiar este

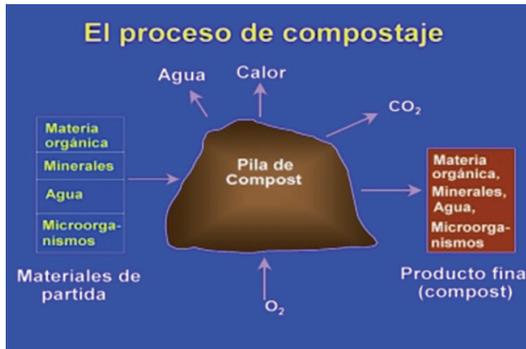


Figura 1. Esquema del proceso de compostaje y pila de compostaje a escala real.

elevado número de potenciales contaminantes, este trabajo de investigación se ha centrado en dos grupos de compuestos de gran importancia: los disruptores endocrinos químicos (bisfenol A y parabenos) y una familia de fármacos (β -bloqueantes). Dentro de cada grupo se han seleccionado aquellos compuestos de mayor interés comercial y de uso habitual por parte de la población, y que pueden ser detectados, por tanto, en las aguas residuales que entran en las EDAR.

El primer grupo de contaminantes de interés por su persistencia medioambiental es el de los disruptores endocrinos químicos (EDCs). Se trata de compuestos capaces de alterar el balance normal de las funciones hormonales en animales y su progenie, siendo responsables de numerosos defectos reproductivos, pudiendo llegar a degenerar en diversos tipos de cáncer^[8]. Estos compuestos, de los que se ha demostrado actividad estrogénica^[9], son liberados continuamente al medio ambiente, existiendo evidencia de que la mayoría de ellos se encuentran presentes en los lodos EDAR. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre su evolución a lo largo del proceso de tratamiento (por ejemplo, en el compostaje) que reciben estos lodos antes de llegar a los suelos agrícolas, y los cambios que sufren a partir de ahí (lixiviación, biotransformación).

El bisfenol A es uno de los compuestos químicos más producido a nivel mundial, siendo la materia prima empleada para la fabricación de resinas epoxi y plásticos policarbonato. Tiene innumerables aplicaciones en productos manufacturados que abarcan desde pinturas o plásticos para envasado de alimentos, a biberones, composites dentales o prótesis médicas^[10]. Es posiblemente el disruptor que más preocupación causa a la comunidad científico-médica y su presencia medioambiental es ubicua^[11]. Aunque se ha demostrado su eliminación principalmente por biodegradación^[12],

se sabe que las concentraciones remanentes en las aguas y lodos EDAR son capaces de provocar efectos adversos a nivel endocrino. Actualmente se encuentra bajo revisión para ser incluido dentro de la Directiva Marco Europea del Agua (DMEA) como sustancia prioritaria peligrosa, con objeto de realizar un mayor control sobre ella^[13]. En la figura 2 se muestra la estructura química del bisfenol A.

Los parabenos son una familia de compuestos químicos de síntesis empleados como conservantes en cosméticos desde principios del siglo XX y que

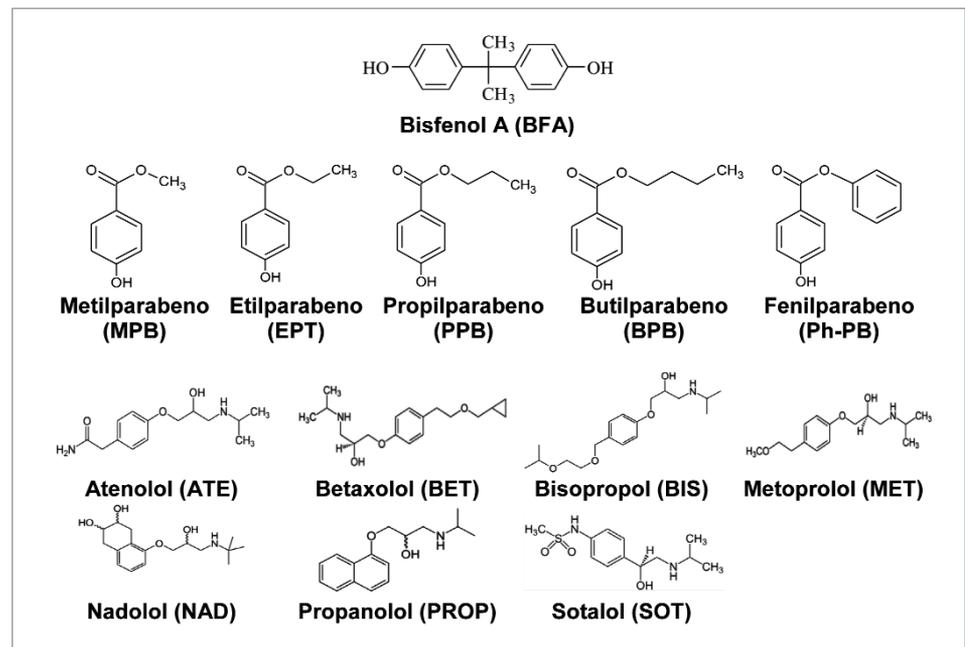


Figura 2. Estructura química de los contaminantes emergentes seleccionados.



idad crónicos en animales y plantas^[21]. En este trabajo se ha realizado el seguimiento de la familia de los β -bloqueantes. Se trata de fármacos de gran importancia y presencia medioambiental ya que son muy usados para el control de enfermedades cardiacas. Constituyen un grupo de 13 fármacos^[22], siendo los seleccionados en este trabajo los que se muestran en la figura 2.

