



**Centro Universitario de la Defensa  
en la Escuela Naval Militar**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

*Remediación de suelos mediante del uso de radiación  
microondas*

**Grado en Ingeniería Mecánica**

**ALUMNO:** Darío García Pereira

**DIRECTORES:** Rocío Maceiras Castro  
Rosa Devesa Rey

**CURSO ACADÉMICO:** 2017-2018

Universida<sub>d</sub>eVigo





# Centro Universitario de la Defensa en la Escuela Naval Militar

## TRABAJO FIN DE GRADO

*Remediación de suelos mediante del uso de radiación  
microondas*

**Grado en Ingeniería Mecánica**  
Intensificación en Tecnología Naval  
Cuerpo General

Universida<sub>de</sub>Vigo



## **RESUMEN**

El mundo en que vivimos ha sufrido durante años las consecuencias de numerosas actividades humanas sin control, que han provocado la transformación de la gran mayoría de medios que nos rodean, siendo el suelo uno de los mayores damnificados. No obstante, el desconocimiento general que hasta hace poco existía acerca de la contaminación de suelos ha enmascarado en cierta medida esta problemática de nivel mundial. La calidad del suelo es vital para un adecuado desarrollo de las especies que habitan en la Tierra. La creciente concienciación mundial en este aspecto y numerosos avances tecnológicos y científicos en materia de descontaminación de suelos, han dado lugar en las últimas décadas al desarrollo de numerosas técnicas de remediación de suelos.

En este Trabajo Fin de Grado se presenta una novedosa técnica que consigue extraer los contaminantes del suelo mediante el uso de disolventes aplicando radiación microondas. Se ha estudiado la influencia del tiempo y del disolvente utilizado en el proceso de extracción. Además, se ha optimizado el tiempo para cada uno de los disolventes utilizados, con el fin de que esta técnica tenga rendimientos acordes a los alcanzados mediante el modo convencional de extraer metales pesados de suelos. Finalmente, se ha realizado un estudio bacteriológico para determinar la posibilidad de aplicar estas técnicas para eliminar microorganismos contaminantes del suelo.

## **PALABRAS CLAVE**

Remediación de suelos, Metales pesados, Extracción asistida por microondas, *Escherichia coli*



# AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, la Dra. Rocío Maceiras Castro y la Dra. Rosa Devesa Rey, por el tiempo y esfuerzo invertido en guiarme y corregirme durante los meses en que he llevado a cabo este trabajo. Por haberme solventado las innumerables cuestiones que me han surgido durante la elaboración del presente trabajo.

A mis compañeros de la promoción 418-148 (y a aquellos que ya no forman parte de ella por diversos motivos). No solo a los que me han ayudado a la hora de enfrentarme al Trabajo Fin de Grado, sino a todos aquellos con los que he compartido tantos momentos, buenos y malos, a lo largo de estos cinco años en la Escuela Naval Militar.

A mi familia en general, y en especial a mis padres y hermana, pilares básicos para haber conseguido estar donde estoy, y sobre todo, ser como soy.



## CONTENIDO

Contenido .....	1
Índice de Figuras .....	3
Índice de Tablas.....	5
1 Introducción y objetivos .....	7
1.1 Generalidades.....	7
1.2 Definición del problema.....	8
1.3 Objetivos .....	9
2 Estado del arte .....	11
2.1 Problemática de la contaminación del suelo .....	11
2.1.1 El suelo .....	11
2.1.2 Marco legal .....	12
2.1.3 La degradación del suelo .....	12
2.1.4 Contaminación de suelos .....	13
2.1.5 Contaminación por metales pesados.....	14
2.2 Remediación de suelos.....	16
2.3 Tratamientos para eliminación de metales.....	17
2.3.1 Biorremediación .....	18
2.3.2 Empleo de polímeros naturales.....	19
2.3.3 Tratamientos físico-químicos .....	19
2.4 Extracción sólido-líquido con disolventes .....	21
2.4.1 Método convencional.....	21
2.4.2 Extracción asistida por microondas (MAE) .....	21
2.5 Teoría de las microondas .....	22
2.6 Antecedentes .....	23
2.6.1 Parámetros .....	24
2.7 Contaminación de suelos por microorganismos .....	24
2.7.1 Bacteria ‘Escherichia coli’ .....	25
3 Desarrollo del TFG.....	27
3.1 Material y equipos.....	27
3.1.1 Analizador de humedad .....	27
3.1.2 Balanza digital .....	27
3.1.3 Agitador orbital.....	28
3.1.4 Microondas .....	28
3.1.5 Equipo de filtración a vacío.....	29

3.1.6 Espectrofotómetro.....	30
3.1.7 Equipos auxiliares.....	31
3.2 Plan de trabajo.....	33
3.3 Metodología y procedimiento .....	35
3.3.1 Contaminación del suelo.....	35
3.3.2 Preparación de los disolventes.....	36
3.3.3 Extracción convencional.....	38
3.3.4 Extracción asistida por microondas (MAE) .....	38
3.3.5 Medición CACTI.....	40
3.3.6 Recta de calibrado del cobre.....	41
3.3.7 Medio de cultivo .....	42
4 Resultados y Discusión .....	47
4.1 Recta de calibrado del cobre .....	47
4.2 Resultados extracción del cobre.....	49
4.2.1 Extracción convencional.....	49
4.2.2 Extracción asistida por microondas (MAE) .....	50
4.3 Comparativa métodos de extracción .....	53
4.3.1 Método convencional.....	53
4.3.2 Método asistido por microondas.....	54
4.3.3 Comparativa global.....	55
4.3.4 Comparativa según metal extraído .....	56
4.3.5 Rendimientos .....	57
4.4 Análisis cultivos de bacterias .....	60
5 Conclusiones y líneas futuras .....	63
5.1 Conclusiones .....	63
5.2 Líneas futuras.....	63
6 Bibliografía.....	65
Anexo I.....	69
Anexo II.....	70
Anexo III .....	73
Anexo IV .....	75
Anexo V .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Ejemplo contaminación de suelos [2].....	7
Figura 1-2 Fuentes contaminación de suelos por metales pesados [4].....	8
Figura 2-1 Tipos de degradación del suelo [9].....	13
Figura 2-2 Distribución de terrenos contaminados por metales pesados en Europa [15].....	16
Figura 2-3 Ejemplos de tratamientos de suelos [3].....	17
Figura 2-4 Tratamientos físico-químicos contra metales pesados [8].....	19
Figura 2-5 Técnica de extracción de agua [24].....	20
Figura 2-6 Montaje extracción asistida por microondas [28].....	22
Figura 3-1 Analizador de humedad.....	27
Figura 3-2 Balanza digital.....	28
Figura 3-3 Agitador orbital con incubador.....	28
Figura 3-4 Equipo microondas.....	29
Figura 3-5 Esquema filtración a vacío.....	29
Figura 3-6 Filtro de microfibra de vidrio.....	29
Figura 3-7 Espectrofotómetro.....	30
Figura 3-8 Espectro de luz visible [39].....	30
Figura 3-9 Campana extractora.....	31
Figura 3-10 Agitador magnético.....	31
Figura 3-11 Autoclave.....	32
Figura 3-12 Estufa.....	32
Figura 3-13 Equipo medición ICP-OES [40].....	32
Figura 3-14 Plan de trabajo descontaminación del suelo.....	34
Figura 3-15 Plan de trabajo medio de cultivo.....	35
Figura 3-16 Muestra suelo contaminado.....	35
Figura 3-17 Ciclo de extracción por método convencional.....	38
Figura 3-18 Ciclo teórico óptimo de extracción asistida por microondas.....	40
Figura 3-19 Muestras para recta de calibrado.....	41
Figura 3-20 Cultivo teórico bacteria <i>Escherichia coli</i> en medio <i>Agar-bilis</i> [41].....	43
Figura 3-21 Medio de cultivo.....	43
Figura 3-22 Colonia de bacterias <i>E. coli</i> a partir de agua de un charco.....	44
Figura 3-23 Fruta putrefacta portadora de bacterias.....	44
Figura 3-24 Colonia bacterias 1.....	45
Figura 3-25 Colonia bacterias 2.....	45
Figura 3-26 Bacterias introducidas en el suelo.....	45

Figura 4-1 Recta de calibrado de cobre 1 .....	48
Figura 4-2 Recta de calibrado de cobre 2.....	48
Figura 4-3 Comparativa de rendimientos método convencional: a) tras 4 días, b) tras 19 días.....	50
Figura 4-4 Concentración Cu en CaCl <sub>2</sub> -Tiempo microondas .....	51
Figura 4-5 Concentración Cu en CH <sub>3</sub> COOH-Tiempo microondas.....	52
Figura 4-6 Concentración Cu en AEDT-Tiempo microondas .....	52
Figura 4-7 Ciclo final óptimo de extracción asistida por microondas .....	53
Figura 4-8 Concentraciones metales pesados en disolventes extraídos por método convencional..	55
Figura 4-9 Concentraciones metales pesados en disolventes extraídos por MAE.....	55
Figura 4-10 Comparativa rendimientos totales .....	59
Figura A4-1 Ejemplo pérdidas por filtración .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1 Determinación suelos contaminados [6] .....	12
Tabla 2-2 Metales vertidos al suelo según origen [10] .....	13
Tabla 2-3 Concentraciones anómalas de elementos traza [3, 7] .....	15
Tabla 2-4 Metales depositados en suelos anualmente .....	18
Tabla 2-5 Comparativa ventajas y desventajas técnicas remediación [3] .....	18
Tabla 2-6 Parámetros MAE [31] .....	23
Tabla 2-7 Cantidad coliformes admisibles en aguas [34] .....	25
Tabla 3-1 Composición tierra comercial .....	35
Tabla 3-2 Especificaciones metales pesados .....	36
Tabla 3-3 Especificaciones disolventes .....	37
Tabla 3-4 Barrido tiempos $\text{CaCl}_2$ .....	39
Tabla 3-5 Barrido de tiempos $\text{CH}_3\text{COOH}$ .....	39
Tabla 3-6 Barrido de tiempos AEDT .....	40
Tabla 3-7 Especificaciones sulfato de cobre .....	41
Tabla 3-8 Muestras recta de calibrado de Cu .....	42
Tabla 3-9 Composición Agar-bilis [36] .....	42
Tabla 3-10 Especificaciones reactivo del medio de cultivo .....	43
Tabla 4-1 Datos recta de calibrado Cu .....	47
Tabla 4-2 Resultados método convencional 1 .....	49
Tabla 4-3 Resultados método convencional 2 .....	49
Tabla 4-4 Resultados microondas barrido $\text{CaCl}_2$ .....	50
Tabla 4-5 Resultados microondas barrido $\text{CH}_3\text{COOH}$ .....	51
Tabla 4-6 Resultados microondas barrido AEDT .....	52
Tabla 4-7 Resultados laboratorio método convencional muestra 10 g .....	53
Tabla 4-8 Resultados CACTI método convencional muestra 10 g .....	54
Tabla 4-9 Resultados laboratorio método MAE muestra 10 g .....	54
Tabla 4-10 Resultados CACTI método MAE muestra 10 g .....	55
Tabla 4-11 Comparativa resultados según metal extraído y método .....	56
Tabla 4-12 Rendimiento extracción convencional de cobre .....	57
Tabla 4-13 Rendimiento extracción asistida por microondas de cobre .....	57
Tabla 4-14 Rendimiento extracción convencional de hierro .....	58
Tabla 4-15 Rendimiento extracción asistida por microondas de hierro .....	58
Tabla 4-16 Rendimiento extracción convencional de zinc .....	58
Tabla 4-17 Rendimiento extracción asistida por microondas de zinc .....	59

Tabla 4-18 Comparativa resultados cultivos $\text{CaCl}_2$ según grado de concentración.....	60
Tabla 4-19 Resultados cultivos disolventes 1:100 .....	61
Tabla A1-1 Cálculos estequiométricos disoluciones disolventes.....	69
Tabla A2-1 Resumen ensayos en laboratorio.....	72
Tabla A3-1 Cálculos estequiométricos disolución patrón $\text{CuSO}_4$ .....	73
Tabla A3-2 Concentraciones Cu de las muestras para recta de calibrado.....	74
Tabla A4-1 Pérdidas por filtración de cada ensayo.....	78

# 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

## 1.1 Generalidades

El suelo es uno de los mayores bienes de los que dispone el ser humano, tal y como se redacta en la Carta Europea del Suelo [1]. Es la base de todo ecosistema y un recurso limitado y fácilmente alterable. Los suelos son la fuente de nutrientes y también el medio en el que se desarrollan bosques, plantas y cultivos.

La contaminación de los mismos se introduce en la cadena trófica y afecta no solo a vegetales y animales, sino también, directa o indirectamente, al ser humano. Sin embargo, hasta hace pocos años, la concienciación que la sociedad mostraba sobre este aspecto era escasa o nula. Esa falta de preocupación es el principal factor que ha provocado que la contaminación de los suelos haya ido aumentando de forma progresiva a nivel global. Un ejemplo de la degradación del suelo en un entorno industrial puede apreciarse en la Figura 1-1. Es necesario que tanto agricultores como industrias, así como la población mundial en general, tomen conciencia de ello para lograr un desarrollo sostenible contra la contaminación [1]. Se trata de un problema más global de lo que en un principio puede parecer, ya que la contaminación de los suelos puede alcanzar los cursos de los ríos, provocando así un gran incremento de las zonas afectadas.



**Figura 1-1 Ejemplo contaminación de suelos [2]**

Una de las fuentes de contaminación de suelos más representativas son actualmente los metales pesados, ya sea por causas naturales o por la actividad humana. Y aunque este problema tuvo sus

orígenes muchos años atrás, fue a partir de la Revolución Industrial y el desarrollo de algunas tecnologías modernas cuando la presencia de metales pesados en los suelos se agravó. Una cantidad excesiva de metales pesados en los suelos da lugar a que sean absorbidos por vegetales y cultivos, lo que podría causar graves riesgos para la salud como enfermedades cardiovasculares, cáncer, anemia y repercusiones en el sistema nervioso, piel o huesos [3]. En la Figura 1-2 se recogen los principales orígenes de las distintas fuentes de contaminación de metales pesados en el suelo. Como se puede observar, las actividades más contaminantes del suelo son las relacionadas con la minería, seguidas de las procedentes de la agricultura. Otras fuentes de contaminación son también las industrias y las aguas residuales.

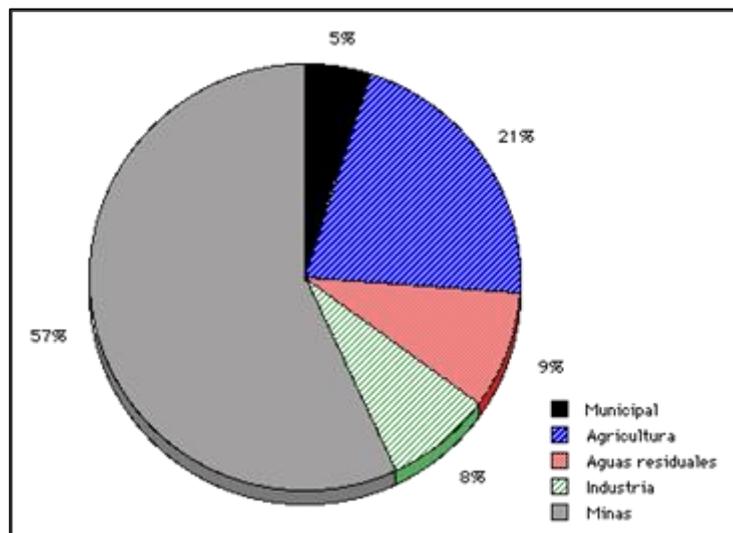


Figura 1-2 Fuentes contaminación de suelos por metales pesados [4]

Según la Ley 22/2011 [5], la declaración de un suelo como contaminado obliga a realizar acciones de limpieza y recuperación de dicho terreno. En el Real Decreto 9/2005 [6], se catalogan como actividades potencialmente contaminantes del suelo la producción de metales como cobre, aluminio, plomo, estaño y otros metales, al igual que todas las actividades relacionadas con su comercialización y transporte. Estos dos documentos regulan el tratamiento de suelos contaminados en España, y establecen los valores umbrales para la catalogación de suelos como contaminados.

En los últimos años, un aumento de los conocimientos en materia de descontaminación de suelos, junto con una concienciación global de la sociedad sobre los efectos perjudiciales de los metales pesados, ha dado lugar al desarrollo de técnicas que permiten la limpieza de esos suelos contaminados, a la vez que son respetuosas con el medio ambiente.

Los avances tecnológicos han permitido desarrollar técnicas que optimizan el rendimiento de los procesos de descontaminación, y una de ellas es el uso de la radiación microondas que será el objeto de estudio de este trabajo.

## 1.2 Definición del problema

La remediación de suelos tiene por objeto la purificación de terrenos contaminados. Son procesos en los que se ha estado investigando ya durante las últimas décadas, y se han conseguido logros importantes. Se han desarrollado técnicas de descontaminación que ofrecen buenos resultados. Sin embargo, se trata de procesos que por lo general requieren mucho tiempo, son caros, y en muchos casos se necesitan condiciones de montaje, mantenimiento y transporte costosos [3].

La novedosa técnica de extracción de contaminantes asistida por microondas disminuye los problemas anteriormente citados pero su rendimiento también varía en función de las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso. Algunas de esas variables serán objeto de estudio y análisis de este trabajo,

esperando llegar a determinar cuáles son las condiciones más adecuadas para la aplicación dicha técnica. Por lo tanto, se puede definir el problema de la siguiente manera:

*‘La extracción de contaminantes asistida por microondas, es una técnica que depende de múltiples factores como son el tiempo de tratamiento o el disolvente a utilizar, por lo que resulta necesario estudiar los factores que garantizan un empleo efectivo de dicha técnica. Combinando los valores más adecuados de esos parámetros se pretende conocer el punto de trabajo que asegure la extracción de la fracción contaminante de metales en el suelo más adecuada. También se debe tener en cuenta si el hecho de aplicar esas técnicas de descontaminación favorece a la eliminación de microorganismos desarrollados a raíz de la contaminación del suelo’.*

### **1.3 Objetivos**

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la validez del método de extracción asistido por microondas para la remediación de suelos contaminados por metales pesados. Simultáneamente, se pretenden alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Comparar la eficiencia de la extracción asistida por microondas respecto al método convencional para extraer metales pesados de suelos.
- Evaluar la eficacia de la combinación de los tres disolventes empleados para la extracción de metales pesados de suelos contaminados.
- Establecer el tiempo de operación más adecuado, para extraer una cantidad de metales equiparable a la cantidad extraída por el método convencional.
- Analizar la viabilidad de ambos métodos para la descontaminación biológica, mediante el estudio de un medio de cultivo.



## 2 ESTADO DEL ARTE

En este epígrafe se contextualiza la problemática de la contaminación de suelos en general y más en detalle la provocada por metales pesados, así como las técnicas de remediación que existen para la limpieza de suelos contaminados, ofreciendo una visión general de los estudios e investigaciones realizados hasta ahora en esta materia.

### 2.1 Problemática de la contaminación del suelo

#### 2.1.1 *El suelo*

Se define el suelo como la capa más externa de la corteza terrestre formada por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos, exceptuando la parte de la superficie terrestre cubierta por mares y océanos. Es el resultado de las actividades que tienen lugar en la biosfera, hidrosfera y atmósfera, sumadas a la meteorización de las rocas y la influencia de los procesos microbiológicos. Cuando dichas actividades, controladas principalmente por la energía del Sol y las condiciones climáticas se estabilizan, se logra un equilibrio. Si ese equilibrio se rompe, como consecuencia de las actividades del ser humano, se produce la degradación del suelo. La degradación que implica variar la concentración de alguno de los componentes del suelo, es conocida como contaminación [7].

Según el R.D. 09/2005 [6] suelo contaminado es *‘aquél cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente’*.

El nivel genérico de referencia (NGR) es un dato característico de cada tipo de contaminante del suelo que hace referencia a la concentración límite de dicha sustancia en el suelo, a partir de la cual supone un riesgo para la salud humana o los ecosistemas [6].

El suelo es importante para la vida del ser humano y para el medio ambiente ya que es el responsable de llevar a cabo las siguientes funciones, todas ellas imprescindibles para un desarrollo sostenible del planeta [8]:

- Aporta nutrientes, agua y es el medio donde tiene lugar el crecimiento de vegetales.
- A través del suelo se distribuyen las aguas superficiales y se almacenan las aguas subterráneas en acuíferos. Esto lo hace fundamental para el ciclo hidrológico.
- Actúa como barrera frente a algunos contaminantes y sustancias tóxicas, impidiendo que lleguen a aguas subterráneas.
- Es el hábitat de multitud de microorganismos.
- Es una fuente de materias primas.
- Forma parte del paisaje y patrimonio cultural de cada lugar.

### 2.1.2 Marco legal

En 1999, la Agencia Europea de Medio Ambiente calculó entre 300.000 y 1.500.000 zonas geográficas o terrenos contaminados en Europa Occidental [6]. Un margen tan grande entre los dos valores anteriores se debe a la diferencia de criterios de cada país para determinar los límites y valores que caracterizan a un suelo como contaminado. Es por eso que se crea una metodología para identificar más fácilmente los suelos degradados.

En 2005, se promulga el R.D. 09/2005 [6] en el que se detallan las actividades potencialmente contaminantes del suelo y se establece un baremo para determinar cuándo dichos suelos suponen un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Según este Real Decreto, en función de si se toma como prioridad la salud humana o los ecosistemas, un suelo se considerará contaminado atendiendo a los criterios de la Tabla 2-1. En el Anexo V de dicho Real Decreto se recoge una relación de las sustancias contaminantes con sus respectivos niveles genéricos de referencia para la protección de la salud de las personas, mientras que en el Anexo VI de dicho documento se muestran los niveles genéricos de referencia para la protección de los ecosistemas.

#### Declaración suelos contaminados

<b>Prioridad salud humana</b>	Concentración sustancia contaminante excede 100 o más veces el nivel genérico de referencia (NGR).	
<b>Prioridad ecosistemas</b>	Concentración letal o efectiva media para organismos del suelo inferior a 10 mg suelo contaminado por 1 g de suelo	Concentración letal o efectiva media para organismos acuáticos inferior a 10 mL de lixiviado por 1L de agua

Tabla 2-1 Determinación suelos contaminados [6]

Si no se dispone del nivel genérico de referencia de alguna sustancia, como es el caso de los metales pesados, se puede utilizar el siguiente criterio redactado en el Anexo VII del R.D. 09/2005: el límite estándar se calcula sumando a la concentración media que existe en la zona de dicho metal, el doble de la desviación típica de las concentraciones existentes en suelos de zonas próximas no contaminadas con composición semejante [6].

### 2.1.3 La degradación del suelo

En función de las consecuencias que provocan en las características del suelo, los tipos de degradación de un suelo se pueden agrupar de la siguiente manera:

- *Físicos*: son los procesos que afectan a la estructura de los suelos, como la variación de la temperatura o radiactividad.
- *Químicos*: son los procesos que alteran la composición original del suelo y producen efectos como la acidificación o la pérdida de nutrientes.
- *Biológicos*: son los procesos culpables de acabar con la materia orgánica presente en el suelo, al incluir bacterias o especies putrefactas [8].

En la Figura 2-1 se detallan las principales consecuencias de cada tipo de degradación del suelo. Las principales consecuencias de la degradación física se deben a efectos de erosión, ya sea realizada por el viento o el agua. Las consecuencias biológicas afectan sobre todo a los seres vivos, mientras que las químicas son las que se van a tratar en este trabajo, más en concreto la contaminación por componentes tóxicos.

