



**Universitat Autònoma de Barcelona**



**Escola d'Enginyeria**

**Departament d'Enginyeria Química**

**Biodegradació de compostos orgànics  
halogenats amb *Trametes versicolor***

**MEMÒRIA DE TESI DOCTORAL**

**MARCEL VILAPLANA ARTIGAS**

**Bellaterra, Juny 2011**

**Títol:** Biodegradació de compostos orgànics halogenats amb *Trametes versicolor*

**Realitzat per:** Marcel Vilaplana Artigas

**Dirigit per:** Gloria Caminal Saperas i Montserrat Sarrà Adroguer

Programa de Doctorat de Ciències Ambientals.

Departament d'Enginyeria Química.

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria.

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. 2011.

Aquest treball ha estat finançat pels projectes CTQ2004-01459 i CTM2007-60971/TECNO del Ministerio de Educación y Ciencia, i pel projecte 010/PC08/3-04.1 del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Part d'aquest treball s'ha realitzat al Centre de Recerca Mediambiental Helmholtz, situat a Leipzig, Alemanya, sota la supervisió del Dr. Ernest Marco-Urrea i la Dra. Mònica Rosell.

GLÒRIA CAMINAL SAPERAS, Científica Titular del CSIC a la Unitat de Biocatàlisi Aplicada associada al IIQAB, i MONTSERRAT SARRÀ ADROGUER, Professora Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que el titulat en Enginyeria Química Marcel Vilaplana Artigas ha realitzat sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química el treball que amb el títol “**Biodegradació de compostos orgànics halogenats amb *Trametes versicolor***”, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, Juny de 2011

Dra. Glòria Caminal Saperas

Dra. Montserrat Sarrà Adroguer



***Als meus pares.***



# Agraïments

---

En primer lloc, vull agrair especialment a la Montse i a la Glòria tota la seva ajuda per poder realitzar aquesta Tesi doctoral, no només el fet que em donessin l'oportunitat d'entrar al grup ja fa uns anys, sinó també per la seva implicació durant tots aquests anys i en alguns moments també pel necessari suport moral davant les nombroses dificultats que ens hem anat trobant en aquest llarg camí. També estic molt agraït a la Teresa, que de tant en tant ha fet de tercera directora intentant aportar solucions als problemes, i que sempre m'ha tractat molt bé i m'ha ajudat en tot el que he necessitat.

A més a més, m'agradaria agrair l'ajuda i l'amistat que he rebut dels companys/es "Tòxics", dels que encara hi són i dels que van marxar en algun moment. Gràcies a Xavi, Paqui, realment vam formar un bon tàndem fent classes a la tècnica; Núria, Laura, per quan la primera peli?; Lucía, sempre disposada a ajudar-me en qualsevol cosa, incloent l'operació exprés "Menjar pel fong de Leipzig que si no això s'enfonsa", Carles, Marina, Ana, gracias por enseñarme el "maravilloso" mundo del redox cycling y por estar currando codo a codo conmigo hasta las tantas; Carlos, de todas las conversaciones musicales, me quedo con la de "Throwing Copper" de Live, me descubriste un gran, gran disco; Belén, Croatian Holidays!; Paula, vas estar poc temps però vas deixar empremta, sempre amb la teva "felicitat", quin acudit més dolent...; Ernest, que em va fer de "profe" al laboratori quan vaig entrar i que més tard, va ser amfitrió i gran amic de laboratori-sopars-fiestons varis-viatges a la bonica vila de Leipzig durant uns mesos que vaig comprovar què és realment un hivern i pràcticament no vaig aprendre alemany, però m'ho vaig passar molt bé. Entre tots els companys de laboratori del grup, especialment vull donar les gràcies al que podríem dir que ha estat el meu "germanet" de Tesi, una mica cursi l'expressió però bueno; Edu, vam començar i pràcticament hem acabat alhora la Tesi, hem passat hores i hores colze amb colze al laboratori cadascú amb les seves històries i fent-nos costat en les diverses frustracions que ens anàvem trobant al llarg dels anys al so de "I a vegades ens en sortim...". Ha estat un autèntic plaer compartir amb tu converses músico-artístiques-venedores de fum, cursets de vins, visites a Praga i festes i sopars varis durant tot aquest temps...i tenint en compte que els dos tenim un pis a Barcelona i suburbi pijo respectivament, ens seguirem veient sovint segur...

Gràcies a tota la gent amb la que he anat compartint despatx tots aquests anys. Primer amb la Cristina i la Engreis, amb la que vam compartir moltes xerrades i riures,

després es va afegir un dupla fantàstica, a l'alçada de les millors davanteres de la història del futbol, Carol i Torà, després amb el Carles i el Jordi, amb els que vam formar un despatx realment animat. I finalment va arribar la Núria, amb la que també hem compartit molts bons moments.

Gràcies a l'ajuda del dia a dia a la gent que treballa al laboratori, Manuel, Pili, Margot (temporalment...) i molt especialment, a la Rosi, per no tenir mai un no per resposta quan t'he demanat ajuda tot i estar enfeïnada, i per ser una persona tan agradable, realment ets un 10. I a la gent de secretaria, sempre diligent i amable al màxim. Gràcies Míriam, Montse, Nati, Rosa i Ernestina.

Gràcies a la penya del Supermanager, Albert, Paco, Xavi, Torà i Roger (realment no és el teu fort). Ens ho hem passat molt bé discutint de bàsquet, ara, he deixat de gaudir dels partits de l'ACB...Navarro ha fallat un tir!! No, la valoració, la valoració!!

From my stage in Leipzig, first I want to thank to all the people in the research group, Lorenz, Benny, Ken, Duan, Josefine, Jennifer, Camelia and Ernest. Thanks for all your help and your kindness. Y por supuesto el agradecimiento total a la Spanish Mafia, sois unos cracks!! Juan, Javi, Edu, Patri, Vassilis, Ailette, Sven, Enrique, Cristóbal, Maite, Ana, Sara, Rafa, Ernest, Camelia. Realmente me lo pase muy, muy bien en Leipzig, con mil anécdotas divertidas que me llevo, y en gran, gran parte gracias a vosotros...Pero por encima de todo, mi "jefa" y la de la Spanish Mafia, Mònica, la que manejaba el cotarro en Leipzig, moltes gràcies per tot. Va estar molt bé treballar amb tu durant aquells mesos descobrint el món del fraccionament isotòpic, i si la feina no va acabar de sortir no serà perquè no ho vam intentar, simplement que el fong no tenia ganes de treballar. Però per sobre de l'ajuda professional, simplement és que ets un encant com a persona i potser no te n'adones però el simple fet d'estar sempre de bon humor i tenir aquesta simpatia radiant, alegres a tota la gent del teu voltant, i mira que costa al Desembre a Leipzig... osti quin fred que cardava!

Què puc dir de tota la gent, amb la que potser no hem treballat junts, però que hem anat fent una gran amistat al llarg del anys. Merci a tots per fer els dies de feina divertits i per tot el que hem compartit. Engreis, que lluny queda quan vam entrar junts al departament com uns "pipiolillos"; Núria, la sex symbol del departament sense cap mena de dubte; Sergio Ríos, grande argentino!; Kristin, ets un encant i fas el millor apfelstrudel i el millor pa del mon, que lo sepas; Carlota, ets fantàstica, sempre alegre i disposada a fer "jarana"; Ramon, merci per tota l'ajuda i per ser tan catxondo; Margot,



Juliana, Belén, Cynthia JuanMi, he rigut molt amb el teu sentit de l'humor; Alfred, Lastres forever!; Laura i Ernest, que al final ens en sortirem tots ja veureu...

Que no m'oblido de vosaltres! Que anàvem a menjar-nos el món i no ens hem menjat un "colín"... ara, els Machos Alfa sempre amb la dignitat intacta. Realment m'ho he passat molt molt bé en cadascun dels sopars i sortides que hem fet i tot el que hem compartit al departament i el que queda que encara ens queda corda... Roger, Sergio, Joan, Óscar (te pongo dentro del grupo pero no sé si te lo mereces...jeje...), Michele, Marc, Edu, Bartro (Tamudator!), Jero i Torà. Simplement sou uns grandes! I penseu que vam aconseguir que les noies ens copiessin la idea i fessin carnets igual que nosaltres...Això no té preu...Merci per tot nanos (no queda molt macho alfa això...)

Carol, benvolguda, com hem rigut al despatx! De la carrera no ens coneixíem gaire però t'has convertit en una gran amiga després d'aquests anys junts al departament. Recordo quan estàvem fent les assignatures d'Informàtica i de Processos biotecnològics, era una feinada però ens ho passàvem bé; totes les hores de feina amb la música de Manel i tantes i tantes anècdotes (el facebook fa molt mal...), tranquila que ens seguirem veient, que encara he de perfeccionar la meva tècnica d'esquí...jeje...Merci per tot, de veritat....

Que us pensàveu que me'n oblidava, a vosaltres us he deixat pel final (de la gent del departament), simplement sou uns grans, grans amics i de les millors persones que conec. Ens ho hem passat molt bé junts, grans viatges, mil anècdotes que m'enrecordaré tota la vida i ara simplement cadascú anirà pel seu camí i en lloc de compartir minis al bar de la ETSE, farem canyetes i soparets a qualsevol banda, però tot seguirà igual... Jero i Torà, Moltes moltes gràcies per tot....

I també hi ha vida fora del departament...si si certament... A tots els meus amics, que ja fa molts i molts anys que m'aguanteu i que també m'heu alegrat la vida en els moments difícils de la tesi i de fet, que m'alegreu la vida sempre amb o sense tesi...

Gràcies a la penyita de la carrera, Ramon, trincador professional i millor persona; Xavi, com pots ser que hagis arribat a ser jefe amb samarretes de Bud Spencer, suposo que serà perquè ets un tio de puta mare...; Irene, sempre fantàstica i de tant en tant, tensant una mica la corda que si no ens adormim...jeje...; Vane, també fantàstica i contigo siempre me parto y me mondo; Laura, també també fantàstica, sempre somrient i alegre davant qualsevol circumstància, un Sol; Priu i Enric, vosaltres

després. Ens ho vam passar molt molt bé quan estudiàvem junts i ens ho seguim passant molt molt bé quan quedem. Realment et poses a pensar el temps que fa que ens coneixem i les milers d'anècdotes que han sorgit, i veus que ens seguim portant igual de bé que sempre...Simplement que es fantàstic que ens puguem seguir veient i per molts anys...I no, el de Istanbul del tramvia no era jo...quants cops ho he de dir...

Gràcies als amics de Sant Cugat (i als que no ho sou però com si ho fóssiu que sembla que ens coneguem de tota la vida). Pere, ets el tio que coneix més gent del món mundial però sempre deixes clar qui són els teus amics i això no té preu (Si fins i tot et vas aprendre el títol del meu màster, ara toca el de la tesi...), i a sobre ets bon tio, imagina't...; Monzón, company infatigable de Barças, en les èpoques fosques gaspartianes i en les èpoques glorioses guardiolistes (Si si ara és molt fàcil ser del Barça...) i d'altres mil històries (que ens coneixem des de que teníem 8 anys...), i gran gurú de les sèries, per cert; Joan, referent musical i mira que es buena persona, qui hagués dit que acabaria sent fan de Los Planetas, i si si és culpa teva...; Enric, també referent musical i el tio que fa els millors varis de música del món (millor que els meus, imagina't!), i Saleta, ets un encant, i a veure quan ens convides a fer uns pulpitos a Galícia, que ja toca; Laura, la reina per haver-nos aguantat a tots durant tants anys, que no és fàcil, et mereixes un monument!; Dani, ets el tio més divertit que conec i a més a més mira que es buena persona, llàstima que t'agradi tant això de fer Erasmus, torna ja! Que et trobem a faltar!; Erik, ets un tio fantàstic i el recurs perfecte per quan fas anys: "Però l'Erik és més gran...", Ruby, bring him back to Barcelona that we miss you a lot!; Rosic, ets un grande i quan presenti la tesi, em convides a dinar o sopar a casa teva no? (Quina cara...); Marc, potser no ens veiem mai però segueixes sent un gran amic per mi, algun dia hem de quedar eh...; Júlia, sempre alegre i radiant, em quedo amb els viatgets que hem fet i algun més farem no?; Frede, ets un campeón i com hem rigut durant tots aquests anys, quan tornis de Madrid celebrem la Champions en condicions no?; Manu, també un campeón i em quedo amb la imatge teva cantant "Madrid se quema!" amb la samarreta del Barça el dia que vam guanyar la Champions en ple centre de la capital...això no té preu!; Miki, ets un grande i Viva San Esteban! (Que no recordo com es diu el poble on vius ara...); Susana, ets fantàstica i a veure quan ens vens a veure!; Sebas y Lucía, esos Uruguayos maravillosos; i els millors companys de pis, i amics es clar, que podria haver tingut (Visca Santjoanistes!), Priu (abans amic que company de pis), ets el rei, sempre anant a muerte amb el cubatilla a la mà i el somriure a la boca, jo de gran vull ser com tu, i Elisa, que al final era com si visquessis al pis, ets fantàstica (tot i els punyalitos) i convida'ns a Girona que el Priu no ho farà; Sergio, eres la raja wan! Vente ya para Barcelona, que te estás perdiendo los

mejores años del Barça; Jordi, ets un tio de puta mare, com vam riure al pis i després també, i tu sempre alegre, bueno sempre sempre tampoc, quan estava el Michael Jackson al pis i arribaven factures de telèfon de 200 euros, tan tan alegre ja no estaves... I em falten els tiki-takeros, merci per les grans tardes de futbol espectacle i esquinços de turmell, quan la pluja ens ha deixat: Roquinho, Roger, Thomas, Dani Love, Pere, Xavi, Jordi, Joan, Priu, Sergio, Adri, Ana, Malte, Bernat, Coutinho, Martí i sobretot, Pablo, als meus amics els hi explico l'anècdota del mail i encara no se la creuen...

I ara toca el torn familiar. Moltes, moltes gràcies a tota la meva família per estimar-me tant. Gràcies Àvia, per cuidar-me i preocupar-te tant sempre per mi i intentar sempre fer-me content; Gràcies Carmen i Tieta, també sempre cuidant-me al màxim i preocupant-vos per com em va i preguntant si el fong treballava o no treballava; Gràcies per tot al tiet Joan, tieta Rosa, Guillem i Eduard; Gràcies a la demás família. I gràcies als que van marxar fa un temps i que em van estimar tant i que no podran llegir aquestes paraules, Gràcies Avi Joan, Gràcies Avi Quim, Gràcies Àvia Enriqueta, Gràcies Tiet Enric, Gràcies Tiet Santi...

I ara arriben els agraïments per a les persones més importants de la meva vida, els meus pares. Mires enrere i han passat 30 anys, i penso com m'heu educat, com m'heu cuidat, com us heu preocupat per mi, com m'heu donat suport sempre, com m'heu fet créixer l'interès per la ciència i per la cultura, a pensar per mi mateix, a ser crític, a valorar l'esforç i les coses que tenim, en resum, com m'heu estimat i realment, no podria haver estat millor. Estic molt i molt content de que sigueu tan feliços i encara us queden molts i molts anys per gaudir de la vida. He tingut la gran, gran sort de tenir uns pares com vosaltres. Us estimo tant, tant i tant...

I aquí arriba el final...Mira que el principi pensava, faré una cosa senzilla, una pàgina o pàgina i mitja i ja està, però ja em coneixeu, que m'allargo i et poses a escriure i a pensar amb tota la gent que t'aprecia, que t'ha ofert la seva amistat, que t'ha estimat i acabes parlant pels colzes...Simplement un petó molt fort a tots! Fins aviat!

MARCEL.

P.D.: <http://www.youtube.com/watch?v=9XV776PWcLA> (Vale sí, soc un pesat, però alguna banda havien de sortir ells també...Crec que era de felicitat, jo diria que era de felicitat...)



# Índex

---

<b>Resum.....</b>	<b>I-III</b>
<b>Capítol 1 Introducció general .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aplicació dels fongs ligninolítics a la bioremeiació .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Sistema enzimàtic dels fongs de podridura blanca.....	3
1.1.1.1 Lacasa i peroxidases extracel·lulars .....	3
1.1.1.2 Sistema citocrom P450 .....	6
<b>1.2 El fong <i>Trametes versicolor</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>Capítol 2 Objectius .....</b>	<b>9</b>
<b>Capítol 3 Materials i mètodes .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Microorganismes .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Contaminants i reactius.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Medis i producció de pèl·lets .....</b>	<b>12</b>
3.3.1 Medis líquids.....	12
3.3.2 Producció de pèl·lets .....	14
<b>3.4 Experiments amb <i>Trametes versicolor</i> .....</b>	<b>15</b>
3.4.1 Determinació del consum d'oxigen .....	15
3.4.2 Preparació de solucions stock .....	18
3.4.3 Contaminants volàtils.....	20
3.4.3.1 Adsorció de TCE i PCE.....	20
3.4.3.2 Desorció de TCE i PCE.....	21
3.4.3.3 Degradació de TCE i PCE en ampelles de sèrum.....	22
3.4.3.4 Degradació de TCE en reactor agitat.....	24
3.4.3.5 Degradació de MTBE, ETBE, toluè i etilbenzè .....	29
3.4.3.6 Càlcul de la degradació de compostos volàtils .....	31
3.4.4 Contaminants no volàtils.....	32
3.4.4.1 Degradació de polibromodifenil éters.....	32

3.4.4.2	Càlcul de la degradació de compostos no volàtils .....	35
3.4.5	Contaminants volàtils sota condicions de cicle redox .....	36
3.4.5.1	Degradació de TCE en ampolles de sèrum .....	36
3.4.5.2	Degradació de TCE en reactor .....	37
3.4.5.3	Degradació de MTBE i ETBE en tubs de rosca .....	37
3.4.5.4	Càlcul de la degradació de compostos volàtils .....	38
3.4.6	Contaminants no volàtils sota condicions de cicle redox .....	39
3.4.6.1	Degradació de decaBDE.....	39
3.4.6.2	Degradació de carbamazepina .....	39
3.4.6.3	Càlcul de la degradació de contaminants no volàtils .....	42
<b>3.5</b>	<b>Mètodes analítics .....</b>	<b>43</b>
3.5.1	Concentració de contaminants volàtils .....	43
3.5.1.1	Productes clorats.....	43
3.5.1.2	MTBE i ETBE .....	44
3.5.1.3	Toluè i etilbenzè .....	45
3.5.2	Concentració de contaminants no volàtils .....	45
3.5.2.1	PBDEs.....	45
3.5.2.2	PBDEs hidroxilats.....	47
3.5.2.3	Carbamazepina i DBQ .....	49
3.5.3	Relació isotòpica d'elements en mostres de degradació de contaminants.. .....	49
3.5.3.1	TCE i PCE .....	49
3.5.3.2	MTBE i ETBE .....	50
3.5.3.3	Toluè i etilbenzè .....	50
3.5.3.4	DecaBDE.....	51
3.5.4	Concentració de glucosa .....	51
3.5.5	Concentració de bromurs.....	51
3.5.6	Activitat enzimàtica lacasa.....	51
3.5.7	Producció de TBARS.....	52
3.5.8	Determinació de la biomassa per pes sec .....	52
3.5.9	Densitat dels pèl·lets.....	52
3.5.10	Mesura del pH .....	53
<b>3.6</b>	<b>Metodologia estadística.....</b>	<b>53</b>
3.6.1	Metodologia de disseny experimental i anàlisi estadístic dels experiments de degradació de TCE mitjançant el procés biooxidació avançada .....	53

<b>Capítol 4 Disseny i aplicació d'un bioreactor per degradar triclороetilè mitjançant <i>Trametes versicolor</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 Introducció.....</b>	<b>56</b>
4.1.1 Contaminació del medi per triclороetilè i tetraclороetilè.....	56
4.1.1.1 Processos de transport de TCE al medi ambient .....	58
4.1.1.2 Normativa respecte la contaminació de TCE i PCE .....	60
4.1.2 Processos de biodegradació de TCE .....	62
4.1.2.1 Degradació bacteriana .....	62
4.1.2.2 Degradació de TCE per fongs de podridura blanca.....	70
4.1.3 Tractaments per a la degradació de TCE en medi líquid <i>in-situ</i> i <i>ex-situ</i> .....	75
4.1.3.1 Tractaments físics .....	76
4.1.3.2 Tractaments químics .....	78
4.1.3.3 Tractaments biològics .....	80
<b>4.2 Resultats i discussió .....</b>	<b>86</b>
4.2.1 Equilibri vapor-líquid del TCE i PCE .....	86
4.2.2 Equilibri sòlid-líquid del TCE i PCE.....	89
4.2.2.1 Isotermes d'adsorció del TCE i PCE.....	89
4.2.2.2 Avaluació de la isoterma lineal d'adsorció del TCE i PCE en un sistema trifàsic en condicions de degradació .....	92
4.2.3 Consum d'oxigen .....	95
4.2.3.1 Càlcul del consum d'oxigen mitjançant la tècnica dinàmica .....	96
4.2.3.2 Càlcul del consum d'oxigen en ampolla de sèrum.....	100
4.2.4 Determinació de l'equació cinètica de desaparició de TCE .....	101
4.2.5 Disseny del reactor per a la degradació de TCE .....	106
4.2.5.1 Procediment de càlcul dels paràmetres del reactor.....	107
4.2.5.2 Resultats obtinguts.....	109
4.2.6 Aplicació del procés de disseny del reactor per degradar TCE i estudi de l'efecte de diferents paràmetres experimentals sobre la seva degradació.....	114
4.2.6.1 Estimació del temps d'esgotament d'oxigen en les ampolles de sèrum.....	114
4.2.6.2 Estudi de l'efecte de diferents paràmetres en la degradació de TCE en ampolles de sèrum.....	116
4.2.6.3 Estudi de l'efecte de diferents paràmetres experimentals en la degradació de TCE en reactor de tanc agitat .....	122
<b>4.3 Conclusions.....</b>	<b>134</b>

## **Capítol 5 Degradació de polibromodifenil éters en medi líquid mitjançant *Trametes versicolor* ..... 135**

### **5.1 Introducció..... 136**

- 5.1.1 Contaminació del medi ambient per la presència de polibromodifenil éters..... 136
  - 5.1.1.1 Vies de contaminació i processos de transport de PBDEs al medi ambient..... 139
- 5.1.2 Degradació biològica de PBDEs..... 140
  - 5.1.2.1 Degradació aeròbia..... 141
  - 5.1.2.2 Degradació anaeròbia..... 145
  - 5.1.2.3 Degradació de PBDEs en mamífers ..... 148

### **5.2 Resultats i discussió ..... 151**

- 5.2.1 Degradació de decaBDE en fase aquosa..... 151
  - 5.2.1.1 Determinació de la capacitat de degradació de decaBDE..... 151
  - 5.2.1.2 Avaluació de l'efecte de diferents surfactants..... 156
- 5.2.2 Determinació de la via de degradació de decaBDE..... 159
  - 5.2.2.1 Estudi *in vitro* amb lacasa comercial i mediadors ..... 160
  - 5.2.2.2 Estudi *in vivo* amb inhibidors del citocrom P450..... 161
  - 5.2.2.3 Mineralització de DecaBDE ..... 162
  - 5.2.2.4 Mesura d'ions bromur alliberats al medi per la degradació de decaBDE ..... 166
  - 5.2.2.5 Degradació de DecaBDE en discontinus seqüencials mitjançant la reutilització del fong..... 168
- 5.2.3 Degradació de les mesclures comercials de pentaBDEs i d'octaBDEs ... 169
- 5.2.4 Identificació dels productes de degradació de PBDEs ..... 173

### **5.3 Conclusions..... 177**

## **Capítol 6 Degradació de contaminants mitjançant el procés de biooxidació avançada amb *Trametes versicolor* ..... 179**

### **6.1 Introducció..... 180**

### **6.2 Resultats i discussió ..... 185**

- 6.2.1 Degradació de decabromodifenil éter ..... 185
- 6.2.2 Degradació de tricloroetilè ..... 188
  - 6.2.2.1 Optimització de les condicions d'operació ..... 190



6.2.3	Degradació de carbamazepina en reactor mitjançant el procés de biooxidació avançada .....	197
6.2.3.1	Comparació de la degradació de carbamazepina en diferents reactors operant en discontinu .....	197
6.2.3.2	Formes d'operació per degradar carbamazepina en reactor.....	199
<b>6.3</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>205</b>
<b>Capítol 7 Aplicació de l'anàlisi isotòpic d'elements estables en la degradació de compostos recalcitrants mitjançant <i>Trametes versicolor</i> .....</b>		<b>207</b>
<b>7.1</b>	<b>Introducció.....</b>	<b>207</b>
<b>7.2</b>	<b>Resultats i discussió .....</b>	<b>218</b>
7.2.1	Degradació de metil tert-butil éter i etil tert-butil éter .....	218
7.2.2	Degradació de MTBE i ETBE mitjançant el procés de biooxidació avançada .....	221
7.2.3	Degradació de tricloroetilè i tetracloroetilè .....	225
7.2.4	Degradació de toluè i etilbenzè.....	227
<b>7.3</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>230</b>
<b>Capítol 8 Conclusions globals .....</b>		<b>231</b>
<b>Capítol 9 Annexes.....</b>		<b>233</b>
<b>Capítol 10 Bibliografia.....</b>		<b>237</b>



## Resum

---

La contaminació del medi ambient per la presència de compostos químics com a conseqüència de l'activitat humana s'ha convertit, actualment, en un dels principals problemes per a la protecció del medi ambient i en una amenaça real per la salut de tots els éssers vius que habiten el planeta Terra. Tenint en compte que és possible la contaminació de qualsevol compartiment de l'ecosistema i que existeix una gran varietat de compostos recalcitrants que són potencials agents contaminants, un dels grans reptes de la bioremediació és disposar de microorganismes que siguin capaços de degradar, en diferents hàbitats, una gran diversitat d'estructures químiques complexes i així fer front a les dues problemàtiques exposades anteriorment. En el cas dels tractaments de bioremediació, els quals han guanyat atenció en els últims anys al ser ambientalment respectuosos, existeix un tipus de fongs, coneguts com fongs de podridura blanca, que han demostrat la seva capacitat de degradar, tant en sòl com en medi líquid, una gran varietat de contaminants recalcitrants, com són els colorants sintètics, els hidrocarburs aromàtics policíclics, els fàrmacs i productes de cura personal i els compostos orgànics halogenats, entre d'altres.

El treball de Tesi que es presenta engloba diferents aspectes de l'estudi de la degradació de diferents contaminants orgànics halogenats mitjançant el fong *T. versicolor*, que es troba englobat dins els fongs de podridura blanca. Els resultats corresponents es presenten en quatre apartats diferenciats:

- El primer apartat tracta el disseny i posterior aplicació d'un reactor per degradar tricloroetilè (TCE) en fase aquosa mitjançant el fong.

En la primer lloc es determinen diferents paràmetres necessaris per al disseny del bioreactor. Aquests paràmetres corresponen als equilibris de repartició del contaminant que s'estableixen entre les fases gas, líquida i sòlida. En el cas de l'equilibri gas-líquid s'ha escollit, a partir d'una recerca bibliogràfica, el valor de la constant de Henry més adequat i per l'equilibri sòlid-líquid, a partir de l'ajust de diferents isoterms a valors experimentals d'adsorció. S'ha comprovat que la isoterma lineal és la que descriu amb més fiabilitat aquest procés. L'altre paràmetre estudiat correspon al consum d'oxigen per part del fong.

A continuació, es presenta el disseny del reactor, incloent la determinació de l'equació cinètica de degradació de TCE pel fong, i es detalla el procediment de càlcul de cadascun dels paràmetres del reactor. En tercer i últim lloc, es mostra l'aplicació del procés de disseny del reactor en diferents condicions per tal comprovar la seva validesa i l'estudi de l'efecte de diferents paràmetres en la degradació de TCE.

- El segon apartat correspon a la degradació de polibromodifenil éters (PBDEs) en medi líquid mitjançant el fong.

S'ha estudiat la capacitat del fong per degradar diferents PBDEs, com són les mescles de decabromodifenil éter (decaBDE), octabromodifenil éters (octaBDEs) i pentabromodifenil éters (pentaBDEs). En tots els casos s'ha comprovat que el fong és capaç d'eliminar els compostos presents a les diferents mescles amb un elevat percentatge. En el cas del decaBDE, s'ha estudiat l'efecte de diferents surfactants sobre el procés de degradació i s'ha comprovat que el Tween 80 i Tween 20 són els que el potencien en major grau. D'altra banda, les proves d'inhibició enzimàtica realitzades indiquen que el citocrom P450 és l'enzim responsable del primer pas de degradació d'aquest contaminant mitjançant el fong.

En el cas de les mescles d'octaBDEs i pentaBDEs, s'ha detectat, a les mostres de degradació per a un temps de 12 hores, la formació d'un hexabromodifenil éter monohidroxilat i d'un tetrabromodifenil éter monohidroxilat, respectivament. Aquests dos productes no es detecten en cap de les altres mostres analitzades, que corresponen a temps de degradació de 24 hores o superiors. En el cas del decaBDE, no s'ha detectat la formació de cap PBDE hidroxilat, però s'ha de tenir en compte que no s'ha disposat de mostres de degradació per a temps inferiors a 24 h.

- El tercer apartat correspon a l'estudi de la degradació de contaminants mitjançant el procés de biooxidació avançada amb el fong. Aquesta procés es basa en l'oxidació de contaminants en fase aquosa mitjançant radicals hidroxils induïts pel fong.

En primer lloc, es presenta l'estudi de la degradació del decaBDE en medi líquid mitjançant el procés esmentat i s'ha comprovat que el procés biològic de

producció de radicals hidroxils no és eficient per degradar aquest contaminant, a causa de la baixa solubilitat en fase aquosa del compost a degradar.

En segon lloc, es mostra l'optimització de la degradació de TCE en ampolles de sèrum mitjançant el procés de biooxidació, a partir de l'estudi de l'efecte de la velocitat d'agitació, de la relació de volum entre la fase gas i la fase líquida i de la concentració de biomassa en el procés de degradació. Els percentatges de degradació de TCE obtinguts en reactor han estat significativament inferiors als obtinguts en ampolles de sèrum.

Finalment, en tercer lloc, es presenta l'aplicació en reactor del procés de biooxidació avançada per degradar la carbamazepina, la qual s'ha escollit com a contaminant a estudiar davant les dificultats de l'aplicació d'aquest procés per a degradar TCE en reactor. Entre els diferents sistemes experimentals provats, s'ha escollit un reactor de vidre fluïditzat per polsos d'aire per aplicar aquest procés en reactor. S'ha treballat en dues formes d'operació diferents: en discontinu seqüencial i en continu. En els dos casos, s'ha comprovat que el procés biològic de producció de radicals hidroxils és capaç de degradar la carbamazepina durant un cert temps, obtenint majors percentatges de degradació operant en mode discontinu seqüencial que en continu.

- El quart i últim apartat es centra en l'aplicació de l'anàlisi isotòpic d'elements estables per estudiar el fraccionament isotòpic del carboni i en alguns casos, de l'hidrogen, causat per la degradació de diferents compostos recalcitrants mitjançant el fong. Entre tots els contaminants estudiats, només en el cas del TCE i el PCE, s'ha obtingut un percentatge de degradació suficientment elevat per a poder considerar com a concloents els resultats de fraccionament obtinguts en aplicar posteriorment la tècnica d'anàlisi esmentada. Per aquests dos compostos, el fraccionament de carboni obtingut a causa del procés de degradació no es pot considerar significatiu.





---

# **Capítol 1**

## **Introducció general**

---



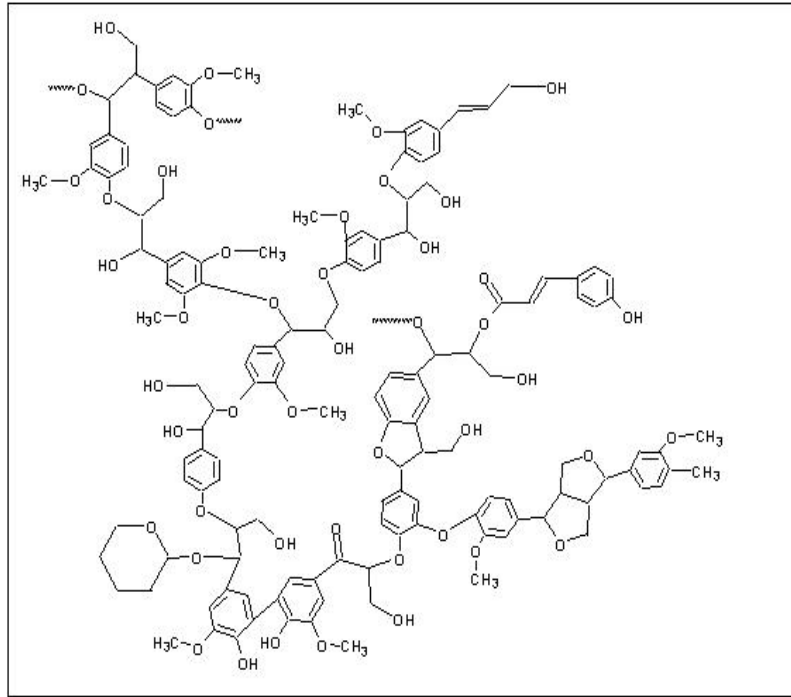




## 1.1 Aplicació dels fongs ligninolítics a la bioremediació

La majoria d'estudis de bioremediació publicats fins ara s'han centrat en la degradació de contaminants mitjançant bacteris pel seu ràpid creixement, per la facilitat que ofereixen per estudiar les seves vies metabòliques i per portar a terme construccions genètiques que permetin degradar contaminants específics. Tot i això, els fongs tenen un gran potencial per a ser aplicats en processos de bioremediació, al ser capaços de degradar per co-metabolisme i en condicions aeròbies una gran varietat de compostos orgànics i en certes ocasions, mineralitzar-los fins a CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, sense la necessitat d'un condicionament previ.

Els fongs tenen un paper important en el medi ambient com a descomponedors de la cel·lulosa, l'hemicel·lulosa i la lignina (Kirk i Fenn, 1982). Dins d'aquest regne d'organismes, el grup dels fongs de podridura blanca engloba els més actius envers la degradació de lignina, de la qual poden mineralitzar tots els seus components (Martinez et al., 2005). La lignina és el segon compost orgànic renovable més abundant a la biosfera, per darrere de la cel·lulosa, i presenta una estructura molecular molt heterogènia i complexa, tal com es pot observar a la figura 1.1 (Boominathan i Reddy, 1992). A partir del descobriment de la capacitat d'aquest tipus de fongs per degradar una molècula tan complexa com la lignina, es va començar a estudiar la seva capacitat per degradar compostos presents al medi ambient i considerats com a recalcitrants. Fins a l'actualitat, s'ha demostrat que aquests tipus de fongs són capaços de degradar un ventall molt ampli de compostos com són els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), colorants sintètics, compostos aromàtics clorats, pesticides o compostos nitroaromàtics, entre d'altres (Pointing, 2001; Reddy i Mathew, 2001; Gao et al., 2010). La raó principal del diversificat potencial degradador és el fet que catalitzen la degradació de la lignina i dels contaminants mitjançant un mecanisme enzimàtic, que també possibilita la formació de radicals lliures no específics.



**Figura 1.1.** Possible estructura de la lignina.

A diferència dels bacteris, els fongs de podridura blanca disposen d'un sistema enzimàtic extracel·lular, conegut com a ligninolític, fet que possibilita la degradació de substrats sense la necessitat de internalitzar-los, permetent la degradació de compostos amb una baixa solubilitat en fase aquosa i augmentant la seva tolerància a concentracions elevades de contaminant. A més a més, els fongs de podridura blanca, en la majoria de casos, no requereixen un període de preacondicionament a un contaminant concret. A causa de la inducció del sistema de degradació per la limitació de nutrients, una font limitada de carboni o nitrogen pot iniciar la degradació sense ser necessari una exposició a nivells elevats de contaminant (Reddy i Mathew, 2001).

El sistema ligninolític inclou els enzims manganès peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), versàtil peroxidasa (VP) i lacasa. Les reaccions que poden catalitzar aquests enzims inclouen la polimerització i metoxilació de la lignina, la descarboxilació, la hidroxilació i el trencament d'anells aromàtics.

D'altra banda, gran part dels fongs de podridura blanca incorporen també un sistema de degradació intracel·lular amb la implicació del sistema enzimàtic citocrom P450, el qual s'ha comprovat que és responsable de la degradació de PAHs (Bezalel et al., 1996) o de tricloroetilè i tetracloroetilè (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2008a), entre d'altres.

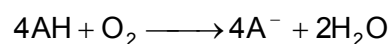
## 1.1.1 Sistema enzimàtic dels fongs de podridura blanca

### 1.1.1.1 Lacasa i peroxidases extracel·lulars

La lacasa i peroxidases extracel·lulars es caracteritzen per tenir una alta especificitat per l'acceptor d'electrons i, a causa de l'elevada heterogeneïtat estructural de la lignina, una baixa especificitat pel donador d'electrons, raó per la qual els fongs ligninolítics són capaços de degradar una gran varietat de contaminants. La lacasa representa un grup homogeni respecte a l'especificitat de substrat i a la seva acció i les peroxidases mostren una major variabilitat, distingint-se els tres grups esmentats anteriorment: LiP, MnP i VP. La principal diferència entre la lacasa i les peroxidases recau en l'acceptor d'electrons, perquè la lacasa utilitza l'O<sub>2</sub> i les peroxidases el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La lacasa (bencenodiol:oxigen oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) pertany al grup de les fenoloxidasas blaves de coure i és l'enzim que es troba més àmpliament distribuït entre els fongs de podridura blanca. Generalment, la lacasa s'expressa en forma de diferents isoenzims, ja sigui de forma constitutiva o inductiva.

L'enzim conté quatre àtoms de coure (Cu), que es classifiquen en diferents tipus (I, II i III), per molècula (Thurston, 1994). Els quatre àtoms es troben directament implicats en el cicle catalític de l'enzim, que té lloc mitjançant la reducció d'una molècula d'oxigen per donar dues molècules d'aigua i l'oxidació monoelectrònica i simultània de molts substrats orgànics. La reacció global es pot expressar d'aquesta manera:



El cicle catalític complet de la lacasa es mostra a la figura 1.2. En presència d'oxigen, el donador d'electrons (AH) transfereix un electró al coure I, seguit de la transferència de dos electrons al coure III per l'oxidació de dues molècules més de substrat. Els electrons acumulats es transfereixen a un àtom d'oxigen, que donarà lloc a una molècula d'aigua, a partir de l'espècie O<sub>2</sub><sup>2-</sup>, i a la formació d'un radical hidroxil associat (O<sup>·</sup>). A l'última etapa del cicle, s'oxida una altra molècula de substrat i s'acumula un electró en el coure II, que serà transferit al radical hidroxil amb la participació de dos protons del medi, donant lloc a la segona molècula d'aigua i tancant el cicle enzimàtic. Mitjançant aquest mecanisme, la lacasa genera radicals fenoxi a partir de compostos fenòlics. Aquests radicals són altament reactius i

provoquen noves oxidacions, ja siguin espontànies o per via enzimàtica (Thurston, 1994).

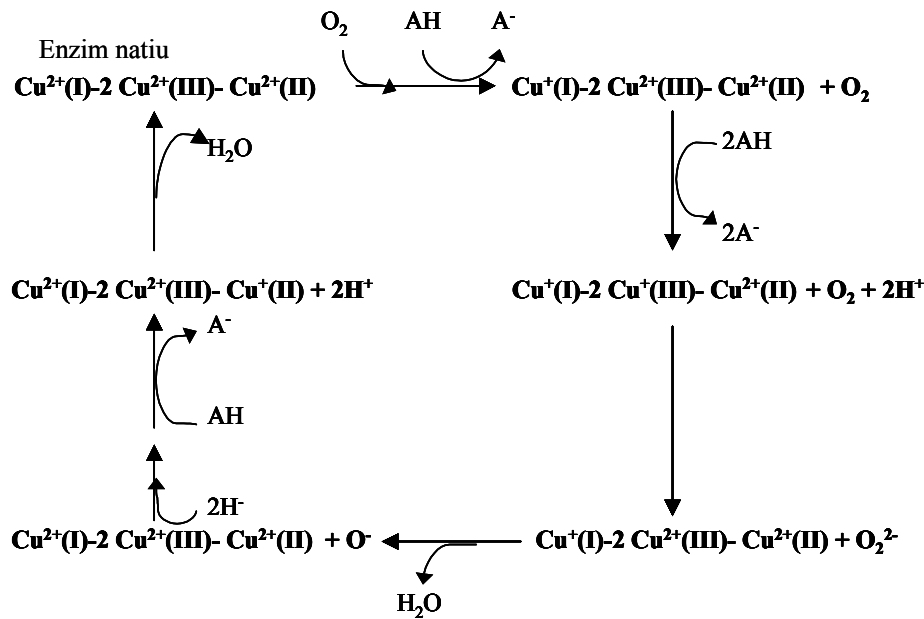
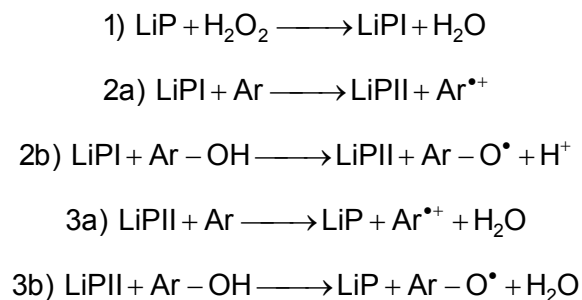


Figura 1.2. Cicle catalític de la lacasa.

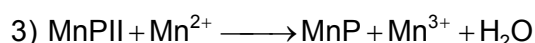
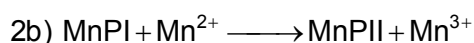
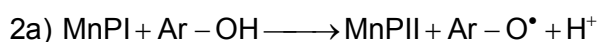
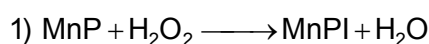
La lignina peroxidasa (diarilpropà:peròxid d'hidrogen oxidoreductasa, EC 1.11.1.14) va ser el primer enzim ligninolític descobert en el fong de podridura blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Tien i Kirk, 1983). Aquesta peroxidasa és capaç d'oxidar compostos aromàtics tant fenòlics com no fenòlics. Les etapes del cicle catalític són les següents:



En l'estat inicial, el ferro present com a grup hemo en la peroxidasa es troba en el seu estat fèrric. Així, el peròxid d'hidrogen oxida per dos electrons l'enzim a un compost intermedi (LiPI). A continuació, aquest capta un electró del compost aromàtic, ja sigui fenòlic (Ar-OH) o no fenòlic (Ar), amb el que es produeix l'estat d'oxidació monovalent de l'enzim (LiPII) i el radical catió aromàtic ( $\text{Ar}^{*+}$ ) o fenoxil ( $\text{Ar}-\text{O}^\bullet$ ) del substrat. Per últim, una oxidació addicional d'una altra molècula de substrat transforma la LiPII en l'estat original de l'enzim. El peròxid d'hidrogen que inicia el cicle és format

extracel·lularment pels fongs a partir dels enzims glioxal oxidasa i superòxid dismutasa (Leonowicz et al., 1999).

La manganès peroxidasa (Mn(II):peròxid d'hidrogen oxidoreductasa, EC 1.11.1.13) va ser descoberta posteriorment a la LiP (Kuwahara et al., 1984) però el nombre de fongs en els que s'ha detectat és superior a la LiP (Fakoussa i Frost, 1999). El seu cicle catalític és similar al de la LiP, però difereix en dos aspectes. D'una banda, el compost intermedi MnPI oxidaria  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  i aquest darrer compost, estabilitzat amb certs àcids orgànics, actuaria com a agent oxidant generant radicals lliures. D'una altra banda, el compost intermedi MnPII només pot ser reduït al seu estat original per  $Mn^{2+}$  i depèn estrictament d'aquest ió per tancar el cicle:



La versàtil peroxidasa pertany a les peroxidases hemo de classe II, grup A.3. Es troba present en els gèneres *Pleurotus*, *Bjerkandera* i *Trametes* i comparteix les propietats catalítiques de MnP i LiP (Hofrichter et al., 2010). Tal com succeeix amb MnP, exhibeix una elevada afinitat per  $Mn^{2+}$  i catalitza l'oxidació de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ . VP oxida dimetoxibenzè, dímers de lignina, fenols, amines, colorants i alcohols aromàtics (Hofrichter et al., 2010). En absència de  $Mn^{2+}$ , VP oxida substrats fenòlics i no-fenòlics de forma similar a com ho fa LiP.

Respecte al potencial d'oxidació dels enzims extracel·lulars descrits, LiP posseeix el potencial redox més elevat ( $E_0 \approx 1,2$  V, pH 3), seguit per MnP ( $E_0 \approx 0,8$  V, pH 4,5) i lacasa ( $E_0 \approx 0,79$  V, pH 5,5) (Wong 2009). Una comparació de LiP, MnP i lacasa en l'oxidació de diverses sèries homòlogues de metoxibenzens (amb valors de potencial redox des de 0,81 fins a 1,76 V a pH 3) va mostrar una correlació entre el potencial redox dels enzims i el contaminant a degradar (Kersten et al., 1990; Popp i Kirk, 1991).

### 1.1.1.2 Sistema citocrom P450

Inicialment, l'habilitat d'un dels primers fongs de podridura blanca, *P. chrysosporium*, utilitzats en tractaments de bioremeiació per a degradar contaminants, en condicions de limitació de nitrogen, s'atribuïa als enzims ligninolítics extracel·lulars, particularment a LiP i MnP. Tot i això, es va comprovar que certs contaminants orgànics, com els àcids 2,4-diclorofenoxiacètic i 2,4,5-triclorofenoxiacètic, podien ser degradats, en medi ric en nitrogen, sense l'expressió dels enzims LiP i MnP (Yadav i Reddy, 1992, , 1993). Per tant, es va deduir que altres sistemes enzimàtics, a banda de LiP i MnP, estaven implicats en la degradació d'aquests contaminants. Estudis recents han demostrat que el sistema citocrom P450 exerceix un paper important en la degradació de diferents contaminants orgànics mitjançant els fongs de podridura blanca. Aquesta evidència es basa en la disminució important de la degradació que s'observa en presència de compostos inhibidors del citocrom P450 en el medi de tractament i també en el patró d'inducció dels gens codificats del citocrom P450 en resposta a diferents contaminants orgànics (Doddapaneni i Yadav, 2004). A més a més, la seqüenciació completa del genoma de *P. chrysosporium* va revelar un nombre estimat de 148 gens de monooxigenasa P450 diferents, el nombre més elevat conegut fins al moment entre tots els genomes fúngics seqüenciats (Martinez et al., 2004; Yadav et al., 2006). Les principals reaccions catalitzades pels enzims intracel·lulars citocrom P450 són l'epoxidació dels dobles enllaços C=C i la hidroxilació de compostos aromàtics. S'ha suggerit que el citocrom P450 exerceix un important paper en la natura en el procés de mineralització dels metabòlits ligninolítics resultants de la despolimerització de la lignina pels enzims peroxidases (Subramanian i Yadav, 2008).

