



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Estudio comparativo de métodos de remoción  
en suelos contaminados con antraceno**

**Tesis que presenta**

**Laura Delgado Balbuena**

**Para obtener el grado de**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Director de la tesis: Dr. Luc Dendooven  
Codirectora: Dra. Marina O. Franco Hernández**

México, D.F.

Diciembre 2014

## **COMITÉ TUTORIAL**

Director:

**Dr. Luc Dendooven**

Codirectora:

**Dra. Marina Olivia Franco Hernández**

Asesores:

**Dra. Nathalie Cabirol**

**Dra. Silvia M. Contreras Ramos**

**Dr. Frédéric Thalasso**

**Dr. Fernando J. Esparza García**

**Dr. Rodolfo Marsch Moreno**

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV) por su apoyo para la realización de mis estudios de doctorado y trabajo de tesis.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 170138.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), por el apoyo económico para la realización de ésta investigación.

## Dedicatorias

A mis padres:

**Cecilia y Alfonso**

Gracias por todo su esfuerzo, su apoyo y por la confianza depositada en mí.

A mis hermanos:

**Dante, Salatiel y Josue**

Gracias por darme la oportunidad de crecer a su lado y ser mejor día a día.

A mis amigos:

**Abigail, Aurelia, Azucena, Benito, Blanca, Carolina, Daniel, Deyanira, Elizabeth, Ernesto, Fabiola, Jesús G., Leonardo, J. Manuel, Pilar, Reyes J. y Víctor**

Gracias por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida.

A mis asesores:

**Dr. Luc Dendooven, Dra. M. Olivia Franco Hernández, Dra. Nathalie Cabirol, Dra. Silvia M. Contreras Ramos, Dr. Rodolfo Marsch Moreno, Dr. Fernando J. Esparza y Dr. Frédéric Thalasso**

Mi más amplio agradecimiento por su valiosa dirección, apoyo y motivación para el desarrollo de este trabajo.

# Contenido

	Página
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1 El suelo	5
3.2 Fuentes de contaminación	6
3.3 El petróleo	7
3.4 Hidrocarburos aromáticos	8
3.5 Técnicas de remediación	10
3.6 Factores que influyen en la biodegradación de los HAPs	16
4. Justificación	21
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	22
7. Material y métodos	23
7.1 Productos químicos utilizados	23
7.2 Caracterización fisicoquímica del suelo	23
7.2.1 Determinación de pH	23
7.2.2 Humedad	23
7.2.3 Capacidad de retención de agua	24
7.2.4 Textura	24
7.2.5 Carbono	25
7.2.6 Nitrógeno total	26
7.3 Tratamiento del suelo, condiciones en el invernadero y muestreo	27
7.4 Muestreo del sitio y colecta. Primera etapa	27
7.5 Establecimiento de la dinámica	28
7.6 Muestreo del sitio y colecta. Segunda etapa	29
7.7 Establecimiento de la dinámica	30
7.8 Análisis químico del suelo	31
8. Análisis estadístico	32
9. Resultados y discusión	32
10. Conclusión	37
11. Recomendaciones	37
11. Bibliografía	38
Anexos	43
Artículos I y II	

## Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Género o especie bacteriano degradador de hidrocarburos aromáticos policíclicos	13
Tabla 2. Especies de lombrices degradadoras de hidrocarburos	15
Tabla 3. Efecto de la estructura y contenido de agua sobre la remoción de contaminantes en el suelo	19

## 1. Resumen

Diferentes factores controlan la remoción de los hidrocarburos del suelo, como son las características del contaminante, propiedades del suelo y población microbiana. Se sabe que los microorganismos del suelo son capaces de degradar petróleo (Grant y col. 2007). La mayoría de los componentes recalcitrantes, como son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) son removidos del suelo.

Este proyecto se dividió en dos etapas. La primera fue la evaluación del efecto de las fluctuaciones de agua y el tiempo de contaminación sobre la remoción del antraceno a diferentes profundidades del suelo. Y la segunda fue un estudio comparativo de la eficiencia en la remoción de antraceno en dos suelos, usando diferentes técnicas de remediación.

En la primera etapa, se encontró que aplicando un ciclo de secado-rehumedecido al suelo, aceleró la remoción del antraceno, por lo que se propuso que la liberación de pequeñas concentraciones de antraceno secuestrado, fue debido a las fluctuaciones en el contenido de agua principalmente acentuadas en la superficie de la capa del suelo (Vázquez y col. 2010). Se contaminó suelo de Otumba con 500 mg de antraceno/kg de suelo seco. La mitad de este suelo se colocó en columnas de diferentes profundidades y el resto se mantuvo incubado durante 112 días (suelo viejo). Las fluctuaciones en el contenido de agua o el perfil de profundidad del suelo no afectaron ninguno de los dos suelos estudiados (el recientemente contaminado o el suelo viejo). Sin embargo, el mezclado y aireado del suelo aceleró la remoción del antraceno en el suelo que tenía 112 días de haberse contaminado con antraceno.

En la segunda etapa, se hizo el seguimiento de la remoción de antraceno en un suelo agrícola y de pastizal; los suelos fueron mezclados regularmente, adicionados con materia orgánica, un surfactante no iónico (Surfynol 485) o lombrices (*Eisenia fetida* (Savigny 1826)). En ambos suelos fueron obtenidos los mismos resultados,

aunque la remoción de antraceno fue más rápida en el suelo de pastizal que en el agrícola. La remoción más rápida de antraceno se obtuvo cuando se mezcló el suelo cada 7 días, y después de 56 días ya no fue detectado en ambos suelos. El tratamiento que quedó en segundo lugar de rapidez fue el que incluía la adición de las lombrices al suelo. Después de 112 días de tratamiento en ambos suelos, el contaminante ya no fue detectado. La aplicación de materia orgánica que sirvió como comida para las lombrices, aceleró también la remoción del contaminante. Cuando el surfactante fue aplicado, únicamente el 37% del antraceno adicionado fue removido del suelo, mientras que se disipó el 62% en el suelo control después de 112 días. La aplicación del surfactante inhibió la remoción del antraceno por los microorganismos autóctonos del suelo.

La capacidad de la población microbiana para degradar los HAPs no fue un factor limitante, pero la biodisponibilidad del contaminante sí. La biodisponibilidad del contaminante fue incrementada por la manipulación del suelo (mezclado) pero no por el contenido de agua fluctuante. La remoción del antraceno fue más rápida cuando se aplicaron lombrices en los dos suelos; sin embargo, el mezclado del suelo fue el mejor tratamiento. La aplicación de material orgánico también fue benéfico para la remoción.



## 2. Abstract

Different factors control the removal of oil from the ground, such as the contaminant characteristics, soil properties and microbial population. It is well known that soil microorganisms are capable of degrading petroleum. The most recalcitrant components such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can be removed from the soils.

This project was divided into two stages. The first was to evaluate the effect of fluctuations in water and the pollution time on the removal of anthracene at different soil depths. The second was one comparative study of efficiency in the removal of anthracene in two soils using various remediation techniques.

In the first stage, it was found that applying a dry cycle-rewet down, accelerated the removal of anthracene, so it was suggested that the release of small concentrations of sequestered anthracene was due to fluctuations in the water content, mainly marked on the surface of the soil layer (Vazquez y col. 2010). Otumba soil was contaminated with anthracene 500 mg/kg of dry soil. Half of this soil was placed in columns of different depths and the rest remained incubated for 112 days (old soil). Fluctuations in water content or soil depth profile did not affect any of the two soils studied (recently contaminated soil or old). However, the mixed and aerated soil removal anthracene accelerated soil had been contaminated 112 days with anthracene.

In the second stage, it was monitoring the removal of anthracene in an arable soil and pasture; soil was mixed regularly added with organic material, a nonionic surfactant (Surfynol 485) and earthworms (*Eisenia fetida* (Savigny, 1826)). In both soils were obtained the same results, although the removal of anthracene was faster in the pasture soil than the arable. The faster removal of anthracene was obtained when soil was mixed every 7 days, after 56 days was no longer detected in both soils. The second fastest treatment was that included adding earthworms to the soil. After 112

days of treatment in both soils, contaminant was not detected. The application of organic material that served as food for the earthworms also accelerated the removal of the contaminant. When the surfactant was applied, only 37% of anthracene added soil was removed, while 62% is dissipated in the control soil after 112 days. The application of surfactant inhibited removal anthracene by native soil microorganisms.

The ability of the microbial population to degrade PAHs was not a limiting factor, but the bioavailability of the contaminant itself. Contaminant bioavailability was increased by manipulation of the soil (mixed) but not by fluctuating water content. Removal of anthracene was faster when earthworms were used in the two soils; however, the mixed soil was the best treatment. The application of organic material was also beneficial for removal.

### **3. Introducción**

#### **3.1 El suelo**

El término suelo se refiere al material exterior poco compacto de la superficie terrestre, un estrato característicamente diferente del lecho rocoso subyacente. Es la región en la que se sustenta la vida vegetal y de la cual las plantas obtienen soporte mecánico y muchos de sus nutrientes (Alexander, 1981). Es un organismo vivo: un consorcio de células vivas en una matriz orgánico-mineral (Coyne, 2000).

La matriz del suelo está formada por cinco componentes principales: minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos vivos.

Los materiales minerales son los componentes principales estructurales de varios tamaños, formas y características químicas y constituyen más del 50% del volumen total del suelo (Paul y Clark, 1996; Volke y Velasco, 2002). La porción inorgánica del suelo tiene un notable efecto sobre los habitantes microbianos, debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua (Alexander, 1981). El aire y el agua juntos ocupan el volumen de los espacios, y usualmente conforman de 25% a 50% del volumen total. La proporción relativa de aire/agua fluctúa considerablemente con el contenido de humedad del suelo (Volke y Velasco, 2002).

El suelo se forma a través de un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar sobre el medio rocoso original, produciendo la meteorización del mismo. La meteorización es la erosión producida en una roca por los agentes atmosféricos, los cambios de temperatura y en general, por la intemperie. Se dice que es de tipo físico cuando se produce la disgregación de la roca por procesos mecánicos que las trituran mediante grietas o fisuras, y se dice que es de tipo químico cuando la descomposición de la roca se produce por procesos químicos

(disolución, hidratación, hidrólisis, carbonatación y oxidación) que atacan los minerales que las constituyen transformándolos en otros (Sabroso y Pastor, 2004).

El proceso de formación de los suelos sigue un ritmo de crecimiento extremadamente lento: se ha calculado en 3 cm cada 500 años; sin embargo, pueden ser destruidos en algunas horas por acción del viento, lluvia o actividades del hombre (Luna Guido y col. 2002). El suelo es fundamental e irremplazable: éste gobierna la productividad de las plantas del ecosistema terrestre y mantiene los ciclos biogeoquímicos (mineralización de la materia orgánica, nitrificación, fijación de nitrógeno y oxidación de metano, entre otros procesos) (Luna Guido y col. 2002; Nannipieri y col. 2002).

### **3.2 Fuentes de contaminación**

Según FAO-PNUMA (1983), la degradación del suelo se puede definir como todo proceso que rebaja la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativa y cualitativamente, bienes y servicios. Aunque se puede producir por causas naturales, la degradación del suelo es fundamentalmente la consecuencia directa de su utilización por el hombre, bien como resultado de actuaciones directas, como actividades agrícolas, forestales, ganaderas, agroquímicas y riego, o por acciones indirectas, como son las actividades industriales, eliminación de residuos, transporte, etc.

La contaminación del suelo consiste en una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de su productividad, como consecuencia de la acumulación de sustancias tóxicas en concentraciones que superan el poder de amortiguación natural del suelo y que modifican negativamente sus propiedades (Volke y Velasco, 2002).

La contaminación del suelo por hidrocarburos (principalmente hidrocarburos del petróleo) está presente en todo el mundo. Esto se debe a la gran dependencia del petróleo como fuente principal de energía, la rápida industrialización y el crecimiento de la población. La liberación de hidrocarburos al ambiente por accidentes o debido a

las actividades humanas es la principal causa de contaminación del agua y el suelo. Los contaminantes del petróleo usualmente causan disturbios en el equilibrio natural de las especies vivientes y su ambiente (Pascucci, 2011).

### **3.3 El petróleo**

Los hidrocarburos de petróleo son contaminantes ambientales de gran importancia. Con tasas de producción de 13.42 millones de metros cúbicos de crudo por día, su potencial como contaminante del suelo y agua es evidente (Pascucci, 2011).

El petróleo crudo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rossini, 1960).

Los hidrocarburos del petróleo pueden ser neurotóxicos para los seres humanos y animales. Se ha encontrado que afectan la actividad y el desarrollo del cerebro. También causan otros síntomas más, incluyendo náuseas, desorientación, confusión mental, dificultad en el habla y trastornos de la memoria. La exposición a niveles más altos puede causar la debilitación extrema, pérdida de enderezamiento, coma, convulsiones y muerte. La exposición a largo plazo puede causar cambios en la capacidad neurofisiológica o psicológica, y aumentar el riesgo de cáncer de pulmón, piel y vejiga, así como tener otros efectos cancerígenos.

Diversos combustibles son el resultado del refinamiento del petróleo crudo. Estos productos contienen principalmente C (83-97%), H (10-14%), N (0.1-2%), O (0.0005 a 1.5%), S (0.05-6%) y diversos tipos de metales, tales como V, Fe y Cu (<0,1%). Estos combustibles están clasificados por dos criterios principales: la estructura del hidrocarburo (alifático o aromático) y el número de C en la estructura química. Estos dos criterios afectan a algunas de las características de los productos, como el punto de ebullición, solubilidad, absorción y toxicidad (Pascucci, 2011).

La composición heterogénea entre los diferentes petróleos crudos y productos refinados influyen el porcentaje de biodegradación (Leahy y Colwell, 1990).

### **3.4 Hidrocarburos aromáticos**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos con alto peso molecular, con dos o más anillos aromáticos en su estructura.

Los factores naturales que favorecen la formación de HAPs incluyen los cósmicos, geológicos y biológicos. Las fuentes antropogénicas incluyen la producción de aluminio, el creosota, el cemento, el asfalto y la industria petroquímica (Tsibart y Gennadiev, 2013).

**Propiedades fisicoquímicas de los HAPs.** Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es muy pequeña. Dependiendo de su carácter aromático, los HAPs absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos pero muy poco solubles en agua, entre mayor sea su peso molecular menor será su solubilidad (Kanay y Harayama, 2000). La mayoría de los HAPs se fotooxidan. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirse a quinonas.

**Formación.** Los HAPs se forman por pirólisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno (Kanay y Harayama, 2000). A elevadas temperaturas, la pirólisis de compuestos orgánicos producen fragmentos de moléculas y radicales que se combinan para formar HAPs. Los combustibles que forman HAPs son metano, otros hidrocarburos, hidratos de carbono, ligninas, péptidos, etc.

**Producción y usos.** Muchos HAPs pueden obtenerse a partir de alquitrán de hulla. Las sustancias puras no tienen aplicaciones técnicas importantes, salvo el naftaleno y

el antraceno. Las fuentes comunes de HAPs en el medio ambiente son las naturales y antropogénicas. Estos son tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Los HAPs pueden encontrarse casi en todas partes: en el aire, en la tierra y en el agua, procedentes de fuentes naturales, como los incendios forestales y los volcanes aunque la combustión de combustibles fósiles es la principal fuente de emisiones de HAPs. Otras emisiones proceden de la combustión de residuos y madera, así como los vertidos de petróleo crudo o refinado.

**Riesgos asociados a algunos HAPs.** El antraceno es un hidrocarburo aromático policíclico que forma antraquinona cuando se oxida y 9,10-dihidroantraceno cuando se reduce. A pesar de que el antraceno y fenantreno no son dañinos a la salud humana por no poseer efectos genotóxicos o carcinógenos, han mostrado ser tóxicos para los peces y las algas (Moody y col. 2001). El antraceno es fotosensibilizante. Produce dermatitis aguda y crónica con síntomas de quemazón, picor y edema, que son más pronunciados en las regiones de la piel expuesta. Las lesiones cutáneas se asocian a irritación de la conjuntiva y de las vías aéreas superiores. Otros síntomas son lagrimeo, fotofobia, edema de los párpados e hiperemia conjuntival.