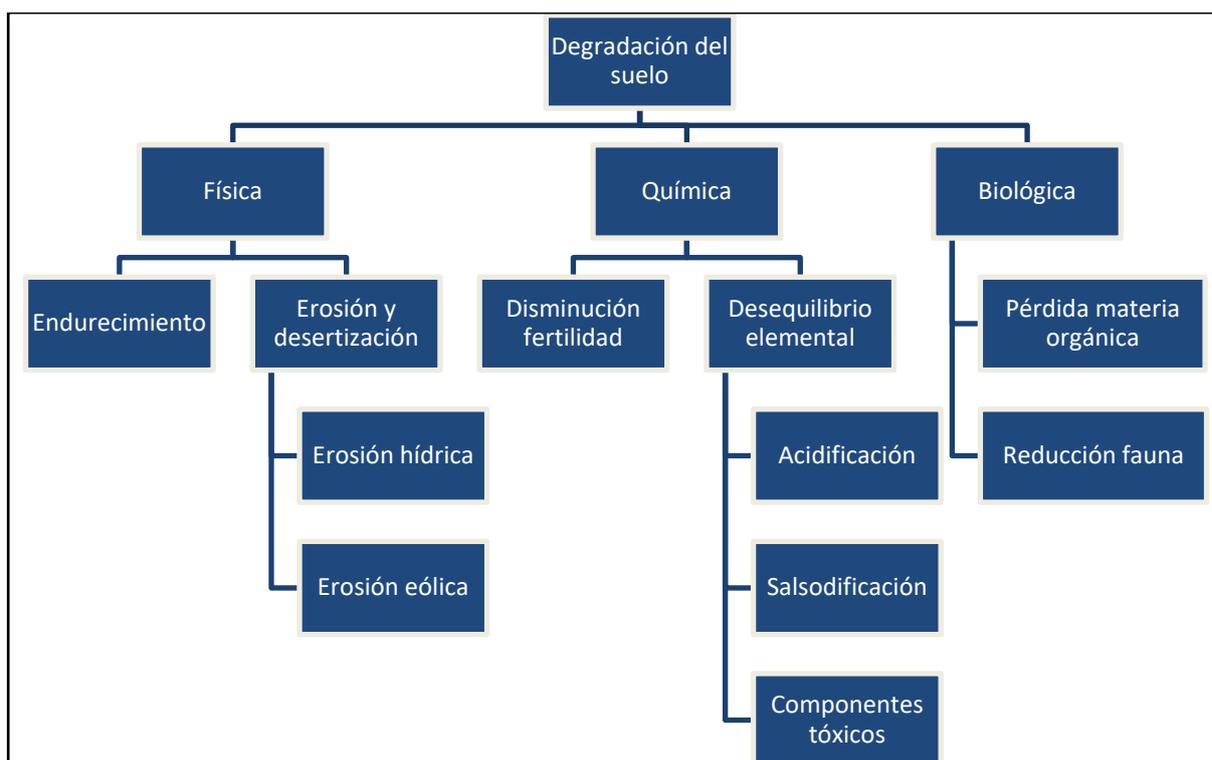


Figura 2-1 Tipos de degradación del suelo [9]

#### 2.1.4 Contaminación de suelos

Dentro de la degradación de tipo químico, según el origen de los elementos que modifican la composición de los suelos, se distinguen dos tipos de contaminantes [8]:

- *Origen geogénico*: son aquellos que proceden de la roca madre original, liberados por meteorización por la actividad volcánica o por la minería, entre otros, como el cromo (Cr) o el níquel (Ni).
- *Origen antropogénico*: son aquellos que derivan de residuos industriales, de la industria agrícola y de residuos sólidos urbanos.

Estos últimos son los verdaderos contaminantes, puesto que son creados y vertidos por el hombre o proceden de sus actividades, de forma directa o indirecta. Un ejemplo representativo son los procesos de explotación y extracción de metales que anualmente generan millones de toneladas de residuos que al oxidarse dan lugar a grandes cantidades de metales pesados que se introducen en el suelo, como cobre, hierro o cadmio [7].

Fuente	Contribución (%)
Cenizas combustión	74
Desechos urbanos	9
Turba	6
Residuos metalurgia	6
Residuos materia orgánica	3
Fertilizantes	2

Tabla 2-2 Metales vertidos al suelo según origen [10]

En la Tabla 2-2 se muestran los resultados de un estudio realizado a finales de los años 80, que determinó que la cantidad anual de metales vertidos en el suelo ascendía a 5 mil billones de kilogramos. De esta cantidad, el 74 % corresponde a cenizas procedentes de la combustión de carburantes sobre todo en el sector de la minería, especialmente de carbón [10].

La peligrosidad de la contaminación de los suelos no reside solo en la propia alteración de su composición, sino en la forma en la que se encuentre el contaminante, es decir, su especiación. Esto afectará en mayor o menor medida a la expansión de las sustancias tóxicas. Son muchos los organismos que habitan o se abastecen de recursos del suelo, lo que convierte a todos ellos en víctimas potenciales de los contaminantes del suelo, ya sea por su ingesta en el caso de animales o adsorción por parte de los vegetales.

El concepto de disponibilidad, hace referencia a la posibilidad de que un elemento del suelo quede libre. Por lo tanto, la biodisponibilidad es el grado de libertad en que se encuentra un elemento en el suelo para ser capturado por los seres vivos. Depende de factores como el pH del suelo, su conductividad eléctrica o sus propiedades mineralógicas [3]. Por lo general, sólo una pequeña cantidad de una sustancia es biodisponible, la cual suele tener un efecto negativo en los organismos que son contaminados, aunque en algunos casos no afecta a su desarrollo [7].

Los principales agentes contaminantes de suelos son: lluvias ácidas, salinización, fitosanitarios, explotaciones mineras, contaminantes orgánicos y metales pesados [8]. Estos últimos serán analizados en detalle en el siguiente epígrafe.

### 2.1.5 Contaminación por metales pesados

Se consideran metales pesados aquellos cuyo peso molecular es superior al del hierro (Fe) (55,85 g/mol), con una densidad relativamente alta y que pueden resultar tóxicos o venenosos en concentraciones pequeñas [11]. No obstante, existen algunas excepciones de metales cuyo peso molecular es inferior y son altamente contaminantes como pueden ser el vanadio (V), el manganeso (Mn) o el cromo (Cr). La presencia de metales pesados en la corteza terrestre, el suelo y las plantas suele darse en bajas concentraciones ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) [7].

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados poseen ciertas características que los hacen más peligrosos si cabe, dada su resistencia a ser química o biológicamente degradados y el tiempo de persistencia una vez han sido introducidos (p.ej., Pb, 150-5000 años [3]). Todo suelo posee cierto poder depurador, filtrando, neutralizando, descomponiendo o almacenando contaminantes. Es denominado poder amortiguador del suelo y es característico de cada tipo de suelo. Este efecto es uno de los motivos que hace que la fracción biodisponible de contaminantes no sea muy elevada. La cantidad máxima de metales pesados que admite un terreno se llama carga crítica y representa el valor umbral a partir del cual un suelo resulta tóxico [3].

No obstante, hay ciertos metales cuya presencia es esencial para un correcto desarrollo de los ecosistemas. Cuando se habla de elementos traza o metales esenciales, se hace referencia a elementos que son imprescindibles para el adecuado desarrollo de los organismos del suelo, siempre y cuando su concentración no supere ciertos límites. Un estudio publicado por de la EPA (US Environmental Protection Agency) ha caracterizado como principales contaminantes de suelos los siguientes trece elementos traza: antimonio, arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y zinc [7].

En muchas ocasiones, el margen que existe entre las concentraciones necesarias de elementos traza y las concentraciones tóxicas es bastante estrecho. En la Tabla 2-3 se muestran algunos ejemplos de elementos traza que en concentraciones excesivas pueden resultar perjudiciales para el suelo. Estas concentraciones pueden sufrir variaciones en función de la zona en que se realice el estudio. La primera columna de la Tabla 2-3 representa un compendio de valores habituales encontrados en distintos terrenos mientras que la segunda se refiere a casos extremos que se han llegado a encontrar en suelos industriales [7].

<b>Elemento traza</b>	<b>Concentración normal (ppm)</b>	<b>Concentración anómala (ppm)</b>
As	<5-40	Hasta 2500
Cd	<1-2	Hasta 30
<b>Cu</b>	<b>20-250</b>	<b>Hasta 4000</b>
Mo	<1-5	10-100
Ni	2-100	Hasta 8000
Pb	10-150	10000 o más
Se	<1-2	Hasta 500
<b>Zn</b>	<b>25-200</b>	<b>10000 o más</b>

**Tabla 2-3 Concentraciones anómalas de elementos traza [3, 7]**

Los metales se pueden encontrar en el suelo en distintas especiaciones, es decir, de distintas formas: la fracción soluble, fracción residual, fracción intercambiable, ligados a materia orgánica o asociados a óxidos de Fe y Mn, carbonatos, fosfatos, sulfuros, silicatos u otros minerales secundarios [12]. La fracción intercambiable es aquella que representa los metales que pueden ser extraídos del suelo. Las fracciones metálicas unidas a óxidos de Fe y/o Mn o bien a la materia orgánica se pueden extraer cambiando las propiedades reductoras u oxidantes del medio. La fracción residual por el contrario, sólo se puede movilizar tras largas meteorizaciones, con efectos más a largo plazo [13]. Las fuentes de contaminación por metales son diversas pero se destacan las siguientes:

#### 2.1.5.1 *Efluentes de la minería*

En las minas donde abunda la piritita y otros sulfuros, al entrar éstos en contacto con el oxígeno de la atmósfera, dan lugar a reacciones de oxidación que producen la acidificación del medio, produciendo la dispersión en el suelo del  $\text{Fe}^{2+}$  y de otros metales [14].

#### 2.1.5.2 *Efluentes industriales*

Existe una gran variedad de actividades industriales que pueden conducir a la adición de metales traza en el suelo. Ejemplos de ello y unas de las actividades que mayores vertidos de metales producen son la fabricación de fertilizantes y la de refinados de petróleo [14].

#### 2.1.5.3 *Efluentes domésticos*

Las actividades domésticas cotidianas de los seres humanos producen también contaminación de los suelos por metales. Altos niveles de Cu, Pb, Zn y, en menores proporciones de Cd, han sido descubiertos en suelos como consecuencia de la corrosión de los sistemas de abastecimiento de aguas de los hogares. Los detergentes empleados en lavadoras contienen también cantidades de Fe, Mn, Cr y otros [14]. Muchos de estos metales son arrastrados hacia el suelo por medio de las lluvias en áreas urbanizadas.

#### 2.1.5.4 *Aportes procedentes de áreas rurales*

Como ya se mencionó anteriormente, la fabricación de los fertilizantes es una fuente importante de contaminación industrial. Más reseñable es aún su empleo en el tratamiento de cultivos agrícolas. Contienen una pequeña cantidad de metales pesados que, después de ser empleados en los suelos como fuente de nutrientes de los cultivos, debido al efecto de lluvias y aguas superficiales son arrastrados hasta los ríos y acumulados como sedimentos.

Algunos ejemplos mundialmente famosos sobre espacios contaminados por metales pesados fueron lugares como Basel o el Coto de Doñana. En el primero, 30 toneladas de pesticidas con alto contenido en mercurio fueron vertidos en el río Rhin por una compañía química. En el Coto de Doñana, un espacio natural reservado en el sur de España, un millón de metros cúbicos de lodos contaminados con elevadas concentraciones de plomo, cobre, zinc y cadmio acabaron contaminando el río Guadimar en 1998, lo que afectó a gran cantidad de aves y especies protegidas [11].

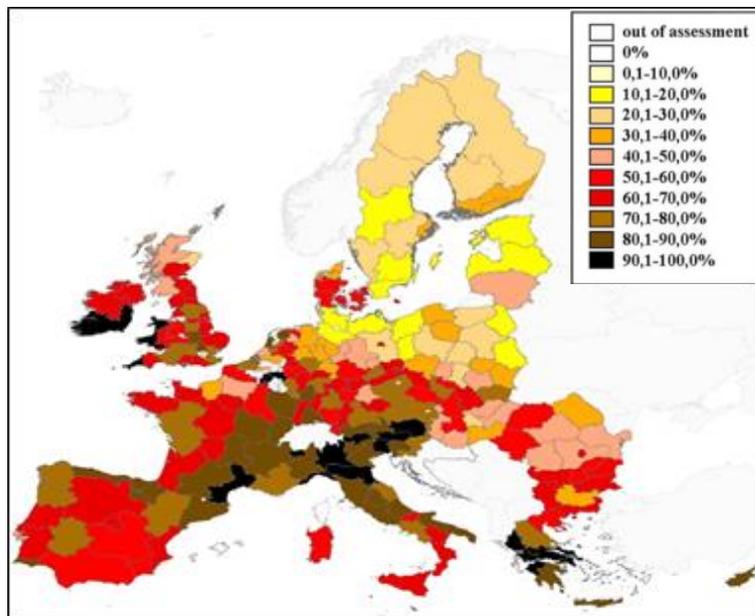


Figura 2-2 Distribución de terrenos contaminados por metales pesados en Europa [15]

Países como Alemania, Suecia y China han visto aumentar el empleo de sus suelos en procesos industriales, con el consiguiente aumento de productos contaminantes en ellos. En Estados Unidos existen alrededor de 600.000 hectáreas de suelos contaminados por metales pesados, lo que supone que aproximadamente 50.000 terrenos requieren un tratamiento de remediación urgente [16]. Según un estudio de la EEA (Agencia Europea de Medio Ambiente) en Europa existen más de 3 millones de lugares cuyas actividades son calificadas como potencialmente contaminantes del suelo y más de 250.000 terrenos en países europeos que han sido contaminados por metales pesados [15]. En la Figura 2-2 se muestra la disposición de terrenos del continente europeo según su concentración de metales pesados. Las zonas más oscuras son aquellas que presentan mayor concentración de metales en sus suelos, mientras que las más claras son las que gozan de los suelos menos contaminados por metales. Aun así, la gran mayoría de países europeos muestran concentraciones elevadas. Las regiones del noreste de Europa y Europa central presentan las menores concentraciones mientras que los suelos de los países mediterráneos y del oeste de Europa son los más afectados [15].

A continuación, se desarrollan los distintos métodos de descontaminación de suelos que existen.

## 2.2 Remediación de suelos

A partir de la década de los 70 empieza a tenerse en cuenta la contaminación de los suelos, además de la del aire y del agua. Uno de los factores clave que dio a conocer la gravedad de esta problemática fue la declaración de la “Carta Europea de Suelos” [1] en 1972.

Aun así, antiguamente el modo de tratar un suelo contaminado era destruirlo o bien trasladarlo a un vertedero donde se pudiese controlar y evitar que la contaminación se propagase [17]. Durante las últimas décadas, ante la gran variedad de vías de contaminación y organismos susceptibles de ser contaminados, se ha desarrollado una concienciación a nivel global para hacer frente a la contaminación de suelos [3]. Esta preocupación ha tenido como resultado el desarrollo y mejora de tecnologías destinadas a la remediación de terrenos contaminados por metales pesados, cuyo objetivo es reducir la

fracción biodisponible de contaminantes en suelos y evitar o reducir su acumulación en cultivos u organismos. Son ya 80.000 el número de terrenos en Europa que han sido sometidos a técnicas de remediación durante los últimos 30 años [3]. Estos datos revelan la importancia que se le está otorgando al desarrollo de técnicas de descontaminación de suelos en la actualidad.

Según el lugar en el que se lleve a cabo el tratamiento, se distinguen tres grupos: tratamientos *in situ*, en los que los suelos son tratados en su lugar de origen; tratamientos *on site*, en los que los suelos contaminados se excavan y se realiza el tratamiento en el mismo lugar; y los tratamientos *ex situ*, que se llevan a cabo en laboratorios o instalaciones de tratamiento [18]. Para llevar a cabo estos últimos es necesario trasladar los suelos contaminados, lo que hace que sean más caros, pero suelen ser más rápidos y permiten conseguir una mejor descontaminación. A la hora de seleccionar uno de los métodos se valora el tipo de suelo, el tipo de contaminante, la eficacia del método, su coste y el tiempo total empleado [8].

Según el tipo de tratamiento y la tecnología en la que se basa existen tres tipos de técnicas de remediación:

- Los métodos químicos se centran en la adición de agentes químicos capaces de modificar la composición de suelos contaminados al reaccionar con los agentes contaminantes [8].
- Los métodos biológicos son la mejor opción para restaurar las condiciones originarias de suelos contaminados. Usan microorganismos y/o plantas capaces de eliminar o inmovilizar metales pesados del suelo. La biorremediación es una solución efectiva y duradera [8].
- Los métodos físicos son laboriosos y costosos, pero pueden ser aplicados a grandes cantidades de suelo. La mayoría son técnicas de aislamiento en las que se pretende que la contaminación no se expanda a otros medios como las aguas subterráneas. Por otro lado, la vitrificación, a veces considerado tratamiento térmico, consiste en someter el suelo a elevadas temperaturas para fundir sus compuestos. Son recomendables como última opción en situaciones extremas en las que los suelos contaminados son ya casi irrecuperables [4].

En la Figura 2-3 se citan ejemplos de las principales formas de tratar los suelos.

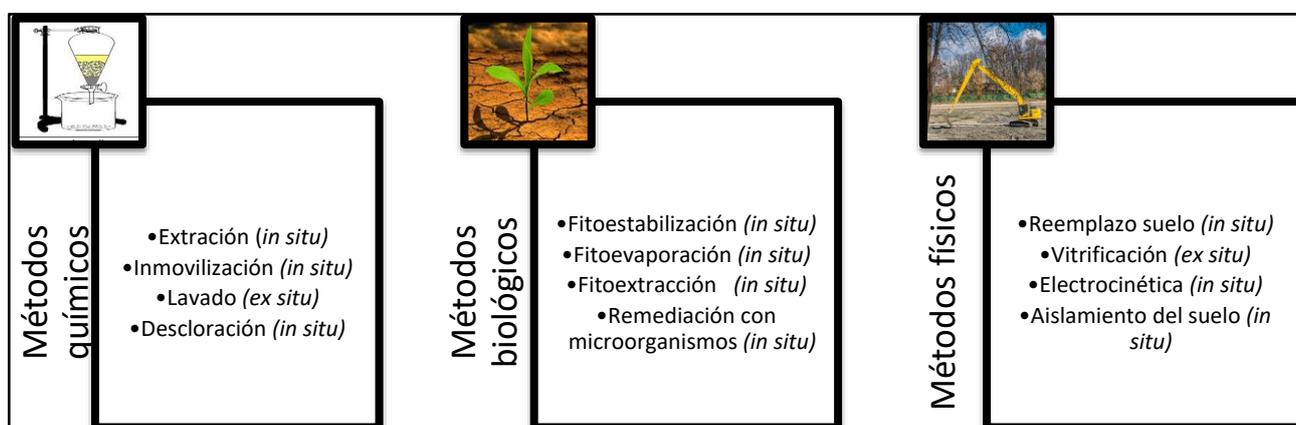


Figura 2-3 Ejemplos de tratamientos de suelos [3]

## 2.3 Tratamientos para eliminación de metales

El parámetro fundamental que definirá el tipo de técnica a emplear para remediar un suelo es el tipo de contaminante con el que ha sido alterado. Los contaminantes químicos se dividen en contaminantes orgánicos y contaminantes inorgánicos. El primer grupo lo forman principalmente los derivados del carbono y pueden ser de origen natural o antropogénico. En cambio, los inorgánicos no incluyen carbono en su composición. A este grupo pertenecen los metales. En la Tabla 2-4, se recogen las cantidades de algunos de los metales que, anualmente y con mayor frecuencia, son depositados en los suelos [11]. Entre ellos se encuentran el cobre y el zinc, usados en la fase de experimentación de este trabajo.

**Toneladas de metales**

arsénico	120,000	mercurio	11,000
cadmio	30,000	molibdeno	110,000
<b>cobre</b>	<b>2,150,000</b>	níquel	470,000
plomo	1,160,000	<b>zinc</b>	<b>2,340,000</b>

Tabla 2-4 Metales depositados en suelos anualmente

A diferencia de lo que ocurre con algunos contaminantes orgánicos, la gravedad y el impacto producido por la contaminación de metales radica en que éstos no son biodegradables [19]. A continuación, se desglosan las principales técnicas de remediación para hacerles frente. Las ventajas y desventajas de algunos de ellos se comparan en la Tabla 2-5.

**2.3.1 Biorremediación**

La bioacumulación es el aumento de la concentración de un elemento químico en la cadena trófica comparada con la concentración originaria de dicho elemento en el medio ambiente. Como técnica innovadora ante este problema, surge la biorremediación que consiste en el uso de organismos vivos naturales o mejorados genéticamente (microorganismos, hongos o plantas) para degradar, transformar o reducir la cantidad de metales presentes en el suelo [11]. Dentro de este grupo, destaca la fitorremediación para la extracción de metales.

**2.3.1.1 Fitorremediación**

Su bajo coste y sencillo mantenimiento juegan a su favor como una de las técnicas de remediación de suelos con más futuro. Emplea especies de plantas y algas que almacenan y eliminan parte de los metales contaminantes del suelo mediante procesos metabólicos [20]. En la Tabla 2-5 se muestran algunas de sus ventajas e inconvenientes frente a otras técnicas de extracción de metales.

Dentro de este grupo, son varias las técnicas que se pueden aplicar a suelos contaminados por metales pesados: fitoextracción, fitoestabilización, fitodegradación, fitovolatilización y fitorrestauración. La más conocida, la fitoextracción, consiste en la absorción de los metales desde la raíz de las plantas hasta los tallos y las hojas. No obstante, todas estas técnicas todavía están en fase de desarrollo e implantación, pero los resultados alcanzados en varios estudios son prometedores [20].

<b>TÉCNICA</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>LIMITACIONES</b>	<b>APLICACIÓN</b>	<b>TIEMPO REQUERIDO</b>
<b>Fitorremediación</b>	-Económicamente muy efectiva. -Respetuosa medio ambiente.	-Gran dependencia condiciones del suelo.	-Entre pequeña y media escala.	-Muy elevado.
<b>Electrocínética</b>	-Fácil aplicación. -Económicamente efectiva.	-Suelos con baja permeabilidad -pH debe ser controlado.	-Pequeña escala, pero efectiva a largo plazo.	-Bajo
<b>Lavado</b>	-Económicamente efectiva.	-Extractantes pueden afectar naturaleza del suelo. -Inefectivo frente algún metal.	-Pequeña escala, pero efectiva a largo plazo.	-Inferior a la media.

Tabla 2-5 Comparativa ventajas y desventajas técnicas remediación [3]

### 2.3.2 Empleo de polímeros naturales

Se trata de un tratamiento de tipo físico que se basa en el empleo de una mezcla de oligogalacturónidos (un tipo de polímeros) para contrarrestar los efectos de los metales pesados como contaminantes del suelo. Los resultados obtenidos evidencian su efectividad para contrarrestarla toxicidad así como cambios en los patrones de acumulación de metales en las plantas tratadas con estos polímeros naturales [21]. Dichos polímeros son productos bioactivos, obtenidos a partir de la corteza de cítricos, que forman complejos con los metales contaminantes del suelo. Se han llevado a cabo estudios sobre plantas de tomate empleando esta técnica que demuestran su efectividad como bloqueador del efecto contaminante del cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [21].

### 2.3.3 Tratamientos físico-químicos

Los métodos empleados en este trabajo se agrupan dentro de los tratamientos físico-químicos, que aprovechan factores como la gravedad y reacciones químicas para destruir, contener o separar el contaminante del suelo [22]. En comparación con las técnicas de biorremediación, estas técnicas son efectivas en un período de tiempo menor.

Dentro de los tratamientos físico-químicos existen gran variedad de técnicas útiles para la eliminación de metales de suelos. En la Figura 2-4 se muestran las más destacables.