## 1.2 El fong *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor* és un fong filamentós de podridura blanca i se'l coneix popularment com a fong de "cua de gall d'indi", per la forma i colors que adquireix al créixer com a cos fructífer a la natura. Aquest fong es pot trobar principalment en zones temperades d'Europa, Àsia i Nord-amèrica i creix, en condicions aeròbies, al tronc, la soca i les branques dels arbres. Es pot trobar durant tot l'any, tot i que amb més facilitat a la tardor i a l'hivern quan es produeix l'alliberament d'espores. S'han usat diferents noms a la literatura per a referir-se a aquest fong, com són *Agaricus versicolor*, *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Polystictus versicolor* o *Poria versicolor*, entre d'altres, i es coneixen més de 120 soques de *T. versicolor*.



La morfologia del seu creixement en cultius submergits varia des del creixement dispers (miceli) fins a agregats molt compactes i de forma esfèrica anomenats pèl·lets, però mai com a cos fructífer i tampoc es formen espores. El tipus de morfologia que s'obté durant el creixement depèn tant de la composició del medi de cultiu com de les condicions de creixement. Així la font de carboni, la relació C/N, el pH i la força iònica del medi condicionen el seu creixement, però també el nivell d'inòcul, l'aeració, el tipus i la velocitat d'agitació són determinants en el procés de creixement.

El sistema ligninolític d'aquest fong s'estimula per limitació per nitrogen. És capaç de produir LiP, MnP i lacasa (Wesenberg et al., 2003). Acebes (2008) va estudiar l'expressió d'aquests enzims extracel·lulars en la soca ATCC#42530 de *T. versicolor* i va determinar que és capaç de secretar els tres tipus d'enzims, però la seva expressió depèn de la composició del medi. A més a més, el sistema enzimàtic d'aquesta soca també inclou el sistema citocrom P450, el qual pot participar en la degradació de contaminants (Ichinose et al., 2002).

La soca ATCC#42530 és capaç de degradar, tant en medi líquid com en sòl, un gran nombre de contaminants, com per exemple, colorants sintètics (Blánquez et al., 2004), tricloroetilè i tetracloroetilè (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2008a), disruptors endocrins (Blánquez i Guieysse, 2008), triclorobenzens (Marco-Urrea et al., 2009d), hidrocarburs aromàtics policíclics (Borràs et al., 2010) i productes farmacèutics i de cura personal (Marco-Urrea et al., 2009b), entre d'altres.



**Figura 1.3.** *Trametes versicolor* crescut com a cos fructífer (esquerra) i en forma de pèl·lets (dreta).





---

# **Capítol 2**

## **Objectius**

---





L'objectiu principal d'aquest treball de Tesi és explorar l'ús de *Trametes versicolor* per a la degradació de compostos orgànics halogenats amb diferents aproximacions.

Per assolir aquest objectiu, es van definir diferents objectius específics:

- Determinar els paràmetres necessaris per dissenyar un bioreactor per al tractament de tricloroetilè o tetracloroetilè mitjançant el fong.
- Estudiar l'operació en reactor per tal d'optimitzar el procés de degradació.
- Avaluar la capacitat de *T. versicolor* per a degradar diferents compostos retardants de flama bromats pertanyents a la família dels polibromodifenil éters (PBDEs).
- Identificar la via de degradació d'aquests compostos PBDEs.
- Valorar l'aplicació del procés de biooxidació avançada per degradar el compost decabromodifenil éter.
- Escalar el tractament amb el fong sota condicions de cicle redox utilitzant diferents tipus de reactors.
- Explorar l'aplicació de l'anàlisi isotòpic d'elements estables com a eina per a demostrar la degradació de diferents contaminants.









---

# **Capítol 3**

## **Materials i mètodes**

---







### 3.1 Microorganismes

Tots els experiments han estat realitzats amb el fong de podridura blanca *Trametes versicolor* (ATCC#42530). La soca es manté a 25°C en plaques Petri amb 20 g/L d'extracte de malta i 15 g/L d'agar bacteriològic i es ressebra periòdicament.

### 3.2 Contaminants i reactius

Els contaminants tractats i els reactius utilitzats en els diferents experiments de degradació mitjançant *Trametes versicolor* es mostren a les taules 3.1 i 3.2, respectivament.

**Taula 3.1.** Contaminants tractats en els diferents processos de degradació.

	Estat	Subministrador
<b>Productes clorats</b>		
Tricloroetilè (≥99,5% - Ref. 251402) i tetracloroetilè (≥99,0% - Ref. 443786)	Líquid	Sigma-Aldrich (Espanya)
<b>Productes bromats</b>		
Decabomodifenil éter (98% - Ref. 194425)	Sòlid	Sigma-Aldrich
Decabomodifenil éter marcat (13C12 - 98% - Ref. EO-5003)	Líquid	Cambridge Isotope Laboratories (EEUU)
Mescla pentabromodifenil éters (Ref. TBDE-71X)	Sòlid	Wellington Laboratories (Canadà)
Mescla octabromodifenil éters (Ref. S17400 - 1EA)	Sòlid	Sigma-Aldrich
<b>Productes farmacèutics</b>		
Carbamazepina (Ref. C4024)	Sòlid	Sigma-Aldrich
<b>Components de la gasolina</b>		
Metil tert-butil éter (purum - Ref. 1018432500)	Líquid	Merck (Alemanya)
Étil tert-butil éter(>97% - Ref. 03202) i etilbenzè (>98% - Ref. 03080)	Líquid	Fluka (Alemanya)
Toluè (99% - Ref. 244511)	Líquid	Sigma-Aldrich (Alemanya)

**Taula 3.2.** Reactius emprats en els tractaments de degradació.

	Estat	Subministrador
<b>Dissolvents</b>		
Diclorometà (Ref. P02937E21)	Líquid	SDS (Espanya)
Etanol absolut (Ref. 361086)	Líquid	Panreac (Espanya)
Acetonitril (Ref. AC03712500) i metanol (Ref. ME03262500)	Líquid	Promochem (Alemanya)
n-Pentà (Ref. 236705)	Líquid	Fluka (Alemanya)
<b>Surfactants</b>		
Tween 80 (Ref. P1754) i Tween 20 (Ref. P1379)	Líquid	Sigma-Aldrich
GoldCrew	Liquid	Goldcrew_Company (EEUU)
BS400	Líquid	IEPSorbents (Espanya)
<b>Inhibidors citocrom P450 i mediadors lacasa</b>		
Lacasa purificada de <i>T. versicolor</i> (Ref. 53739)	Liofilitzat	Fluka (Espanya)
3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenol (Ref. 324743) i sal de diamoni d'àcid 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfònic (Ref. 653158)	Sòlid	Sigma-Aldrich
Àcid vilúric (Ref. 32597) i hidrat 1-hidroxi-benzotriazol (Ref. 31569)	Sòlid	Fluka
1-aminobenzotriazol (Ref. 479532)	Sòlid	Sigma-Aldrich
<b>Altres productes</b>		
Extracte de malta (Ref. 07-080-500)	Sòlid	Scharlau
Agar bacteriològic (Ref. LP0011)	Sòlid	Oxoid (Espanya)
2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ, 97% - Ref. 428566)	Sòlid	Sigma-Aldrich
Àcid acètic glacial (Ref. 141008)	Líquid	Panreac

### 3.3 Medis i producció de pèl·lets

#### 3.3.1 Medis líquids

Un cop preparats, tots els medis líquids, excepte el medi de reacció pel cicle redox, es rectificuen a pH 4,5 amb àcid nítric 1 M i s'esterilitzen a l'autoclaui durant 30 min a 121°C.

- Medi d'extracte de malta (MEM). Conté 20 g/L d'extracte de malta.



- Medi definit (MD). A la taula 3.3 es presenta la seva composició habitual. En aquells experiments que s'addicioni un surfactant al medi s'especificarà convenientment.

**Taula 3.3.** Composició del MD.

Components Medi	Concentració
Glucosa (g/L)	0,5-20*
Àcid 2,2-Dimetilsuccínic (g/L)	1,168
Tartrat d'amoni (g/L)	3,3
Macronutrients (mL/L)	100
Micronutrients (mL/L)	10

\* La concentració de glucosa pot variar depenent de l'experiment

La composició de les solucions de micronutrients i macronutrients va ser descrita per Kirk et al. (1986) i es detalla a la taula 3.4.

**Taula 3.4.** Composició dels macronutrients i micronutrients.

Micronutrients	Concentració (g/L)	Macronutrients	Concentració (g/L)
Àcid nitril-tri-acètic	1,5	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,3
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1,2		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01		
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,01		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,01		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,01		

- Medi de reacció pel cicle redox (MCR). Aquest medi conté 500  $\mu\text{M}$  de DBQ, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  - 300  $\mu\text{M}$  d'oxalat i 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 20 mM de tampó fosfat a pH 5. La solució stock de  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalat es prepara mesclant volums iguals d'una solució 20 mM  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , la qual s'ha de preparar just abans de fer la mescla, i una solució 60 mM d'àcid oxàlic. (Gomez-Toribio et al., 2009b).

### 3.3.2 Producció de pèl·lets

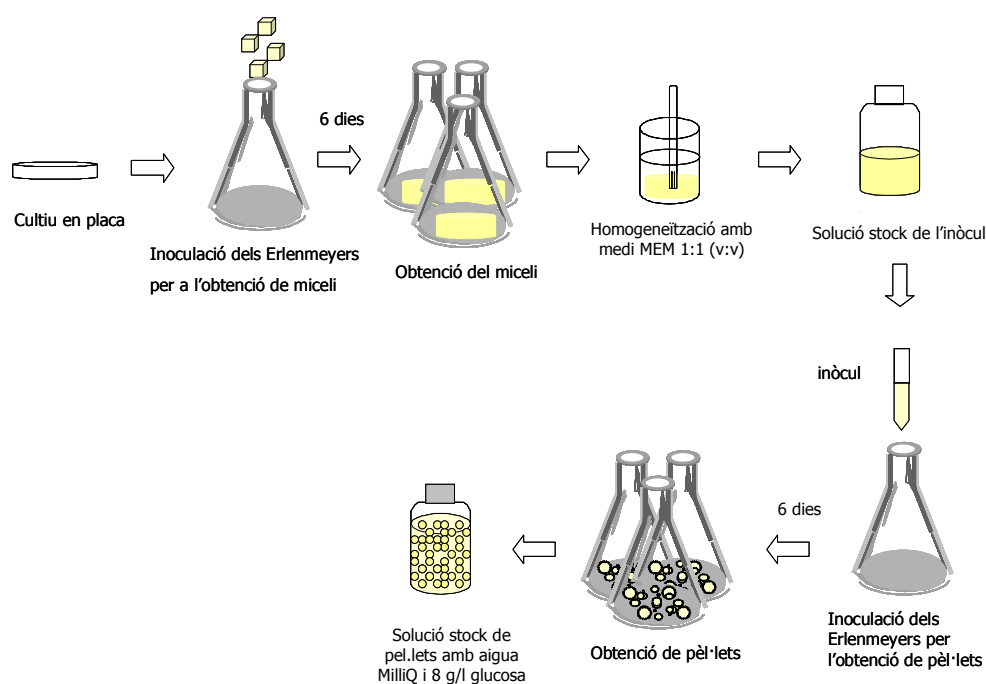
La producció de pèl·lets realitza en dos passos: l'obtenció de miceli i el creixement del fong en forma de pèl·lets.

#### 3.3.2.1 Obtenció de miceli

De la zona de creixement de *T. versicolor* en una placa de Petri s'extreuen quatre cubs d'agar de 1 cm<sup>2</sup> i es porten a 150 mL de MEM en un Erlenmeyer de 500 mL. Es mantenen a 25°C i agitació orbital (135 rpm, r=25 mm) durant 6 dies. Transcorregut aquest temps es forma una densa massa de miceli que es separa del medi mitjançant un colador. Al miceli obtingut se li afegeix MEM en relació 1:1 (v/v) i es tritura amb un homogeneïtzador Ystral GmgH model X/10/20. La suspensió resultant es guarda a 4°C o s'utilitza acte seguit per la formació de pèl·lets (Marco-Urrea, 2007).

#### 3.3.2.2 Creixement del fong en forma de pèl·lets

S'afegeix 1 mL de la suspensió de fong triturat a 250 mL de MEM en Erlenmeyers de 1000 mL i es porten a un agitador orbital de 135 rpm durant 5 dies. Finalment, els pèl·lets formats es separen del medi i es renten amb aigua MilliQ en un colador. Posteriorment es resuspenen en una solució de 8 g/L de glucosa (amb aigua MilliQ i esterilitzada prèviament a 121°C durant 30 min) en relació 1:1 (v/v) i es guarden a 4°C on s'utilitzen a continuació per inocular les ampolles dels experiments (Marco-Urrea, 2007). A la figura 3.1 es troba esquemàticament el procés seguit per a l'obtenció dels pèl·lets. En el cas dels pèl·lets que s'utilitzen pels experiments de degradació sota condicions de cicle redox, un cop crescuts en extracte de malta, es transfereixen els pèl·lets continguts en cadascun dels Erlenmeyers a un corresponent Erlenmeyer de 1000 mL amb 250 mL de MD i s'incuben durant 2 dies més per ser utilitzats directament en l'experiment de degradació, sent rentats tres cops prèviament amb aigua milliQ.



**Figura 3.1.** Esquema de la metodologia per a la obtenció de pèl·lets de *T. versicolor* (Blánquez, 2005).

## 3.4 Experiments amb *Trametes versicolor*

### 3.4.1 Determinació del consum d'oxigen

#### 3.4.1.1 Consum d'oxigen en fermentador

El mètode experimental utilitzat per a obtenir el consum d'oxigen del fong s'anomena tècnica dinàmica i consisteix en introduir una pertorbació al sistema un cop s'ha arribat a l'estat estacionari i analitzar la resposta davant aquesta pertorbació.

S'utilitza un fermentador Braun Biostat B amb una cubeta de 2 L amb unitat de control digital i equipat amb control de pH (sonda InPro 3030, Mettler Toledo, Espanya) i de temperatura, i una sonda de mesura de l'oxigen dissolt (Ingold, Mettler Toledo, Espanya). L'experiment es realitza amb agitació (Turbina tipus Rushton) i aeració i les dades experimentals es registren on-line en un ordinador a partir d'un programa dissenyat amb Microsoft Visual Basic (Pinsach et al., 2006).

Abans de realitzar l'experiment de mesura del consum d'oxigen, es determina la constant de temps de resposta de la sonda d'oxigen. Aquesta part es realitza amb dos recipients, un amb aigua saturada de nitrogen i un altre amb aigua saturada d'oxigen.

Primer s'introdueix la sonda al recipient amb aigua saturada de nitrogen i quan s'assoleix una concentració d'oxigen igual a 0% s'introdueix ràpidament la sonda al recipient amb aigua saturada d'oxigen i es grafica l'evolució de la concentració fins a arribar a un valor del 100%.

Un cop determinada la constant de temps de resposta de la sonda es realitza l'experiment del consum d'oxigen dels pèl·lets. El primer pas és preparar el MD i esterilitzar-lo, junt amb el fermentador i tot el material necessari. Un cop finalitzada l'esterilització, es munta el fermentador amb els controls de temperatura (encamisetat d'aigua per mantenir la temperatura a 25°C) i pH (HCl i NaOH 1M per mantenir el pH a 4,5), l'agitació a una velocitat de 135 rpm i l'aireació amb un cabal de 1,5 L aire/(L reactor·min) i un cop es troba el sistema a règim, s'inocula amb la quantitat de pèl·lets necessària per a tenir una concentració aproximada en pes sec de 3,5 g/L. La figura 3.2 mostra el sistema experimental per determinar el consum d'oxigen en fermentador.



**Figura 3.2.** Muntatge experimental per determinar el consum d'oxigen de *T. versicolor* en fermentador.

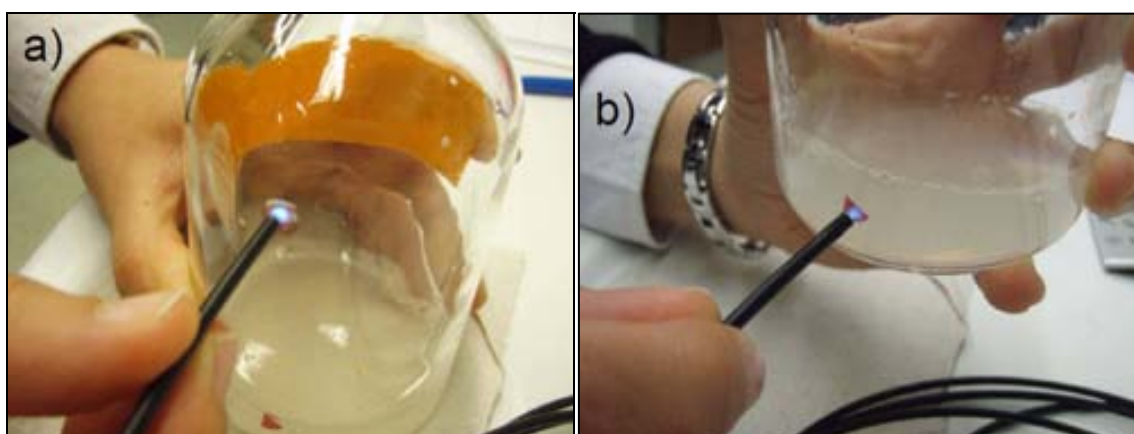
L'experiment consisteix en interrompre el subministrament d'aire en un moment determinat i mesurar el descens de la concentració d'O<sub>2</sub> fins a un valor per sobre de la concentració crítica d'oxigen (valor al voltant del 25% d'O<sub>2</sub>). Aquest procediment es realitza en repetides ocasions, per determinar el consum d'oxigen durant els períodes de creixement i manteniment. A l'acabar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets.

### 3.4.1.2 Consum d'oxigen en ampolles de sèrum

L'experiment per obtenir el consum d'oxigen del fong es realitza en ampolles de sèrum amb un volum útil de 240 mL (Wheaton, EEUU), on s'hi fixa per la part interior de l'ampolla, utilitzant cola de silicona, dos optodes sensibles a l'oxigen de mida petita (POF-PSt3, PreSens, Alemanya) per poder mesurar la concentració d'oxigen tant a la fase gas com a la fase líquida.

S'afegeixen 15 mL de MD amb una concentració inicial de glucosa de 10 g/L a tres ampolles de sèrum i a continuació, en dues d'elles, s'afegeix la quantitat necessària de pèl·lets per obtenir una concentració aproximada de 3,5 g/L (Pes sec). S'oxigenen les tres ampolles amb oxigen pur durant 2 min a 30 KPa i es tanquen hermèticament amb tap de tefló i anella d'alumini. De les tres ampolles preparades, les que contenen fong s'utilitzen per mesurar l'evolució de la concentració d'oxigen al llarg del temps i la que no en conté, s'utilitza per comprovar que no es produeixen pèrdues d'oxigen en les ampolles experimentals al llarg del temps.

Es mesura varis cops al dia la concentració d'oxigen tant a la fase gas com a la fase líquida per un període de 7 dies mitjançant l'anàlisi de l'optode amb una fibra òptica acoblada a un dispositiu òptic de fibres (FIBOX 3 trace, PreSens, Alemanya), tal com es mostra a la figura 3.3. A l'acabar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets de cada ampolla.



**Figura 3.3.** Mesura de la concentració d'oxigen en les ampolles sèrum en: a) fase gas i b) fase líquida.

### 3.4.2 Preparació de solucions stock

#### Productes clorats

Es prepara en una ampolla de sèrum de 20 mL (Volum útil de 24 mL) (Wheaton, EEUU) amb etanol com a dissolvent. El volum de la solució ha de correspondre quasi al volum total de l'ampolla per minimitzar el volum de fase gasosa i aconseguir que tota la quantitat de compost clorat es trobi a la fase líquida. Un cop s'ha afegit l'etanol a l'ampolla, es tanca amb un tap de butil teflonat (Wheaton, EEUU) i una anella d'alumini (Baxter Scientific Products, EEUU) segellats amb un crimpador. A continuació s'afegeix l'hidrocarbur clorat, ja sigui tricloroetilè (TCE) o tetracloroetilè (PCE), mitjançant una xeringa teflonada (Sèrie A-2, Vici, Canadà) perforant el tap de butil i ràpidament es gira l'ampolla per minimitzar les pèrdues a través del forat. Aquesta ampolla es deixa agitant durant 1 hora a l'agitador orbital a 135 rpm per aconseguir una solució homogènia. En el cas dels experiments de degradació de TCE mitjançant el fong sota condicions de cicle redox el dissolvent utilitzat és acetonitril en lloc d'etanol.

Per als experiments de degradació de TCE en reactor, la solució stock en etanol es prepara de forma anàloga als experiments de degradació en ampolles de sèrum. Posteriorment, s'afegeix un volum determinat d'aquesta solució mitjançant una xeringa teflonada en una ampolla de sèrum de 20 mL on s'ha addicionat prèviament un volum d'aigua milliQ determinat per tal d'obtenir una solució stock de TCE en fase aquosa amb una concentració inferior a 1000 mg/L, que correspon a la solubilitat del TCE en fase aquosa a 25°C, i minimitzar el volum de fase gas en l'ampolla un cop afegit el volum de solució stock en etanol. Aquesta ampolla es deixa agitant durant 1 hora a l'agitador orbital a 135 rpm.

#### Metil tert-butil éter i etil-tert butil éter

S'afegeix, mitjançant una xeringa teflonada, el volum necessari del corresponent contaminant en un vial de 10 mL (La-Pha-Pak, Alemanya), on s'ha afegit prèviament un volum d'aigua milliQ de 10 mL. Posteriorment el vial es tanca amb un sèptum de butil teflonat (La-Pha-Pak, Alemanya) i una anella d'alumini.

### **Toluè i etilbenzè**

La solució stock es prepara seguint el mateix procediment que la solució stock de TCE en ampolles de sèrum, amb la diferència que el dissolvent utilitzat és acetonitril en lloc d'etanol.

### **Compostos bromats**

Es prepara una solució stock de decaBDE en diclorometà d'una concentració de 200 mg/L en una ampolla de sèrum de 20 mL folrada completament amb paper d'alumini per evitar la fotodegradació del compost. Primerament, s'afegeix quantitat necessària del producte per obtenir la concentració desitjada i posteriorment, s'afegeix diclorometà fins a un volum de 23 mL. Finalment, es tanca l'ampolla amb un tap de butil teflonat i es crimpa amb una anella d'alumini.

La solució stock de la mescla d'octaBDEs es prepara a una concentració de 500 mg/L de mescla total en una vial de 10 mL folrat completament amb paper d'alumini. Inicialment, s'afegeix la quantitat necessària de producte per obtenir la concentració desitjada i després s'afegeixen 10 mL de diclorometà. Finalment, es tanca el vial amb un sèptum de butil teflonat i una anella d'alumini.

En el cas de la mescla de pentaBDEs, primerament, es prepara una solució concentrada de 10 g/L en un vial de 10 mL folrat de paper d'alumini, a partir dels 100 mg de producte pur dels que es disposa i 10 mL de diclorometà, es tanca el vial mitjançant un sèptum de butil teflonat i una anella d'alumini i s'agita el vial durant 1 hora a 135 rpm. Posteriorment, es prepara una solució d'una concentració de 500 mg/L de mescla total en un vial de 10 mL folrat de paper d'alumini afegint el volum necessari de la solució stock de 10 g/L mitjançant una xeringa teflonada i enrasant amb diclorometà fins a 10 mL. Aquest vial es tanca amb un sèptum de butil teflonat i anella d'alumini.

La preparació de totes mescles es realitza a la campana d'extracció de gasos i es guarden a 4°C. Prèviament a la seva utilització, les solucions stock s'agiten en un agitador orbital a una velocitat elevada durant un temps prudencial per assegurar la completa dissolució dels compostos bromats abans de la seva utilització.

### **Carbamazepina**

En una ampolla de sèrum de 20 mL, es prepara una solució stock de 13 g/L de carbamazepina, addicionant la quantitat de contaminant necessària en 10 mL

d'acetonitril. Posteriorment, l'ampolla es tanca mitjançant un tap de butil teflonat i una anella d'alumini i es guarda a 4°C fins a la seva utilització.

### **3.4.3 Contaminants volàtils**

#### **3.4.3.1 Adsorció de TCE i PCE**

Per a realitzar els experiments d'adsorció de TCE i PCE en pèl·lets s'utilitzen ampolles de sèrum de 20 mL. Prèviament, s'ha aplicat un tractament tèrmic als pèl·lets per eliminar tota la seva activitat metabòlica i tenir la certesa que només es produïa adsorció i no degradació del compost clorat.

Per a trobar la isoterma d'adsorció del TCE i el PCE s'han realitzat experiments a diferents concentracions inicials dels dos compostos (11 concentracions diferents entre 5 i 20 mg/L, que és el nostre rang de treball) i per a cada concentració de contaminant, diferents concentracions en pes humit de pèl·lets inactivats tèrmicament (20 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L). Els experiments es van realitzar a una temperatura de 25°C.

S'afegeixen 20 mL d'aigua destil·lada i 3 mL d'una solució d'azida sòdica 1g/L, per evitar problemes de contaminació, a les ampolles de sèrum, aconseguint així que el volum de fase gas a les ampolles sigui mínim. A continuació, s'afegeix la quantitat de pèl·lets necessària a cada ampolla i es tapen les ampolles amb taps de butil teflonats i anelles d'alumini segellats amb el crimpador. No és necessari treballar en condicions estèrils.

Paral·lelament, per a cada experiment s'inclouen ampolles abiòtiques per a conèixer la concentració inicial de TCE o PCE. Aquestes ampolles només contenen 24 mL d'aigua en ampolles de sèrum de 20 mL. En aquest experiment es treballa amb ampolles unitàries per triplicat.

Un cop s'han preparat les ampolles, s'addiciona el volum desitjat de solució stock a cadascuna de les ampolles, mitjançant la xeringa teflonada, perforant el tap de butil i vigilant que la punta de l'agulla es trobi en contacte amb el líquid. Les ampolles es deixen agitant cap per avall, per minimitzar les possibles pèrdues per evaporació, a una velocitat d'agitació de 190 rpm, per tal d'assegurar que els pèl·lets es reparteixin



homogèniament per la fase líquida. La figura 3.4 mostra l'aspecte de les ampolles experimentals utilitzades en els experiments d'adsorció.



**Figura 3.4.** Ampolla experimental d'adsorció.

Al cap de 24 hores, quan ja s'ha assolit l'equilibri, s'extreu 1 mL de mostra líquida amb una xeringa de plàstic d'un sol ús, s'afegeix a un vial de 10 mL, on s'ha addicionat prèviament 4 mL d'aigua destil·lada, i es tanca amb un segell d'alumini amb sèptum folrat de tefló. Les mostres es conserven a 4°C fins a la determinació de la concentració del compost clorat. A l'acabar l'experiment, es mesura la biomassa de cada ampolla.

#### **3.4.3.2 Desorció de TCE i PCE**

Els experiments es realitzen a una concentració inicial de TCE i PCE de 20 mg/L, una concentració de pèl·lets de 2,7 g/L (pes sec) i es treballa amb mostres unitàries per triplicat.

El procés experimental d'adsorció és igual al detallat en l'apartat anterior. Després de finalitzar el procés d'adsorció, cada ampolla inoculada s'obre i els pèl·lets continguts en cada ampolla experimental es transfereixen a una altra ampolla de sèrum de 20 mL. Llavors, s'afegeixen 19 mL d'aigua destil·lada i 3 mL d'una solució d'azida sòdica 1 g/L a cada ampolla. A continuació, les ampolles s'incuben a 25°C en un agitador orbital (190 rpm, r=25 mm) durant 24 hores i per aquest temps, es treu mostra líquida per analitzar la concentració de compostos clorats. A l'acabar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets de cada ampolla.

### 3.4.3.3 Degradació de TCE i PCE en ampolles de sèrum

Principalment, els experiments es porten a terme en ampolles de sèrum de 125, 500 i 240 mL (volums útil de 161, 539 i 240 mL, respectivament) (Wheaton, EEUU).

A cada ampolla s'afegeix en primer lloc el medi i posteriorment el fong. El volum de MD que s'addiciona és variable depenent de l'experiment i s'afegeix la quantitat de pèl·lets per obtenir una concentració aproximada de 3,5 g/L (pes sec). S'oxigena cadascuna de les ampolles superficialment durant 1 min (ampolles de 125 mL), 2 min (ampolles de 240 mL) i 4 min (ampolles de 500 mL) a una pressió de 30 KPa mitjançant una pipeta Pasteur de vidre connectada a una ampolla d'oxigen pur per una mànega de silicona. L'oxigenació és superficial donat que el bombolleig del medi pot desactivar els enzims del fong. Un cop oxigenada, es tanca immediatament amb taps de butil teflonats i anelles d'alumini. Aquesta fase es realitza en la cambra de flux laminar per tal de mantenir les condicions estèrils dels medis i els materials, que prèviament s'han autoclavat a 121°C durant 30 min. En tots els experiments de degradació de TCE i PCE mitjançant el fong es treballa amb ampolles unitàries per triplicat. A la figura 3.5 es mostra un exemple d'ampolles de tractament de TCE amb un volum de 500 i 125 mL.



**Figura 3.5.** Exemple de les ampolles de 500 mL (esquerra) i 125 mL (dreta) utilitzades per a degradar TCE mitjançant *T. versicolor*.

Un cop s'han preparat les ampolles, es passa un cotó amarat d'etanol al 70% tant per la superfície dels taps de la solució mare com de les ampolles experimentals. A cada ampolla s'afegeix un volum de solució stock entre 20 i 100  $\mu$ L del corresponent contaminant mitjançant una xeringa teflonada de 25 o de 100  $\mu$ L, segons el cas, i a

través dels taps, en la cambra de flux laminar, tenint en compte que la punta de l'agulla ha d'estar en contacte amb la fase líquida al realitzar l'addició. Un cop addicionat, les ampolles es capgiren i es porten a un agitador orbital a 135 rpm. Al cap de 30 minuts, s'extreuen les mostres de temps zero.

En alguns experiments de degradació de TCE amb ampolles de 500 mL s'utilitza un agitador tipus roller (P selecta, Espanya) per agitar les ampolles experimentals en posició horitzontal. En aquests experiments les ampolles blanc es mantenen incubades a 25°C en posició vertical sense capgirar per comprovar que no es produeixin pèrdues de TCE durant el procés experimental a través del tap que es troba en contacte amb la fase gas, perquè en les ampolles que es troben a l'agitador tipus Roller el tap també està en contacte amb la fase gas. A la figura 3.6 es mostra les dues disposicions utilitzades alhora d'agitar les ampolles de 500 mL en els experiments de degradació de TCE.



**Figura 3.6.** Ampolles experimentals de degradació de TCE agitades mitjançant l'agitador tipus roller (esquerra) i agitador orbital (dreta).

L'addició de glucosa concentrada a les ampolles experimentals durant l'experiment es realitza mitjançant una xeringa d'un sol ús, a través del tap de l'ampolla. Aquesta operació es realitza a la cambra de flux laminar per evitar problemes de contaminació.

Per a les analítiques rutinàries es realitzen dos tipus d'extraccions diferents. En ambdós casos, es realitza a la campana d'extracció de gasos.

- Per anàlisis del TCE i PCE mitjançant la tècnica "d'espai de cap" (o headspace) estàtica i cromatografia de gasos. S'extreu 1 mL de mostra

líquida amb una xeringa de plàstic d'un sol ús en un vial de 10 mL, on s'hi ha addicionat prèviament 4 mL d'una solució d'azida sòdica 5 g/L per aturar l'activitat biològica. A continuació, les mostres es conserven a 4°C fins a la determinació de la concentració de TCE i PCE. En el cas dels experiments en ampolles de 240 mL, a més a més, s'extreu una mostra suplementària seguint el mateix protocol que la mostra per anàlisi dels compostos clorats per analitzar el fraccionament isotòpic del carboni.

- Extracció de mostra líquida pels anàlisis de glucosa, lacasa, i pH. De manera anàloga al punt anterior, s'extreu mostra líquida amb una xeringa de plàstic (poden ser volums superiors a 1 mL) i es filtra amb un filtre Millipore de 0,45 µm.

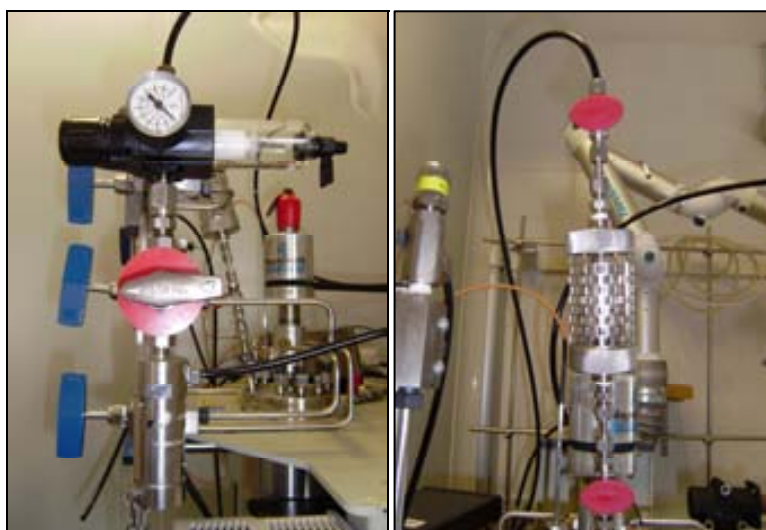
A l'acabar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets de cada ampolla.

#### **3.4.3.4 Degradació de TCE en reactor agitat**

El reactor utilitzat és el model de tanc agitat Zipperclave de 2 L de volum (Autoclave Engineers, EEUU) i és un equip que és específicament dissenyat per treballar a valors de pressió i temperatura molt elevats, amb valors màxims de treball de 151 bar i 232°C, respectivament. La cubeta té forma cilíndrica i és d'acer inoxidable. L'obertura i tancament de la cubeta es produeix en sentit vertical per la seva connexió a un cargol sense fi i mitjançant el gir d'una maneta. El reactor disposa d'un dispositiu de seguretat per evitar accidents derivats d'operar a alta pressió, que consisteix en una vareta d'un compost metàl·lic flexible que s'introdueix per un orifici a la part superior de la cubeta quan aquesta es troba totalment tancada i que impedeix que la cubeta sigui oberta a no ser que es retiri la vareta metàl·lica, la qual només es pot retirar quan a l'interior del reactor no hi ha sobrepressió.

El reactor disposa d'un accessori d'introducció de líquid al reactor amb pressió amb un recipient cilíndric de vidre amb capacitat per 60 mL, una vàlvula d'introducció de gas per addicions puntuals, que en el nostre cas s'utilitza per introduir oxigen pur, una vàlvula de buidat de líquid del reactor connectada a un tub on al seu extrem inferior s'hi col·loca una malla de teixit plàstic per evitar l'extracció dels pèl·lets per aquest tub al buidar el líquid del reactor. El reactor també disposa d'una vàlvula de venteig, la qual es troba connectada a un equip extractor amb filtre de carbó actiu (Nederman, Suècia) per evitar emissions de TCE gas a l'atmosfera del laboratori a

l'obrir la vàlvula per disminuir la pressió al reactor. A més a més, l'equip disposa d'un accessori de presa de mostra de fase líquida (Dopak, Països Baixos) que es troba acoblat a una vàlvula connectada a un tub submergit a la fase líquida del reactor, on també s'hi col·loca una malla de plàstic al seu extrem inferior per evitar l'extracció de pèl·lets al treure mostra. El sistema de presa de mostra disposa de dues agulles que s'inserten en un vial de 10 mL, tancat hermèticament amb sèptum de butil teflonat i anella d'alumini, a través del seu sèptum i al treure mostra, per una de les agulles circula el líquid del reactor que omple el vial i per l'altra, que es troba connectada a un tub de sortida que es troba direccionat a l'equip extractor amb filtre de carbó, s'utilitza per purgar la fase gas de l'interior del vial. Un cop s'ha tret mostra, el sistema permet retornar tot el volum de líquid residual que ha quedat retingut en els tubs que conformen el sistema de presa de mostra, aplicant un corrent d'oxigen a una pressió superior a l'existent a l'interior del reactor que força al líquid retingut a retornar cap a l'interior del reactor. D'aquesta manera, al treure mostra per un temps posterior, aquesta no es veurà contaminada per fraccions residuals de líquid de la mostra anterior. El sistema de presa de mostra i l'accessori d'introducció de líquid al reactor es mostren en detall a la figura 3.7.



**Figura 3.7.** Sistema de presa de mostra (esquerra) i accessori d'introducció de líquid al reactor (dreta).

L'agitació a l'interior del reactor té lloc mitjançant un agitador mecànic de pales amb un sistema electrònic de regulació de velocitat incorporat. A la figura 3.8 es mostra en detall la part interior del reactor, on es troben l'agitador mecànic de pales i els tubs de presa de mostra i de buidat del reactor. La pressió al reactor es mesura mitjançant un manòmetre diferencial connectat a la part superior del reactor. En els diferents experiments es va utilitzar dos tipus de manòmetres diferencials, un que

mesurava fins a una pressió màxima de 5 bar absoluts i un altre, que s'instal·la posteriorment, que permet mesurar fins a una pressió màxima de 11 bar absoluts. El cabal d'oxigen introduït al reactor es mesura mitjançant un mesurador de cabal màssic per efecte tèrmic amb una unitat electrònica incorporada, que permet la circulació d'un cabal d'oxigen entre 2,9 i 145 mLn/min (Bronkhorst Hi-Tec, Països Baixos).

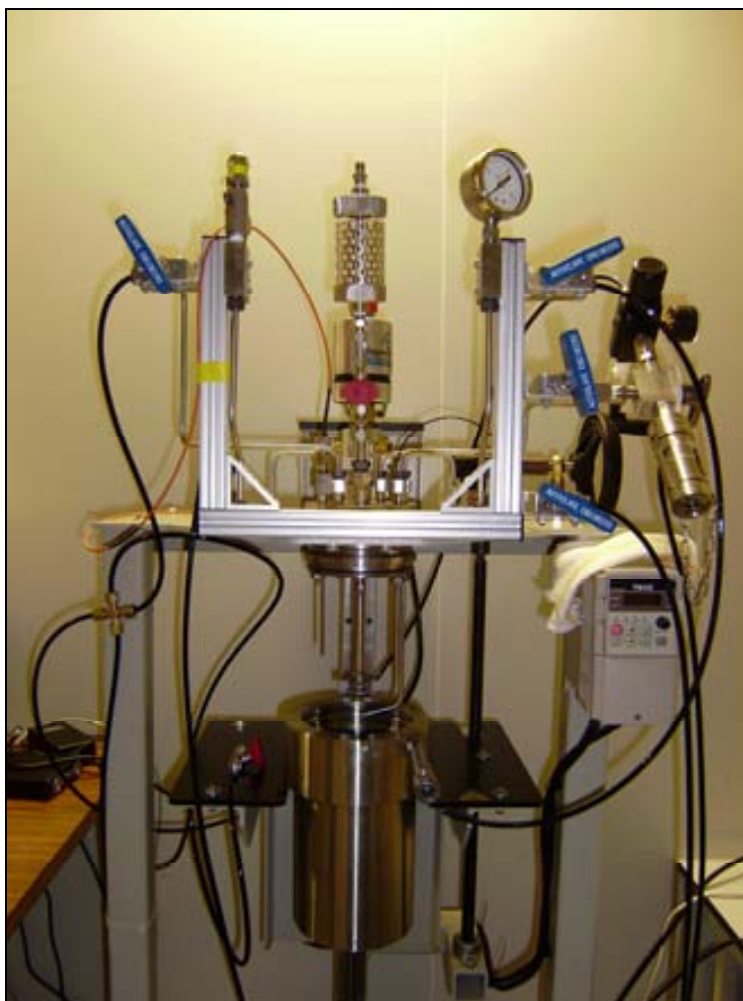


**Figura 3.8.** Visió detallada dels elements situats a l'interior del reactor. Es pot observar els tubs de buidat (tub en forma de L situat a la dreta) i de presa de mostra del reactor (dreta), i l'agitador mecànic de pales (centre).

Prèviament a l'últim experiment de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* en reactor, es va instal·lar una sonda de fibra òptica per tal de mesurar l'oxigen dissolt a la fase líquida per fluorescència (Z-Light SL, EEUU). A més a més de la sonda de fibra òptica, es va instal·lar un sensor de temperatura, que permet mesurar les variacions de temperatura al llarg de l'experiment, tenint en compte que els experiments es realitzen a temperatura ambient i no en una cambra amb control de temperatura, com els experiments de degradació en ampolles de sèrum. Ambdós sensors es troben connectats a un ordinador, així les dades experimentals de concentració d'oxigen i temperatura són registrades on-line a partir d'un programa dissenyat amb Labview (Hexascreen Culture Technologies SL, Espanya).

A la figura 3.9 es mostra una imatge general del reactor amb els diferents accessoris, que s'han detallat prèviament, incorporats.





**Figura 3.9.** Muntatge general del reactor Zipperclave de tanc agitat amb els diferents accessoris i sensors incorporats.

El protocol experimental s'inicia amb una esterilització química amb etanol de les parts internes del reactor. Un cop s'ha evaporat l'etanol, s'afegeix un volum determinat de MD juntament amb el fong i es posa en marxa el sistema d'agitació, que es fixa a una velocitat de 135 rpm en tots els casos. El volum de medi i la quantitat de pèl·lets que s'afegeix són variables depenent de l'experiment. Posteriorment, es tanca la cubeta del reactor i es fa circular oxigen pel reactor durant 2 min per saturar la fase gas. A continuació, es transfereix mitjançant una xeringa d'un sol ús el volum complet de la solució stock aquosa de TCE de l'ampolla de sèrum al recipient cilíndric de l'accessori d'introducció de líquid, el qual es connecta a un tub per on circula oxigen alhora connectat a la vàlvula de subministrament del gas i al fixar una pressió de circulació d'oxigen major a la pressió del reactor, el líquid és arrossegat al reactor per la pressió de circulació de l'oxigen a l'obrir la vàlvula que connecta l'accessori d'introducció de líquid amb el reactor. Tot el procés d'addició de la mostra es realitza amb l'equip extractor encès i amb el focus d'extracció proper a la zona de treball, i

s'utilitza una màscara de protecció de les vies respiratòries equipada amb un filtre de carbó actiu per a compostos volàtils halogenats (Dräger, Alemanya).

En els experiments de consum de glucosa i activitat lacasa, l'addició de MD i del fong es realitza de forma anàloga a com s'ha descrit en el paràgraf anterior però sense addicionar el contaminant al reactor en aquest cas.

Per les analítiques, es realitzen dos tipus de presa de mostra:

- Anàlisi de la concentració de TCE. La mostra de líquid de l'interior del reactor s'extreu, mitjançant l'accessori de presa de mostra, en un vial de 10 mL, el qual s'omple completament de líquid de mostra per evitar que part del contaminant es volatilitzï a la fase gas del vial abans de transferir part del líquid als vials d'anàlisi. A continuació, es transfereix amb una xeringa de plàstic d'un sol ús 1 mL de fase líquida del vial de mostra a un vial de 10 mL on s'han addicionat prèviament 4 mL d'una solució d'azida sòdica 5g/L per aturar l'activitat biològica i que just després d'addicionar la mostra es tanca hermèticament amb un sèptum teflonat i una anella d'alumini. Aquesta operació es realitza per triplicat i a continuació, les mostres es conserven a 4°C fins a la determinació de la concentració del compost clorat. Un cop ha finalitzat completament l'extracció de la mostra, es retorna el volum de líquid residual que ha quedat retingut en tot el sistema de presa de mostra del reactor mitjançant l'aplicació d'un corrent d'oxigen a una pressió superior a la de l'interior del reactor.
- Extracció de la mostra pels anàlisis de glucosa, lacasa i pH. Es treu el volum de líquid desitjat del que resta en el vial un cop preparats els vials per analitzar la concentració de TCE, mitjançant una xeringa de plàstic i es filtren amb un filtre Millipore de 0,45 µm.

Tots els processos d'extracció de mostra es realitzen amb l'equip d'extracció encès i proper a la zona de treball i s'utilitza la màscara de protecció de l'aparell respiratori amb el filtre de carbó actiu corresponent.

Per tal d'introduir una solució líquida al reactor durant l'experiment, ja sigui una solució concentrada de glucosa o de NaOH, es transfereix la solució líquida a l'accessori d'introducció de líquid mitjançant una xeringa i llavors es connecta al tub de



subministrament d'oxigen i el líquid s'introdueix per la pressió que l'oxigen exerceix al circular a una pressió major a l'existent dins el reactor.

Per introduir oxigen al reactor durant l'experiment, es fixa la pressió de la vàlvula de subministrament d'oxigen a un valor superior a la pressió de l'interior del reactor i s'obre la vàlvula d'introducció de fase gas, mantenint les diferents vàlvules de sortida tancades. En els experiments de consum de glucosa i activitat lacasa, la variació de pressió a l'interior del reactor es va realitzar, en els casos requerits, treballant inicialment a la pressió més baixa planificada i posteriorment augmentant-la mitjançant la introducció d'oxigen amb les vàlvules de sortida tancades

Al finalitzar l'experiment, en tots els casos, es determina el pes sec dels pèl·lets del reactor.