Objetivo y alcance

En el departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada se ha iniciado el desarrollo de una nueva línea de investigación para el estudio del impacto medioambiental de numerosos microcontaminantes emergentes. El objetivo que se ha planteado con esta investigación es triple. Por una parte, observar el efecto del proceso de compostaje de los lodos sobre la calidad del compost final, estudiando para ello la evolución química de diversos contaminantes emergentes desde su llegada a los lodos EDAR hasta su aplicación final al suelo de labor. Por otra, profundizar en el comportamiento de estos contaminantes en los suelos de la Vega de Granada enmendados con dicho material, y por último, realizar estudios de biodegradación de los contaminantes en diferentes situaciones que permitan aislar y seleccionar microorganismos capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía. Los objetivos específicos concretos del proyecto han sido:

- Desarrollar y validar metodología analítica de buenas características para la

aunque se han usado durante más de un siglo, su seguridad se ha puesto en tela de juicio recientemente^[14]. Su liberación al medio ambiente se realiza por múltiples vías, de forma que han sido detectados en prácticamente todos los compartimentos ambientales^[15]. El interés de su estudio radica en la posible relación con el cáncer de mama, ya que se les atribuye actividad como disruptores endocrinos^[16-18]. En la figura 2 también se muestra la estructura química de los cinco compuestos seleccionados para su estudio.

El segundo grupo de contaminantes de interés seleccionados para el desarrollo de esta investigación son los fármacos. Tras su uso, éstos son excretados a través de la orina y las heces en su forma original, como metabolitos y/o formas conjugadas, finalizando su ciclo en las aguas residuales de forma poco controlada. En Europa, la concen-

tración ambiental límite de un fármaco en las aguas es de $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ para que se pueda estimar la posibilidad de riesgo ambiental^[19,20], no teniéndose información al respecto en relación a las concentraciones existentes en lodos EDAR. Dado que la adsorción al material sólido constituye una de las principales rutas de eliminación de fármacos de las aguas residuales, la aplicación de estos materiales como fertilizantes es una importante vía de ingreso de estas sustancias en el medio ambiente. Además, se debe estudiar su persistencia medioambiental para evitar el riesgo por exposición a largo plazo, lo cual podría ser responsable de problemas de toxi-

El bisfenol A es el disruptor que más preocupación causa a la comunidad científico-médica y su presencia ambiental es ubicua. Se encuentra bajo revisión para ser incluido dentro de la Directiva Marco Europea del Agua.

Tabla 1. Parámetros óptimos del análisis mediante USE-UHPLC-MS/MS (1 g muestra).

	USE		
	BFA	PBs	β -Bloqueantes
Disolvente de extracción	Metanol	Metanol	Acetonitrilo / buffer (1:1, v/v)
Volumen de disolvente	2 mL	5 mL	5 mL
Tiempo de ultrasonidos	15 min	25 min	30 min
Ciclos de extracción	2		
Potencia del ultrasonido	75 %		
Tiempo de centrifugado	30 min (3.700 x g)		
Evaporación	Bajo corriente de N ₂		
Volumen de redisolución	500 μ L		
UHPLC			
Columna	Acquity UPLC BEH C18 2.1 x 50 mm, 1.7 μ m		
Fase móvil (300 μ L min ⁻¹)	A: 0.025 % NH ₃ en agua B: 0.025 % NH ₃ en metanol	A: 0.025 % NH ₃ en agua B: 0.025 % NH ₃ en metanol	A: formiato amónico en agua (pH 4) B: metanol
Gradiente de fase móvil	Inicial: 60% B 4,0 min: 100 % B 6,5 min: 100 % B 6,6 min: 60% B 10,0 min: 60% B	Inicial: 60% B 4,0 min: 100 % B 6,5 min: 100 % B 6,6 min: 60% B 10,0 min: 60% B	inicial: 20% B 3,0 min: 60% B 3,1 min: 100% B 4,9 min: 100% B 5,0 min: 20% B
Temperatura de columna	40° C	40° C	30° C
Volumen de inyección	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Tiempo de cromatograma	10 min	10 min	5 min
MS/MS (Multiple Reaction Monitoring)			
Modo de ionización	ESI (-)	ESI (-)	ESI (+)
Voltaje del capilar	0.60 kV	1.80 kV	0.60 kV
T (fuente)	150° C	150° C	150° C
T (desolvatación)	500° C	500° C	100° C
Flujo gas de cono	150 L h ⁻¹	150 L h ⁻¹	150 L h ⁻¹
Flujo (gas desolvatación)	500 L h ⁻¹	800 L h ⁻¹	800 L h ⁻¹
Flujo (gas de colisión)	0.15 mL min ⁻¹	0.5 mL min ⁻¹	0.15 mL min ⁻¹
Presión (gas nebulizador)	7.0 bares	7.0 bares	7.0 bares
Gas (cono y desolvatación)	N ₂ (99.995%)	N ₂ (99.995%)	N ₂ (99.995%)
Gas de colisión	Argón	Argón	Argón

detección y cuantificación de los contaminantes emergentes seleccionados en suelos agrícolas, lodo de EDAR y lodo de EDAR compostado.

- Estudiar la lixiviación/degradación de los compuestos en suelos de labor sin enmendar y enmendados con compost contaminados en una parcela agrí-

cola experimental situada en la Vega de Granada

- Realizar un estudio microbiológico del proceso de enmendado de los suelos agrícolas con compost, seleccionando los microorganismos capaces de biodegradar a estas familias de compostos.