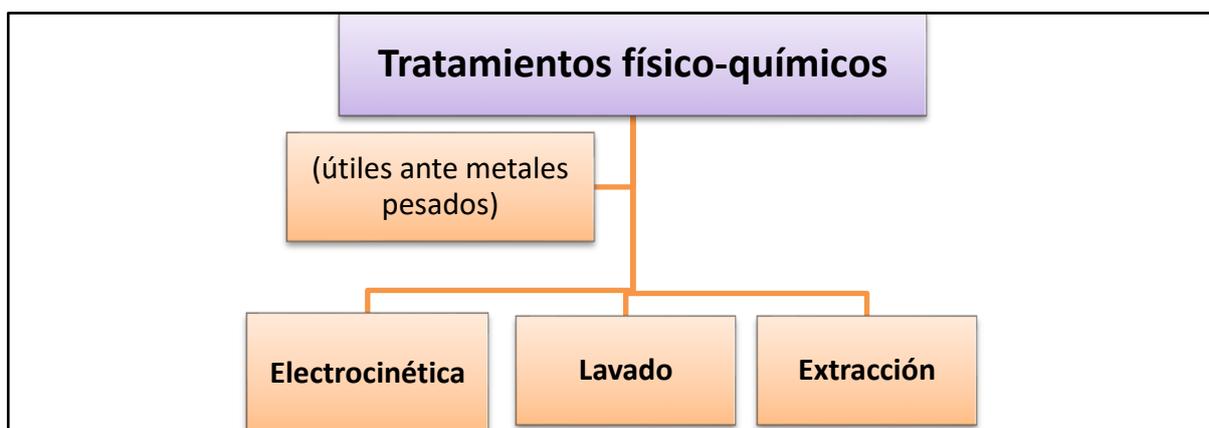


Figura 2-4 Tratamientos físico-químicos contra metales pesados [8]

#### 2.3.3.1 Electrocinética o Electromigración

Consiste en aprovechar las propiedades conductivas del suelo para separar los contaminantes inorgánicos (metales) del suelo. Se basa en el empleo de un campo eléctrico para eliminar los iones y de una corriente eléctrica de baja intensidad entre dos electrodos (uno positivo y otro negativo) que provoca que los iones metálicos con carga positiva migren hacia el cátodo y los aniones cargados negativamente se desplacen hacia el ánodo. También se puede emplear esta técnica para complementar técnicas de biorremediación [22].

#### 2.3.3.2 Lavado

El lavado de suelos es normalmente un tratamiento *ex situ* en el que el suelo excavado se separa previamente por tamizado, densidad o gravedad. Posteriormente se lava con sustancias químicas que absorben y solubilizan los contaminantes presentes en el suelo. Después del lavado con productos químicos, se lava el suelo con agua y se devuelve a su lugar original. Se utiliza para eliminar compuestos orgánicos semivolátiles, hidrocarburos derivados del petróleo y metales pesados [8].

#### 2.3.3.3 Extracción

Las técnicas de extracción son tratamientos físico-químicos, aplicados normalmente *in situ*, que están dirigidos a reducir la concentración de sustancias contaminantes en el suelo. El suelo debe ser

permeable para que las sustancias añadidas puedan atravesar sus poros y que los contaminantes puedan ser retirados. Las más importantes son: extracción de aire, extracción de agua, extracción de fase libre, extracción de fases densas, extracción con disolventes orgánicos [8]. Sin embargo, no todas son efectivas frente a metales pesados. A continuación, se explican en detalle aquellas que son aplicables a suelos contaminados por metales pesados.

- Extracción de agua

La extracción de agua es una técnica *in situ* utilizada para extraer el agua contaminada presente en el suelo, ya sea de la zona saturada (acuíferos) como no saturada (aguas superficiales) [23]. En el primer caso se bombea hasta la superficie el agua contaminada para ser posteriormente tratada; mientras que si no está saturada, se inyecta agua a presión o por gravedad para que arrastre y lave los elementos contaminantes del suelo hacia la zona saturada y después aplicar nuevamente el bombeo hasta la superficie. Es recomendable este método para la limpieza de aguas subterráneas contaminadas con compuestos orgánicos volátiles, combustibles y metales. Se debe tener en cuenta que al retirar aguas subterráneas se está provocando una disminución del nivel freático que podría perjudicar al ecosistema por la pérdida de humedad. No es el método más eficiente por su elevado coste y por el tiempo que requiere [8].

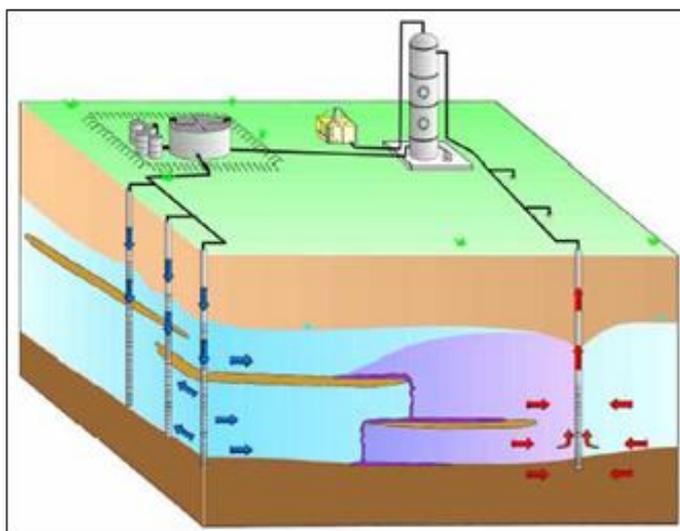


Figura 2-5 Técnica de extracción de agua [24]

En la Figura 2-5 se distinguen los pozos que inyectan agua (izquierda), que arrastran las aguas contaminadas presentes en el suelo hacia el nivel freático donde se encuentran los acuíferos, cuyas aguas son bombeadas a través de los pozos de bombeo (color rojo). Esas aguas contaminadas son tratadas en plantas especializadas y después pueden ser devueltas a los acuíferos.

- Extracción con disolventes

La forma de extracción con disolventes es una técnica *ex situ* en la que el suelo contaminado se mezcla en un tanque con un disolvente orgánico que absorbe parte de los contaminantes. La elección de dicho disolvente dependerá sobre todo de las características del suelo. Posteriormente, el suelo y el disolvente se separan por destilación, evaporación o filtración. Es una técnica útil para la extracción de metales pesados (con ácido clorhídrico por ejemplo) pero se debe tener en cuenta que el disolvente utilizado no sea tóxico para el suelo. Este es el método de extracción en el que se basan las técnicas empleadas en este trabajo. Esta categoría engloba tanto la forma convencional como la revolucionaria técnica asistida por microondas que serán explicadas con mayor detalle en los próximos capítulos [8].

## 2.4 Extracción sólido-líquido con disolventes

Actualmente, no existe un método que haya sido determinado por la comunidad científica como estándar para la extracción de metales del suelo. A mayores, el gran abanico de condiciones de trabajo, reactivos utilizables y el número de etapas de los procesos hace que sean muchas las técnicas cuya efectividad puede ser comparada [25]. El tipo de disolvente a utilizar cuando se quiere descontaminar una muestra de suelo resulta ser un factor determinante, puesto que en función del tipo de contaminante existirá un disolvente más o menos afín.

### 2.4.1 Método convencional

Tradicionalmente, para extraer las fracciones contaminantes de metales pesados que se encontraban en exceso en el suelo, se han seguido métodos desarrollados a finales de los años 70 [26]. Son procedimientos basados en la exposición sucesiva de una misma muestra de suelo a soluciones extractantes que, según los estudios de Tessier y Campbell, se aplican en el siguiente orden [25]:

- Electrolitos inertes concentrados
- Ácidos débiles
- Agentes reductores
- Agentes complejantes
- Agentes oxidantes
- Ácidos fuertes

Las muestras de suelo contaminado se ponen en contacto con los disolventes seleccionados y se agitan durante diferentes períodos de tiempo, en ocasiones hasta 16 horas. A pesar de la gran variedad de productos disolventes que se pueden usar con este método, se han destacado como sustancias extractantes más efectivas frente a metales en suelos las siguientes [26]:

- Agua regia para evaluar el riesgo antes de la diseminación del metal.
- AEDT, DTPA, ácido acético, para procesos físico-químicos.
- Extractantes débiles como cloruro de calcio o nitrato de calcio.
- Nitrato de sodio, acetato de amonio y cloruro de amonio.

Los disolventes que se han utilizado en este trabajo han sido: cloruro de calcio, ácido acético y ácido etilendiaminotetracético (AEDT). Aunque se consiguen buenos resultados, el tiempo y la cantidad de disolvente necesarios son también bastante elevados. En la última década se ha observado un creciente incremento de las investigaciones destinadas al desarrollo de técnicas de descontaminación de suelos. Las líneas generales de estos estudios apuntan hacia la automatización de los procesos, la reducción de los tiempos de extracción y la reducción de la cantidad de disolvente empleado [27].

### 2.4.2 Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas o MAE (Microwave Assisted Extraction) es una modificación del método convencional que incluye el calentamiento de un disolvente orgánico que está en contacto con el suelo contaminado por metales pesados. Ese calentamiento tiene lugar mediante el uso de la radiación microondas siguiendo el esquema de montaje que se puede apreciar en la Figura 2-6. Resulta muy complicado, e incluso en ocasiones innecesario, extraer por completo el contaminante del suelo. Al igual que existe la fracción biodisponible para ser absorbida por los seres vivos, hay también solo una fracción contaminante de algunos metales que se pueda extraer. Esta cantidad depende fundamentalmente de la temperatura, del tiempo y del disolvente empleado [17].

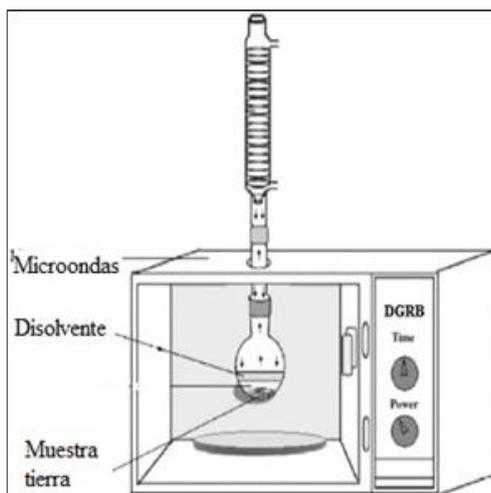


Figura 2-6 Montaje extracción asistida por microondas [28]

Esta técnica fue realizada por primera vez a finales de los 80 usando un microondas convencional, como el de la Figura 2-6, ante la necesidad de desarrollar un método rápido, seguro y barato para la extracción de pesticidas y antinutritivos presentes en el suelo [29].

Sus principales ventajas son que ofrece posibilidad de trabajar a elevadas temperaturas y presiones, aumentando drásticamente la velocidad del proceso de extracción; la reducción del volumen de disolventes empleado y la posibilidad de realizar extracciones múltiples (de varios contaminantes distintos) [27]. Ese aumento de la velocidad de extracción respecto al método convencional, se debe al modo en que se produce el calentamiento. Mientras que el método convencional precisa de un tiempo previo para calentar el recipiente que contiene la muestra, las microondas inciden directamente sobre la disolución acuosa [27].

Como punto negativo del empleo de esta técnica destacan la necesidad de que el disolvente cuente con la capacidad para absorber las microondas y que se debe controlar la temperatura del calentamiento para que los disolventes no se evaporen [27].

## 2.5 Teoría de las microondas

Las microondas son un tipo de ondas electromagnéticas de muy corta longitud de onda (entre 1 mm y 1 m) menores que las ondas de radio pero mayores que las ultravioletas, cuya frecuencia oscila entre 300 MHz y 300 GHz. Este tipo de ondas pueden funcionar bien como portadoras de información o bien como vectores de energía. De esta segunda forma es el caso de su aplicación más conocida: los hornos para calentar alimentos. No obstante, existen campos mucho más amplios en los que también se usan este tipo de ondas: telefonía, radares o remediación de suelos. Se forman por la unión de campos perpendiculares oscilantes (eléctrico y magnético) en el rango de frecuencias previamente mencionado [29].

Los microondas comerciales funcionan a una frecuencia de 2,45 GHz, que corresponde a una longitud de onda de 12,2 cm [29]. Lo que hace que la materia se caliente cuando incide sobre ella la radiación microondas es la agitación que ésta provoca en sus moléculas, originando calor debido a la fricción molecular. Una de las causas del calor es conocida como rotación de dipolos. A 2,45 GHz, los dipolos se desplazan aleatoriamente y se alinean  $4,9 \cdot 10^9$  veces por segundo. Esas fuerzas provocan el movimiento de las moléculas que dan lugar a la producción de calor [27]. Por este motivo, sólo las muestras y disolventes cuyas moléculas tengan la capacidad de formar dipolos pueden ser usados para este tipo de extracción [30]. Esa capacidad para absorber la energía de las microondas depende en gran medida del factor de disipación. Los disolventes polares (normalmente ácidos) absorben la energía porque mantienen un momento dipolar permanente que se ve afectado por las microondas. Los disolventes no polares (como el hexano), en cambio, no se calientan cuando son expuestos a microondas.

Sin embargo, no es la única forma en que se produce calor debido a las microondas. El otro motivo es la conducción iónica. Debido a las variaciones del signo del campo aplicado, la dirección en que se mueven los iones varía también. Dichas variaciones dan lugar a colisiones moleculares que generan calor.

Estos dos fenómenos son los causantes de que la temperatura aumente debido a las microondas.

## 2.6 Antecedentes

El científico estadounidense Percy Spencer fue el primero en calentar alimentos con microondas para demostrar su efectividad en 1945. El descubrimiento de esta aplicación tuvo lugar de forma accidental por este científico que trabajaba en el desarrollo en un radar basado en la tecnología del magnetrón. Tras varios experimentos y prototipos, en 1947 el primer horno comercial era vendido por la marca Raytheon. Pero no fue hasta 1986 cuando se empezaron a realizar experimentos en laboratorios empleando hornos de microondas para la extracción de pesticidas y antinutritivos del suelo [29].

En 1993 Onuska y Terry evaluaron la capacidad de las microondas para extraer pesticidas en muestras de sedimentos del suelo [27]. Compararon los rendimientos obtenidos con los métodos clásicos de descontaminación (Soxhlet) y concluyeron que tenía mucho mejor rendimiento. Este fue uno de los puntos de partida que provocaron que numerosos laboratorios comenzasen a estudiar las posibilidades de la extracción asistida por microondas para la descontaminación de suelos [27]. Aunque también se ha demostrado su aplicación para eliminar metales, han sido aplicadas sobre todo para la extracción de contaminantes orgánicos [27]. De ahí una de las motivaciones de este trabajo: demostrar su utilidad también frente a contaminantes inorgánicos.

En un trabajo previo realizado por la Universidad Politécnica de Madrid sobre extracción de metales pesados por microondas [31], se han utilizado tres disolventes orgánicos adecuados para extraer Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn. Dicha extracción se realiza en tres etapas: en la primera fase se emplea cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) con concentración  $0,01 \text{ mol/L}^{-1}$ ; para la segunda ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) de concentración  $0,43 \text{ mol/L}^{-1}$  y por último ácido etilendiaminotetracético (AEDT)  $0,05 \text{ mol/L}^{-1}$  [31]. Los resultados obtenidos mostraron una gran variedad en el porcentaje de metales extraídos en función de la concentración, el tiempo, la temperatura y el tipo de metal. En la Tabla 2-6 se muestran las combinaciones usadas en ese trabajo.

Disolvente	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
$\text{CaCl}_2$	5	50
$\text{CH}_3\text{COOH}$	15	120
AEDT	5	50

Tabla 2-6 Parámetros MAE [31]

Según Sparr Eskilsson y Björklund [27], la aplicación de microondas durante menos de 10 minutos a muestras de suelo contaminadas con metales pesados utilizando tolueno como disolvente produce resultados equivalentes a la extracción convencional de metales por agitación a  $40 \text{ °C}$ . Se destacan en estas experiencias casos como los de la extracción de zinc y níquel, en los que la reducción de tiempos disminuyó de 17,5 horas por el método convencional de agitación a tan solo 2 minutos empleando las microondas [27].

### 2.6.1 Parámetros

Los principales condicionantes que influyen en la extracción de metales por microondas son:

- Selección de disolventes

Una correcta selección de los disolventes a emplear es fundamental para el éxito del proceso. Deben ser disolventes capaces de absorber la radiación microondas. Otro aspecto importante es la compatibilidad de la sustancia disolvente con el método analítico que se use posteriormente para el análisis de resultados [27], en este caso la espectrofotometría.

- Temperatura adecuada

Una temperatura muy elevada no garantiza la mayor optimización de la técnica, pero sí que es cierto que por normal general, cuanto mayor sea la temperatura, mayor capacidad tienen los disolventes para absorber los contaminantes. En el caso de los metales el rango de temperaturas óptimas para la extracción es muy variable, desde los 40 °C hasta 125 °C en algunos casos [27].

- Tiempo de extracción

Esta es la principal ventaja que presenta la extracción asistida por microondas frente a los métodos convencionales. Y es que los estudios previos aseguran que a menudo con 10 minutos de tratamiento aproximadamente es suficiente [27]. No obstante, este valor depende de muchas variables como el disolvente utilizado o el metal a extraer.

## 2.7 Contaminación de suelos por microorganismos

Aunque el tipo de contaminación estudiado a lo largo de este trabajo han sido los metales pesados en concentraciones tóxicas para el correcto desarrollo de los suelos, de los medios de sus proximidades y de los organismos que viven en él y de él, existen multitud de tipos de contaminación que afectan al medio ambiente. El crecimiento exponencial de las industrias a lo largo del siglo XX ha transformado completamente la forma de vivir del ser humano, pero también ha tenido aspectos negativos que repercuten en los ecosistemas. El incremento de la producción y uso de compuestos orgánicos sintéticos como plaguicidas, lubricantes o gasolinas ha provocado también un aumento en el número de incidentes en que esas sustancias orgánicas han llegado a los suelos y sedimentos [32]. En muchos casos esos incidentes han sido responsables del aumento de la actividad microbiana en el suelo y en las aguas.

Los organismos que habitan el suelo se clasifican según su tamaño en macroorganismos y microorganismos. Los primeros, son aquellos animales visibles del suelo: mamíferos, anélidos, moluscos y artrópodos. Dentro de los macroorganismos se incluyen también las raíces de las plantas cuyo papel es vital para el desarrollo de muchos microorganismos. Unos microorganismos que son los intermediarios entre los minerales y los seres vivos. Con sus reacciones metabólicas incorporan los materiales presentes en el medio y son la base de la que depende la fertilidad de un suelo. Cada uno realiza su función específica: fijar nitrógeno atmosférico (cianobacterias), romper la materia orgánica de plantas y animales, realizar la fotosíntesis etc [33]. El grupo de microorganismos que interesa para este trabajo es el de las bacterias que habitan en el suelo, materia putrefacta y en las aguas.

Las bacterias son abundantes y pequeñas, de 0,1 a 1 micras. Las hay aerobias (precisan de oxígeno), anaerobias (crecen en ausencia de oxígeno) o facultativas (crecen con o sin oxígeno). Si se alimentan de compuestos orgánicos se denominan heterótrofas y si lo hacen de sustancias inorgánicas son autótrofas [33].

Pero no es sólo en el suelo donde se desarrollan las bacterias. Más importantes por su relación directa con el consumo humano son aquellas que viven en el agua y cuya presencia puede ser un parámetro para determinar un medio acuático como contaminado. Según la ley de calidad de aguas para el consumo humano [34], para determinar la calidad de un agua se deben analizar los siguientes parámetros: olor, sabor, turbidez, color, conductividad, concentración del ión hidrógeno o pH, amonio, *Escherichia coli*

(*E. coli*) y bacterias coliformes. En la Tabla 2-7 se detallan los valores umbrales definidos por el Estado para la acumulación de bacterias coliformes en aguas aptas para el consumo humano.

Parámetro	Valor paramétrico*
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC en 100 mL
<i>Enterococo</i>	0 UFC en 100 mL
<i>Clostridium perfringens</i> (incluidas las esporas)	0 UFC en 100 mL

**Tabla 2-7 Cantidad coliformes admisibles en aguas [34]**

(\*) UFC (*Unidad formadora de colonias*): hace referencia al número de microorganismos.

La primera de estas bacterias, por ser la más general, es las que se ha analizado durante el proceso de experimentación a lo largo del desarrollo de este trabajo, para determinar si las técnicas de extracción de contaminantes del suelo son aplicables frente a este tipo de microorganismos.

### 2.7.1 Bacteria '*Escherichia coli*'

Cuando se habla de organismos coliformes, se hace referencia a un grupo de bacterias con características bioquímicas semejantes y cuya aparición en un medio, sobre todo en el agua y en alimentos, implica la existencia de contaminación en ese medio.

*'El grupo de coliformes engloba bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados'* [35]. Este grupo de microorganismos se caracteriza por fermentar la lactosa y formar ácido dentro de un margen de 48 horas a 37 °C [36].

Concretamente, el microorganismo de esa categoría en el que se centra este trabajo es la bacteria aerobia *E. coli*, del latín '*Escherichia coli*'. Esta bacteria precisa de oxígeno para su correcto desarrollo. Fue descubierta por el alemán Theodor von Escherich en 1860 que la bautizó simplemente como '*bacterium coli*', que significa bacteria del intestino [33]. Está presente en el intestino de los organismos de sangre caliente y, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), puede ocasionar graves intoxicaciones alimentarias. Las principales fuentes de bacterias proceden de la contaminación fecal del agua y de otros alimentos. Normalmente, se transmite al hombre por consumir alimentos contaminados, como por ejemplo productos de carne picada cruda, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas [37].

Palabras textuales de la OMS afirman que *'también se ha aislado E. coli en masas de agua (estanques y arroyos), pozos y abrevaderos, y se ha observado que puede sobrevivir durante meses en el estiércol y en los sedimentos de recipientes de agua. Se ha informado de casos de transmisión por el agua, tanto por agua de bebida contaminada como por aguas de recreo'* [37].

La relación de este trabajo con estos microorganismos reside precisamente en tratar de evitar esa transmisión de la bacteria al ser humano. Una técnica de extracción sólido-líquido asistida por la radiación microondas que pueda eliminar bacterias presentes en el agua, las cuales podrían trasladarse a alimentos y seres vivos, aumentaría el abanico de ventajas que proporciona el aplicar estos procesos a suelos contaminados.



## 3 DESARROLLO DEL TFG

En el presente apartado se describen los materiales y equipos empleados, así como los procedimientos que se han llevado a cabo para el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado. Se muestra también el plan de trabajo que se ha seguido en la realización de las distintas experiencias.

### 3.1 Material y equipos

#### 3.1.1 *Analizador de humedad*

Antes de preparar las muestras de suelo a descontaminar, ha sido necesario calcular su humedad. Esto se ha realizado antes de cada ensayo puesto que el porcentaje de humedad del suelo varía en función del día de análisis. Se ha utilizado el analizador de humedad 'RADWAG' modelo 'MA 110 R' que se muestra en la Figura 3-1 y que posee una precisión de 0,001 g. El dato de la humedad es muy importante puesto que para la realización de los cálculos es necesario conocer la cantidad de suelo seco que hay en cada una de las muestras. Se han utilizado muestras de 1 g de suelo para el análisis de la humedad, las cuales se introducen en la bandeja del equipo para ser calentadas mediante un halógeno y un radiador infrarrojo y posteriormente ser secadas. El dato obtenido es el porcentaje de humedad que contiene la muestra de suelo contaminado.



Figura 3-1 Analizador de humedad

#### 3.1.2 *Balanza digital*

La balanza digital 'BLAUSCAL' serie 'AH' se ha usado para pesar las muestras de suelo a descontaminar y los reactivos necesarios para preparar las distintas disoluciones. Este equipo proporciona una precisión de 0,001 g. A la hora de realizar las mediciones se coloca sobre la balanza un vidrio de reloj y se tara el equipo quedando el montaje tal y como se muestra en la Figura 3-2.



**Figura 3-2 Balanza digital**

### 3.1.3 *Agitador orbital*

Con el equipo que se puede apreciar en la Figura 3-3 se realizan las experiencias de extracción convencional. Dado que el tiempo durante el que se debe estar agitando el suelo contaminado con el disolvente es muy alto, el trabajo automático de este equipo resulta muy provechoso. Además de seleccionar las revoluciones de trabajo y el tiempo de extracción, cuenta con una incubadora en la parte superior que permite establecer las condiciones de temperatura. Las muestras se introducen en un matraz Erlenmeyer y mediante las barras horizontales se ajusta la posición para que no se mueva durante el proceso de agitación. Las condiciones establecidas durante las extracciones han sido 120 rpm, 25 °C y el tiempo asociado a cada disolvente se detalla en el apartado 3.3.3. Este equipo es de la casa 'OVAN'.