#### **3.4.3.5 Degradació de MTBE, ETBE, toluè i etilbenzè**

L'experiment de degradació d'aquests contaminants mitjançant el fong es realitza en ampolles de 240 mL, on s'hi fixen dos optodes sensibles a l'oxigen a la part interior de l'ampolla per realitzar la mesura de la concentració d'oxigen.

S'afegeix un volum de 35 mL de MD, en el cas del MTBE i l'ETBE, i de 15 mL de MD pel toluè i l'etilbenzè. A continuació, s'afegeix la corresponent quantitat de pèl·lets per tenir una concentració de 3,5 g/L (pes sec). A continuació, les ampolles s'oxigenen durant 2 min a 30 KPa i es tanquen amb tap de butil teflonat i anella d'alumini.

S'afegeix el volum corresponent de solució stock mitjançant una xeringa teflonada de cadascun dels contaminants per assolir la concentració en fase líquida de 10 mg/L, pel MTBE i l'ETBE, i de 13 mg/L pel toluè i l'etilbenzè, tenint en compte que la punta de l'agulla es trobi en contacte amb la fase líquida al addicionar el volum de solució stock. A continuació, es deixen les ampolles agitant a 135 rpm i 30°C en posició invertida.

Es realitzen tres tipus d'extraccions de mostra segons el compost a analitzar:

- El procediment d'extracció de la mostra per analitzar la concentració de MTBE i ETBE en fase líquida i per l'anàlisi del fraccionament isotòpic del carboni i l'hidrogen pel procés de degradació és el mateix, amb la diferència

que s'utilitzen vials de 20 mL per analitzar la concentració del contaminant i vials de 10 mL per l'anàlisi del fraccionament isotòpic. En els dos casos es treu 1 mL de mostra líquida mitjançant una xeringa de plàstic a través del tap teflonat i es transfereix al vial corresponent, on prèviament s'hi ha afegit 1 mL d'azida sòdica 5 g/L, i després es tanca el vial amb un sèptum de butil teflonat i una anella d'alumini. Posteriorment, els vials es guarden a -20°C fins analitzar la concentració de contaminant a la fase líquida i el fraccionament del carboni i l'hidrogen, tenint en compte que per a cadascuna de les ampolles i temps de mostra, s'extreuen dues mostres per analitzar.

- Respecte a l'extracció de mostra per analitzar la concentració de toluè i etilbenzè per cromatografia de gasos, s'extreu 1 mL de mostra líquida mitjançant una xeringa d'un sol ús a través del tap de butil i es transfereix a un vial de 20 mL on s'ha addicionat prèviament 9 mL de solució d'azida sòdica 5 g/L. A continuació, es tanca el vial amb un tap de butil teflonat i anella d'alumini. Un cop s'ha extret aquesta mostra, es treu tot el volum de líquid de l'ampolla experimental mitjançant una xeringa d'un sol ús i es transfereix a un vial amb tancament de tap de rosca de 50 mL, on prèviament s'hi han afegit 20 mL d'aigua milliQ i 1 mL de solució d'azida sòdica 10 g/L. A continuació, s'afegeix 1 mL de n-pentà pur, es tanca el vial amb el tap de rosca i s'agita vigorosament de forma manual durant 1 minut per tal d'afavorir la transferència del contaminant a la fase orgànica. S'ha comprovat que l'extracció d'aquests dos contaminants amb n-pentà no afecta a la relació isotòpica del carboni present al toluè o l'etilbenzè (Ptak et al., 2000). Les mostres es guarden a 4°C per analitzar posteriorment la concentració de contaminant a la fase líquida i el fraccionament isotòpic del carboni.
- Per a les mostres de glucosa, l'extracció de la mostra es realitza de forma idèntica al procés descrit en els experiments de degradació de TCE i PCE en ampolles de sèrum.

Al finalitzar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets.

### 3.4.3.6 Càlcul de la degradació de compostos volàtils

La degradació obtinguda en cada experiment es calcula mitjançant un balanç màssic total en les ampolles i determinant el percentatge de degradació obtingut en cada cas.

- Balanços màssics. La massa total i la concentració en el medi líquid de cadascun dels productes es calcula considerant els equilibris entre la fase líquida i gas. El valors de les constants de Henry utilitzats pels diferents contaminants són:

TCE i PCE (25°C): 0,392 i 0,723, respectivament (Gossett, 1987)

MTBE i ETBE (30°C): 0,039 (Staudinger i Roberts, 1996) i 0,06 (EPATools), respectivament.

Toluè i etilbenzè (30°C): 0,272 (Staudinger i Roberts, 1996) i 0,314 (Robbins et al., 1993), respectivament.

La massa total de producte a l'ampolla es calcula sumant les masses obtingudes en la fase gas i en la fase líquida. La massa de producte en la fase líquida es calcula a partir de la concentració obtinguda en la mostra extreta per a l'anàlisi mitjançant la tècnica d'espai de cap estàtica. D'altra banda, la massa de producte en la fase gas s'obté en primer lloc calculant la seva concentració mitjançant l'equació de Henry:

$$C_G = C_L \cdot H_C$$

on  $C_L$  es mesura experimentalment i  $H_C$  és la constant de Henry. Posteriorment es multiplica el valor de  $C_G$  pel volum en la fase gas de l'ampolla experimental.

- Càlcul del percentatge de degradació. En els experiments de degradació en ampolles de sèrum, a les ampolles amb fong viu se les anomena ampolles experimentals. Paral·lelament, per a cada experiment s'inclou també l'ampolla abiòtica, la qual només conté medi líquid i contaminant, sense fong. En tots els experiments, excepte els que s'utilitza la isoterma d'adsorció de TCE en el fong per quantificar l'adsorció (Vilaplana et al., 2008), s'utilitza l'ampolla amb fong autoclavat, que conté pèl·lets desactivats tèrmicament a 121°C durant 30 min. En tots els casos es treballa amb ampolles unitàries i per triplicat.

El percentatge de degradació es calcula, per cada mostrat, comparant la massa total de producte en les ampolles experimentals respecte al de les abiòtiques. Tots els valors de degradació es corregeixen pels valors de massa de contaminant adsorbida en el fong. L'equació que s'aplica és:

$$\% \text{ degradació} = \left( \frac{m_S - m_T}{m_A} \right) \cdot 100$$

On  $m_T$  i  $m_A$  són les massa total de contaminant a les ampolles de degradació i abiòtica, respectivament, i  $m_S$  és la massa de contaminant adsorbida en el fong.

En els experiments on s'aplica la isoterma lineal d'adsorció de TCE o PCE, la massa adsorbida en el fong es quantifica mitjançant la següent equació:

$$m_S = K \cdot X \cdot C_L$$

On  $K$  és la constant de la isoterma lineal (0,110 l/g pes sec pel TCE i 0,176 l/g pes sec pel PCE),  $X$  és el pes sec de pèl·lets i  $C_L$  és la concentració de TCE o PCE en fase líquida per a un temps determinat.

En els experiments on no s'aplica la isoterma d'adsorció, la massa de contaminant adsorbida en el fong s'obté a partir de l'anàlisi de la concentració de contaminant a les ampolles amb fong autoclavat.

### **3.4.4 Contaminants no volàtils**

#### **3.4.4.1 Degradació de polibromodifenil éters**

Tots els experiments de degradació de polibromodifenil éters (PBDEs) s'han realitzat en ampolles de sèrum (Wheaton, EEUU) de 100 mL (120 mL reals) de color àmbar per evitar la fotodegradació del compost durant el procés experimental. En els experiments de degradació de decabromodifenil éter (decaBDE) s'ha treballat en condicions *in vivo* (degradació amb fong) i en condicions *in vitro* (degradació amb el sistema lacassa-mediadors). En els experiments de degradació de les mescles d'octabromodifenil éters (mescla octaBDEs) i pentabromodifenil éters (mescla pentaBDEs) s'ha treballat només en condicions *in vivo*. Per als dos tipus d'experiment, el protocol d'addició de contaminant a les ampolles experimentals ha estat idèntic.

---

Per a cadascuna de les diferents mescles de PBDEs, s'afegeix un volum de solució stock determinat mitjançant una xeringa teflonada per tenir la concentració desitjada de PBDE tenint en compte que el volum de fase aquosa final serà de 10 mL. A continuació es deixen les ampolles obertes dins la campana d'extracció de gasos fins que el diclorometà s'ha evaporat completament.

En aquest punt del procés experimental, distingirem entre el protocol dels experiments *in vivo* i *in vitro*:

- Experiments *in vivo*. Totes les manipulacions és necessari realitzar-les la cambra de flux laminar. S'afegeix un volum de 10 mL de MD amb surfactant a cadascuna de les ampolles experimentals i posteriorment s'afegeix el fong en forma de pèl·lets (3,5 g pes sec/L). El volum de líquid afegit amb els pèl·lets es calcula a partir del pes sec inicial de la biomassa. A continuació es tapa cadascuna de les ampolles experimentals amb un cotó envoltat de gasa i paper d'alumini, per permetre la renovació de l'aire de l'interior de l'ampolla experimental durant l'experiment. Finalment, s'incuben totes les ampolles a 25°C en un agitador orbital a 135 rpm.

En el cas de l'experiment de degradació de decaBDE en discontinus seqüencials en ampolles de sèrum, un cop finalitza cadascun dels tractaments en discontinu, es separa la biomassa de la fase aquosa mitjançant un col·lador, sent la fase aquosa tractada posteriorment per a portar a terme el procés d'anàlisi, i la biomassa es reutilitza per al següent batch, el qual es prepara de forma anàloga al procediment detallat en aquest apartat.

- Experiments *in vitro*. Les concentracions utilitzades a les ampolles per cada mediador han estat d' 1mM per a l'HOBT i 0,8 mM per a l'AV, DMHAP i ABTS. Respecte a la lacasa, es prepara una solució concentrada de 2000 U/L i s'afegeix 1 mL sobre 10 mL totals a cadascuna de les ampolles experimentals, per tal d'obtenir una activitat aproximada de 200 U/L, que correspon a un valor del mateix ordre d'activitat lacasa que el mesurat en els experiments de degradació de decaBDE *in vivo*. Les ampolles control només contenen aigua MilliQ. Després de l'addició de l'enzim, les ampolles s'han tancat amb taps de butil teflonats i anelles d'alumini i s'han incubat a

25°C en un agitador orbital a 135 rpm fins la presa de mostra. En tots els casos s'ha treballat amb mostres unitàries per triplicat.



**Figura 3.10.** Ampolla de sèrum d'un experiment *in vivo* de degradació de PBDEs mitjançant *T. versicolor*.

Per a les analítiques rutinàries es realitzen dos tipus d'extraccions diferents. En ambdós casos, es realitza a la campana d'extracció de gasos.

- Anàlisi de PBDEs en HPLC. És necessari realitzar una extracció d'una etapa del contaminant amb diclorometà. S'afegeix un volum de diclorometà igual al de fase aquosa present a les ampolles experimentals, es tanquen cadascuna d'elles amb un tap de butil teflonat, es crimpen amb una anella d'alumini i es deixen agitant durant 90 min en un agitador orbital a 135 rpm. A continuació, en el cas dels experiments amb una concentració de PBDE igual o superior a 5 mg/L, es transfereix amb una xeringa d'un sol ús, tot filtrant-la amb filtres per a dissolvents orgànics de 0,45 µm (Millipore, Espanya), un volum entre 0,5 i 1 mL de fase orgànica a un vial àmbar d'anàlisi de 1,5 mL (Agilent Technologies, Espanya), el qual es guarda a 4°C per al posterior anàlisi de la mostra. D'altra banda, en el cas de treballar amb una concentració inicial inferior a 4 mg/L, es necessari concentrar la fase orgànica per tenir la certesa que el valor de concentració de PBDE de la mostra es trobi dins el límit de detecció. En aquest cas, s'obren les ampolles i tot el volum de fase orgànica de cadascuna d'elles es pipeteja a una altra ampolla àmbar, la qual es deixa oberta a la campana d'extracció de gasos i s'aireja amb pipetes Pasteur connectades a un corrent d'aire de cabal baix fins a la total evaporació de la fase orgànica.

Posteriorment, s'afegeixen 2 mL de diclorometà amb una xeringa teflonada a cadascuna de les ampolles, es tanquen amb tap de butil i anella d'alumini i s'agiten fortament per assegurar que tota la massa de decaBDE present a l'ampolla es dissol en la fase orgànica. Finalment es transfereix amb una xeringa d'un sol ús un volum entre 0,5 i 1 mL de cada ampolla a un vial àmbar, tot filtrant-la amb filtres per a dissolvents orgànics. Els vials es guarden a 4°C per al posterior anàlisi de la mostra per HPLC.

- Anàlisi de glucosa, lacasa, pH i bromurs. S'extreu mostra de la fase aquosa un cop s'ha realitzat l'extracció amb diclorometà. La mostra s'extreu amb una xeringa de plàstic (poden ser volums superiors a 1 mL) i es filtra amb un filtre Millipore de 0,45 µm. En el cas de la mostra per l'anàlisi de bromurs, és necessari aplicar un tractament per precipitar els ions sulfat abans de realitzar l'anàlisi. Per aquesta raó, s'addiciona un volum determinat d'àcid nítric concentrat per acidificar el pH de la mostra i després s'addiciona d'hidròxid de calci ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) en excés per provocar la precipitació dels ions sulfat com a sulfat de calci ( $\text{CaSO}_4$ ).

A l'acabar l'experiment, es separa la fase orgànica de la fase aquosa a cadascuna de les ampolles experimentals, si no s'ha realitzat aquest pas prèviament, i es determina el pes sec dels pèl·lets presents a la fase aquosa.

#### **3.4.4.2 Càlcul de la degradació de compostos no volàtils**

En els experiments de degradació de PBDEs, es disposa de les ampolles amb fong viu, les quals se les anomena ampolles experimentals. Paral·lelament, per a cada experiment s'han inclòs també les ampolles abiòtiques, que només contenen medi líquid i contaminant, i les ampolles amb fong autoclavat. En tots els experiments es treballa amb mostres unitàries per triplicat

La degradació de compost bromat obtinguda es calcula comparant la massa de contaminant a les ampolles experimentals per a un temps determinat respecte a la massa de composta bromat en les ampolles abiòtiques. En tots els càlculs s'ha tingut en compte la massa de decaBDE adsorbida en el fong, la qual s'obté a partir de les ampolles amb fong autoclavat. L'equació que s'ha utilitzat és:

$$\% \text{ degradació} = \left( \frac{m_S - m_T}{m_A} \right) \cdot 100$$

On  $m_T$  i  $m_A$  són les masses totals de PBDE a les ampolles de degradació i abiòtica, respectivament, i  $m_S$  és la massa de contaminant adsorbida en el fong.

### 3.4.5 Contaminants volàtils sota condicions de cicle redox

#### 3.4.5.1 Degradació de TCE en ampolles de sèrum

Els experiments de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* en condicions de cicle redox es realitzen en ampolles de sèrum de 125 mL tancades hermèticament amb taps de butil teflonats i anelles d'alumini.

S'afegeix el volum de MCR i la quantitat de pèl·lets corresponent rentats amb aigua milliQ després de créixer en extracte de malta i MD. A continuació, el procediment a seguir és idèntic al descrit per la degradació de TCE i PCE en ampolles de sèrum, tenint en compte que no és necessari treballar en condicions d'esterilitat per la curta durada del procés de degradació.

La solució de DBQ afegida durant l'experiment s'introdueix en les ampolles experimentals a través del tap teflonat mitjançant una xeringa de plàstic.

Respecte a l'addició del contaminant, el procediment a seguir és igual al descrit per a la degradació de TCE i PCE, mitjançant el fong tenint en compte s'addiciona el volum de solució stock necessari per disposar de la mateixa massa total de TCE a cada ampolla i per tant, depenent del volum de líquid present a l'ampolla, el volum de solució stock a afegir variarà. A més a més, és important comentar que les ampolles es col·loquen a l'agitador orbital en posició horitzontal i que la velocitat d'agitació pot variar segons l'experiment, treballant a un rang entre 90 i 200 rpm.

Respecte a l'extracció de mostra líquida per l'anàlisi de TCE, s'extreu el volum apropiat de mostra en un vial de 10 mL amb el volum apropiat d'azida sòdica 5 g/L, la qual s'afegeix prèviament per aturar l'activitat metabòlica a la mostra (Johannes i Majcherczyk, 2000), per obtenir un volum final de líquid de 5 mL. Les mostres obtingudes es guarden a 4°C fins a ser analitzades. Per a l'extracció de mostra líquida per a altres anàlisis, en aquest cas, s'extreu mostra per analitzar la concentració de



DBQ amb una xeringa de plàstic, tot filtrant-la amb un filtre Millipore de 0,45 µm per fase aquosa, i es transfereix en un vial on prèviament s'han afegit 10 µl d'àcid fosfòric (1:1 v/v) per aturar la seva reacció. Les mostres de DBQ es guarden a -20°C fins a ser analitzades.

A l'acabar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets de cada ampolla.

#### **3.4.5.2 Degradació de TCE en reactor**

Aquest experiment es realitza en el reactor Zipperclave de 2 L de volum. El procediment experimental utilitzat per la preparació de la mostra i l'addició del contaminant és el mateix que en els experiments de degradació de TCE en reactor mitjançant el fong, amb la diferència que, en aquest cas, no es treballa en condicions estèrils i que com a medi de reacció s'utilitza el MCR.

Durant l'experiment es realitzen addicions puntuals de DBQ mitjançant el sistema d'introducció de líquid del reactor.

Respecte a l'extracció de la mostra per a l'anàlisi de TCE i DBQ, es realitza el mateix procediment experimental que el descrit en els experiments de degradació de TCE en reactor mitjançant el fong, tenint en compte que al vial de presa de mostra s'afegeixen prèviament 50 µl d'àcid fosfòric per aturar la reacció de degradació al vial.

Al finalitzar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets del reactor.

#### **3.4.5.3 Degradació de MTBE i ETBE en tubs de rosca**

L'experiment es realitza en tubs de rosca de 8 mL, els quals es tanquen mitjançant un sèptum de silicona teflonat i un tap de plàstic de rosca (Teknokroma, Espanya).

A cadascun dels tubs s'afegeixen 4 mL del MCR i la quantitat adequada de pèl·lets rentats amb aigua milliQ prèviament crescuts en extracte de malta i MD. Posteriorment, s'oxigenen els tubs durant 5 segons a 30 KPa, tancant-los immediatament després amb un sèptum de silicona teflonat i un tap amb rosca. Posteriorment, s'afegeix el volum necessari, mitjançant una xeringa teflonada i a través

del sèptum, de solució stock de cadascun dels contaminants als tubs per assolir una concentració de 100 mg/L en fase líquida, tenint en compte que la punta de l'agulla es trobi en contacte amb la fase líquida a l'addicionar la solució stock. Finalment, els tubs es col·loquen en horitzontal en un agitador orbital que funciona a 135 rpm i que es troba en una cambra a una temperatura controlada de 30°C.

L'addició de DBQ durant l'experiment es realitza mitjançant l'obertura del tap de rosca amb sèptum, addició de la solució mitjançant una micropipeta i immediatament després es torna a tancar el tub amb el tap de rosca.

L'extracció de les mostres per analitzar la concentració de MTBE i ETBE en fase líquida i el fraccionament isotòpic del carboni i l'hidrogen és realitza seguint el mateix procediment que els experiments de degradació dels dos contaminants mitjançant el fong.

#### **3.4.5.4 Càlcul de la degradació de compostos volàtils**

- Balanços màssics. S'han realitzat els balanços seguint el mateix procediment que pels experiments de degradació de compostos volàtils mitjançant el fong.
- Degradació de contaminant. En els experiments en ampolles de sèrum i tubs, a banda d'utilitzar recipients amb fong i MCR (experimentals), es van usar també recipients amb fong i MCR sense Fe<sup>3+</sup>-oxalat ni Mn<sup>2+</sup> (controls) i recipients amb MCR sense fong (controls abiòtics). En tots els casos es treballa amb mostres unitàries i per triplicat.

La degradació obtinguda a les ampolles o tubs experimentals es calcula comparant la massa de contaminant en les ampolles o tubs experimentals per a un temps determinat respecte a la massa de contaminant en les ampolles o tubs abiòtics. En tots els càlculs s'ha tingut en compte la massa de contaminant degradada pel sistema enzimàtic del fong, la qual s'obté a partir de les ampolles o tubs control. L'equació que s'ha utilitzat és:

$$\% \text{ degradació} = \left( \frac{m_{SE} - m_T}{m_A} \right) \cdot 100$$

On  $m_T$  i  $m_A$  són les masses totals de TCE a les ampolles o tubs experimentals i controls abiòtics, respectivament, i  $m_{SE}$  és la massa de contaminant al control equivalent al sistema enzimàtic del fong.

### **3.4.6 Contaminants no volàtils sota condicions de cicle redox**

#### **3.4.6.1 Degradació de decaBDE**

Els experiments de degradació s'han realitzat en ampolles de sèrum de color àmbar de 100 mL. El procediment experimental seguit és idèntic al realitzat en els experiments *in vivo* de degradació de decaBDE mitjançant el fong, amb la diferència que s'utilitza el MCR com a medi de tractament i no es treballa en condicions estèrils.

La solució de DBQ afegida durant l'experiment s'introdueix en les ampolles experimentals mitjançant una xeringa de plàstic

L'extracció de cadascuna de les mostres de degradació es realitza de forma idèntica als experiments de degradació de decaBDE mitjançant el fong, tenint en compte que per a concentracions de decaBDE inicials inferiors a 4 mg/L, és necessari concentrar la fase orgànica de cadascuna de les mostres per a poder ser analitzada a l'HPLC.

A l'acabar l'experiment, es separa la fase orgànica de la fase aquosa a cadascuna de les ampolles experimentals, si no s'ha realitzat prèviament, i es determina el pes sec dels pèl·lets presents a la fase aquosa.

#### **3.4.6.2 Degradació de carbamazepina**

Els experiments de degradació es realitzen en reactor de vidre de 1,5 L, reactor d'acer inoxidable amb agitació mecànica de 2 L i en ampolles de vidre de 1 L.

*Reactors.* El reactor de vidre utilitzat manté la fluïdització de la biomassa i l'homogeneïtzació de la fase líquida i la biomassa mitjançant polsos d'aire generats per una electrovàlvula i en el reactor amb agitació mecànica es treballa a una velocitat d'agitació de 135 rpm. Les condicions d'operació són dependents del tipus d'experiments. En tots els casos es treballa a una temperatura controlada de 25°C.

En el cas dels experiments en discontinu amb els dos tipus de reactors, cadascun d'ells conté el volum apropiat de MCR i la quantitat apropiada de pèl·lets rentats amb aigua milliQ prèviament crescuts en extracte de malta i MD. Durant l'experiment es realitzen addicions de DBQ i en el cas del reactor amb agitació mecànica, es renova l'oxigen de l'interior del reactor de forma periòdica fent circular oxigen durant 1 min amb les vàlvules d'entrada d'oxigen i de venteig obertes, les quals es tanquen al transcórrer el temps esmentat. En el cas dels experiments en batch seqüencial en el reactor de vidre, el MCR conté glucosa (0,75 g/L). Aquest medi es renova al principi de cadascun dels batchs i la biomassa es reutilitza d'un batch al següent. El temps de durada de cadascun dels batchs és de 6 hores.

En el cas de l'experiment en continu en el reactor de vidre, inicialment s'afegeixen 400 mL de MCR i la quantitat apropiada de fong en forma de pèl·lets rentats amb aigua milliQ prèviament crescuts en extracte de malta i MD. L'experiment comença amb un experiment de degradació en batch i quan la concentració de DBQ a l'interior del reactor és aproximadament 0,2 mM, que en aquest cas va correspondre a un temps de 2,75 h, comença el tractament en continu. S'alimenta amb tres corrents diferents: la solució de DBQ amb  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalat i  $\text{Mn}^{2+}$ , la solució de glucosa i la solució amb carbamazepina. El temps de retenció hidràulic (TRH) depèn de l'etapa de l'experiment. La biomassa roman retinguda al reactor durant l'experiment sense produir-se'n pèrdues per l'efluent.

Durant tot l'experiment de degradació en continu, el cabal d'afluent de glucosa es fixa en un valor igual a la velocitat de consum de glucosa per part el fong (0,034 g/(h·g pes sec)), la qual es va determinar en experiments previs de degradació de carbamazepina en batch mitjançant el procés de cicle redox.

Per a cadascun dels períodes experimentals, es recull l'efluent i s'extreu una mostra líquida per analitzar la concentració de carbamazepina abans de canviar les condicions dels corrents d'alimentació. La velocitat de degradació de carbamazepina per a cadascun dels períodes s'obté mitjançant la comparació entre la quantitat total de contaminant acumulada a la sortida durant el període i la quantitat total de contaminant introduïda al sistema. Per a calcular la velocitat de consum de DBQ, s'extreuen mostres de la fase líquida de l'interior del reactor, mitjançant un sistema de presa de mostra del reactor, per tal d'ajustar la velocitat de consum a una equació d'ordre zero per a cadascun dels períodes. S'ha decidit ajustar la velocitat de consum

de DBQ a una cinètica d'ordre zero perquè s'ha comprovat, en els experiments previs en discontinu, que l'ajust més adequat als valors experimentals correspon a aquesta cinètica. A la figura 3.11 es mostra el sistema de tractament de carbamazepina en reactor en continu.



**Figura 3.11.** Sistema de tractament de carbamazepina en continu mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox. Muntatge amb el reactor i les ampolles d'aliment de carbamazepina, DBQ i glucosa (dreta) i tanc d'emmagatzemament de l'efluent líquid de sortida del reactor (esquerra).

Posteriorment a la finalització de l'experiment en continu, la biomassa es reutilitza per realitzar un experiment de degradació en batch amb 400 mL renovats de MCR amb glucosa (0,75 g/L).

*Ampolles.* En els experiments de degradació en ampolles de vidre s'utilitza un volum de MCR de 200 mL i la quantitat apropiada de pèl·lets, i s'incuben les ampolles en un agitador orbital a 25°C i 135 rpm. Les ampolles no es tanquen completament per assegurar la presència d'oxigen durant tot l'experiment. S'addiciona DBQ durant l'experiment.

Respecte a l'addició del contaminant en tots els experiments en batch, el volum apropiat d'una solució de carbamazepina dissolta en acetonitril s'afegeix mitjançant una xeringa teflonada per assolir la concentració inicial desitjada (aproximadament 10 mg/L) abans de mesclar els substrats i la biomassa.

Totes les mostres es guarden en vials de 10 mL hermèticament tancats amb un sèptum de butil teflonat i una anella d'alumini, on prèviament s'hi han afegit 10  $\mu$ L d'àcid fosfòric, sent posteriorment transferit un volum corresponent a vials de 1,5 mL per ser analitzats a l'HPLC.

Al finalitzar l'experiment, es determina el pes sec dels pèl·lets del reactor o de les ampolles, depenent del cas.

### 3.4.6.3 Càlcul de la degradació de contaminants no volàtils

Per a calcular el percentatge de degradació en els experiments en ampolles de sèrum i ampolles de 1 L, a banda d'utilitzar recipients amb fong i MCR (experimentals), es van usar també recipients amb fong i MCR sense  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalat ni  $\text{Mn}^{2+}$  (controls) i recipients amb MCR sense fong (controls abiòtics). En tots els casos es treballa amb mostres unitàries i per triplicat.

La degradació obtinguda es calcula comparant la massa de contaminant en les ampolles experimentals per a un temps determinat respecte a la massa de contaminant en els controls abiòtics. En tots els càlculs s'ha tingut en compte la massa de contaminant degradada pel sistema enzimàtic del fong, la qual s'obté a partir de les ampolles o tubs control:

$$\% \text{ degradació} = \left( \frac{m_{\text{SE}} - m_{\text{T}}}{m_{\text{A}}} \right) \cdot 100$$

On  $m_{\text{T}}$  i  $m_{\text{A}}$  són les masses totals de TCE a les ampolles experimentals i controls abiòtics, respectivament, i  $m_{\text{SE}}$  és la massa de contaminant al control equivalent al sistema enzimàtic del fong.

En els experiments de degradació en reactor, per calcular el percentatge de degradació es compara la massa de contaminant en el reactor per a un temps determinat amb la massa de contaminant en el reactor per al temps inicial:

$$\% \text{ degradació} = \left( \frac{m_{\text{t}} - m_{\text{o}}}{m_{\text{o}}} \right) \cdot 100$$

On  $m_{\text{t}}$  i  $m_{\text{o}}$  corresponen a la massa de contaminant per a un temps determinat i per al temps inicial, respectivament.

## **3.5 Mètodes analítics**

### **3.5.1 Concentració de contaminants volàtils**

#### **3.5.1.1 Productes clorats**

##### **Procediment analític**

La concentració dels productes clorats s'ha determinat mitjançant la tècnica d'espai de cap (o headspace) estàtica i cromatografia de gasos. El terme "espai de cap" fa referència a l'espai que es troba per sobre de la mostra líquida afegida en el vial segellat de 10 mL.

Els vials de 10 mL que contenen la mostra a analitzar es col·loquen en el carrusel de l'automostrejador de l'espai de cap (Agilent 7964 Headspace Sampler, EEUU) i s'escalfen a 85°C durant 50 minuts. Després d'aquest temps, 1 mL de la fase gas del vial s'injecta automàticament a un cromatògraf de gasos Agilent 6890N (EEUU) equipat amb una columna HP-5 (30 m de llargada x 0.32 mm D.I. x 0.25 µm gruix) i un detector per ionització de flama (FID).

Les condicions d'operació del cromatògraf són les següents: temperatura de la columna, 40°C (2 min), rampa 4°C/min, 50°C (1 min), rampa 10°C/min, temperatura final: 160°C; temperatura de l'injector, 125°C; temperatura del detector per ionització de flama, 260°C; gas portador, He a una pressió de 7 psi.

Les dades són adquirides i quantificades mitjançant el software Millennium 32 (Waters Corp., EEUU).

##### **Realització del calibratge**

Donada l'elevada volatilitat dels productes analitzats, el procediment per realitzar la recta de calibratge en el cromatògraf de gasos ha de ser molt curós i s'han de considerar alguns aspectes importants.

Per al calibratge del PCE i TCE s'han adquirit solucions estàndards per a cada producte de 5000 mg/L de la casa Sigma-Aldrich. Aquestes càpsules es porten a -20°C, posteriorment s'obren i amb la xeringa teflonada es traspassa tot el contingut a un vial de 1,5 mL, es tanca amb un tap folrat amb Tefló i anella d'alumini i es conserven a -20°C.

A partir d'aquesta solució estàndard es preparen diferents solucions de 250 mg/L dels dos productes. Així, s'afegeixen 900 µL d'etanol a vials de 1,5 mL i es porten a -20°C. Un cop freds i amb el tap obert s'afegeix a cada vial 50 µL de TCE i 50 µL de PCE de les solucions estàndards anteriors, obtenint un volum total de 1 mL. El PCE s'afegeix en últim lloc donat que és el més volàtil dels dos. Un cop afegits, els vials es tanquen ràpidament amb taps folrats amb Tefló i anelles d'alumini. Es conserven a -20°C.

Per preparar les solucions patró, cal prendre els volums de la solució mare de 250 mg/L de PCE/TCE que s'especifiquen a la taula 3.5 i traspasar-los a un vial de 10 mL amb 5 mL d'aigua MilliQ que s'hauran conservat prèviament a la nevera. El vial de 10 mL estarà obert, i aquest volum es prendrà del vial de la solució mare de 250 mg/L amb una xeringa teflonada a través del sèptum, i un cop afegit ràpidament es segellarà el vial. La solució mare de 250 mg/L es mantindrà durant aquest procés en gel per desplaçar l'equilibri cap a la fase líquida.

**Taula 3.5.** Volums afegits de la solució mare de TCE i PCE per a la realització de la recta de calibratge.

Volum aigua MilliQ en el vial (mL)	Volum afegit de la solució mare de 250 mg/L (µL)	Concentració al vial (mg/L)	Concentració a l'ampolla experimental (mg/L)
5	100	5	25
5	75	3,75	18,75
5	50	2,5	12,5
5	25	1,25	6,25
5	10	0,5	2,5
5	5	0,25	1,25

Aquests vials de 10 mL s'analitzaran de forma rutinària mitjançant la tècnica de "headspace" estàtica i cromatografia de gasos. Donat que en l'extracció de les mostres experimentals es produeix una dilució 1:5 en el vial que conté l'azida sòdica, a la taula 3.5 s'especifica quina és la concentració real en les ampolles experimentals per a cada solució patró.

### 3.5.1.2 MTBE i ETBE

Les mostres contingudes en els vials de 20 mL s'equilibren a 70°C durant 30 min en el mostrejador automàtic d'espai de cap, HP 7694 Headspace Sampler (Agilent Technologies, Alemanya), abans que 1 mL de fase gas sigui extret i s'injecti en el



cromatògraf de gasos, HP 6890 Series GC System, acoblat a un detector per ionització de flama. Els diferents analits es separen al circular per una columna capil·lar tipus HP-5 (30 m de llargada x 0,32 mm D.I. x 0,25 µm gruix) usant el següent programa de variació de temperatura: 35 °C durant 6 min., augment de 30 °C/min fins arribar a 260 °C i 5 min de temperatura constant a 260 °C.

S'han utilitzat rectes de regressió externes calculades prèviament amb 9 punts diferents per quantificar el MTBE, l'ETBE i els possibles metabòlits. Els límits de detecció per MTBE, ETBE, TBF i TBA són 10, 20, 500 i 1000 µg/L, respectivament.

### **3.5.1.3 Toluè i etilbenzè**

Els dos contaminants s'analitzen mitjançant mostrejador automàtic d'espai de cap amb un cromatògraf de gasos Varian 3800 (Varian, EEUU) equipat amb una columna capil·lar CP SIL 5 CB (25 m llargada x 0,12 mm DI x 0,12 µm gruix; Varian, Alemanya) i un detector per ionització de flama. Inicialment cada mostra s'incuba a 70°C durant 30 min en un agitador (Règim de rotació: 350 rpm durant 5 s i sense rotació durant 2 s) i a continuació, s'injecta 1 mL de fase gas de la mostra al cromatògraf de gasos. Les condicions cromatogràfiques utilitzades són les següents: temperatura d'injecció, 250°C (split 1:50), temperatura del detector, 260°C, i una temperatura de forn consistent en 70°C durant 2 min, augment de 10°C/min fins arribar a 90°C i de 60°C/min fins a 220°C. S'utilitza heli (1 mL/min) com a gas portador.

El calibrat es realitza mitjançant solucions estàndard preparades a partir de solucions stock que s'analitzen amb el mateix procediment que el descrit per les mostres experimentals. Les solucions stock es preparen en metanol pur.

## **3.5.2 Concentració de contaminants no volàtils**

### **3.5.2.1 PBDEs**

La detecció de compostos PBDEs es va realitzar mitjançant dues tècniques d'anàlisi diferents. En el cas del decaBDE, es van analitzar les mostres per HPLC amb detector UV i per cromatografia de gasos-espectrometria de masses. Respecte als altres PBDEs, només es va aplicar l'anàlisi per cromatografia de gasos-espectrometria de masses.

## Anàlisi per HPLC

### Procediment analític

La quantificació de decaBDE es realitza amb una sistema HPLC amb detector UV (Dionex 3000 Ultimate HPLC, EEUU). La separació es duu a terme en una columna C18 de fase inversa (GraceSmart C18, 250x4,6 mm, partícules de 5µm, Grace Davison Discovery Sciences, EEUU). La fase mòbil consisteix en una solució de 5% d'aigua en metanol a un cabal constant de 1,2 mL/min. La cambra de la columna es manté a una temperatura de 30°C i els efluents es monitoritzen a 235 nm. S'injecten 20 µl de mostra mitjançant un injector automàtic (Dionex, EEUU), el temps aproximat de retenció pel decaBDE és de 13 min, i el temps de d'anàlisi és de 15 min.

Les dades són adquirides i quantificades mitjançant el software Millennium 32 (Waters Corp., EEUU).

### Recta de calibratge

Una solució stock de 50 mg/L es prepara afegint la quantitat necessària del producte per obtenir la concentració desitjada en una ampolla de 250 mL folrada d'alumini i posteriorment, s'afegeix el diclorometà fins a un volum total de 250 mL. Posteriorment, s'agita la solució durant 1 hora a 135 rpm.

A partir de la solució stock de 50 mg/L es preparen les diferents solucions patrons en vials àmbar d'HPLC transferint els volums de solució stock especificats a la taula 3.6 mitjançant una xeringa teflonada de 25 o 100 µL, depenent del cas.

**Taula 3.6.** Volums afegits de la solució stock de decaBDE per a la realització de la recta de calibratge.

Volum diclorometà en el vial (µL)	Volum afegit de la solució stock de 50 mg/L (µL)	Concentració al vial (mg/L)
290	10	1,7
281	19	3,2
262	38	6,4
225	75	12,5
150	150	25

Les diferents solucions patrons s'analitzen de forma rutinària i es realitza una recta de calibratge per a analitzar mostres de decaBDE amb una concentració entre 1,7 i 25 mg/L.

### Anàlisi per cromatografia de gasos-espectrometria de gasos (GC/NICI-MS)

L'anàlisi dels compostos PBDEs es realitza mitjançant un cromatògraf de gasos Trace GC Ultra connectat a un espectròmetre de masses quadrupol de doble etapa (Thermo Electron, Texas, USA). Una columna capil·lar DB-5MS (15 m, 0,25 mm D.I., 0,1 µm gruix) s'usa, amb amoníac com a gas portador, a una pressió de font iònica de  $1,9 \cdot 10^{-4}$  Torr. El programa de temperatura comença a 140°C (mantinguda durant 2 min) i acaba a 325°C (mantinguda durant 10 min), amb un increment de 10 °C/min. La injecció es realitza en mode splitless durant 1 min a una temperatura d'injecció de 250°C.

Les condicions d'operació de GC/NICI-MS són les següents: la temperatura de font iònica és de 250°C i s'utilitza amoníac com a gas moderador de la ionització química a un cabal de 3,0 mL/min. Els experiments es van portar a terme mitjançant la monitorització dels pics dels dos isòtops més abundants de l'espectre de masses, que corresponen a  $m/z = 79$  i  $81$  [Br]<sup>-</sup> pels compostos des de di- fins a nonaBDEs, a  $m/z = 487$  i  $489$  pel decaBDE i a  $m/z = 497$  i  $498$  pel <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-decaBDE.

La identificació dels analits seleccionats es basa en els següents criteris de restricció: (i) el temps de retenció per a tots els ions monitoritzats per un determinat analit s'ha de maximitzar simultàniament en ±1 s, sent cadascuna de les àrees de senyal com a mínim 3 cops superior a la senyal del soroll i (ii) la diferència de la intensitat relativa de pic respecte els valors teòrics obtinguts amb les solucions estàndards no pot ser superior a ±15%.

La quantificació dels compostos des de di- fins a pentaBDEs es va portar a terme mitjançant el procediment amb estàndard intern usant el BDE-77, mentre que pels compostos hexa- i heptaBDEs es va usar el BDE-181. En el cas dels compostos des de octa- fins a decaBDE la quantificació es va realitzar mitjançant l'ús de <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-decaBDE com a estàndard intern.

#### **3.5.2.2 PBDEs hidroxilats**

La separació dels compostos PBDEs hidroxilats (OH-PBDEs) de cada mostra es realitza en un sistema de cromatografia líquida Symbiosos Pico (Spark Holland, Emmen, Països Baixos) usant una columna C18 BetaBasic (100mm x 2,1mm, 3µm mida de partícula) proporcionada per Waters. Els experiments es porten a terme en mode de ionització negativa usant aigua com a solvent A i acetonitril com a solvent B,

a un cabal de 200µL/min. La relació de solvents en el cabal comença amb una composició inicial de 75% del solvent A i 25% del solvent B, amb una augment en rampa del percentatge de B durant els següents 10 minuts fins a una composició de 40% de A i 60% de B, la qual es manté durant 15 min. Després, s'arriba a una composició del 100% de B en un esglaió de 10 min i es manté l'anàlisi durant 2 min en aquestes condicions. Finalment, s'assoleixen novament les condicions inicials al cap de 5 min i es mantenen durant 10 min per reequilibrar la columna.

La detecció dels OH-PBDEs es porta a terme mitjançant l'anàlisi d'espectrometria de masses. Aquest anàlisi es va realitzar mitjançant una trampa d'ions lineal/quadrupol triple híbrid Applied Biosystem MSD Sciex 4000QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usant un mode d'ionització Química a Pressió Atmosfèrica. El programa Analyst 1.4.2 es va usar per recollir i processar totes les dades. L'adquisició de dades es va realitzar en monitorització per reacció selectiva (SRM de l'anglès *Selected reaction monitoring*) per tal d'augmentar la sensibilitat. Les condicions MS-MS també es van optimitzar per tal d'assolir la màxima intensitat relativa: el potencial de Desegmentació varia des de -55 a -70 ev, l'Energia de Col·lisió varia des de -60 a -120 ev i el Potencial de Sortida de la Cel·la de Col·lisió varia des de -1 fins a -13 ev. Es van monitoritzar dues transicions de SRM per cada grau de bromació d'OH-PBDE: 421>79 i 421>81 per tri-OH-BDEs, 501>79 i 501>81 per tetra-OH-BDEs, 579>79 i 579>81 per penta-OH-BDEs, 654>79 i 654>81 per hexa-OH-BDEs.

Per tal de quantificar els compostos OH-PBDEs es disposa d'onze estàndards d'aquests compostos, els quals es van adquirir a Accustandard (EEUU): 4'-OH-BDE-17, 3'-OH-BDE-28, 3-OH-BDE-47, 5-OH-BDE-47, 6-OH-BDE-47, 4-OH-BDE-90, 5'-OH-BDE-99, 6'-OH-BDE-99, 6-OH-BDE-85, 3-OH-BDE-154 i 6-OH-BDE-157. També es disposa de dos congèneres de OH-BDE amb <sup>13</sup>C marcat: 6-OH-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TetraBDE-47 i 6-OH-<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PentaBDE-100.

Les solucions estàndard es van preparar i diluir posteriorment en acetonitril per obtenir mesclades perfectes i les corresponents solucions estàndard per a la calibració del cromatògraf líquid per tots els compostos.

### 3.5.2.3 Carbamazepina i DBQ

La quantificació de decaBDE es realitza amb una sistema HPLC amb detector UV (Dionex 3000 Ultimate HPLC, EEUU). La separació es duu a terme en una columna C18 de fase inversa (GraceSmart C18, 250x4,6 mm, partícules de 5µm, Grace Davison Discovery Sciences, EEUU). Es treballa a una longitud d'ona de 230 nm, a una temperatura de 30°C i s'injecten 20 µl de mostra mitjançant un mostrejador automàtic (Dionex, EEUU). La fase mòbil consisteix en una mescla d'una solució d'àcid acètic 6,9 mmol/l ajustada a pH 4 mitjançant NaOH i acetonitril amb un 35% v/v, i es manté en condicions isocràtiques a 1 mL/min tal com descriu Stafiej et al. (2007).

Les dades són adquirides i quantificades mitjançant el software Millennium 32 (Waters Corp., EEUU).

## 3.5.3 Relació isotòpica d'elements en mostres de degradació de contaminants

### 3.5.3.1 TCE i PCE

La relació isotòpica del carboni en les mostres de degradació de TCE i PCE s'analitza mitjançant un cromatògraf de gasos de combustió espectròmetre de masses de relació isotòpica (GC-C-IRMS). El sistema consisteix en un cromatògraf de gasos (Sèrie 6890, Agilent Technologies, EEUU) connectat a un equip de combustió Finnigan MAT GC III acoblat a un espectròmetre de masses Finnigan MAT 252 (ThermoFinnigan, Alemanya). La temperatura d'oxidació del forn es fixa en 940°C. En tots els casos, 1 mL de fase gas de la mostra en vial s'injecta en mode splitless en un injector split/splitless que es manté a 250°C. Cada mostra s'injecta per triplicat. Els compostos clorats es separen mitjançant una columna capil·lar (CP-PoraBOND Q 50 m de llargada x 0,32 mm de D.I. x 0,5 µm de gruix, Varian, Països Baixos). La temperatura del forn es manté a 40°C durant 5 min i després augmenta a una velocitat de 20°C/min fins a 150°C, llavors l'augment es redueix a 5°C/min fins a 200°C i finalment es realitza una augment de 20°C/min fins a 250°C, temperatura a la qual es manté durant 6 min. S'utilitza heli com a gas portador (2 mL/min).

### 3.5.3.2 MTBE i ETBE

La composició isotòpica de les mostres de degradació de MTBE i ETBE s'analitza mitjançant un sistema de GC-C-IRMS que consisteix en un cromatògraf de gasos (Sèrie 6890, Agilent Technologies) acoblat a un dispositiu Finnigan MAT GC III i connectat a un espectròmetre de masses MAT 252 IRMS pel carboni i MAT 253 IRMS per l'hidrogen (Ambdós ThermoFinnigan, Alemanya). La columna cromatogràfica utilitzada per ser els diferents analits és del tipus ID-BPX5 (50 m de llargada x 0,32 mm de D.I.x 0.5 µm de gruix, SGE, Alemanya). S'utilitza heli com a gas portador (1,5 mL/min). La temperatura del forn es manté constant a 70°C durant 60 min realitzant injeccions manuals cada 4 min. A continuació, la temperatura augmenta a una velocitat de 20°C/min fins a 220°C, on es manté durant 2 minuts per netejar la columna. Les mostres s'injecten manualment mitjançant una xeringa teflonada per a fase gas (SGE, Darmstadt, Germany) en un injector split/splitless que es troba a 250°C. El volum d'injecció per espai de cap i el mode split varien segons la concentració de MTBE i ETBE a les mostres tenint en compte la sensibilitat de l'anàlisi isotòpic del carboni i l'hidrogen. En el cas del carboni, els volums varien de 30 a 100 µL, utilitzant relacions de split entre 1:1 i 1:3. Pel que fa a l'hidrogen, els volums afegits varien de 100 a 1000 µL i s'injecten sense mode split. Cadascuna de les mostres es mesura, com a mínim, per triplicat pels dos isòtops.