Materiales y metodología

Reactivos, patrones y equipos

Los reactivos y disolventes empleados fueron los habituales en un laboratorio de química y microbiología. Los patrones de bisfenol A (BFA), parabenos (PBs) y β -bloqueadores fueron suministrados por diferentes casas comerciales,

La seguridad de los parabenos, aunque se han usado durante más de un siglo como conservantes en cosméticos, no ha sido puesta en tela de juicio hasta la actualidad

con una pureza superior al 99 por ciento en todos los casos. Para los análisis químicos, se empleó un cromatógrafo de líquidos Waters Acquity UPLC™ acoplado a espectrómetro de masas triple cuadrupolo Waters H-Class-Xevo TQSTM. Para el desarrollo de la metodología de extracción de los contaminantes a partir de las muestras, se ensayaron dos sistemas de extracción: un equipo Dionex ASE 200, para la extracción con disolventes presurizados (PLE), y una sonda de ultrasonidos Digital Sonifier S450D (BRANSON) para la extracción asistida por ultrasonidos (USE).

Para la recogida de las muestras de compost se emplearon palas convencionales y para las muestras de suelo un muestreador de calado (superficiales) y una barrena helicoidal para mayores profundidades. La temperatura y humedad del suelo fueron controladas a las diferentes profundidades del suelo estudiadas, de forma continua, mediante una sonda AquaCheck. Por último, se emplearon los equipos (balanzas, estufas, agitadores, incubadores, etc.) y el material de vidrio habituales de un laboratorio de química analítica y de microbiología.

Tratamiento de muestra

Se optimizaron las diferentes variables que ejercen una mayor influencia en el rendimiento de las distintas técnicas de extracción empleadas. El valor óptimo para cada variable fue determinado a través del porcentaje de recuperación de la extracción de muestras dopadas con los compuestos (100 µg g⁻¹). A la vista de los resultados globales obtenidos, se seleccionó la técnica de ultrasonidos para el análisis de las muestras por su mayor simplicidad y menor

coste. En la tabla 1 se muestran los parámetros óptimos para cada contaminante cuando se empleó esta técnica de extracción.

Por último, y con objeto de mejorar la calidad de los extractos finales obtenidos tras la extracción con ultrasonidos, se aplicó una etapa de limpieza mediante la técnica de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)^[23], observándose que este proceso favorecía notablemente la calidad del análisis.

Análisis mediante UHPLC-MS/MS

En la tabla 1 se muestran también los parámetros optimizados para la separación cromatográfica y la detección mediante espectrometría de masas. Una vez optimizadas estas variables se seleccionaron las dos transiciones en el espectrómetro (cuantificación e identi-

ficación) óptimas para la determinación inequívoca de cada molécula. En la tabla 2 se muestran las transiciones seleccionadas.

Evolución de los contaminantes durante el proceso de compostaje

Tras desarrollar la metodología analítica, se llevó a cabo un experimento con muestras obtenidas a lo largo de un proceso de compostaje en una planta piloto diseñada a tal efecto. Se estudió la evolución de los compuestos durante un periodo de un mes. El objetivo fue determinar la presencia/ausencia de los contaminantes en el compost final. Para desarrollar estos experimentos, se tomaron muestras a diferentes tiempos.

Estudio de campo (BFA y PBs)

Se llevó a cabo en una parcela experimental situada en la huerta de Santa María (Belicena, Vega de Granada). En ella no se había utilizado ningún tipo de pesticida, herbicida o insecticida en los

Tabla 2. Fragmentación de los contaminantes estudiados

	Transición 1 (Da)	CV / CE (V)	Transición 2 (Da)	CV / CE (V)
BFA	227.2 → 210.1	50 / 22	227.2 → 133.0	50 / 26
BFA-d ₁₆	241.3 → 223.1	46 / 22	241.3 → 142.0	46 / 32
MPB	151.1 → 91.8	38 / 22	151.1 → 135.9	38 / 14
EPB	165.1 → 91.9	38 / 24	165.1 → 136.6	38 / 16
PPB	179.1 → 91.9	42 / 24	179.1 → 136.1	42 / 16
BPB	193.2 → 91.9	42 / 24	193.2 → 136.1	42 / 16
Ph-PB	213.1 → 168.9	18 / 10	213.1 → 92.8	18 / 28
EP-C ₁₃	171.2 → 143.8	44 / 14	171.2 → 97.9	44 / 22
PRO	260.2 → 116.0	20 / 20	260.2 → 183.0	18 / 18
ATE	267.1 → 144.9	96 / 96	267.1 → 190.0	24 / 28
MET	268.3 → 71.4	12 / 12	268.3 → 116.0	20 / 20
SOT	273.2 → 255.1	22 / 22	273.2 → 133.1	28 / 18
BET	308.2 → 116.0	18 / 18	308.2 → 74.2	20 / 20
NAD	310.3 → 254.1	20 / 20	310.3 → 201.0	16 / 22
BIS	326.3 → 116.0	20 / 20	226.3 → 73.8	18 / 26
Isoproturon-d ₆	213.2 → 77.8	14 / 14	213.2 → 51.9	26 / 16

CV: voltaje de cono; CE: energía de colisión.



Figura 3. Imagen de la huerta de Santa María y de las parcelas experimentales.

últimos 10 años con objeto de evitar la alteración de la microbiota del suelo^[24]. En la figura 3 se muestra una visión general de la finca y de las subparcelas.

Se prepararon una serie de subparcelas de 1 m² para cada ensayo separadas por tasquibas de 30 centímetros de espesor. Se procedió a la limpieza de la vegetación existente para evitar posibles interferencias en los mecanismos de adsorción-desorción, la degradación de los compuestos en estudio, o la interferencia sobre alguna variable general como el índice de evaporación del agua. Se fijaron cuatro condiciones diferentes:

- Parcela 1. Solo suelo. Referencia (Control).
- Parcela 2. Con los contaminantes puros aplicados directamente al suelo.
- Parcela 3. Enmendada con compost y contaminada con BFA y PBs.
- Parcela 4. Enmendada con compost. Referencia (control, blanco).