**Figura 3-3 Agitador orbital con incubador**

### 3.1.4 *Microondas*

Es un equipo vital para la realización de este trabajo. Se ha utilizado un microondas convencional de la marca 'SHARP' modificado en el laboratorio con potencia máxima de 800 W. Los parámetros que se pueden ajustar en el equipo son únicamente el tiempo y la potencia de trabajo. Para evitar que el disolvente se evapore al ser calentado por las microondas se ha practicado en su parte superior un orificio y se ha introducido un condensador por el que se recircula agua que actúa como refrigerante. De este modo, la fracción de disolvente en forma de vapor que asciende por el condensador se devuelve al balón en el que se encuentra la muestra de suelo contaminada. Dicho balón se fija en el centro del microondas utilizando una pinza de sujeción. En la Figura 3-4 se presenta un esquema del montaje.

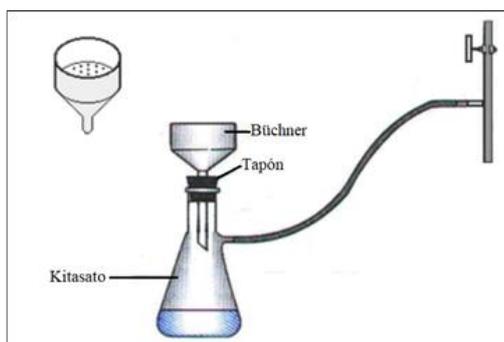


**Figura 3-4 Equipo microondas**

Sin embargo, el orificio practicado en el microondas supone cierto peligro para la realización de las experiencias. Si bien la parte interna del microondas está formada por una cubierta metálica que actúa como jaula de Faraday para evitar que se escape radiación del equipo, se ha comprobado que parte de la radiación microondas se dispersa por la abertura de la parte superior. Por ese motivo se ha recubierto y sellado el orificio con cinta adhesiva de aluminio. Aun así, es recomendable que durante el tiempo de funcionamiento del equipo circule el menor personal posible por sus inmediaciones.

### 3.1.5 *Equipo de filtración a vacío*

Una vez realizadas las extracciones de metales pesados por ambos métodos es necesario separar el suelo del disolvente para su posterior análisis. Para ello se lleva a cabo la técnica de filtración mediante el equipo de filtración a vacío que se muestra en la Figura 3-5.



**Figura 3-5 Esquema filtración a vacío**

Este equipo consta de dos partes principales: embudo Büchner y matraz Kitasato. En el embudo se introduce un filtro de microfibras de vidrio en el que se vierte la muestra sólido-líquida a separar. Dicho filtro, mostrado en la Figura 3-6, tiene 90 mm de diámetro y un diámetro de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ . El peso del filtro es de 0,39 g, dato de importancia a la hora de calcular las pérdidas de suelo durante la filtración.



**Figura 3-6 Filtro de microfibras de vidrio**

El éxito de esta técnica se debe al efecto Venturi. El matraz Kitasato presenta un pequeño orificio en un lateral que se conecta a un grifo a través una manguera. Cuando se abre el agua en el Büchner se genera el vacío necesario para que se filtre la muestra sólida del líquido.

### 3.1.6 Espectrofotómetro

La forma de medir la cantidad de metales pesados que se extraen del suelo en cada experiencia es la espectrofotometría, que consiste en realizar un análisis óptico mediante el equipo de la Figura 3-7, de la marca 'ANALYTIK JENA' y modelo 'SPEKOL 1500'.



Figura 3-7 Espectrofotómetro

El espectrofotómetro empleado usa la radiación UV-visible, cuya longitud de onda se engloba dentro del espectro electromagnético entre los 380 nm y 780 nm, tal y como muestra la Figura 3-8. Utiliza la radiación en sus rangos visible, ultravioleta (UV) cercano e infrarrojo (IR) cercano [38]. El equipo cuenta con una fuente de luz responsable de iluminar la muestra de forma directa y estable. En función de la longitud de onda seleccionada (en este trabajo han sido 600 nm), se mide la concentración de componentes químicos presentes en la muestra a analizar.

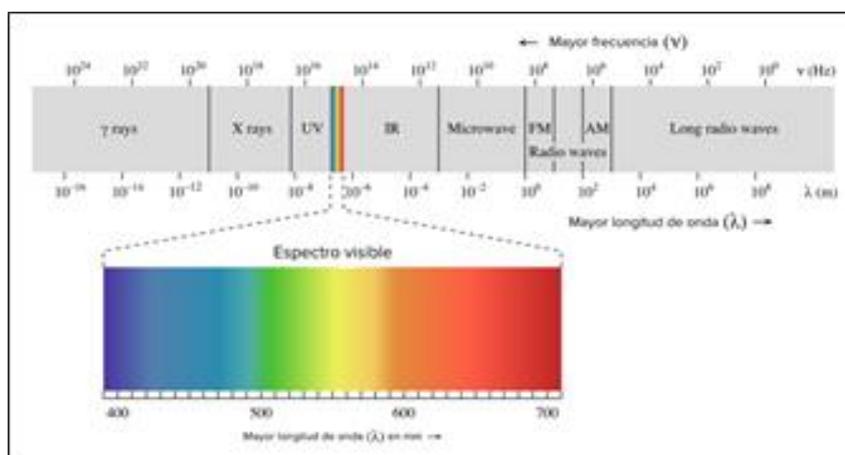


Figura 3-8 Espectro de luz visible [39]

La técnica de la espectrofotometría UV-visible es la más utilizada para la determinación cuantitativa de disoluciones de iones metálicos [38]. La base del funcionamiento del equipo es el principio de absorción de la radiación ultravioleta. Hace pasar a través de la disolución de iones metálicos un haz de luz y mide su intensidad. Compara esa intensidad de luz resultante con la intensidad inicial antes de atravesar la muestra y calcula la relación entre ambas. Este parámetro se denomina transmitancia (%T) y se calcula según la ecuación (Ec. 3-1). Sin embargo, el dato que muestra en pantalla el equipo es el de absorbancia (A) que se calcula en base a la ecuación (Ec. 3-2) conocida como ecuación de Beer-Lambert [38].

$$\%T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Ec. 3-1}$$

$$A = -\log(\%T) \quad \text{Ec. 3-2}$$

Esta técnica es la que ha permitido el análisis objetivo de los resultados de cada extracción. Para llevarla a cabo, se debe realizar seleccionando en el espectrofotómetro aquella longitud de onda que corresponda al máximo de absorción y que minimice los posibles errores debido a variaciones de la longitud de onda. En este trabajo todas las espectrofotometrías se han realizado a 600 nm, puesto que se ha obtenido que el espectro de absorbancia de una disolución que contenía 8,5 mL de disolución patrón de cobre y 5,0 mL de amoníaco, se encuentra entre 550 y 650 nm [38]. El amoníaco se añade para conseguir que las partículas del elemento cuya concentración se está analizando puedan ser detectables por el equipo.

Para introducir las disoluciones en el espectrofotómetro se utilizan unas cubetas especiales de vidrio óptico de muy alta calidad, apto para trabajar con longitudes de onda entre 320 nm y 2500 nm.

### 3.1.7 Equipos auxiliares

- Campana extractora de gases. Mostrada en la Figura 3-9, pertenece a la marca 'ERLAB GROUP' dentro del modelo 'CAPTAIR ®FLEX™' y se ha utilizado para manipular reactivos que pueden ser perjudiciales para la salud en caso de ser inhalados, como el amoníaco (NH<sub>3</sub>).



Figura 3-9 Campana extractora

- Agitador magnético. A la hora de preparar los disolventes y demás disoluciones, para asegurar su completa dilución se ha utilizado el equipo de la Figura 3-10, de la marca 'BIPEE' y modelo 'SH-2 MAGENTIC STIRRER'. Introduciendo en el vaso de precipitados un imán se ayuda a homogeneizar las disoluciones.



Figura 3-10 Agitador magnético

- Autoclave. Este equipo de la marca ‘JP SELECTA’ y modelo ‘MED 20’ se ha utilizado para esterilizar las Placas Petri que han sido usadas en la preparación de medios de cultivo de bacterias. Se muestra en la Figura 3-11.



**Figura 3-11 Autoclave**

- Estufa. Ha sido necesario el uso de una estufa de laboratorio de la marca ‘INDELAB’ representada en la Figura 3-12, para mantener durante largos períodos a temperaturas constantes los cultivos de bacterias durante el proceso de incubación de las mismas



**Figura 3-12 Estufa**

- Equipo de medición ICP-OES. Este es el equipo con el cual se han realizado las mediciones de concentración de los analitos en las muestras de disolventes enviadas al Centro de Apoyo Científico-Tecnológico a la Investigación de la Universidad de Vigo. Perteneció a la marca ‘PERKIN ELMER’ y es el modelo ‘Optima 4300 DV’, representado en la Figura 3-13.



**Figura 3-13 Equipo medición ICP-OES [40]**

### 3.2 Plan de trabajo

En la Figura 3-14 se muestra una visión general de cómo se han llevado a cabo las experiencias que permitieron alcanzar las conclusiones posteriores de este trabajo. Se pueden distinguir dos fases generales: la contaminación de un suelo con metales pesados y la posterior descontaminación del mismo. Por último, tras haber aplicado las técnicas de remediación se procede al análisis de los resultados por medio de espectrofotometría.

En primer lugar, fue necesario contaminar una cantidad considerable de suelo con metales pesados que será el suelo contaminado objeto de estudio. Posteriormente se llevan a cabo las técnicas de descontaminación por extracción para muestras de 2 g y de 10 g, tanto por el método convencional como la extracción asistida por microondas. Para esta última se realizó previamente un barrido de tiempos que permitiese determinar el tiempo óptimo de microondas para cada disolvente. Una vez realizadas las extracciones, se separan por filtración el suelo y el disolvente. Cada uno de los disolventes después de ser separado del suelo contaminado es analizado por espectrofotometría para saber así la cantidad de contaminante que se ha extraído. De este modo se puede comprobar la validez de la novedosa técnica de las microondas para extraer metales y comparar su rendimiento con el del método tradicional.

Como último paso, se llevó a cabo un estudio bacteriológico en el que se comprobó si las técnicas de descontaminación anteriores son útiles para la eliminación de bacterias presentes en medios contaminados.

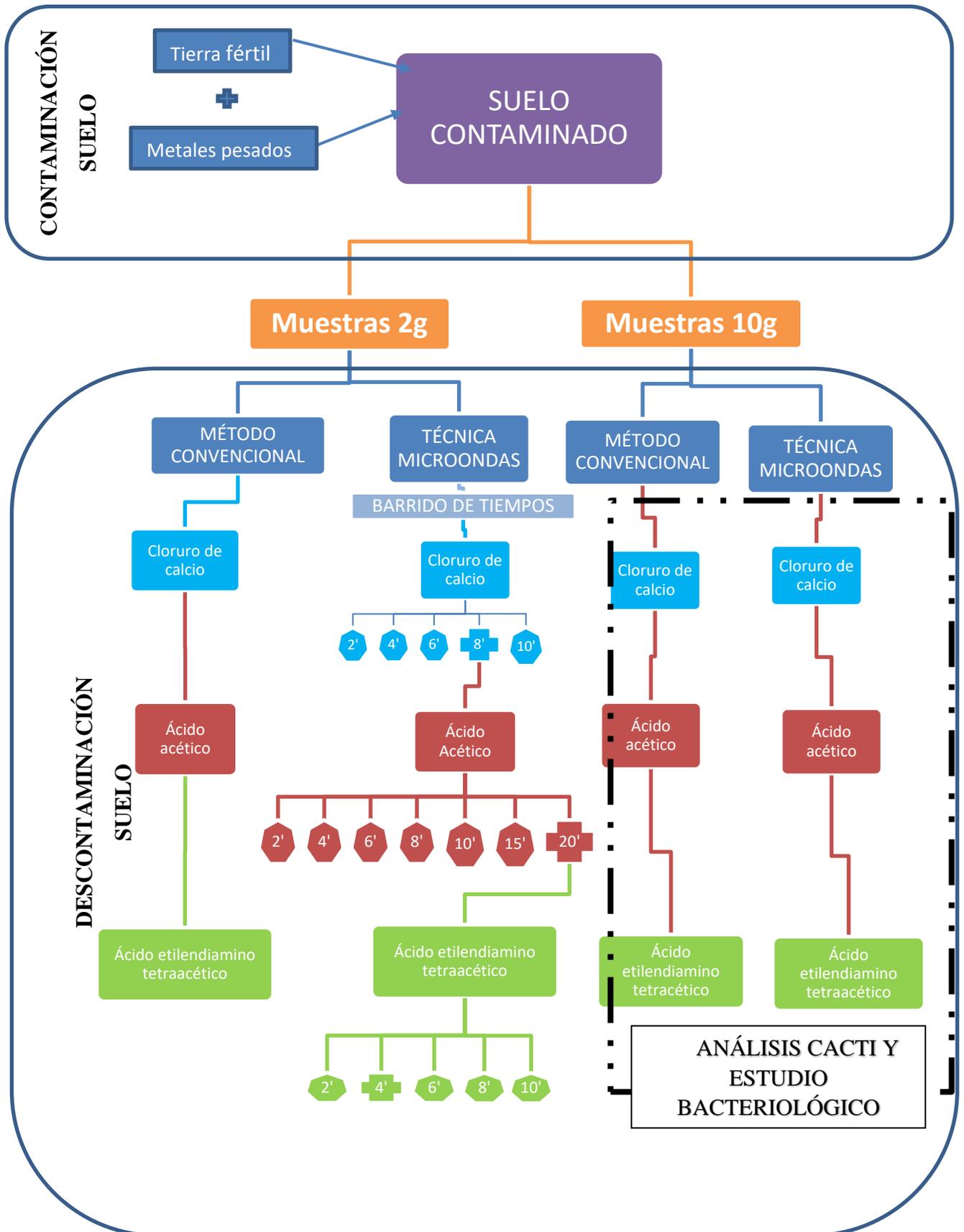


Figura 3-14 Plan de trabajo descontaminación del suelo

Para resolver la disyuntiva de la Figura 3-15 se realiza un cultivo de bacteria *E. coli* que se añade a una porción del suelo contaminado con metales pesados. Éste se somete nuevamente a los procesos de descontaminación convencional y mediante microondas para analizar si además de reducir la cantidad de metales pesados, ayudan también a eliminar las bacterias del suelo.

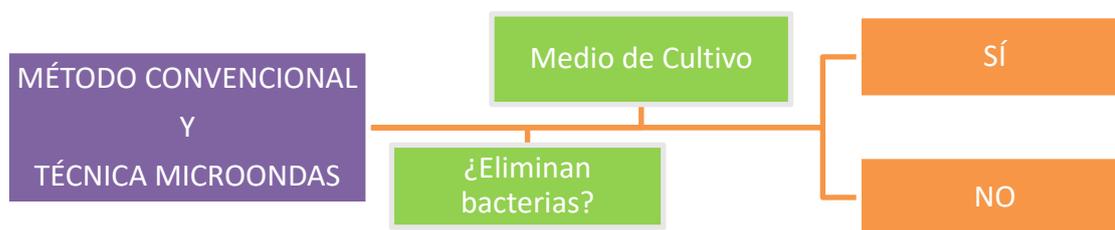


Figura 3-15 Plan de trabajo medio de cultivo

### 3.3 Metodología y procedimiento

#### 3.3.1 Contaminación del suelo

En primer lugar, fue necesario conseguir el suelo contaminado que simulase un suelo alterado por metales pesados, el cual ha sido objeto de las técnicas de descontaminación. Para ello se procedió a contaminar en el laboratorio 0,5 kg de tierra comercial para cultivos de la marca ‘COMPO’ cuya composición se recoge en la Tabla 3-1.

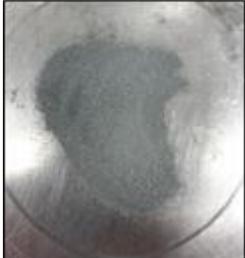
Propiedad	Valor
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,0 - 6,0
Contenido en sal (KCl) g/L:	<3,0
Contenido en abono (nutrientes solubles) mg/L:	200 – 450 Nitrógeno (N)
	200 – 500 Fosfato (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )
	300 – 550 Óxido de potasio (K <sub>2</sub> O)
Contenido básico	Turba, Perlita, AGROSIL <sup>®</sup> , cal y elementos nutrientes.

Tabla 3-1 Composición tierra comercial

La concentración deseada de cada contaminante en el suelo era de 1000 ppm (mg metal/kg suelo), por lo que se añadieron al suelo 500 mg de hierro (Fe), cobre (Cu) y zinc (Zn), cuyas especificaciones se muestran en la Tabla 3-2. Para ello se mezclan dichas cantidades de cada metal en agua y se vierten en el recipiente de plástico que contiene la muestra de suelo dando como resultado la Figura 3-16. Es necesario remover a conciencia la mezcla para garantizar que los contaminantes se distribuyen de forma homogénea por todo el volumen de suelo.



Figura 3-16 Muestra suelo contaminado

Metal	Propiedad	Unidad	Valor
 Cobre (Polvo)	Fórmula química	-	Cu
	Peso molecular	g/mol	63,54
	Marca	-	Quimipur
	Punto de fusión	°C	1083
	Punto de ebullición	°C	2595
 Hierro (Polvo)	Fórmula química	-	Fe
	Peso molecular	g/mol	55,85
	Riqueza	%	99,5
	Marca	-	Quimipur
	Punto de fusión	°C	1535
 Zinc (Polvo)	Fórmula química	-	Zn
	Peso molecular	g/mol	65,38
	Marca	-	Fisher Scientific
	Punto de fusión	°C	419,5
	Punto de ebullición	°C	906

**Tabla 3-2 Especificaciones metales pesados**

Una vez preparada la muestra de suelo se deja reposar con el recipiente sellado durante 4 días a temperatura ambiente, con el fin de proporcionar tiempo de contacto entre los contaminantes y el suelo y favorecer la adsorción para simular una situación de contaminación real.

### 3.3.2 Preparación de los disolventes

Los disolventes seleccionados para las experiencias de extracción fueron el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), el ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) y el ácido etilendiaminotetracético (AEDT). La relación suelo-disolvente utilizada en las experiencias es 1:10, basado en las experiencias previas realizadas en trabajos similares [31], utilizando 20 mL de disolvente para la remediación de muestras de 2 g de suelo y 100 mL en el caso de las muestras de 10 g de suelo. Las características de los disolventes se especifican en la Tabla 3-3.

Los cálculos realizados a la hora de preparar las disoluciones se detallan en el Anexo I, pero a continuación se enumeran, de forma resumida, las cantidades de reactivos empleadas en dicha tarea:

- 0,37 g de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) dihidratado para preparar 250 mL de disolución 0,01 M.
- 7,14 mL ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) para preparar 250 mL de disolución 0,5 M.
- 1,46 g de ácido etilendiaminotetracético (AEDT) para preparar 100 mL de disolución 0,05 M.

Disolvente	Propiedad	Unidad	Valor
<b>Cloruro de calcio dihidratado (Polvo)</b> 	Formula química	-	CaCl <sub>2</sub> ·(2H <sub>2</sub> O)
	Marca	-	Vorquímica
	Peso molecular	g/mol	147,08
	Densidad (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	1,85
	Punto de fusión	°C	176
	Solubilidad	g/L	1280
	Riesgo y peligrosidad	-	 Irritante
<b>Ácido acético (Líquido)</b> 	Formula química	-	CH <sub>3</sub> COOH
	Marca	-	Vorquímica
	Peso molecular	g/mol	60,05
	Pureza	%	99,5
	Densidad (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	1,05
	Punto de ebullición	°C	118
	Punto de inflamabilidad	°C	39
	pH	-	2,5
	Solubilidad	g/L	602,9
Riesgo y peligrosidad	-	 Inflamable-Corrosivo	
<b>Ácido etilendiamino-tetracético (Polvo)</b> 	Fórmula química	-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
	Marca	-	Labkem
	Peso molecular	g/mol	292,24
	Pureza	%	99
	Riesgo y peligrosidad	-	 Peligro salud

Tabla 3-3 Especificaciones disolventes

### 3.3.3 Extracción convencional

Esta técnica de extracción se ha realizado en primer lugar para extraer los metales pesados del suelo contaminado de la forma tradicional [25]. Se ha llevado a cabo en dos ocasiones separadas un margen de tiempo considerable entre ellas para comprobar si este hecho afectaba a los resultados, la primera 4 días después de haber contaminado el suelo y la segunda 15 días más tarde. Para ello se han estudiado muestras de 2 g de suelo contaminado aplicando los siguientes pasos, cuyas condiciones de trabajo se resumen en la Figura 3-17.

- En primer lugar, se mezclan 2 g de suelo con 20 mL de  $\text{CaCl}_2$ , el primero de los tres disolventes, en un matraz Erlenmeyer. Se introduce la muestra sólido-líquido en el agitador orbital, y se deja trabajar a 120 rpm y 25 °C durante 3 horas. Una vez ha transcurrido este tiempo se somete a la muestra a filtración a vacío para separar el suelo sólido del disolvente líquido. Es importante conservar el filtro puesto que una vez se seque, será necesario pesarlo para determinar las pérdidas que han tenido lugar durante el proceso. El líquido extraído se analiza por espectrofotometría y el resultado obtenido ofrece una idea de la fracción de metales pesados que se han extraído del suelo.
- En segundo lugar, el extracto sólido se vuelve a poner en contacto con el segundo disolvente, el  $\text{CH}_3\text{COOH}$  en este caso. Se repite el proceso de agitación en las mismas condiciones, pero en esta ocasión la mezcla permanece agitándose durante 16 horas. Nuevamente se realiza el filtrado y la espectrofotometría del compuesto líquido.
- Por último, se repite todo el proceso anterior para el disolvente AEDT al que sólo se le otorga un tiempo de extracción de 1 hora.

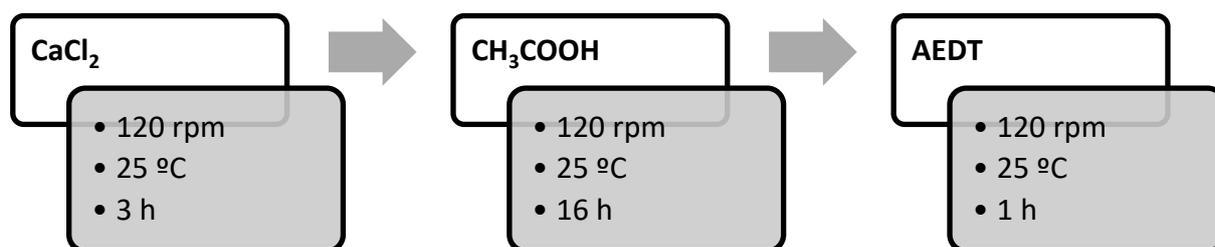


Figura 3-17 Ciclo de extracción por método convencional

### 3.3.4 Extracción asistida por microondas (MAE)

La novedosa técnica de extracción con microondas requirió el uso del equipo microondas diseñado para este fin, pero siguiendo el procedimiento y ciclo de experiencias utilizadas para el método convencional. Sin embargo, a la hora de realizar el estudio de la técnica de extracción asistida por microondas para comparar su efectividad frente al método convencional, surge la problemática de qué condiciones de trabajo seleccionar para la realización del estudio. En lo que respecta a la potencia, basándose en estudios previos y los resultados obtenidos [31], se decidió utilizar el 20 % de la potencia del equipo microondas (160 W). La cantidad de disolvente empleada, como se ha explicado con anterioridad fue 1:10 (g suelo/mL de disolvente). Por lo tanto, el parámetro a modificar y que resultaba una incógnita para el estudio era el del tiempo. Tanto es así que se realizó un barrido de tiempos para averiguar cuáles eran los valores que optimizaban el rendimiento de la técnica. Al final de este documento, en el Anexo II, se puede encontrar una tabla-resumen de todos los ensayos realizados por todos los métodos con los parámetros que se han variado en cada uno de ellos.

#### 3.3.4.1 Barrido de tiempos

Durante la fase de experimentación se llevó a cabo un estudio para determinar el tiempo óptimo que se debe introducir cada muestra con cada uno de los disolventes en el microondas para maximizar el rendimiento. Las muestras de suelo utilizadas para los barridos fueron siempre de 2 g de suelo y 20 mL de cada disolvente. En cuanto al procedimiento y material empleado fue similar al método convencional.