### 3.5.3.3 Toluè i etilbenzè

El sistema utilitzat per analitzar la relació isotòpica del carboni en les mostres de degradació de toluè i etilbenzè és el mateix que per l'anàlisi de la relació isotòpica del carboni pel TCE i PCE (veure apartat 3.5.3). Alíquotes (0,5-4µl) dels extractes de pentà s'injecten al cromatògraf de gasos mitjançant un injector split/splitless que es troba a 250°C i es separen mitjançant una columna capil·lar ZB1 (60 m de llargada x 0,32 mm D.I.x 1µm gruix, Phenomenex EEUU). El programa de temperatura s'inicia a 40°C, mantenint-se la temperatura constant durant 3 minuts, per després augmentar a una velocitat de 4°C/min fins a 100°C i mantenir-se a aquesta temperatura durant 5 minuts. Llavors a temperatura augmenta a raó de 4°C/min fins a 120°C i a raó de 20°C/min fins a 200°C. S'utilitza heli com a gas portador (1,5 mL/min). Els compostos que surten del cromatògraf de gasos s'oxiden a 940°C sobre un catalitzador de CuO/Ni/Pt. Cadascuna de les mostres es mesura un mínim de 3 cops. La linealitat i la precisió de l'espectròmetre de masses es comprova amb el gas de referència (CO<sub>2</sub>) i el toluè.

#### 3.5.3.4 DecaBDE

Aquests anàlisis es van realitzar a la Unitat de Cromatografia de Gasos-Espectrometria de Masses Aplicada dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Per a aquest anàlisis es va utilitzar un cromatògraf de gasos Agilent 6890N acoblat a un espectròmetre de masses ThermoFinnigan Delta Plus a través d'una interfase de combustió FinniganMat GC III. La temperatura de l'injector va ser de 240°C i la injecció de la mostra gasosa es va realitzar mitjançant el sistema splitless (40 l/min) i introduint un volum de 3 µL de mostra. El cromatògraf de gasos estava equipat amb una columna capil·lar GS-GasPro (30x0,32) a una temperatura de 60°C. El cromatògraf de gasos i l'espectròmetre de masses es varen controlar amb el software Thermo Isodat NT 2.0, que també permetia l'adquisició de les dades experimentals i el càlcul dels valors de la delta per mil ( $\delta^{13}\text{C}$ ) respecte el patró internacional V-PDB (Viena Pee Dee Belemnite).

#### 3.5.4 Concentració de glucosa

Es mesura amb un analitzador enzimàtic de glucosa i lactat model YSI 2700 (Yellow Springs Instruments & Co, EEUU). El rang de concentració de glucosa admissible per aquest analitzador és de 0 a 20 g/L, amb una precisió de  $\pm 2\%$  o 0,04 g/L. L'anàlisi es basa en la reacció enzimàtica d'oxidació de la glucosa a peròxid mitjançant la glucosa oxidasa immobilitzada a la membrana i la posterior reducció del peròxid a l'ànode de platí.

#### 3.5.5 Concentració de bromurs

La mesura de la concentració de bromurs es dur a terme mitjançant un cromatògraf iònic ICS-1000 Ion Chromatography System, amb una columna IonPac AS9-HC (Dionex Corporation, EEUU) per separar anions inorgànics. La solució portadora és  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  9 mM, amb un cabal d'1 mL/min i un volum d'injecció de 0.5 mL. El temps d'anàlisi és de 25 minuts.

#### 3.5.6 Activitat enzimàtica lacasa

L'activitat de lacasa es mesura fent servir la primera part del mètode per a la determinació de l'activitat de manganès peroxidasa (Wariishi et al., 1992). El medi de reacció conté: 200 µL de malonat sòdic 250 mM a pH 4,5, 50 µL de 2,6-dimetoxifenol (DMP) 20 mM i 600 µL de mostra. El DMP és oxidat per la lacasa inclús en absència

de cofactors. Es mesura durant dos minuts la variació de l'absorbància a 468 nm i 30 °C en un espectrofotòmetre Varian Cary 3 UV/Vis equipat amb termòstat. Les unitats d'activitat (UA) es defineixen com el número de micromols de DMP oxidats per minut ( $\mu\text{mol DMP}/\text{min}$ ). El coeficient d'extinció del DMP és de  $24800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.5.7 Producció de TBARS

La producció de TBARS (de l'anglès *Thiobarbituric acid reactive substances*) a partir de desoxiribosa (Halliwell i Gutteridge, 1981) s'usa per estimar la producció de OH $\cdot$ . Els TBARS es determinen segons es detalla a continuació: 0,5 mL d'àcid tricloroacètic 2,8% (p/v) i 0,5 mL d'àcid tiobarbitúric 1% (p/v) en 50 mM de NaOH s'afegeixen a 1 mL de mostra i la mescla s'escalfa durant 10 min a 100°C. Un cop la mescla s'ha refredat, es mesura l'absorbància a 532 nm respecte al corresponent blanc (Gutteridge, 1984).

### 3.5.8 Determinació de la biomassa per pes sec

El pes sec de la biomassa del fong de les ampolles experimentals s'ha obtingut filtrant al buit les mostres amb filtres preterats Whatman GF/C i rentant amb 100 mL d'aigua destil·lada cada mostra. El filtre s'asseca a l'estufa a 100°C fins assolir pes constant. Posteriorment es calcula la diferència entre el pes inicial del filtre i el que conté la biomassa.

Pels experiments de degradació en reactor, al finalitzar l'experiment, es separa el fong de la fase líquida en forma de pèl·lets mitjançant un col·lador, es netegen els pèl·lets repetidament amb aigua milliQ per evitar la interferència de les sals del medi en la mesura del pes sec. S'introdueixen els pèl·lets en un vas de precipitats prèviament tarat i s'assequen a l'estufa a 100°C fins assolir pes constant. Posteriorment es calcula la diferència entre el pes inicial del vas de precipitats i el que conté la biomassa.

### 3.5.9 Densitat dels pèl·lets

Es pesa una quantitat determinada de pèl·lets humits i s'afegeixen a una proveta on s'ha addicionat prèviament una quantitat determinada d'aigua. El volum d'aigua desplaçada pels pèl·lets s'utilitza per calcular la densitat real i el volum que ocupen els



pèl-lets a la proveta per a la densitat aparent. Seguidament, es determina el pes sec dels pèl-lets utilitzats per poder realitzar els càlculs.

### 3.5.10 Mesura del pH

La mesura de pH de les ampolles experimentals s'ha realitzat de forma quantitativa mitjançant un elèctrode de pH (Crison Instruments SA, Espanya).

## 3.6 Metodologia estadística

### 3.6.1 Metodologia de disseny experimental i anàlisi estadístic dels experiments de degradació de TCE mitjançant el procés biooxidació avançada

La metodologia de disseny de composició central (DCC) amb dos factors ( $k=2$ ) s'aplica per estudiar l'efecte de la velocitat d'agitació ( $x_1$ ) i la relació de volums entre la fase gas i la fase líquida ( $x_2$ ) en la degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox. Aquesta metodologia s'utilitza freqüentment en processos d'optimització perquè implica la realització d'un reduït nombre d'experiments en comparació a un disseny factorial complet. DCC permet l'ajust d'un model polinòmic quadràtic complet i aquesta metodologia permet distingir estadísticament entre la importància dels factors i l'error aleatori associat als experiments. Els nivells factorials es normalitzen i es codifiquen entre el rang  $(-\alpha, +\alpha)$ .

La metodologia DCC consisteix en  $2^k$  punts factorials que representen totes les combinacions dels valors codificats ( $\pm 1$ ),  $2k$  punts axials a una distància  $\pm\alpha$  de l'origen, i com a mínim tres punts centrals amb un valor codificat de zero. El valor de  $\alpha$  és 1,414 ( $\alpha = F^{1/4}$ , on  $F = 2^k$ ), el qual representa els valors als extrems per cadascun dels factors implicats en el disseny. Normalment tres replicats pel valor central són suficients per avaluar la incertesa experimental. Tot i això, en aquest disseny experimental, cada combinació s'ha realitzat per triplicat per tal d'incrementar la fiabilitat del model ajustat. Una explicació detallada del mètode DCC i les seves possibles aplicacions es pot trobar a la bibliografia (Deming, 1987).

Per tant, es van realitzar nou combinacions de variables independents, implicant l'execució d'un total de 27 experiments. La velocitat d'agitació varia de 90 fins a 200 rpm i es troba restringida pel tipus d'equip utilitzat. El rang de volums de líquid s'ha triat

per tal de tractar un volum significatiu de líquid en tots els casos sense limitar la degradació per falta d'oxigen.

Cada funció de resposta es pot ajustar a un model polinòmic de segon ordre (equació 3.1) considerant els factors de nivell.

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (3.1)$$

Els paràmetres del model ( $b_i$ ) i l'anàlisi estadístic es van estimar a partir dels valors experimentals usant el programa informàtic Sigmaplot 11.0 (Systat Software Inc.).

---

## Capítol 4

# Disseny i aplicació d'un bioreactor per degradar tricloroetilè mitjançant *Trametes versicolor*

---

- Part dels resultats continguts en aquest capítol es troben publicats a:

Vilaplana, M., Marco-Urrea, E., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., 2008. Required equilibrium studies for designing a three-phase bioreactor to degrade trichloroethylene (TCE) and tetrachloroethylene (PCE) by *Trametes versicolor*. Chem. Eng. J. 144, 21-27.



## Resum

En aquest capítol es descriu, en primer lloc, el procediment a seguir per completar el disseny d'un bioreactor per degradar tricloroetilè (TCE) en fase líquida mitjançant el fong *Trametes versicolor*. Per tal de d'obtenir aquest disseny, ha estat necessari assolir certs objectius previs, com són la determinació dels equilibris vapor-líquid i líquid-sòlid en relació al contaminant en el sistema trifàsic, al tractar-se d'un compost altament volàtil i que alhora s'adsorbeix de forma apreciable en el fong, i la determinació del consum d'oxigen per part del fong durant el procés, al ser una reacció de degradació aeròbia.

Respecte a l'equilibri de TCE entre la fase gas i la fase líquida, s'ha escollit el valor de constant de Henry més adient entre diferents valors obtinguts a partir d'una recerca bibliogràfica. En el cas de l'equilibri de contaminant entre la fase líquida i la fase sòlida, a partir de la realització d'un elevat nombre d'experiments d'adsorció de contaminant en el fong a diferents concentracions inicials de TCE, es comprova que la isoterma lineal és la més adient per descriure aquest procés.

Un cop completat el procediment de disseny del reactor, aquest s'ha aplicat en experiments en diferents condicions per comprovar la seva validesa en condicions reals i estudiar l'efecte de diferents paràmetres experimentals en la degradació de TCE mitjançant el fong. S'ha treballat en diferents sistemes experimentals, com són ampolles de sèrum de 125 i 500 mL i un reactor de 2 L.

A partir dels resultats obtinguts, es comprova que, en els diferents sistemes experimentals, si s'apliquen els valors dels paràmetres obtinguts mitjançant el procediment de disseny, no és possible assolir, en cap cas, el percentatge de degradació fixat pel corresponent temps de degradació. Respecte a l'efecte de diferents paràmetres en la degradació de TCE, els resultats suggereixen que, en tots els casos, la disponibilitat d'oxigen és un paràmetre important respecte a l'optimització del procés i en el cas de l'operació en el reactor de 2 L, la sobrepressió que s'aplica, a causa de la introducció d'oxigen en condicions d'hermeticitat, podria tenir un efecte negatiu en l'activitat enzimàtica del fong i com a conseqüència, en la degradació de contaminant.

## 4.1 Introducció

### 4.1.1 Contaminació del medi per tricloroetilè i tetracloroetilè

El tricloroetilè (TCE) i el tetracloroetilè (PCE) són dos compostos organoclorats que es poden classificar dins del grup dels hidrocarburs alifàtics clorats. Són compostos líquids, no inflamables a temperatura ambient, incolor, molt poc solubles en aigua i amb una alta volatilitat. Aquests compostos tenen un aroma i un gust lleugerament dolç i ardent. El tricloroetilè també es coneix amb els noms de tricloroetà, 1-clor-2,2-dicloroetilè o triclorur d'acetilè, entre d'altres, i el tetracloroetilè és conegut també com percloroetilè o tetracloroetà, entre d'altres (ATSDR, 1997).



**Figura 4.1.** Estructura química del tricloroetilè (esquerra) i del tetracloroetilè (dreta).

Aquests dos compostos van començar a ser utilitzats a mitjans de la primera meitat del segle XX i des d'aquell moment, van ser molt usats a tot el món durant tot el segle passat. Actualment el seu ús industrial s'ha reduït i està molt controlat, a causa de l'alt grau de contaminació que provoquen, tant en l'atmosfera, com en el medi aquàtic i el sòl, i pels seus efectes perjudicials per a la salut.

Els usos majoritaris del PCE són com a solvent en neteja en sec i en la neteja de metalls, i com intermediari en reaccions químiques, com la producció de fluorocarbonats. A més a més, també s'utilitza en processos d'extracció i, en menor mesura, com a solvent netejador en la indústria tèxtil i com a fumigant (IHCP, 2005).

Pel que respecta al TCE, s'usa principalment com a desengreixant de metalls a la indústria. També s'utilitza en menor mesura en adhesius, com a solvent per a varis productes, com pesticides o ceres, com a intermediari químic en la fabricació de 1,1,1,2-tetrafluoroetà (HFC 134a) i clorur de 2,2,2-trifluoroetil (HCFC 133a) i s'usa també a la indústria tèxtil per a la neteja de cotó, llana i altres productes (IHCP, 2004).

La principal causa de que una part dels aqüífers i sòls d'una part del món industrialitzat estiguin contaminats amb TCE i PCE va ser el fet que durant la segona meitat del segle XX es produís una important acumulació d'aquests compostos al sòl i

a les aigües subterrànies pel seu abocament incontrolat per part de les indústries i per la presència d'aquests compostos en diferents productes de consum. Com la majoria de compostos organoclorats, el TCE i el PCE s'acumulen amb certa facilitat al sòl i a les aigües subterrànies, a les quals arriben per percolació a través de sòls porosos, perquè són molt insolubles en aigua, recalcitrants i xenobiòtics, tot i que es produeixen en petites quantitats a la naturalesa (Abrahamsson et al., 1995; Dimmer et al., 2001). Per tant, és molt complicat que siguin degradats pels microorganismes autòctons presents al sòl o a les aigües subterrànies contaminades.

Aquests compostos estan considerats com dos dels principals contaminants d'aqüífers de tot el món industrialitzat. Periòdicament, l'agència de registre de substàncies tòxiques i malalties dels Estats Units (ATSDR) publica una llista de les principals substàncies perilloses més habituals en indrets contaminats d'aquest país segons la seva freqüència, toxicitat i el seu potencial d'exposició humana (CERCLA Priority List). L'última llista que es pot consultar correspon a l'any 2007 i sobre un total de 275 substàncies classificades, el tricloroetilè es troba situat a la posició 16 i el tetracloroetilè es troba a la posició 33 (web ATSDR). Com a exemple de l'extensió de la contaminació d'aquests compostos, dels 1233 indrets contaminats per residus perillosos identificats per l'EPA l'any 2002 a la seva *Final Priority List*, el 42% mostraven contaminació per PCE i un 47% contaminació per TCE (Gossett, 2002).

La via principal de les emissions de TCE i PCE és l'aire, a causa de l'alta volatilitat d'aquests dos productes. En el cas del TCE, la principal font d'emissió correspon al seu ús com a desengreixant de metalls (IHCP, 2004) i pel PCE, la font d'emissió més important correspon al seu ús en la neteja en sec (IHCP, 2005). En el passat, el sistema més comú per la neteja en sec era el de circuit obert, en el que l'assecat final de la peça de roba es feia directament a l'atmosfera. Posteriorment, aquest sistema es va millorar afegint filtres de carbó actiu per adsorbir el dissolvent abans de l'assecat a l'exterior. Hi ha un altre sistema, el de circuit tancat, on els vapors del dissolvent es recuperen en el cicle d'assecat per condensació. La contaminació aquosa en aquest procés té lloc per l'addició d'aigua durant el rentat per eliminar impureses solubles en aigua i per la regeneració del filtre de carbó actiu en els sistemes que l'utilitzen (IHCP, 2004, , 2005).

Respecte a la seva toxicitat sobre la salut humana, el PCE està classificat com a carcinogen de categoria 3 i el TCE de categoria 2, per la Directiva 67/548/CEE. Formen part de la categoria 3 aquelles substàncies els efectes carcinògens de les

quals són preocupants, però de les que no es disposa suficient informació per realitzar una avaluació satisfactòria; hi ha algunes proves realitzades amb animals però que resulten insuficients per incloure-les en la segona categoria. La categoria 2, en canvi, la formen aquelles substàncies que es poden considerar carcinògenes per als éssers humans. En aquest cas, es disposa de suficients elements per suposar que l'exposició de les persones a aquestes substàncies pot produir càncer, i aquesta presumpció es fonamenta generalment en estudis a llarg termini en animals i amb altres tipus d'informació pertinent. Addicionalment el PCE està classificat com a substància mutagènica de categoria 3. A aquesta categoria pertanyen aquelles substàncies que són preocupants pels seus possibles efectes mutagènics però que els resultats obtinguts fins ara són insuficients per classificar-la en la segona categoria.

Tot i que en aquest capítol, alguns aspectes del TCE i el PCE es tracten en paral·lel, s'ha escollit el TCE com a contaminant model per estudiar la seva degradació en detall.

#### 4.1.1.1 Processos de transport de TCE al medi ambient

A la taula 4.1 es mostra les propietats físico-químiques del TCE, que estan estretament relacionades amb la seva mobilitat i distribució en el medi, i a les que es farà referència al llarg d'aquest capítol. En el cas de la constant de Henry, el rang de valors presentat engloba tots els obtinguts a partir de la bibliografia consultada.

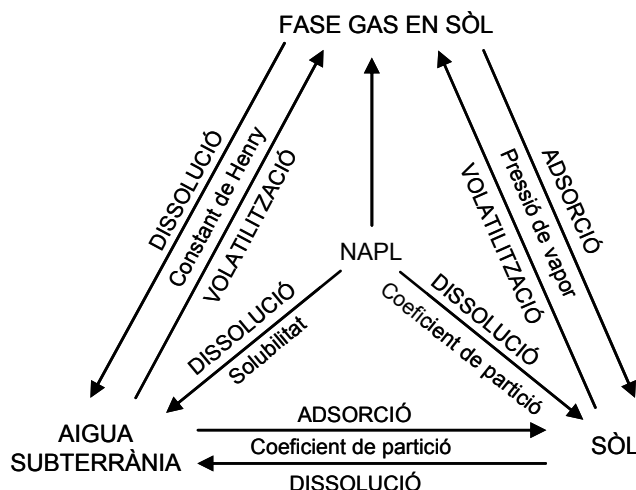
**Taula 4.1.** Característiques físico-químiques del TCE.

Densitat (g/cm <sup>3</sup> ) 20°C	Solubilitat aigua (mg/L) 20°C	Densitat vapor (Kg/m <sup>3</sup> )	Pressió vapor (mm Hg) 25°C	Constant Henry (adimensional) 25°C	Coefficient partició octanol- aigua (log Kow)	Coefficient partició carboni (log Koc)
1,463	1100	0,42	57,9	0,35-0,45	2,29	2,29

En cas que el TCE, i en general un hidrocarbur alifàtic clorat, s'alliberi al medi ambient com un líquid pur i arribi fins al subsòl, aquest compost assolirà un estat d'equilibri entre les diferents fases presents si no es produeix un canvi bruscat en el sistema. El compost al ser molt poc soluble en aigua (taula 4.1) es mantindrà en gran majoria com a fase líquida no aquosa (NAPL de l'anglès *None aqueous phase liquid*) i d'aquesta fase una fracció s'adsorbirà al sòl, una altra es mantindrà en contacte amb la fase aquosa amb la conseqüent transferència de TCE de la fase no aquosa a la fase aquosa i una tercera part es volatilitzarà ocupant els espais buits del subsòl (Huling i



Weaver, 1991). La repartició del contaminant entre la NAPL, el sòl i la fase aquosa dependrà del coeficient de repartició del compost, que està relacionat amb la hidrofobicitat, i de la solubilitat en fase aquosa del TCE (taula 4.1). D'altra banda, la constant de Henry del compost defineix la repartició entre la fase aquosa i la fase gas, i la pressió de vapor del compost defineix la repartició entre la fase no aquosa, la proporció adsorbida al sòl i la fase gas (taula 4.1). A la figura 4.2 es mostra l'esquema de repartició del contaminant entre les tres fases del subsòl.

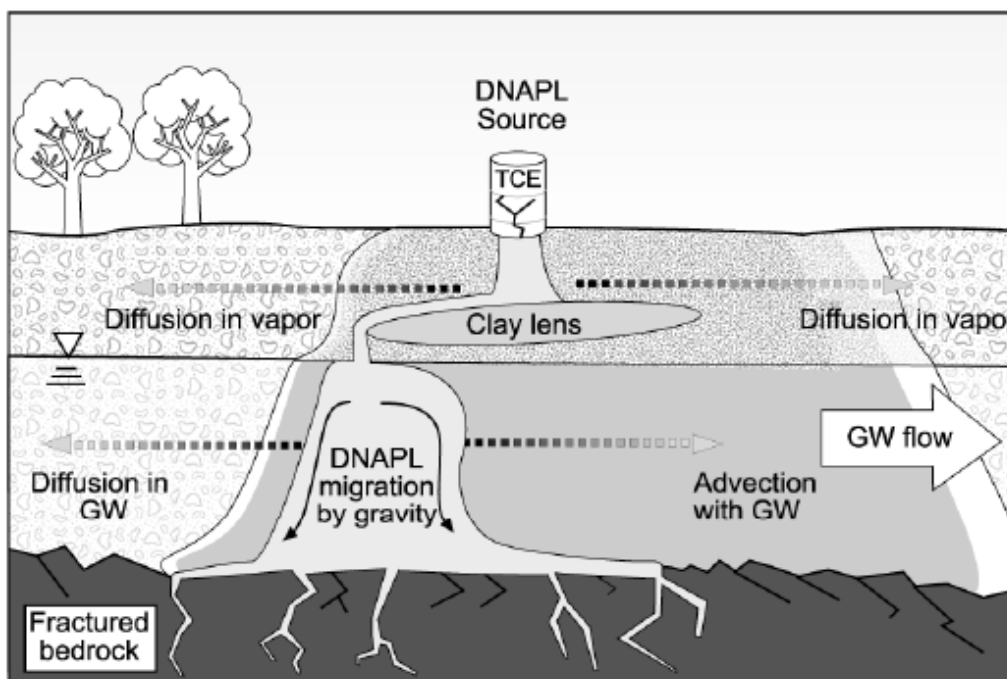


**Figura 4.2.** Esquema dels diferents equilibris del compost que s'estableixen entre les diferents fases del subsòl (Huling i Weaver, 1991).

El TCE és un compost més dens que l'aigua i per tant, al produir-se un abocament a la superfície, aquest percolarà a través del sòl permeable i a l'arribar a l'aigua subterrània, a causa de la seva major densitat, es situarà just a sobre de l'estrat inferior que confina l'aquífer. Aquest comportament també succeirà en el cas dels diferents isòmers de dicloroetà (DCE), que són possibles productes de la degradació anaeròbia de TCE. En canvi, en el cas del clorur de vinil, que també pot produir-se com a producte de la degradació anaeròbia de TCE, al ser un compost menys dens que l'aigua romandrà a la superfície de la fase aquosa de l'aquífer (EPA, 2000).

A banda de la transferència del TCE entre fases per assolir l'equilibri, aquest compost pot migrar al subsòl entre les diferents fases per l'acció de processos de transport tant actius com passius (Sims et al., 1992). Els principals processos de transport actius són l'advecció i la dispersió, sent més important el transport per advecció pel que fa al moviment del contaminant dissolt en la fase aquosa. El procés passiu més important és la difusió i es produeix principalment al sòl en el transport del contaminant entre la fase sòlida i la fase gas. A més a més, el TCE és mou al sòl per

l'arrossegament del flux de NAPL. A la figura 4.3 es mostra una visió complerta dels diferents processos de transport que tenen lloc al subsòl al produir-se un abocament de TCE.



**Figura 4.3.** Diferents processos de transport que es produeixen al subsòl després d'un abocament de TCE a la superfície (Sims et al., 1992).

#### 4.1.1.2 Normativa respecte la contaminació de TCE i PCE

##### Contaminació del medi aquàtic

La norma bàsica respecte la protecció del medi aquàtic a la Unió Europea és la Directiva 2000/60/CE, que detalla les actuacions a nivell comunitari en l'àmbit de la política d'aigües. A partir d'aquesta norma, han derivat una sèrie de normes subsidiàries que fixen els límits legals màxims de contaminants en el medi aquàtic. Aquesta Directiva conté una llista de 33 contaminants prioritaris que presenten un risc elevat pels éssers vius del medi aquàtic, entre la qual no es troben ni el TCE ni el PCE (Decisió 2455/2001/CE). Existeix una nova Directiva sobre contaminació d'aigües superficials (2008/105/CE), que va entrar en vigor el 13/01/2009, però que encara no ha estat transposada als estats membres i per tant, encara no s'està aplicant. Aquesta nova Directiva també conté una llista de contaminants prioritaris, i el TCE i el PCE tampoc hi són presents, però si es troben regulats dins aquesta Directiva en la Norma de Qualitat Ambiental expressada com a valor mig anual (NCA-MA), que fixa un valor límit de 10 µg/L per cadascun d'aquests composts en aigües superficials.

D'altra banda, la presència de TCE i PCE en aigües subterrànies sí es troba regulada pel Real Decreto 1514/2009, on es troben incloses en una llista de substàncies per les quals s'han d'establir uns nivells màxims de contaminació a partir d'una l'avaluació detallada en cada cas.

Respecte a les aigües potables, l'aigua destinada a consum humà ha de tenir una concentració inferior a 10 µg/L per la suma de TCE i PCE (Real Decreto 140/2003 i Directiva 1998/83/CE). Aquesta concentració màxima permesa en aigües potables és semblant a l'establerta als EEUU, on la concentració màxima permesa en aigua per consum humà tant per TCE com per PCE és de 5 µg/L (EPA, 2002).

Respecte a les aigües residuals no domèstiques que s'aboquin als sistemes públics de sanejament, a Catalunya la concentració màxima permesa de TCE i PCE és de 400 µg/L per a cadascun d'ells (Decret 130/2003).

### Emissions a l'atmosfera

L'ús de TCE i PCE en l'activitat industrial genera emissions d'aquests compostos a l'atmosfera. Per evitar que aquestes emissions siguin nocives per la salut i causin perjudicis el medi ambient, el Real Decreto 117/2003 estableix uns límits màxims d'emissió per les indústries que utilitzen aquests compostos.

En el cas del TCE i el PCE, els límits d'emissió dependran del cabal màssic d'emissió tal com s'estableix a les següents frases de risc:

- Frases de risc R45, R46, R49, R60 o R61: 2 mg/Nm<sup>3</sup>, quan el cabal màssic de la suma dels compostos sigui major o igual a 10 g/h.
- Frases de risc R40 per a compostos orgànics volàtils halogenats: 20 mg/Nm<sup>3</sup> per un cabal màssic de la suma dels dos compostos superior o igual a 100 g/h.

D'altra banda, el Real Decreto indica que és necessari reduir les emissions mitjançant l'ús de les millors tècniques disponibles o l'ús de productes alternatius no tòxics en cas que sigui possible.

## Contaminació del sòl

Actualment no existeix una legislació vigent a la Unió Europea sobre protecció de sòls que englobi el TCE i el PCE.

A Espanya, la Llei 10/1998 de Residus fa referència en els seus articles 27 i 28 al inventari de sòls contaminats que hauran de realitzar les Comunitats Autònomes i fixa les responsabilitats de la neteja d'un sòl declarat com a contaminat. D'altra banda, a partir del Real Decreto 9/2005 queda establert la definició de sòl contaminat, s'estableix una relació d'activitats que són susceptibles de contaminar el sòl i es regulen els nivells genèrics de referència per determinar si un sòl està contaminat o no.

### **4.1.2 Processos de biodegradació de TCE**

En aquest apartat es revisen les diferents vies de degradació biològiques del contaminant escollit com a model, el TCE.

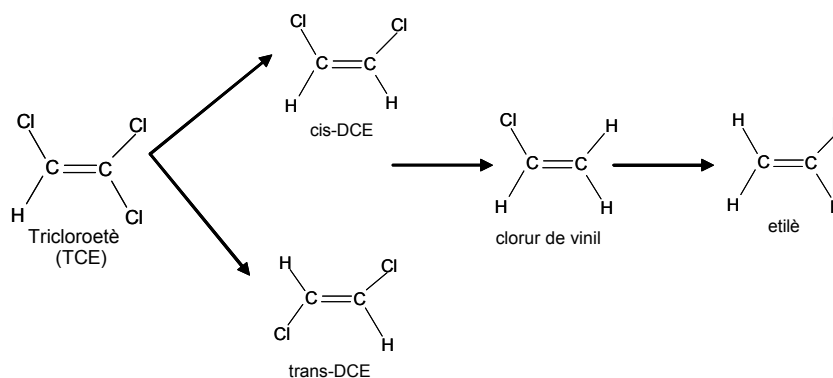
La biodegradació de TCE pot tenir lloc en condicions anaeròbies (decloració reductiva directa mitjançant dehalorespiració bacteriana o per co-metabolisme bacterià) o en condicions aeròbies (co-metabolisme bacterià, degradació mitjançant fongs ligninolítics i degradació en mamífers). Fins l'actualitat, el gruix en recerca de la degradació d'aquest compost s'ha centrat sobretot en l'acció bacteriana, tant en condicions aeròbies com anaeròbies, aïllant una gran quantitat de bacteris capaços de degradar aquest contaminant. En canvi, en condicions aeròbies mitjançant fongs, només s'ha demostrat la degradació mitjançant dues soques: *Phanaerochaete chrysosporium* (Khindaria et al., 1995; Yadav et al., 2000) i *Trametes versicolor* (Marco-Urrea et al., 2008a).

#### **4.1.2.1 Degradació bacteriana**

##### Decloració reductiva anaeròbia

La decloració reductiva de TCE consisteix en el reemplaçament seqüencial d'un àtom de clor per un àtom d'hidrogen en condicions anaeròbies fins a la formació, en alguns casos, del producte final, l'etilè, el qual es considera un compost inòcua pel medi ambient. Dels dos isòmers de DCE que es poden generar, el més comú correspon al cis-DCE, perquè el trans-DCE només es produeix ocasionalment (van

Eekert et al., 2001). Tot i això, s'han descobert casos en que es produeix el procés de dechloració reductiva per l'acció de microcosmos anaerobis i es produeix predominantment la formació de trans-DCE en lloc de cis-DCE (Griffin et al., 2004; Miller et al., 2005). El procés complet de degradació es mostra a la figura 4.4.



**Figura 4.4.** Dechloració reductiva de TCE en condicions anaeròbies.

La tendència dels hidrocarburs clorats a ser reduïts disminueix a mesura que també ho fa el nombre de clors presents a la molècula i per tant, la dechloració del cis-DCE a clorur de vinil i sobretot la del clorur de vinil a etilè són sensiblement més lentes que la dechloració del TCE (Vogel et al., 1987). Aquesta diferència entre les velocitats de degradació suposa la principal limitació del procés dechlorador reductiu, perquè en una majoria de les situacions el procés no es produeix de forma completa i es pot produir una acumulació important en el medi de cis-DCE i sobretot de clorur de vinil com s'ha comprovat en diferents estudis d'ambients contaminats amb TCE que es troben en condicions anaeròbies (Freedman i Gossett, 1989; Mohn i Tiedje, 1992). Aquests dos compostos es consideren tòxics i el clorur de vinil també es considera carcinogènic.

#### *Bacteris haloinspiradors degradadors de TCE*

En el cas de la via directa de degradació de TCE, aquesta es porta a terme mitjançant els bacteris haloinspiradors que utilitzen el TCE com a acceptor d'electrons per a recolzar el seu creixement i depenent del bacteri utilitzen un donador d'electrons diferent.

Els bacteris haloinspiradors de TCE provenen de 4 grups filogenètics diferents. A la taula 4.2 es mostren les diferents espècies bacterianes degradadores de TCE i PCE, agrupades en els diferents grups filogenètics, amb els donadors d'electrons que utilitzen pel procés i el producte final que es produeix. Entre tots els bacteris només els

del gènere *Dehalococcoides* són capaços de degradar TCE i PCE fins a etilè. Dins aquest gènere, la primera soca que es va isolar va ser *Dehalococcoides ethenogens* 195 (Maymo-Gatell et al., 1997) i en aquest cas, només es pot produir la decloració completa fins a etilè si el TCE o PCE es troba present durant tot el procés, perquè el clorur de vinil no és utilitzat per aquesta soca com a substrat de creixement i només es pot degradar si és co-metabolitzat en presència dels etens amb major cloració. Tot i això, la presència d'una elevada concentració de TCE o PCE al medi inhibeix la decloració del clorur de vinil mitjançant aquesta soca bacteriana (Maymo-Gatell et al., 2001). Depenent del gènere bacterià, els requeriments pels donadors d'electrons varien. Hi ha gèneres més restrictius com *Dehalococcoides* o *Dehalobacter* que només utilitzen H<sub>2</sub> com a donador d'electrons. En canvi, hi ha altres gèneres, com *Desulfitobacterium* o *Sulfurospirillum*, que són més versàtils i són capaços de degradar TCE o PCE en presència de diferents donadors d'electrons. Els bacteris pertanyents als gènere *Desulfuromonas* són els únics bacteris aïllats fins al moment capaços de degradar TCE en presència d'acetat com a donador d'electrons (Krumholz et al., 1996; Krumholz, 1997; Sung et al., 2003)

**Taula 4.2.** Exemples de bacteris haloinspiradors que utilitzen TCE i/o PCE com a acceptor d'electrons.

Bacteri	Acceptors d'electrons clorats <sup>1</sup>	Donadors d'electrons	Acceptors d'electrons no clorats	Productes de declaració del PCE/TCE	Referència
<b>Firmicutes</b>					
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> TCE-1	PCE, TCE	H <sub>2</sub> , format, lactat, piruvat, etanol, butirat, etanol, serina	Nitrat, fumarat, sulfit, tiosulfat	cis-DCE	Gerritse et al., 1999
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> PCE-S	PCE, TCE	H <sub>2</sub> , format, piruvat, extracte de llevat	Fumarat, sulfit	cis-DCE	Miller et al., 1997
<i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE-1	PCE, Cl-OH-FA, 2,4,6-TCF, 2,4-DCF, 2-CF.	H <sub>2</sub> , format, lactat, piruvat, etanol, butirat, succinat, serina	Fumarat, sulfit, tiosulfat, cisteat, isetionat	TCE	Gerritse et al., 1996
<i>Desulfitobacterium</i> sp. Y51	PCE, TCE, HCA, PCA, TCA, hepta-CPA	Format, lactat, piruvat	Fumarat, nitrat, sulfit	cis-DCE	Suyama et al., 2002
<i>Dehalobacter restrictus</i> TEA	PCE, TCE	H <sub>2</sub>	Cap	cis-DCE	Wild et al. 1997
<i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	PCE, TCE	H <sub>2</sub>	Cap	cis-DCE	Holliger et al., 1998
<b>Proteobacteri δ</b>					
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> TT4B	PCE, TCE	Acetat, piruvat	Fumarat, Fe(III), sulfur	cis-DCE	Krumholz, 1996 i 1997
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> BB1 i BRS1	PCE, TCE	Acetat, lactat, piruvat, succinat, malat, fumarat	Fumarat, malat, Fe(III), sulfur	cis-DCE	Sung et al., 2003
<b>Proteobacteri ε</b>					
<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	PCE, TCE	Piruvat, lactat, etanol, format, glicerol, H <sub>2</sub>	Nitrat, fumarat, arsenat, selenat	cis-DCE	Scholz-muramatsu et al., 1995
<i>Sulfurospirillum haloinspirans</i>	PCE, TCE	H <sub>2</sub> , format, lactat, piruvat	Fumarat	cis-DCE	Luijten et al., 2003
<b>Verds no del sofre</b>					
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	PCE, TCE, cis-DCE, 1,1-DCE, 1,2-DCA	H <sub>2</sub>	Cap	Etè (CV) <sup>2</sup>	Maymó-Gatell et al., 1997
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> FL2	TCE, cis-DCE, trans-DCE	H <sub>2</sub>	Cap	Etè (CV) <sup>2</sup>	He et al., 2005

<sup>1</sup> Cl-OH-FA: 3-cloro-4-hidroxifenil acetat, TCF: triclorofenol, DCF: diclorofenol, DCE: dicloroetà, DCA: dicloroetà, CV: clorur de vinil, HCA: hexacloroetà, PCA: pentacloroetà, TCA: tricloroetà, CPA: cloropropà. / <sup>2</sup> El subproducte de degradació per haloinspiració és el CV, i la posterior reducció de CV fins a etè és produïda co-metabòlicament i a una velocitat més lenta.

### *Degradació anaeròbia per co-metabolisme*

Pel que fa a la degradació anaeròbia de TCE per co-metabolisme, aquesta es produeix de forma fortuïta perquè els bacteris generen els enzims responsables de la degradació d'aquest contaminant per la presència d'altres compostos al medi que actuen com a substrats primaris i no per la presència del contaminant halogenat. Aquest procés de degradació té lloc a una velocitat més lenta que la dechloració reductiva per via directa perquè els bacteris no creixen pel consum dels cloroetens i tampoc guanyen energia amb el procés de degradació. És important comentar que la majoria de gèneres bacterians aïllats són capaços de degradar PCE fins a TCE però no fins als etens menys clorats. Aquests és el cas de gran part dels metanògens, del gènere *Methanosarcina*, que són els primers bacteris degradadors per co-metabolisme que es van aïllar i que utilitzen principalment metanol com a substrat donador d'electrons (Jablonski i Ferry, 1992; El Fantroussi et al., 1998), i també els bacteris acetogènics, com *Acetobacterium woodii* i *Sporomusa ovata* (Terzenbach i Blaut, 1994), són capaços de transformar PCE en TCE. Però dins del gènere *Methanosarcina* també existeix alguna soca, com és el cas de *Methanosarcina* FR, que és capaç de dechlorar completament PCE amb metanol com a substrat primari (Cabirol et al., 1998) i *Methanosarcina termophila* que és capaç de reduir el TCE als diferents isòmers de DCE, a clorur de vinil i a etè (Jablonski i Ferry, 1992).

### *Degradació de TCE en cultius d'enriquiment anaerobi*

Hi ha un gran nombre d'estudis que s'han portat a terme amb cultius d'enriquiment anaerobi on creixen els microorganismes especialitzats en la dechloració de TCE fins a cis-DCE (Garant i Lynd, 1996; Kengen et al., 1999) o etilè (Tandoi et al., 1994; Nielsen i Keasling, 1999). D'una banda, en els casos en que s'ha observat una major velocitat de degradació dels contaminants, es pot deduir que els cultius d'enriquiment es beneficien del procés de dechloració reductiva. D'altra banda, la formació de diferents productes finals en els diferents cultius d'enriquiment indiquen que hi ha diferents microorganismes involucrats en la degradació depenent de l'ambient en que els cultius s'han originat.

Respecte als processos de degradació de TCE mitjançant bacteris anaerobis, el fet que es pugui produir l'acumulació de subproductes de degradació més tòxics que el TCE, com són el cis-DCE i el clorur de vinil, provoca que, en molts casos, no siguin processos recomanables per la seva aplicació en bioremeiació *in-situ*.



### Degradació co-metabòlica de TCE en condicions aeròbies

La degradació de TCE per bacteris aerobis només és possible com a procés co-metabòlic, perquè fins al moment no s'ha aïllat cap soca bacteriana capaç de degradar TCE per via directa utilitzant-lo com a substrat primari pel seu creixement i guany d'energia. En canvi, sí s'han aïllat soques capaces de degradar cis-DCE (Bradley i Chapelle, 2000; Coleman et al., 2002) i clorur de vinil (Verge et al., 2002) en condicions aeròbies utilitzant-los com a substrats primaris.

Existeix una important varietat de bacteris capaços de degradar TCE per co-metabolisme en condicions aeròbies utilitzant com a substrats primaris compostos com metà, amoníac, fenol, toluè i propà (Semprini, 1997; Alvarez-Cohen i Speitel, 2001; Arp et al., 2001). En la majoria de casos els enzims responsables del procés de degradació són les monooxigenases que es troben implicades en l'oxidació del substrat primari, però també es pot produir la degradació mitjançant microorganismes que expressen certes dioxigenases, com la toluè dioxigenasa de *Pseudomonas putida* F1 (Wackett i Gibson, 1988). La degradació del TCE es produeix per la reducció de l'O<sub>2</sub> a partir de la introducció d'un àtom (monooxigenasa) o dos àtoms d'oxigen (dioxigenasa) en el substrat primari i en el contaminant per co-metabolisme. Les monooxigenases requereixen un reductor per reduir el segon àtom d'oxigen a H<sub>2</sub>O, mentre que per a les dioxigenases no és estrictament necessari perquè el dos àtoms d'oxigen es redueixen al incorporar-se al substrat.

Els organismes degradadors de TCE es distingeixen en funció del substrat de creixement requerit per expressar l'oxigenasa degradadora. Tanmateix, la majoria d'aquests bacteris són capaços de créixer utilitzant varis substrats, alguns dels quals podrien estimular també l'expressió de l'oxigenasa degradadora de TCE. A més a més, un mateix substrat pot induir enzims substancialment diferents en altres bacteris. A la taula 4.3 es pot observar la varietat de bacteris degradadors de TCE per co-metabolisme aerobi.

**Taula 4.3.** Exemples de bacteris degradadors de TCE per co-metabolisme aerobi.

Substrat de creixement	Bacteri	Enzim	Velocitat d'oxidació de TCE <sup>1</sup>	Velocitat d'oxidació del substrat <sup>1</sup>	Referència
Etilè/Propilè	<i>Xanthobacter</i> Py2	Alquè monooxigenasa	8,6 16-95	92 116	Ensign et al., 1992 Reij et al., 1995
Propilè	<i>Rhodococcus corallinus</i> B-276	Alquè monooxigenasa	2,4	59	Saeki et al., 1999
Amoni	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Amoni monooxigenasa	10,9	700-1700	Bedard i Knowles, 1989 Ely et al., 1995
Fenol i 2,4-diclorofenoxiacetat	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP 134	Fenol hidroxilasa	0,2		Harker i Kim, 1990
		2,4-diclorofenol hidroxilasa	0,06		Harker i Kim, 1990
Butà	<i>Pseudomonas butanovora</i>	Butà monooxigenasa			Hamamura et al., 1997
Propà	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB-5	Propà monooxigenasa			Wackett i Householder, 1989
Metà	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	Metà monooxigenasa particulada	4,1	82	DiSpirito et al., 1992
Metà	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	Metà monooxigenasa soluble	37,5		Oldenhuis et al., 1991
Metà	<i>Methylomonas methanica</i> 68-1	Metà monooxigenasa soluble	38,8		Koh et al., 1993
Toluè	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Toluè dioxigenasa	8		Heald i Jenkins, 1994
			1,8		Leahy et al., 1996
			0,5	65,2	Sun i Wood, 1996
Toluè	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Toluè 2-monooxigenasa	8		Folsom et al., 1990
			9		Leahy et al., 1996
			3	7,6	Shields i Reagin, 1992
Toluè	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	Toluè 4-monooxigenasa	20		Leahy et al., 1996
			2,4	71,2	Sun i Wood, 1996
Toluè	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluè 3-monooxigenasa	2,4	11,3	Olsen et al., 1994

<sup>1</sup> Les velocitats d'oxidació estan expressades en mmol/(mg proteïna·min).

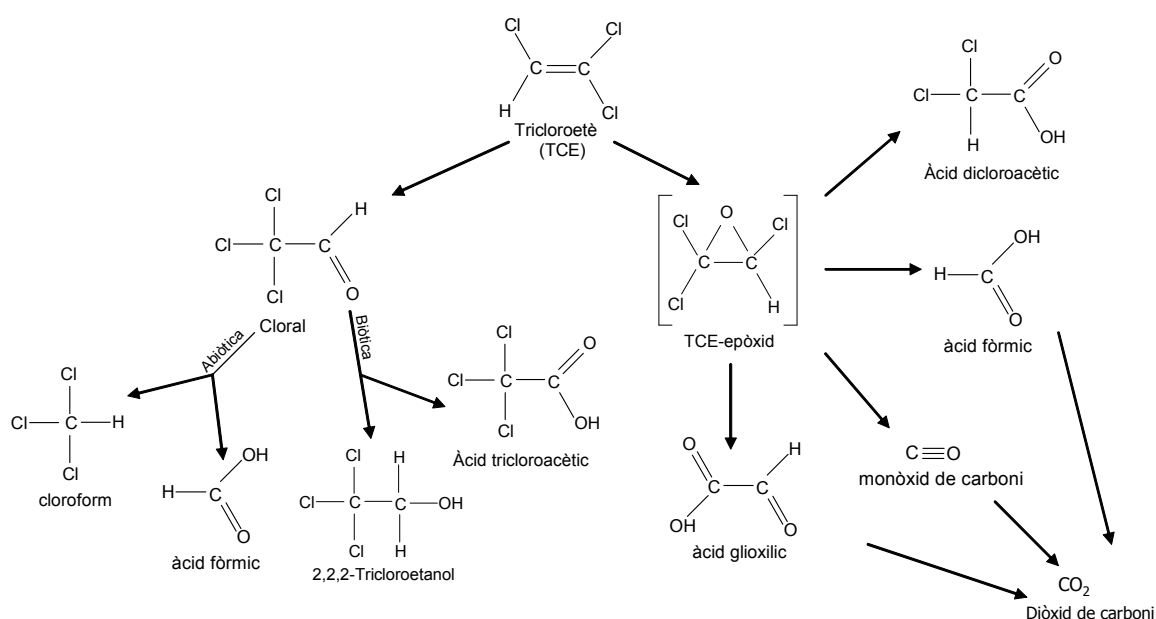
A la taula 4.3 es poden apreciar diferències en la inducció de l'activitat degradadora de TCE pels diferents bacteris. Per exemple, el bacteri oxidant d'amoni *Nitrosomonas europaea* és restrictiu en quant a l'ús d'amoni com a font d'energia pel creixement i l'expressió de l'oxigenasa no específica amb la que inicia l'oxidació de l'amoni, l'amoni monooxigenasa (AMO), és essencialment constitutiva. En contrast amb això, hi ha bacteris com *Ralstonia eutropha* que poden expressar dos enzims degradadors de TCE diferents, una fenol hidroxilasa i una 2,4-diclorofenol hidroxilasa. A partir de la taula 4.3 es poden extreure certes relacions entre les cinètiques de degradació de TCE i del substrat primari i de la cinètica segons el substrat utilitzat. D'aquesta manera, la màxima velocitat de degradació de TCE per a la majoria d'aquests bacteris és entre 10 i 100 vegades inferior a la velocitat d'oxidació dels substrats de creixement. Tanmateix, segons quin sigui el substrat de creixement, la cinètica de degradació de TCE pot variar de manera molt notable (Oldenhuis et al., 1991).