La contaminación tanto de la parcela compostada como de la no compostada se realizó adicionando 1 gramo de cada compuesto en un volumen de 120 litros de agua de pozo. Una vez dopada, durante todo el periodo de experimentación se llevaron a cabo sucesivamente dos operaciones, una de muestreo y otra de riego. La toma de muestra se realizó a siete profundidades (superficie, 10, 20, 30, 40, 50

y 60 centímetros). Durante la primera semana la toma de muestra fue diaria, ya que estudios previos realizados habían demostrado que durante este espacio de tiempo se producía la caída exponencial de la concentración, aportando información de gran importancia sobre el comportamiento del compuesto.

Estudio microbiológico

Para este estudio se tomaron tres muestras de cada subparcela a lo largo del tiempo (0, 15 y 30 días) y a tres profundidades (superficie, 30 y 60 centímetros). Debido a consideraciones de tiempo de experimentación y económicas, se seleccionaron para este estudio solamente los tres compuestos de mayor impacto medioambiental, es decir, BFA, MPB y BPB. Se realizaron los siguientes ensayos:

■ **Recuento de la microbiota cultivable.** Mediante la técnica de siembra en placa. Los resultados se expresaron como recuento de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g suelo).

■ **Cinéticas de crecimiento de microorganismos y estudios de degradación de los compuestos.** Se seleccionó una bacteria de microorganismos procedentes de las muestras de suelo tratadas con los diferentes compuestos y compostadas (codificados con las iniciales del compuesto adicionado a esa parcela y un número consecutivo). La selección se realizó en base a criterios morfológicos de las colonias. Además, se utilizaron 10 de los microorganismos para los ensayos de cinética de crecimiento y degradación. Para la cinética se utilizó medio de cultivo base diluido 1/10 con 5 mg L⁻¹ del compuesto en estudio y se incubó a 30° C durante cinco días.

■ **Análisis microbiológicos.** Se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Los resultados se expresaron de acuerdo a la relación densidad óptica / recuento UFC mL⁻¹.

■ **Análisis químicos.** La determinación de la cantidad de compuesto degradado se realizó mediante la técnica de UHPLC-MS/MS, empleando las

El compostaje de lodos EDAR para su uso en agricultura es una alternativa atractiva, ya que es capaz de transformar un producto nocivo para el medio ambiente en otro con gran valor añadido

condiciones descritas con anterioridad en este trabajo. Tras la toma de muestra se centrifugó a 13.000 rpm para la retirada de células. Las medidas se realizaron a tiempo inicial y final de ensayo (0 horas y 96 horas).

■ **Caracterización bioquímica de los microorganismos.** Se realizaron ensayos de API 50 CH (estudio del metabolismo de carbohidratos) y API ZYM (estudio de la actividad enzimática). Los microorganismos elegidos para realizar el test de carbohidratos fueron aquellos capaces de degradar en altos porcentajes a los contaminantes, concretamente los codificados como MPB-8, BPB-3 y BFA-4. De igual modo, se seleccionaron para el ensayo de las actividades enzimáticas los más representativos de cada grupo de muestras, es decir, para el metilparabeno, MPB-1, MPB-2, MPB-3, MPB-8 y MPB-10; para el butilparabeno, BPB-3, BPB-7, BPB-12, BPB-13, BPB-15; y para el bisfenol A, BFA-1, BFA-4, BFA-8, BFA-9 y BFA-10.

Resultados y discusión

Método analítico

En primer lugar se establecieron los calibrados que relacionan la concentración de cada uno de los compuestos con la señal generada por el equipo de UHPLC-MS/MS. Para cada nivel de calibración se dopó 1 gramo de muestra con cantidades crecientes de los compuestos a analizar y se añadieron los patrones internos oportunos. Tras tratar los patrones de acuerdo a los procedimientos experimentales descritos mediante las técnicas de USE y QuEChERS, se inyectaron en el cromatógrafo.

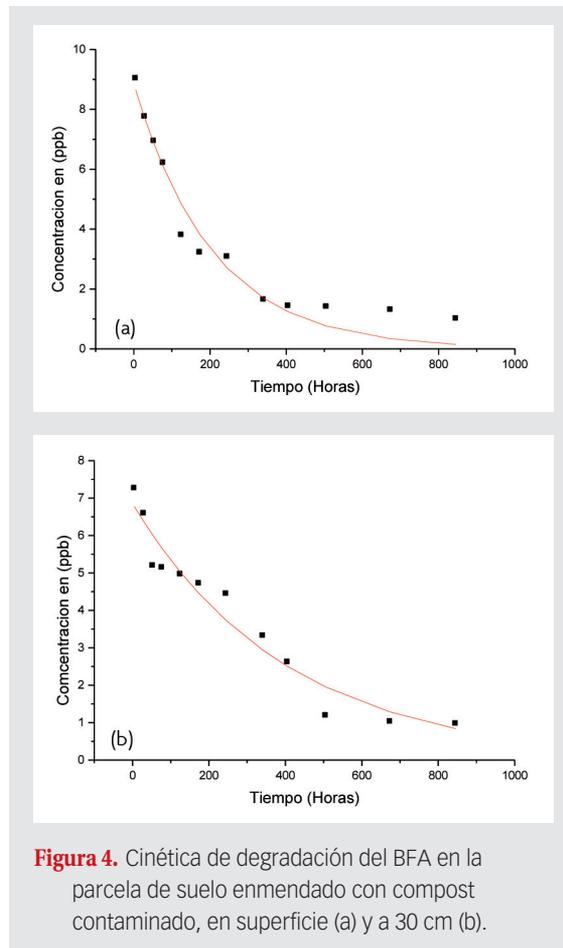


Figura 4. Cinética de degradación del BFA en la parcela de suelo enmendado con compost contaminado, en superficie (a) y a 30 cm (b).