Una vez transcurrido el tiempo de trabajo del equipo, se extrae el balón, se cierra el agua, se realiza la filtración a vacío y el posterior análisis espectrofotométrico del disolvente extraído. Todos los resultados de dichas espectrofotometrías se recogen en el apartado 4.2.

#### 3.3.4.1.1 Barrido cloruro de calcio

Se toman 5 muestras de suelo y se introducen en los balones de vidrio. A cada uno se le asigna un tiempo distinto de microondas. Para el primer barrido se utilizan los tiempos de la Tabla 3-4.

#### 1<sup>er</sup> Barrido

Nº Muestra	Tiempo Microondas CaCl <sub>2</sub>
1	2 min
2	4 min
3	6 min
4	8 min
5	10 min

Tabla 3-4 Barrido tiempos CaCl<sub>2</sub>

Lo que se pretende es que la cantidad de metales extraídos en el tiempo ‘x’ seleccionado se asemeje a la cantidad de metales que se extraen de la forma convencional, con el factor de que el tiempo empleado es mucho menor.

#### 3.3.4.1.2 Barrido ácido acético

Nº Muestra	1 <sup>er</sup> Barrido	2 <sup>o</sup> Barrido
	Tiempo CaCl <sub>2</sub>	Tiempo Microondas CH <sub>3</sub> COOH
6	x min	2 min
7	x min	4 min
8	x min	6 min
9	x min	8 min
10	x min	10 min
11	x min	15 min
12	x min	20 min

Tabla 3-5 Barrido de tiempos CH<sub>3</sub>COOH

Una vez se ha fijado el tiempo para el primer disolvente, se vuelven a preparar nuevas muestras de suelo. Como el tiempo asociado al ácido acético por el método convencional (16 horas) era mucho mayor que para el cloruro de calcio (3 horas), se estima que los valores máximos en este segundo barrido se alcanzarán para tiempos mayores. Es por eso que se amplía el abanico y se preparan 7 muestras de suelo a las que se le añade el primer disolvente con su tiempo óptimo (‘x’), se filtran, y se realiza el segundo barrido para los tiempos de la Tabla 3-5.

### 3.3.4.1.3 Barrido AEDT

Conocidos ya los tiempos tanto para el primero como el segundo disolvente, se procede a realizar el tercer barrido con el ácido etilendiaminotetracético (AEDT), para lo cual se preparan otras 5 muestras de suelo y se repiten los procesos anteriores según se explica en la Tabla 3-6.

Nº Muestra	1 <sup>er</sup> Barrido	2 <sup>o</sup> Barrido	3 <sup>o</sup> Barrido
	Tiempo CaCl <sub>2</sub>	Tiempo CH <sub>3</sub> COOH	Tiempo Microondas AEDT
13	x min	y min	2 min
14	x min	y min	4 min
15	x min	y min	6 min
16	x min	y min	8 min
17	x min	y min	10 min

Tabla 3-6 Barrido de tiempos AEDT

Llegados a este punto, tras haber descontaminado 17 muestras de suelo, haber realizado en total 34 extracciones con sus filtraciones y las correspondientes espectrofotometrías cuyos resultados se mostrarán en el apartado 4.2.2, se habrá llegado a la combinación más adecuada para extraer metales pesados del suelo con estos disolventes. El proceso completo se resume en la Figura 3-18.

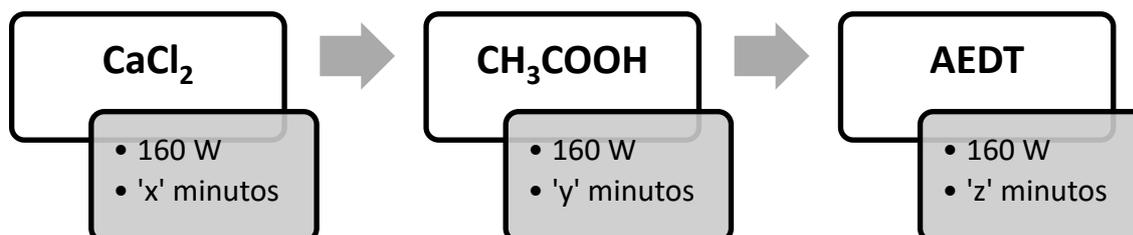


Figura 3-18 Ciclo teórico óptimo de extracción asistida por microondas

### 3.3.5 Medición CACTI

Una vez fueron determinados los tiempos óptimos para cada disolvente en el microondas, se repitió el proceso completo por los dos métodos estudiados, para una cantidad de suelo contaminada de 10 g. La relación 1:10 entre muestra y disolvente se mantuvo, por lo que se utilizaron 100 mL de cada disolvente para cada ensayo. De este modo se pudo comprobar la utilidad de los métodos para descontaminar mayor cantidad de suelo.

Los valores de cobre extraído se calcularon en el laboratorio del mismo modo que las anteriores experiencias realizadas para las muestras de 2 g de suelo. No obstante, una muestra de cada disolvente extraído por ambos métodos fue enviada al CACTI (Centro de Apoyo Científico-Tecnológico a la Investigación) de la Universidad de Vigo para medir la cantidad extraída de los otros metales pesados (hierro y zinc) y conseguir así un análisis completo. La técnica utilizada en este centro fue la de ICP-OES.

ICP-OES son las siglas que definen la técnica de Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente. Se utiliza para determinar cuantitativamente el contenido de casi todos los elementos de la tabla periódica en soluciones acuosas, hasta una concentración del orden de µg/L. En este trabajo fue aplicada para medir la cantidad de hierro y zinc presente en los disolventes extraídos durante las experiencias realizadas en el laboratorio. Para ello, las muestras enviadas se diluyen con agua ultrapura mili-Q® hasta una concentración 1:5 y con HNO<sub>3</sub> al 2 %. La dilución acuosa se mezcla con

una corriente de argón y se convierte en pequeñas gotas formando un aerosol. Todas las pequeñas partículas de los elementos presentes en el aerosol se depositan en un plasma de argón a 10000 °C, que fue generado por la ionización del argón tras ser sometido a un campo de radiofrecuencia. A esa temperatura las partículas emiten luz con una longitud de onda característica. Un complejo sistema de lentes consigue separar ese haz de luz en las diferentes longitudes de onda que son detectadas por una matriz de diodos simultáneamente. En función de la cantidad de fotones que lleguen a los diodos detectores se calcula la concentración de cada uno de los analitos que forman la muestra analizada [40].

### 3.3.6 Recta de calibrado del cobre

A pesar de haber contaminado el suelo con varios metales pesados, en el laboratorio solo se midió la fracción de cobre (Cu) que se extrae en cada experiencia, por lo que fue necesario el cálculo de la recta de calibrado del cobre para el posterior análisis de los resultados. Para la realización de esta tarea se preparó una disolución patrón de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) 0,1 M, cuyas propiedades del reactivo se definen en la Tabla 3-7. Los cálculos de dicha disolución se muestran más en detalle en el Anexo III.

Compuesto	Propiedad	Unidad	Valor
Sulfato de cobre pentahidratado (polvo) 	Fórmula química	-	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	Marca	-	Fisher Scientific
	Peso molecular	g/mol	249,68
	Punto de fusión	°C	110
	Punto de ebullición	°C	650
	Riesgo y peligrosidad	-	
			Irritante-Peligro medio ambiente

Tabla 3-7 Especificaciones sulfato de cobre

Partiendo de esa disolución patrón se prepararon nuevas muestras con distintas cantidades de sulfato de cobre, las de la Figura 3-19. Todas ellas contenían 5,0 mL de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), que forma un complejo amoniacal,  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ , de un característico color azulado, que puede ser medido por el espectrofotómetro. Todas las disoluciones fueron preparadas en matraces aforados de 50 mL. Al contener las cantidades apropiadas de cada componente se diluyeron con agua destilada hasta completar un volumen total de 50 mL. Las cantidades de cada disolución para la preparación de las muestras que dieron lugar a la recta de calibrado, así como la disolución de blanco sin contenido en sulfato de cobre, se resumen en la Tabla 3-8.



Figura 3-19 Muestras para recta de calibrado

Muestra	NH <sub>3</sub> (mL)	CuSO <sub>4</sub> (mL)	Concentración Cu (ppm)
BLANCO	5,0	0	0
M.1	5,0	0,25	31,78
M.2	5,0	0,50	63,55
M.3	5,0	0,75	95,33
M.4	5,0	1,0	127,10
M.5	5,0	2,5	317,75
M.6	5,0	5,0	635,50
M.7	5,0	7,5	953,25
M.8	5,0	10,0	1271

Tabla 3-8 Muestras recta de calibrado de Cu

La tercera columna muestra los datos de concentración de cobre de cada muestra. Como la densidad del agua es aproximadamente 1 kg/L, 1 kg de solución tiene un volumen aproximado de 1 litro. Es por eso que para el cálculo de las concentraciones, desarrollados en el Anexo III, se toman como unidades miligramos de cobre por litro de disolución (ppm). Este dato figurará en el eje de abscisas del gráfico de la recta de calibrado, mientras que el otro dato será la absorbancia de cada una de las muestras en el eje de ordenadas, que determina la cantidad de luz absorbida por éstas durante las espectrofotometrías. Será la ecuación de esa recta de calibrado la que posteriormente permita calcular la concentración de cobre extraído con los disolventes empleados.

### 3.3.7 Medio de cultivo

Una vez fueron realizadas las experiencias completas de extracción de metales por los dos métodos, se planteó la cuestión de que si además de eliminar metales de suelos, estas técnicas resultarían útiles para eliminar microorganismos presentes en las muestras de suelo. Por ese motivo se procedió a la realización de un estudio del problema a través del cultivo de bacterias. Para ello fue necesario obtener primero las propias bacterias, después sembrarlas en las muestras de suelo a descontaminar y posteriormente repetir las técnicas de extracción ya explicadas.

El ‘*Agar Bilis y rojo-violeta*’ es un medio utilizado para analizar los organismos coliformes presentes en agua, leche y otros materiales. Su composición, definida en la Tabla 3-9, contiene sustancias que favorecen el desarrollo de bacterias así como componentes reactivos que permiten detectar las colonias de bacterias formadas [36].

Componente	Cantidad (g)	Componente	Cantidad (g)
Extracto de levadura	3,0	Peptona de gelatina	7,0
Sales biliares	1,5	Lactosa	10,0
Cloruro de sodio	5,0	Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002	Agar bacteriológico	15,0

Tabla 3-9 Composición Agar-bilis [36]

Dichas bacterias surgen porque las muestras con bacterias *Escherichia coli* analizadas provocan la fermentación de la lactosa contenida en el medio *Agar-bilis*, después de un proceso de incubación de entre 24 h y 36 h a 37 °C, que es la temperatura óptima para su desarrollo. Esa fermentación da lugar a un ácido que provoca el viraje del indicador rojo neutro y la precipitación de las sales biliares en las zonas en las que existen los microorganismos coliformes. Las colonias de bacterias *Escherichia coli* se tincen de color rosado oscuro y las sales biliares que hayan precipitado presentan una tonalidad de rojo claro a rosa. De esta forma, si la separación y el nivel de diferenciación de las colonias son suficientes, es posible identificarlas y contarlas [36]. El aspecto teórico que se debería obtener en los cultivos para poder identificar las bacterias sería el mostrado en la Figura 3-20.



Figura 3-20 Cultivo teórico bacteria *Escherichia coli* en medio *Agar-bilis* [41].

### 3.3.7.1 Preparación del medio

Para la preparación de los medios de cultivo en los que se desarrollaron las bacterias, fue necesario diluir con agua destilada el reactivo descrito en la Tabla 3-10.

Compuesto	Propiedad	Unidad	Valor
Agar bilis rojo-violeta con lactosa (VRBL) 	Marca	-	Labkem
	Concentración recomendada	g/L	41,5
	pH (25 °C)	-	7,2 – 7,6
	Color	-	rojo/violeta

Tabla 3-10 Especificaciones reactivo del medio de cultivo

Se toman 41,5 g de dicho reactivo y se diluyen en 1 litro de agua destilada. A continuación, se agita suavemente la mezcla para conseguir una disolución completa y se calienta hasta llevarla a ebullición, dejándola hervir durante 1 minuto. Por último, se deja enfriar hasta una temperatura entre 40 °C y 50 °C y se vierte en las placas Petri en las que se realizarán los cultivos, resultando los medios de cultivo con la apariencia que se puede apreciar en la Figura 3-21. Es vital que las placas en las que se realicen los cultivos hayan sido previamente limpiadas y esterilizadas. En este caso, la esterilización de las mismas se realizó usando el equipo autoclave descrito en el apartado 3.1.7.



Figura 3-21 Medio de cultivo

### 3.3.7.2 Cultivo de bacterias

Los microorganismos con los que se trabajó son una clase de bacterias comunes, del grupo de las enterobacterias, denominadas '*Escherichia coli*' y que se pueden encontrar en cualquier agua contaminada, véase por ejemplo un charco de fango en el césped de la Escuela Naval Militar. Ahí fue donde se encontraron las bacterias empleadas en este trabajo. El objetivo final de este método es obtener, después de todo el proceso, placas en las que se puedan detectar, enumerar e identificar los microorganismos previamente citados. Éstos se desarrollan en el '*Agar-Bilis*' dando lugar a puntos de tonalidad distinta a la del medio en el que han sido sembradas. Para llevar a cabo el cultivo se vierte un volumen conocido, y adecuado en cuanto a concentración de bacterias, de los disolventes resultantes en las experiencias de extracción de metales del suelo. En los siguientes subapartados se detalla el procedimiento seguido para el cultivo de colonias de bacteria '*E. coli*' en el medio '*Agar-Bilis*' a partir de 1 mL de disolvente resultante de una extracción sólido-líquido.

#### 3.3.7.2.1 Obtención de las bacterias

De un charco de fango encontrado en la Escuela Naval Militar, se toma una muestra de agua en la que se supone que se habían desarrollado bacterias, pero no se tiene la certeza. Para confirmarlo, se vierte una pequeña cantidad de volumen en una placa Petri en la que previamente se había añadido el medio de cultivo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en la estufa se extrae la placa y se confirma la existencia de bacterias en la muestra de agua recogida del charco. Como se puede apreciar en el extremo derecho de la Figura 3-22, se desarrolló una colonia de bacterias *E. coli* en el medio de cultivo.



**Figura 3-22** Colonia de bacterias *E. coli* a partir de agua de un charco.

Tras haber confirmado la existencia de bacterias en la muestra de agua, se procede a la preparación de las colonias de bacterias con las que más tarde se contaminaron las muestras de suelo. Para ello se preparan dos nuevos medios de cultivo en dos placas Petri. Se raspa con una varilla de vidrio limpia la colonia violeta de bacterias obtenida en la Figura 3-22 y se frota por una de las nuevas placas. En la otra placa las bacterias se obtienen de raspar partículas de fruta en proceso de putrefacción, como se observa en la Figura 3-23. Una vez realizado este trabajo se introducen en la estufa a 37 °C durante 24 horas.



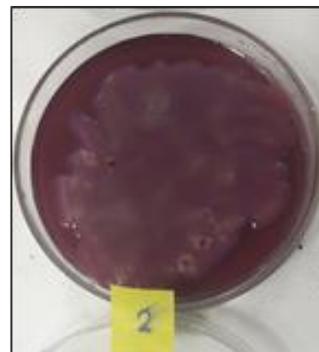
**Figura 3-23** Fruta putrefacta portadora de bacterias

### 3.3.7.2.2 Siembra bacterias en el suelo

Después de las 24 horas de incubación se extraen de la estufa las dos placas anteriores, obteniéndose los resultados de las Figura 3-24 y Figura 3-25. Como se puede apreciar, en lugar de representarse por puntos cada colonia, se forma una gran masa de bacterias en la que no se pueden contabilizar cuántas hay, debido a su enorme concentración en la placa.



**Figura 3-24 Colonia bacterias 1**



**Figura 3-25 Colonia bacterias 2**

Esas masas de bacterias formadas son las que se utilizan para contaminar 2 muestras de 10 g del suelo contaminado con metales pesados que se preparó el primer día de laboratorio. Se raspan con una espátula y se mezclan en 5 mL de agua, dando lugar a unas amalgamas de bacterias mostradas en la Figura 3-26. Esas bacterias en agua se añaden a las muestras de suelo, que a posteriori se van a descontaminar, y se introducen en la estufa otras 24 horas a 37 °C, para potenciar el crecimiento de los microorganismos en el suelo.



**Figura 3-26 Bacterias introducidas en el suelo**

### 3.3.7.2.3 Extracción de bacterias

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, sabiendo que la siembra de las bacterias en el suelo ha sido efectiva (se ha comprobado cultivando en una placa partículas de suelo), se puede proceder a realizar los procesos de extracción de metales pesados del suelo. Por lo tanto, se repiten los procedimientos descritos en los apartados 3.3.3 y 3.3.4 con los valores de tiempo optimizados para la técnica basada en microondas, en nuevas muestras de 10 g de suelo con contenido en bacterias coliformes. Una vez hayan sido realizadas, los disolventes extraídos en cada experiencia se conservan, puesto que serán los que revelen si las técnicas son realmente útiles para eliminar las bacterias del suelo. Para ello se realiza un cultivo de 1 mL de cada disolvente en una placa Petri, y tras el tiempo óptimo de incubación de estas bacterias (entre 24 y 36 horas) se deberían poder contar las bacterias desarrolladas en el medio de cultivo '*Agar-bilis*'



## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado del Trabajo Fin de Grado se exponen los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el laboratorio por los diversos métodos, para comparar su efectividad. A pesar de haber contaminado el suelo con tres metales pesados, se ha seleccionado el cobre como elemento sobre el que se va a realizar el estudio en el laboratorio. Así mismo, se incluyen las mediciones de los otros metales pesados que contenía el suelo contaminado, realizadas por el CACTI de la Universidad de Vigo, al que se le enviaron muestras para su análisis. Por último, se ofrece una visión de los resultados obtenidos en los cultivos de bacterias '*Escherichia coli*', planteados para comprobar si estas técnicas, además de extraer metales pesados, son útiles para eliminar las bacterias presentes en el suelo.

### 4.1 Recta de calibrado del cobre

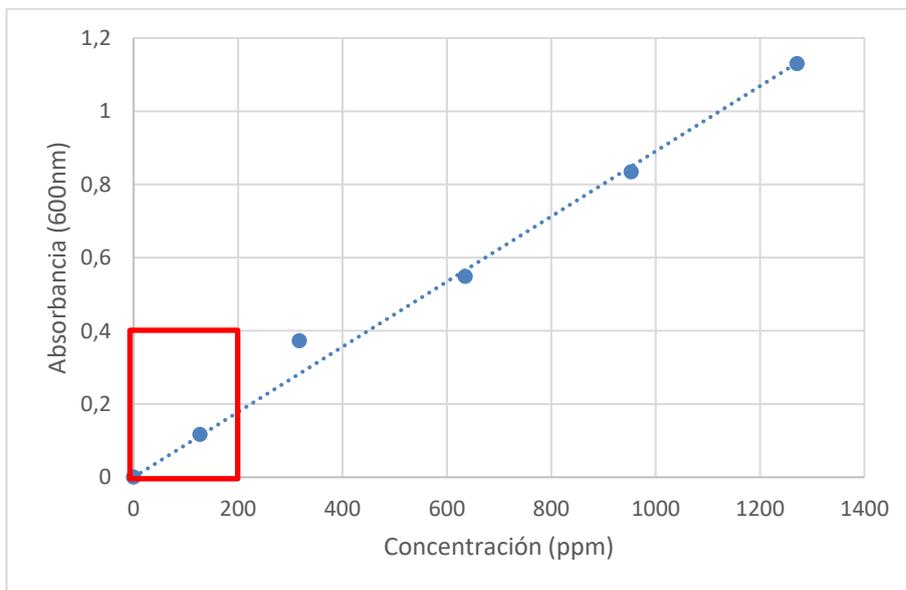
Tal y como se describió en el apartado 3.3.6, se midieron los valores de absorbancia de 8 muestras de concentración conocida y, situando los datos de concentraciones de cobre en el eje de abscisas y las absorbancias obtenidas por espectrofotometría de la Tabla 4-1 en el eje de ordenadas, se construye la recta de calibrado del cobre.

Muestra	CuSO <sub>4</sub> (mL)	Concentración Cu (ppm)	Absorbancia media* (600 nm)
<b>BLANCO</b>	0	0	0
<b>M.1</b>	0,25	31,78	0,029
<b>M.2</b>	0,50	63,55	0,051
<b>M.3</b>	0,75	95,33	0,069
<b>M.4</b>	1,0	127,10	0,161
<b>M.5</b>	2,5	317,75	0,373
<b>M.6</b>	5,0	635,50	0,548
<b>M.7</b>	7,5	953,25	0,834
<b>M.8</b>	10,0	1271	1,129

Tabla 4-1 Datos recta de calibrado Cu

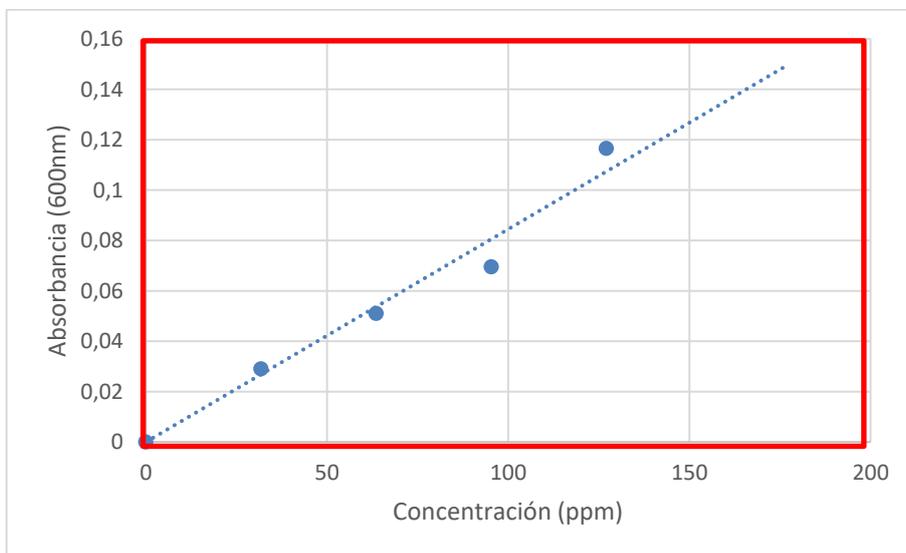
(\*) El equipo utilizado tiene una precisión de 0,001 unidades. Se han realizado dos espectrofotometrías por cada muestra para reducir los posibles errores y ganar en precisión de la recta, y se ha realizado una media aritmética.

Como en un principio se desconoce el rango en el que se van a situar los datos de las absorbancias resultantes de las extracciones de cobre, se construye la recta de la Figura 4-1 tomando las muestras que contenían desde 1 mL hasta 10 mL de disolución patrón de cobre.



**Figura 4-1 Recta de calibrado de cobre 1**

Dado que finalmente los valores de absorbancia de los distintos disolventes se concentraban en la parte inferior de la gráfica, dentro del área señalada en la Figura 4-1, se decide realizar una recta de calibrado cuyo rango de absorbancias se adapte mejor a los resultados obtenidos. Esto supone usar las muestras con menor contenido en cobre para crear la nueva recta representada en la Figura 4-2.



**Figura 4-2 Recta de calibrado de cobre 2**

El coeficiente de determinación de la recta ( $R^2$ ) de valor 0,972, representa la precisión del ajuste lineal de la recta, es decir, la bondad de la predicción de algún dato obtenido dicha recta. Cuando este parámetro vale uno, significa un ajuste lineal perfecto, pero valores superiores a 0,9 son considerados aceptables. Siendo 0,972 significa que el 97,2 % de los posibles datos del proceso pueden ser obtenidos de este modelo. En este caso el dato a extraer es la concentración de cobre a partir de la recta creada con las absorbancias de las muestras de calibrado del cobre. De la recta representada por la Figura 4-2, se extrae la siguiente ecuación (Ec. 4-1) donde el término 'y' representa la absorbancia y el término 'x' la concentración de cobre en ppm.

$$y = 8,45 \cdot 10^{-4}x$$

Ec. 4-1

Con esta fórmula y los valores de absorbancia (y) de las muestras de disolventes resultantes de cada extracción, se puede despejar el valor de la concentración de cobre (x) y conocer así la cantidad de cobre extraída de las muestras de suelo contaminado en cada ensayo.