Ambos, antraceno y fenantreno, son usados como substratos modelo en estudios relacionados a la degradación ambiental de los HAPs, ya que su estructura es encontrada en los HAPs carcinógenos como el benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, y 3-metilclorantreno (Rasol, 1994).

Debido a sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas, 28 HAPs han sido listados como contaminantes principales por la USEPA (Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos) (Gan y col. 2009).

El suelo es un depósito natural de hidrocarburos. El contenido de HAPs en el suelo está fuertemente determinado por su concentración en la atmósfera, donde los HAPs pueden estar unidos a partículas o existir en fase gaseosa (Tsibart y Gennadiev, 2013).

El peligro asociado con los HAPs puede ser vencido por el uso de métodos convencionales, los cuales involucran remoción, alteración o aislamiento del contaminante. Aunque otras técnicas involucran la excavación del suelo contaminado y su incineración o almacenamiento. Sin embargo, estas tecnologías son caras y se necesita del transporte del suelo contaminado.

Sin embargo, la degradación microbiana es el mejor proceso de degradación. Se sabe de la actividad catabólica de los microorganismos en la biorremediación. La degradación de los HAPs puede ser por bacterias, algas u hongos. Esto involucra el rompimiento de los componentes orgánicos por la biotransformación en metabolitos menos complejos y a través de la mineralización en minerales inorgánicos, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> (aeróbica) o CH<sub>4</sub> (anaeróbica). La biorremediación de un contaminante depende de las condiciones ambientales, número y tipo de microorganismos, naturaleza y estructura química del componente que se va a degradar (Volke y Velasco, 2002).

### **3.5 Técnicas de remediación**

La remediación es el conjunto de tecnologías desarrolladas para limpiar y/o disminuir el contenido de contaminantes (hidrocarburos, metales pesados, etc.) de diferentes niveles de toxicidad, involucrando metodologías químicas, físicas o biológicas, con el objetivo de reducir la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (USEPA, 2001).

#### ***Clasificación de tecnologías de remediación***

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios: (a) estrategia de remediación; (b) lugar en que se realiza el proceso de remediación, y (c) tipo de tratamiento.



**a) Estrategia de remediación.** Son tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto, para remediar la mayoría de los sitios contaminados:

- Destrucción o modificación de los contaminantes. Este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.
- Extracción o separación. Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica).
- Aislamiento o inmovilización del contaminante. Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

**b) Lugar de realización del proceso de remediación.** En general, se distinguen dos tipos de tecnología:

- *In situ.* Son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del suelo contaminado, sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.
- *Ex situ.* La realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio o fuera de él.

(SEMARNAT, 2002; Volke y Velasco, 2002).

**c) Tipo de tratamiento.** Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento:

- Tratamientos biológicos (biorremediación). Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.

- Tratamientos fisicoquímicos. Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
- Tratamientos térmicos. Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo

(López y col. 2006; Volke y Velasco, 2002).

### **Biorremediación**

Las tecnologías de biorremediación ofrecen la ventaja de usar procesos naturales que se basan en la capacidad de los microorganismos para la biodegradación del petróleo mediante procesos metabólicos o cometabólicos, transformando los compuestos tóxicos en compuestos secundarios de menor toxicidad e incluso la mineralización de los hidrocarburos totales del petróleo a dióxido de carbono y agua (Maldonado Chávez y col. 2003).

Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras. El proceso de biorremediación incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales (Volke y Velasco, 2002).

En el caso de que las poblaciones microbianas autóctonas no sean capaces de biodegradar los compuestos orgánicos tóxicos, se pueden adicionar al suelo microorganismos específicos que si lo lleven a cabo, un proceso conocido como bioaumentación, esto se logra adicionando microorganismos genéticamente modificados con genes catabólicos adicionales específicos para degradar (Ortiz y col. 2007).

Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs que incluyen: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Atrhobacter*,

*Bacillus*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxela*, *Mycobacterium* (Moody y col. 2001), *Nocardia*, *Pseudomonas* (Stelmack y col. 1999), *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas* (Haritash y Kaushik, 2009).

En la Tabla 1 se puede observar el tipo de hidrocarburo degradado por algún género o especie bacteriano.

**Tabla 1.** Género o especie bacteriano degradador de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Género o especie	Hidrocarburo	Referencia
<i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i>	Naftaleno, fenantreno y bifenilo	Plotnikova y col. 2001
<i>Sphingomonas</i>	HAPs	Viñas y col. 2005
<i>Burkholderia</i> y <i>Sphingomonas</i>	9.10-fenantreno quinona, naftaleno	Holt y col. 2005
<i>Mycobacterium parmense</i> , <i>Pseudomonas mexicana</i> y <i>Sphingobacterales</i>	Benzo(a)antraceno y criseno	Lladó y col. 2009
<i>Acidovorax</i>	Fenantreno	Singleton y col. 2009
<i>Mycobacterium sp.</i>	HAPs	Zeng y col. 2010

Liste y Alexander en el 2002, encontraron que las lombrices son capaces de asimilar HAPs de la porción remanente en suelos que no son disponibles por otras técnicas de extracción convencionales.

Las lombrices son consideradas como un grupo de invertebrados del suelo. Éstas han sido estudiadas ampliamente en todo el mundo, donde a menudo representan una parte significativa de la biomasa del suelo, aunque no dominante (Decaëns y col. 2013). Cerca de 3,700 especies han sido descritas hasta el momento.

Las lombrices han sido reconocidas como los ingenieros típicos de los ecosistemas y representan un socio excelente para los seres humanos en la gestión de servicios de los ecosistemas.

Se han dividido en tres categorías:

- 1) Las epígeas, que viven en la hojarasca y producen “casting” (bolo fecal) en la superficie del suelo, afectando su dureza y la distribución de los macroporos.
- 2) Las anécicas viven en madrigueras verticales, que utilizan como refugios y se encuentran conectados con la superficie del suelo.
- 3) Las endógeas hacen madrigueras verticales u orientadas al azar en el suelo, aunque son considerados como estructuras temporales, ya que rara vez las reutilizan.

(Blouin y col. 2013)

Algunas especies degradadoras de hidrocarburos se mencionan en la Tabla 2.

<b>Tabla 2. Especies de lombrices degradadoras de hidrocarburos</b>			
<b>Compuesto analizado</b>	<b>Especie de lombriz</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
Petróleo crudo y derivados de refinería	<i>E. fetida</i>	Aumento del número de microorganismos en combinación con composta y disminución de hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	Ceccanti y col. (2006)
Crudo	<i>E. fetida</i>	Disminución de crudo	Schaefer (2003)
Petróleo	<i>E. fetida</i>	No se observó ningún efecto	Callaham y col. (2002)
Petróleo crudo	<i>L. terrestris</i> , <i>A. chlorotica</i> <i>E. fetida</i>	Incremento microbiano y aumento de la mineralización	Schaefer y col. (2005)
Petróleo crudo	<i>E. fetida</i>	Mejora de la estructura y porosidad del suelo. Pérdidas mínimas del hidrocarburo	Stom y col. (2003)
Petróleo crudo	<i>L. terrestris</i> , <i>A. chlorotica</i> , <i>E. fetida</i>	Degradación de HTP e incremento microbiano	Schaefer y Filser (2007)
Aceite	<i>E. fetida</i>	Disminución del contaminante	Tomoko y col. (2005)
Fluidos de perforación	<i>E. fetida</i>	Disminución de HTP	Getliff y col. (2002)
Asfalteno	<i>E. fetida</i>	Reducción de asfalteno y aumento de actividad de microorganismos en intestino Mineralización	Martin-Gil y col. (2007)
HAP Fenantreno y fluoranteno	<i>L. rubellus</i>	Reducción de HAP	Ma y col. (1995)
HAP Fenantreno y fluoranteno	<i>E. fetida</i>	Incremento en la disponibilidad de HAP	Eijsackers y col. (2001)
Fenantreno, antraceno y benzo(a)pireno	<i>E. fetida</i>	Reducción del 51%, 100% y 47%, respectivamente	Contreras-Ramos y col. (2006)
Fenantreno, antraceno y benzo(a)pireno	<i>E. fetida</i>	Reducción de los 3 HAPs	Álvarez-Bernal y col. (2006)
Benzo(a)pireno	<i>E. fetida</i>	Reducción alta	Tejada y Masciandaro, (2011)
Fenantreno, antraceno y benzo(a)pireno	<i>E. fetida</i>	Reducción de HAPs sin diferencias entre los tratamientos con y sin sustrato	Contreras-Ramos y col. (2009)
Hidrocarburos	<i>E. fetida</i>	Para pruebas de toxicidad se requieren de 5-50 lombrices	OECD, (2000)
HAP	<i>E. fetida</i>	Para pruebas de toxicidad se requieren 10 lombrices	Contreras-Ramos y col. (2006, 2009)

Se ha demostrado por diversos investigadores que la biodisponibilidad de hidrocarburos puede incrementarse por el uso de surfactantes o solventes.

En general, una molécula de surfactante (tensoactivo) contiene en su estructura un grupo hidrófilo y una o dos partes hidrófobas (Guang-Guo, 2006). La cola hidrófoba, generalmente, es una cadena de hidrocarburo que actúa para reducir la solubilidad del tensoactivo en agua, mientras que la cabeza polar tiene el efecto opuesto.

Los surfactantes pueden ser clasificados por la carga iónica de la parte superficialmente activa de la molécula. Estos son los surfactantes no iónicos (sin carga) e iónicos. A su vez, los surfactantes iónicos pueden clasificarse en catiónicos (carga positiva), aniónicos (carga negativa) y anfóteros (carga positiva y negativa).

Aunque se reconoce que los tensoactivos pueden mejorar la solubilidad y disolución de hidrocarburos en suelo, también se han reportado datos contradictorios. La mejora en la biodegradación puede ser atribuible a una mayor solubilidad y biodisponibilidad del sustrato para las bacterias, mejorando su transporte a través de la pared celular microbiana e incrementando el contacto de las bacterias con el hidrocarburo.

Los posibles mecanismos de inhibición incluyen la toxicidad del tensoactivo para el microorganismo, la absorción microbiana preferible del surfactante como sustrato y la inhibición del contacto directo entre las células y del hidrocarburo por las micelas del surfactante. La toxicidad de un agente tensoactivo también es dependiente de su estructura molecular (Jing-Liang y col. 2009).

### **3.6 Factores que influyen en la biodegradación de los HAPs**

El porcentaje de biodegradación depende de muchos factores (Rasol, 1994). Dentro de estos, las características del suelo son especialmente importantes para el éxito de biodegradación de los hidrocarburos; algunos de los principales factores limitantes son: textura del suelo, permeabilidad, capacidad de retención de agua,

temperatura, contenido de nutrientes y contenido de oxígeno. La textura del suelo afecta la permeabilidad, el contenido de agua y la densidad aparente del suelo. El suelo con baja permeabilidad dificulta el transporte y la distribución de agua, nutrientes y oxígeno (Concetta y col. 2013; Snežana y col. 2013).

### ***Temperatura***

La temperatura rige todos los procesos biológicos. Cada microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento y un intervalo fuera del cual el crecimiento se detiene (Alexander, 1981). A una baja temperatura la viscosidad del petróleo aumenta y la volatilización de los alcanos tóxicos de cadena corta es reducida, retrasando el comienzo de la biodegradación. Los porcentajes de degradación generalmente decrecen conforme la temperatura baja. Se cree que es el resultado de la disminución de la actividad enzimática. Temperaturas más altas incrementan la velocidad del metabolismo de los hidrocarburos, a un máximo, típicamente, en el intervalo de 30 a 40 °C (Leahy y Colwell, 1990).

### ***Oxígeno***

El oxígeno es la variable ambiental principal que controla el porcentaje de degradación (Hinchee y col. 1995). El paso inicial en el catabolismo de los hidrocarburos por bacterias y hongos involucra la oxidación del sustrato por oxigenasas, para la cual el oxígeno molecular es requerido. Las condiciones aeróbicas son, por lo tanto, necesarias para esta ruta de oxidación microbiana de los hidrocarburos en el ambiente (Leahy y Colwell, 1990).

La disponibilidad de oxígeno en suelos es dependiente del porcentaje de consumo del oxígeno por los microorganismos, el tipo de suelo, si el suelo está inundado y la presencia de sustrato utilizable.

La degradación anaeróbica de los hidrocarburos del petróleo por microorganismos ha sido demostrada en algunos estudios (Leahy y Colwell, 1990).

### ***Nutrientes***

Aunque el carbón orgánico es el principal constituyente del suministro de alimentos para los microorganismos, se requiere de nutrientes inorgánicos por lo que no es sorprendente que la flora sea afectada algunas veces por la aplicación de fertilizantes inorgánicos (Alexander, 1981). Roubal y Atlas reportaron que en sedimentos de lodo, las adiciones de nitrógeno y fósforo estimulan la degradación del naftaleno, pero no del benzo(a)pireno (citado por Hincee y col. 1995).

### ***Actividad de agua***

Los cambios en el contenido de agua en el suelo están acompañados por cambios en el potencial redox del suelo, motilidad y biomasa de los microorganismos y la disponibilidad y transporte de gases y nutrientes en el suelo (Hincee y col. 1995). Cuando la humedad es excesiva, la proliferación microbiana se detiene, no tanto a causa del exceso de agua, sino principalmente porque dicho exceso limita el intercambio gaseoso y disminuye el suministro de oxígeno disponible, creando así un ambiente anaeróbico (Rasol, 1994). Se ha observado que el contenido de agua en el suelo afecta la degradación de los hidrocarburos del petróleo (Hincee y col. 1995) así como el efecto del secado y rehumedecido del suelo favorece la remoción de antraceno (Tabla 3).



**Tabla 3.** Efecto de la estructura y contenido de agua sobre la remoción de contaminantes en el suelo.

Referencia	Aporte
Vázquez Núñez y col. 2009	En la parte superior (0-2 cm) la degradación de antraceno fue más rápida. No fue claro si fue por procesos bióticos o abióticos. Las columnas fueron cubiertas con polietileno negro y transparente con orificios para permitir la aireación. Las fluctuaciones de agua fueron mínimas. Se usó suelo agrícola de Acolman. Estado de México. El suelo se contaminó con antraceno, 550 mg/kg ss. Se tomaron muestras de 0-2, 2-8 y 8-15 cm.
Betancur-Galvis y col. 2006	Dos suelos, Acolman y Texcoco, se contaminaron con Ant, Fen y BaP. En el suelo salino alcalino de Texcoco el BaP fue más resistente a la degradación. Las características del suelo afectaron la degradación. La concentración de antraceno fue removida más rápido en la capa de 0-2 cm.
Saghir y col. 2007	La biodisponibilidad influenciada por propiedades fisicoquímicas del suelo, tamaño de partícula, arcilla, carbono orgánico. Suelo de un año contaminado con hexaclorobenceno presentó menos remoción y biodisponibilidad.
Ahmad y col. 2004	Investigaron la biodisponibilidad y degradación de un pesticida en un suelo de inmediata contaminación y otro con 12 años de contacto. Hubo secuestro en nanoporos y materia orgánica. Ampliamente absorbido.
Smit y col. 1998	Propiedades del suelo, factor principal de la influencia de la biodisponibilidad: el contenido de materia orgánica y arcilla. El suelo fue contaminado con ZnCl <sub>2</sub> por 1.5 años.
Steinberg y col. 1987	1,2-dibromoetano recién aplicado al suelo es destruido por la población autóctona más rápido en comparación con suelos de 19 años de contaminación.