Entre tots els bacteris degradadors de TCE per co-metabolisme aïllats, el que més s'ha estudiat és el bacteri oxidador del metà *Methylosinus trichosporium* OB3b. Els enzims responsables de l'oxidació del metà en metanol són les metà monooxigenases (MMO) i també es troben implicades en la degradació de TCE. Hi ha dues formes diferents de MMO, una metà monooxigenasa soluble (sMMO) que s'expressa en condicions limitants de coure i una metà monooxigenasa particulada (pMMO) expressada en condicions de no limitació per coure. A partir d'experiments de degradació de TCE *in vitro* amb sMMO s'ha comprovat que aquest enzim és el principal catalitzador de la degradació de TCE per co-metabolisme (Fox et al., 1990).

El cas de degradació de TCE mitjançant sMMO és útil per descriure en detall el procés de degradació per co-metabolisme. En un primer pas es forma el compost intermedi TCE-epòxid (Fox et al., 1990; Van Hylckama Vlieg et al., 1996). S'ha estimat que un 94% del TCE co-metabolitzat per *Methylosinus trichosporium* OB3b es produeix a través de la formació de l'epòxid de TCE (Van Hylckama Vlieg et al., 1996). El compost TCE-epòxid té un temps de vida molt curt i es degrada formant àcid glioxílic o àcid fòrmic i monòxid de carboni (Fox et al., 1990). La formació de TCE-epòxid com a producte intermedi s'ha demostrat pel fet que s'obtenen els mateixos productes en l'experiment de degradació de TCE *in vitro* amb sMMO que per descomposició química del TCE-epòxid sintètic (Fox et al., 1990). Si la degradació es produeix de forma completa, els productes resultants de la degradació del TCE-epòxid es mineralitzen formant CO<sub>2</sub>. D'altra banda, també s'ha detectat la formació de

tricloroacetaldehid (cloral) com a producte de la co-oxidació, tant en experiments *in vivo* com *in vitro*, però no com a producte de la descomposició de TCE-epòxid, suggerint que aquest es forma per una via diferent a partir del TCE. El cloral és un producte minoritari respecte el TCE-epòxid i pot ser metabolitzat pels bacteris formant 2,2,2-tricloroetanol, àcid tricloroacètic i àcid dicloroacètic (Newman i Wackett, 1991; Saeki et al., 1999; Hashimoto et al., 2002).

En el cas de la degradació de TCE mitjançant dioxigenases s'ha demostrat que el procés de degradació segueix una altra via. Per exemple, en el cas de la toluè dioxigenasa expressada per *Pseudomonas putida*, suposadament es forma inicialment un producte intermedi amb un enllaç dioxigen-ferro. A partir d'aquest compost es pot formar àcid glioixílic o àcid fòrmic (Wackett i Gibson, 1988; Li i Wackett, 1992). A la figura 4.5 es mostra les diferents vies de degradació de TCE per co-metabolisme bacterià.



**Figura 4.5.** Vies de degradació de TCE per un bacteri aerobi que expressi enzims monooxigenases o dioxigenases.

#### 4.1.2.2 Degradació de TCE per fongs de podridura blanca

A diferència de la degradació de TCE per bacteries, on s'han aïllat una gran varietat de soques capaces de degradar aquest contaminant, ja sigui en condicions aeròbies o anaeròbies, en el cas dels fongs de podridura blanca només s'ha descrit la degradació de TCE mitjançant *Phanaerochaete chrysosporium* (Khindaria et al., 1995; Yadav et al., 2000) i *Trametes versicolor* (Marco-Urrea et al., 2008a).

### Degradació mitjançant *Phanaerochaete chrysosporium*

En el cas de la degradació de TCE amb *Phanaerochaete chrysosporium*, els dos articles publicats es contradiuen en quant als enzims implicats en la degradació del contaminant. En l'article publicat per Khindaria et al. (1995), es realitza un experiment de degradació de  $[\alpha, \beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{TCE}$  isotòpicament marcat utilitzant un medi amb alt contingut en nitrogen i un amb baix contingut. En el cas del medi amb baix contingut en nitrogen, on es produeix producció dels enzims extracel·lulars LiP i MnP, s'obté una mineralització de TCE del 20,3% en forma de  $^{14}\text{CO}_2$  per a una concentració de TCE de 10 mg/L al cap de 9 dies d'experiment. En canvi, en el medi amb alt contingut en nitrogen, on la producció dels enzims LiP i MnP es troba suprimida, no s'observa mineralització. Per tant, es dedueix que les peroxidases, i concretament l'enzim LiP, es troba implicat en la degradació de TCE.

Pel que fa a l'article publicat per Yadav et al. (2000), s'estudia la degradació de TCE en tres medis diferents per comprovar quin d'ells afavoreix més la degradació de TCE. Al cap de tres setmanes d'experiment s'obté un percentatge de degradació molt més elevat (46,2%) amb el medi d'extracte de malta que amb els medis amb alt contingut en nitrogen (14%) i baix contingut en nitrogen (6,5%). A partir d'aquests resultats, a l'article es dedueix que els enzims LiP i MnP no estan implicats en la degradació de TCE si no que hi estaria implicat un altre mecanisme degradador alternatiu, perquè en l'únic dels tres medis on es les peroxidases és en el de baix contingut en nitrogen i és en el que s'obté una menor degradació de TCE. Aquesta conclusió és totalment oposada a l'extreta de l'article publicat per Khindaria et al. (1995), on s'afirma que aquests enzims extracel·lulars sí estan implicats en la degradació de TCE. A més a més, en l'article publicat per Yadav et al. (2000), es realitza un experiment de degradació de ( $^{14}\text{C}$ -TCE) isotòpicament marcat en medi d'extracte de malta i s'obté una mineralització d'un 38,5% del TCE total inicial, que implica que un 83,3% del TCE degradat es mineralitza si es compara el percentatge de degradació obtingut en l'altre experiment amb extracte de malta i per tant, només una petita es transforma en un altre producte de degradació de degradació que no sigui  $\text{CO}_2$ . D'altra banda, en aquest article es testen diferents concentracions inicials de TCE (5, 10, 15, 20, 50, 75 i 100 mg/L) i s'observa que el percentatge de degradació de TCE va disminuint a mesura que s'augmenta la concentració inicial de TCE, des d'una degradació del  $36,2\pm 4,8\%$  per a 5 mg/L inicials fins a una degradació del  $6,5\pm 1,0\%$  per a 100 mg/L inicials. Pel que fa a l'efecte de la concentració inicial de TCE sobre el creixement de la biomassa es pot considerar relativament insignificant excepte en el

cas de la concentració de TCE més elevada, on es produeix un lleugera inhibició del creixement de la biomassa.

#### Degradació mitjançant *Trametes versicolor*

La degradació de TCE mitjançant *Trametes versicolor* ha estat demostrada a partir d'un treball d'investigació previ al nostre grup de recerca. A l'article publicat per Marco-Urrea et al. (2008a) es detallen els resultats de degradació obtinguts i es proposa una via de degradació.

En aquest article s'estudia la degradació de TCE a diferents concentracions inicials de contaminant, des de 2 mg/L fins a 20 mg/L, i a la taula s'obtenen percentatges de degradació significatius en tots els casos per a un temps experimental de 14 dies, tot i que s'observa com el percentatge de degradació de TCE disminueix progressivament a mesura que augmenta la concentració inicial de TCE. Pel que fa al pes sec de biomassa, no s'observa un efecte important de la concentració inicial de TCE sobre aquest paràmetre. En aquests experiments es calcula, a partir de l'anàlisi de la concentració d'ions clorur al medi, que un 53% del TCE degradat és declora completament.

**Taula 4.4.** Efecte de la concentració inicial de TCE en la seva degradació i en el pes sec de cultius de *T. versicolor* en medi definit (Marco-Urrea et al., 2008a).

Concentració inicial TCE (mg/L)	% Degradació TCE	Pes sec miceli (mg)
2	88 ± 10	25,7
5	84 ± 2	25,5
10	74 ± 4	24,9
15	67 ± 8	22,9
20	47 ± 6	22,3

D'altra banda, a partir d'un experiment de degradació de [<sup>13</sup>C]-TCE isotòpicament marcat s'observa un augment important de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> per a un temps de 21 dies, el qual significa que una part del TCE degradat es mineralitza, i en anàlisis per RMN es detecta la formació de 2,2,2-tricloretoanol, el qual suposa la primera evidència de la formació d'aquest compost a partir de la degradació de TCE mitjançant qualsevol tipus de soca de fong. A diferència del TCE, el 2,2,2-tricloretoanol no és considerat un producte carcinogènic i aquest fet suposa un avantatge respecte al procés de decloració reductiu on en molts casos es produeix l'acumulació de clorur de vinil, que és un compost carcinogènic, i de cis-DCE, que és un compost tòxic. A partir dels

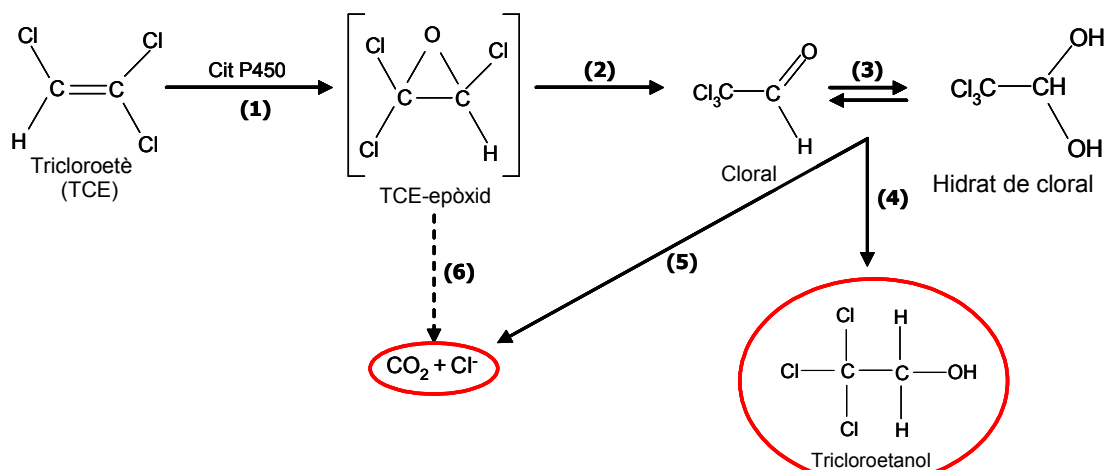
productes de degradació obtinguts, es pot comprovar que tots els ions clorur alliberats al medi provenen de la transformació de TCE en CO<sub>2</sub>, perquè el 2,2,2-tricloretranol reté els tres àtoms de clor a la seva estructura.

Respecte a l'enzim implicat en la degradació de TCE, es comprova que l'enzim extracel·lular lacasa no està implicat en el primer pas de degradació del TCE després de realitzar un experiment de degradació de TCE *in vitro* amb lacasa comercial en presència i absència de mediadors i no obtenir degradació del contaminant en cap cas.

D'altra banda, es suggereix que l'enzim citocrom P450 es troba implicat en el primer pas de degradació de TCE, perquè en cultius amb presència del compost 1-aminobenzotriazole (ABT), un compost conegut per ser inhibidor del citocrom P450, no s'obté degradació de TCE a diferència del que succeeix en els cultius en absència d'ABT, on s'obté una degradació important de TCE. La implicació d'aquest enzim en la degradació d'aquest compost pel fong es troba confirmada també pel fet que en articles publicats amb anterioritat, s'observa la formació de 2,2,2-tricloretranol i CO<sub>2</sub> producte de l'oxidació de TCE pel sistema degradador de citocrom P-450 en mamífers (Goeptar et al., 1995; Bloemen et al., 2001). D'altra banda, els resultats obtinguts respecte la implicació del citocrom P-450 concorden amb altres articles publicats de degradació de compostos xenobiòtics amb fongs on també es demostra la implicació d'aquest enzim en la degradació de contaminants (Cerniglia, 1997; Mori et al., 2003; Van Hamme et al., 2003).

Respecte a la via de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor*, es suggereix la formació de cloral com a producte intermedi degut a que s'ha demostrat, per una banda, la formació d'aquest compost com a producte intermedi en el procés de degradació de TCE en mamífers (Lash et al., 2000) i que en experiments de degradació de cloral comercial per cultius de *T. versicolor* es formen com a productes 2,2,2-tricloretranol i ions clorur, els quals indicarien la mineralització d'una part del cloral degradat (Marco-Urrea et al., 2008a). Aquests experiments mostren que la proporció entre les concentracions d'aquests productes depèn de la concentració inicial de cloral i que la formació de 2,2,2-tricloretranol es veu afavorida per altes concentracions inicials d'aquest compost. Referent a l'enzim implicat en la degradació del cloral es suggereix que ni la lacasa ni el citocrom P-450 estan implicats en la seva degradació, perquè no s'obté degradació de cloral en experiments *in vitro* amb lacasa comercial ni en presència ni en absència de mediadors i d'altra banda, s'obté un percentatge de degradació molt semblant en els experiments de degradació del cloral amb cultius de

*T. versicolor* amb presència i amb absència de l'inhibidor ABT. Per tant, aquests resultats indiquen un altre sistema enzimàtic del fong estaria implicat en aquesta segon pas del procés de degradació de TCE. A la figura 4.6 es mostra la via de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor*.



**Figura 4.6.** Via de degradació del TCE mitjançant *T. versicolor* (Marco-Urrea et al., 2008a).

La via de degradació de TCE descrita per a *T. versicolor* té una gran similitud amb una de les vies descrites en mamífers, la que correspon a l'oxidació pel citocrom P450. Respecte a aquesta via de degradació, existeix certa controvèrsia respecte al metabòlit que es forma en el primer pas de la degradació de TCE, on es troba implicat el citocrom P450. Hi ha certs estudis que proposen la formació d'un epòxid, tal com suposadament succeeix en la degradació mitjançant el fong, el qual donaria lloc a la formació de clorurs d'acil, que serien posteriorment hidrolitzats fins als corresponents àcids, o bé podrien formar aldehyds que serien oxidats fins a àcids carboxílics o reduïts fins a alcohols. La presència d'hidrat de cloral, 2,2,2-tricloroetanol, els quals també es detecten en el procés de degradació mitjançant el fong, i àcid tricloroacètic com a metabòlits majoritaris de la degradació de TCE en mamífers es troba en consonància amb aquesta hipòtesi inicial (Goepfert et al., 1995; Bloemen et al., 2001). D'altra banda, existeixen estudis que dubten de la formació de l'epòxid de TCE, pel fet que el grup hemo del citocrom P450 és destruït durant el procés d'oxidació del TCE, i l'epòxid no destrueix aquest grup (Miller i Guengerich, 1982). Per aquesta raó, es proposa que la majoria de TCE passaria a una molècula TCE-450 oxigenada (TCE-O-P450) que donaria lloc a la formació d'hidrat de cloral, que es troba en equilibri amb el cloral i que es transformaria en diferents productes (Lash et al., 2000), entre ells 2,2,2-tricloroetanol, tal com s'observa a la figura 4.7, on també es troba inclosa la via de degradació a través del TCE-epòxid.





les mateixes condicions prèvies al procés de contaminació. Però al cap d'un temps d'aplicar aquesta tècnica, els científics van adonar-se que en la majoria de casos era necessari el bombeig d'una quantitat d'aigua molt més elevada del que estava planificat per restaurar completament un aqüífer contaminat amb solvents clorats, amb el consegüent augment en les despeses i de temps de tractament que això comporta (Mackay i Cherry, 1989; Travis i Doty, 1990). Per tant, un cop es va comprovar les dificultats que suposava realitzar la descontaminació d'un aqüífer amb un gran volum d'aigua en condicions ex-situ, l'esforç de la investigació en el camp de la remeiació d'ambients contaminats amb solvents clorats es va centrar sobretot en el desenvolupament de diferents tècniques que permetessin un tractament in-situ dels contaminants, sobretot en el camp dels tractaments químics i biològics, i que fossin més eficients i econòmics que el tractament de *pump-and-treat*. En aquest apartat es mostra una visió general dels principals tractaments de remeiació desenvolupats fins al moment per a l'eliminació de TCE, classificats en tres grans grups diferents segons la naturalesa dels processos emprats: tractaments físics, tractaments químics i tractaments biològics.

#### **4.1.3.1 Tractaments físics**

Els tractaments físics impliquen l'ús de tècniques o mètodes basats en les propietats físiques dels dissolvents clorats presents a les aigües subterrànies contaminades per provocar la seva transferència des del medi líquid a un altre medi, generalment a la fase gas mitjançant la seva volatilització per ser posteriorment tractat. Entre els tractaments dels vapors de TCE generats a partir del tractament físic previ s'inclouen la condensació, l'adsorció per carboni, l'oxidació tèrmica i la biodegradació.

En el cas dels etens clorats, els tractaments físics són més senzills d'aplicar respecte a altres contaminants presents en aigües subterrànies a causa de la seva alta volatilitat. En aquest apartat es presenten diferents exemples de tractaments físics que s'utilitzen per a la remeiació d'aqüífers contaminats amb TCE: l'extracció multifase, l'aeració in-situ, l'extracció per vapor i el tractament per *pump-and-treat*.

L'extracció multifase és un tractament que consisteix en aplicar una pressió de buit elevada al subsòl i a les aigües subterrànies per extreure simultàniament el contaminant present als espais buits del sòl i a l'aigua subterrània tot separant-lo de la fase aquosa per poder ser tractats posteriorment (EPA, 1997). En el cas del TCE, aquesta tècnica és eficaç perquè aquest compost té una constant de Henry elevada

(Taula 4.1) i per tant, s'evapora amb facilitat si s'aplica una pressió de buit. Cal tenir en compte que aquesta tècnica requereix d'un procés previ de detecció de la situació de la ploma de contaminació de TCE en l'aqüífer per a poder separar la fase orgànica de la fase aquosa de forma eficaç. Aquest tractament és idoni per aquífers amb un volum reduït d'aigua.

L'aeració in-situ consisteix en fer circular un corrent d'aire o oxigen a través de l'aigua subterrània per tal de transferir els contaminants clorats de la fase líquida a la fase gas, procés que es veu afavorit per l'alta volatilitat del TCE. Posteriorment, els dissolvents clorats presents a la fase gas poden ser extrets per sistemes de vapor i ser tractats posteriorment. En alguns casos, l'aeració in-situ també pot afavorir la degradació microbiana de TCE si juntament amb aire o oxigen es fan circular composts que siguin co-substrats del procés de degradació aerobi mitjançant bacteris (Semprini, 1997). El principal desavantatge del l'aeració in-situ és que si aquesta no s'aplica amb precaució, pot afavorir la dispersió de la ploma de contaminació en l'aigua subterrània augmentant l'àrea contaminada i dificultant més la possible remeiació del medi .

L'extracció per vapor implica la injecció de vapor en el medi provocant un augment de temperatura de la zona contaminada, augmentant d'aquesta manera la pressió parcial de vapor del TCE i forçant que aquest es transfereixi de la fase líquida a la fase gas. A més a més, la mobilitat del contaminant en el medi també augmenta i disminueix la seva viscositat, fets que també afavoreixen al pas del compost clorat de la fase líquida a la fase gas. El principal avantatge d'aquest tractament és que la capacitat calorífica del vapor és relativament gran i proporciona més calor que la injecció d'aire calent. Entre les limitacions de la seva aplicació in-situ hi ha la seva dependència de la textura del sòl, donat que grandàries de porus petites impedeixen la penetració del vapor. També cal tenir en compte l'heterogeneïtat geològica del subsòl, que pot provocar que el flux de vapor derivi cap a altres vies preferencials.

El tractament de *pump-and-treat* és el tractament més usat per a descontaminar aquífers contaminats amb dissolvents clorats i tal com s'ha comentat anteriorment, va ser la primera tècnica de remeiació que es va utilitzar. Aquest tractament consisteix en bombejar l'aigua contaminada de l'aqüífer a través d'un o més pous fins a la superfície, on es tracta el corrent líquid per retornar-lo posteriorment a l'aqüífer un cop descontaminat amb èxit. Els principals desavantatges d'aquest tractament s'han comentat anteriorment i es refereixen a les dificultats de tractar un gran volum d'aigua

contaminada i que en ocasions, les concentracions residuals d'etens clorats mesurades un cop es retorna el corrent tractat a l'aquífer segueixen sent superiors al límit legal permès.

#### 4.1.3.2 Tractaments químics

Els processos químics impliquen la transformació del contaminant clorat a tractar mitjançant la seva oxidació o reducció a partir d'una reacció química. Els tractaments es poden classificar en tractaments d'oxidació química i de reducció química.

##### Tractaments d'oxidació química

Si es disposa d'un compost oxidant adequat, la majoria dels compostos orgànics es poden oxidar a  $\text{CO}_2$  i aigua. Els tractaments d'oxidació química es diferencien en si s'utilitza un reactiu amb un alt poder d'oxidació per reaccionar directament amb el contaminant, per exemple amb  $\text{KMnO}_4$  o  $\text{O}_3$ , o si s'utilitza un reactiu per generar radicals hidroxils, els quals són altament oxidants i reaccionen amb el contaminant. Entre els tractaments d'aquest segon grup es troben els tractaments amb ozó ( $\text{O}_3$ ) a pH elevat,  $\text{O}_3$  combinat amb peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  combinat amb radiació de llum ultraviolada i el procés Fenton químic entre d'altres.

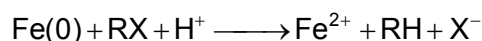
Els tractaments per oxidació directa es solen realitzar in-situ mitjançant pous d'injecció. Com que els oxidants que s'utilitzen no són selectius, aquests reaccionen amb tots els compostos presents al medi i en molts casos, la demanda de reactiu oxidant dependrà més de la concentració de carboni orgànic total present al medi que de la concentració de contaminant.

Entre els reactius utilitzats per a portar a terme reacció d'oxidació directa en aquífers, el  $\text{KMnO}_4$  és el més prometedor i funciona bé per degradar TCE i PCE. En aquest cas, la reacció té lloc si el pH del medi es troba entre 3 i 10 i els productes que es formen a causa de la reacció d'oxidació de TCE amb  $\text{KMnO}_4$  són  $\text{CO}_2$ , ions clorur, clor gas, el qual pot reaccionar amb aigua formant  $\text{HClO}$ ,  $\text{HCl}$ , manganès dissolt i precipitat de  $\text{MnO}_2$ . Les principals limitacions d'aquest reactiu són la disminució del pH del medi a causa del procés de reacció i la solubilització d'alguns metalls a causa de l'alliberació de protons al produir-se la reacció d'oxidació. Respecte a l' $\text{O}_3$ , el permanganat potassi disposa de certes avantatges com una major solubilitat en aigua i un major temps de vida mitja.

El procés Fenton és el resultat del procés de reacció entre el peròxid d'hidrogen i l'ió ferrós ( $\text{Fe}^{2+}$ ) per produir radicals hidroxils que degraden el TCE. A partir dels estudis realitzats a escala laboratori, s'ha comprovat que aquest procés presenta certs inconvenients com són la seva dependència del pH, perquè la reacció només pot tenir lloc si el pH es troba entre 3 i 6, el qual implica que és necessari mantenir un pH àcid en el medi perquè tingui lloc la reacció, aspecte molt complicat en un aqüífer real (Georgi et al., 2007). A més a més, el procés també té una forta dependència de la concentració de ferro present en el lloc d'aplicació, i no és fàcil fer arribar el peròxid d'hidrogen fins a l'aqüífer al tenir un temps de vida molt curt i descomposar-se a pocs metres de la seva injecció. D'altra banda, presenta certs avantatges com són la producció de compostos de degradació innocuos, com són  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$  i sals, i els reactius a utilitzar són barats i no perillosos (Liang et al., 2007).

#### Tractaments de reducció química

La decloració dels etens clorats es pot produir mitjançant la seva reducció per un metall de valència zero, com per exemple Ferro. Amb aquest metall, la reacció que té lloc és la següent:



A l'hora d'aplicar aquest tractament in-situ, normalment s'utilitzen barreres reactives permeables que contenen  $\text{Fe}(0)$  al seu interior, on té lloc la reacció de reducció de TCE. Les principals limitacions d'aquest tractament són la profunditat de les barreres que dificulta el contacte entre el ferro i el contaminant, la pèrdua d'eficiència del metall per la seva corrosió a causa del procés de deshalogenació i sobretot per la producció d'hidrogen gas a partir d'aigua que reacciona amb el  $\text{Fe}(0)$ , provocant la disminució de la velocitat de reacció. Si s'utilitza el pal·ladi a més a més del ferro com a catalitzador del procés de reacció, s'obté una major eficiència de degradació de TCE (Cho i Choi, 2010), però l'elevat preu d'aquest metall fa que actualment no sigui un tractament econòmicament viable per remediació in-situ. Aquest tractament ha estat aplicat de manera efectiva per degradar TCE en tractaments d'aigües, i sovint s'ha combinat amb altres tècniques com la bioremediació o l'addició de surfactants (Janda et al., 2004; Lee et al., 2007).

#### 4.1.3.3 Tractaments biològics

La recerca iniciada a partir de principis dels anys 80 ha permès identificar diferents mecanismes de degradació biològics capaços de degradar TCE i altres etens clorats. Entre els diferents processos de degradació dels etens clorats es poden distingir entre els que es troben involucrats els bacteris en condicions anaeròbies (taula 4.2) o en condicions aeròbies (taula 4.3), i els que porten a terme els fongs de podridura blanca.

Pel que fa a l'aplicació dels processos biològics en la descontaminació d'aqüífers, aquesta és possible si les condicions hidrogeològiques i biogeoquímiques són favorables a aquests tipus de processos. Entre els diferents mecanismes de degradació, la dechloració reductiva és la que s'ha aplicat amb una major freqüència com a tractament de remeiació perquè les condicions existents en gran part dels aqüífers són principalment anaeròbies (Illman i Alvarez, 2009). Tal com s'ha comentat anteriorment, el principal desavantatge de la degradació anaeròbia de TCE és la possible acumulació de productes intermedis més tòxics que el TCE, com són el cis-DCE i clorur de vinil, com a resultat del procés de degradació. Si la degradació té lloc de forma completa el producte de degradació és l'etilè, que és considerat com a no tòxic. Segons quin bacteri sigui el responsable de la degradació de TCE, és produirà acumulació de productes intermedis o no (taula 4.2). Per tant, si s'aplica un tractament biològic en condicions anaeròbies és molt important realitzar un estudi previ per comprovar que les condicions de l'aqüífer fan possible l'aplicació d'aquest tractament.

Entre tots els tractaments biològics existents, el que suposa una ingerència menor de l'acció humana en el medi natural és l'atenuació natural monitoritzada (ANM). Aquest tractament consisteix en l'acció d'una sèrie de processos físics, químics i biològics que, sota condicions favorables, actuen sense la intervenció de l'home per reduir en un aqüífer la concentració d'un o més contaminants i per tant, la seva toxicitat. Els processos que poden estar involucrats són la biodegradació, la dispersió, la dilució, la sorpció, la volatilització i els processos biològics o químics d'estabilització, transformació o destrucció del contaminant. (EPA, 1999). Entre tots aquests processos el que té una major importància és la biodegradació i els microorganismes capaços de degradar TCE només es troben en medis amb unes condicions concretes i per tant, no és possible aplicar amb èxit l'ANM a qualsevol aqüífer contaminat amb TCE. Per tant, com s'ha comentat anteriorment, és necessari realitzar un estudi molt acurat per poder determinar si aquest tractament serà efectiu per descontaminar un aqüífer concret o no.

Hi ha diferents exemples de l'aplicació de ANM amb resultats de degradació molt positius en aigües subterrànies contaminades per TCE (Witt et al., 2002; Newell et al., 2006; Wymore et al., 2007).

En el cas que l'ANM no sigui suficientment eficient per degradar el TCE d'un aquífer fins a concentracions per sota el límit legal, és necessari la utilització d'un tractament amb un major intervenció de l'home. Existeixen dos possibles tractaments per aplicar: la bioestimulació i la bioaugmentació.

La bioestimulació consisteix en la introducció en el medi dels substrats necessaris, nutrients o donadors i acceptors d'electrons, per afavorir el creixement dels microorganismes nadius i com a conseqüència, la degradació del TCE per part d'aquests. Pel que fa als nutrients, les fonts principals són nitrogen, fòsfor i altres elements traça necessaris per al creixement dels bacteris. Respecte als donadors d'electrons, aquests s'afegeixen en el cas de que es produeixi la dechloració reductiva, perquè actuïn de reductors en la reacció de degradació de TCE. El compost més utilitzat com a donador d'electrons és l'hidrogen (Yang i McCarty, 1998). Aquest es pot addicionar en preparats com el *Hydrogen Release Compound* (HRC) que són altament insolubles i que per tant alliberen l'hidrogen de forma lenta, o mitjançant substrats més solubles i que alliberen l'hidrogen més ràpidament, com són el lactat, les molasses o l'àcid làctic. El principal problema respecte a l'addició dels donadors d'electrons és la possible competència per l'assimilació d'aquests compostos del bacteris metanògens i homoacetògens presents al medi respecte els bacteris halogenadors. Respecte a aquest fet, s'ha estudiat que en el cas de remeiació d'aquífers amb una elevada concentració d'etens clorats, propera a la de saturació, els bacteris metanògens i homoacetògens es veuen inhibits pels compostos clorats en el seu creixement, però no així els bacteris dehalogenadors, i per tant, aquests últims es veuen afavorits en aquestes condicions i per una banda, s'augmenta l'eficiència d'utilització dels donadors d'electrons i per altra banda, és possible utilitzar varietat més gran de substrats com a donadors d'electrons (Yang i McCarty, 2000). En els processos de degradació aeròbica s'utilitza habitualment oxigen com a acceptor d'electrons i en condicions anaeròbiques l'ordre de preferència seria els nitrats, manganès (IV), ferro (III), sulfat i en últim lloc, el diòxid de carboni. Depenent dels objectius de la remeiació i de les característiques del medi a descontaminar, la solubilitat i la viscositat del substrat són dos paràmetres importants a tenir en compte a l'hora de l'elecció del substrat a utilitzar.

La bioaugmentació consisteix en la introducció de microorganismes amb unes habilitats catabòliques específiques conegudes per degradar un contaminant determinat en un ambient contaminat per complementar a la població microbiana indígena perquè tingui lloc el procés de degradació d'aquest compost o accelerar-lo en el cas de que ja es produís la degradació per l'acció dels microorganismes presents al medi. Un dels principals problemes de la bioaugmentació és assegurar la supervivència i l'activitat dels microorganismes inoculats al medi. Els microorganismes inoculats es poden veure inhibits per varis factors com el pH, la presència d'altres contaminants tòxics, la concentració i la biodisponibilitat dels contaminants a degradar o l'absència de co-substrats, en el cas que la reacció de degradació es produeixi per co-metabolisme (Perelo, 2010). Però el factor clau per aconseguir que la bioaugmentació sigui eficient és l'elecció de la soca de microorganisme adequada per a portar a terme la degradació de TCE. Al seleccionar la soca, s'ha de tenir en compte els microorganismes indígenes per assegurar que el microorganisme inoculat no es veurà desafavorit pels ja presents al medi (Perelo, 2010).

En el cas de la degradació anaeròbia de TCE, la bioaugmentació pot ser molt útil per evitar que es produeixi una acumulació de cis-DCE i clorur de vinil mitjançant la introducció d'una soca que declori el TCE completament fins a etilè. Fins a l'actualitat, només l'espècie *Dehalococcoides* pot portar a terme aquest procés i ja s'ha reportat en diverses ocasions la presència d'aquesta soca en un microcosmos d'un aqüífer contaminat amb TCE on es produeix el procés de dechloració complert (Hendrickson et al., 2002; Sung et al., 2006).

Respecte a l'aplicació de la bioaugmentació i la bioestimulació per a descontaminar aqüífers contaminats amb TCE, hi ha diversos articles que demostren la viabilitat d'aquests tractaments per degradar el TCE present a les aigües subterrànies fins a la seva pràctica eliminació total del medi. Per exemple, Ellis et al. (2000) van portar a terme un procés de bioaugmentació en un aqüífer contaminat amb TCE a la Base Aèria de Dover, situada a Delaware, EEUU, i mitjançant la introducció d'un cultiu bacterià conegut com *Pinella*, es va aconseguir que al cap de 509 dies, la totalitat del TCE i cis-DCE presents inicialment es transformessin en etilè. Respecte a la bioestimulació, Seemer i Banerjee (2001) van realitzar un estudi de bioestimulació d'un procés de degradació anaeròbia d'un aqüífer contaminat amb TCE a l'Aeroport Internacional de Duluth, situat a Minnesota, EEUU, i mitjançant l'addició del preparat HRC com a font d'hidrogen es va comprovar que al cap de 9 mesos el percentatge de degradació de TCE era del 99,5% per a una concentració inicial de 400 µg/L, però



comentar que en aquest cas el procés de decloració reductiva no es va produir de forma complerta, perquè es va detectar un augment de la concentració de cis-DCE (de 50 a 750 µg/L) i de clorur de vinil (de 10 a 20 µg/L).

En el cas en que el procés de decloració reductiva no es produeixi de forma complerta i hi hagi acumulació dels productes intermedis cis-DCE i clorur de vinil, existeix la possibilitat de combinar el tractament anaerobi en una primera etapa, per degradar el TCE fins a cis-DCE i clorur de vinil, amb un tractament posterior en condicions aeròbies mitjançant bacteris per transformar el cis-DCE i el clorur de vinil acumulat a productes molt menys tòxics en condicions co-metabòliques (Figura 4.5). Per exemple, Noell et al. (2009) va estudiar aquest procés en un pla pilot en una aigua subterrània situada a una planta d'emmagatzematge d'armes navals, a Dallas, EEUU, on es va realitzar inicialment un procés de bioestimulació durant un període de 163 dies dels microorganismes indígenes amb l'addició d'acetat de sodi i fosfat d'amoni al medi aquàtic, que es trobava en condicions fortament anaeròbies, i es va comprovar que a causa de la bioestimulació hi va haver un augment de la decloració de TCE amb la conseqüent acumulació de cis-DCE i clorur de vinil. A continuació, es va realitzar una aeració in-situ de l'aqüífer i es va assolir un augment de l'eliminació de cis-DCE i clorur de vinil a causa de que la velocitat de degradació d'aquests dos compostos és major en condicions aeròbies que en condicions anaeròbies.

Totes les tecnologies de biodegradació descrites prèviament poden presentar diferents configuracions alhora de ser implementades sobre el terreny:

- Injecció directa. Aquest sistema preveu l'addició de microorganismes, nutrients, oxidants o reductors directament en l'aqüífer per diferents punts d'injecció. El flux natural de l'aigua es monitorea per determinar si la degradació dels productes es produeix a diferents punts de l'aqüífer.
- Recirculació de l'aigua subterrània. S'extreu l'aigua contaminada del lloc, s'afegeixen els substrats ex-situ i aquesta es reinjecta posteriorment al subsòl. Com a alternativa, l'extracció i la injecció es poden realitzar en un mateix pou a diferents punts d'alçada, creant una circulació vertical que permet un major control de les aigües freàtiques.
- Barreres permeables reactives. Estableixen una zona de bioremediació activa farcint una rasa amb materials rics en nutrients, oxidants o reductors.

D'aquesta manera es permet la mobilitat de l'aigua freàtica impedit la del contaminant. Normalment el farciment de la barrera es barreja amb sorra o un altre material porós per tal de ser menys dens que el sòl que el rodeja i canalitzar l'aigua a través del mur per poder-lo tractar. Aquesta forma d'implementar la biodegradació en l'aqüífer és una tècnica econòmicament viable i amb percentatges d'eliminació de TCE elevats (Kao i Lei, 2000).

#### Processos en bioreactor de degradació de TCE en medi líquid

A banda de la possibilitat de realitzar tractaments biològics in-situ per degradar TCE, també existeixen varis estudis per a degradar aquest contaminant en condicions ex-situ mitjançant reactors biològics. L'aplicació en condicions reals d'aquest tipus de tractaments per a descontaminar aqüífers contaminats amb TCE encara no es porta a terme, al ser una tecnologia relativament moderna i amb importants dificultats d'operació, al tractar-se d'un compost volàtil. De fet, es treballa sobretot amb reactors d'una capacitat de volum petit, no superior a les desenes de litre, per estudiar en profunditat els diferents processos de degradació biològics en reactor i optimitzar-los de cara a una futura aplicació en el tractament d'aigües reals contaminades amb TCE.

Tenint en compte que el treball experimental d'aquest capítol es basa en el disseny i l'aplicació d'un reactor d'un volum de 2 L per a degradar TCE en condicions aeròbies mitjançant *T. versicolor*, és interessant conèixer els estudis previs existents en degradació de TCE en reactor mitjançant els diferents processos biològics.

En el cas de reactors en condicions aeròbies, els estudis publicats fins l'actualitat es centren en la degradació de TCE per co-metabolisme bacterià (Misra i Gupta, 2001; Wu et al., 2008). Si es realitza la inoculació mitjançant una mescla bacteriana, s'ha d'haver realitzat un estudi previ per confirmar que en el consorci microbià que s'utilitza conté algun bacteri degradador de TCE (Misra i Gupta, 2001). Per exemple, Wu et al. (2008) va utilitzar un reactor de llit fluïditzat de 12 litres de volum per inocular llocs actius d'una planta de tractament d'aigües residuals i mitjançant la introducció d'un corrent amb la presència de benzè, toluè i xilè, va afavorir el creixement de una o varies espècies bacterianes degradadores de TCE, obtenint un percentatge mig de degradació de TCE del 90% en un règim en continu per a un influent líquid amb concentracions d'entrada entre 4 i 280 µg/L. Un altre exemple és el treball publicat per Guo et al. (2001), on es va utilitzar un reactor de llit de fibra per inocular un cultiu pur amb *Pseudomonas putida* F1, que és un bacteri que expressa l'enzim toluè

---

dioxigenasa. En aquest estudi, el reactor treballava en continu i es van obtenir percentatges de degradació de TCE de fins al 90%.

Respecte a estudis en bioreactors per tractar un efluent líquid contaminat amb TCE mitjançant fongs de podridura blanca, no s'ha trobat cap referència prèvia al treball experimental realitzat en aquesta tesi doctoral.

Pel que fa a estudis de degradació anaeròbia en reactor de TCE en medi líquid, principalment els estudis realitzats fins ara han utilitzat bacteris anaerobis que degraden el contaminant per co-metabolisme, ja sigui bacteris metanogènics o acetogènics o una mescla dels dos. Per a treballar amb aquesta classe de microorganismes, el tipus de reactor usat habitualment és el reactor de llit de llots (UASB), on a banda del corrent de TCE a degradar, es fa circular un corrent amb diferents co-substrats per afavorir el creixement d'aquest tipus de bacteris. Per exemple, Sponza (2002) i Ozdemir et al. (2007) van realitzar estudis de degradació de TCE en UASB en règim en continu amb cultius de bacteris metanogènics i acetogènics obtenint, en el primer cas, un percentatge de degradació mig de TCE del 88% per un règim de treball de 50 dies i per concentracions d'influent entre 5 i 50 mg/L, però amb certa acumulació de productes intermedis com cis-DCE i clorur de vinil. En el segon cas, es va assolir una degradació aproximada de TCE del 50% al cap de 230 dies de degradació per a un una concentració màxima d'influent de 40 mg/L de TCE. En aquest cas no es van realitzar anàlisis per detectar la possible acumulació dels productes intermedis de la decloració reductiva.

Per evitar la possible acumulació dels productes intermedis en la decloració reductiva de TCE per bacteris anaerobis co-metabòlics, existeix la possibilitat de realitzar un tractament aerobi posterior al anaerobi per eliminar els possibles productes intermedis formats, principalment cis-DCE i clorur de vinil. S'han realitzat diferents estudis de degradació de TCE mitjançant la configuració anaeròbia-aeròbia amb resultats positius en quant a degradació de TCE, cis-DCE i clorur de vinil (Lyew i Guiot, 2003; Tartakovsky et al., 2003; Tartakovsky et al., 2005).

Entre tots els estudis de degradació de TCE en reactor referenciats en aquest apartat només dos d'ells han realitzat un estudi previ per quantificar les possibles pèrdues per volatilització de TCE associades al procés experimental per tal d'incloure-les en la quantificació del percentatge de degradació del contaminant. En el cas del treball publicat per Misra i Gupta (2001), les pèrdues per volatilització es quantifiquen

en un 18,5% del TCE total introduït al sistema i en el treball publicat per Tartakovsky et al. (2005) entre un 5 i un 30% del TCE introduït al sistema es perd per volatilització, depenent del mode d'operació. A més a més, els altres articles tampoc comenten haver realitzat un estudi per comprovar l'hermeticitat del sistema experimental emprat. Per tant, és possible que els percentatges de degradació inclosos en aquests estudis siguin superiors a la degradació real obtinguda al no haver tingut en compte les possibles pèrdues per evaporació del TCE durant el procés.

En l'apartat de resultats i discussió es detallen totes les etapes realitzades per tal de completar el procediment de disseny d'un reactor per degradar TCE mitjançant *T. versicolor* i la posterior aplicació d'aquest procediment de disseny en condicions experimentals, tant en ampolles de sèrum com en reactor. A més a més, també es presenta l'estudi de l'efecte de diferents paràmetres experimentals en la degradació de TCE mitjançant el fong.

## **4.2 Resultats i discussió**

Per tal de poder completar el procediment de disseny del reactor per a degradar TCE mitjançant *T. versicolor*, i en el futur dissenyar un bioreactor per degradar PCE si s'escau, es van realitzar estudis previs sobre diferents paràmetres experimentals que afecten a aquest procés de degradació, com són els equilibris vapor-líquid i sòlid-líquid pels dos contaminants, al tractar-se de compostos volàtils i amb una adsorció no menyspreable en el fong, i el consum d'oxigen del fong, al ser un procés de degradació en condicions aeròbies.

### **4.2.1 Equilibri vapor-líquid del TCE i PCE**

Davant la gran importància de l'equilibri vapor-líquid per als hidrocarburs alifàtics clorats, es va realitzar una extensa recerca bibliogràfica per obtenir diferents valors de la constant de Henry de TCE i PCE a la temperatura de treball experimental i disseny del reactor, que correspon a 25°C (298 K), per escollir posteriorment el valor més adequat a utilitzar en el disseny del reactor.

A les taules 4.5 i 4.6 es mostren els resultats de la recerca bibliogràfica realitzada, agrupant els valors per compostos.

**Taula 4.5.** Valors bibliogràfics de la constant del Henry de TCE a 298K.

	$H_c$ (adimensional)	H (atm·m <sup>3</sup> /mol)
Mètode directe (Chiang et al., 1998)	0,38	0,009
Tècnica Epics en fase gas (Chiang et al., 1998)	0,46	0,011
Tècnica Epics en fase líquida (Chiang et al., 1998)	0,37	0,009
William i Cummins (1984)	0,40	0,010
Munz (1985)	0,42	0,010
Tècnica EPICS_SPME (Dewulf et al., 1998)	0,41	0,010
Tècniques estàtiques (Ashworth et al., 1988)	0,42	0,010
Tècniques estàtiques (Robbins et al., 1993)	0,42	0,010
Tècniques estàtiques (Dewulf et al., 1995)	0,35	0,009
Batch air stripping (Leighton i Calo, 1981)	0,40	0,010
Calculat (Staudinger i Roberts, 1996)	0,46	0,011
Hwang et al. (1992)	0,35	0,009
Wan i Mackay (1986)	0,37	0,009
Tècnica EPICS modificada (Ryu i Park, 1999)	0,43	0,010
Tècnica EPICS modificada (Gossett, 1987)	0,39	0,010

**Taula 4.6.** Valors bibliogràfics de la constant del Henry de PCE a 298K.

	$H_c$ (adimensional)	H (atm·m <sup>3</sup> /mol)
Mètode directe (Chiang et al., 1998)	0,89	0,022
Tècnica Epics en fase gas (Chiang et al., 1998)	1,03	0,025
Tècnica Epics en fase líquida (Chiang et al., 1998)	0,65	0,016
Hwang et al. (1992)	1,10	0,027
Wan i Mackay (1986)	1,04	0,025
Ashworth et al. (1988)	0,74	0,018
Tècnica EPICS modificada (Ryu i Park, 1999)	0,76	0,019
Tècnica EPICS modificada (Gossett, 1987)	0,72	0,018

Un cop realitzada la recerca bibliogràfica es pot comprovar com els dos compostos clorats estudiats són altament volàtils. Per al TCE es pot comprovar com hi ha poca dispersió de valors entre les diferents referències bibliogràfiques i pràcticament tots els valors es troben en un rang petit de valors (entre 0,35 i 0,45). D'altra banda, per al PCE, la dispersió de valors és més elevada i el rang de valors va aproximadament des de 0,65 fins a 1,10.

A partir dels valors de la constant de Henry adimensional ( $H_c$ ) del TCE podem deduir que en un sistema tancat, a una temperatura de 298 K, on el volum de la fase líquida i gasosa fos igual i suposant que inicialment tot el TCE es trobi a la fase líquida, aproximadament entre un 35 i un 45% de la quantitat de TCE total es trobaria a la fase gasosa un cop arribat a l'equilibri. Per tant, en el cas d'aquest compost podem afirmar que l'equilibri vapor-líquid és un dels paràmetres importants a tenir en compte en el disseny del reactor. En el cas del PCE, a partir dels valors de  $H_c$  i suposant les mateixes condicions que pel TCE, aproximadament entre 65 i un 90% de la quantitat de PCE total es trobaria a la fase gas en equilibri. En aquest cas, l'equilibri vapor-líquid és encara més important que pel TCE, al estar més desplaçat l'equilibri cap a la fase gas.