## 4.2 Resultados extracción del cobre

A continuación, se muestran los valores de absorbancia obtenidos en las extracciones, que permitirán determinar la concentración de cobre que existe en los disolventes extraídos, la cantidad de metal remanente en el suelo y el rendimiento de las dos técnicas estudiadas, permitiendo comparar los dos métodos de extracción. Para disminuir la posibilidad de error, se llevaron a cabo dos espectrofotometrías por cada disolvente y se calculó el valor medio de absorbancia de ambas. Las pérdidas producidas durante la filtración para separar la materia sólida del líquido se detallan en el Anexo IV.

### 4.2.1 Extracción convencional

Las extracciones de metales del suelo por el método tradicional fueron llevadas a cabo en dos ocasiones distintas, dejando un intervalo de tiempo de dos semanas entre ambas. Para ello se utilizaron muestras de 2 g de suelo contaminado. De este modo y siguiendo la metodología ya explicada, cuatro días después de haber contaminado el suelo se realiza la primera extracción y se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 4-2.

Disolvente	Tiempo (h)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (ppm)
CaCl <sub>2</sub>	3	0,023	0,023	0,023	136,09
CH <sub>3</sub> COOH	16	0,032	0,031	0,031	183,43
AEDT	1	0,010	0,006	0,008	47,34

Tabla 4-2 Resultados método convencional 1

En esta primera experiencia se observa que de los tres disolventes empleados el que más cobre consigue extraer es el ácido acético, sin embargo, para ello precisa de un tiempo muy elevado (16 horas). Es por eso que se le puede catalogar como el más efectivo pero el menos eficiente. Por otra parte, el AEDT extrae casi tres veces menos cobre que el cloruro de calcio pero en un tiempo tres veces menor. Por lo tanto, tienen una eficiencia bastante pareja, si se tiene en cuenta el tiempo de extracción. Habiendo dejado pasar dos semanas desde que se realiza la primera extracción y aplicando el mismo procedimiento se procede a descontaminar nuevas muestras de suelo, las cuales habían sido contaminadas hacía ya diecinueve días exactamente. La Tabla 4-3 recoge los resultados obtenidos en dichas experiencias, que se asemejan a los resultados obtenidos por García-Salgado y Quijano [31].

Disolvente	Tiempo (h)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (ppm)
CaCl <sub>2</sub>	3	0,004	0,005	0,005	29,59
CH <sub>3</sub> COOH	16	<0,001	<0,001	<0,001	<5,92
AEDT	1	0,012	0,011	0,011	65,09

Tabla 4-3 Resultados método convencional 2

En general, se aprecia que ha disminuido mucho el rendimiento de todos los disolventes en esta segunda extracción, es decir, apenas se ha extraído cobre de la suelo si se comparan los resultados con los de la primera extracción, como se observa en la Figura 4-3. Esto se debe a que ha pasado mucho más tiempo desde que el suelo fue contaminado y por tanto los contaminantes se han fijado mucho más en él, de ahí que resulte más complicado extraerlos como ha sucedido con el cloruro de calcio. Si en la primera experiencia el ácido acético había sido el que más cobre había extraído de los tres, en esta ocasión ha resultado prácticamente ineficaz para la extracción de cobre. El cloruro de calcio también ha tenido un rendimiento mucho menor que en la primera extracción por este método. Sin embargo, el AEDT, aplicando las mismas condiciones de trabajo, ha mantenido e incluso mejorado su rendimiento. En la Figura 4-3 se ofrece una comparativa (Cu extraído-tiempo) de las experiencias realizadas por el método convencional.

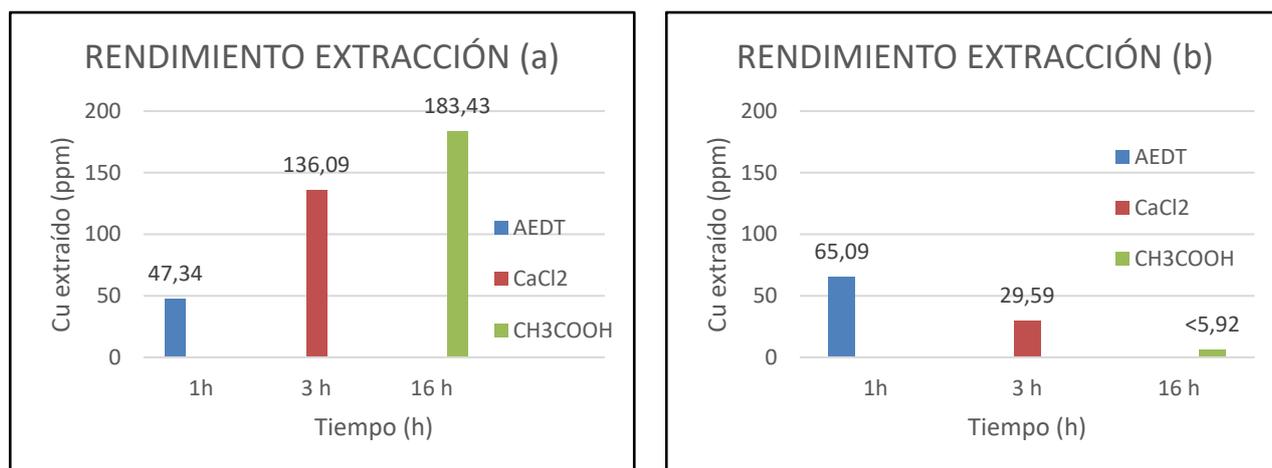


Figura 4-3 Comparativa de rendimientos método convencional: a) tras 4 días, b) tras 19 días

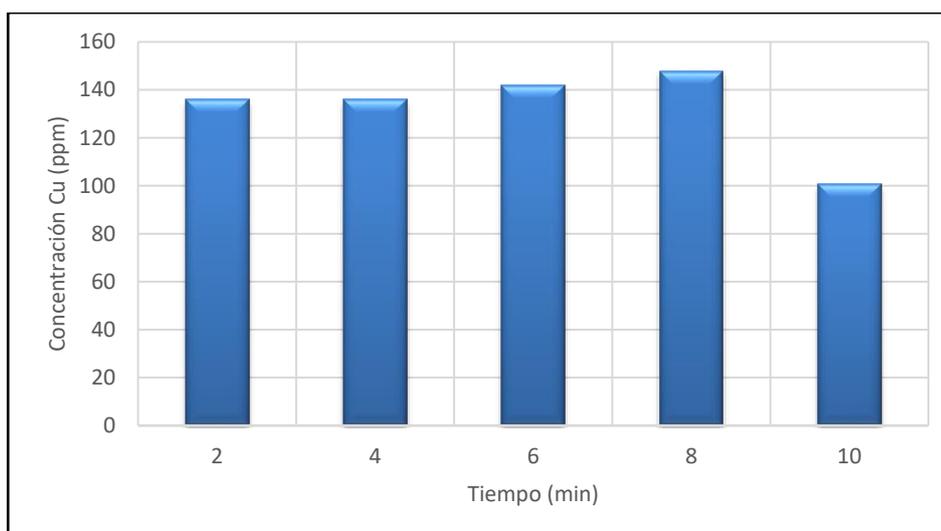
#### 4.2.2 Extracción asistida por microondas (MAE)

Con el objetivo de establecer el tiempo más adecuado para la extracción asistida por microondas se realiza un barrido de tiempos para cada uno de los disolventes a emplear. Con tal propósito se realizan extracciones sobre muestras de 2 g de suelo contaminado, tratando de lograr que los rendimientos de dichas experiencias sean equiparables a las extracciones llevadas a cabo por el método convencional.

Para empezar, se calcula el tiempo óptimo para el primer disolvente, el cloruro de calcio, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4-4 y cuya evolución en función del tiempo se aprecia en la Figura 4-4.

Disolvente	Tiempo (min)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (mg Cu/L disolvente)
CaCl <sub>2</sub>	2	0,022	0,024	0,023	136,09
	4	0,025	0,022	0,023	136,09
	6	0,024	0,024	0,024	142,01
	8	0,025	0,026	0,025	147,93
	10	0,016	0,017	0,017	100,59

Tabla 4-4 Resultados microondas barrido CaCl<sub>2</sub>



**Figura 4-4 Concentración Cu en CaCl<sub>2</sub>-Tiempo microondas**

Como se puede observar en la Figura 4-4, la cantidad de Cu extraído aumenta con el tiempo hasta 8 min, a partir de los cuales empieza a disminuir. A la vista de los resultados obtenidos se establece el tiempo de 8 minutos como el más adecuado para la extracción con CaCl<sub>2</sub>.

Una vez establecido el tiempo de trabajo más adecuado para la extracción asistida por microondas con el primer disolvente, se preparan nuevas muestras de 2 g de suelo contaminado y se les aplica el tratamiento anterior durante los 8 minutos. Se filtran las mezclas de los balones y a las muestras sólidas de suelo se les añade el siguiente disolvente del proceso, el ácido acético, para realizar el segundo barrido de tiempos, del cual se extraen los resultados de la Tabla 4-5 y su correspondiente evolución representada en la Figura 4-5. Como al evaluar los resultados se observa que a los 10 minutos todavía sigue aumentando el valor de concentración de cobre en el ácido acético, se alarga este segundo barrido para tiempos de 15 y 20 minutos respectivamente, valores a los cuales la cantidad extraída se queda estancada.

Disolvente	Tiempo (min)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (mg Cu/L disolvente)
CH <sub>3</sub> COOH	2	0,007	0,006	0,007	41,42
	4	0,011	0,012	0,011	65,09
	6	0,013	0,014	0,013	76,92
	8	0,016	0,012	0,014	82,84
	10	0,018	0,017	0,017	100,59
	15	0,019	0,018	0,019	112,43
	20	0,019	0,021	0,020	118,34

**Tabla 4-5 Resultados microondas barrido CH<sub>3</sub>COOH**

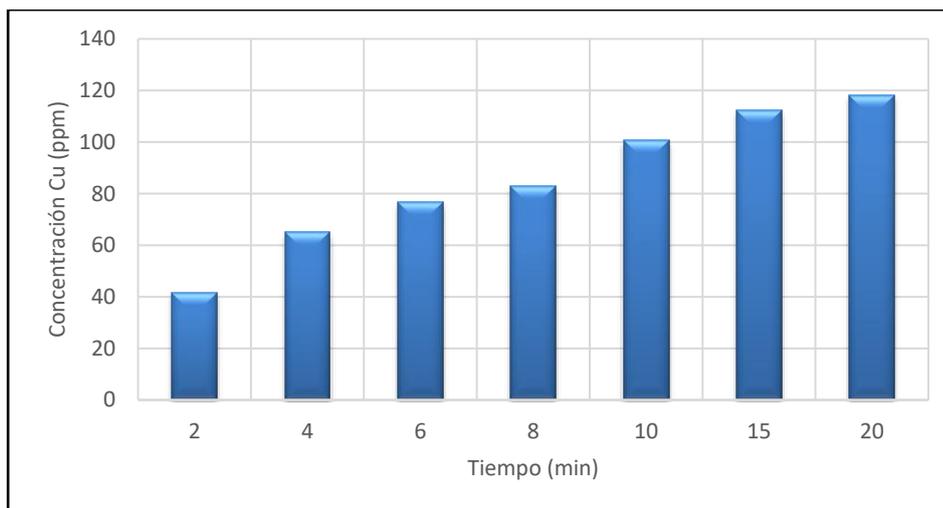


Figura 4-5 Concentración Cu en CH<sub>3</sub>COOH-Tiempo microondas

A la vista de los datos obtenidos, se fija el tiempo más adecuado para la extracción mediante microondas con ácido acético en 20 minutos. Se procede entonces a preparar nuevamente cinco muestras de 2 g de suelo contaminado que son sometidas a la extracción con CaCl<sub>2</sub> durante ocho minutos y posteriormente con CH<sub>3</sub>COOH durante veinte minutos. Así, sólo queda analizar el tiempo que más beneficia a la extracción usando ácido etilendiaminotetracético (AEDT). La Tabla 4-6 recoge los resultados obtenidos y su evolución temporal la representa la Figura 4-6.

Disolvente	Tiempo (min)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (mg Cu/L disolvente)
<b>AEDT</b>	2	0,004	0,005	0,005	29,59
	4	0,006	0,007	0,007	41,42
	6	0,003	0,002	0,003	17,75
	8	0,003	0,003	0,003	17,75
	10	0,002	0,004	0,003	17,75

Tabla 4-6 Resultados microondas barrido AEDT

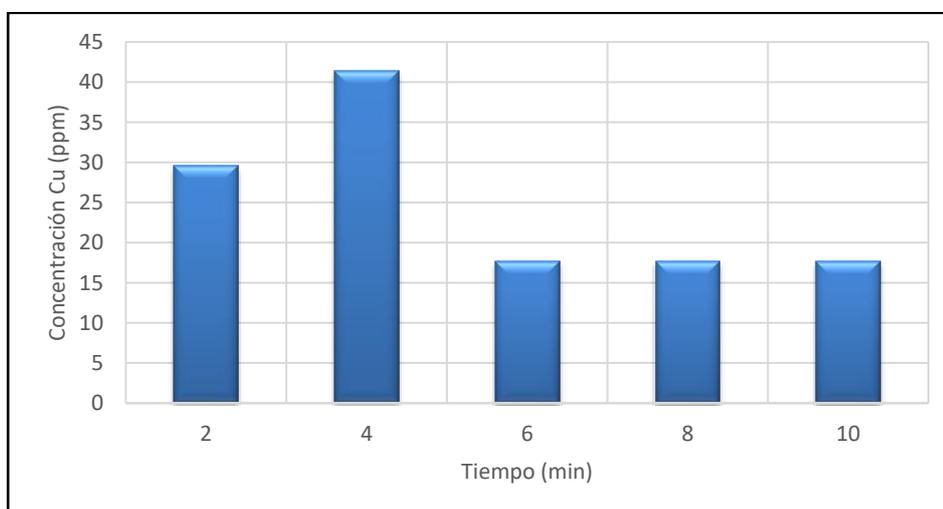


Figura 4-6 Concentración Cu en AEDT-Tiempo microondas

En este caso, se aprecia claramente que el tiempo para el cual se extrae mayor cantidad de cobre son 4 minutos, a partir de los cuales se observa que la cantidad extraída disminuye y a partir de los 6 minutos se mantiene estable.

Después de realizar este último barrido se alcanza el objetivo inicial de determinar el patrón de tiempos que maximizan la cantidad de cobre extraído para estos disolventes aplicando la técnica de extracción asistida por microondas, quedando de la manera expuesta en la Figura 4-7.

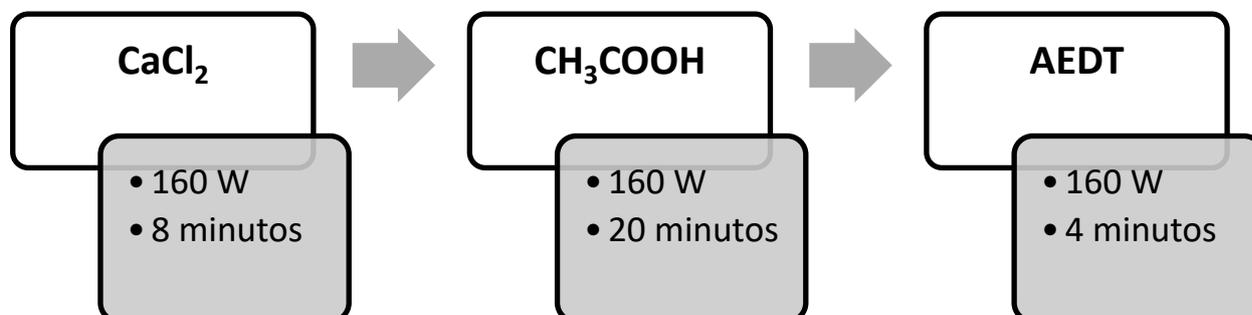


Figura 4-7 Ciclo final óptimo de extracción asistida por microondas

Estos valores se asemejan en cierta medida a los obtenidos en los trabajos previos por la Universidad Politécnica de Madrid [31], en cuanto a que el ácido acético es el que más tiempo requiere en comparación con los otros dos. La exactitud de los valores de tiempo no es total ya que existen más variables a tener en cuenta en el proceso, que no han sido aplicadas de la misma manera.

### 4.3 Comparativa métodos de extracción

Para comparar las dos técnicas analizadas en este trabajo, lo más acertado es comparar los resultados obtenidos de la descontaminación de las muestras de 10 g de suelo, puesto que se realizaron a la par. Esto significa que las condiciones de adsorción de los metales pesados por el suelo eran las mismas para ambos métodos. Como ya se comprobó comparando los rendimientos de las dos extracciones convencionales separadas dos semanas, el tiempo transcurrido desde la contaminación de un suelo es un factor importante. Tras 26 días de contaminación es de esperar que los metales se encuentren bien adsorbidos por el suelo.

#### 4.3.1 Método convencional

##### 4.3.1.1 Resultados laboratorio

Al igual que para las anteriores experiencias, en el laboratorio sólo se ha medido la cantidad de cobre extraída del suelo. Dichas mediciones son las representadas en la Tabla 4-7. Con los valores de absorbancia y la ecuación de la recta de calibrado (Ec. 4-1), se calculan las concentraciones de este metal en el disolvente. Los valores de absorbancia y concentración son proporcionales, cuanto mayor absorbancia, mayor concentración de metal lo que supone que mayor es la cantidad que se ha extraído del suelo contaminado porque han sido adsorbidos por el disolvente y eliminados del suelo.

Disolvente	Tiempo (h)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (mg Cu/L)
CaCl <sub>2</sub>	3	0,006	0,004	0,005	29,59
CH <sub>3</sub> COOH	16	0,002	0,002	0,002	11,83
AEDT	1	0,001	0,001	0,001	5,92

Tabla 4-7 Resultados laboratorio método convencional muestra 10 g

A la vista de los resultados obtenidos en el laboratorio, para extraer cobre el mejor disolvente es con diferencia el cloruro de calcio, seguido del ácido acético y el AEDT, pero se deben tener en cuenta los tiempos empleados por cada uno, ya que hay una gran diferencia.

#### 4.3.1.2 Resultados CACTI

Como se explicó en el apartado 3.3.5, muestras de cada disolvente extraído en esta última experiencia, fueron enviadas al centro de medición especializado de la Universidade de Vigo para medir la cantidad extraída de los metales que no fueron calculados en el laboratorio. Los datos en la Tabla 2-1 representan la cantidad que se extrajo de hierro (Fe) y de zinc (Zn).

Disolvente	Tiempo (h)	Hierro extraído (mg Fe/L)	Zinc extraído (mg Zn/L)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	3	0,10	3,80
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	16	0,30	25,60
<b>AEDT</b>	1	15,00	21,70

Tabla 4-8 Resultados CACTI método convencional muestra 10 g

Por el método convencional el metal del que más cantidad se extrae es el zinc, seguido de cerca por el cobre. En concreto, para extraer zinc los mejores disolventes son el ácido acético y el ácido etilendiaminotetracético. El hierro resultó el metal más complicado de extraer en general, aunque empleando AEDT se consigue adsorber una fracción importante de hierro. Todo esto es relativo, puesto que si se tiene en cuenta el tiempo empleado en cada extracción, el AEDT sale claramente favorecido puesto que sólo necesita 1 hora.

#### 4.3.2 Método asistido por microondas

##### 4.3.2.1 Resultados laboratorio

Una vez fijados los tiempos óptimos para la técnica de extracción asistida por microondas se realiza la experiencia completa, para una mayor cantidad de suelo contaminado: 10 g. Del mismo modo que se hizo para el método convencional, se analizan los resultados de cobre extraído en el laboratorio, obteniendo los datos de la Tabla 4-9, y dos muestras de cada disolvente son enviadas al centro de medición especializado de la Universidade de Vigo.

Disolvente	Tiempo (minutos)	Absorbancia <sub>1</sub> (600 nm)	Absorbancia <sub>2</sub> (600 nm)	Absorbancia media* (600 nm)	Cobre extraído (mg Cu/L)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	8	0,005	0,005	0,005	29,59
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	20	0,005	0,004	0,005	29,59
<b>AEDT</b>	4	0,006	0,007	0,007	41,42

Tabla 4-9 Resultados laboratorio método MAE muestra 10 g

Con esta técnica se consigue extraer una gran cantidad de cobre, especialmente utilizando el AEDT como disolvente. Los otros dos disolventes son un poco menos eficaces, pero igualmente útiles. Comparando las cantidades extraídas de cobre con la técnica convencional se extrae bastante más cobre por este método (100,59 mg/L en total frente a 47,34 mg/L), más del doble.

### 4.3.2.2 Resultados CACTI

Las cantidades extraídas de hierro y zinc por este segundo método, medidas por el CACTI, se recogen en la Tabla 4-10.

Disolvente	Tiempo (minutos)	Hierro extraído (mg Fe/L)	Zinc extraído (mg Zn/L)
CaCl <sub>2</sub>	8	0,10	2,60
CH <sub>3</sub> COOH	20	0,60	13,10
AEDT	4	7,00	21,40

Tabla 4-10 Resultados CACTI método MAE muestra 10 g

El metal del que más cantidad se extrajo esta vez fue del cobre con mucha diferencia respecto al resto de metales. Para todos los metales el AEDT ha resultado ser el disolvente más efectivo, algo que no ocurría en el método convencional en el que dependiendo del metal a extraer algunos disolventes eran más efectivos que otros, pero ninguno destacaba en términos globales (para extraer cobre el cloruro de calcio, para hierro el AEDT y para zinc el ácido acético).

### 4.3.3 Comparativa global

Para realizar una comparativa genérica entre los dos métodos de extracción, lo más adecuado es comparar los resultados obtenidos para la extracción de cada metal. En la Figura 4-8 y la Figura 4-9 se ofrece en una visión genérica de todos los datos anteriores.

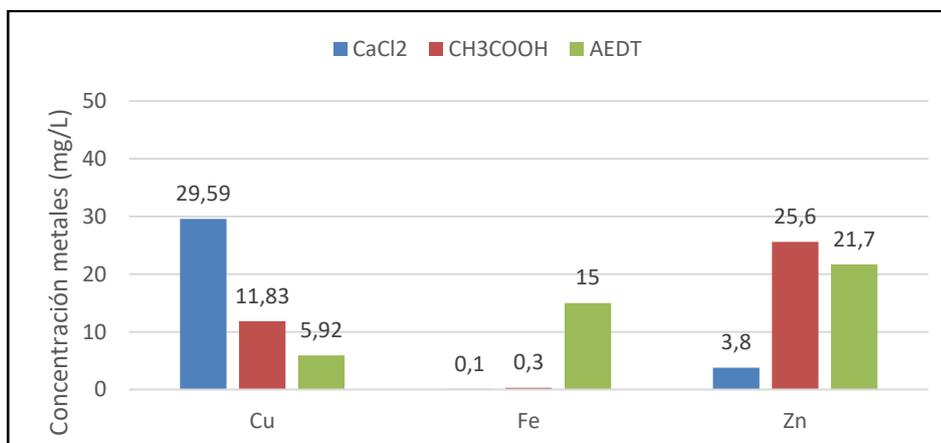


Figura 4-8 Concentraciones metales pesados en disolventes extraídos por método convencional

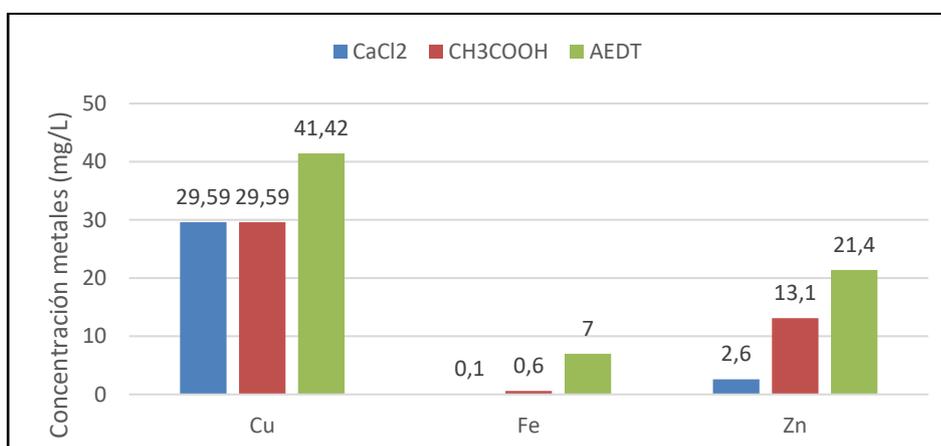


Figura 4-9 Concentraciones metales pesados en disolventes extraídos por MAE

Si se suman las cantidades totales extraídas de cada metal con los tres disolventes, se observan diferencias entre los dos métodos llevado a cabo. En el caso del cobre, la cantidad extraída por microondas es bastante superior que mediante el método convencional. En cambio, para el hierro y el zinc, sucede lo contrario. Aun así siempre hay que tener en cuenta el factor del tiempo de extracción que requiere cada técnica, ya que el proceso de extracción convencional requirió un tiempo de extracción total (contando los tres disolventes) de 20 horas, mientras que la extracción asistida por microondas tan sólo 32 minutos en total. Esto supone reducir el tiempo de extracción casi 38 veces.