### **Salinidad y pH**

En ambientes marinos, la salinidad parece tener un efecto significativo sobre la degradación microbológica de los HAPs (Rasol, 1994).

Las condiciones altamente ácidas o alcalinas tienden a inhibir a muchas bacterias comunes, ya que para la mayoría de las especies el óptimo está cercano a la neutralidad. Mientras mayor es la concentración de iones hidrógeno, el tamaño de la comunidad bacteriana generalmente es menor (Alexander, 1981).

Algunas bacterias y hongos crecen mejor a un pH cercano a la neutralidad. El pH extremo en algunos suelos tiene una influencia negativa sobre la capacidad de las poblaciones microbianas para degradar los hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990).

Se sabe que algunos microorganismos participan en la degradación y detoxificación de HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Ambos microorganismos, procariotas y eucariotas, tienen la habilidad para metabolizar los HAPs vía dioxigenasa, monooxigenasa o en reacciones catalizadas por la peroxidasa (Rasol, 1994).

La degradación por los hongos lignolíticos se produce por enzimas extracelulares. Los sistemas lignolíticos consisten de tres principales grupos de enzimas: lignino peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso y fenoloxidasas (lacasas, tirosinasas). Las enzimas son activas a diferentes temperaturas, la mayoría tiene su actividad óptima a condiciones mesofílicas.

Las características físicas del suelo, además de afectar la remoción de los HAPs, también intervienen en su biodisponibilidad (Song y col. 2006; Stokes y col. 2006). Los HAPs son secuestrados en el suelo y fijados en la matriz, estabilizados físicamente dentro de los agregados o reaccionando con la materia orgánica del suelo haciéndola inaccesible para los microorganismos (Yang y col. 2010).

La biodegradación puede ser seriamente afectada por el tiempo de contaminación y por un incremento en la sorción ( Snežana y col. 2013; Tsibart y col. 2013).

#### **4. Justificación**

Los derrames de petróleo y sus derivados en el mundo, han provocado una severa contaminación del suelo y de los cuerpos de agua. Estos compuestos son tóxicos para los seres vivos ya que son mutagénicos y carcinogénicos y tienen un amplio efecto sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo.

En la actualidad hay un interés creciente por los métodos de recuperación biológicos, ya que prometen tecnologías más sencillas, más baratas y más respetuosas con el medio ambiente que otros tratamientos. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos de biorrecuperación está todavía por comprobarse.

El suelo contaminado con antraceno servirá para estudiar el efecto de los factores (humedad y, oxígeno) que controlan la remoción de los hidrocarburos, así como determinar el mejor método de remediación (biorremediación o químico).

## **5.- Hipótesis**

- 1.- El secado-rehumedecido del suelo y el tiempo de contaminación afectarán la remoción del antraceno a diferentes profundidades.
- 2.- Las tecnologías de remediación, como el uso de lombrices y surfactantes, serán más eficientes en la remoción del antraceno en comparación con el uso exclusivo de los microorganismos autóctonos del suelo.

## **6. objetivos**

### ***Objetivo general***

- 1.- Evaluar el efecto de las fluctuaciones de agua y el tiempo de contaminación sobre la remoción y biodisponibilidad del antraceno a diferentes profundidades del suelo.
- 2.- Realizar un estudio comparativo de la eficiencia en la remoción de antraceno usando diferentes técnicas de remediación.

### ***Objetivos específicos***

- 1.- Analizar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas del suelo, pH, CRA, CE, Humedad, Textura, C y N total.
- 2.- Determinar si las fluctuaciones de agua y el tiempo de contaminación afectan la remoción del antraceno en tres diferentes capas y profundidades del suelo.
- 3.- Determinar la técnica de remediación (surfactante, lombrices, materia orgánica, mezclado y microorganismos autóctonos del suelo) más adecuada para la remoción de antraceno en diferentes suelos.

## **7.- Materiales y métodos**

### **7.1 Productos químicos utilizados**

El antraceno con una pureza >98% se obtuvo de Sigma-Aldrich (USA). La acetona con una pureza >99.7% y el n-butanol con pureza >99.4% se obtuvieron de J.T. Baker (USA).

### **7.2 Caracterización fisicoquímica del suelo**

#### **7.2.1 Determinación de pH**

- a) Se pesó 1 de suelo
- b) Se disolvió en dos volúmenes de agua destilada y se mantuvo la solución en agitación.
- c) Se introdujo el electrodo y se tomó lectura cuando se mantuvo constante.  
(Thomas, 1996).

#### **7.2.2 Humedad**

- a) Se pesó 10 g de suelo en las condiciones en que se tomó la muestra.
- b) Se puso a secar durante 24 horas a 100° C.
- c) Se pesó nuevamente la muestra de suelo.

$$\% \text{ Humedad} = (W1-W2)/W1)*100$$

W1: Peso inicial del suelo

W2: Peso seco final del suelo

### **7.2.3 Capacidad de retención de agua**

- a) Se pesó 25 g de suelo
- b) Se colocó el suelo en un cono de papel filtro Whatman No. 42 dentro de un embudo. El papel filtro se pesó previamente.
- c) Se agregó agua destilada hasta saturar el suelo completamente y se dejó escurrir por 24 horas.
- d) Tanto las muestras de suelo como los conos de papel filtro se pesaron nuevamente.

$$CRA = M1/M2$$

M1: Peso de agua en el suelo saturado

M2: Peso de suelo seco

### **7.2.4 Textura**

Se determinó mediante el método gravimétrico de Bouyoucus, cuyo principio se fundamenta en la separación de las partículas presentes en el suelo en función del tamaño y el tiempo de sedimentación.

- a) Se pesó 40 g de suelo tamizado y se colocó en el recipiente homogeneizador.
- b) Se agregaron 100 mL de agua destilada y 10 mL de hexametáfosfato de sodio 1 N como agente dispersante.
- c) Se dejaron reposar durante 5 min y después se agitó durante otros 5 min en el homogenizador.
- d) Todo el contenido se colocó en una probeta de 1 L cuidando de no perder suelo. Después se completó el volumen con el hidrómetro dentro.
- e) A cada lectura efectuada se tomó la temperatura de la suspensión con el fin de obtener el factor de corrección.
- f) La primera lectura se realizó a los 49 s y la segunda 2 horas después de la primera lectura.

$$\% \text{Partículas} = 100 - (\rho_n + FC) * 100$$

$\rho_n$ : Densidad de la mezcla (g/L)

FC: Factor de conversión por temperatura

### **7.2.5 Carbono**

Se utilizó un analizador semiautomático de carbono orgánico, Total Organic Carbon (TOC-Vcsn) Shimadzu, usando el método de oxidación de carbono por combustión a alta temperatura, donde la muestra preparada sufrió una combustión a 1,350° C en una atmósfera rica en oxígeno. Todo el carbono presente se convierte en CO<sub>2</sub> y éste fluye a través de tubos lavadores de gas para eliminar las interferencias, tales como cloro gaseoso y vapor de agua. El CO<sub>2</sub> se mide usando un detector infrarrojo.

- a) Se pesó 1 g de suelo seco.
- b) Se colocó el suelo en un recipiente de porcelana mantenido a peso constante y cubierto con una capa fina de vidrio.
- c) Se ejecutó el protocolo de incineración de la muestra. Esta operación se realizó en el módulo Solid Sample que está acoplado al TOC-Vcsn.
- d) Se relacionó el valor con los valores obtenidos de la curva estándar determinada con concentraciones conocidas de carbono, usando diferentes masas de glucosa.

$$\text{COT} = \text{CT} - \text{CIT}$$

COT: Carbono orgánico total (g)

CT: Carbono total (g)

CIT: Carbono inorgánico total (g)

(SHIMADZU, USA)

### 7.2.6 Nitrógeno Total

Se utilizó el método de digestión ácida de Kjeldhal.

- a) Se pesó 1 g de suelo proveniente de una muestra homogeneizada, colocándola en un recipiente Kjeldhal de vidrio.
- b) Se agregaron perlas de vidrio, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 0.5 g de sulfato cúprico y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- c) Se colocó el recipiente Kjeldhal en el equipo, incluyendo la trampa de absorción (solución de hidróxido de sodio al 15%).
- d) Se calentó hasta ebullición obteniendo una solución transparente. Se mantuvo durante 20 min más.
- e) Se dejó enfriar y se agregaron 200 mL de agua destilada
- f) La muestra se colectó y preparó para la destilación agregando 100 mL de NaOH al 30%.
- g) Se destiló no menos de 150 mL en un matraz con tubo colector cuyo extremo estuvo sumergido en refrigerante. El matraz contenía:
  - 1) 50 mL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N, 4-5 gotas de rojo de metilo al 1% y 50 mL de agua destilada. Se aseguró un exceso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para realizar la retrotitulación. Se tituló el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta un color amarillo.

$$Nt \text{ en } \% = \frac{(A.N1 - B.N2) * 0.014 * 100}{M}$$

M

A: Volumen de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> empleando en la recolección del amoníaco destilado.

N1: Normalidad del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

B: Volumen de la solución de hidróxido de sodio empleando en la neutralización de la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

N2: Normalidad de la solución de NaOH 0.1N



M: Masa de la muestra en gramos.  
Miliequivalentes del nitrógeno (0.0014).  
(Bremner 1996).

### **7.3 Tratamientos de suelo, condiciones en el invernadero y muestreo**

El suelo fue previamente tamizado con el propósito de eliminar raíces y hojas, así como diseminar los agregados existentes para contar con un suelo homogéneo y con características adecuadas para la realización del estudio. Se permitió sólo el paso de partículas menores de 5 mm.

El trabajo de tesis se dividió en dos etapas:

**Etapas I. Evaluación del efecto de las fluctuaciones de agua y el tiempo de contaminación sobre la remoción del antraceno a diferentes profundidades del suelo.**

### **7.4 Muestreo del sitio y colecta**

El suelo fue colectado en Otumba, Estado de México, (N.L. 19°42', W.L. 98°49'). Los detalles del sitio de muestreo se pueden encontrar en Méndez-Bautista y col. (2010). Éste tiene una altitud promedio de 2349 msnm y una temperatura subhúmeda, con un promedio anual de 14.8° C y una precipitación anual promedio de 577 mm, principalmente de junio a agosto (<http://www.inegi.gob.mx>). El suelo es arenoso arcilloso con un pH de 7.6, CE de 1.15 dS m<sup>-1</sup> y un contenido de carbono orgánico de 7.2 g C kg<sup>-1</sup>. El área es cultivada principalmente con maíz y otros granos, recibiendo una cantidad mínima de fertilizantes inorgánicos (<http://www.inegi.gob.mx>).

El suelo fue muestreado al azar, a una profundidad de 0-15 cm de cinco sitios de aproximadamente 0.5 Ha.

### **7.5 Establecimiento de la dinámica**

El suelo previamente contaminado con 500 mg de antraceno/kg de suelo seco se adicionó a tubos (20 cm diámetro) de cloruro de polivinilo (PVC) de tres longitudes diferentes. Un primer grupo de tubos de PVC de 60 cm se llenó con 6 kg de suelo para tener una capa de 20 cm de longitud. Un segundo grupo de tubos de PVC de 60 cm se llenó con 3 kg para tener una capa de 10 cm y un tercer grupo de tubos de PVC de 10 cm se llenó con 1.5 kg para tener una capa de 5 cm.

Las columnas fueron sometidas a dos tratamientos:

- 1) Tratamiento con luz, que se fundó en mantener el suelo de la columna expuesto a fotoperiodos y aireación normales. La parte superior de la columna no se cubrió favoreciendo la pérdida de la humedad, facilitando el secado de la parte superficial del suelo y la formación de microagregados.
- 2) Tratamiento en oscuridad, que consistió en someter al suelo a condiciones de oscuridad, manteniendo la humedad del suelo constante y la aireación moderada. Esto se consiguió colocando un papel aluminio con perforaciones de 0.3 cm en la parte superior de la columna.

Las columnas con suelo fueron puestas en el invernadero. Después de 1, 3, 7, 14, 28, 56 y 112 días, una muestra de suelo fue tomada de la capa de 0-5 cm de cada una de las columnas (tres muestras), de 5-10 cm (dos muestras) y de 10-20 cm de profundidad (una muestra). Cada muestra de las diferentes capas de suelo fue analizada por la extracción del antraceno con un método exhaustivo y con n-butanol.

El procedimiento experimental descrito arriba también fue aplicado al suelo que fue almacenado por 112 días (suelo viejo).

De acuerdo a los resultados obtenidos con el suelo viejo, donde al final de la dinámica ya no se detectó antraceno en el suelo, surgió la duda del porqué de ese comportamiento. Para probar la hipótesis de que simplemente el mezclado del suelo tuvo un efecto importante sobre la remoción del antraceno, se realizó un estudio adicional con 4 tratamientos.

El suelo se contaminó con 500 mg de antraceno/kg de suelo seco, y se colocaron 15 g en frascos de 120 mL.

El primer tratamiento consistió en mezclar el suelo cada 7 días por 2 minutos; el segundo tratamiento en mezclar el suelo cada 14 días; el tercero en mezclarlo cada 28 días; y el último fue el tratamiento control en el cual no se realizó ningún mezclado. Los frascos fueron colocados en jarras de 1 L con 10 mL de agua destilada para evitar la desecación del suelo, además se colocaron viales con 20 mL de NaOH 1M para atrapar el CO<sub>2</sub>.

Los frascos fueron incubados durante 112 días. Se tomaron muestras los días 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56, y 112. Cada semana todas las jarras fueron abiertas y aireadas durante 5 minutos para evitar condiciones anaeróbicas.

## **Etapa II. Estudio comparativo de la eficiencia en la remoción de antraceno en dos suelos, usando diferentes técnicas de remediación**

### **7.6 Muestreo del sitio y colecta**

En este estudio se usaron dos suelos. El suelo agrícola fue obtenido de Otumba (mencionado anteriormente) y el segundo fue un suelo de pastizal colectado de Juchique de Ferrer (Estado de Veracruz, México) (L.N. 19° 50', L.O. 96° 42'). El clima en el sitio de muestreo es caliente con una temperatura promedio anual de 25° C. Este sitio es caracterizado por abundantes precipitaciones en verano y otoño con un promedio de 1000 mm/año. El suelo fue areno arcilloso con un pH de 5.9 y CE de 1.0 dS/m. Tuvo un contenido de carbono orgánico de 13.2 g C/kg, un tamaño de

distribución de partícula de 721 g/kg de arena, 42 g/kg de arcilla y 237 g/kg de limo. La CRA fue 1130 g/kg de suelo.

El suelo se muestreó al azar de una capa de 0-15 cm de cinco sitios de aproximadamente 0.5 Ha. Un total de 10 muestras de suelo fueron obtenidas (cinco réplicas de dos suelos).

### **7.7 Establecimiento de la dinámica**

Se contaminaron 100 kg de cada suelo con 500 mg de antraceno/kg de suelo seco. Se aplicaron cinco diferentes tratamientos. El primero fue el tratamiento control, donde únicamente el suelo se mantuvo en la columna sin modificación. El segundo tratamiento consistió en el mezclado del suelo cada siete días durante 10 min, el tercero fue la adición 60 g de materia orgánica (zanahoria) cada dos semanas a la columna. En el cuarto se colocaron dos lombrices adultas de *E. fetida* al suelo, cada una de ellas tuvo un peso de 0.35 g con el clitelo desarrollado. Las lombrices fueron alimentadas con 60 g de zanahoria cada dos semanas. Y el quinto tratamiento fue la adición de un surfactante (Surfynol® 485) al suelo; se le agregó 24.9 g de surfactante/kg de suelo seco.