Validación de los métodos. Parámetros de calidad

Se determinó en cada caso el rango dinámico lineal, la sensibilidad analítica, los límites de detección y cuantificación y la exactitud del método en términos de precisión y veracidad. Los excelentes resultados obtenidos demostraron la validez de los métodos desarrollados para la aplicación propuesta.

Estudio del compost

Los métodos validados se aplicaron a la determinación de los contaminantes en muestras de lodo EDAR y compost fabricado a partir del mismo. Se observó que a lo largo del estudio se produjo la desaparición de la mayor parte de los β -bloqueantes en los primeros días del experimento. Los más persistentes fueron el SOT y el BET, aun-

Los PBs no lixivian en el suelo (enmendado y sin enmendar). El BFA solo lixivia hasta los 30 cm. Esto indica un buen comportamiento medioambiental de los contaminantes.

que se biodegradaron completamente a tiempo final. Es importante destacar que la duración de un proceso a escala industrial de compostaje en pilas de toneladas de material es de aproximadamente un año. En el caso de BFA y PBs, aunque se detecta una ligera reducción respecto a la contaminación inicial, se observa que los contaminantes están presentes en concentraciones elevadas a lo largo de todo el ensayo, siendo por tanto persistentes en las condiciones del estudio realizado.

Estudio de campo

Dada la rápida degradación de los β -bloqueantes durante los primeros días del proceso de compostaje, observada en el estudio de la evolución de estos compuestos realizado en la planta piloto, nuestra atención se centró en el resto de contaminantes ya que aparentemente muestran una degradación más lenta y por tanto mayor persistencia. Se estudiaron las cinéticas de degradación de BFA y PBs en presencia y ausencia de compost en el suelo. En la figura 4 se muestra un ejemplo de la cinética de degradación de un compuesto en unas condiciones determinadas (BFA).

Los datos experimentales obtenidos, para todos los contaminantes, se ajustan a una ecuación exponencial de primer orden ($C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$), siendo los valores de concentración inicial (C_0), constante de degradación (k), tiempo de vida me-

dia ($t_{1/2}$) y coeficiente de determinación (R^2) los mostrados en la tabla 3.

Como conclusión, se puede afirmar que el comportamiento para el BFA es similar en presencia y ausencia de compost observándose una degradación significativamente mayor en las muestras de superficie (zona aerobia) que a mayores profundidades (zona anaerobia). El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) en la parcela de suelo no tratado es mucho mayor que en la parcela enmendada; esto puede deberse a que el compost tiene mayor contenido de materia orgánica, hecho que favorece el crecimiento de microorganismos que aceleran la degradación del contaminante. En cuanto a los PBs, en ambas condiciones los cinco compuestos estudiados mostraron un comportamiento similar en cuan-

to a degradación (todos se degradaron en la superficie) y ninguno lixivió en el suelo, hecho de gran importancia desde un punto de vista medioambiental ya que, al no penetrar en el suelo, no alcanzan el nivel freático y, por tanto, las aguas subterráneas. Los tiempos de vida media son también en este caso mayores en las parcelas sin compostar para el caso de los PBs de cadena más corta (MPB y EPB) y el Ph-PB, pero en el caso de PPB y BPB se observa una biodegradación más lenta en las parcelas enmendadas con compost.

Se podrían potenciar las características del compost, aislando y suplementando el material con ellos. Estos microorganismos podrían ser usados en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con BFA y PBs.

Estudio microbiológico

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el estudio microbiológico desarrollado:

Influencia de la presencia de los compuestos y del compost en el recuento de la microbiota del suelo

La figura 5 muestra un ejemplo (BFA) de la tendencia observada.

Los resultados porcentuales de log UFC/g suelo obtenidos en suelos sin tratamiento con compost (Figura 5a) fueron diferentes en relación a las muestras superficiales (100 por 100), siendo el descenso de microorganismos observado de un 9,0 por ciento y de un 25,6 por ciento para las muestras recolectadas a 30 y 60 centímetros, respectivamente. En los suelos enmendados con compost (figura 5b), la evolución del número de microorganismos viables en el suelo adicionado de compost y contaminado con BFA fue decreciente, observándose una reducción de 0.5 log en el recuento de UFC suelo⁻¹, a lo largo del tiempo de ensayo. Si se comparan ambas figuras, se observa una tendencia descendente del recuento al aumentar la profundidad del suelo; este comportamiento se repite en todos los ensayos realizados a lo largo del tiempo (0, 15 y 30 días). En los recuentos tanto de las muestras de la parcela control como de las tratadas con el BFA no se observaron variaciones significativas en el recuento en superficie (2 centímetros), lo cual indica que los niveles poblacionales se mantuvieron cuantitativamente constantes a lo largo del tiempo. De igual modo, tanto los recuentos realizados a 30 como a 60 centímetros de profundidad indicaron que no existían variaciones sig-

Tabla 3. Parámetros de la cinética de degradación de los contaminantes

	Superficie	10 cm	20 cm	30 cm	
BFA en suelo sin tratar					
k (h ⁻¹)	6.2 · 10 ⁻³	4.4 · 10 ⁻³	2.9 · 10 ⁻³	2.5 · 10 ⁻³	
C ₀ (µg Kg ⁻¹)	7.6	8.7	7.4	6.9	
t _{1/2} (h)	112	158	237	279	
R ² (%)	95.8	98.3	96.2	94.7	
BFA en suelo con compost					
k (h ⁻¹)	5.4 · 10 ⁻³	4.9 · 10 ⁻³	4.5 · 10 ⁻³	3.6 · 10 ⁻³	
C ₀ (µg Kg ⁻¹)	14.0	8.9	5.9	4.7	
t _{1/2} (h)	128	143	155	192	
R ² (%)	95.5	95.7	93.8	97.4	
	MPB	EPB	PPB	BPB	Ph-PB
PBs en suelo sin tratar (solo en superficie)					
k (h ⁻¹)	3.8 · 10 ⁻³	3.5 · 10 ⁻³	4.1 · 10 ⁻³	4.0 · 10 ⁻³	2.9 · 10 ⁻³
C ₀ (µg Kg ⁻¹)	13.2	15.9	11.91	14.7	11.8
t _{1/2} (h)	183.8	196.4	167.4	172.9	231.8
R ² (%)	98.7	98.9	97.9	97.3	97.2
PBs en suelo compostado (solo en superficie)					
k (h ⁻¹)	6.0 · 10 ⁻³	5.1 · 10 ⁻³	3.7 · 10 ⁻³	2.2 · 10 ⁻³	4.6 · 10 ⁻³
C ₀ (µg Kg ⁻¹)	13.8	14.9	12.8	10.9	14.2
t _{1/2} (h)	115.5	136.9	188.3	312.2	150.0
R ² (%)	97.8	92.8	97.1	98.1	98.2