#### 4.3.4 Comparativa según metal extraído

Llaman la atención casos aislados de algún metal del cual la cantidad extraída del suelo es considerablemente mayor utilizando un disolvente por una u otra técnica, como es el caso de extracción de Zn con ácido acético. Por el método convencional se extrae el doble. Lo mismo sucede con la extracción de hierro mediante AEDT. También se da la situación opuesta en la que el método asistido por microondas es mucho más efectivo, como la extracción de cobre con AEDT o con ácido acético. Para un análisis más en detalle de estos datos se ofrece en la Tabla 4-11 una comparativa más clara comparando individualmente los resultados obtenidos para cada metal por los dos métodos de extracción.

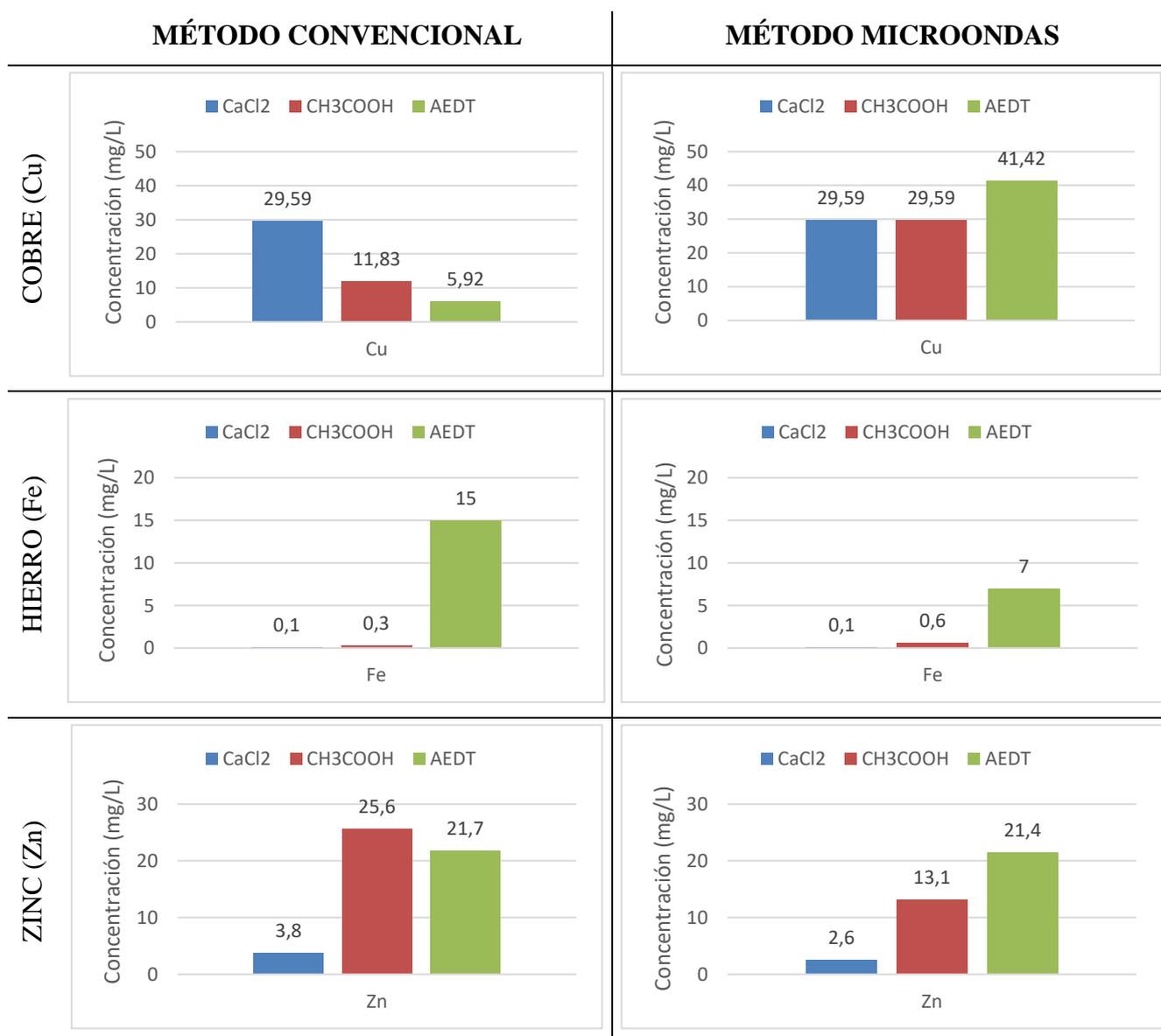


Tabla 4-11 Comparativa resultados según metal extraído y método

En cuanto a la extracción de cobre, el método asistido por microondas es francamente más efectivo, a lo que hay que añadir que el tiempo total empleado en el proceso es también considerablemente menor.

En caso de que el metal contaminante a extraer sea el hierro, las cantidades extraídas no son muy elevadas por ninguno de los dos métodos. Sin embargo, destaca el AEDT como disolvente extractor de hierro y más concretamente en la técnica convencional, ya que se extrae más del doble de lo conseguido con la ayuda de las microondas.

Si fuese zinc el metal contaminante del suelo, las capacidades de ambas técnicas son bastante parejas, a excepción del ácido acético que se ve beneficiado por el método convencional. Aun así, la extracción asistida por microondas sigue contando con la ventaja del tiempo empleado.

#### 4.3.5 Rendimientos

Para poder determinar la efectividad de las técnicas de extracción selectiva es necesario analizar los rendimientos de las mismas, para poder calcular no solo la cantidad de metal que se extrae, sino también la cantidad remanente en el suelo. Para ello es necesario conocer la concentración de metales existente en el suelo que hay que remediar, teniendo en cuenta la humedad del mismo, que no es la misma todos los días y que por eso fue analizada antes de cada experiencia. Sabiendo que se utilizaron 500 mg de cada metal para contaminar medio kilogramo de tierra, la concentración inicial de cada metal en el suelo eran 1000 ppm (mg metal/kg suelo húmedo). La humedad del suelo tras adsorber los metales era del 70,86%. Con estos datos, se calcula que la concentración inicial de metales respecto a la cantidad de suelo seco contaminado eran 3431,71 ppm. El procedimiento de cálculo para llegar a este valor se especifica en el Anexo V. Sabiendo este dato se procede a calcular el rendimiento de cada una de las extracciones llevadas a cabo.

##### 4.3.5.1 Extracción de cobre

- Extracción convencional

Disolvente	Concentración en disolvente extraído (mg/L)	mg metal/kg suelo seco	Porcentaje metal extraído
CaCl <sub>2</sub>	29,59	1035,55	30,18 %
CH <sub>3</sub> COOH	11,83	417,56	12,17 %
AEDT	5,92	209,73	6,11 %

Tabla 4-12 Rendimiento extracción convencional de cobre

- Extracción asistida por microondas

Disolvente	Concentración en disolvente extraído (mg / L)	mg metal/kg suelo seco	Porcentaje metal extraído
CaCl <sub>2</sub>	29,59	1035,55	30,18 %
CH <sub>3</sub> COOH	29,59	1040,24	30,31 %
AEDT	41,42	1462,21	42,61 %

Tabla 4-13 Rendimiento extracción asistida por microondas de cobre

Con un rendimiento cercano al 100 % para el método asistido por microondas y un 48 % aproximadamente para el método convencional, la primera técnica muestra una eficiencia francamente mejor. Además de la mayor cantidad de metales extraídos del suelo, hay que recordar que el tiempo de

operación total empleado fueron 32 minutos, por los 1200 minutos (20 horas) que precisó el método convencional para extraer la mitad de cobre. Teniendo en cuenta que se consideran 4000 ppm [3, 7] como una concentración anómala de cobre en suelos industriales, que son los más permisivos, se ha conseguido dejar en el suelo una concentración de cobre menor que este valor. Partiendo de los rendimientos de la Tabla 2-3 y conocida la cantidad añadida de cobre (Anexo V), se determina que la concentración de cobre que quedaría en el suelo sería prácticamente nula empleando la técnica asistida por microondas y 1770 ppm por el método convencional.

#### 4.3.5.2 Extracción de hierro

- Extracción convencional

Disolvente	Concentración en disolvente extraído (mg/L)	mg metal/kg suelo seco	Porcentaje metal extraído
CaCl <sub>2</sub>	0,10	3,50	0,10 %
CH <sub>3</sub> COOH	0,30	10,59	0,31 %
AEDT	15,00	531,67	15,49 %

Tabla 4-14 Rendimiento extracción convencional de hierro

- Extracción asistida por microondas

Disolvente	Concentración en disolvente extraído (mg/L)	mg metal/kg suelo seco	Porcentaje metal extraído
CaCl <sub>2</sub>	0,10	3,50	0,10 %
CH <sub>3</sub> COOH	0,60	21,10	0,61 %
AEDT	7,00	247,11	7,20 %

Tabla 4-15 Rendimiento extracción asistida por microondas de hierro

Ha resultado complicada la extracción de hierro, siendo el metal que peores rendimientos ofrece de los tres estudiados. Además entre las dos técnicas el rendimiento es doble para el método convencional, que alcanza un 16 %, por tan sólo un 8 % de la extracción asistida por microondas. No obstante esta diferencia no parece tan grande si se tiene en cuenta el tiempo de operación de las dos técnicas.

#### 4.3.5.3 Extracción de zinc

- Extracción convencional

Disolvente	Concentración en disolvente extraído (mg/L)	mg metal/kg suelo seco	Porcentaje metal extraído
CaCl <sub>2</sub>	3,80	133,01	3,88%
CH <sub>3</sub> COOH	25,60	903,27	26,32 %
AEDT	21,70	769,15	22,41 %

Tabla 4-16 Rendimiento extracción convencional de zinc

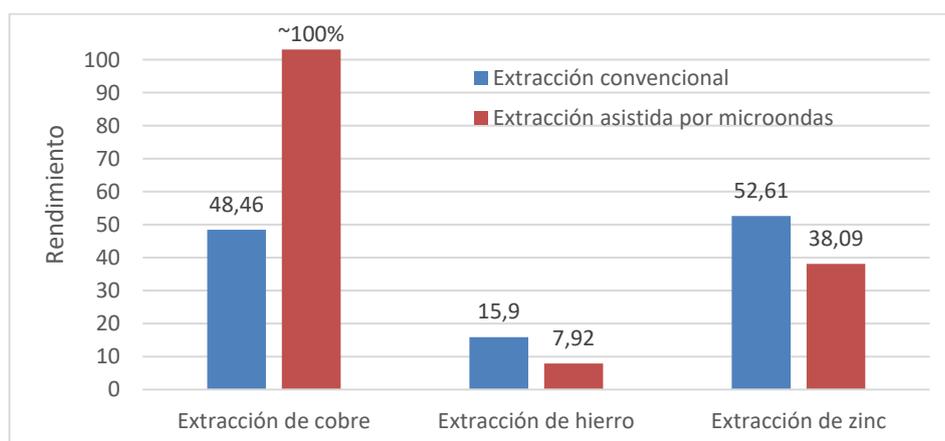
- Extracción asistida por microondas

Disolvente	Concentración en disolvente extraído (mg/L)	mg metal/kg suelo seco	Porcentaje metal extraído
CaCl <sub>2</sub>	2,60	91,00	2,65 %
CH <sub>3</sub> COOH	13,10	460,60	13,42 %
AEDT	21,40	755,46	22,01 %

**Tabla 4-17 Rendimiento extracción asistida por microondas de zinc**

En cuanto al zinc, no hay gran diferencia entre el rendimiento de una y otra técnica, estando por encima el del método convencional que consigue extraer la mitad del zinc que se añadió al suelo para contaminarlo (53 %) y quedando el zinc remanente en suelo con una concentración de 1570 ppm. La extracción de zinc empleando la técnica basada en microondas consigue un rendimiento del 38 %, lo que supone que la fracción que queda en el suelo se encuentra con una concentración de 2070 ppm. Con todo, las dos técnicas han asegurado que el suelo resultante mantiene una concentración de zinc por debajo del valor considerado anómalo para un suelo industrial (10000 ppm) [3, 7].

El procedimiento seguido para hallar todos estos valores se detalla en el Anexo V. Con el propósito de comparar de forma más precisa los rendimientos de las extracciones, en la Figura 4-10 se muestran de forma más visual los datos anteriormente calculados.



**Figura 4-10 Comparativa rendimientos totales**

Como era de esperar, el rendimiento de los procesos varía dependiendo del metal con que haya sido contaminado el suelo. Solo hay que ver lo efectivas que fueron las técnicas si se comparan los rendimientos de las experiencias para extraer cobre con respecto al bajo rendimiento que presentan si es hierro lo que hay que extraer. La diferencia es abismal. Hay que tener en cuenta a la hora de calcular el rendimiento del cobre que, además de la cantidad de cobre añadida en forma de metal contaminante, es posible que el agua empleada tanto para mezclar los contaminantes en el suelo como para preparar las disoluciones, pudiese contener también cierta cantidad de cobre. Según la Agencia Europea del Medioambiente la concentración de cobre en el agua potable de uso humano puede rondar 1 mg por litro (1ppm) [42].

Estos valores son muy representativos para poder establecer las conclusiones de este trabajo, pero todavía queda analizar un aspecto a mayores de la aplicación de estas técnicas de descontaminación. Es la cuestión de si además de ser útiles para extraer metales son efectivas para eliminar posibles microorganismos que se hayan desarrollado en los suelos debido a su contaminación. Para analizar esa problemática se emplearon los mismos procedimientos para descontaminar muestras de suelos a las que

previamente se le añadieron bacterias y se analizaron posteriormente los disolventes extraídos en medios de cultivo. En el siguiente apartado se muestran los resultados obtenidos en ese estudio.

#### 4.4 Análisis cultivos de bacterias

Se repitieron una vez más los ensayos completos de descontaminación de suelos por los dos métodos con los mismos parámetros, pero esta vez el objetivo no era ver la cantidad de metales extraídos sino la presencia de bacterias una vez finalizado el proceso de extracción. Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.7 sobre el cultivo de bacterias, se realizaron cultivos de todos los disolventes extraídos en los ensayos de descontaminación de muestras de 10 g de suelo, tanto por el método convencional como el asistido por microondas. Partiendo de 1 mL de dichos disolventes se dejaron incubar las bacterias en la estufa entre 24 y 36 horas a 37 °C.

Como se desconocía el grado de concentración de las bacterias en esa cantidad de disolvente, se realizó una estimación para el primer disolvente, el cloruro de calcio, utilizando diferentes concentraciones. Una placa con una muestra original de disolvente en concentración 1:1, una segunda con concentración 1:10 y una última concentrada 1:100. Esta operación fue necesaria porque la concentración de bacterias fue lo que determinó la posibilidad de contar o no las bacterias que más tarde se desarrollaron. Mucha concentración supondría colonias de bacterias indistinguibles que resultan imposibles de contabilizar. Si la concentración fuese demasiado baja puede que no se llegase a desarrollar ninguna bacteria. A continuación, en la Tabla 4-18, se pueden ver los resultados de los cultivos realizados en ese primer barrido para el cloruro de calcio.

	Concentración 1:1	Concentración 1:10	Concentración 1:100
MÉTODO CONVENCIONAL			
MÉTODO MICROONDAS			

Tabla 4-18 Comparativa resultados cultivos CaCl<sub>2</sub> según grado de concentración

A la vista de los resultados, se aprecia que debido a la gran cantidad de bacterias desarrolladas, en las placas cultivadas con disolventes puros sin diluir resulta imposible contabilizar el número de bacterias. Para los disolventes en concentración 1:10 no mejora demasiado la apariencia de las placas. Se necesita por lo menos una dilución 1:100 para que las bacterias sean diferenciables. Tal como se

aprecia en las placas cuyos disolventes están más diluidos, es posible identificar las colonias y contar las bacterias.

Ahora que se cuenta con una referencia sobre el grado de dilución adecuado, se procede a realizar los cultivos del resto de disolventes utilizando esa misma concentración 1:100. Las placas resultantes se aprecian en la Tabla 4-19, así como la contabilización de bacterias llevada a cabo siguiendo estos criterios:

- Fijando un área de la placa en la que se distingan bien las colonias (1/4 en este caso), se cuenta el número de puntos bien marcados que han aparecido.
- Ese valor se multiplica por 4 para calcular cuántas habría en una placa completa homogénea.
- Conocido el grado de dilución 1:100 se multiplica por 100 el valor anterior para obtener el dato de bacterias por mililitro que se han conseguido eliminar durante el proceso de extracción.

	MÉTODO CONVENCIONAL		MÉTODO MICROONDAS	
<b>CaCl<sub>2</sub></b>		<p>¼ placa = 24 colonias</p> <p>1 placa = 96 colonias</p> <p>-Dilución 1:100</p> <p>9.600 bacterias/mL CaCl<sub>2</sub></p>		<p>¼ placa = 220 colonias</p> <p>1 placa = 880 colonias</p> <p>-Dilución 1:100</p> <p>88.000 bacterias/mL CaCl<sub>2</sub></p>
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>		*No se aprecian colonias desarrolladas		*No se aprecian colonias desarrolladas
<b>AEDT</b>		*No se aprecian colonias desarrolladas		*No se aprecian colonias desarrolladas

Tabla 4-19 Resultados cultivos disolventes 1:100

A la vista está que tan solo en el primer disolvente (CaCl<sub>2</sub>) se han desarrollado bacterias. De entre las dos técnicas, la placa del método asistido por microondas está mucho más poblada. Esto significa que permite la vida de dichas bacterias mientras que el método convencional es más efectivo a la hora de eliminarlas. También hay que puntualizar que para eliminar bacterias a favor del método tradicional

juega el factor tiempo, ya que el disolvente estuvo mucho más tiempo en contacto con el suelo (3 horas frente a 8 minutos).

Sin embargo, en el resto de medios no crecieron las bacterias en ninguno de los dos métodos a partir de la segunda etapa. Esto significa que tras la segunda extracción con ácido acético se matan la mayoría de microorganismos, tanto por uno como por el otro método. Por lo tanto el resultado final de ambas técnicas es que son útiles para eliminar las bacterias presentes en el suelo, con la ventaja añadida de que la asistida por microondas requiere mucho menos tiempo de trabajo. Concretamente consigue en 28 minutos (2 primeras etapas) lo que el método convencional necesita 19 horas para alcanzar. Aunque las bacterias se eliminan en dos pasos, realizando el proceso completo con sus tres etapas, se consigue eliminar simultáneamente a las bacterias junto con gran cantidad de metales pesados.

## 5 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

### 5.1 Conclusiones

En primer lugar, se confirma la validez de la extracción asistida por microondas (MAE) como método apto para la descontaminación de suelos contaminados por metales pesados. Tras haber realizado un total de 40 ensayos, en los que fue aplicada la técnica objeto de estudio de este trabajo, se comprobó que en todos ellos una fracción metálica era extraída del suelo. Con un rendimiento cercano al 100 % en la extracción de cobre la efectividad del método quedó constatada, sobre todo si se compara con el rendimiento obtenido por el método convencional (48 %). Para el caso del zinc, se extrajo mediante microondas un 38 % de la cantidad con que inicialmente se había contaminado. El porcentaje extraído por el método convencional fue ligeramente mayor, con un valor del 53 %. A pesar de extraer una cantidad menor de zinc, la técnica asistida por microondas redujo casi 38 veces el tiempo de operación (32 minutos totales frente a 1200 minutos por el modo convencional).

Por tanto, si se tienen en cuenta los tiempos de extracción empleados para las dos técnicas, destaca la remediación basada en las microondas debido al gran ahorro de tiempo que supone. Mientras que para el modo convencional se emplearon 3 horas con el cloruro de calcio, 16 horas para la extracción con ácido acético y 1 hora con AEDT, empleando las microondas estos tiempos se redujeron hasta 8 minutos, 20 minutos y 4 minutos, respectivamente.

Individualmente, dentro del proceso de extracción por microondas, en la tercera etapa, en la que se extraen los metales con AEDT (ácido etilendiaminotetracético), se alcanzan rendimientos superiores al resto de las etapas, caracterizando a este disolvente como el más efectivo de los tres para extraer cobre, hierro y zinc. Resaltando además el hecho de haber sido, de los tres empleados, el que menos tiempo de extracción necesitó (4 min).

Por último, se resuelve la disyuntiva de si las técnicas de extracción de metales ayudan también a poner remedio a la contaminación por microorganismos bacteriológicos. Se comprobó experimentalmente con el medio de cultivo que, tanto las microondas como el método convencional, eliminan en dos fases las principales bacterias procedentes de aguas contaminadas, las bacterias *E. coli*, haciendo del suelo un medio apto para su uso. Por lo que, teniendo la misma efectividad, se mejora el proceso empleando la extracción asistida por microondas, ya que el tiempo requerido es mucho menor, 28 minutos frente a 1140 minutos.

### 5.2 Líneas futuras

Para este trabajo se ha realizado un estudio pormenorizado de los tiempos de extracción óptimos para los disolventes seleccionados. Sería recomendable en futuros trabajos sobre esta técnica el mantener estos tiempos y realizar un barrido probando el amplio abanico de potencias seleccionables en el equipo

microondas. De este modo se continuaría mejorando el método y probablemente se optimizarían más aún los rendimientos.

Según los valores de concentración de metales extraídos de las muestras de suelo y tras comprobar experimentalmente que en dos fases se eliminan la totalidad de las bacterias por ambos métodos, teóricamente, sería factible el desarrollo de plantas y organismos en dicho suelo. No obstante, sería interesante confirmar este hecho mediante la realización de un estudio fitotóxico en el que se compruebe que verdaderamente se desarrollan especies vegetales en el suelo descontaminado.