Los tratamientos quedaron de la siguiente forma:

Tratamiento 1: Suelo + Acetona + Antraceno

Tratamiento 2: Suelo + Acetona + Antraceno + Mezclado

Tratamiento 3: Suelo + Acetona + Antraceno + Materia orgánica

Tratamiento 4: Suelo + Acetona + Antraceno + Materia orgánica + Lombriz

Tratamiento 5: Suelo + Acetona + Antraceno + Surfactante

Doscientas sub-muestras de 500 g de cada suelo (Otumba y Juchiqué) se colocaron en tubos de cloruro de polivinilo (PVC) de 10.5 cm de diámetro y 20 cm de

longitud, para al final tener una capa de 10 cm de suelo. Las columnas de PVC se cubrieron con papel aluminio perforado para limitar la evaporación.

Después de 1, 3, 7, 14, 28, 56 y 112 días, se tomaron 20 g de suelo de cada tratamiento para realizar la extracción de antraceno con un método de extracción exhaustivo (Song y col. 1995).

### **7.8 Análisis químico del suelo**

La concentración de antraceno en el suelo se analizó usando un método de extracción exhaustivo ultrasónico desarrollado por Song y col. (1995). Se mezclaron 1.5 g de suelo de muestra con 3 g de sulfato de sodio anhidro para formar un polvo fino. Posteriormente se colocaron en un tubo pyrex con 5 mL de acetona. Los tubos se agitaron mecánicamente en "vórtex" por un minuto y después se pusieron en un baño de sonicación a 35-40° C por 20 minutos. Los extractos se separaron del suelo por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces. Los extractos se combinaron, evaporaron y disolvieron en 2 mL de acetona.

La biodisponibilidad del antraceno en el suelo se determinó usando una extracción no exhaustiva con n-butanol (Listen y Alexander 2002). Los 10 g de muestra del suelo se extrajeron con 15 mL de n-butanol y se agitaron por 5 min. El suelo mezclado con n-butanol se reposó por 20 min y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y evaporó en oscuridad a temperatura ambiente por 48 horas. Se agregaron al residuo 2 mL de acetona y se analizó para determinar antraceno.

Se usó una solución de n-butanol con una concentración conocida de antraceno para determinar la cantidad de antraceno que se perdió durante el procedimiento de cada día de muestreo. Aunque la cantidad de antraceno perdida durante el procedimiento fue menor al 2%, los datos reportados se ajustaron para esas pequeñas pérdidas.

Por cada tubo se tomó una alícuota de 2.0 µL para analizar el antraceno en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 4890-D GC (USA) con un detector de ionización de flama. Se usó una columna HP-5 de Hewlett Packard (USA) con longitud de 15 mm, diámetro interior de 0.53 mm y grosor de película de 1.5 µm. Para separar el antraceno se usó como acarreador el gas He, la velocidad de flujo fue de 7 mL min<sup>-1</sup>.

### **8.- Análisis estadístico**

Las diferencias significantes entre los tratamientos y las capas para la concentración del antraceno que se determinaron con la técnica exhaustiva y n-butanol se analizaron usando PROC MIXED.

### **9.- Resultados y discusión**

**Etapas I. Evaluación del efecto de las fluctuaciones de agua y el tiempo de contaminación sobre la remoción del antraceno a diferentes profundidades del suelo.**

Con respecto al suelo recién contaminado, la remoción del antraceno no fue afectada significativamente por las capas, profundidad del suelo y fluctuaciones en el contenido de agua durante la dinámica. La remoción del antraceno fue más rápida al inicio y a la mitad del tratamiento, no encontrándose alguna diferencia entre los dos tratamientos, el abierto y el cerrado.

Después de los 112 días, 66% del antraceno originalmente adicionado fue removido del suelo, y solamente 18 % del antraceno adicionado fue recuperado con n-butanol.

La mayor remoción ocurrió en los primeros 28 días en el suelo recién contaminado (columnas abiertas), y a los 112 solamente dos terceras partes del antraceno adicionado se removieron del suelo.

En la dinámica con el suelo viejo (el que fue almacenado por 112 días), solo 31% del antraceno adicionado originalmente se removió del suelo, y solo 52% de los 500 mg de antraceno adicionado al suelo se extrajo con n-butanol.

En el tratamiento con las columnas abiertas, a partir del día 28, el antraceno en algunos casos ya no se detectó con la técnica exhaustiva ni con la de n-butanol. Y al día 56 prácticamente el antraceno se removió del suelo.

La manipulación y el mezclado del suelo viejo, aceleraron la remoción del antraceno. El suelo viejo con una edad de 112 días no fue trastornado durante su incubación, y después de 112 días de envejecimiento, únicamente se removió 40% del antraceno adicionado.

Sin embargo, la manipulación, el mezclado, y la adición a las columnas de PVC del suelo viejo, indujeron una remoción inmediata de antraceno que fue similar al recién contaminado. Todo el antraceno detectado al tiempo 0 (304 mg de antraceno/kg de suelo seco), fue removido después de 56 días.

El descenso de contaminantes en el suelo ocurrió más rápido dentro de los primeros días de contaminación (Betancur-Galvis y col. 2006). Kästner (1999), reportó que 20% del antraceno adicionado al suelo se disipó dentro de los primeros 30 días, y solamente 24% en los siguientes 146 días.

Se cree que la mayoría del antraceno fue biodisponible en los primeros días de incubación y por lo tanto fue degradado por los microorganismos. Reichenberg y Mayer (2006), sugieren que la biodisponibilidad de los contaminantes depende de dos factores, de la biodegradabilidad y/o la bio-accesibilidad. Por otro lado, el secado-rehumedecido del suelo liberó el contaminante inicial, provocando un incremento en la bio-accesibilidad.

En un previo experimento de Vázquez Núñez (2009), el secado-rehumedecido del suelo aceleró la remoción del antraceno en la capa de 0-2 cm, en comparación a las capas más profundas.

La técnica con n-butanol se considera relacionada a la biodisponibilidad. Sin embargo, en el experimento reportado aquí estas relaciones son cuestionables. La cantidad de antraceno extraído con n-butanol o la parte biodisponible decreció en menor proporción a la cantidad removida del suelo. Con estos resultados se asume que las características del suelo como el contenido de arcilla y/o materia orgánica afectaron la extracción con n-butanol.

La teoría de que el mezclado del suelo aceleró la remoción del antraceno fue confirmada. Reafirmamos que los microorganismos del suelo son capaces de remover el antraceno y que la biodisponibilidad del contaminante afecta ésta disipación. Con el simple mezclado del suelo se incrementó la biodisponibilidad del antraceno. La cantidad de antraceno extraído con la técnica exhaustiva fue similar en los diferentes tratamientos, excepto en el día 7. Del día 14 en adelante, el antraceno extraído fue menor en el suelo que se mezcló cada 7 días en comparación a los otros tratamientos. Y a partir del día 28, el antraceno ya no se encontró en el suelo mezclado cada semana. Después de 56 días el antraceno ya no se detectó en el suelo que se mezcló cada 14 días. Después de 56 días, en el suelo mezclado cada 28 días, la concentración de antraceno fue significativamente más baja que en el suelo que nunca se mezcló, y en el día 112 ya no se detectó antraceno en el suelo. En el suelo que nunca se mezcló, 210 mg de antraceno/kg de suelo seco aún fueron detectados a los 112 días.

El mezclado alteró las propiedades físicas y químicas del suelo, rompiendo los agregados, redistribuyendo la humedad en el suelo, y exponiendo el carbón orgánico y los nutrientes, con lo cual se estimuló la actividad microbiana (Doran 1982; Melope y col. 1987).



## **Etapa II. Estudio comparativo de la eficiencia en la remoción de antraceno en dos suelos, usando diferentes técnicas de remediación.**

La concentración de antraceno disminuyó en ambos suelos, el agrícola y el de pastizal. Ésta se llevó a cabo en las primeras semanas de incubación.

Se sabe que la aplicación de surfactantes acelera la remoción de HAPs en el suelo, pero no siempre. En el estudio reportado aquí, el surfactante inhibió la remoción del contaminante. Al final de la dinámica, aún se detectó el 60% de antraceno en el suelo. Existen varios reportes donde indican que la biodegradación de los HAPs en la presencia de surfactantes sintéticos se inhibe. Diferentes procesos pueden explicar este comportamiento. Primero, el surfactante pudo haber inhibido la actividad microbiana en el suelo o pudo haber disminuido la biodisponibilidad del antraceno (Chen y col. 2000). Segundo, pudo presentarse una competencia entre las fuentes de carbono debido a una mayor biodegradabilidad del surfactante en comparación al contaminante, y por lo tanto se inhibió la degradación del contaminante (Makkar y Rockne, 2003). Tercero, el surfactante pudo incrementar la biodisponibilidad del contaminante y éste al ser liberado inhibió la actividad microbiana (Christofi y Ivshina, 2002).

La aplicación de material orgánico redujo la concentración de antraceno en ambos suelos, en comparación al tratamiento control. Después de 112 días, únicamente 17 y 88 mg de antraceno/kg de suelo seco se encontraron en el suelo de pastizal y en el agrícola, respectivamente. Creemos que la actividad microbiana del suelo fue estimulada por la aplicación del material orgánico (Tejeda, 2009). La materia orgánica es un contribuyente importante en la biodegradación, ya que ésta proporciona nutrientes y sustrato de carbono para la biomasa microbiana. Además, la elevada actividad microbiana libera enzimas que podrían participar en la degradación de los contaminantes del suelo.

La concentración de antraceno se redujo drásticamente en el suelo mezclado, y al día 56 el contaminante ya no fue detectado. Al parecer el simple mezclado del suelo incrementó el contacto entre el contaminante y los microorganismos. El aumento de la disponibilidad del antraceno combinado con la capacidad de los microorganismos autóctonos para metabolizar el contaminante, condujo a una disminución casi lineal del antraceno en el suelo.

En el tratamiento con lombrices también se encontró una alta disminución, sin embargo aún se detectó antraceno en el suelo después de 56 días. Después de 112 días, sin embargo, ya no fue detectado antraceno en el suelo. La capacidad de las lombrices para acelerar la eliminación de los HAPs del suelo está bien documentada (Schaefer y Filser, 2007; Tomoko y col. 2005). Las lombrices excavan, mueven, airean y mezclan el suelo, y de esa forma aumentan el contacto entre los microorganismos y el contaminante (Ceccanti y col. 2006; Chaudhuri y col. 2012; Schaefer y col. 2005). Por consiguiente, la actividad microbiana se estimula y acelera la eliminación del contaminante. Rajiv y col. (2008), menciona que las lombrices también tienen un efecto sobre la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas cuando pasan el suelo a través de su intestino, lo que podría aumentar la eliminación del contaminante.

Tanto la aplicación de lombrices y el mezclado del suelo, son técnicas viables para eliminar los HAPs como el antraceno. Sin embargo, el costo de utilización de las lombrices y la dificultad de mezclar un suelo de manera adecuada en el campo, podrían ser una limitante de las dos técnicas. Por un lado, las lombrices necesitan un ambiente estable, sin temperaturas extremas, preferentemente cercano a la neutralidad y humedad suficiente. También tienen que ser alimentadas con el fin de mantener o aumentar su actividad. Por otro lado, puede ser difícil mezclar un suelo a fondo, y más en condiciones de campo. Sin embargo, la mezcla del suelo semanal y el mantenimiento de un contenido de agua adecuado, podría ser la manera menos costosa para remediar un suelo contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos.

## **10.- Conclusiones**

No hubo una diferencia significativa en la remoción del antraceno relacionado a las capas, profundidad del suelo y fluctuaciones en el contenido de agua durante la dinámica. Tampoco se encontró alguna diferencia entre los dos tratamientos, el abierto y el cerrado.

La capacidad de la población microbiana para degradar los HAPs no fue un factor limitante, pero la biodisponibilidad del contaminante sí. La biodisponibilidad del contaminante fue incrementada por la manipulación del suelo (mezclado) pero no por el contenido de agua fluctuante. La cantidad del contaminante que fue extraído con n-butanol no fue correlacionada con la cantidad de HAPs removidos del suelo, y tampoco fue relacionada a su biodisponibilidad en el suelo.

La remoción del antraceno fue más rápida en el suelo de pastizal que en el agrícola, y la aplicación de lombrices en los dos suelos aceleró su remoción; sin embargo, el mezclado del suelo fue el mejor tratamiento. La aplicación de material orgánico también fue benéfico para la remoción. El surfactante no iónico inhibió la remoción del contaminante del suelo.

## **11.- Recomendaciones**

- Identificar las poblaciones microbianas (bacterias) que participan en la remoción de antraceno al aplicar las cinco diferentes técnicas de remediación, en los suelos agrícolas y de pastizal.
- Comparar las comunidades microbianas presentes en los dos suelos contaminados con antraceno sometidos a los cinco diferentes métodos de remediación.

## 11.- Bibliografía

Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J. (2011) *Microbes and Microbial Technology. Agricultural and Environmental Applications*. Springer

Alexander, M. (1981) *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT (Ed) pp 32-33.

Alvarez-Bernal D., García-Díaz, L., Contreras-Ramos, S.M., Dendooven, L. (2006) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost. *Chemosphere* **65**:1642-51.

Betancur-Galvis L.A., Alvarez-Bernal D., Ramos-Valdivia A.C., Dendooven L. (2006) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soil of the former Lake Texcoco. *Chemosphere* **62**:1749-1760.

Blouin M., Hodson M.E., Delgado E.A., Baker G., Brussaard L., Butt K.R., Dai J., Dendooven L., Peres G., Tondoh J.E., Cluzeau D., Brun J.J. (2013) A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European J Soil Sci.* **64**:161-182.

Bremner J.M. (1996) Total nitrogen. *Methods of soil Analysis Chemical Methods*. In: Sparks DL (Ed) Soil Science Society of America Inc American Society of Agronomy, pp 1085-1122.

Callahan M.A., Stewart A.J., Alarcon C., McMillen S.J. (2002) Effects of earthworm (*Eisenia fetida*) and wheat (*Triticum aestivum*) straw additions on selected properties of petroleum contaminated soils. *Environ Toxicol Chem.* **21**:1658-63.

Ceccanti B., Masciandaro G., García C., Macci C., Doni S. (2006) Soil bioremediation: combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil. *Water Air Soil Pollut.* **17**:383-97.

Concetta Tomei M., Daugulis A.J. (2013) *Ex situ* bioremediation of contaminated soils: an overview of conventional and innovative technologies. *Critical reviews in environmental science and technology.* **43**:2107-2139.

Contreras-Ramos S.M. (2006) Asimilación y acumulación de HPA's por *Eisenia fetida* en suelos contaminados con hidrocarburos. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Contreras-Ramos S.M., Álvarez-Bernal D., Dendooven L. (2006) *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environ Pollut.* **141**:396-401.

Contreras-Ramos S.M., Álvarez-Bernal D., Dendooven L. (2009) Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with sewage sludge or vermicompost. *Appl Soil Ecol.* **41**:269-276.

Coyne M. (2000) *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Ed: Paraninfo.

Chaudhuri P.S., Pal T.K., Nath S., Dey S.K. (2012) Effects of five earthworm species on some physico-chemical properties of soil. *J Environ Biol.* **33**:713-716.