k: constante cinética; C₀: Concentración inicial; t_{1/2}: tiempo de vida media; R²: Coeficiente de correlación.

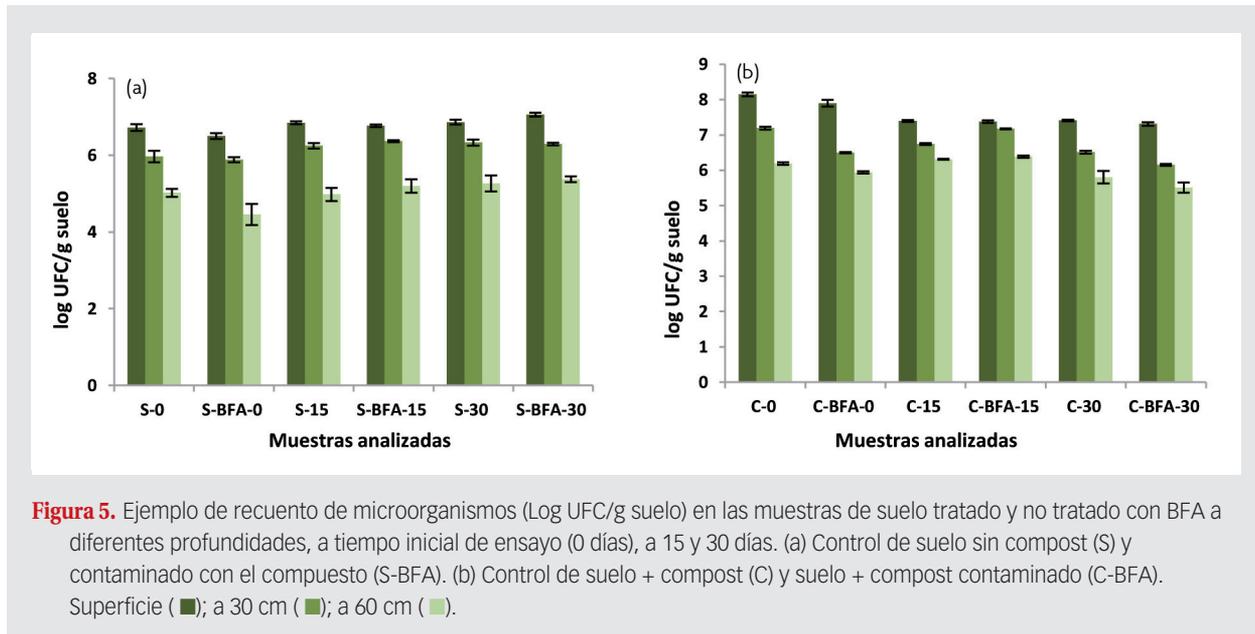


Figura 5. Ejemplo de recuento de microorganismos (Log UFC/g suelo) en las muestras de suelo tratado y no tratado con BFA a diferentes profundidades, a tiempo inicial de ensayo (0 días), a 15 y 30 días. (a) Control de suelo sin compost (S) y contaminado con el compuesto (S-BFA). (b) Control de suelo + compost (C) y suelo + compost contaminado (C-BFA). Superficie (■); a 30 cm (■); a 60 cm (■).

nificativas en el tiempo en relación a la cantidad de bacterias presentes en las muestras de suelo control como en las tratadas, obteniéndose valores muy similares en el número de microorganismos en las muestras recogidas a 30 centímetros para cada compuesto así como los de 60 centímetros de profundidad. Los PBs mostraron un comportamiento muy similar en todos los casos (figuras no mostradas).

Es de destacar, a la vista de los recuentos obtenidos, un aumento del número absoluto de microorganismos en presencia de compost respecto al suelo no enmendado, ya que el material compostado no sólo aporta nutrientes químicos, sino que también aumenta la riqueza microbiana. Por tanto, hay un mayor desarrollo microbiano en las parcelas enmendadas. Este hecho sería muy aprovechable a la hora de potenciar una mejora en las características del compost, aislando los microorganismos de mayor interés y suplementando el material con ellos.

Caracterización bioquímica de los microorganismos seleccionados^[25]

El empleo de los kits API 50 CH para el metabolismo de carbohidratos y API

ZYM para la actividad enzimática permitió caracterizar numerosos microorganismos. A partir de los resultados obtenidos en los procesos de oxidación y fermentación de carbohidratos, se concluyó que cada microorganismo los metabolizaba de forma diferente. Este dato, sumado a los resultados de actividad enzimática, que informa sobre la presencia o ausencia de una determinada actividad de una enzima, grupo de ellas o de una determinada vía metabólica, nos permitió discriminar los microorganismos estudiados y seleccionar aquellos que eran diferentes desde el punto de vista metabólico.