Per a triar el valor de la constant més adequat per utilitzar en els càlculs del disseny del reactor, es va consultar diferents articles sobre degradació de TCE i PCE on apareixien els valors de constant de Henry utilitzats i la seva referència bibliogràfica. En la majoria d'aquests articles (p.ex.: Sharma i McCarty (1996) o Yang i McCarty (1998)) aquesta referència correspon a un treball publicat per J.M. Gossett (1987) i els valors dels quals es troben inclosos a les taules 4.5 i 4.6. A més a més, en l'article publicat per J.M. Gosset es calculen les constants de Henry mitjançant la tècnica EPICS (de l'anglès *Equilibrium Partitioning in Closed Systems*), que és una de les tècniques més utilitzades per calcular el valor d'aquesta constant, però modificada en part per augmentar la seva precisió de càlcul. Per tant, s'ha decidit utilitzar els valors de la constant que apareixen en aquest article, després de comprovar també que són valors propers als altres valors bibliogràfics consultats. Els valors escollits corresponen a una temperatura de 25°C, perquè, com s'ha comentat anteriorment, aquesta és la temperatura de treball experimental i de disseny del reactor. D'altra banda, és important comentar que s'ha decidit utilitzar l'expressió de la constant de Henry adimensional, que implica càlculs més senzills respecte l'altre expressió de la constant ( $H - \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ).

Els valors de la constant de Henry utilitzats són:

$$H_c \text{ TCE (a } 25^\circ\text{C)} = 0,39 \pm 0,01 \text{ (Gossett, 1987)}$$

$$H_c \text{ PCE (a } 25^\circ\text{C)} = 0,72 \pm 0,03 \text{ (Gossett, 1987)}$$

## 4.2.2 Equilibri sòlid-líquid del TCE i PCE

### 4.2.2.1 Isotermes d'adsorció del TCE i PCE

Per a trobar la isoterma d'adsorció més adequada, es van realitzar experiments d'adsorció per a 11 concentracions inicials en fase líquida diferents entre 5 i 20 mg/L tant pel TCE com pel PCE, i per a cada concentració inicial es van utilitzar 6 concentracions diferents de pèl·lets de fong autoclavat (20, 40, 50, 60, 70 i 80 g/L). A l'utilitzar fong autoclavat per quantificar l'adsorció dels contaminants en el fong, aquesta és sobreestimada, perquè s'ha comprovat que s'obté una major adsorció de contaminant en fong autoclavat que en fong inactivat per la presència d'azida sòdica 5 g/L, la qual és tòxica pel fong i també elimina la seva activitat metabòlica. Ara bé, es va decidir treballar amb fong autoclavat per obtenir una isoterma d'adsorció més conservativa i assegurar que en cap cas, la quantitat de contaminant adsorbit en el fong calculada mitjançant la isoterma fos inferior a la real.

A partir d'un primer experiment on es van extreure diferents mostres al llarg del temps, començant a les 3h i finalitzant a les 29h, es va comprovar per a la mostra corresponent a les 3h i fins al final, la massa de TCE o PCE adsorbida a la fase sòlida ja no augmentava i per tant, per aquest temps ja s'havia assolit l'equilibri entre fases. En els diferents experiments posteriors per determinar les corresponents isotermes d'adsorció es va fixar un temps mínim d'extracció de mostra de 5 hores, per assegurar que s'assolia l'equilibri d'adsorció en tots els casos.

La raó de realitzar un gran nombre d'experiments d'adsorció a diferents concentracions inicials és el fet que al ser experiments amb una concentració de contaminant tan baixa i al ser aquests uns compostos tan volàtils, cal disposar d'un nombre elevat de resultats per reduir la incertesa experimental associada.

A partir de la mesura de les concentracions del compost clorat a la fase líquida al finalitzar els experiments, es pot calcular la relació de compost adsorbit a la fase sòlida per pes sec de biomassa per obtenir la isoterma que millor s'ajusta als resultats experimentals. El procediment de càlcul utilitzat és el següent:

Ampolles blanc

$$C_{liq,i} = 5 \cdot C_{vial,i}$$

$$m_{liq,i} = V_{liq,i} \cdot C_{liq,i}$$

$$m_{blanc,i} = m_{liq,i}$$

Ampolles d'adsorció

$$C_{liq,i} = 5 \cdot C_{vial,i}$$

$$m_{liq,i} = V_{liq,i} \cdot C_{liq,i}$$

$$m_{sòlid,i} = m_{blanc,i} - m_{liq,i}$$

$$q_i = \frac{m_{sòlid,i}}{\text{pes sec}_{biom,i}}$$

Un cop obtinguts els resultats experimentals, s'han utilitzat les isoterms més senzilles de càlcul i més usuals, que corresponen a les de Langmuir i Freundlich, que són del tipus favorable, i a la lineal. A la taula 4.7 es mostra les equacions obtingudes a partir de les tres isoterms d'adsorció ajustades a les dades experimentals d'adsorció de TCE i PCE en el fong.

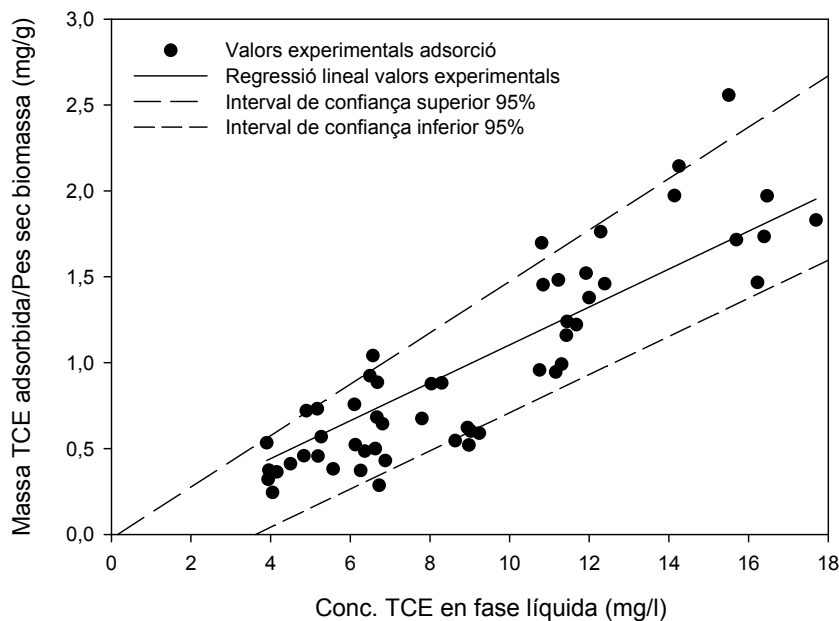
**Taula 4.7.** Equacions resultants de l'ajust per a cadascuna de les isoterms d'adsorció utilitzades per al TCE i PCE amb el conseqüent coeficient de correlació ( $R^2$ ) obtingut.

Isoterms d'adsorció	TCE		PCE	
	Equació	$R^2$	Equació	$R^2$
Lineal	$q_{TCE} = 0,110 \cdot C_{liq,TCE}$	0,76	$q_{PCE} = 0,176 \cdot C_{liq,PCE}$	0,84
Langmuir	$q_{TCE} = \frac{0,081 \cdot C_{liq,TCE}}{1 - 0,015 \cdot C_{liq,TCE}}$	0,81	$q_{PCE} = \frac{0,230 \cdot C_{liq,PCE}}{1 + 0,048 \cdot C_{liq,PCE}}$	0,76
Freundlich	$q_{TCE} = 0,060 \cdot C_{liq,TCE}^{1,232}$	0,79	$q_{PCE} = 0,221 \cdot C_{liq,PCE}^{0,890}$	0,83

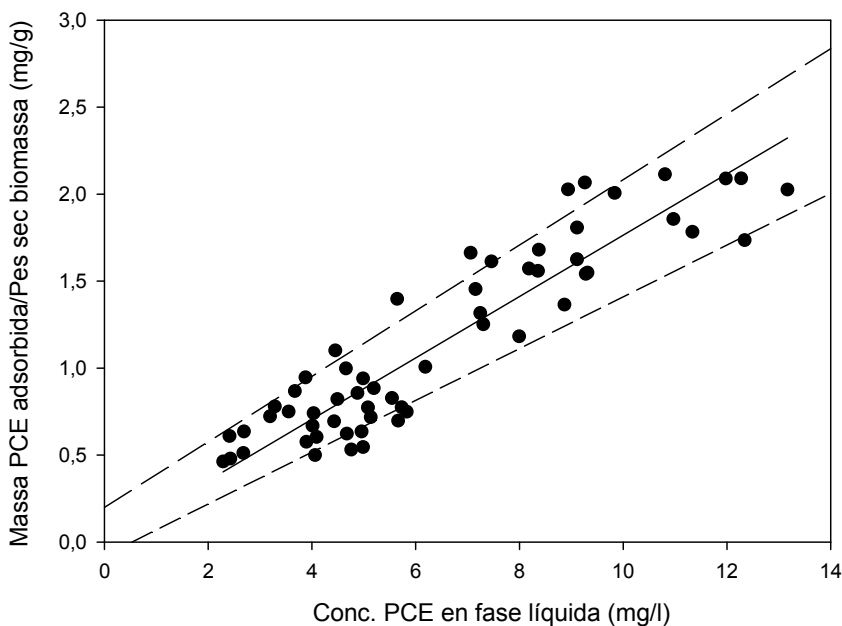
A la taula anterior es pot observar que les tres isoterms d'adsorció s'ajusten acceptablement a les dades experimentals d'adsorció tant pel TCE com pel PCE. Ara bé, a causa d'haver estudiat l'adsorció dels dos compostos en un rang de concentracions baix, l'ajust dels valors experimentals d'adsorció per a les isoterms de Freundlich i Langmuir es localitza a la zona lineal. Per tant, la isoterma lineal és suficient per descriure l'adsorció dels dos contaminants en el fong.

Les figures 4.8 i 4.9 mostren els valors experimentals d'adsorció i els ajusts de la isoterma lineal a aquests valors.





**Figura 4.8.** Valors experimentals de TCE i ajust per a la isoterma lineal amb els intervals de confiança al 95%.



**Figura 4.9.** Valors experimentals de PCE i ajust per a la isoterma lineal amb els intervals de confiança al 95%.

A partir de les figures 4.8 i 4.9 es pot observar que, tant en el cas del TCE com del PCE, la isoterma lineal s'ajusta correctament als valors experimentals d'adsorció. A més a més, es va realitzar un estudi estadístic i els intervals de confiança superior i inferior al 95% es representen en aquestes figures. Aquests intervals signifiquen que hi ha una certesa del 95% de trobar un valor experimental entre ells i s'utilitza per

detectar quins valors s'allunyen de la tendència general dels valors experimentals, provocant certa dispersió en el resultat de l'equació de regressió.

A partir dels intervals de confiança de les figures, es pot observar que per la isoterma lineal la majoria dels valors experimentals es troben entre els intervals de confiança, tant en el cas del TCE com del PCE, i aquest fet significa que no hi ha una gran dispersió dels valors obtinguts experimentalment. Per aquesta raó i d'acord amb els coeficients de regressió obtinguts, la isoterma lineal és adequada per descriure l'adsorció de TCE i PCE en el fong.

D'altra banda, es va estudiar la desorció de TCE i PCE i es va comprovar que la seva adsorció és reversible i això significa que durant el procés de degradació, l'adsorció de TCE i PCE no només es produeix en l'etapa inicial, sinó que existeix un equilibri entre la massa adsorbida de contaminant i la seva concentració a la fase líquida durant tot el procés de degradació. Per tant, és necessari conèixer la concentració del compost a la fase líquida durant tot el procés de degradació per obtenir la massa adsorbida de contaminant en condicions d'equilibri. En canvi, si la adsorció fos irreversible, la massa adsorbida de compost en equilibri s'hauria de calcular només amb les condicions de degradació inicials.

#### **4.2.2.2 Avaluació de la isoterma lineal d'adsorció del TCE i PCE en un sistema trifàsic en condicions de degradació**

En aquest apartat es mostra l'aplicació de la isoterma lineal de TCE i PCE per calcular la distribució d'aquests compostos en un reactor trifàsic per degradar-los mitjançant *T. versicolor*. D'altra banda, es mostra una comparació entre els rendiments experimental i calculat de degradació de TCE i PCE per demostrar que la isoterma lineal és vàlida per descriure l'adsorció d'aquests dos contaminants en el fong en condicions de degradació experimentals.

Tots els experiments de degradació es van realitzar en un reactor amb un relació entre el volum de fase gas i de fase líquida de 14,7. Aquesta relació és molt elevada perquè la degradació d'aquests contaminants pel fong es produeix de forma aeròbia i és necessari un volum gran de fase gas per contenir una elevada quantitat d'oxigen, la qual es va afegir abans d'iniciar la degradació, perquè durant el procés el reactor es troba hermèticament tancat per evitar pèrdues per evaporació.

A més a més, fou necessari determinar experimentalment la densitat dels pèl·lets (23,58 g pes sec/L) per conèixer la relació entre el seu volum i el pes sec. 0,09 g de pèl·lets (pes sec), els quals equivalen, a partir de la densitat de pèl·lets, a un relació entre volum de biomassa i volum de líquid de 0,4, es van usar al reactor. La distribució del TCE i el PCE a l'equilibri es va realitzar per a quatre concentracions inicials en fase líquida diferents (5, 10, 15 i 20 mg/L). Usant les constants de Henry de TCE i PCE, la massa inicial a la fase gas i a la fase líquida es va calcular per a cada concentració inicial. Llavors es va realitzar un balanç màssic total.

$$m_0 = m_L + m_G + m_S \quad (4.1)$$

On  $m_0$  és la massa inicial afegida de TCE o PCE a les ampolles experimentals i  $m_L$ ,  $m_G$  i  $m_S$  són la massa de TCE o PCE a la fase líquida, fase gas i fase sòlida, respectivament, en condicions d'equilibri.

A partir de la mesura de la concentració a la fase líquida, el balanç màssic total, la constant de Henry i la isoterma lineal, es pot determinar la distribució de la massa de contaminant en cadascuna de les fases.

$$m_G = H_c \cdot m_L \cdot \frac{V_G}{V_L} \quad (4.2)$$

$$m_S = K \cdot X \cdot \left( \frac{m_L}{V_L} \right) \quad (4.3)$$

On  $H_c$  és la constant de Henry del TCE i el PCE adimensional,  $V_G$  és el volum de fase gas,  $V_L$  és el volum de fase,  $K$  és la constant de la isoterma lineal i  $X$  és el pes sec de pèl·lets. Els resultats obtinguts per a cada concentració inicial en fase líquida de TCE i PCE es mostren a les taules 4.8 i 4.9.

**Taula 4.8.** Distribució de TCE entre les diferents fases a l'equilibri.

$C_0$ (fase líquida) (mg/L)	$C$ (fase líquida) (mg/L)	$C$ (fase gas) (mg/L)	$C$ (fase sòlida) (mg/L)	% adsorció en biomassa
5	4,36	1,71	11,35	12,8
10	8,72	3,42	22,70	12,8
15	13,08	5,13	34,05	12,8
20	17,44	6,84	45,40	12,8

**Taula 4.9.** Distribució de PCE entre les diferents fases a l'equilibri.

C <sub>0</sub> (fase líquida) (mg/L)	C (fase líquida) (mg/L)	C (fase gas) (mg/L)	C (fase sòlida) (mg/L)	% adsorció en biomassa
5	4,40	3,18	18,30	12,0
10	8,81	6,36	36,60	12,0
15	13,20	9,54	54,90	12,0
20	17,60	12,72	73,21	12,0

Aquests resultats demostren que l'adsorció d'aquests dos compostos en el fong no és molt elevada, però sí és significativa (12,8% pel TCE i 12,0% pel PCE) i això significa que és un paràmetre important que s'ha de tenir en compte en el disseny d'un bioreactor. Les taules 4.8 i 4.9 mostren que si la massa total inicial de compost augmenta, lògicament l'adsorció de TCE i PCE també ho fa. A més a més mostra que el percentatge d'adsorció és molt semblant en ambdós casos i el percentatge és lleugerament més elevat en el cas del TCE que del PCE a causa de la seva menor volatilitat.

Per tal de validar la isoterma lineal en condicions de degradació, es van obtenir els rendiments experimental i calculat de degradació de TCE i PCE i es mostren a les taules 4.10 i 4.11.

**Taula 4.10.** Comparació entre els rendiments experimental i calculat de degradació de TCE.

C <sub>0</sub> en fase líquida (mg/L)	% Degradació experimental	% Degradació calculada	% Error
5	74,8	74,0	1,0
10	66,1	61,2	7,4
15	56,7	52,6	7,2
20	55,6	40,0	28,1

**Taula 4.11.** Comparació entre els rendiments experimental i calculat de degradació de PCE.

C <sub>0</sub> en fase líquida (mg/L)	% Degradació experimental	% Degradació calculada	% Error
3	36,9	37,1	0,6
5	26,4	20,3	22,9
10	15,2	14,3	6,0

El rendiment experimental de degradació es va obtenir comparant la concentració de TCE i PCE a les ampolles abiòtiques amb la concentració a les ampolles inoculades amb fong. A més a més, la massa de contaminant adsorbida es va obtenir experimentalment en cada cas i es van utilitzar per corregir els valors de degradació obtinguts. El rendiments calculats de degradació es van obtenir a partir dels mateixos valors experimentals usats per calcular els rendiments experimentals de degradació, excepte la massa adsorbida de TCE i PCE, que es calcula mitjançant la isoterma lineal.

Les taules 4.10 i 4.11 mostren que per a la majoria de concentracions inicials de TCE i PCE, els rendiments experimental i calculat de degradació són molt similars i en els casos en que l'error és més elevat (aproximadament un 28% en el cas del TCE i un 23% en el cas del PCE), es comprova que aquestes desviacions són degudes a la mesura de l'adsorció i es magnifiquen en calcular el rendiment de degradació. Malgrat tot, a partir de la comparació entre els rendiments experimental i calculat de degradació, es pot afirmar que la isoterma lineal descriu de forma acceptable l'adsorció de TCE i PCE en el fong en forma de pèl·lets.

### **4.2.3 Consum d'oxigen**

El procés de degradació de TCE i PCE amb *Trametes versicolor* en forma de pèl·lets es produeix en condicions aeròbies. Per tant, un paràmetre clau en el disseny del reactor hermètic és la quantitat d'oxigen necessària que s'ha de subministrar al fong per a que degradi els contaminants. Per aquesta raó es va realitzar, en primer lloc, un experiment de mesura del consum d'oxigen d'aquest fong en fermentador utilitzant la tècnica dinàmica, que consisteix en introduir una pertorbació quan el sistema es troba en equilibri i analitzar la resposta que es produeix (Casas et al., 1998). Posteriorment, es va realitzar un altre experiment de consum d'oxigen del fong realitzant la mesura l'evolució de concentració d'oxigen al llarg del temps directament a l'ampolla de sèrum tant en fase gas com en fase líquida mitjançant un sensor d'oxigen amb fluoròfors que s'adhereixen al vidre de l'ampolla.

#### 4.2.3.1 Càlcul del consum d'oxigen mitjançant la tècnica dinàmica

Aquest experiment té dues parts: una primera consisteix en la determinació de la constant del temps de resposta de la sonda de mesura d'oxigen dissolt i una segona on es determina el consum d'oxigen del fong.

##### Determinació de la constant del temps de resposta de la sonda d'oxigen dissolt

La sonda d'oxigen dissolt té associat un retard en la mesura de la concentració d'oxigen. Aquesta retard es modelitza com un retard de primer ordre amb la introducció en el model de la constant del temps de resposta, que es defineix com el temps que transcorre fins que s'assoleix el 63,2% del valor final de la mesura quan s'exposa a la sonda a un canvi de concentració en esglaió (Stephanopoulos, 1984):

$$\frac{dC_{mes}}{dt} = \frac{C_{real} - C_{mes}}{\tau} \quad (4.4)$$

On  $C_{mes}$  és la concentració d'oxigen mesurada per la sonda a la fase líquida,  $C_{real}$  és la concentració real d'oxigen a la fase líquida,  $\tau$  és la constant del temps de resposta de la sonda i  $t$  és el temps. Si l'equació 4.4 conté el terme de temps mort ( $t_d$ ), l'equació només és vàlida per a  $t > t_d$ , perquè per a valors de temps inferiors a  $t_d$ ,

$$\frac{dC_{mes}}{dt} = 0.$$

Amb la transformada de Laplace es determina que la solució d'aquesta equació diferencial, suposant un primer ordre amb un temps mort i un esglaió unitari, és:

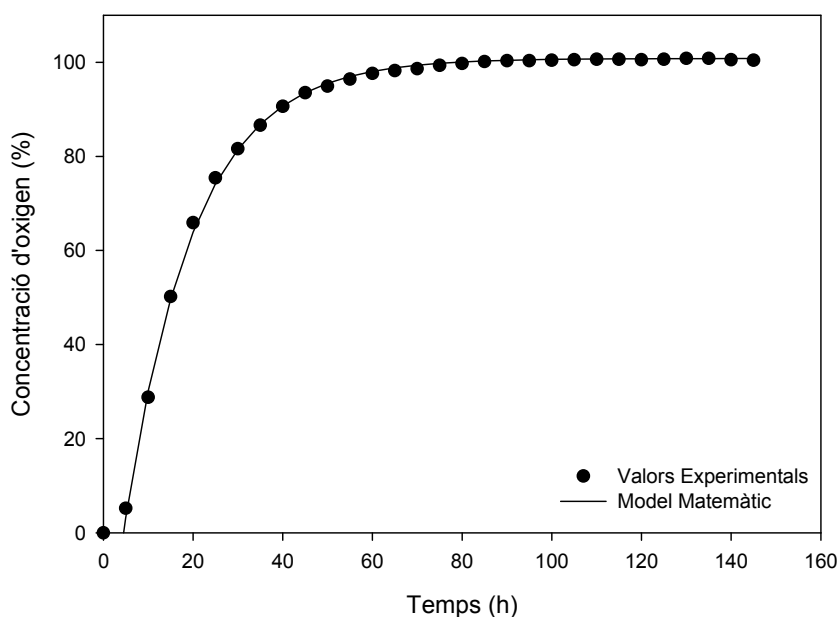
$$C_{mes} = U \cdot \left( 1 - e^{-\frac{(t-t_d)}{\tau}} \right) \quad (4.5)$$

On  $t_d$  és el temps mort del sistema de primer ordre, calculat amb el mètode de la corba de reacció (Ollero de Castro i Fernández, 1997), i  $U$  és un factor que equival a un valor de 1 si  $t > t_d$  i a un valor de 0 si  $t < t_d$ .

A partir de l'equació 4.5, es troba el valor de la constant que minimitza l'error entre el comportament que segueix aquesta l'equació i les dades experimentals obtingudes al laboratori.

Es van realitzar diverses mesures per determinar la constant del temps de resposta de la sonda i els valors de la constant del temps de resposta per a cadascun dels experiments s'han obtingut mitjançant la funció Solver de Microsoft Excel, que calcula el valor de la constant que minimitza l'error entre els valors experimentals i els valors obtinguts a partir del model (equació 4.5).

A la figura 4.10 es pot comprovar que els resultats experimentals s'ajusten perfectament a la modelització de la dinàmica d'un sistema de primer ordre amb una constant de temps  $\tau$  davant d'un canvi en esglaó. A banda d'aquest exemple, es van realitzar més mesures per obtenir un valor mig del valor de  $\tau$  que fos representatiu.



**Figura 4.10.** Mesura de la resposta de la sonda a un canvi de concentració d'oxigen en esglaó i ajust del model matemàtic respecte els valors experimentals.

El valor mig de la constant del temps de resposta és:

$$\tau = 15,3 \pm 0,1 \text{ s}$$

Pel que fa al temps mort del sistema de primer ordre ( $t_d$ ) associat a cada mesura de la resposta de la sonda a un canvi de la concentració d'oxigen en esglaó, també s'ha obtingut un valor mig de totes les mesures:

$$t_d = 4,9 \pm 0,6 \text{ s}$$

Determinació del consum d'oxigen del fong *Trametes versicolor*

A l'interrompre el subministrament d'oxigen al fermentador, la concentració d'oxigen disminueix, a causa del consum del fong, segons la següent equació:

$$\frac{dC_{real}}{dt} = Q_{O_2} \quad (4.6)$$

On  $Q_{O_2}$  és el consum d'oxigen.

A partir de les transformades de Laplace, la solució de les dues equacions diferencials que descriuen el procés (equacions 4.4 i 4.6), suposant un primer ordre amb una rampa negativa i de magnitud igual al consum d'oxigen, és (Casas et al., 1998):

$$C_{mes} = U \cdot \left[ C_0 + Q_{O_2} \cdot \left( (t - t_d) - \tau \cdot \left( 1 - e^{\frac{-(t-t_d)}{\tau}} \right) \right) \right] \quad (4.7)$$

On  $C_0$  és la concentració inicial d'oxigen dissolt.

$U$  és un factor que equival a un valor de 1 si  $t > t_d$  i un valor de 0 si  $t < t_d$

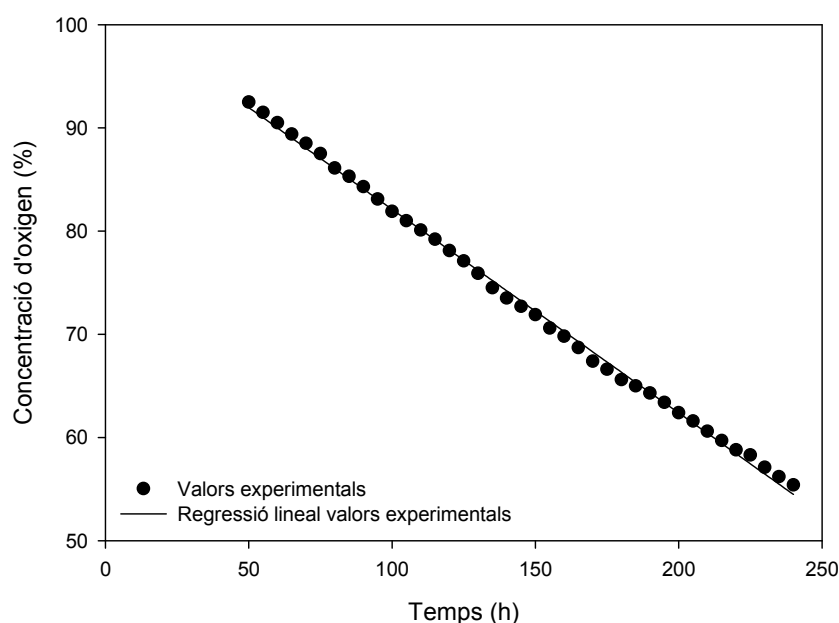
Si el sistema es troba inicialment en equilibri i  $C_{0, sensor} = C_{0, líquid}$ , al passar un temps molt més gran que  $\tau$ , el terme exponencial de l'equació 4.7 és negligible (Baeza et al., 2002) i l'equació queda de la següent manera:

$$C_{mes} = U \cdot [C_0 + Q_{O_2} \cdot ((t - t_d) - \tau)] \quad (4.8)$$

Per tant, el consum d'oxigen equival al pendent que s'obté d'una regressió lineal dels valors experimentals de concentració d'oxigen front el temps, però si es vol obtenir un 95% de la resposta correcta, és necessari utilitzar valors de concentració d'oxigen obtinguts a partir d'un temps equivalent a  $3\tau$  més el temps mort de la sonda (Baeza et al., 2002). En el cas de la sonda utilitzada,  $3\tau$  té un valor de 45,9 s i el temps mort té un valor de 4,95 s. Per tant, per trobar un valor correcte del consum d'oxigen s'han realitzat els càlculs per als valors mesurats a partir de 50 s i fins a valors de mesura de concentració d'oxigen del 55%, perquè per a valors inferiors, la disminució de la concentració no es produeix de forma lineal i no es poden ajustar els valors experimentals a l'equació d'una recta.



Es van realitzar diverses mesures per determinar el consum d'oxigen durant el període de creixement de pèl·lets i durant el període de manteniment. La figura 4.11 mostra un exemple de l'evolució de la concentració d'oxigen i la regressió lineal dels valors experimentals durant el període de creixement, on es pot observar com la regressió lineal s'ajusta satisfactòriament als valors experimentals. A més a més, els valors dels coeficients de regressió obtinguts en totes les regressions lineals dels valors experimentals són superiors a 0,994. Per tant, la suposició de menysprear el terme exponencial per a valors de temps molt més elevats que el valor de la constant del temps de resposta és correcta en aquest cas.



**Figura 4.11.** Mesura de l'evolució de la concentració d'oxigen i regressió lineal dels valors experimentals en el període de creixement.

Com ja s'ha comentat anteriorment, es van realitzar experiments durant la fase de creixement de pèl·lets i durant la fase de manteniment i s'ha obtingut un resultat mig del consum en cadascuna de les fases:

#### Fase de creixement

$$Q_{O_2,1er dia} = -0,100 \pm 0,008 \frac{\%}{s}$$

$$Q_{O_2,2on dia} = -0,192 \pm 0,006 \frac{\%}{s}$$

#### Fase de manteniment

$$Q_{O_2} = -0,26 \pm 0,01 \frac{\%}{s}$$

Pel disseny del reactor s'ha decidit utilitzar el valor de consum d'oxigen més elevat, expressant-lo en funció de la biomassa. A partir del valor de solubilitat de l'oxigen a 298 K, equivalent a 8,38 mg/L O<sub>2</sub> (Metcalf, 1985), i de la concentració de biomassa (2,7 g pes sec/L), es calcula el consum d'oxigen per massa de biomassa seca. El valor resultant és:

$$Q_{O_2} = 29 \pm 1 \frac{\text{mg O}_2}{\text{h} \cdot \text{g pes sec}}$$

#### 4.2.3.2 Càlcul del consum d'oxigen en ampolla de sèrum

Per tal de conèixer el consum d'oxigen del fong en ampolla de sèrum, es va monitoritzar l'evolució de la concentració d'oxigen tant en fase gas com en fase líquida en les mateixes condicions que un experiment de degradació de TCE en ampolla de sèrum, excepte per la no presència de contaminant. A partir de l'obtenció de la concentració d'oxigen (en mg/L) en fase gas, la qual es mesura en percentatge volumètric i es converteix a unitats de massa/volum mitjançant l'aplicació de la llei dels gasos ideals (considerant el volum molar de l'oxigen a 30°C com a 24,876 l/mol), i la corresponent concentració d'oxigen (en mg/L) en fase líquida, és possible conèixer la massa total d'oxigen a l'ampolla i per tant, la seva evolució al llarg del temps. Si es representen els valors de la massa d'oxigen consumida total, en mg, enfront el temps, el consum d'oxigen del fong correspon al pendent de la regressió lineal ajustada als valors experimentals. En l'experiment realitzat, es van utilitzar dues ampolles sèrum amb fong i una altra només amb medi líquid (control abiòtic), per tal de comprovar que no hi havia pèrdues d'oxigen en les ampolles al llarg de l'experiment, fet que es va comprovar com a cert al mantenir-se la concentració d'oxigen constant en aquesta ampolla. A partir de les mesures realitzades a les dues ampolles sèrum amb fong es va obtenir un valor mig de consum d'oxigen de

$$Q_{O_2} = 2,2 \pm 0,1 \frac{\text{mg O}_2}{\text{h}}$$

Tenint en compte que el consum d'oxigen s'expressa en funció del pes sec de biomassa i que en aquest cas es va obtenir un pes sec mig de 0,075 g, el valor resultant de consum d'oxigen és:

$$Q_{O_2} = 29 \pm 2 \frac{\text{mg O}_2}{\text{h} \cdot \text{g pes sec}}$$

Si es compara el valor de consum d'oxigen obtingut en les ampolles sèrum amb el consum d'oxigen obtingut en fermentador mitjançant la tècnica dinàmica, s'observa que s'obté el mateix valor. Si es fa un promig dels dos valors de consum d'oxigen obtinguts en els dos experiments tenint en compte les desviacions estàndards corresponents, s'obté un resultat final de consum d'oxigen del fong *T. versicolor* de

$$\bar{Q}_{O_2} = 29 \pm 1 \frac{\text{mg } O_2}{\text{h} \cdot \text{g pes sec}}$$

#### 4.2.4 Determinació de l'equació cinètica de desaparició de TCE

A partir d'experiments de degradació de TCE i PCE, s'ha comprovat que els percentatges de degradació de TCE són més elevats que pel PCE amb el fong *T. versicolor* sota les mateixes condicions (Marco-Urrea, 2007), obtenint un percentatge de degradació del 80% pel TCE i percentatges al voltant del 40% pel PCE, el qual implica que no s'han determinat unes condicions òptimes de degradació que permetin assolir elevats rendiments de degradació en el cas del PCE. Per aquesta raó, s'ha decidit dissenyar el reactor per tractar TCE, però si en el futur es determinen les condicions òptimes de degradació de PCE amb aquest fong, es disposa de la informació necessària per dissenyar el reactor de degradació d'aquest contaminant.

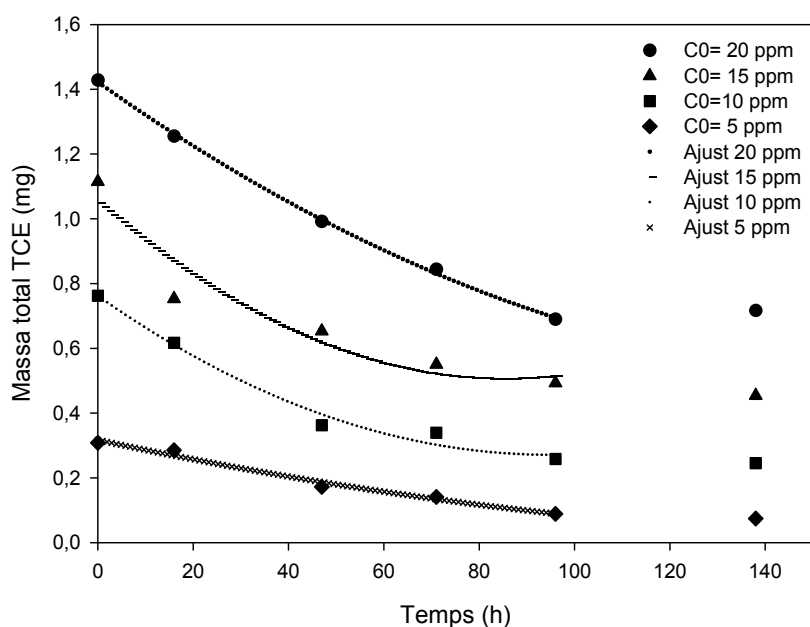
Per a trobar el temps necessari per degradar el TCE amb el percentatge de degradació desitjat, és molt important disposar d'una equació que descriu amb fiabilitat la desaparició de massa de contaminant al llarg del temps.

Per obtenir aquest model, s'han ajustat gràficament diferents corbes de cinètiques de degradació a dades experimentals de desaparició de massa de TCE al llarg del temps, obtingudes a partir de quatre experiments de degradació del contaminant a diferents concentracions inicials de TCE (5,10,15 i 20 mg/L) (Marco-Urrea, 2007) i s'ha fet un estudi per comprovar si alguna d'aquestes cinètiques descriu amb suficient exactitud i fiabilitat la desaparició de la massa de TCE total al llarg del temps per als diferents experiments, per tal d'utilitzar els seus paràmetres en el disseny del reactor.

Al treballar amb concentracions de contaminant baixes, existeix la possibilitat de cert error experimental, a causa de l'alta volatilitat del TCE, i això provoca que hi pugui haver algun punt experimental que s'allunyi de la tendència general i d'altra banda, al disposar de pocs valors experimentals al llarg del temps per a cada concentració

inicial, no es pot menysprear cap dels punts experimentals, perquè tots proporcionen una informació molt important. Per aquesta raó, es va ajustar els valors experimentals de cadascun dels experiments a un polinomi de segon grau per evitar un posterior error en l'ajust de les equacions de degradació causat per aquest fet i d'altra banda, aconseguir una evolució de la degradació al llarg del temps més uniforme i obtenir un millor ajust de les diferents equacions de degradació utilitzades. És important comentar que en tots els gràfics de d'aquest apartat estan representats els valors experimentals, però l'ajust de les diferents equacions de regressió s'han realitzat a partir dels polinomis de segon grau obtinguts.

La figura 4.12 mostra els valors experimentals d'evolució de TCE al llarg del temps i els ajusts dels polinomis de segon grau per a cadascun dels experiments:



**Figura 4.12.** Valors experimentals de l'evolució de la massa de TCE per a diferents concentracions inicials de contaminant i ajusts del polinomi de segon grau als valors experimentals.

Cal remarcar que l'objectiu no és trobar una equació que descrigui la cinètica de degradació d'aquest contaminant, perquè les dades experimentals estan referides a la massa de TCE total present a totes les fases del sistema i no només a la fase líquida on està present el fong, i per tant, l'evolució de la massa del compost està influenciada per altres factors, com els equilibris entre fases, que la cinètica de degradació utilitzada no té en compte. Per tant, s'ha de considerar que l'equació cinètica que s'ajusti als valors experimentals és una pseudo-cinètica de degradació de TCE, però aquesta ja proporciona suficient informació per saber el temps necessari per degradar

la quantitat de TCE desitjada amb un percentatge de degradació determinat en les condicions en les que s'ha realitzat l'estudi.

La reacció de degradació de TCE mitjançant *Trametes versicolor* hauria d'ajustar-se, en principi, a una equació del tipus Michaelis-Menten, la qual descriu una degradació basada en reaccions enzimàtiques i en aquest cas, la degradació de TCE es produeix per l'acció d'enzims produïts pel fong. De fet, s'ha demostrat que l'enzim responsable del primer pas de la reacció de degradació del TCE és l'enzim citocrom P450 (Marco-Urrea et al., 2008a). Com es pot observar a la figura 4.12, la disminució de la massa de contaminant es produeix de forma pronunciada fins a un temps de 96h, però a partir d'aquest temps la reacció s'atura i la massa de TCE pràcticament ja no disminueix. Aquesta fet pot ser degut exclusivament a la cinètica de degradació del contaminant mitjançant el fong o a possibles limitacions experimentals que poden afectar al procés de degradació a partir d'un temps de 96 hores, com és l'esgotament de l'oxigen o la glucosa present a les ampolles experimentals. Per aquesta raó, s'ha realitzat l'ajust de l'equació de desaparició de TCE en el període on el procés de degradació, en principi, no es troba limitat per cap factor i que correspon a les primeres 96h d'experiment. Com que només es realitza l'ajust del període inicial, existeixen altres cinètiques de degradació, a banda de l'equació de Michaelis-Menten, per les quals és més senzill el càlcul dels seus paràmetres a partir de les dades experimentals i que alhora, són útils com a primera aproximació de l'evolució de la desaparició de TCE mitjançant el fong al llarg del temps. Per tant, s'han ajustat les equacions d'ordre zero, primer ordre i segon ordre a les dades experimentals i per tal de comprovar quina de les tres equacions descriu amb millor precisió la desaparició de TCE mitjançant el fong. Al ajustar aquest tipus d'equacions, s'assumeix que, en tots els casos, es subestima el temps de degradació necessari per assolir un determinat percentatge de degradació si aquest és major a 96 hores perquè aquest tipus d'equacions no tenen en compte l'alentiment de la reacció de degradació que té lloc a partir d'aquest temps al tractar-se d'una reacció enzimàtica. A continuació es detallen les equacions utilitzades:

$$\text{Equació d'ordre zero: } m = m_0 - k \cdot t \cdot X \quad (4.9)$$

$$\text{Equació de primer ordre: } m = m_0 \cdot e^{-ktx} \quad (4.10)$$

$$\text{Equació de segon ordre: } m = \frac{m_0}{m_0 \cdot k \cdot t \cdot x + 1} \quad (4.11)$$

On  $m$  és la massa total de TCE (mg) per a un temps  $t$

$m_0$  és la massa total inicial de TCE (mg)

$k$  és la constant de degradació (mg TCE/(h·g pes sec))

$X$  és la massa de biomassa (g pes sec)

El càlcul la constant de degradació ( $k$ ) per a les equacions d'ordre zero, de primer i de segon ordre s'ha realitzat mitjançant el càlcul del valor de la constant que minimitza l'error entre els valors experimentals i els valors teòrics, a partir de la funció Solver de Microsoft Excel.

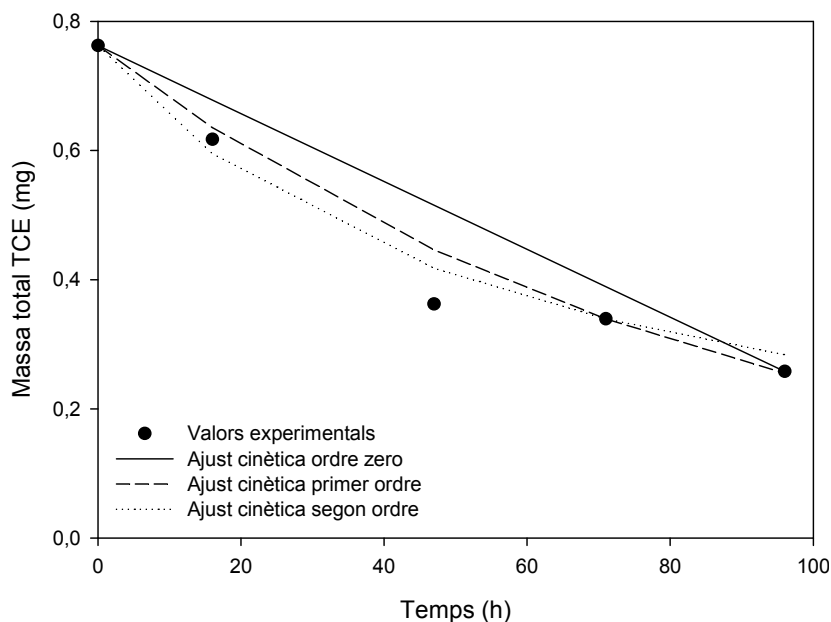
A continuació, es mostra els valors mig dels diferents valors de la constant de degradació trobats per a cada concentració inicial de TCE i per a cadascuna de les equacions utilitzades. S'ha de remarcar que per calcular la constant de degradació per a cadascuna de les concentracions inicials, s'ha utilitzat el valor màxim de biomassa de les ampolles unitàries experimentals per a cadascuna de les quatre concentracions inicials de TCE:

$$k = 0,06 \pm 0,02 \text{ mgTCE}/(\text{h}\cdot\text{g pes sec}) \text{ (Equació d'ordre zero)}$$

$$k = 0,12 \pm 0,02 \text{ } 1/(\text{h}\cdot\text{g pes sec}) \text{ (Equació de primer ordre)}$$

$$k = 0,3 \pm 0,2 \text{ } 1/(\text{h}\cdot\text{g pes sec}\cdot\text{mg TCE}) \text{ (Equació de segon ordre)}$$

Amb els resultats obtinguts, es pot comparar gràficament l'evolució de la massa de TCE al llarg del temps a partir de les dades experimentals i l'evolució obtinguda amb les tres equacions cinètiques. La figura 4.13 mostra aquesta comparació per a un valor de concentració inicial de TCE de 10 mg/L.



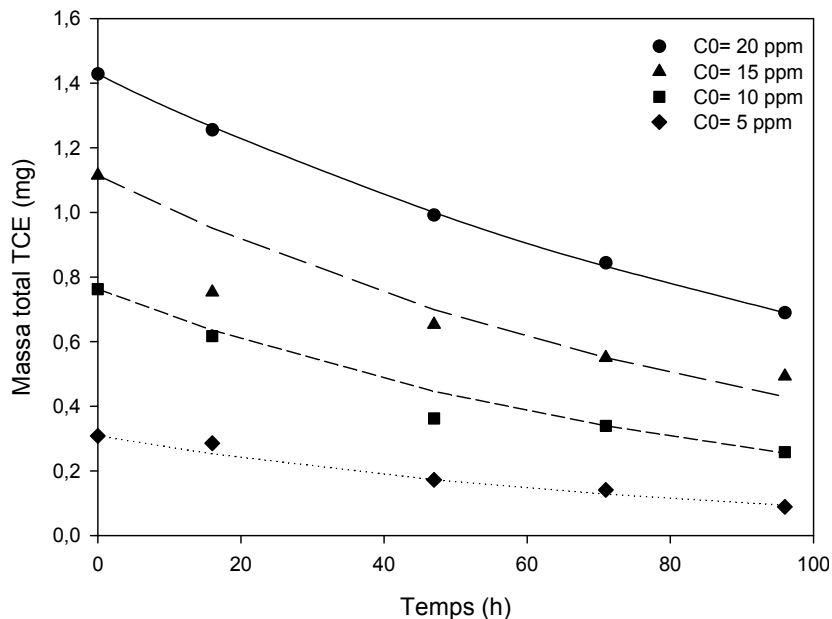
**Figura 4.13.** Valors experimentals i corbes dels ajustos a les equacions cinètiques per a una concentració inicial de 10 mg/L.

A partir dels ajustos matemàtics, es pot afirmar que l'equació d'ordre zero no és adequada per descriure la degradació del compost clorat. Per a les equacions de primer i segon ordre, les dues corbes s'ajusten correctament a les dades experimentals per a temps inferiors a 96 hores.

D'altra banda, si observem els valors mig de  $k$  obtinguts per a l'equació de segon ordre, podem comprovar que la seva desviació estàndard és extremadament elevada i per tant, existeix una gran dispersió entre els valors de la constant obtinguts per a cadascuna de les concentracions inicials de TCE i implica que no és una equació vàlida per a descriure la seva degradació a diferents concentracions. En el cas de la equació de primer ordre, la desviació estàndard de la constant té un valor significatiu però d'una magnitud menor a la de segon ordre.