- Chen P., Pickard M.A., Gray M.R. (2000) Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation*. 11(5):341-347.
- Christofi N., Ivshina I.B. (2002) A REVIEW Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microb.* 93:915-929.
- Decaëns T., Porco D., Rougerie R., Brown G.G., James S.W. (2013) Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Appl Soil Ecol.* 65:35-42.
- Doran J.W. (1982) Tilling changes soil. *Crops Soils.* 34:10-12.
- Eijsackers H., Van Gestel C.A.M., De Jonge S., Mujs B., Slijkerman D. (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted dredged peat sediments and earthworms: a mutual interference. *Ecotoxicology* 10:5-50.
- Getliff J., McEwan G., Ross S., Richards R., Norman M. (2002) Drilling fluid design and the use of vermiculture for the remediation of drill cuttings. AADE 2002 Technology Conference "Drilling Fluids and Waste Management".
- Guang-Guo Y. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International.* 32:417-431.
- Gan S., Lau E.V., Ng H.K. (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Hazard Mater.* 172:532-549.
- Grant R.J., Muckian L.M., Clipson N.J.W. Doyle E.M. (2007) Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 44:293-300.
- Haritash A.K., Kaushik C.P. (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater.* 169:1-15.
- Hinchee R.E., Miller R.N., Johnson P.C. (1995) *In Situ* Aeration: Air Sparging, Bioventing, and Related Remediation Processes. Battelle Press.
- Jing-Liang L., Bing-Hung Ch. (2009) Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Materials* 2(1):76-94.
- Kanally R.A., Harayama S. (2000) Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol.* 182:2059-2067.
- Kanally R.A., Harayama S. (2010) Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnol.* 3(2):136-164.
- Kästner M., Streibich S., Beyrer M., Richnow H.H., Frietsche W. (1999) Formation of boun residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C] anthracene in soil. *Appl. Env. Microb.* 65: 1834-1842.
- Leah J.G., Colwell R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews.* 54(3):305-315.
- Lladó S., Jiménez N., Viñas M., Solanas A.M . (2009) Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil. *Biodegradation* 20(5):593-601.

López de Mesa J.B., Quintero G., Guevara Vizcaíno A.L. Jaimes Cáceres D.C., Gutiérrez Riaño S.M., Miranda García J. (2006) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Publicación científica* **4**(5):82-90.

Luna Guido M.L., Vega Jarquín C., Franco Hernández M.O., Vásquez Murrieta S., Trujillo Tapia N., Ramírez Fuentes E., Dendooven L. (2002) Actividad microbiana en suelos. *Avance y perspectiva*. **2**:328-332.

Liste H.H., Alexander M. (2002) Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere*. **46**:1011-1017.

Ma W., Immerzeel J., Bodt J. (1995) Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: studies on phenanthrene and fluoranthene. *Ecotox Environ Safe*. **95**:226-32.

Mahmood S.K., Rao P R. (1993) Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *B. Environ Contam Tox*. **50**:486-491.

Makkar R.S., Rockne K.J. (2003) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem*. **22**(10):2280–2292.

Maldonado Chávez E., Rivera Cruz M.C., Izquierdo Reyes F., Palma López D.J. (2003) Efecto de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y ciencia* **26**:123

Martin-Gil J., Navas-Gracia L.M., Gomez-Sobrino E., Correa-Guimaraes A, Hernandez-Navarro Sanchez-Bascones S.M. (2007) Composting and vermicomposting experiences in the treatments and bioconversion of asphaltens from the prestige oil spill. *Bioresour Technol*. **99**:1821-1829.

Melope M.B., Grieve I.C., Page E.R. (1987) Contribution by fungi and bacteria to aggregate stability of cultivated soils. *J Soil Sci*. **38**:71-77.

Moody J.D., Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. (2001) Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium sp.* Strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*. **67**:1476-1483.

Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European J Soil Sci*. **54**:655-670.

Organization for Economic Co-operation Development (OECD). (2000) Guideline for Testing Organic Chemicals. Proposal for New Guideline: Earthworms Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*). <http://www.oecd.org>.

Ortiz Bernad I., Sanz García J., Dorado Valiño M., Villar Fernández S. (2007) Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Informe de Vigilancia Tecnológica. Elec Industria Gráfica.

Abioye, O.P. (2011) Cap 7 Biological Remediation of Hydrocarbon and Heavy Metals Contaminated Soil. In: Pascucci S (eds). *Soil contamination*. Vol 1.

- Paul E.A. Clark F.E. (1996) Soil microbiology and biochemistry. Second edition. Academic press.
- Rajiv K., Sinha R.K., Bharambe G., Ryan D. (2008) Converting wasteland into wonderland by earthworms—a low-cost nature's technology for soil remediation: a case study of vermiremediation of PAHs contaminated soil. *Environmentalist* **28**:466-475.
- Rasol C. (1994) Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. Chapman & Hall (Ed) pp: 92, 94, 101.
- Reichenberg F., Mayer P. (2006) Two complementary sides of bioavailability: accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environ Toxicol Chem.* **25**:1239-1245.
- Rossini, D. (1960) Heats of combustion and formation of naphthalene, the two methyl naphthalenes, cis and trans-decahydronaphthalene, and related compounds. *J physical Chem.* **64**:1723-1727.
- SAS Institute. (1989) Statistic Guide for Personal Computers. Version 6.04. SAS Institute, Cary (Eds).
- Sabroso González, M.C., Pastor E.A. (2004) Guía sobre suelos contaminados. Gobierno de Aragón. Departamento de Economía, Hacienda y Empleo.
- Saghir S.A., Bartels M.J., Budinsky R.A., Harris E.E., Clark A.J., Staley J.L., Chai Y., Davis J.W. (2007) Effect of organic carbon content, clay type, and aging on the oral bioavailability of hexachlorobenzene in rats. *Environ Toxicol Chem.* **26**(11): 2420-2429.
- Schaefer M. (2003) Behavioral endpoints in earthworm ecotoxicology. Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *Soils Sediment.* **3**:79-84.
- Schaefer M., Filser J. (2007). The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated. *Soil Appl Soil Ecol.* **36**:53-62.
- Schaefer M., Peterson S.O., Filser J. (2005) Effects of *Lumbricus chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biol Biochem.* **37**:2065-2076.
- Song J., Fang-Jie Z., McGrath S.P. Yong-Ming L. (2006) Influence of soil properties and aging on arsenic phytotoxicity. *Environ Toxicol Chem.* **25**(6):1663-1670.
- Song Y.F, Ou Z.Q., Sun T.H., Yediler A., Lorinci G., Kettrup A. (1995) Analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and plants samples. *Chin. J. Appl. Ecol.* **6**:92-96.
- Steinberg S.M., Pignatello J.J., Sawhney B.L. (1987) Persistence of 1,2-dibromoethane in soils: entrapment in intraparticle micropores. *Environ Sci Technol.* **21**:1201-1208.
- Stelmack P.L., Gray M.R., Pickard M.A. (1999) Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl Environ Microbiol.* **65**(1):163-168.
- Stokes J.D., Paton G.I. Semple K.T. (2006) Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. *Soil Use Manage.* **21**:475-486.

- Stom D., Potapov D., Balayan A., Matveeva O. (2003) Transformation of oil in soil by a microbial preparation and earthworms. *Eurasian Soil Sci.* **36**:329-31.
- Tejada M., Masciandaro G. (2011) Application of organic wastes on a benzo(a)pyrene polluted soil. Response of soil biochemical properties and role of *Eisenia fetida*. *Ecotox Environ Safe.* **74**:668-674.
- Tejada M. (2009) Application of different organic wastes in a soil polluted by cadmium: Effects on soil biological properties. *Geoderma* **153**:254-268.
- Tomoko Y., Koki T., Hiroaki S. (2005) Enhanced bioremediation of oil-contaminated soil by a combination of the earthworm (*Eisenia fetida*) and tea extraction residue. *Edaphologia* **77**:1-9.
- Tsibart A.S., Gennadiev A.N. (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: sources, behavior, and indication significance (a review). *Eurasian Soil Sci.* **46**(7):728-741.
- Vázquez-Núñez E., Rodríguez V., García-Gaytán A., Luna-Guido M., Betancur-Galvis A., Marsch R., Dendooven L. (2009) Using acetone as solvent to study removal of anthracene in soil inhibits microbial activity and alters nitrogen dynamics. *Arch Environ Contam Toxicol.* **57**:239-46.
- Vázquez Núñez, E. (2010) Análisis molecular de las poblaciones microbianas en un suelo agrícola al contaminarse con antraceno y la participación de factores físicos involucrados en su remoción. Tesis de Doctorado, Depto. De Biotecnología, CINVESTAV-IPN, México D.F.
- Viñas S.M., Sabaté J., Espuny M.S., Solanas A.M. (2005) Bacterial Community Dynamics and Heavily Creosote-Contaminated Soil Degradation during Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. *Appl Environ Microbiol.* **71**(11):7008-7018.
- Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo J.A. (2002) Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (Ed) pp 15-30.
- Yang Y., Zhang N., Xue M., Tao S. (2010) Impact of soil matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *Environ Pollut.* **158**:2170-2174.
- Zeng J., Lin X., Zhang J., Li X. (2010) Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium spp.* and the degradation in soil. *J Hazard Mater.* **183**:718-723.



## **Anexos**

Se anexan los artículos publicados de las dos etapas del trabajo:

1. "Removal of anthracene from recently contaminated and aged soils". *Water Air Soil Pollut.* (2013). 224:1420.
2. "Mixing of anthracene-contaminated soil: A simple but efficient remediation technique?" *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013 (96) 238:241.

## Removal of Anthracene from Recently Contaminated and Aged Soils

Laura Delgado-Balbuena · Elda M. Romero-Tepal ·  
Marco L. Luna-Guido · Rodolfo Marsch · Luc Dendooven

Received: 17 July 2012 / Accepted: 18 December 2012  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** Remediation of anthracene from soil was faster in the topsoil than in the lower layers. It was not clear whether this was due to a higher anthracene bioavailability or an increased microbial degradation in the topsoil layer. Therefore, an arable soil was contaminated with 500 mg anthracene kg<sup>-1</sup> dry soil, and its removal was monitored with an exhaustive technique and with *n*-butanol to determine its bioavailability in three layers. Additionally, part of the contaminated soil was stored aerobically for 112 days (considered the aged soil), and the anthracene was monitored thereafter. After 112 days, 360 mg anthracene kg<sup>-1</sup> was removed from the soil, but its dissipation was not affected by the layer, depth, and fluctuations in water content or the interaction between. In the aged soil stored for 112 days, only 170 mg anthracene kg<sup>-1</sup> was removed. In the subsequent incubation of the aged soil, 273 mg anthracene kg<sup>-1</sup> was removed within 28 days, and after 112 days, no contaminant was detectable in the soil. An additional experiment confirmed the hypothesis that simply mixing the soil accelerated the removal of anthracene. Mixing the soil every 7 days removed all anthracene from the soil within 28 days, while in the undisturbed soil, 301 mg anthracene kg<sup>-1</sup> was still

extractable. It can be concluded that mixing the soil accelerated the removal of anthracene, but fluctuations in water content did not. The anthracene extracted with *n*-butanol was not related to the amount removed and is thus not a good indicator of bioavailability of anthracene in soil.

**Keywords** Drying and wetting of soil · Exhaustive extraction technique · *n*-Butanol · Soil profile · Soil mixing

### 1 Introduction

Different factors control the removal of hydrocarbons from soil (i.e., soil properties, characteristics of the contaminant, and the soil microbial population) (Chung and Alexander 2002; Stroud et al. 2007). It is well known that soil microorganisms are capable of degrading petroleum (Van Hamme et al. 2003; Haritash and Kaushik 2009). Even the most recalcitrant components, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), are removed from soil (Haritash and Kaushik 2009). However, the more complex the PAH is (i.e., the higher the number of aromatic rings), the lower its removal rate from soil (Stroud et al. 2007). For instance, phenanthrene, a three aromatic-ring PAH, is removed faster from soil than benzo[*a*]pyrene which has five aromatic rings (Stroud et al. 2007; Owabor et al. 2010). Extreme soil conditions, such as low or high pH or extreme salt or heavy metal

L. Delgado-Balbuena · E. M. Romero-Tepal ·  
M. L. Luna-Guido · R. Marsch · L. Dendooven (✉)  
Laboratory of Soil Ecology, ABACUS, Cinvestav,  
México D.F., México  
e-mail: dendooven@me.com

content, and lack of nutrients (e.g., N or P) might inhibit microbial activity and consequently the removal of PAHs from soil. However, even in an N-depleted soil with a high pH and high electrolytic conductivity, anthracene, phenanthrene, and benzo[*a*]pyrene removal was not impeded (Betancur-Galvis et al. 2006).

Soil characteristics are also known to affect the bioavailability of PAHs and thus their removal from soil (Chung and Alexander 2002). PAHs are known to be sequestered in soil as they are fixed on the soil matrix, physically stabilized within soil aggregates, or react with soil organic material making them inaccessible for soil microorganisms (Swindell and Reid 2006; Yang et al. 2010). As such, aging of contaminated soil might reduce the amount of the pollutant and will limit its removal from soil (White et al. 1999; Nam and Alexander 2001).

In a previous study, it was found that applying a drying–wetting cycle to soil accelerated the removal of anthracene from the 0–2-cm layer compared to the 2–12- and 12–22-cm layers (Vázquez-Núñez et al. 2009). It was speculated that fluctuations in water content, most accentuated in the topsoil layer, liberated some of the sequestered anthracene from soil, thereby stimulating its removal. If this hypothesis is correct, then the bioavailability of the contaminant will be higher when the water content fluctuated freely than when it did not. To test this hypothesis, soil columns were contaminated with anthracene, left to age or not while the soil water content was allowed to fluctuate or was kept constant. The concentration of anthracene was measured with an exhaustive technique to determine its removal (Song et al. 1995) and with a non-exhaustive extraction method to determine its bioavailability (Liste and Alexander 2002). The objective of this research was to determine (1) if anthracene extracted with *n*-butanol correlated well with its removal from soil, (2) if fluctuating water content affected the dissipation of anthracene from soil, and (3) if aging of the soil affected the dissipation of the contaminant in different soil layers.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Chemicals Used

Anthracene with purity >98 % was obtained from Sigma-Aldrich (USA). Acetone with purity >99.7 %

and *n*-butanol with purity >99.4 % were obtained from I.T. Baker (USA).

### 2.2 Sampling Site, Collection, and Characterization of Soil

Soil was collected in Otumba, State of Mexico, Mexico (NL 19°42', WL 98°49'). Details of the sampling site can be found in the study of Méndez-Bautista et al. (2010). Soil was sampled at random by augering the 0–15-cm top layer of five plots of approximately 0.5 ha. The soil from each plot was pooled, and as such, a total of five soil samples were obtained. This field-based replication was maintained in the incubation study. The sandy loam soil with pH 7.6 and EC 1.15 dS m<sup>-1</sup> had an organic C content of 7.2 g C kg<sup>-1</sup> and a particle size distribution of 870 g kg<sup>-1</sup> sand, 90 g kg<sup>-1</sup> clay, and 40 g kg<sup>-1</sup> silt, all on a dry matter base.

### 2.3 First Experiment: Effect of Fluctuating Water Content, Soil Depth, and Aging

Twenty-one grams of anthracene was dissolved in 2 L acetone, and this solution was added to the 42-kg soil from each sample ( $n=5$ ), resulting in a final concentration of 500 mg anthracene kg<sup>-1</sup> dry soil. This concentration allows the study of the removal of anthracene from soil and the factors controlling it (Contreras-Ramos et al. 2006, 2008, 2009). The soil was placed under vacuum in a desiccator for 30 min so that the acetone was removed from the soil. A first factor that was studied was the effect of aging on the removal of anthracene from the soil. Half of the contaminated soil of each plot ( $n=5$ ) was added to 18 L polyvinyl chloride (PVC) recipients and stored in PVC drums for 112 days (i.e., considered the “aged” soil). The PVC drums contained a 500-mL recipient with 1 M NaOH to trap the CO<sub>2</sub> evolved and distilled water to avoid desiccation of the soil samples. Every week, the PVC drums were opened and aired for 10 min to avoid anaerobic conditions in the soil. The 500-mL 1 M NaOH was replaced each month.

The other half of the soil was used immediately to study the effect of depth on the dissipation of anthracene from the soil (i.e., this was considered the “newly contaminated” soil). The soil was added to PVC tubes (diameter 10.5 cm) of three different lengths. A first set of five PVC tubes which were 10 cm long was



filled with 1.5 kg of soil so that a soil layer of 5 cm was obtained; a second set of five PVC tubes which were 60 cm long was filled with 3 kg of soil so that a soil layer of 10 cm was obtained; a third set of five PVC tubes which were 60 cm long was filled with 6 kg of soil so that a soil layer of 20 cm was obtained. A third factor, fluctuating water content, was studied by covering half of the PVC columns with perforated aluminum foil so that aeration occurred and fluctuations in water content were small. As such, the water content in the soil could fluctuate freely in half of the columns (i.e., columns that were not covered), and in the other half of the columns, water content of the soil was preserved by preventing evaporation.