Cinética de crecimiento en presencia de BFA, MBP y BPB como fuente de C/E. Degradación de los compuestos

La figura 6 muestra un ejemplo de cinética de crecimiento de microorganismos para cada uno de los contaminantes estudiados.

Los resultados mostraron que los microorganismos seleccionados fueron capaces de crecer en presencia del contaminante y que este crecimiento fue superior al obtenido en el medio base

en ausencia del compuesto (control). Las diferencias entre ambos cultivos (control y problema) son de aproximadamente 0.5 log UFC mL⁻¹. La mayor diferencia entre el cultivo suplementado con los contaminantes y el control se observó en los microorganismos codificados como BPA-6, MPB-3, y BPB-7 (mostrados en la figura), siendo esta diferencia de 8,2, 7,6 y 6,3 por ciento, respectivamente. En relación a la cantidad de producto degradada, en el caso de BFA fue parecida en todos los ensayos realizados, observándose que todos los microorganismos degradaron el compuesto casi en su totalidad (99,9 por ciento). En el caso del MPB existe una gran variabilidad dependiendo del microorganismo, siendo el codificado como MPB-3 el único capaz de degradar completamente el compuesto, en las 96 horas de ensayo, con un 99,9 por ciento de degradación total. El nivel de degradación observado en otros cultivos (MPB-1, MPB-2, MPB-8 y MPB-9) fue de aproximadamente el 20 por ciento. Los microorganismos que menos degradaron el compuesto fueron MPB-4, MPB-5, MPB-6 y MPB-7, con porcentajes de

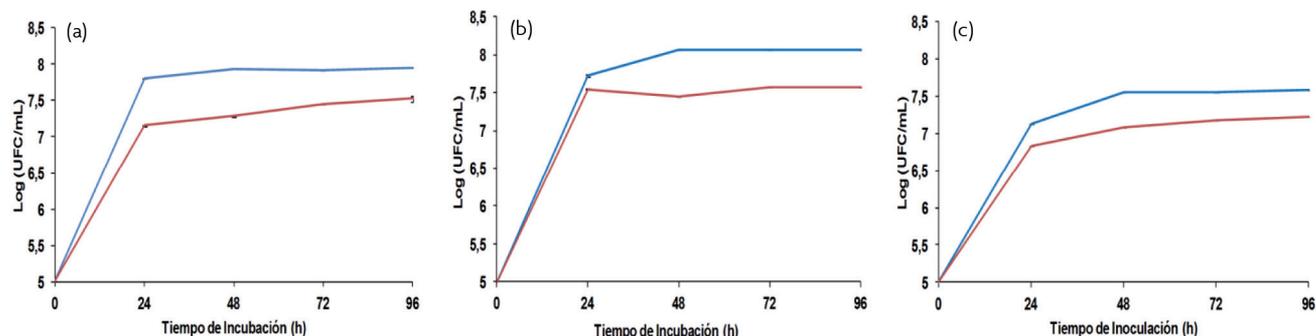


Figura 6. Cinética de crecimiento. (a) Microorganismo BPA-6 en medio de cultivo contaminado con 5 ppm de BFA. (b) Microorganismo MPB-3 en medio de cultivo con 5 ppm de MPB. (c) Microorganismo BPB-7 en medio de cultivo con 5 ppm de BPB. Línea azul: crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10 suplementado con BPA. Línea roja: control, crecimiento del microorganismo en medio TSB 1/10.

degradación inferiores al 10,0 por ciento, siendo el microorganismo identificado como MPB-9 el que menos utilizó este compuesto como fuente de C/E, con un porcentaje de degradación del 5,6 por ciento. En el caso de BPB, la cantidad de compuesto degradada fue también muy variada dependiendo del microorganismo. Así, ocho de ellos degradaron este compuesto en un porcentaje superior al 95 por ciento, observándose que el codificado como BPB-7 degradó el producto en más del 96 por ciento.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de esta investigación, cabe concluir que:

- Se han propuesto y validado diferentes metodologías analíticas para la detección y cuantificación de microcontaminantes pertenecientes a dos familias de disruptores endocrinos químicos (PBs y BFA) y una de fármacos (β -bloqueantes) en lodos EDAR, compost procedente de estos lodos y suelos agrícolas (enmendados y sin enmendar) mediante el empleo de la cromatografía de líquidos acoplada a

espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS), previa extracción de los contaminantes mediante las técnicas de ultrasonido (USE) y QuEChERs. En todos los casos, los límites de detección y cuantificación obtenidos son lo suficientemente bajos como para poder emplear estos métodos en la detección y cuantificación de estos contaminantes en las muestras medioambientales seleccionadas.

- Los métodos analíticos desarrollados ofrecen una importante innovación científica, ya que en la actualidad son muy pocos los métodos publicados sobre el estudio de estos contaminantes en las matrices seleccionadas, principalmente en suelos y compost procedentes de las EDAR.
- La aplicación de la metodología propuesta al estudio de la evolución de los compuestos en un proceso de compostaje a escala piloto demostró la rápida degradación de los β -bloqueantes y la lenta de los EDCs bajo las condiciones de trabajo ensayadas.