Per tant, entre les tres equacions de degradació estudiades, la de primer ordre és la més adequada per descriure la desaparició del TCE al llarg del temps. A la figura 4.14 es mostra l'ajust de la cinètica de primer ordre per a les diferents concentracions inicials de TCE. Com es pot observar en aquesta figura, aquesta cinètica descriu de forma fiable l'evolució de la massa de contaminant en el procés de degradació de TCE per a les diferents concentracions inicials, tot i que, com s'ha comentat anteriorment, el temps de degradació calculat mitjançant aquest ajust per assolir una determinada desaparició de contaminant serà inferior al valor real per a temps superiors a 96

hores, perquè l'equació de primer ordre no té en compte l'alentiment de la reacció enzimàtica que es produeix a partir d'aquest temps.



**Figura 4.14.** Evolució dels valors experimentals i de les corbes corresponents a la cinètica de primer ordre per a les diferents concentracions inicials de TCE.

#### 4.2.5 Disseny del reactor per a la degradació de TCE

L'objectiu del disseny realitzat és avaluar les principals condicions d'un reactor d'un volum fixat (quantitat de biomassa, volum de fase líquida i gas, quantitat d'oxigen necessari i temps de degradació mínim) per a degradar diferents quantitats de TCE i percentatges de degradació i posteriorment, decidir quines són les condicions òptimes del reactor per tractar aquest contaminant. S'ha comprovat que la degradació és el pas limitant del sistema i que els equilibris entre les diferents fases s'assoleixen més ràpidament.

A més a més, per a dissenyar el reactor de degradació s'han tingut en compte certes restriccions:

- i. El reactor opera en discontinu.
- ii. El reactor ha de ser totalment hermètic per evitar pèrdues per volatilització.
- iii. L'aportació d'oxigen al reactor es fa mitjançant oxigen pur.



- 
- iv. Per minimitzar la volatilització del compost clorat present a la fase líquida i les conseqüents pèrdues que pot ocasionar, si no és imprescindible, no s'introdueix oxigen al reactor durant la degradació, sinó que s'afegeix tot el volum d'oxigen necessari per a que el fong degradi el contaminant abans d'introduir el contaminant al reactor. Aquest fet implica que el volum de fase gas del reactor haurà de ser suficient per contenir el volum d'oxigen necessari. Per assegurar que es produeix la degradació desitjada, és sobredimensiona en un 20% la quantitat necessària d'oxigen a afegir al reactor.
  - v. El volum de la fase líquida ha de ser igual o superior al volum necessari per submergir la biomassa utilitzada per al procés de degradació. Per tenir la certesa que el volum de líquid serà suficient, es sobredimensiona en un 20% el volum de la fase líquida necessari. Per calcular el volum de líquid necessari per encabir els pèl·lets s'utilitza la densitat aparent dels pèl·lets ( $\rho_{ap}$ ), entre d'altres paràmetres, que correspon a la massa de biomassa, mesurada com a pes sec, que pot trobar-se submergida en un litre de líquid i que s'ha determinat experimentalment amb un valor de 6,80 g pes sec/L.
  - vi. La concentració inicial de TCE a la fase líquida serà inferior a 15 mg/L, perquè en condicions reals, és molt poc probable que sigui necessari tractar un corrent amb una concentració de TCE d'aquest ordre de magnitud, perquè els valors de concentració d'aquest contaminant detectats en aqüífers són significativament inferiors a aquest valor màxim fixat.

#### 4.2.5.1 Procediment de càlcul dels paràmetres del reactor

La figura 4.15 descriu el procediment de càlcul dels paràmetres del reactor, mitjançant un diagrama de blocs.



#### 4.2.5.2 Resultats obtinguts

Utilitzant el procediment explicat en l'apartat anterior, s'ha realitzat el disseny del reactor, amb un volum total de 1 litre, per a diferents percentatges de degradació (50, 60, 70, 80 i 90%) i per a un ampli interval de massa inicial de TCE per a comparar els diferents resultats obtinguts.

A la taula 4.12 es mostra una comparativa dels valors dels paràmetres del reactor obtinguts per als diferents percentatges de degradació per a una concentració d'afluent fixada (10 mg/L) i utilitzant l'equació de primer ordre com a equació pseudo-cinètica de degradació.

**Taula 4.12.** Paràmetres del reactor per a una concentració de TCE a l'afluent de 10 mg/L i diferents percentatges de degradació.

% de degradació	C afluent (mg/L)	Quantitat TCE afluent (mg)	C <sub>0</sub> líquid reactor (mg/L)	C efluent (mg/L)
80	10	4	5,0	2,0
70	10	4,6	5,4	3,0
60	10	5,1	5,6	4,0
50	10	5,5	5,8	5,0

**Taula 4.13.** Paràmetres del reactor per a una concentració de TCE a l'afluent de 10 mg/L i diferents percentatges de degradació.

% de degradació	C afluent (mg/L)	Temps de degradació mínim (h)	Volum líquid reactor (L)	Volum líquid reactor/temps (L/h)
80	10	8,5	0,40	0,05
70	10	6,5	0,45	0,07
60	10	5	0,50	0,10
50	10	3,9	0,55	0,14

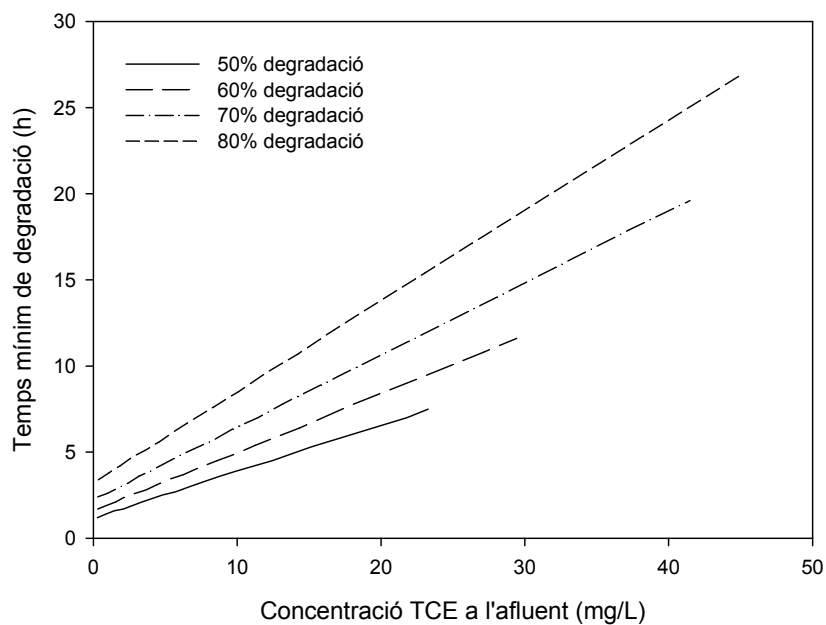
A les taules 4.12 i 4.13 es pot comprovar que es necessiten temps realment baixos (entre 3,9 i 5 hores) per aconseguir una degradació entre el 50 i el 60% en un reactor d'1 litre amb un afluent d'una concentració de TCE de 10 mg/L, i es pot tractar un volum important d'afluent per càrrega (entre 0,5 i 0,55 l), però el corrent tractat, un cop acabat el procés en discontinu, té una concentració elevada de TCE (entre 4 i 5 mg/L de TCE). Per tant, per a una concentració d'afluent de 10 mg/L, és preferible obtenir un percentatge de degradació més elevat, al voltant del 80% o superior, per tenir un corrent tractat amb una concentració prou baixa de TCE (inferior a 2 mg/L) i

ahora es pot tractar també un volum d'afluent prou elevat per càrrega (al voltant de 0,4 l) i el temps de degradació necessari per càrrega no és molt elevat (8,5 h).

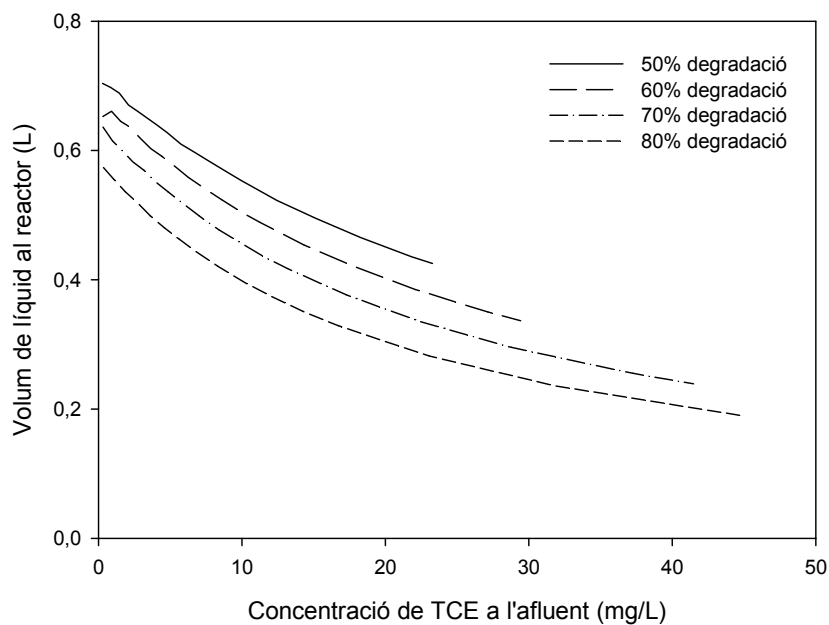
La relació entre el volum de líquid al reactor per càrrega i el temps de degradació mínim permet calcular, si es menyspreen els temps morts entre càrregues, el temps necessari per tractar un cert volum d'afluent. Per exemple, per a una concentració de 10 mg/L i un percentatge de degradació del 80%, és necessari 200 h, que equivalen a 8,3 dies, per tractar 10 litres d'afluent en un reactor d'1 litre. Aquesta relació entre el volum a tractar i el temps de tractament permet estimar la viabilitat de tractar un afluent segons el seu volum total en quant al temps de degradació necessari i estimar també quin és el volum de reactor adequat per tractar un determinat afluent.

És important comentar que el temps necessari per assolir l'equilibri sòlid-líquid no correspon, en el cas del reactor, al valor corresponent als experiments d'adsorció (apartat 4.2.2.1), perquè aquests es van realitzar sota unes condicions determinades d'agitació, i en el cas del reactor, per tal de disminuir el temps per assolir l'equilibri es pot utilitzar una velocitat d'agitació més elevada, entre d'altres opcions, afavorint així la transferència de matèria entre les diferents fases i disminuint el temps necessari per arribar a l'equilibri.

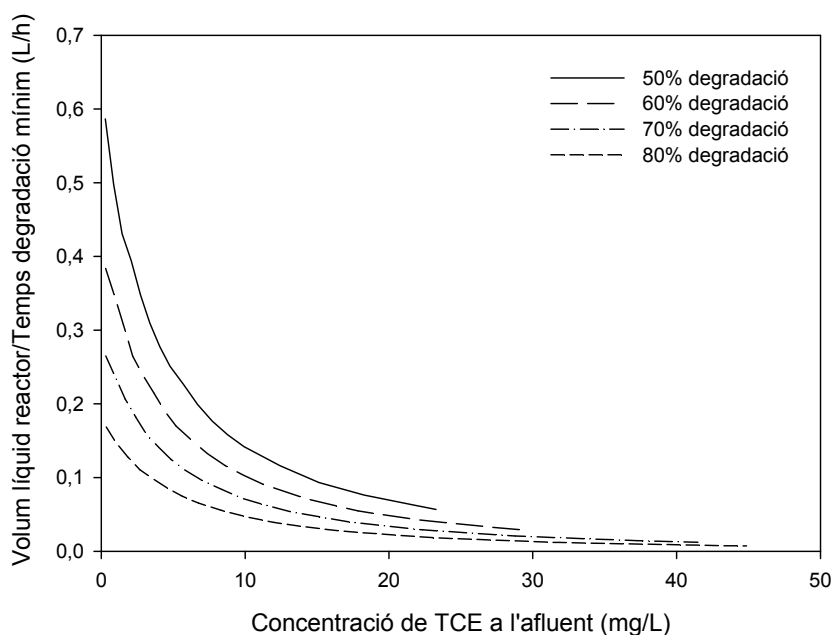
D'altra banda, el percentatge de degradació és un aspecte molt important que influeix en els valors dels paràmetres del reactor per a una mateixa concentració de TCE d'entrada i un estudi dels resultats dels diferents paràmetres segons el percentatge de degradació permet saber, per exemple, quin percentatge és el més idoni en cada cas o quin és el percentatge de degradació que serà viable assolir per una determinada concentració de contaminant. A les figures figura 4.16, figura 4.17 i figura 4.18 mostren la variació de diferents paràmetres al reactor, amb un volum de 1 litre, calculats utilitzant l'equació de primer ordre i per a diferents percentatges de degradació segons la concentració de TCE a l'afluent.



**Figura 4.16.** Temps de degradació mínim de tractament per càrrega per a diferents percentatges de degradació.



**Figura 4.17.** Volum líquid de l'afluent que es pot tractar per càrrega per a diferents percentatges de degradació.



**Figura 4.18.** Relació entre el volum de líquid a tractar i el temps mínim de degradació per càrrega per a diferents percentatges de degradació.

Les tres figures anteriors permeten comparar els resultats obtinguts per diferents percentatges de degradació. A partir de la figura 4.16, es pot comprovar que, per una concentració fixada, si es vol obtenir un major percentatge de degradació, és necessari un major temps de tractament i la figura 4.17 mostra que el volum de líquid que es pot tractar serà menor, perquè aquest es calcula a partir del volum de fase gas (figura 4.15), entre d'altres, que és proporcional a la quantitat d'oxigen necessària (el factor de proporcionalitat és la densitat d'oxigen) i si augmenta el percentatge de degradació, la quantitat d'oxigen necessària és major i per tant, es necessita un volum de fase gas més gran, obligant a reduir el volum de líquid a tractar per càrrega.

Un altre aspecte important a comentar és que per als percentatges de degradació més baixos, la concentració màxima de TCE de l'afluent que es pot tractar és menor, perquè el volum de líquid al reactor és més elevat (figura 4.17) i per tant l'equilibri vapor-líquid es troba més desplaçat cap a la fase líquida que per a percentatges més elevats, augmentant la concentració de TCE al líquid un cop establert l'equilibri entre fases. Si es volgués tractar un afluent pel qual s'obtingués una concentració de TCE a la fase líquida, un cop establert l'equilibri, major al valor màxim fixat, que correspon a 15 mg/L, s'hauria d'operar en cada càrrega amb un volum inferior al màxim que es pugui tractar perquè l'equilibri vapor-líquid es trobi més desplaçat cap a la fase gas i així la concentració a la fase líquida sigui menor un cop establert l'equilibri.

Les figures anteriors també permeten valorar la viabilitat de tractar un afluent segons la seva concentració d'entrada, el seu volum i el percentatge de degradació desitjat. La figura 4.18 permet saber el temps necessari per tractar un volum determinat d'un afluent amb una concentració determinada. A partir d'aquesta figura, es pot comprovar que per a percentatges de degradació més elevats (70 i 80%) i per a concentracions d'afluent majors a 15 mg/L, el volum de líquid que es pot tractar per hora és baix (valors inferiors a 0,055 L/h) i això implica que és requereix un temps molt elevat per a tractar volums importants d'afluent al reactor. Per exemple, per tractar afluents amb un volum entre 40 i 50 litres, una concentració de 20 mg/L i obtenir percentatges de degradació entre un 70 i un 80% es requereix un temps de tractament que pot anar des de 1000 fins a 2500 hores. Per tant, depenent de quin és l'objectiu fixat en el tractament, per exemple, obtenir un corrent de sortida amb la concentració més baixa possible o que el temps de tractament de l'afluent no sigui molt elevat, s'ha de fixar un percentatge de degradació més o menys elevat.

A partir de les figures presentades en aquest apartat es pot conèixer com varien els paràmetres de disseny del reactor per a diferents concentracions de TCE a l'afluent i diferents percentatges de degradació i obtenir tota la informació necessària per seleccionar les condicions d'operació en funció de les característiques de l'afluent i de l'objectiu a assolir en la degradació del TCE. A més a més, es poden obtenir altres informacions addicionals com quin és el percentatge de degradació per a una determinada concentració d'afluent a partir del qual la relació entre el volum de líquid a tractar i el temps de degradació per càrrega és massa baixa i per tant ja no és aconsellable treballar-hi, o també saber a partir de quina concentració de TCE a l'afluent per a un determinat percentatge de degradació és poc viable treballar perquè el temps de degradació per càrrega és massa elevat o el volum de líquid a tractar per càrrega és massa petit.

Un cop finalitzat el procediment de disseny del reactor per degradar TCE mitjançant el fong i realitzades diferents simulacions per saber com varien els valors resultants de certs paràmetres del procés, com són el temps de degradació necessari o el volum de líquid a tractar per batch, és necessari aplicar aquest procediment de disseny en condicions reals per a comprovar si utilitzant els paràmetres calculats a partir del disseny s'obtenen, en condicions reals, valors de degradació semblants al percentatge de degradació desitjat. És important comentar que el procediment de disseny realitzat podria ser aplicable per a qualsevol procés de degradació d'un

compost volàtil, tenint en compte que s'haurien de recalculer els paràmetres intrínsecs al compost inclosos en el disseny.

En el següent apartat es mostra l'aplicació del procediment de disseny del reactor per degradar TCE mitjançant *T. versicolor* en dos sistemes experimentals diferents. En primer lloc, el procediment es va aplicar en ampolles de sèrum de 500 mL. Un cop realitzats diferents experiments en ampolles de sèrum, comprovar les diferents limitacions d'aquest sistema experimental i estudiar l'efecte de diferents paràmetres en la degradació de TCE, es va realitzar un canvi d'escala i es va aplicar el procediment de disseny en un reactor hermètic de tanc agitat de 2 L de volum.

#### **4.2.6 Aplicació del procés de disseny del reactor per degradar TCE i estudi de l'efecte de diferents paràmetres experimentals sobre la seva degradació**

Els experiments previs en el nostre grup de recerca sobre degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* s'havien portat a terme tots en ampolles de sèrum de 125 mL (Marco-Urrea, 2007) i per aplicar el procediment de disseny del reactor, es va realitzar un primer augment de volum per treballar en ampolles de sèrum de 500 mL.

Prèviament a l'estudi de l'efecte de diferents paràmetres en la degradació de TCE en ampolles de sèrum, es mostra un breu apartat on hi ha una estimació del temps d'esgotament de l'oxigen en els experiments de degradació de TCE mitjançant el fong tant en ampolles de 125 mL com de 500 mL. L'estimació del temps d'esgotament de l'oxigen aporta informació important per tal de discutir els resultats de degradació que posteriorment es presenten, tenint en compte que, la possibilitat de mesurar l'evolució de la concentració d'oxigen al llarg del temps mitjançant un sensor òptic en els experiments de degradació en ampolles de sèrum, va sorgir un cop ja s'havien realitzat tots els experiments de degradació de TCE inclosos en aquesta memòria de tesi.

##### **4.2.6.1 Estimació del temps d'esgotament d'oxigen en les ampolles sèrum**

A partir del valor de consum d'oxigen mig per pes sec de biomassa obtingut en l'apartat 4.2.3, es pot calcular el temps d'esgotament d'oxigen disponible en els dos



tipus d'ampolles de sèrum de diferents volums usades en els experiments de degradació de TCE (125 mL i 500 mL).

En el cas de les ampolles de 125 mL (Volum útil de 161 mL), el volum de fase líquida utilitzat en els experiments és de 10 mL i per tant, el de fase gas és de 151 mL. Si ambdues fases es troben saturades d'oxigen, a partir de la solubilitat de l'oxigen pur en aigua a 25°C (Metcalf, 1985), es pot calcular la quantitat d'oxigen en fase líquida:

$$10 \text{ mL líquid} \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \frac{39,90 \text{ mg O}_2}{1 \text{ L}} = 0,40 \text{ mg O}_2 \text{ en fase líquida}$$

Considerant que la densitat de l'oxigen a 1 atm i 25°C és 1,3 g/L, es pot calcular la quantitat d'oxigen en la fase gas de les ampolles a l'inici de l'experiment:

$$151 \text{ mL de fase gas} \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \frac{1300 \text{ mg O}_2}{1 \text{ L}} = 196,3 \text{ mg O}_2 \text{ en fase gas}$$

Per tant, la quantitat total d'oxigen a l'inici de l'experiment és la suma de la quantitat d'oxigen a la fase gas i a la fase líquida i correspon a un valor de 196,7 mgO<sub>2</sub>.

Si s'utilitza el valor mig de biomassa (pes sec) obtingut en els diferents experiments de degradació de TCE, que correspon a un valor de 0,059± 0,004 g, es pot calcular el temps pel qual s'exhaurirà l'oxigen a les ampolles de sèrum:

$$\frac{196,7 \text{ mgO}_2}{29 \frac{\text{mgO}_2 \text{ consumits}}{\text{h} \cdot \text{g pes sec}} \cdot 0,059 \text{ g pes sec}} = 114,7 \text{ h} = 4,8 \text{ dies}$$

En el cas de les ampolles de 500 mL (Volum útil de 539 mL), els càlculs es realitzen de forma anàloga al cas anterior, tenint en compte que els experiments es van realitzar amb dos volums de líquid diferents, 45 i 31,1 mL, amb un volum de fase gas de 494 i 507,9 mL, respectivament. Les quantitats totals d'oxigen inicial són 642,6 mL en el cas de 45 mL de fase líquida i 660,5 mL en el cas de 31,1 mL de fase líquida.

Tenint en compte que el pes sec mig utilitzat en experiments amb un volum de líquid de 45 mL és 0,24±0,02 g i per un volum de 31,1 mL és 0,19±0,02 g, el temps pel

qual s'esgota l'oxigen és de 92,7 hores (3,9 dies) per a 45 mL de líquid i 119,9 hores (5,0 dies).

#### 4.2.6.2 Estudi de l'efecte de diferents paràmetres en la degradació de TCE en ampolles de sèrum

Inicialment, al realitzar un canvi d'escala amb un augment del volum de treball des d'un volum de 125 mL fins a un volum de 500 mL. Es va realitzar un experiment previ (Experiments 1a i 1b - Taula 4.14) per comprovar si s'obtenia un percentatge de degradació similar en els dos tipus d'ampolles sèrum si el factor d'augment de volum també s'aplicava als altres paràmetres experimentals.

**Taula 4.14.** Resultats de degradació obtinguts en diferents experiments de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor*<sup>1</sup>.

		Concentració biomassa final (g pes sec/L)	Degradació experimental (%)
Experiment 1a	Ampolles de 500 mL (Temps exp.= 144h)	5,4 ± 0,2	60 ± 10
Experiment 1b	Ampolles de 125 mL (Temps exp.= 144h)	5,9 ± 0,4	78 ± 2
Experiment 2a	Ampolles de 500 mL (Posició horitzontal) (Temps exp.=168h)	5,2 ± 0,3	51 ± 3
Experiment 2b	Ampolles de 500 mL (Posició invertida) (Temps exp.=168h)	5,4 ± 0,2	52 ± 4
Experiment 3a	Ampolles de 500 mL (Posició horitzontal) (Temps exp.=120h)	6,4 ± 0,5	73 ± 5
Experiment 3b	Ampolles de 500 mL (Posició invertida) (Temps exp.=120h)	7,7 ± 0,7	53 ± 7

<sup>1</sup>En els experiments 2 i 3 es va aplicar el procediment de disseny del reactor i es va fixar un percentatge de degradació del 84% per a un temps de degradació de 96 hores.

A partir de la taula 4.14 es pot observar que la diferència de percentatge de degradació entre l'experiment 1a i 1b, que correspon a un valor del 23%, és significativa tot i treballar proporcionalment en les mateixes condicions experimentals. Aquests resultats indiquen que existeix un o més factors experimentals que limiten la degradació de TCE en el cas de les ampolles de 500 mL respecte les ampolles de 125 mL.

Un d'aquests factors podria estar relacionat amb la transferència de contaminant entre la fase gas i la fase líquida, la qual és un factor molt important en el procés de degradació perquè quan s'afegeix el contaminant, la major part de la massa de TCE es desplaça a la fase gas per la presència d'un elevat volum d'aquesta i l'alta volatilitat del compost. Per tant, tenint en compte que el procés de degradació només es produeix a la fase líquida, en el cas que la velocitat de transferència de contaminant entre les dues fases es trobi limitada, és possible que el percentatge de degradació total sigui inferior al que s'obtindria en un sistema experimental sense limitació en la transferència de matèria. Si es calcula la relació entre les àrees de transferència dels dos tipus d'ampolles s'obté un valor de 1,92, el qual és sensiblement inferior al valor de la seva relació de volums totals, que correspon a un valor de 3,35. Per tant, en el cas de les ampolles de 500 mL, es possible que l'àrea de transferència sigui insuficient per mantenir una velocitat de transferència de contaminant elevada tenint en compte el volum total de recipient i aquest fet podria incidir negativament en la degradació del contaminant.

A partir d'aquesta suposició, es va aplicar el procediment de disseny del reactor en un experiment per estudiar l'efecte de l'àrea de transferència de matèria en la degradació de TCE. En aquest cas, es va fixar un percentatge de degradació del 84% i es van establir els paràmetres calculats a partir del disseny del reactor en ampolles de 500 mL. A banda de treballar amb ampolles agitadaes en posició invertida (experiment 2a), es va treballar també amb ampolles agitadaes en posició horitzontal (experiment 2b), de manera que s'augmentava l'àrea de transferència de matèria en 2,72 vegades respecte a les ampolles en posició invertida. Tot i això, a la taula 4.14 es pot comprovar com els percentatges de degradació obtinguts en els experiments 2a i 2b són molt similars entre les dues configuracions d'agitació. Aquests resultats indiquen que l'àrea de transferència no és la responsable de la disminució del percentatge de degradació en les ampolles de 500 mL respecte les de 125 mL. A més a més, el percentatge de degradació assolit en els dos experiments és molt inferior al fixat en el procediment de disseny del reactor, que correspon a un valor de 84% per a un temps

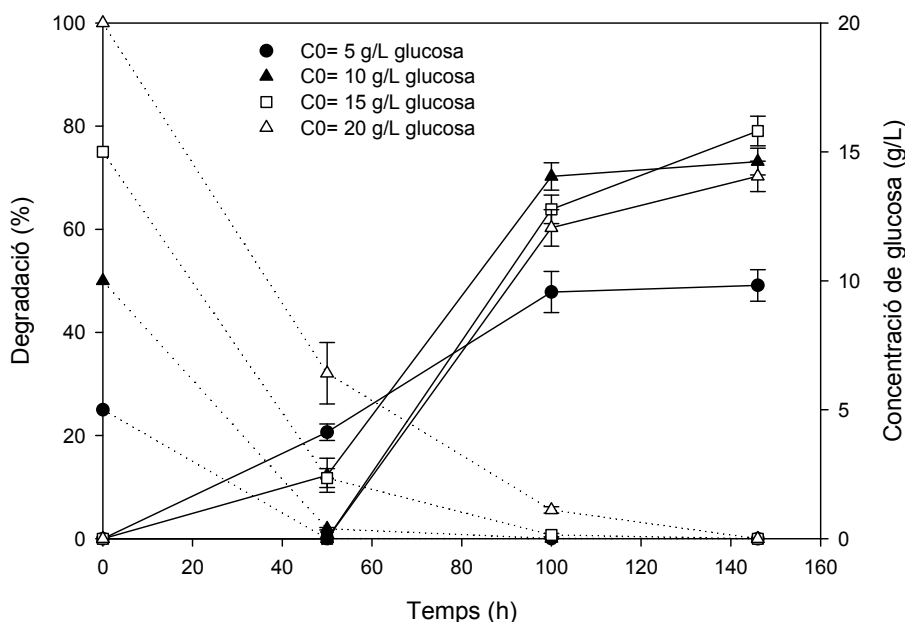
de degradació de 96 hores. Per tant, sembla clar que si un augment en l'àrea de transferència de matèria entre la fase gas i la fase líquida no suposa una millora en el rendiment de degradació, ha d'existir algun altre factor experimental que limita la degradació experimental de TCE en el cas de treballar en ampolles de sèrum de 500 mL.

Aquest factor podria ser la disponibilitat d'oxigen per part del fong. S'ha estimat que les condicions en que es realitzaven els experiments de degradació en ampolles de sèrum de 500 mL, l'oxigen s'hauria d'esgotar per a un temps de 93 hores (Apartat 4.2.6.1), quan s'ha comprovat que en presència d'oxigen el procés pot continuar fins a temps significativament més elevats (Marco-Urrea, 2007). Per aquesta raó, es va realitzar un experiment en unes condicions similars als experiments 2a i 2b, però reduint el volum de fase líquida per augmentar la quantitat d'oxigen en excés a afegir des d'un valor d'un 20% a un 35% (experiment 3). Per determinar els paràmetres experimentals es va utilitzar el procediment de disseny, fixant un percentatge de degradació de 84% i un temps de degradació de 96 hores. Segons la quantitat total d'oxigen addicionada, aquest s'hauria d'esgotar per un temps de 120 hores (Apartat 4.2.6.1).

Com es pot observar a la taula 4.14, en els experiments 3a i 3b no es va assolir el percentatge de degradació fixat, però en el cas de l'ampolla agitada en posició horitzontal (Experiment 3a) es va obtenir un valor de degradació més proper al valor fixat.

Si es comparen els resultats obtinguts en els experiments 3a i 3b amb els resultats obtinguts en els experiments 2a i 2b, s'observa que en el cas de treballar amb les ampolles en agitació horitzontal es va obtenir un percentatge de degradació superior, però no succeeix així en el cas de les ampolles en posició invertida. Per una banda, aquests resultats no permeten concloure si un augment de la disponibilitat d'oxigen augmenta el rendiment de degradació de TCE, perquè només es va obtenir un augment de degradació en el cas de treballar amb ampolles agitades en posició horitzontal. D'altra banda, entre els experiments 3a i 3b sí s'observa una diferència de degradació important si s'agiten les ampolles en posició horitzontal en relació a si s'agiten en posició invertida, però com que en els experiments 2a i 2b no va succeir així, els resultats no són conclouents en quant a si l'àrea de transferència de matèria entre la fase gas i la fase líquida és un factor important en la degradació de TCE.

Un altre factor que pot tenir un efecte important en la degradació de TCE és la concentració inicial de glucosa. Es va realitzar un experiment de degradació de TCE amb quatre concentracions inicials de glucosa diferents (5, 10, 15 i 20 g/L) en ampolles de sèrum de 125 mL. A partir de la figura 4.19 es pot comprovar que per a una concentració de glucosa inicial de 5 g/L, aquesta es va exhaurir completament per a un temps de 48 hores i a partir d'aquest moment, la degradació es troba clarament limitada per la manca de glucosa, obtenint per a un temps de 146 hores un percentatge de degradació clarament inferior al obtingut per a les altres concentracions inicials de glucosa. En canvi, per a concentracions igual o superiors a 10 g/L, els resultats de degradació indiquen que no hi ha un diferència important en el percentatge final assolit i per tant, podem afirmar que no existeix limitació de la degradació de TCE per manca de glucosa si aquesta es troba en un valor de concentració inicial de 10 g/L o superior.



**Figura 4.19.** Evolució de la degradació de TCE (línia contínua) i de la concentració de glucosa (línia discontinua) en l'experiment amb diferents concentracions inicials de glucosa.

D'altra banda, a partir de la figura 4.19 es pot comprovar que en el període inicial s'obté una major degradació de TCE si la concentració de glucosa inicial és menor. En el cas d'una concentració inicial de glucosa de 5 g/L, es va obtenir una degradació del 20,6% per a un temps de 50 hores. En canvi, per a concentracions de glucosa igual o superiors a 10 g/L, la degradació per a les primeres 50 hores és significativament menor o nul·la. En el cas de les concentracions de glucosa més elevades, 15 i 20 g/L, sembla que el fet de disposar d'una major quantitat de glucosa provocaria que l'expressió del citocrom P450 per part del fong s'iniciés més tard que per a les

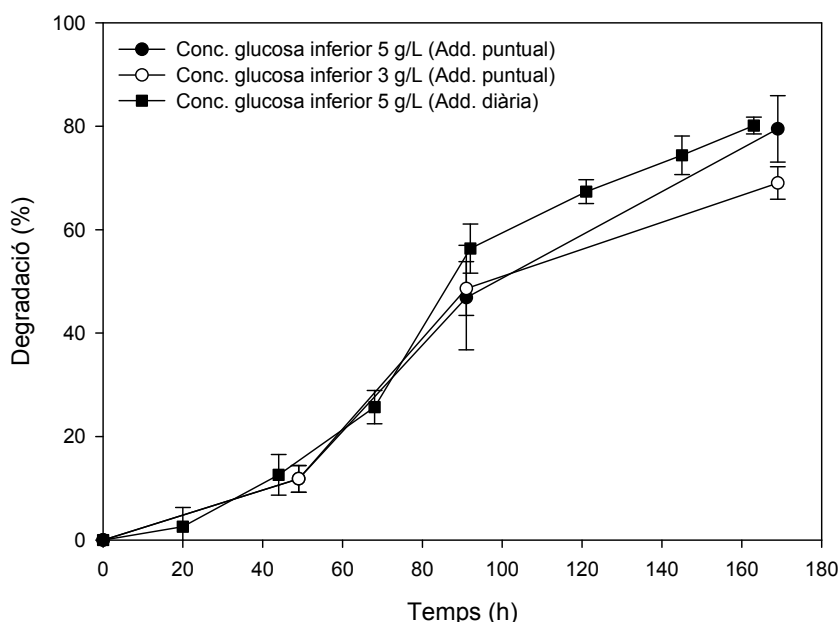
concentracions de glucosa inferiors i per tant, la degradació del contaminant no s'apreciés durant aquest primer període, sinó a partir d'un temps de 50 hores, quan la concentració de glucosa ja es trobés en concentracions baixes en tots els casos. A partir d'aquest temps, el rendiment de degradació de TCE obtingut per a les concentracions de contaminant majors o iguals a 10 g/L va augmentar considerablement, assolint percentatges de degradació superiors al 60% per a un temps de 100 hores. A partir d'aquest temps, es pot observar que l'augment del percentatge de degradació ja no és tan accentuat. Les principals causes d'aquesta disminució de la degradació de TCE es troben en l'esgotament de l'oxigen present a la fase gas, que en principi es produeix a partir d'un temps de 115 hores (Apartat 4.2.6.1), i en l'esgotament de la glucosa, que els resultats obtinguts indiquen que també té un efecte negatiu en la degradació del contaminant per part del fong.

En el cas de l'oxigen, al ser la degradació de TCE per part del fong un procés aerobi, és clar que quan aquest s'esgota completament, el procés d'oxidació del TCE s'ha d'aturar al cap d'un temps perquè aquest element és imprescindible per a que tingui lloc la reacció al actuar com a acceptor d'electrons provinents de la molècula de TCE.

El temps d'esgotament de l'oxigen obtingut per les ampolles de sèrum és semblant al calculat en l'article publicat per Yadav i Reddy (1993) per cultius de *P. chrysosporium* en un experiment en condicions semblants de degradació de BTEX en ampolles de sèrum de 125 mL, on inicialment els medis també es trobaven saturats d'oxigen. Segons els seus càlculs, el 95,4% de l'oxigen disponible era consumit a les 120 hores i aquesta era una de les causes que justificava l'estancament de la degradació de BTEX al cap de la primera setmana de tractament. Com s'ha comentat anteriorment, la disminució de la degradació de TCE a partir de les 100 hores reafirma la hipòtesis que l'esgotament de l'oxigen és clarament un factor limitant per al procés de degradació de TCE.

A partir dels resultats obtinguts en l'experiment amb diferents concentracions inicials de glucosa, on s'ha comprovat que el major rendiment de degradació de TCE es produeix quan la concentració de glucosa és baixa, sorgeix la incògnita de si és possible augmentar el rendiment de degradació de TCE del fong si es manté una concentració baixa de glucosa durant tot l'experiment però sense que aquesta s'esgoti. Per aquesta raó, primer es va realitzar un experiment de degradació del contaminant en ampolles de sèrum de 125 mL amb una concentració inicial de glucosa de 5 g/L i

amb addicions periòdiques de glucosa durant l'experiment per mantenir en un cas la concentració de glucosa en un rang inferior a 5 g/L i en un altre cas, en un rang inferior a 3 g/L. Posteriorment, es va realitzar un tercer experiment en el mateix tipus d'ampolles amb una concentració inicial de glucosa 1 g/L i addicions diàries d'aquest substrat per mantenir la seva concentració en un rang inferior a 5 g/L. A partir de la figura 4.20, es pot comprovar que per a les primeres 50 hores, tal com va succeir amb una concentració inicial de glucosa de 5 g/L (figura 4.19), es van obtenir majors percentatges de degradació en els experiments amb addició periòdica de glucosa que en els experiments amb una concentració inicial de glucosa superior a 10 g/L (figura 4.19), però no va succeir així pel període entre 50 i 100 hores. Al final de l'experiment, el percentatge de degradació de TCE obtingut en els experiments amb addició periòdica no va ser superior als experiments on s'afegia tota la quantitat de glucosa a l'inici.



**Figura 4.20.** Evolució de la degradació de TCE en els experiments amb addició periòdica de glucosa.

Per tant, els resultats presentats a la figura 4.20 mostren que en les condicions experimentals utilitzades en els experiments en ampolles de sèrum, la concentració de glucosa no és un paràmetre crític per a la reacció de degradació de TCE com ho és la disponibilitat d'oxigen i en quant a l'estratègia d'addició de glucosa, és igual d'eficient, en termes de percentatge de degradació final, utilitzar una concentració de glucosa inicial de 10 g/L o superior i no realitzar cap addició de substrat al llarg de l'experiment que utilitzar una concentració inicial de glucosa inferior a 5 g/L però realitzar addicions periòdiques de substrat durant l'experiment.

Ara bé, si es treballa amb un sistema experimental on existeixi la possibilitat d'addicionar oxigen durant el procés de degradació per tal d'evitar que aquest s'exhaureixi, el rol de la concentració de glucosa hauria de ser més important, perquè en el cas d'aconseguir mantenir una concentració mínima d'oxigen durant tot l'experiment, la reacció no s'hauria d'aturar si hi ha presència tant d'oxigen com de glucosa. Com que no és possible comprovar aquesta hipòtesis si es treballa amb ampolles de sèrum al no ser experimentalment viable addicionar-hi oxigen durant l'experiment, és necessari disposar d'un sistema experimental com és un bioreactor que treballi en condicions hermètiques i permeti l'addició d'oxigen i glucosa durant l'experiment.

#### **4.2.6.3 Estudi de l'efecte de diferents paràmetres experimentals en la degradació de TCE en reactor de tanc agitat**

Un cop s'ha estudiat com afecten diferents paràmetres experimentals en la degradació de TCE per part del fong i que per una banda, s'ha comprovat que, en el cas de treballar amb les ampolles de sèrum de 500 mL, no s'assoleix el percentatge de degradació fixat en el procediment de disseny, i que per altra banda, en els experiments en ampolles de sèrum no és possible disposar de la presència durant tot l'experiment d'un paràmetre clau en el procés de degradació com és l'oxigen, es va decidir realitzar un canvi d'escala i utilitzar un sistema experimental amb un volum major per aplicar el procediment de disseny i que permet l'addició d'oxigen i de fase líquida durant l'experiment. Aquest sistema consisteix en un reactor de tanc agitat de 2 litres de volum que permet treballar en condicions hermètiques a valors de temperatura i pressió molt elevats i que està equipat amb un sistema accessori per introduir oxigen i un altre per introduir líquid al reactor. En el cas de l'aplicació del procés de degradació de TCE mitjançant el fong en aquest reactor, es pot considerar que el sistema opera en condicions hermètiques, però es va comprovar que dues de les operacions que es realitzen durant un experiment de degradació podrien causar pèrdues de TCE per volatilització. Aquestes operacions corresponen a la introducció de la solució concentrada de TCE en el reactor a l'inici de l'experiment i a la presa de mostra de fase líquida per analitzar la concentració de contaminant. Per aquest fet, es van portar a terme diferents estudis per comprovar l'hermeticitat del sistema experimental i en el cas que fos necessari, quantificar les pèrdues de contaminant per volatilització associades a les dues operacions experimentals que s'han mencionat anteriorment.



### Comprovació de l'hermeticitat al reactor durant el procés de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor*

Per portar a terme els estudis d'hermeticitat del reactor, es va treballar amb una solució aquosa de TCE amb una concentració teòrica inicial al reactor de 10 mg/L sense la presència del fong, per tal de comprovar si un cop s'afegia la solució concentrada de contaminant i es treia mostra al llarg del temps, la seva concentració a l'interior del reactor corresponia a la teòrica inicial i a més a més, es mantenia constant. La pressió de treball utilitzada en tots els estudis es trobava entre 5 i 6 bar.

Els diferents estudis van consistir en provar diverses formes d'introduir la solució concentrada de TCE al reactor abans d'iniciar l'experiment i en treure mostra amb el vial completament buit o introduint un volum d'aigua milliQ suficient perquè l'agulla de presa de mostra s'hi trobés submergida i el líquid extret no entrés en contacte directe amb la fase gas del vial. A partir d'aquests estudis es va comprovar que en tots els casos s'obtenia una concentració de TCE constant al treure mostra al llarg de temps, però aquesta era significativament més baixa que la teòrica inicial. Es va comparar el percentatge de pèrdua de TCE per volatilització obtingut en els diferents estudis i es va observar que s'obtenien valors de pèrdua de contaminant en el vial de mostra semblants entre els diferents protocols d'operació utilitzats. Realitzant una mitjana del percentatge de pèrdua de TCE obtingut en els diferents estudis, aquest es va quantificar en un valor de  $30 \pm 8\%$ .

A l'hora d'intentar identificar la font principal de les pèrdues de TCE en el reactor per volatilització, no és possible saber amb seguretat quina de les dues accions porta associada unes pèrdues més importants, si la introducció de TCE al reactor o la presa de mostra. Ara bé, els indicis apunten a que la causa principal correspon a la presa de mostra, perquè com generalment el líquid es troba a una pressió elevada a l'interior del reactor i el vial de presa de mostra es troba a pressió atmosfèrica, al treure mostra i entrar el líquid en contacte amb la fase gas del vial o amb el volum d'aigua afegit prèviament al vial, es produeix un efecte de destil·lació flash del líquid pel canvi bruscat de pressió. Llavors una part significativa del TCE present en la mostra líquida extreta es volatilitza i surt del vial per l'agulla de venteig. Per això, a l'analitzar la mostra s'obté una concentració de TCE significativament més baixa que el valor teòric de concentració de TCE a l'interior del reactor. La pèrdua de contaminant que es produeix al treure mostra no afecta a la seva concentració a l'interior del reactor, perquè s'extreu un volum molt petit respecte al volum total present, i per això, el percentatge de pèrdua que s'obté és constant per a les diferents mostres que s'extreuen al llarg del

temps. Ara bé, el valor mig de pèrdua de TCE obtingut en els diferents estudis, realitzats a una pressió absoluta al reactor entre 5 i 6 bar, no és un valor aplicable per a experiments amb el reactor en unes condicions diferents, perquè la fracció de contaminant que es volatilitza al treure mostra varia segons la diferència de pressió existent entre l'interior del reactor i el vial de presa de mostra. Tenint en compte que els experiments de degradació de TCE que es presenten en aquest apartat es van realitzar a diferents condicions de pressió, seria necessari realitzar un estudi de pèrdua de contaminant per a cadascuna d'aquestes condicions per tal de poder aplicar un factor de correcció en el percentatge de degradació obtingut en cada cas. Els percentatges d'eliminació de contaminant obtinguts en els diferents experiments en reactor són, en la majoria de casos, inferiors als percentatges de degradació obtinguts en ampolles de sèrum. Per aquest fet es va decidir no estudiar les pèrdues de contaminant en el reactor a les diferents condicions de treball i presentar els resultats com a percentatge d'eliminació en la mostra, pel fet que no s'aplica el corresponent factor de correcció. Aquests resultats es troben compilats a la taula 4.15.

#### Degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* en reactor de tanc agitat

En el primer experiment (experiment A - taula 4.15) es van calcular els paràmetres de disseny fixant un percentatge de degradació final del 90% per un temps de 3 hores. Per una banda, al treballar amb un temps de degradació molt més curt que els experiments realitzats en ampolles de sèrum, es va obtenir, a partir del procediment de disseny, una relació de volum de fase líquida respecte a volum de fase gas molt més elevada que les relacions utilitzades en els experiments en ampolles de sèrum. La degradació de TCE és directament proporcional a la quantitat de biomassa segons l'equació de primer ordre i si el temps de degradació fixat és baix, es necessita un elevat volum de líquid per contenir la quantitat de biomassa necessària. D'altra banda, respecte a la concentració de glucosa, es va decidir treballar amb una concentració inicial molt baixa (0,5 g/L) al tractar-se d'un experiment amb un temps de degradació molt curt. Pel que fa a la quantitat d'oxigen a afegir, aquesta venia marcada pels càlculs amb el procediment de disseny.

Al realitzar l'experiment, es va comprovar que per al temps de degradació fixat (3h) s'obtenia un percentatge d'eliminació de  $8 \pm 3\%$ , el qual és realment baix i molt allunyat del percentatge de degradació fixat. Llavors es va decidir allargar l'experiment per comprovar si s'obtenia un percentatge d'eliminació major al llarg del temps. Com que la concentració de glucosa i la quantitat d'oxigen inicials corresponien a la

necessària segons el procediment de disseny per un temps de degradació de 3h, es va realitzar una addició puntual de glucosa i diverses addicions puntuals d'oxigen abans de finalitzar l'experiment, assolint una pressió absoluta final a l'interior del reactor de 2,5 bar. Com es pot comprovar a la taula 4.15, el percentatge d'eliminació obtingut al final de l'experiment A tampoc és proper al valor fixat en el procediment de disseny.