Every other day in the evening at around 6 p.m., 2 g of soil was taken from each soil layer, weighted, and dried overnight at 100 °C. The next morning, the soil was weighted, the water content calculated, and the soil column adjusted to 50 % WHC as determined at the onset of the experiment when necessary. The soil columns were placed in a greenhouse. After 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56, and 112 days, a soil sample was taken from the 0–5-cm layer of each of the columns (three samples), 5–10-cm layer (two samples), and 10–20-cm layer (one sample). Each sample from the different soil layers was analyzed for anthracene extracted with an exhaustive method and with *n*-butanol. The experimental procedure described above was applied also to the soil that was stored in PVC drums for 112 days (i.e., the aged soil).

#### 2.4 Second Experiment: Soil Mixing

In the soil stored for 112 days, the concentration of anthracene (306 mg anthracene kg<sup>-1</sup> dry soil) was significantly larger than that in the soil which was incubated for 112 days (169 mg anthracene kg<sup>-1</sup> dry soil). The only difference between the two soils was the fact that the latter was disturbed when soil samples were taken, while the former was left undisturbed during storage. To test the hypothesis that soil disturbance had an important impact on the removal of anthracene, the following treatments were applied to the soil.

Thirty-two subsamples of 15 g of dry soil from each soil sample (*n*=5) were added to 120-mL glass flasks, spiked with 500 mg anthracene kg<sup>-1</sup> dry soil, and the acetone was removed from the soil as described in the first experiment. Four different treatments were applied to the anthracene-contaminated soil. The first 8 soil

samples were mixed every 7 days for 2 min, the second 8 soil samples were mixed every 14 days for 2 min, and the third 8 soil samples were mixed every 28 days for 2 min, while the remaining 8 soil samples were not mixed and served as a control. The 120-mL flasks were placed in 1-L glass jars containing 10 mL distilled water to avoid desiccation of the soil and a 25-mL glass flask containing 20 mL 1 M NaOH to trap the evolved CO<sub>2</sub>. The glass jars were airtight sealed and incubated for 112 days. After 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56, and 112 days, one glass jar from each treatment was selected at random and opened, and the soil was analyzed for anthracene as described earlier. Every week, all glass jars were aired for 5 min to avoid anaerobic conditions in the soil.

#### 2.5 Soil Chemical Analysis

Concentration of anthracene in the soil was analyzed using an exhaustive ultrasonic extraction method developed by Song et al. (1995). Details of the technique used can be found in the study of Contreras-Ramos et al. (2008).

Bioavailability of anthracene in the soil was determined using a non-exhaustive extraction with *n*-butanol (Liste and Alexander 2002). The 10-g subsample of soil was extracted with 15 mL *n*-butanol and shaken for 5 min. The soil-*n*-butanol mixture was left to stand for 30 min and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The supernatant was decanted and evaporated in the dark under a continuous airflow at room temperature for 48 h. Two milliliters of acetone was added to the residue and analyzed for anthracene. A solution of *n*-butanol with a known concentration of anthracene was used to determine the amount of anthracene that was lost during the procedure at each sampling day. Although, the amount of anthracene lost during the procedure was <2 %, the data reported were adjusted for these small losses.

#### 2.6 Statistical Analyses

For the first experiment, concentrations of anthracene were subjected to an analysis of variance using PROC GLM (SAS 1989) to test for significant differences between soil depth (columns of 5, 10, or 20 cm), soil layer (0–5, 5–10, and 10–20 cm) and treatment (open versus closed columns), and their interactions. For the second experiment, concentrations of anthracene were subjected to an analysis of variance using PROC GLM

(SAS 1989) to test for significant differences between different times of mixing (every 7, 14, and 28 days or never).

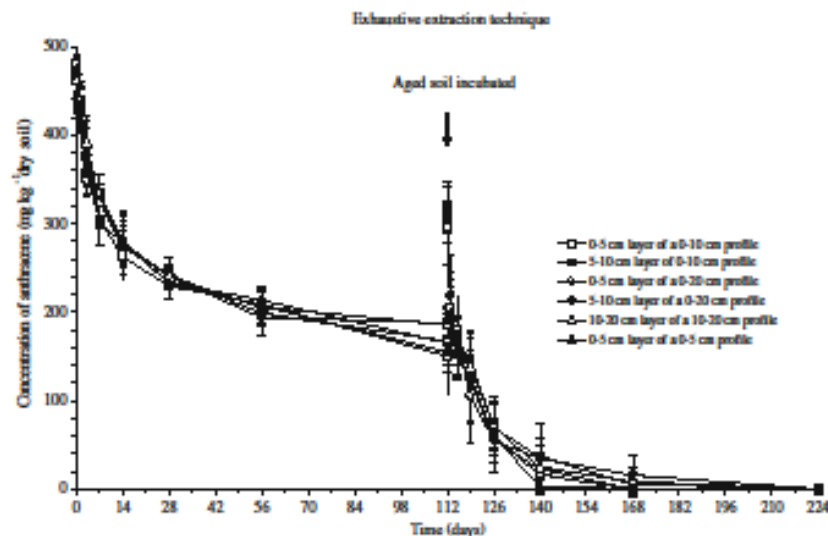
### 3 Results

#### 3.1 Experiment 1: Removal of Anthracene from Recently and Aged Contaminated Soils

Just after contaminating the soil,  $93.7 \pm 3.7$  % of the added 500-mg anthracene was extracted from the soil with the exhaustive technique (Fig. 1; Table 1). The removal of anthracene was most accentuated in the beginning, and half of the added anthracene was dissipated from the soil within 28 days. After 112 days, 66 % of the anthracene added was removed from the soil (Fig. 1; Table 1). The removal of anthracene from the soil was not significantly affected by the layer or depth of the soil profile (Fig. 1). The amount of anthracene removed from the covered soil (i.e., soil in which fluctuations in water content were prevented) was the same as that in the open soil (i.e., soil in which the water content fluctuated freely) (data not shown).

Just after contaminating the soil,  $68.6 \pm 8.6$  % of the added 500-mg anthracene was extracted from the soil with *n*-butanol (Fig. 2; Table 1). The decrease in the amount of anthracene as determined with *n*-butanol was near linear. After 112 days, only  $18.1 \pm 10.0$  % of the anthracene added was recovered with *n*-butanol from the soil (Fig. 2; Table 1). The removal of anthracene from the soil was not significantly affected by the layer or depth of the soil profile (Fig. 1).

In the aged soil (i.e., stored for 112 days),  $304 \pm 22$   $\text{mg kg}^{-1}$  or  $60.8 \pm 8.6$  % of the added 500-mg anthracene was extracted from the soil with the exhaustive technique (Fig. 1; Table 1). During the subsequent aerobic incubation, the removal of anthracene from the aged soil followed a similar pattern as found when the soil was freshly contaminated as most of the anthracene was removed within 28 days ( $273$   $\text{mg kg}^{-1}$ ). However, after 112 days, no anthracene was extractable from the aged soil. The removal of anthracene from the aged soil was not affected significantly by the layer or depth of the soil profile or fluctuations in water content. The amount of anthracene removed from the covered aged soil (i.e., soil in which fluctuations in water content were prevented) was the same as



**Fig. 1** Concentration of anthracene ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) in the 0–5-cm layer of a 0–5-cm soil profile (filled triangle), in the 0–5-cm (empty square) and 5–10-cm (filled square) layers of a 0–10-cm soil profile, and in the 0–5-cm (empty circle), 5–10-cm (filled circle), and 10–20-cm layers (empty triangle) of a 0–20-cm soil

profile as extracted with an exhaustive extraction technique for soil incubated at  $22 \pm 2$  °C for 112 days in which the water content fluctuated or for soil spiked with anthracene, conditioned for 112 days (aged soil), and incubated in which the water content fluctuated for 112 days. Bars are  $\pm 1$  standard deviation

**Table 1** Percentage of anthracene extracted with an exhaustive technique and with *n*-butanol just after application of the contaminant (day 0) and after 112 days, and in soil conditioned for 112 days and then incubated aerobically for 112 days

Extraction technique	Day 0 (%)	Day 112 (%)	Aged soil, conditioned for 112 days	
			Day 0 (%)	Day 112
Exhaustive	93.7±3.7 <sup>a</sup>	34.0±5.9	60.8±4.5	0
<i>n</i> -Butanol	68.6±8.6	18.1±10.0	51.6±4.8	0

<sup>a</sup> Values are means ± standard deviations ( $P < 0.05$ )

that in the open aged soil (i.e., soil in which the water content fluctuated freely) (data not shown).

In the aged soil stored for 112 days, 51.6±4.8 % of the added 500-mg anthracene was extracted from the soil with *n*-butanol (Fig. 2; Table 1). The decrease in the amount of anthracene extractable with *n*-butanol was faster in the aged than in the newly contaminated soil. After 56 days, no anthracene was extractable with *n*-butanol from the aged soil.

### 3.2 Experiment 2: Removal of Anthracene from a Soil Mixed Regularly

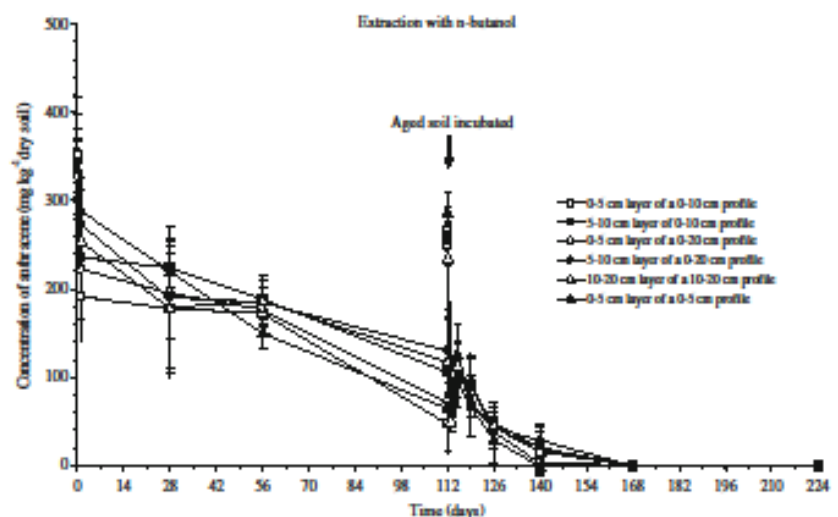
The amount of anthracene extracted with the exhaustive technique was similar in the different treatments until day 7 (Fig. 3a). From day 14 onwards, the anthracene extracted was lower in the soil mixed every 7 days than in the other treatments, and already after 28 days, no anthracene was detectable in the soil mixed every week. From day 28 onwards, the amount

of extractable anthracene was lower in the soil mixed every 14 days than in the unmixed soil and the soil mixed every 28 days, and after 56 days, no anthracene was detectable in the soil mixed every 14 days. In the soil mixed every 28 days, the concentration of anthracene was significantly lower than that in the unmixed soil after 56 days, and after 112 days, no anthracene was detected. In the unmixed soil, 210 mg anthracene  $\text{kg}^{-1}$  was still extractable after 112 days. The extractability of anthracene from the regularly mixed or unmixed soil was similar when an exhaustive method or *n*-butanol was used, but the amount was generally lower in the latter than in the former (Fig. 3b).

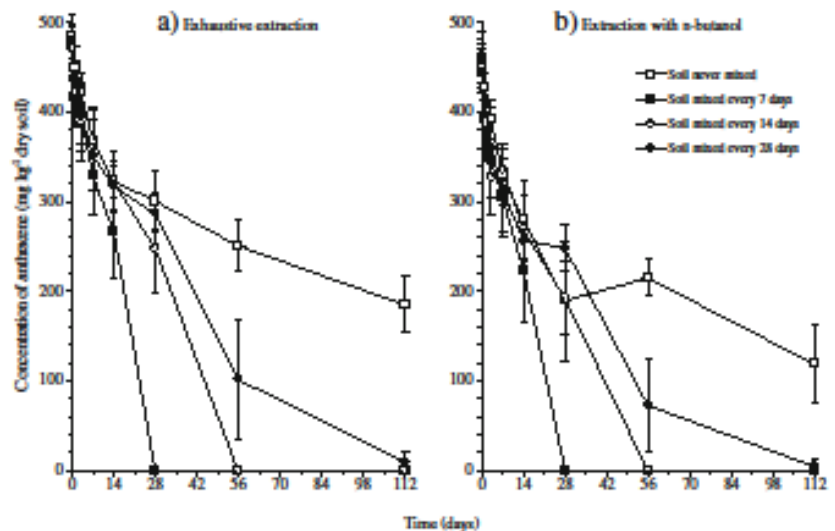
## 4 Discussion

The amount of anthracene recovered with the exhaustive technique was 94 %. Similar results have been reported in literature. Fernández-Luqueño et al. (2008,

**Fig. 2** Concentration of anthracene ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) extracted with *n*-butanol for soil incubated at  $22 \pm 2$  °C for 112 days in which the water content fluctuated or for soil spiked with anthracene, conditioned for 112 days (aged soil), and incubated in which the water content fluctuated for 112 days. Legends can be found in Fig. 1. Bars are  $\pm 1$  standard deviation



**Fig. 3** Concentration of anthracene ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) in soil never mixed (*empty square*) or mixed every 7 days (*filled square*), every 14 days (*open circle*), or every 28 days (*filled circle*) as extracted with a) an exhaustive technique or b) *n*-butanol incubated for 112 days. Bars are  $\pm 1$  standard deviation



2009) reported 93 % for recovery, Contreras-Ramos et al. (2006, 2008) 94 %, and Álvarez-Bernal et al. (2006) 96 %.

The removal of anthracene from the agricultural soil followed a well-described pattern, with most of the dissipation occurring in the first 28 days. Hamdi et al. (2007) reported similar results as the fastest removal of anthracene from soil occurred in the first 30 days of a 120-day incubation. Rhykerd et al. (1999) also found that the most rapid rate of remediation occurred during the first 12 weeks, and by week 30, 90 % of the polycyclic hydrocarbon (TPH) was degraded. Hamdi et al. (2007) reported that 63 % of the applied anthracene was removed within 120 days. In the experiment reported here, similar amounts of anthracene (66 %) were removed from the soil after 112 days. In other studies, even larger amounts were removed: Betancur-Galvis et al. (2006) reported a removal of 84 % and Fernández-Luqueño et al. (2008) a removal of 85 % after 112 days. Fernández-Luqueño et al. (2009) found, however, that only 49 % of anthracene was removed in an alkaline-saline soil after 112 days. Differences in soil characteristics might explain these differences in the removal of PAHs from soil (Lima et al. 2011).

The amount of anthracene recovered with *n*-butanol was 68.6 % at the onset of the experiment. Larger amounts extracted with *n*-butanol have been reported by Nam and Alexander (2001). They recovered 98.7 and 104.8 % phenanthrene from soils incubated at 4 and 21 °C, respectively. However, White et al. (1999)

reported that only 6.9–35.8 % of the added phenanthrene was extractable with *n*-butanol from a silt loam soil and 9.3–35.5 % from peat soil. As mentioned before, differences in extractability are defined by the extraction method, the nature and concentration of the contaminant, and the soil characteristics.