El metal más empleado en el sector armamentístico es el plomo (Pb). Por eso, sería aconsejable analizar el rendimiento de esta técnica aplicada para extraer plomo de terrenos empleados para ejercicios de tiro, en los que recientemente se ha descubierto un aumento de su concentración natural en el suelo, como consecuencia de estas actividades.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Consejo de Europa, «Carta Europea del Suelo,» 1972.
- [2] Instituto Superior del Medio Ambiente, «ismedioambiente.com,» [En línea]. Available: <http://www.ismedioambiente.com/noticias/la-contaminacion-del-suelo-problematica-de-primer-magnitud>.
- [3] S. Khalid, M. Shahid, N. Khan Niazi, B. Murtaza, I. Bibi y C. Dumat, «A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils,» *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 182, pp. 247-268, 2 Diciembre 2016.
- [4] I. García y C. Dorronsoro, «TEMA 15. Contaminación por metales pesados,» edafología.net, [En línea]. Available: <http://www.edafologia.net/conta/tema15/introd.htm>.
- [5] Jefatura del Estado, «Ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados,» de *BOE 181*, 2011.
- [6] Ministerio de la Presidencia, «Real Decreto 9/2005 Actividades contaminantes del suelo y criterios para declaración de suelos contaminados,» de *BOE 15*, 2005.
- [7] E. Galán Huertos y A. Romero Baena, «Contaminación de suelos por metales pesados,» de *revista de la sociedad española de mineralogía*, Sevilla, 2008.
- [8] I. Ortiz Bernad, J. San García, M. Dorado Valiño y S. Villar Fernández, «Técnicas de recuperación de suelos contaminados,» Universidad de Alcalá, Madrid, 2007.
- [9] «forsuelo.es,» Forsuelo, [En línea]. Available: <http://forsuelo.es/servicios-de-fertilizacion/restauracion-de-suelos-degradados/>.
- [10] B. J. Alloway y A. P. Jackson, «The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils,» *Science of The Total Environment*, vol. 100, pp. 151-176, 1991.
- [11] D. J. Field, «Biorremediación de metales pesados,» 2018. [En línea]. Available: <http://eca-suelo.com.pe/articulos-tecnicos/tecnicas-de-remediacion/>. [Último acceso: 04 Marzo 2018].
- [12] M. Malandrino, O. Abollino, S. Buoso y C. Casalino, «Geochemical characterisation of Antarctic soils and lacustrine sediments from Terra Nova Bay,» *Microchemical Journal*, vol. 92, nº 1, pp. 21-31, 2009.

- [13] A. Filgueiras, I. Lavilla y C. Bendicho, «Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples,» *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 4, nº 6, pp. 823-857, 2002.
- [14] G. Wittman y U. Förstner, «Toxic Metals,» de *Metal Pollution in the Aquatic Environment*, 1981.
- [15] G. Tóth, T. Hermann, M. Da Silva y L. Montanarella, «Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety,» *Environment International*, vol. 88, pp. 209-309, 2016.
- [16] Foucault, Y. Lévêque, T. Xiong, E. Schreck, A. Austray, A. Sahid y M. Dumat, «Green manure plants for remediation of soils polluted by metals and metalloids: Ecotoxicity and human bioavailability assessment,» *Chemosphere*, vol. 93, nº 7, pp. 1430-1435, 2013.
- [17] J. González-Aller Cornago, «Extracción de contaminantes en suelos asistida por ultrasonidos y microondas,» Universidad de Vigo, Marín, 2017.
- [18] C. M. Martínez-Vara de Rey de Artaza, «Optimización de la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos para la descontaminación de suelos,» Universidad de Vigo, Marín, 2015-2016.
- [19] M. Lasat, «Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms.,» *PubMed*, pp. 109-120, 31 Enero 2002.
- [20] R. A. Batista García y A. Sánchez Reyes, «Fitorremediación de metales pesados y microorganismos,» *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, nº 16, pp. 1-6, 2009.
- [21] O. E. Cartaya, I. Reynaldo, C. Peniche y M. L. Garrido, «Empleo de polímeros naturales como alternativa para la remediación de suelos contaminados por metales pesados,» *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, vol. 27, nº 1, pp. 41-46, 2011.
- [22] T. Volke Sepúlveda y J. A. Velasco Trejo, *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*, R. M. d. P. Lalli, Ed., México D.F.: Instituto Nacional de Ecología, 2002, p. 64.
- [23] D. S. Roote, P.G., *In Situ Flushing, Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center*, 1997.
- [24] «CLU-IN (Clean-up Information),» United States Environmental Protection Agency, [En línea]. Available: [https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/In\\_Situ\\_Flushing/cat/Overview/](https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/In_Situ_Flushing/cat/Overview/).
- [25] P. López Julián y J. Mandado Collado, «Extracciones químicas secuenciales de metales pesados. Aplicaciones en ciencias geológicas,» Zaragoza, 2002.
- [26] P. Quevauviller, «Activities in support of standardisation of operationally-defined extraction procedures for soil and sediment analysis,» *Methodologies in soil and sediment fractionation studies*, 2002.
- [27] C. Sparr Eskilsson y E. Björklund, «Analytical-scale microwave-assisted extraction,» *Journal of Chromatography*, pp. 227-250, 2000.
- [28] K. Thirugnanasambandham, V. Sivakumar y J. Prakash Maran, «Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 72, pp. 1-5, 2015.

- [29] M. Letellier y H. Budzinski, «Microwave assisted extraction of organic compounds,» *Analisis*, vol. 27, n° 3, pp. 259-270, 1999.
- [30] J. M. Manso Sayago, Desarrollo de métodos basados en el uso de membranas para la determinación de microcontaminantes orgánicos en alimentos, medio ambiente y fluidos biológicos., Huelva: Universidad de Huelva, Dpto. de Química y Ciencias de los Materiales., 2013.
- [31] S. García-Salgado y M. Á. Quijano, «Rapid metal extractability tests from polluted mining soils by ultrasound probe sonication and microwave-assisted extraction systems,» *Global Pollution Problems, Trends in Detection and Protection*, 08 Noviembre 2016.
- [32] E. Galán Huertos, J. L. Gómez Ariza, N. Bellinfante Crocci y P. Aparicio Fernández, «Contaminación de suelos por compuestos orgánicos,» Comunidad de Andalucía, 2003.
- [33] J. Johansson, L. Paul y R. Finlay, «Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agricultura,» *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 48, pp. 1-13, 2004.
- [34] Ministerio de La presidencia, «Real Decreto 140/2003 sobre criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano,» de *BOE-A-2003-3596*, Madrid, Madrid, 2003.
- [35] Instituto de Salud Pública Gobierno de Chile, «Procedimiento Recuento de Coliformes en Medio Sólido,» 1992.
- [36] MCD LAB, «Agar bilis y rojo violeta,» MCD LAB, Ciudad de México.
- [37] Organizacion Mundial de la Salud, «E. Coli,» 2017.
- [38] G. Pérez, «espectrometria.com,» Facultad Ciencias Biológicas Universidad de Sevilla, [En línea]. Available: [https://www.espectrometria.com/espectrometra\\_ultravioleta-visible](https://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible).
- [39] Universidad de California, «khanacademy.org,» [En línea]. Available: <https://es.khanacademy.org/science/physics/light-waves/introduction-to-light-waves/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>.
- [40] Centro de Apoyo Científico-Tecnológico a la Investigación, «Cactiweb.webs.uvigo.es,» Universiad de Vigo, 2018. [En línea]. Available: <http://cactiweb.webs.uvigo.es/Joomla/index.php/seguridade-alimentaria/icp-oes>. [Último acceso: 28 Febrero 2018].
- [41] Bioser, «bioser.com,» Bioser, 2018. [En línea]. Available: <http://www.bioser.com/p/266/vrbl-agar/>. [Último acceso: 28 Febrero 2018].
- [42] A. M. Sancha, «Presencia de Cobre en Aguas de Consumo Humano: Causas, Efectos y Soluciones,» Santiago, 2002.



## ANEXO I

### CÁLCULOS DISOLUCIONES DISOLVENTES

En este anexo se recogen los cálculos realizados para la preparación de las distintas disoluciones.

DISOLUCIONES	CÁLCULOS
<p><b><u>250 mL CaCl<sub>2</sub> 0,01M:</u></b>                      -Reactivo CaCl<sub>2</sub> dihidratado (polvo).                      -Peso molecular: 147,08 g/mol</p>	$0,250 L \times \frac{0.01 \text{ mol CaCl}_2}{1 L \text{ don}} \times \frac{147,08 \text{ g CaCl}_2}{1 \text{ mol CaCl}_2}$ $\approx \mathbf{0,37 \text{ g CaCl}_2}$
<p><b><u>250 mL CH<sub>3</sub>COOH 0,5 M:</u></b>                      -Reactivo ácido acético glacial (líquido).                      -Peso molecular: 60,05 g/mol                      -Pureza: 99,5 %                      -Densidad: 1,05 Kg/L</p>	$0,250 L \times \frac{0.5 \text{ mol CH}_3\text{COOH}}{1 L \text{ don}} \times \frac{60,05 \text{ g}}{1 \text{ mol CaCl}_2} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,05 \text{ g}}$ $\times \frac{100 \text{ ml reactivo}}{99,5 \text{ mL puros}} \approx \mathbf{7,18 \text{ mL CH}_3\text{COOH}}$
<p><b><u>250 mL AEDT 0,05M:</u></b>                      -Reactivo AEDT (polvo).                      -Peso molecular: 292,24 g/mol</p>	$0,250 L \times \frac{0.05 \text{ mol AEDT}}{1 L \text{ don}} \times \frac{292,24 \text{ g AEDT}}{1 \text{ mol AEDT}}$ $\approx \mathbf{3,65 \text{ g AEDT}}$

Tabla A1-1 Cálculos estequiométricos disoluciones disolventes

## ANEXO II

### RESUMEN ENSAYOS TOTALES

En la Tabla A2-1 mostrada a continuación se resumen todos los ensayos de extracción realizados durante este trabajo en el laboratorio, así como los parámetros y condiciones de trabajo de cada uno.

Fase trabajo	Ensayo	Cantidad suelo (g)*	Fecha	Método	Disolventes empleados			Cantidad disolvente (mL)	Tiempo	Rpm	Tª (°C)	Potencia (W)
					CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	AEDT					
Convencional 1	1		15/01/2018	Convencional	✓			20	3 h	120	25	-
	2	2	15/01/2018	Convencional	➤	✓		20	16 h	120	25	-
	3		16/01/2018	Convencional	➤	➤	✓	20	1 h	120	25	-
Microondas barrido 1	4	2	17/01/2018	MAE	✓			20	2 min	-	-	160
	5	2	17/01/2018	MAE	✓			20	4 min	-	-	160
	6	2	17/01/2018	MAE	✓			20	6 min	-	-	160
	7	2	17/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	8	2	17/01/2018	MAE	✓			20	10 min	-	-	160
Microondas barrido 2	9		22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	10	2	24/01/2018	MAE	➤	✓		20	2 min	-	-	160
	11		22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	12	2	24/01/2018	MAE	➤	✓		20	4 min	-	-	160
	13		22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	14	2	24/01/2018	MAE	➤	✓		20	6 min	-	-	160
	15		22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	16	2	24/01/2018	MAE	➤	✓		20	8 min	-	-	160

Fase trabajo	Ensayo	Cantidad suelo (g)*	Fecha	Método	Disolventes empleados			Cantidad disolvente (mL)	Tiempo	Rpm	Tª (°C)	Potencia (W)
					CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	AEDT					
Microondas barrido 3	17	2	22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	18		24/01/2018	MAE	➤	✓		20	10 min	-	-	160
	19	2	22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	20		24/01/2018	MAE	➤	✓		20	15 min	-	-	160
	21	2	22/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	22		24/01/2018	MAE	➤	✓		20	20 min	-	-	160
	23		25/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	24	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		20	20 min	-	-	160
	25		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	20	2 min	-	-	160
	26		25/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	27	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		20	20 min	-	-	160
	28		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	20	4 min	-	-	160
	29		25/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	30	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		20	20 min	-	-	160
	31		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	20	6 min	-	-	160
	32		25/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	33	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		20	20 min	-	-	160
	34		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	20	8 min	-	-	160
	35		25/01/2018	MAE	✓			20	8 min	-	-	160
	36	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		20	20 min	-	-	160
37		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	20	10 min	-	-	160	

Fase trabajo	Ensayo	Cantidad suelo (g)*	Fecha	Método	Disolventes empleados			Cantidad disolvente (mL)	Tiempo	Rpm	Tª (°C)	Potencia (W)
					CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	AEDT					
Convencional 2	38		30/01/2018	Convencional	✓			20	3 h	120	25	-
	39	2	30/01/2018	Convencional	➤	✓		20	16 h	120	25	-
	40		31/01/2018	Convencional	➤	➤	✓	20	1 h	120	25	-
Convencional 3 CACTI	41		05/02/2018	Convencional	✓			100	3 h	120	25	-
	42	10	05/02/2018	Convencional	➤	✓		100	16 h	120	25	-
	43		06/02/2018	Convencional	➤	➤	✓	100	1 h	120	25	-
Microondas 4 CACTI	44		05/02/2018	MAE	✓			100	8 min	-	-	160
	45	10	05/02/2018	MAE	➤	✓		100	20 min	-	-	160
	46		05/02/2018	MAE	➤	➤	✓	100	4 min	-	-	160
Convencional 4 (Bacterias)	47		21/02/2018	Convencional	✓			100	3 h	120	25	-
	48	10	22/02/2018	Convencional	➤	✓		100	16 h	120	25	-
	49		23/02/2018	Convencional	➤	➤	✓	100	1 h	120	25	-
Microondas 5 (Bacterias)	50		21/02/2018	MAE	✓			100	8 min	-	-	160
	51	10	22/02/2018	MAE	➤	✓		100	20 min	-	-	160
	52		23/02/2018	MAE	➤	➤	✓	100	4 min	-	-	160

Tabla A2-1 Resumen ensayos en laboratorio

(\*) No se han tenido en cuenta en esta tabla las pérdidas por filtración que se detallan en el Anexo IV.

(✓) Disolvente utilizado en este ensayo para extracción de metales.

(➤) Disolvente previamente utilizado en esa muestra de suelo para extracción de metales

## ANEXO III

### CÁLCULOS RECTA DE CALIBRADO

En primer lugar se prepara la disolución patrón de sulfato de cobre, que será utilizada posteriormente para las muestras que permitirán el trazado de la recta de calibrado. A continuación se detallan los cálculos que fueron necesarios:

DISOLUCIÓN	CÁLCULOS
<p><b>50 mL CuSO<sub>4</sub> 0,1M:</b>                      -Reactivo CuSO<sub>4</sub> pentahidratado (polvo).                      -Peso molecular: 249,68 g/mol</p>	$5 \cdot 10^{-3} L \times \frac{0,1 \text{ mol CuSO}_4}{1 L d^{on}} \times \frac{249,68 \text{ g CuSO}_4}{1 \text{ mol CuSO}_4} \approx$ $\approx 1,25 \text{ g CaCl}_2$

**Tabla A3-1 Cálculos estequiométricos disolución patrón CuSO<sub>4</sub>**

Las concentraciones de cobre de las 8 muestras para trazar la recta de calibrado se resumen en la Tabla A3-2. Todas son muestras realizadas a partir de la disolución patrón anterior con diferentes concentraciones. Cada una fue preparada para un volumen de 50 mL en matraces aforados de esa capacidad.

MUESTRA	CANTIDAD DISOLUCIÓN PATRÓN (mL)	CÁLCULOS
Blanco	0	-
M.1	0,25	$\frac{0,25 \cdot 10^{-3} L \text{ CuSO}_4}{0,05 L d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 L d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 31,78 \text{ ppm} = 31,78 \frac{\text{mg Cu}}{L d^{on}}$
M.2	0,5	$\frac{0,5 \cdot 10^{-3} L \text{ CuSO}_4}{0,05 L d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 L d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 63,55 \text{ ppm} = 63,55 \frac{\text{mg Cu}}{L d^{on}}$
M.3	0,75	$\frac{0,75 \cdot 10^{-3} L \text{ CuSO}_4}{0,05 L d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 L d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 95,33 \text{ ppm} = 95,33 \frac{\text{mg Cu}}{L d^{on}}$
M.4	1	$\frac{1 \cdot 10^{-3} L \text{ CuSO}_4}{0,05 L d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 L d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 127,10 \text{ ppm} = 127,10 \frac{\text{mg Cu}}{L d^{on}}$

MUESTRA	CANTIDAD DISOLUCIÓN PATRÓN (mL)	CÁLCULOS
M.5	2,5	$\frac{2,5 \cdot 10^{-3} \text{ L CuSO}_4}{0,05 \text{ L } d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 \text{ L } d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 317,75 = 317,75 \frac{\text{mg Cu}}{\text{L } d^{on}}$
M.6	5	$\frac{5 \cdot 10^{-3} \text{ L CuSO}_4}{0,05 \text{ L } d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 \text{ L } d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 635,50 \text{ ppm} = 635,50 \frac{\text{mg Cu}}{\text{L } d^{on}}$
M.7	7,5	$\frac{7,5 \cdot 10^{-3} \text{ L CuSO}_4}{0,05 \text{ L } d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 \text{ L } d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 953,25 \text{ ppm} = 953,25 \frac{\text{mg Cu}}{\text{L } d^{on}}$
M.8	10	$\frac{10 \cdot 10^{-3} \text{ L CuSO}_4}{0,05 \text{ L } d^{on}} \times \frac{0,1 \text{ mol Cu}}{1 \text{ L } d^{on}} \times \frac{63,55 \text{ g Cu}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$ $= 1271 \text{ ppm} = 1271 \frac{\text{mg Cu}}{\text{L } d^{on}}$

Tabla A3-2 Concentraciones Cu de las muestras para recta de calibrado

## ANEXO IV

### PÉRDIDAS POR FILTRACIÓN

Los procesos de filtración fueron necesarios para separar el suelo del disolvente y poder así reutilizar la muestra para las siguientes fases del proceso de remediación de suelos. Durante este proceso un porcentaje de la muestra inicial de suelo se quedaba adherida en el filtro de microfibra de vidrio, tal y como se puede apreciar en la Figura A4-1. Para calcular esa cantidad perdida se pesa el filtro limpio y después, una vez se haya secado, se pesa el filtro después de haberse realizado la filtración.



**Figura A4-1 Ejemplo pérdidas por filtración**

De cualquier modo, el mayor valor de pérdidas de todas las experiencias fueron 0,08 g de una muestra de 10 g de suelo, lo que equivale a un 0,8% de la cantidad inicial muestreada, un valor prácticamente despreciable. En la Tabla A4-1 mostrada a continuación quedan registradas las pérdidas de cada ensayo.

Fase trabajo	Ensayo	Cantidad muestra (g)	Fecha	Método	Disolventes empleados			Cantidad inicial muestra (g)	Pérdidas (g)	Cantidad final muestra (g)
					CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	AEDT			
Convencional 1	1		15/01/2018	Convencional	✓			2	0,06	1,94
	2	2	15/01/2018	Convencional	➤	✓		1,94	0,05	1,89
	3		16/01/2018	Convencional	➤	➤	✓		1,89	0,05
Microondas barrido 1	4	2	17/01/2018	MAE	✓			2	-	-
	5	2	17/01/2018	MAE	✓			2	-	-
	6	2	17/01/2018	MAE	✓			2	-	-
	7	2	17/01/2018	MAE	✓			2	-	-
	8	2	17/01/2018	MAE	✓			2	-	-
Microondas barrido 2	9	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,03	1,97
	10		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,97	-	-
	11	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,04	1,96
	12		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,96	-	-
	13	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,03	1,97
	14		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,97	-	-
	15	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,03	1,97
	16		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,97	-	-
	17	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,05	1,95
	18		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,95	-	-
	19	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,05	1,95
	20		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,95	-	-

Fase trabajo	Ensayo	Cantidad muestra (g)	Fecha	Método	Disolventes empleados			Cantidad inicial muestra (g)	Pérdidas (g)	Cantidad final muestra (g)
					CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	AEDT			
Microondas barrido 3	21	2	22/01/2018	MAE	✓			2	0,05	1,95
	22		24/01/2018	MAE	➤	✓		1,95	-	-
	23		25/01/2018	MAE	✓			2	0,04	1,96
	24	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		1,96	0,04	1,92
	25		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	1,92	-	-
	26		25/01/2018	MAE	✓			2	0,04	1,96
	27	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		1,96	0,03	1,93
	28		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	1,93	-	-
	29		25/01/2018	MAE	✓			2	0,03	1,97
	30	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		1,97	0,03	1,94
	31		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	1,94	-	-
	32		25/01/2018	MAE	✓			2	0,02	1,98
	33	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		1,98	0,02	1,96
	34		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	1,96	-	-
	35		25/01/2018	MAE	✓			2	0,02	1,98
	36	2	25/01/2018	MAE	➤	✓		1,98	0,02	1,96
	37		26/01/2018	MAE	➤	➤	✓	1,96	-	-
Convencional 2	38		30/01/2018	Convencional	✓			2	0,04	1,96
	39	2	30/01/2018	Convencional	➤	✓		1,96	0,04	1,92
	40		31/01/2018	Convencional	➤	➤	✓	1,92	0,05	1,87

Fase trabajo	Ensayo	Cantidad muestra (g)	Fecha	Método	Disolventes empleados			Cantidad inicial muestra (g)	Pérdidas (g)	Cantidad final muestra (g)
					CaCl <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> COOH	AEDT			
Convencional 3 CACTI	41		05/02/2018	Convencional	✓			10	0,08	9,92
	42	10	05/02/2018	Convencional	➤	✓		9,92	0,05	9,87
	43		06/02/2018	Convencional	➤	➤	✓		9,87	0,06
Microondas 4 CACTI	44		05/02/2018	MAE	✓			10	0,05	9,95
	45	10	05/02/2018	MAE	➤	✓		9,95	0,04	9,91
	46		05/02/2018	MAE	➤	➤	✓		9,91	0,05

**Tabla A4-1 Pérdidas por filtración de cada ensayo**

(-): No afecta a los resultados

## ANEXO V

### CÁLCULOS CONCENTRACIÓN DE METALES Y RENDIMIENTOS

En este anexo se detalla el procedimiento de cálculo llevado a cabo para calcular la concentración inicial de metales contaminantes en el suelo, así como los rendimientos de cada extracción.

- Concentración inicial de metales contaminantes:

Sabiendo que se añadieron 500 mg de cada metal a medio kilogramo de suelo, se obtiene una concentración de cada metal en el suelo de 1000 ppm. La humedad del suelo contaminado era del 70,86 %. Con estos datos se calcula:

$$\frac{500 \text{ mg metal}}{0,5 \text{ kg suelo humedo}} \times \frac{100 \text{ kg suelo humedo}}{29,14 \text{ kg suelo seco}} = 3431,71 \text{ ppm}$$

- Concentración de metales en disolvente extraído:

Del valor de la absorbancia de las muestras de cada disolvente y la ecuación de la recta de calibrado, se obtiene la concentración de cada metal en el disolvente en partes por millón respecto al volumen de disolvente (mg metal/L disolvente). Con estos datos, con la humedad y sabiendo que la relación suelo-disolvente para cada experiencia fue 1:10 se hallan las concentraciones de metal extraídas del suelo con respecto a la cantidad de suelo seco. A continuación se muestra un ejemplo de dichos cálculos para la extracción de cobre con cloruro de calcio siguiendo el método convencional:

-Humedad: 71,43 %

-Muestra suelo: 10 g

-Volumen disolvente: 100 mL

$$\frac{29,59 \text{ mg Cu}}{1 \text{ L disolvente}} \times \frac{100 \cdot 10^{-3} \text{ L disolvente}}{10 \text{ g suelo húmedo}} \times \frac{100 \text{ g suelo húmedo}}{28,57 \text{ g suelo seco}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \\ = 1035,55 \frac{\text{mg Cu}}{\text{kg suelo seco}} = 1035,55 \text{ ppm}$$

Cabe destacar que tras cada extracción se producen pérdidas de suelo debido a las filtraciones. Esas pérdidas, previamente recogidas en el Anexo IV, se deben tener en cuenta para calcular las concentraciones de metales en los siguientes disolventes empleados.

- Rendimiento:

Conociendo la concentración inicial de metales y la concentración extraída con los disolventes, se calcula el rendimiento, que ofrece una idea de la efectividad de cada etapa del proceso. A continuación se calcula el rendimiento del ejemplo anterior:

$$\frac{1035,55 \text{ ppm}}{3431,71 \text{ ppm}} \times 100 = 30,18 \%$$

Sumando los rendimientos de los tres disolventes empleados para extraer cobre (12,17 % ácido acético y 6,11 % AEDT) se obtiene el rendimiento total del proceso de extracción:

$$30,18 + 12,17 + 6,11 = \mathbf{48,46\%}$$

48,46% es el rendimiento del proceso de extracción de cobre del suelo por el método convencional. El procedimiento es el mismo para el resto de metales por cada uno de los métodos empleados.