El enmendado de suelos agrícolas con compost es muy beneficioso, pues acelera la biodegradación de los contaminantes orgánicos en el suelo e impide su lixiviación al favorecer su retención

- El estudio de campo realizado en una parcela agrícola experimental de la Vega de Granada, sobre suelos agrícolas cuando estos son enmendados con compost procedentes de EDAR urbanas contaminados demostró que los compuestos de la familia de los PBs eran retenidos en la superficie (2 centímetros), desapareciendo por completo en esta zona, siempre que se mantuviera ésta húmeda. En el caso del BFA, éste lixivió hasta los 30 centímetros de profundidad, desapareciendo en esta capa del suelo. Esto indica un buen comportamiento medioambiental, ya que los contaminantes en ningún caso alcanzaron el nivel freático y, por tanto, las aguas subterráneas. Por otro lado, todos los compuestos demostraron un comportamiento similar en cuanto a su cinética de degradación, ajustándose ésta a una ecuación exponencial de primer orden, $C = C_0 \cdot e^{-kt}$. A partir de esta ecuación se pudo determinar el tiempo de vida medio para cada compuesto, la

concentración inicial (C_0) y la constante cinética (k). Además, para la mayoría de los contaminantes, los tiempos de vida medios eran mayores en las condiciones de la parcela no enmendada respecto a la enmendada. Esto se debe a que al enmendar el suelo con el compost, se aporta materia orgánica que favorece el crecimiento de microorganismos, lo cual puede provocar un aumento en la retención de los compuestos y en su velocidad de degradación.

- El recuento de la microbiota heterótrofa cultivable de los suelos tratados con los compuestos y de los suelos enmendados con compost y tratados con los compuestos demostró que, al

umentar la profundidad en el suelo, se produce un descenso progresivo del número de microorganismos viables. Por otro lado, se pudo observar que el mayor desarrollo microbiano ocurría en las parcelas enmendadas con compost.

- El estudio morfológico y bioquímico de los microorganismos aislados permitió aislar y seleccionar diferentes especies de microorganismos. Siendo los microorganismos de mayor capacidad enzimática los codificados como MPB-8 y BFA-4, con 12 y 11 actividades enzimáticas demostradas, respectivamente.
- Los compuestos estudiados fueron degradados en mayor o menor medida

por los microorganismos seleccionados, siendo los porcentajes de degradación superiores al 70 por ciento en todos los casos. Los resultados obtenidos demuestran la habilidad de crecimiento de los microorganismos en presencia de estos compuestos como fuente de C/E. Por tanto, estos microorganismos podrían ser utilizados en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con BFA y PBs. ♦

Agradecimientos

Los autores de la investigación desean expresar su agradecimiento a FUNDACIÓN MAPFRE por la financiación de la misma y a la Universidad de Granada por permitir desarrollarla en sus instalaciones.

Referencias

- [1] Eriksson, E; Christensen, N; Schmidt, JE; Ledin, A. Potential priority pollutants in sewage sludge. *Desalination*, 2008 (226) 371-388.
- [2] Farrell, M; Jones, DL. Critical evaluation of municipal solid waste composting and potential compost markets. *Bioresource Technology*, 2009 (100) 4301-4310.
- [3] European Commission. Working Document Sludge and Biowaste. Sustainable Production and Consumption, 2010. ENV.C.2.
- [4] European Commission. Report from the commission to the Council and the European parliament on the implementation of Community waste legislation: Directive 75/442/EEC, Directive 91/689/EEC, Directive 75/439/EEC, Directive 86/278/EEC and Directive 94/62/EC, for the period 1998-2000. COM 2003, 250 Final/3 Brussels, Belgium.
- [5] European Commission. Working Document on Sludge (3rd Draft). 27/04. 2000, Brussels, Belgium. ENV.E.3/LM.
- [6] US EPA. Proposed Rule: Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge. Federal Register, 1999 (64) 72045-72062.
- [7] European Chemicals Agency. List of Pre-registered Substances. Helsinki, October 2009.
- [8] Metcalfe, CD; Metcalfe, TL; Kiparis-sis, Y; Koenig, BG; Khan, C; Hughes, RJ; Croley, TR; March, RE; Potter, T. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001 (20) 297-308.
- [9] Keith L.H. Environmental endocrine disruptors. *Pure and Applied Chemistry*, 1998 (70) 2319-2326.
- [10] Kang, JH; Kondo, F; Katayama, Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 2006 (226) 79-89.
- [11] Oehlmann, J; Oetken, M; Schulte-Oehlmann U. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research*, 2008 (108) 140-149.
- [12] Pothitou P; Voutsas D. Endocrine disrupting compounds in municipal and industrial wastewater treatment plants in Northern Greece. *Chemosphere*, 2008 (73) 1716-1723.
- [13] EPCEU, Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on E Quality Standards in the field of water policy, 2008.
- [14] Darbre, PD; Harvey, PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, 2008 (28) 561-578.
- [15] Albergo, B; Pérez, RA; Sánchez-Brunete, C; Tadeo, JL. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid. *Journal of Hazardous Materials*, 2012 (239-240) 48-55.
- [16] Vo, TTB; Yoo, YM; Choi, KC; Jeung EB. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive Toxicology*, 2010 (29) 306-316.
- [17] Terasaka, S; Inoue, A; Tanji, M; Kiyama, R. Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicology Letters*, 2006 (163) 130-141.
- [18] Tavares, RS; Martins, FC; Oliveira, PJ; Ramalho-Santos, J; Peixoto, FP. Parabens in male infertility is there a mitochondrial connection? *Reproductive Toxicology*, 2009 (27) 1-7.
- [19] McArdell CS; Molnar E; Suter MJ; Giger W. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environmental Science and Technology*, 2003 (37) 5479-5486.
- [20] EMEA. European agency For the Evaluation of Medicinal Products. Guidance on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. CPMP/SWP/4447/00 draft, London.
- [21] Daughton, CG; Ternes, TA. Pharmaceuticals and PCPs in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, 1999 (107) 907-938.
- [22] Usán Sanz, V. Proyecto Fin de Carrera: Desarrollo de métodos analíticos para la separación de contaminantes quirales mediante HPLC 2008-2009. Universidad Rey Juan Carlos. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10115/5595>.
- [23] AOAC Method. Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. Official Methods of Analysis 2007.01, 2007.
- [24] Araújo, A; Monteiro, R; Abarkeli, R. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 2003 (52) 799-804.
- [25] Burns, RG. Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 1982 (14) 423-427.