Fluctuating water content or depth of the soil profile did not affect the removal of anthracene from both the recently contaminated or aged soil. In a previous experiment, the fluctuations in water content stimulated the removal of anthracene from the top 0–2-cm soil layer, but not from the lower soil layers (Vázquez-Núñez et al. 2009). However, manipulating the soil (i.e., sampling) did accelerate the removal of anthracene from the soil. The soil that was aged for 112 days was not disturbed. After 112 days of aging,  $304 \pm 22$  mg anthracene  $\text{kg}^{-1}$  was detected in the soil. However, in the incubated and regularly sampled soil, only  $170 \pm 30$  mg  $\text{kg}^{-1}$  was found. As such, sampling the soil (i.e., disturbing it) removed an additional 130 mg anthracene  $\text{kg}^{-1}$ . The dynamics of anthracene in the “newly” contaminated soil suggested that the removal of anthracene after 112 days would be slow or non-existent (Fig. 1). However, manipulating the aged soil (i.e., adding it to the PVC columns and sampling it) induced an immediate removal of anthracene that was similar to that in the just-contaminated soil, and all the anthracene detected in the aged soil at time 0 (i.e.,  $304 \pm 22$  mg anthracene  $\text{kg}^{-1}$ ) was removed within 56 days.

The idea that mixing the soil accelerated the removal of anthracene from the soil was confirmed in the second experiment. Mixing the soil every 7 days removed all anthracene from the soil after 28 days, while in the undisturbed soil, 301 mg anthracene kg<sup>-1</sup> soil was still extractable. This indicated clearly that microorganisms in the soil are perfectly capable of removing anthracene from the soil, but that availability of the contaminant affects its dissipation. Simply mixing the soil increased the bioavailability of anthracene. Mixing alters soil physical and chemical properties; breaks aggregates apart; redistributes carbon, nitrogen, and water; and exposes organic carbon and nutrients, which will stimulate microbial activity (Doran 1982; Melope et al. 1987). It is clear, however, that soil characteristics will affect the removal of anthracene and that even mixing might not accelerate the removal of a contaminant.

The anthracene extracted with *n*-butanol is considered to be related to its bioavailability. However, in the experiment reported here, that relationship is questionable. For instance, the amount of anthracene extracted with *n*-butanol had a slower decrease than the amount removed from the soil. As such, the ratio between the anthracene removed from the soil and that which was extractable with *n*-butanol changed over time. Additionally, at the onset of the experiment with the aged soil, the amount of anthracene that was extractable with *n*-butanol was 258±24 mgkg<sup>-1</sup>, while the total amount as determined with the exhaustive technique was 304±22 mgkg<sup>-1</sup>. All the anthracene detected in the aged soil at time 0 was removed from the soil. As such, 46 mgkg<sup>-1</sup> was removed which was not extractable with *n*-butanol.

## 5 Conclusion

In the experiment reported here, the capacity of the microbial population to degrade PAHs was not the limiting factor in the removal of anthracene, but the bioavailability of the contaminant. The bioavailability of the contaminant was increased by soil manipulation, but not by fluctuating water content. The amount of the contaminant that was extracted with *n*-butanol did not correlate with the amount of PAHs removed from the soil. As such, extraction of anthracene with *n*-butanol was not related to its bioavailability in this soil.

Consequently, if a soil is contaminated with PAHs, regular mixing with an adequate aeration will maximize the removal of the contaminant. Minimizing soil depth and maintaining an adequate water content will further stimulate dissipation of PAHs. Application of nutrients (i.e., N and P) might be required to stimulate microbial activity when the soil is contaminated with large amounts of hydrocarbons as they are characterized by low N and P contents.

**Acknowledgments** E. V-N received grant-aided support from "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" (CONACyT, México). The research was funded by Cimvestav (México).

## References

- Álvarez-Bernal, D., García-Díaz, E. L., Contreras-Ramos, S. M., & Dendooven, L. (2006). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost. *Chemosphere*, *65*, 1642–1651.
- Betancur-Galvis, L. A., Álvarez-Bernal, D., Ramos-Valdivia, A. C., & Dendooven, L. (2006). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soil of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, *62*, 1749–1760.
- Chung, N., & Alexander, M. (2002). Effect of soil properties on bioavailability and extractability of phenanthrene and atrazine sequestered in soil. *Chemosphere*, *48*, 109–115.
- Contreras-Ramos, S. M., Álvarez-Bernal, D., & Dendooven, L. (2006). *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution*, *141*, 396–401.
- Contreras-Ramos, S. M., Álvarez-Bernal, D., & Dendooven, L. (2008). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). *Soil Biology and Biochemistry*, *40*, 1954–1959.
- Contreras-Ramos, S. M., Álvarez-Bernal, D., & Dendooven, L. (2009). Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with wastewater sludge or vermicompost. *Applied Soil Ecology*, *41*, 269–276.
- Doran, J. W. (1982). Tilling changes soil. *Crops and Soils*, *34*, 10–12.
- Fernández-Luqueño, F., Marsch, R., Espinosa-Victoria, D., Thalasso, F., Hidalgo-Lara, M. E., Munive, A., et al. (2008). Remediation of PAHs in a saline-alkaline soil amended with wastewater sludge and the effect on dynamics of C and N. *Science of the Total Environment*, *40*, 218–228.
- Fernández-Luqueño, F., Thalasso, F., Luna-Guido, M. L., Ceballos-Ramírez, J. M., Ordoñez-Ruiz, I. M., & Dendooven, L. (2009). Flocculant in wastewater affects dynamics of inorganic N and accelerates removal of phenanthrene and anthracene in soil. *Journal of Environmental Management*, *90*, 2813–2818.



- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I., & Jedidi, N. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*, 1926–1935.
- Harithash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, *169*, 1–15.
- Lima, A. T., Kleingeld, P. J., Heister, K., & Loch, J. P. G. (2011). Removal of PAHs from contaminated clayey soil by means of electro-osmosis. *Separation and Purification Technology*, *79*, 221–229.
- Liste, H. H., & Alexander, M. (2002). Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere*, *46*, 1011–1017.
- Melope, M. B., Grieve, I. C., & Page, E. R. (1987). Contribution by fungi and bacteria to aggregate stability of cultivated soils. *Journal of the Soil Science*, *38*, 71–77.
- Méndez-Bautista, J., Fernández-Luqueño, F., López-Valdez, F., Mendoza-Cristino, R., Montes-Molina, J. A., Gutierrez-Miceli, F. A., et al. (2010). Effect of pest controlling neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) and mata-raton (*Gliricidia sepium* Jacquin) leaf extracts on green house gases emission from soil cultivated with bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a greenhouse experiment. *Science of the Total Environment*, *408*, 4961–4968.
- Nam, K., & Alexander, M. (2001). Relationship between biodegradation rate and percentage of a compound that becomes sequestered in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, *33*, 787–792.
- Owabor, C. N., Ogbeide, S. E., & Susu, A. A. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: model simulation for bioavailability and biodegradation. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *88*, 268–276.
- Rhykerd, R. L., Crews, B., McInnes, K. J., & Weaver, R. W. (1999). Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Bioresource Technology*, *67*, 279–285.
- SAS Institute. (1989). *Statistic guide for personal computers* (Version 604th ed.). Cary: SAS Institute.
- Song, Y. F., Ou, Z. Q., Sun, T. H., Yediler, A., Lorinci, G., & Ketrup, A. (1995). Analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and plants samples. *Chinese Journal of Applied Ecology*, *6*, 92–96.
- Stroud, J. L., Paton, G. I., & Semple, K. T. (2007). Importance of chemical structure on the development of hydrocarbon catabolism in soil. *Federation of European Microbiological Societies*, *272*, 120–126.
- Swindell, A. L., & Reid, B. J. (2006). Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. *Chemosphere*, *62*, 1126–1134.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 503–549.
- Vázquez-Núñez, E., Rodríguez, V., García-Gaytán, A., Luna-Guido, M., Betancur-Galvis, A., Marsch, R., et al. (2009). Using acetone as solvent to study removal of anthracene in soil inhibits microbial activity and alters nitrogen dynamics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *57*, 239–246.
- White, J. C., Hunter, M., Nam, K., Pignatello, J. J., & Alexander, M. (1999). Correlation between biological and physical availabilities of phenanthrene in soils and soil humin in aging experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*(8), 1720–1727.
- Yang, Y., Zhang, N., Xue, M., & Tao, S. (2010). Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *Environmental Pollution*, *158*, 2170–2174.



## Mixing of an anthracene-contaminated soil: A simple but efficient remediation technique?



Laura Delgado-Balbuena, Ángel R. Aguilar-Chávez, Marco L. Luna-Guido, Luc Dendooven\*

Laboratory of Soil Ecology, Abacus, Cinvestav, México D.F, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 April 2013

Received in revised form

26 June 2013

Accepted 28 June 2013

Available online 27 July 2013

#### Keywords:

Biodegradation

Earthworms

Soil mixing

Surfactants

### ABSTRACT

Contamination of soils with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is a serious problem in petroleum producing countries, such as México, and environment-friendly easy to apply techniques are required to accelerate the removal of the contaminants. Removal of anthracene was monitored in an arable and a pasture soil regularly mixed or amended with organic material, a non-ionic surfactant (Surfynol® 485) or earthworms (*Eisenia fetida* (Savigny, 1826)). In both soils the same results were obtained although the removal of anthracene was faster from the pasture than from the arable soil. The fastest removal of anthracene was obtained when the soil was mixed every 7 days and no contaminant was detected in both soils after 56 days. The second fastest removal of anthracene was obtained when earthworms were added to soil and no contaminant was detected in both soils after 112 days. Application of organic material that served as feed for the earthworms also accelerated the removal of the contaminant compared to the unamended soil, but application of the surfactant inhibited the dissipation of the contaminant. Only 37% of the spiked anthracene was removed from soil when surfactant was applied, while 62% was dissipated in the unamended soil after 112 days. It was found that simply mixing a soil removed anthracene faster than when earthworms were applied, while the application of the surfactant inhibited the removal of anthracene by the autochthonous soil microorganisms.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of organic compounds with 2–13 aromatic rings. Some PAHs might be carcinogenic to humans and animals (Skupinska et al., 2004). The removal of PAHs from contaminated ecosystems is thus of great importance and different techniques have been applied to remediate hydrocarbon-contaminated soils (Khan et al., 2004). The choice of technology and remediation strategy depends on site conditions, contaminant, and the impact of the chosen technology (Khan et al., 2004). Remediation techniques are based on biological, physical, chemical, physicochemical methods or combinations of these (Van Hamme et al., 2003), but those commonly used include burying, evaporation, dispersion and washing. These technologies, however, are expensive and can lead to incomplete decomposition of contaminants (Das and Chandran, 2011), while affecting the soil microorganisms that degrade the contaminant.

Earthworms are perhaps the most important soil organisms in terms of their influence on soil properties (Udovic and Lestan, 2007). Earthworms are important processors of soil organic matter (SOM) and nutrient turnover in terrestrial ecosystems. In agroecosystems,

they are often seen as beneficial organisms to crop growth and actively promoted (Fonte et al., 2010). In soil they stimulate PAHs biodegradation, and by consuming organic matter, they may reduce adsorption of the contaminant, thereby increasing its bioavailability and removal from soil (Natal-Da-Luz et al., 2012).

Although some contaminants may be soluble in water, other inherent physicochemical properties make them particularly problematic, especially, water immiscibility. The use of surfactants to enhance the removal of soil contaminants has received increased attention in recent years. Surfactants are a class of natural and synthetic chemicals that promote the wetting, solubilization, emulsification and removal of various types of organic and inorganic contaminants from soil (Das and Chandran, 2011; Wang and Mulligan, 2004). Surfactants molecules may furthermore influence the dissolution or desorption process by attaching to the PAHs-water interface. They form hemi-micelles, which may accelerate the PAHs-release and subsequently their removal from soil (Johnsen et al., 2005).

In previous research, it was found that mixing a soil accelerated the removal of anthracene (Delgado-Balbuena et al., 2013). Mixing a soil liberates organic material, such as organic contaminants, as soil aggregates are broken-up so that contaminants become available for microbial degradation. Autochthonous soil microorganisms remove PAHs from soil (Das and Chandran, 2011; Khan et al., 2004; Qasemian et al., 2012) and bioremediation techniques

\* Corresponding author. Fax: +52 55 5747 3313.

E-mail address: [dendooven@me.com](mailto:dendooven@me.com) (L. Dendooven).

that increase the availability of a contaminant, such as mixing, will increase its dissipation. As part of a study into the techniques that remove PAHs from soil, four different methods were compared for their capacity to remove anthracene from soil. Anthracene was used as a model for PAH degradation in soil (Moody et al., 2001; Prasanna et al., 2008; Qasemian et al., 2012). However, removal of a three-ring PAHs is faster from soil than the dissipation of a five-ring PAHs such as benzo(a)pyrene (Álvarez-Bernal et al., 2006). Two soils (an arable and a pasture soil) were spiked with anthracene and amended with organic material (carrot, *Daucus carota* L.) that served as food for earthworms, the organic material plus the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), a non-ionic surfactant (Surfynol® 485) or mixed regularly while the removal of the contaminant was monitored in an aerobic incubation experiment. The objective of this research was to compare different strategies to remediate anthracene-contaminated soil and determine which technique might be the best to remove PAHs from soil.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals used

Anthracene with purity > 98% was obtained from Sigma-Aldrich (USA) and acetone with purity > 99.7% from JT Baker (USA). The non-ionic surfactant Surfynol® 485 was obtained from Air Products and Chemicals de México S.A. de C.V. (México). It is an ethoxylated molecule of 2,4,7,9-tetramethyl-5-decyl-4,7-diol with 30 mol of ethylene oxide (EO) per molecule ( $C_{26}H_{54}(OH)_2EO_{30}$ ) and a molecular weight of 1546 and a critical micelle concentration (CMC) of 112 mmol/L (Musaelman and Chandec, 2002).

### 2.2. Sampling site, collection and characterization of soil

Two soils were used in this study. One arable soil was collected in Otumba (State of México, México) (N.L. 19° 42', W.L. 98° 49'). Its average altitude is 2349 m a.s.l. and characterized by a sub-humid temperate climate with a mean annual temperature of 14.8 °C and average annual precipitation of 577 mm mainly from June to August (<http://www.inegi.gob.mx>). Details of the sampling site can be found in Méndez-Bautista et al. (2010). The sandy loam soil had a pH 7.6 and EC 115 dS/m and an organic C content of 7.2 g C/kg with a particle size distribution of 870 g/kg sand, 90 g/kg clay and 40 g/kg silt. The water holding capacity (WHC) was 650 g/kg soil.

The second was a pasture soil collected in Juchitán de Ferrer (State of Veracruz, México) (N.L. 19° 50', W.L. 96° 42'). The weather at the sampling site is warm with an average annual temperature of 25 °C. It is characterized by abundant precipitation in summer and early autumn averaging 1000 mm/y. The loamy sand soil with pH 5.9 and EC 1.0 dS/m had an organic C content 13.2 g C/kg and a particle size distribution of 721 g/kg sand, 42 g/kg clay and 237 g/kg silt. The WHC was 1130 g/kg soil.

Soil was sampled at random by augering 30 times the 0–15 cm top-layer of five plots of approximately 0.5 ha. The soil from each plot was pooled and as such a total of ten soil samples were obtained (five replicates of two soils). This field based replication was maintained in the laboratory study.

### 2.3. Experimental set-up

A total of 100 kg of each soil was contaminated with 500 mg anthracene/kg dry soil. Initially, 10 kg soil was spiked with 50 g anthracene dissolved in 4.7 L acetone and placed under vacuum in a desiccator for 30 min so that the acetone was removed from the soil. The 10 kg contaminated soil was then mixed with the remaining 90 kg soil. Five different treatments were applied to the anthracene-contaminated soil. In a first treatment, soil was amended with two adult *E. fetida* earthworms of 0.35 g obtained from INRECOL (Xalapa, Veracruz, México) and with a developed ciliellum. The earthworms were fed 60 g carrot every two weeks. In a second treatment, soil was amended with 60 g organic material (carrot) every two weeks. As such, the effect of the earthworms on the removal of anthracene could be differentiated from that of the organic material applied. In a third treatment, soil was mixed every 7 days for 10 min. In a fourth treatment, soil was amended with 24.9 g/kg soil surfactant Surfynol® 485 and mixed (Salomón-Hernández, 2012, unpublished M.Sc. thesis). In a fifth treatment, soil was left unamended and served as control so that remediation capacity of the autochthonous microorganisms could be determined.

Two hundred sub-samples of 500 g of both soils were added to polyvinyl chloride (PVC) tubes (diameter 10.5 cm, length 20 cm) containing a 5 cm layer of tezontle or porous volcanic rock. The amount of soil added to the PVC tubes was such that a 10 cm layer was obtained. The PVC columns were covered with perforated aluminium foil so that aeration was possible, but evaporation limited.

Each other day in the evening around 6:00 p.m., 2 g was taken from each treatment, weighted and dried overnight at 100 °C. The next morning, the dried soil was weighted, the water content calculated and the soil column adjusted to 60% WHC when necessary. The soil columns were placed in a greenhouse. After 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56 and 112 days, a 20 g soil sample was taken from each column and extracted for anthracene with an exhaustive extraction method (Song et al., 1995).

### 2.4. Soil chemical analysis

The concentration of anthracene in the soil was determined using a modified exhaustive ultrasonic extraction method described by Song et al. (1995). Briefly, a 1.5 g sub-sample of soil was mixed with 3 g anhydrous sodium sulphate to form a fine powder, placed in a Pyrex tube and 10 mL acetone was added. The mixture was mechanically shaken on a vortex for 1 min, and the tubes were placed in a sonicating bath at 30–40 °C for 20 min. The extracts were separated from the soil by centrifugation at 2000 g for 7 min. The whole process was repeated three times. The extracts were evaporated and dissolved in 1 mL acetone. Each sample was analyzed for anthracene on a Agilent Technology 4890-D (Pennsylvania, USA) fitted with a flame ionization detector.

A HP-5 column from Hewlett-Packard with length 15 m, inner diameter 0.53 mm, and film thickness 1.5 µm was used to separate the anthracene with carrier gas He flowing at a rate of 7 mL/min. The oven temperature at 140 °C was increased to 170 °C at a rate of 2 °C/min maintained at 170 °C for 5 min. The temperature of the injector was 280 °C and that of the detector was 300 °C. The detection limit of our GC analysis was 0.3 mg of anthracene per kg of dry soil. The amount of anthracene recovered with the exhaustive technique was 98%. Although the amount of anthracene lost during the procedure was < 2%, data were adjusted for these small losses.

### 2.5. Statistical analysis

Concentrations of anthracene were subjected to an analysis of variance using PROC GLM (SAS, 1989) to test for significant differences between the remediation techniques used. Repeated measurements, i.e. the sampling was non-destructive, was considered in the statistical analysis.

## 3. Results and discussion

The concentration of anthracene decreased in both the arable and pasture soil and approximately 190 mg anthracene/kg dry soil was still detected in the control treatment after 112 days (Fig. 1a, b). It is well known that autochthonous microorganisms remove PAHs from soil (Hosokawa et al., 2009). The decrease in anthracene over time also followed a well known pattern with most of the dissipation occurring in the first weeks of the incubation (Contreras-Ramos et al., 2008).

Application of surfactant is known to accelerate the removal of PAHs from soil, but not always (Paria, 2008; Singh et al., 2007). It is assumed that the surfactant increases the bioavailability of the hydrocarbon by a parallel action of desorption and solubilization of the contaminant, thereby favouring the removal of the contaminant (Christoff and Ivshina, 2002). In the study reported here, the surfactant inhibited the removal of the contaminant (Fig. 1a, b). After 112 days, more than half of the applied anthracene (approximately 300 mg anthracene/kg dry soil) was not removed from the soil amended with the surfactant. Several studies reported that biodegradation of PAHs in the presence of synthetic surfactants was inhibited (Paria, 2008; Singh et al., 2007). Different processes might explain a decrease in the removal of anthracene from the surfactant-amended soil. First, the surfactant might inhibit the microbial activity in soil or the surfactant might reduce the bioavailability of anthracene (Chen et al., 2000). Second, if the surfactant is highly biodegradable, then there might be competition between carbon sources, so that the degradation of the contaminant is inhibited (Makkar and Rockne, 2003). Third, the surfactant might increase the availability of the contaminant and

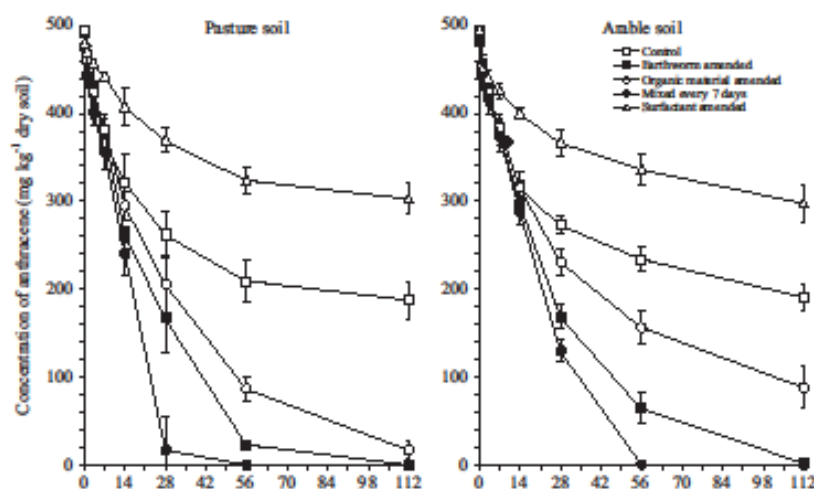


Fig. 1. Concentrations of anthracene (mg/kg dry soil) in the (a) unamended pasture soil or (b) in the unamended arable soil from Otumba (n), in soil amended with organic material (○), organic material and earthworms (■) or surfactant (△), or mixed every seven days (●). Soil was incubated at  $22 \pm 2$  °C for 112 days. Bars are  $\pm 1$  standard deviation.

the liberated pollutant might inhibit the microbial activity (Christofi and Ivshina, 2002). Application of a surfactant, however, does not always inhibit the removal of a contaminant from soil. For instance, Makkar and Rockne (2003) reported that an increased application of a surfactant increased the dissipation of anthracene from soil. Consequently, the effect of a surfactant on the removal of a contaminant will depend on the type of contaminant, soil characteristics and/or the microbial population (Paria, 2008).

Application of the organic material reduced the concentration of anthracene strongly in both soils compared to the unamended soil (Fig. 1). After 112 days, only 17 mg anthracene/kg remained in the pasture soil and 88 mg anthracene/kg in the arable soil. It can be hypothesized that the soil microbial activity was stimulated by the application of the organic material (Tejeda, 2009). Organic matter is an important contributor to biodegradation as it provides nutrients and provides C substrate to the microbial biomass (Bento et al., 2005; Contreras-Ramos et al., 2007). Increased microbial activity will release enzymes that might participate in the degradation of the contaminant from soil. The application of nutrients, especially N, to a hydrocarbon contaminated soil might increase its removal as petroleum is low in nutrients which might become a limiting factor in its biodegradation (Xu and Obbard, 2003).

The concentration of anthracene dropped sharply in the mixed soil and after 56 days no contaminant was detected (Fig. 1). It appears that simply mixing the soil increased the contact between the contaminant and the soil microorganisms. The increased availability of the anthracene combined with the capacity of the autochthonous microorganisms to metabolize the contaminant led to a near linear decrease of anthracene in soil. Additionally, mixing the soil will increase aeration and the degradation of PAH starts with oxidation of the contaminant, e.g. catalyzed by dioxygenases and monooxygenases (Das and Chandran, 2011). As such, a higher  $O_2$  content in soil as a result of mixing will accelerate the removal of anthracene from soil. A sharp drop in the concentration of the contaminant was also found in the earthworm-amended soil, but some anthracene was still detected after 56 days. After 112 days, however, all anthracene was removed from soil. The capacity of earthworms to accelerate the removal of PAHs from soil is well documented (Schaefer and Filser, 2007; Tomoko et al., 2005). The earthworms burrow through the soil. They move, aerate and mix the soil, and increase the contact between the microorganisms and

the contaminant (Ceccanti et al., 2006; Chaudhuri et al., 2012; Schaefer et al., 2005). Consequently, the microbial activity is stimulated and the removal of the contaminant accelerated. Rajiv et al. (2008) mentioned that the earthworms also have an effect on the structure of the bacterial and fungal communities when they pass through the earthworm gut, which might increase the removal of the contaminant. The contribution of the earthworms themselves in the degradation of the contaminants is still disputed as it is argued that the microorganisms in the gut are responsible for most of the dissipation (Hickman and Reid, 2008).

Both applying earthworms and mixing the soils are viable techniques to remove PAHs, such as anthracene, from soil. However, the cost of using earthworms and the difficulty to mix a soil adequately in the field might pose constraints on a wider application of both techniques. On the one hand, earthworms need a stable environment, without extreme high or low temperatures, preferentially near neutral pHs and sufficient moisture. They also need to be fed so as to maintain or increase their activity. Additionally, earthworms are expensive to cultivate or to purchase. For instance 1 kg of earthworms costs approximately 40 USD (Dendoven et al., 2011). On the other hand, it might be difficult to mix a soil thoroughly and successively in the field as was done in this laboratory study. However, mixing a soil weekly while at the same time incorporating organic material and maintaining an adequate soil water content so that microbial activity is not inhibited, might prove the least costly way to remediate a soil contaminated with PAHs.

The removal of anthracene was faster from the pasture than from the arable soil. The organic C content was nearly twice as high in the pasture soil than in the arable soil. Consequently, the higher C substrate in the pasture soil sustains a higher metabolic activity. This higher metabolic activity of the microbial organisms in the pasture soil will accelerate the removal of the contaminant from soil.

#### 4. Conclusion

The autochthonous microorganisms in the two soils degraded the anthracene efficiently, but applying organic material accelerated the removal of the contaminant. Application of earthworms

or mixing the soil regularly increased the dissipation of anthracene significantly compared to the unamended soil or soil applied with organic material, with the latter technique resulting in the fastest removal of the pollutant. The activity of the earthworms and mixing the soil increased the contact between the organic compound and the soil microorganisms, stimulating the removal of the anthracene. The application of the surfactant, however, inhibited the removal of anthracene.

### Acknowledgments

L. D-B. received grant-aided support from 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología' (CONACYT, México), while A.R. A-C. from 'Sistema Nacional de Investigadores' (SNI) (México). The research was funded by 'Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal' (ICTYDF, México).

### References

- Álvarez-Bernal, D., García-Díaz, E.I., Contreras-Ramos, S.M., Dendooven, L., 2006. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost. *Chemosphere* 65, 1642–1651.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.G., Oliele, R.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96, 1049–1055.
- Ceccanti, B., Masciandaro, G., García, C., Maci, C., Doni, S., 2006. Soil bioremediation: combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil. *Water Air Soil Pollut.* 17, 383–397.
- Chaudhuri, P.S., Pal, T.K., Nath, S., Dey, S.K., 2012. Effects of five earthworm species on some physico-chemical properties of soil. *J. Environ. Biol.* 33, 713–716.
- Chen, P., Picard, M.A., Gray, M.R., 2000. Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation* 11, 341–347.
- Christoff, N., Isthina, I.B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915–929.
- Contreras-Ramos, S.M., Álvarez-Bernal, D., Dendooven, L., 2007. Dynamics of nitrogen in a PAHs contaminated soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms. *Chemosphere* 67, 2072–2081.
- Contreras-Ramos, S.M., Álvarez-Bernal, D., Dendooven, L., 2008. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). *Soil Biol. Biochem.* 40, 1954–1959.
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res.* 2011, 1–13. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/948810>
- Delgado-Balbuena, L., Romero-Tepal, E.M., Luna-Guido, M.L., Marsch, R., Dendooven, L., 2013. Removal of anthracene from recently contaminated and aged soils. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1420.
- Dendooven, L., Álvarez-Bernal, D., Contreras-Ramos, S.M., 2011. Earthworms, a means to accelerate removal of hydrocarbons (PAHs) from soil? A mini-review. *Pedobiologia* 54S, S187–S192.
- Fonte, S.J., Barrios, E., Six, J., 2010. Earthworm impacts on soil organic matter and fertilizer dynamics in tropical hillside agroecosystems of Honduras. *Pedobiologia* 53, 327–335.
- Hickman, Z.A., Reid, B.J., 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environ. Int.* 34, 1072–1081.
- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H., 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1519–1528.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133, 71–84.
- Khan, F.I., Husain, T., Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71, 95–122.
- Mallikar, R.S., Rockne, K.J., 2008. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2280–2292.
- Méndez-Bautista, J., Fernández-Luqueño, F., López-Valdez, F., Mendoza-Cristino, R., Montes-Molina, J.A., Gutiérrez-Miceli, F.A., Dendooven, L., 2010. Effect of pest controlling neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) and mata-raton (*Gliricidia sepium* Jacquin) leaf extracts on green house gases emission from soil cultivated with bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a greenhouse experiment. *Sci. Total Environ.* 408, 4961–4968.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1476–1483.
- Muselman, S.W., Chander, S., 2002. Adsorption of acetylenic diol-based nonionic surfactants on lamblack and phthalocyanine blue pigment. *J. Colloid Interface Sci.* 256, 91–99.
- Natal-Da-Luz, T., Lee, I., Verweij, R.A., Morais, P.V., Van-Velzen, M.J.M., Sousa, J.P., Van-Gestel, C.A.M., 2012. Influence of earthworm activity on microbial communities related with the degradation of persistent pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 794–803.
- Paria, S., 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv. Colloid Interface Sci.* 138, 34–58.
- Prasanna, D., Venkata, M.S., Punshotham, R.R., Sarma, P.N., 2008. Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *J. Hazard. Mater.* 153, 244–251.
- Qasemian, L., Gulral, D., Ziaeei, F., Van Dang, T.K., Farnet, A.M., 2012. Effects of anthracene on microbial activities and organic matter decomposition in a *Phragmites* litter from a Mediterranean coastal area. *Soil Biol. Biochem.* 46, 148–154.
- Rajiv, K., Sinha, R.K., Bhatnagar, G., Ryan, D., 2008. Converting wasteland into wonderland by earthworms—a low-cost nature's technology for soil remediation: a case study of vermicoremediation of PAHs contaminated soil. *Environmentalist* 28, 466–475.
- SAS Institute, 1989. *Statist: Guide for Personal Computers*. Version 6.04, Edn. SAS Institute, Cary.
- Schaefer, M., Filer, J., 2007. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated. *Appl. Soil Ecol.* 36, 53–62.
- Schaefer, M., Peterson, S.O., Filer, J., 2005. Effects of *Lumbricus chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 37, 2065–2076.
- Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25, 99–121.
- Skapinska, K., Milewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Pol. Pharm.* 61, 233–240.
- Salomón-Hernández, G., 2012. Efecto de la concentración de surfactante sobre la remoción de antraceno en un suelo agrícola. *Cinvestav, México*. (unpublished M.Sc. thesis).
- Song, Y.F., Ou, Z.Q., Sun, T.H., Yediler, A., Lorinc, G., Ketrup, A., 1995. Analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and plants samples. *Chin. J. Appl. Ecol.* 6, 92–96.
- Tejeda, M., 2009. Application of different organic wastes in a soil polluted by cadmium: effects on soil biological properties. *Geoderma* 153, 254–268.
- Tomoko, Y., Koki, T., Hiroaki, S., 2005. Enhanced bioremediation of oil-contaminated soil by a combination of the earthworm (*Eisenia fetida*) and tea extraction residue. *Edaphologia* 77, 1–9.
- Udovic, M., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after soil remediation. *Environ. Pollut.* 148, 663–668.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 509–549.
- Xu, R., Obbard, J.P., 2003. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *J. Environ. Qual.* 32, 1234–1243.
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2004. An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. *Chemosphere* 57, 1079–1089.