**Taula 4.15.** Resultats d'eliminació de TCE obtinguts en diferents experiments en reactor de tanc agitat de 2 litres.

	Concentració de biomassa (g pes sec/L)	Temps final de degradació (h)	Eliminació en la mostra (%)
Experiment A	5,43	70,3	39 ± 1
Experiment B	2,81	140	52,6 ± 0,9
Experiment C	5,32	163,5	61,2 ± 0,9
Experiment D	5,37	162	65,5 ± 0,6
Experiment E	5,29	163	62,7 ± 0,2
Experiment F	5,46	309	73 ± 2

Per tant, després de comprovar que no és possible obtenir un alt percentatge de degradació de TCE per un temps molt curt de tractament, es va realitzar un segon experiment (experiment B - taula 4.15) utilitzant un temps de tractament més elevat (140 hores) i molt semblant a l'utilitzat en els experiments de degradació en ampolles de sèrum. Com que les condicions experimentals utilitzades en l'experiment A (valor elevat de relació de volums entre fase líquida i fase gas i elevada quantitat de biomassa) no són aplicables si es vol operar a temps de degradació de l'ordre de 140 hores, es va reduir el volum de líquid fins a un valor de 700 mL, que correspon al nivell mínim necessari per a poder treure mostra, i la concentració de biomassa fins aproximadament a la meitat (2,8 g pes sec/L respecte a un valor de 5,4 g pes sec/L). Pel que fa a la concentració de glucosa es va utilitzar una concentració inicial baixa (5 g/L) i es van realitzar addicions puntuals durant l'experiment per mantenir una concentració menor a 3 g/L. En el cas de l'oxigen, es va addicionar una quantitat important d'oxigen a l'inici de l'experiment i es van realitzar addicions puntuals fins assolir una pressió absoluta de 5 bar, que correspon a la màxima pressió possible que podia mesurar el manòmetre instal·lat al reactor. En aquest segon experiment, en principi, la quantitat total d'oxigen addicionada era suficient perquè aquest no s'exhaurís durant tot el procés de degradació.

A la taula 4.15 es pot comprovar que tot i que a l'experiment B es va obtenir un percentatge d'eliminació superior a l'experiment A, l'eliminació obtinguda va ser molt inferior al valor mínim que es desitjava assolir, que correspon a un percentatge de degradació del 90%. En aquest experiment no es va exhaurir la glucosa i suposadament tampoc l'oxigen i per tant, pel que fa a aquests dos paràmetres, en aquest cas, no haurien de suposar una limitació en el procés de degradació. En canvi, el percentatge d'eliminació final assolit mostra clarament que existeix un o varis factors que afecten negativament el procés de degradació de TCE mitjançant el fong.

A partir dels dos primers experiments realitzats en reactor, es va comprovar que els valors dels paràmetres obtinguts a partir del procediment de disseny del reactor no eren els adients de cara a obtenir el percentatge de degradació de TCE que s'havia fixat. Aquest fet indica que la pseudo-cinètica de degradació del contaminant, calculada a partir d'experiments en ampolles de sèrum (apartat 4.2.4), no s'ajusta a la degradació que té lloc en reactor i només es pot utilitzar com una aproximació del procés de degradació. Per tal de d'obtenir una cinètica que descriu millor el procés de degradació de TCE en aquest reactor, és necessari ajustar l'equació cinètica als valors experimentals de degradació obtinguts en els experiments en reactor i no en altres sistemes experimentals.

Al finalitzar l'experiment B, es va considerar que una possible causa del baix percentatge d'eliminació podia ser el fet de treballar amb una concentració de biomassa un 50% menor i per tant, que aquesta fos insuficient per assolir un percentatge de degradació elevat pel temps fixat. Per aquesta raó, es va realitzar un tercer experiment amb unes condicions experimentals molt similars a l'experiment B però augmentant la concentració de biomassa fins a un valor aproximadament igual al utilitzat en els experiments de degradació en ampolla (experiment C - taula 4.15). A més a més, es va augmentar la quantitat inicial d'oxigen al reactor mantenint una pressió absoluta al reactor de 5 bar durant tot l'experiment.

A la taula 4.15 es mostra el valor final d'eliminació obtingut en l'experiment C per un temps de 163,5 hores. Al treballar a una pressió més elevada que els experiments anteriors, es va realitzar una comprovació de l'estat del fong al finalitzar l'experiment i no es van observar danys en la seva estructura externa. Ara bé, és possible que el fet d'aplicar un valor de pressió de 5 bar durant un temps llarg afectés al seu metabolisme, perquè a partir d'un temps entre 80 i 90 hores, es va aturar la l'eliminació

de TCE i el consum de glucosa per part del fong, tot i que hi havia quantitat suficient d'oxigen per a tot l'experiment.

Pel que fa al percentatge final d'eliminació obtingut a l'experiment C, es pot observar que és lleugerament superior al valor obtingut en l'experiment B. Aquest augment podria significar que la utilització d'una major quantitat de biomassa beneficia el procés de degradació, però no suposa un augment prou significatiu per quedar demostrat.

A partir dels experiments B i C, es va comprovar que tot i treballar, suposadament, en condicions no limitants d'oxigen i glucosa durant el procés de degradació de TCE, no era possible assolir els nivells màxims de degradació obtinguts en els experiments en ampolla de sèrum, on no es treballava en condicions òptimes pel fong.

D'altra banda, per tal de comprovar com afecta l'absència de glucosa durant un període llarg en la degradació de TCE, es va realitzar un experiment en condicions de no limitació per oxigen (mateixes condicions que l'experiment C) però en absència de glucosa al medi a partir d'un temps aproximat 48 hores, mitjançant l'addició inicial d'una quantitat equivalent a 5 g/L de glucosa i no realitzant cap addició de glucosa concentrada durant l'experiment (experiment D).

A la taula 4.15, s'observa que al final de l'experiment D es va obtenir un percentatge d'eliminació lleugerament superior a l'experiment C. En quant a l'evolució de l'eliminació de TCE, a partir d'un temps de 70 hores, aquesta pràcticament ja no va augmentar. Per tant, l'evolució de l'eliminació de contaminant obtinguda és molt similar a la de l'experiment anterior, produint-se una aturada en el procés a partir d'un temps molt similar. A més a més, en aquest cas, a l'exhaurir-se la glucosa per a un temps de 48 h, és probable que la manca de substrat primari durant un temps llarg afectés negativament al fong repercutint en l'aturada de l'eliminació per a un temps prematur. Per tant, per tal d'assolir un percentatge de degradació el més elevat possible, és important evitar l'exhauriment de la glucosa realitzant addicions periòdiques d'aquest compost durant l'experiment.

Un altre paràmetre del qual és important conèixer el seu efecte sobre la degradació de TCE és el pH del medi. En tots els experiments de degradació es va treballar a un pH inicial de medi definit de 4,5. El medi utilitzat conté àcid 2,2-

dimetilsuccínic, que és un compost que actua com a tampó del pH de la solució, evitant una disminució brusca del pH a causa de les diferents reaccions que tenen lloc per l'acció del fong. Però aquest compost també és consumit pel fong i un cop s'exhaureix, el pH va disminuint al llarg del temps i per a un temps superior a 100 hores, generalment s'assoleix un valor al voltant de 3 (Borràs, 2011).

El rang de pH considerat com a òptim per a la producció enzimàtica del fong és troba entre 4 i 4,5 (Blánquez, 2005) i s'ha demostrat que l'acidificació del medi provoca una disminució de la producció dels enzims ligninolítics per part dels fongs de podridura blanca (Couto et al., 2004; Wang et al., 2008). En els experiments de degradació de TCE en ampolla, no es va realitzar control de pH i tot i això, els percentatges de degradació obtinguts van ser molt elevats (Figures 4.19 i 4.20). Per tant, tot i que l'acidificació del medi no afecta decisivament a la degradació de TCE, és interessant saber si el fet de treballar dins el rang de pH òptim durant tot l'experiment, augmenta l'eficiència del procés de degradació de TCE i per tant, el seu percentatge de degradació.

Per a dur a terme aquesta comprovació, es va realitzar un experiment en presència d'una quantitat en excés d'oxigen i d'una concentració baixa de glucosa durant tot l'experiment, i a més a més, es va realitzar un control manual de pH amb addicions puntuals de solució NaOH 1 M a través del sistema d'introducció de líquid al reactor per mantenir el pH entre 4 i 4,5 (experiment E). Malgrat alguna incidència que va provocar oscil·lacions del pH entre 3,8 i 5,0, en la major part de l'experiment, aquest es trobava dins del rang òptim.

A partir de la taula 4.15, es pot comprovar que el percentatge d'eliminació final obtingut en l'experiment E amb control manual de pH és molt similar al obtingut en l'experiment C sense control de pH. Per tant, els resultats indiquen que no s'obté una major degradació de TCE si el pH es troba a prop del rang òptim durant tot l'experiment que si no es realitza un control de pH i per tant, es produeix una acidificació del medi a mesura que avança l'experiment.

L'últim factor a estudiar que pot influir en el procés de degradació de TCE va ser la sobrepressió que s'aplica al reactor a causa de la introducció d'oxigen en condicions d'hermeticitat. Al no obtenir referències bibliogràfiques de sistemes experimentals semblants a l'utilitzat, es van realitzar diferents experiments en reactor per obtenir informació sobre aquest aspecte. El principal problema d'estudiar l'efecte de la

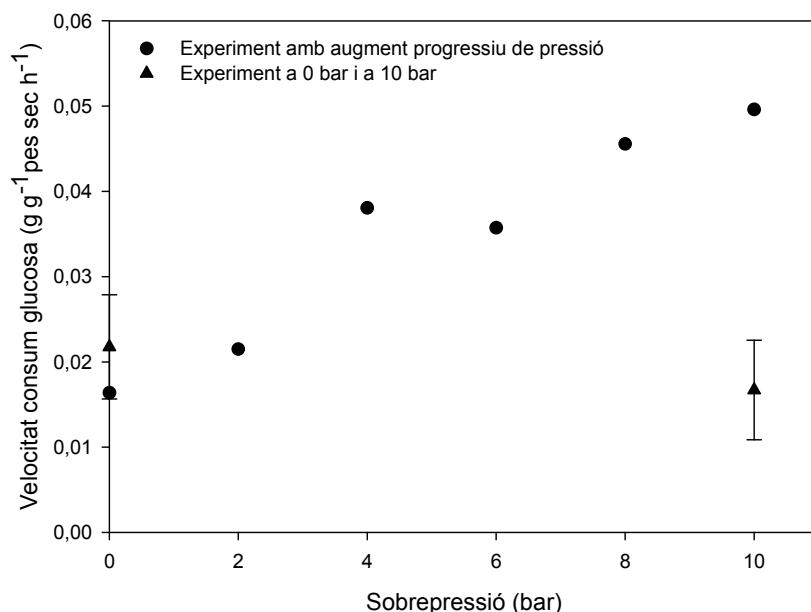
sobrepressió en la degradació de TCE és que no és possible comparar la degradació amb i sense condicions de sobrepressió al reactor, perquè per assegurar que el fong disposi d'oxigen suficient durant tot l'experiment és necessari addicionar inicialment una certa quantitat d'oxigen equivalent a una sobrepressió mínima de 2 bar i és probable que durant l'experiment la pressió dins el reactor augmenti encara més per la necessitat de realitzar addicions puntuals d'oxigen.

Davant la impossibilitat d'estudiar el procés de degradació de TCE en tot el rang de pressions, es va decidir treballar amb el reactor amb condicions d'hermeticitat i estudiar l'efecte de la sobrepressió sobre el consum de glucosa i la producció d'enzim extracel·lular lacasa a partir d'experiments amb el fong submergit en medi definit però sense la presència de TCE. L'estudi de l'efecte de la sobrepressió sobre aquests dos paràmetres és una forma de conèixer com afecta aquesta sobre l'activitat enzimàtica i l'assimilació de substrats per part del fong. A més a més, aquest estudi pot aportar informació que ajudi a entendre com afecta la sobrepressió en la degradació d'un contaminant volàtil per part del fong.

Es van realitzar tres experiments diferents en les mateixes condicions però canviant els nivells de sobrepressió entre un experiment i l'altre. El primer experiment es va realitzar sense sobrepressió, el segon amb la sobrepressió màxima que es podia aplicar en aquell moment al reactor (10 bar) i en el tercer es va incrementar progressivament la sobrepressió des d'un valor de 0 bar fins a 10 bar, amb un augment de 2 bar per cada increment.

Pel que fa al consum de glucosa, a la figura 4.21 es pot observar que, d'una banda, la diferència entre la velocitat mitjana de consum de glucosa obtinguda en l'experiment sense sobrepressió ( $0,022 \pm 0,006$  g/(g pes sec·h)) i l'obtinguda en l'experiment amb una sobrepressió de 10 bar ( $0,017 \pm 0,006$  g/(g pes sec·h)) no és significativa i per tant, es dedueix que el fet de treballar a una sobrepressió de fins a 10 bar no afecta negativament al sistema fisiològic del fong per assimilar aquest substrat primari. D'altra banda, en aquesta mateixa figura s'observa que si es realitza un augment de sobrepressió de forma progressiva, es produeix un augment de la velocitat de consum de glucosa a mesura que augmenta la pressió, obtenint per a una sobrepressió final de 10 bar un valor de consum de glucosa de  $0,050$  g/(g pes sec·h) que correspon a un valor 2,25 cops major al valor de consum obtingut a l'experiment realitzat a 10 bar. Com s'ha comentat anteriorment, no es disposa d'informació bibliogràfica on s'estudiï l'efecte de la sobrepressió sobre el funcionament del fong i a

partir dels resultats obtinguts és difícil deduir una causa que justifiqui l'estimulació del consum de glucosa per part del fong a l'augmentar la pressió progressivament.



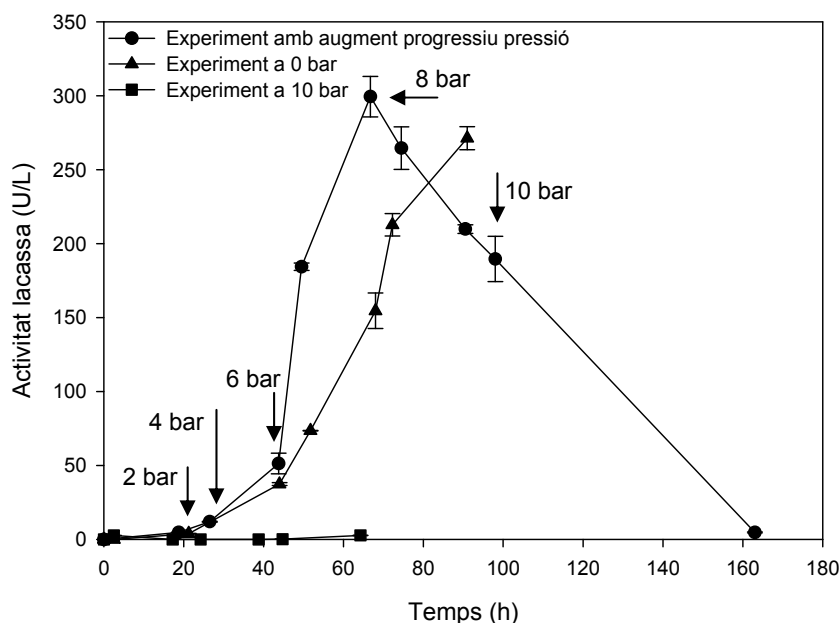
**Figura 4.21.** Velocitats mitjanes de consum de glucosa obtingudes en experiments al reactor amb diferents valors de sobrepressió.

Els resultats presentats a la figura 4.21 indiquen que en els experiments de degradació de TCE, la pressió aplicada al reactor no ha de ser un factor limitant que provoqui una aturada o un menor consum de glucosa de l'esperat durant l'experiment, tant si es realitza un canvi de pressió d'una magnitud elevada com si es realitza un augment progressiu de la pressió al llarg del temps

Pel que fa a la producció d'enzim lacasa per part del fong, a la figura 4.22 es mostra en primer lloc, que si es treballa des d'un inici a una sobrepressió de 10 bar, pràcticament no hi ha producció d'aquest enzim. En canvi, en el cas de l'experiment amb el fong sense condicions de sobrepressió, la producció de l'enzim lacasa va augmentant al llarg del temps fins assolir un valor màxim d'activitat de  $271 \pm 8$  U/L per a un temps de 91h. En el cas de treballar amb un augment progressiu de pressió, es va assolir el nivell màxim d'activitat lacasa per a un temps de 74,5 h, amb un valor de  $300 \pm 13$  U/L. Si es compara el gràfic de l'experiment sense sobrepressió amb l'obtingut en l'experiment amb augment progressiu de pressió, es pot observar que l'augment de l'activitat lacasa és similar i els valors màxims obtinguts en els respectius experiments són molt semblants. El descens d'activitat lacasa que s'observa en l'experiment amb augment de pressió després d'assolir el valor màxim d'activitat succeeix també generalment en els experiments de degradació de contaminants



mitjançant el fong, tal com s'ha observat en el cas de la degradació de TCE en ampolles de sèrum (Marco-Urrea et al., 2008a). Per tant, aquest descens de l'activitat lacasa no es troba relacionat amb el fet de treballar a una pressió elevada i de fet en l'experiment sense sobrepressió també hagués tingut lloc si s'hagués allargat l'experiment.



**Figura 4.22.** Evolució de l'activitat lacasa en els diferents experiments sobre l'efecte de la sobrepressió en el fong. S'indica amb una fletxa quan es va realitzar un increment de pressió i el valor de sobrepressió assolit.

Respecte als valors màxims d'activitat lacasa obtinguts en els experiments sense sobrepressió i amb augment progressiu de pressió, si aquests es comparen amb els valors d'activitat lacasa obtinguts en experiments de degradació de TCE mitjançant el fong en ampolles de sèrum, s'observa que en presència del contaminant s'obté una major producció de lacasa per part del fong, assolint valors màxims superiors a 1000 U/L per a concentracions de TCE entre 10 i 20 mg/L (Marco-Urrea et al., 2008a). El fet que s'obtingui una major activitat d'aquest enzim en presència de TCE indica que aquest contaminant és inductor de la producció de lacasa per *T. versicolor*.

Tenint en compte que l'enzim lacasa no es troba implicat en la degradació de TCE (Marco-Urrea et al., 2008a), els resultats presentats a la figura 4.22 no es poden relacionar directament amb la degradació del contaminant en reactor per a diferents condicions de pressió. D'altra banda, l'evolució de l'activitat dels altres enzims produïts pel fong, entre ells el citocrom P450 pot ser diferent a l'observada per la lacasa a diferents condicions de pressió. Per tant, l'estudi de l'efecte de la pressió sobre la producció de lacasa per part del fong és simplement una indicació de com es podria

comportar el sistema enzimàtic del fong durant el procés de degradació de TCE en reactor.

Finalment, un cop estudiades les possibles limitacions del procés experimental de degradació de TCE en reactor i després d'instal·lar al reactor una sonda de fibra òptica per tal de mesurar per fluorescència la concentració d'oxigen dissolt en la fase líquida, es va realitzar un experiment de degradació d'aquest compost (experiment E) amb unes condicions molt semblants a l'experiment D, excepte l'addició d'oxigen al reactor i per tant, la sobrepressió. En aquest experiment es va afegir oxigen puntualment amb l'objectiu de mantenir un percentatge en fase líquida superior al 20% i de fet es va treballar durant tot l'experiment en nivells d'oxigen força més elevats, entre un 80% i un 120% fins a les 110 hores i després a causa de l'addició d'oxigen produïda pel seu ús com a gas per introduir glucosa concentrada i NaOH al reactor, el seu percentatge va augmentar fins a un valor de 220%, que correspon al valor de saturació de la sonda, a partir d'un temps de 170 hores i es va mantenir aquest valor fins al final de l'experiment. La sobrepressió màxima que es va assolir al reactor va ser de 3,25 bar a partir d'un temps de 125 hores i aquesta pressió es va mantenir més o menys constant fins al final de l'experiment. Aquest fet indica que els valors de sobrepressió que s'havien aplicat en tots els experiments previs, excepte en l'experiment A (taula 4.15), es trobaven sobredimensionats respecte les necessitats d'oxigen del fong al reactor i per tant, en cap d'aquests casos s'hauria d'haver esgotat l'oxigen durant el procés de degradació de TCE.

A la taula 4.15, es pot observar que el percentatge d'eliminació de TCE al final de l'experiment va ser del  $73,1 \pm 0,6\%$  per a un temps de 309 hores, però és important comentar que per a un temps de 170 hores ja es va obtenir un percentatge d'eliminació semblant, fet que indica que a partir d'aquest temps es va aturar l'eliminació de TCE. A més a més, a partir de les 170 hores el rendiment de consum de glucosa va disminuir de forma sobtada i es va mantenir en valors molt baixos fins al final de l'experiment. En aquest cas és difícil atribuir a un factor concret la disminució pronunciada del rendiment d'eliminació de TCE i de consum de glucosa que es produeix durant l'experiment al no haver succeït cap canvi significatiu en les condicions experimentals abans de produir-se el declivi en l'activitat del fong. Però també és cert que aquest va ser el primer experiment en el que s'ha allargat el procés de degradació fins a un temps tan elevat, perquè en tots els altres casos els temps finals de degradació es trobaven al voltant de les 160 hores. Per tant, és possible que en les condicions de treball utilitzades, el fong no sigui capaç de mantenir la seva

activitat enzimàtica durant un temps tan llarg i a partir d'un temps determinat, tot i no trobar-se en condicions limitants d'oxigen i glucosa, l'eficiència de degradació de TCE es vegi afectada per aquest fet.

Si es compara el percentatge d'eliminació obtingut en l'experiment F amb els valors obtinguts als altres experiments (taula 4.15), es pot comprovar que aquest és l'experiment on s'obté una major eliminació de contaminant, però aquesta diferència no és significativa respecte als altres experiments.

Després de realitzar varis experiments de degradació de TCE al reactor en diferents condicions experimentals (taula 4.15) i d'estudiar els principals factors que influeixen en la degradació de TCE, es poden extreure diverses conclusions en relació a l'aplicació del procediment de disseny en aquest sistema experimental.

D'una banda, s'ha comprovat que el procediment de disseny del reactor no és aplicable per a un tractament de temps curt, perquè tot i disposar d'una quantitat molt elevada de biomassa en la relació a la quantitat de TCE total al reactor (experiment A - taula 4.15), no és possible assolir un percentatge de degradació significatiu per a un temps curt. Per tant, tot i que en cap dels experiments amb aquest sistema experimental s'ha aconseguit assolir percentatges de degradació del 80%, és important saber que si s'aplica aquest procediment de disseny en un altre sistema experimental, serà necessari treballar amb un temps de tractament superior a les 100 o 120 hores per obtenir un elevat percentatge de degradació. A més a més, per tal de fer un disseny acurat del bioreactor, és necessari calcular la cinètica intrínseca del procés de degradació de TCE però en aquest sistema experimental és difícil. Per tant, s'hauria de calcular la pseudo-cinètica del procés que té lloc en aquest reactor, la qual descriuria amb major fiabilitat l'evolució de la concentració de contaminant al llarg del temps que la pseudo-cinètica de degradació calculada a partir dels experiments en ampolles de sèrum.

D'altra banda, el reactor de tanc agitat 2 litres no és un sistema experimental adequat per obtenir un elevat percentatge de degradació de TCE mitjançant *Trametes versicolor*, perquè tot i treballar-hi en les condicions més favorables possibles pel procés de reacció, no és possible assolir percentatges de degradació propers al 80%, els quals sí es van obtenir en certs experiments en ampolles de sèrum, on les condicions de treball no es trobaven optimitzades.

### 4.3 Conclusions

- Els processos de transferència de matèria entre les diferents fases condicionen fortament el rendiment de degradació de tricloroetilè.
- El canvi d'escala del procés, d'ampolles de sèrum a reactor, no aconsegueix millorar els rendiments de degradació de TCE.
- El reactor pressuritzat permet treballar en les condicions desitjades per aquest tipus de compostos volàtils però el sistema de presa de mostra no és l'adequat per valorar amb fiabilitat el rendiment de degradació de TCE.
- El tractament d'aigües residuals amb compostos volàtils mitjançant microorganismes aerobis és poc viable perquè es requereix operar amb reactors hermètics en discontinu i de gran volum.



---

## **Capítol 5**

# Degradació de polibromodifenil éters en medi líquid mitjançant *Trametes versicolor*

---

- Una part dels resultats continguts en aquest capítol es troben pendents de ser publicats com a article:

Vilaplana, M., Caminal, G., Eljarrat, E., Sarra, M., 2011. Degradation of polybrominated diphenyl ethers by the fungus *Trametes versicolor*. Article en preparació.







## Resum

En primer lloc, en aquest capítol es demostra la capacitat del fong *T. versicolor* per degradar el compost decabromodifenil éter (decaBDE), el qual es troba englobat dins el grup dels retardants de flama bromats (RFBs). S'ha assolit, amb el fong incubat en agitació i en forma de pèl·lets, una degradació mínima de  $68 \pm 5\%$  i una eliminació de  $86 \pm 8\%$  per a una concentració inicial de contaminant de 2 mg/L, i una degradació mínima de  $73 \pm 5\%$  i una eliminació de  $95 \pm 5\%$  per a una concentració inicial de decaBDE de 10 ppm. A partir d'experiments d'inhibició es suggereix que el sistema enzimàtic responsable del primer pas de degradació d'aquest contaminant és el citocrom P450. S'ha estudiat la possible mineralització de decaBDE pel fong i no ha estat possible demostrar que se'n produeixi al no obtenir una diferència significativa de relació isotòpica del carboni entre les ampolles de degradació amb fong i les ampolles abiòtiques usades com a control. A més a més, s'ha estudiat l'efecte de diferents surfactants en el procés de degradació i s'ha comprovat que Tween 80 i Tween 20 són els que afavoreixen la degradació de contaminant en un major grau.

En segon lloc, en aquest capítol es demostra que el fong també es capaç de degradar les mescles comercials d'octaBDEs i de pentaBDEs, els quals s'utilitzen també com a retardants de flama, per a una concentració inicial de mescla de 5 mg/L en ambdós casos. S'ha comprovat que el fong és capaç de degradar tots els compostos detectats en la composició inicial d'ambdues mescles, obtenint percentatges d'eliminació elevats en tots els casos.

Finalment, s'ha detectat la formació d'un tetraBDE hidroxilat i d'un hexaBDE hidroxilat com a productes de degradació de les mescles de pentaBDEs i octaBDEs, respectivament, per a un temps de degradació de 12 h, però per a un temps de 24 h o superior ja no es detecta la presència d'aquests productes en el medi. La detecció d'aquests compostos indica que la via de degradació mitjançant el fong és molt semblant a la que té lloc en la degradació de decaBDE, hexaBDE (BDE 154) i pentaBDE (BDE 100) en mamífers. En el cas del decaBDE, no s'ha detectat cap compost hidroxilat com a producte de degradació, però al no disposar de mostres de degradació per a temps inferiors a 24 h, és probable que la seva via de degradació sigui similar a la de les altres dues mescles degradades.

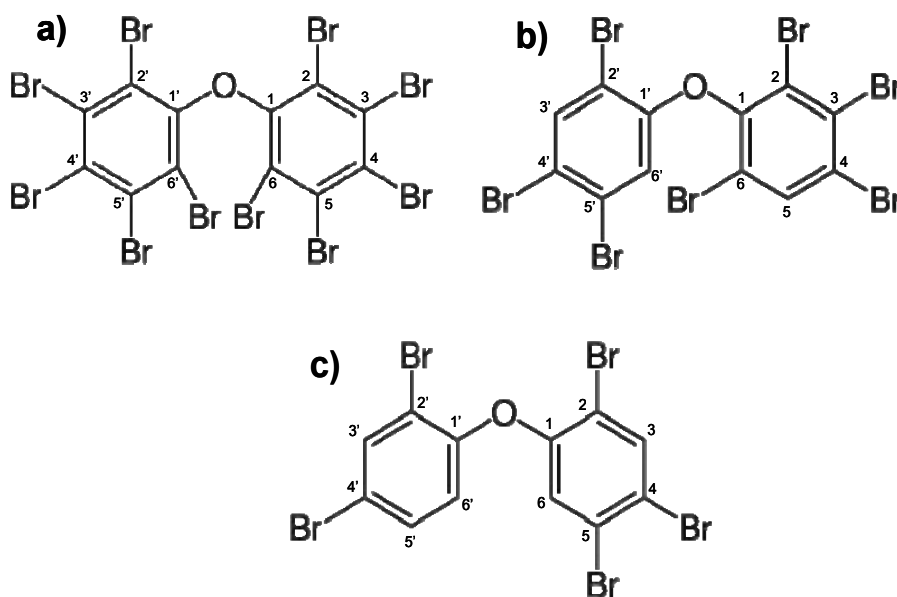
## 5.1 Introducció

### 5.1.1 Contaminació del medi ambient per la presència de polibromodifenil éters

Els polibromodifenil éters (PBDEs) són un grup de compostos que es troben englobats dins dels retardants de flama bromats (RFBs), els quals són usats en diferents aplicacions, com són la fabricació de productes electrònics, tèxtils i mobles, constituint entre un 5 i un 30% del producte (Birnbaum i Staskal, 2004). La funció principals dels RFBs és protegir els materials contra la ignició i prevenir els danys provocats per un possible foc, mitjançant la interferència química en el mecanisme de reacció que té lloc a la fase gas durant el procés de combustió. La producció de RFBs s'estima en 200000 tones anuals i a banda dels PBDEs, els RFBs més usats són el tetrabromobisfenol A (TBBA) i el hexabromociclododecà (HBCD) (Birnbaum i Staskal, 2004).

Hi ha una varietat molt gran de PBDEs tenint en compte que pot hi pot haver des de un fins a deu àtoms de brom enllaçats a la molècula difeniléter. En aquest capítol s'estudia la degradació mitjançant *T. versicolor* de les tres mescles comercials de PBDEs que més s'han utilitzat i que com a conseqüència, són les que es detecten amb una major freqüència en el medi ambient. Aquestes tres productes corresponen a la mescla de decabromodifenil éter (decaBDE), la mescla d'octabromodifenil éters (octaBDEs) i la mescla de pentabromodifenil éters (pentaBDEs). Respecte a les mescles d'octaBDEs i pentaBDEs, el seu ús comercial es va prohibir a la Unió Europea l'any 2004 i aquell mateix any els principals fabricants d'aquestes mescles a Nord Amèrica van deixar de produir-les de forma voluntària (van der Ven et al., 2008). Respecte a la mescla de decaBDE, la seva comercialització encara és permesa a la Unió Europea, tot i que un dels seus països membres, Suècia, va prohibir el seu ús l'any 2007 en material tèxtil, mobles i cables. A Estats Units, hi ha dos estats, Washington i Maine, que van prohibir el seu ús en matalassos i mobles l'any 2008 (van der Ven et al., 2008). A més a més, l'Agència de protecció mediambiental dels EEUU (EPA) va arribar a un acord amb els principals productors d'aquesta mescla comercial, *Albermarle Corporation* i *Chemtura Corporation*, i el principal importador, *ICL Industrial Products Inc.*, pel cessament definitiu de la producció i importació d'aquest producte per a qualsevol ús comercial per a finals de 2013 (EPA, 2009).

La mescla de decaBDE és troba formada quasi exclusivament per decaBDE, que rep el nom comercial de BDE 209, amb un percentatge del 97% o més, per un 3% o menys de nonabromodifenil èters (nonaBDEs) i octaBDEs (web Sigma-Aldrich). Pel que fa a la mescla comercial d'octaBDEs, generalment conté entre un 10 i un 12% d'hexabromodifenil èters (hexaBDEs), un 44% d'heptabromodifenil èters (heptaBDEs), entre un 31 i un 35% de octaBDEs, entre un 10 i un 11% de nonaBDEs i menys d'un 1% de decaBDE (WHO, 1994). Els dos compostos amb una major proporció en aquesta mescla són en primer lloc el BDE 183 (2,2',3,4,4',5',6-heptaBDE) i després el BDE 153 (2,2',4,4',5,5'-hexaBDE). D'altra banda, la mescla de pentaBDEs, coneguda comercialment com DE-71, és troba formada principalment per tetrabromodifenil èters (TetraBDEs) (24-38%), pentaBDEs (50-60%) i HexaBDEs (4-8%), sent el BDE 99 (2,2',4,4',5-pentaBDE) i el BDE 47 (2,2',4,4'-tetraBDE) els principals compostos de la mescla, i abans de ser prohibida, s'usava principalment en productes tèxtils (WHO, 1994). A la figura 5.1 es mostren diferents estructures de PBDEs pertanyents a les tres mescles descrites.



**Figura 5.1.** Exemples d'estructures de PBDEs. a) BDE 209; b) BDE 183; c) BDE 99.

Els PBDEs són compostos altament insolubles en fase aquosa en tots els casos i molt estables. La seva insolubilitat augmenta com major és el nombre de substituents a la molècula, des d'una una solubilitat aproximada de 100 µg/L pels monobromodifenil èters (monoBDEs) fins a un valor de  $25 \pm 5$  ng/L pel DecaBDE (Kuramochi et al., 2007). La toxicitat d'aquests composts va lligada a la seva solubilitat i per tant, a la seva biodisponibilitat, sent els monoBDEs els compostos amb una major toxicitat i el decaBDE el menys tòxic. A causa de la seva solubilitat tan baixa, durant molt temps es

va considerar el decaBDE com un compost pràcticament no tòxic, per la gran dificultat que avanci en la cadena alimentària al ser molt poc biodisponible. Però en els últims anys hi ha diferents estudis de laboratori que demostren que el decaBDE és fotodegradable i si s'exposa a llum ultraviolada pot donar lloc a PBDEs de menor bromació, que són més biodisponibles i per tant, més tòxics. Aquests estudis s'han realitzat tant amb decaBDE en medi líquid (Eriksson et al., 2004; Christiansson et al., 2009) com adsorbit en matrius sòlides, com minerals argilosos o sediments (Ahn et al., 2006b). En aquests estudis s'ha comprovat que es formen una gran varietat de PBDEs a partir de la fotodegradació del decaBDE. En un cas es formen diversos PBDEs des de tribromodifenil éters (triBDEs) fins a nonaBDEs (Eriksson et al., 2004; Ahn et al., 2006b) i en un altre cas a banda de diferents PBDEs, també es va detectar la formació de diferents espècies de polibromo dibenzofurans (PBDFs) i de metoxi-polibromo dibenzofurans (Me-PBDFs) (Christiansson et al., 2009), els quals estan considerats també com a productes tòxics. La pèrdua d'àtoms de brom per l'acció de la llum ultraviolada és progressiva i per tant, el decaBDE es transforma en els diferents isòmers de nonaBDE, aquests es transformen en els diferents isòmers de octaBDE i així successivament fins als isòmers de triBDE, que són els PBDEs de menor bromació que s'han detectat en aquests estudis. La velocitat de descomposició dels PBDEs per llum ultraviolada disminueix a mesura que disminueixen el nombre d'àtoms de brom enllaçats a la molècula difenil éter, sent el decaBDE el compost amb una major velocitat de degradació i més susceptible de descomposició per formar PBDEs de menor bromació (Eriksson et al., 2004). D'altra banda, també s'ha comprovat que el decaBDE es pot degradar en condicions abiòtiques per òxids de metall presents en sòls i sediments (Ahn et al., 2006a). En el cas dels compostos presents en les mesclures d'octaBDEs i pentaBDEs, aquests també són susceptibles de ser debromats per radiació ultraviolada, amb el conseqüent augment de toxicitat del medi (Sanchez-Prado et al., 2005; Davis i Stapleton, 2009).

Respecte a les propietats toxicològiques de les tres mesclures comercials estudiades en aquest capítol, s'ha demostrat que aquests productes tenen propietats disruptores de les hormones tiroïdals (Birnbaum i Staskal, 2004; Hardy et al., 2009), per la gran semblança entre l'estructura d'aquestes hormones i dels PBDEs, que provoca una competència entre ells alhora de vincular-se als receptors hormonals. Aquestes hormones tenen un paper molt important en el correcte funcionament dels sistemes cardiovascular, muscular i esquelètic, així com en les respostes corporals del cos respecte a producció de calor, consum d'oxigen i regulació d'altres sistemes hormonals. A més a més, els PBDEs poden alterar el funcionament del fetge,

provocant canvis en les hormones tiroïdals i la vitamina A homeostàtica, fins al punt de provocar l'eliminació de la hormona tiroïdal T4 (Ellis-Hutchings et al., 2006). També s'ha comprovat que l'exposició cel·lular als PBDEs comporta efectes citotòxics per les cèl·lules amb una progressiva disminució de la viabilitat i un augment de l'apoptosi i la necrosi (Birchmeier et al., 2005), sent aquest últim el procés més crític al no ser un procés natural i controlat per la cèl·lula i que dona lloc a danys irreversibles en teixits. Pel que fa als efectes carcinogènics dels PBDEs, l'exposició humana a aquests productes està relacionada amb la formació de tumors i càncer. Tal com succeeix amb la toxicitat, els PBDEs de menor bromació són suposadament més carcinogènics que els de major bromació (Hardy et al., 2009).

#### **5.1.1.1 Vies de contaminació i processos de transport de PBDEs al medi ambient**

Els PBDEs, i en concret les mesclures estudiades en aquest capítol, s'han detectat a l'aire, al sòl, en sediments i en aqüífers (Segev et al., 2009). S'ha comprovat que la concentració de PBDEs en els diferents medis depèn, en gran part, de la distància d'aquests respecte als centres urbans, amb una disminució progressiva de concentració a mesura que la distància augmenta, el qual indica que les fonts de contaminació estan relacionades amb l'activitat humana (Jaward et al., 2004; Hale et al., 2006). Concretament, en àrees amb una alta densitat de població, les concentracions més elevades de PBDEs en aire, aigua, sòl i sediments es troben en zones properes a indústries de manufactura i reciclatge de productes i en deixalleries (Agrell et al., 2004; Wang et al., 2009).

D'altra banda, la detecció de PBDEs en zones remotes, situades a una distància molt gran dels focus de contaminació, implica que el transport atmosfèric de llarga distància (LRAT) de PBDEs té una importància significativa en el moviment i distribució d'aquests contaminants en el medi ambient tant a escala regional com a escala global (Breivik et al., 2006; de Wit et al., 2006; Cheng et al., 2007). En un principi, es va suggerir que el decaBDE tenia un potencial baix en quant a ser transportat llargues distàncies per aire, però estudis realitzats en els últims anys on, per exemple, s'ha detectat decaBDE en llacs remots de Canadà demostren que aquest compost és capaç de ser transportat distàncies molt llargues a través de l'aire (Breivik et al., 2006). Tot i els diferents estudis realitzats, és necessària una major recerca respecte al LRAT referit als PBDEs com demostra el fet que hi ha una diferència important entre els

valors de LRAT calculats a partir de diferents models, i alhora entre els valors predits pels models i els valors detectats in-situ (Vonderheide et al., 2008).

Una altra via de contaminació del medi ambient per PBDEs, correspon als efluents líquids i els llots provinents de les plantes de tractament d'aigües residuals urbanes. Hi ha una gran varietat d'estudis on s'hi detecten PBDEs, el qual indica que tant les vivendes com les oficines urbanes són una font de contaminació d'aquests contaminants (Hale et al., 2006; Song et al., 2006). Generalment, el decaBDE s'ha detectat en una concentració més elevada en mostres de llots que no pas en efluents líquids al ser el PBDE més insoluble de tots. En canvi, els difenil éters de menor bromació es troben en major proporció a la fase líquida. Tot i això, els volums d'efluent líquid tractats a les depuradores que es retornen a les aigües superficials són molt grans i per tant, també suposen una font important de contaminació de decaBDE, tot i que la seva concentració sigui molt baixa. D'altra banda, els contaminants bromats presents en llots de depuradora poden arribar al sòl, un cop compostats, per la seva aplicació en àrees agrícoles, sent aquesta la principal font de contaminació del sòl per PBDEs (Sellstrom et al., 2005). L'erosió del sòl també promou el moviment i distribució d'aquests contaminants, perquè un cop aquests passen a les aigües superficials, poden ser transportats llargues distàncies i acumular-se en sediments (Hale et al., 2006), fauna marina (Streets et al., 2006) i sòls agrícoles (Sellstrom et al., 2005). Finalment, la fauna també és un element de distribució de PBDEs al medi ambient un cop aquests compostos es van acumulant en els successius nivells de les cadenes tròfiques. Aquesta distribució pot tenir lloc a nivell regional o a nivell global a causa de les migracions de llarga distància, sobretot en el cas d'aus i peixos (Blais et al., 2007). En ambdós casos, les quantitats de PBDEs transportades a través de la fauna són petites comparades amb les vies de distribució per aigua i aire, però tenen una gran importància pel seu potencial d'introduir aquests compostos directament en els nivells superiors de les xarxes tròfiques d'alimentació (Blais et al., 2007).

### **5.1.2 Degradació biològica de PBDEs**

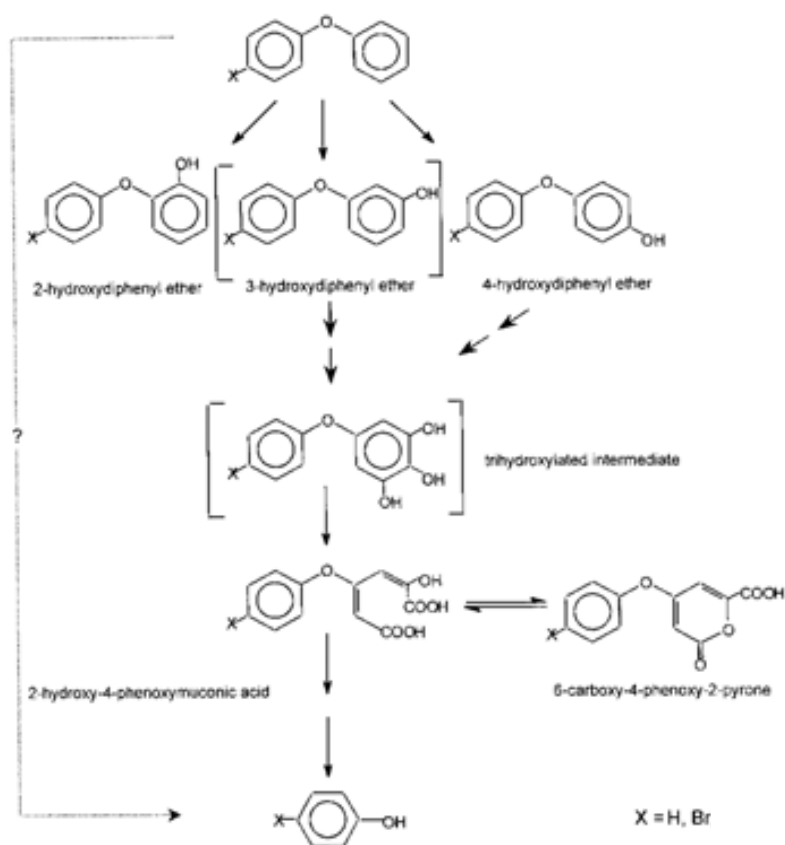
Existeixen diferents estudis que demostren la degradació de diferents compostos PBDEs mitjançant processos biològics, tant en condicions aeròbies com anaeròbies. Tot i això, s'ha de comentar que al tractar-se de contaminants emergents i que s'han tingut en compte com a agents tòxics i carcinogènics des de fa pocs anys, el nombre d'estudis publicats no és molt elevat i la majoria d'ells són molt recents. En condicions

aeròbies, existeixen pocs estudis de degradació dels diferents compostos de PBDEs i en bona part dels casos corresponen a congèneres de baixa bromació, com monoBDEs o diBDEs, que al ser els compostos més biodisponibles i amb el potencial de toxicitat més elevat entre tots els PBDEs, van ser els primers contaminants la degradació dels quals es va estudiar (Schmidt et al., 1992; Hundt et al., 1999). Per tant, els treballs sobre degradació en condicions aeròbies de les mescles estudiades en aquest capítol són encara més reduïts. Pel que fa a la degradació anaeròbia de mescles de PBDEs, s'ha realitzat una recerca més extensa fins al moment, tant en medi líquid com en sòl o llots. En aquest apartat es presenta un recull dels treballs d'investigació sobre degradació de PBDEs, principalment de les mescles comercials estudiades en aquest capítol, però també d'altres PBDEs que es poden arribar a formar al medi ambient com a conseqüència de la fotodegradació dels compostos presents a les mescles comercials.

#### 5.1.2.1 Degradació aeròbia

El primer estudi de degradació d'un compost PBDE en condicions aeròbies va ser realitzat per Schmidt et al. (1992), on es demostra que la soca bacteriana *Sphingomonas* SS3 és capaç de degradar la molècula difenil éter i els derivats halogenats (4-fluor, 4-clor i 4-bromodifenil éter) utilitzant-los com a principal font de carboni i energia. En el cas del 4-bromodifenil éter, en aquest article es proposa una doble via de degradació per una hidroxilació no específica de l'enzim dioxigenasa, formant-se fenol i 4-bromocatecol per una banda si l'enzim ataca l'anell halogenat, i catecol i 4-bromofenol per una altra banda si és l'anell no halogenat el que és atacat per l'enzim. Aquesta espècia bacteriana també s'ha utilitzat en un altre estudi de degradació de PBDEs de baixa bromació, on la soca *Sphingomonas* PH-07 degrada cinc compostos diferents de PBDEs (4-bromoBDE, 2,4- i 4,4'-dibromoBDE, i 2,4,6- i 2,4,4'-tribromoBDE) (Kim et al., 2007). En el cas del 4-bromoBDE, la via de degradació obtinguda és diferent a la descrita per Schmidt et al. (1992) al produir-se la hidroxilació en una posició de l'anell fenil diferent, formant-se com a productes de degradació 4-bromofenol, que en part es transforma en 4-bromocatecol, i àcid 2-hidroximucònic. En el cas dels altres PBDEs de major bromació, es va detectar degradació de tots ells, excepte del 2,4,6-triBDE, i es va comprovar que també es produeix una reacció enzimàtica d'hidroxilació, amb la formació de diferents bromofenols i bromocatecols com a productes de degradació depenent del compost bromat degradat.

Referent a la degradació de PBDEs mitjançant un fong de podridura blanca, el primer article que demostra la seva capacitat per degradar un compost PBDE, correspon a un treball publicat per Hundt et al. (1999), on s'estudia la degradació de 4-bromoBDE mitjançant *Trametes versicolor*. Segons queda demostrat en aquest article, la degradació té lloc inicialment per una reacció d'hidroxilació amb la possible formació de tres isòmers diferents de hidroxidifenil éter seguit d'un trencament de l'anell aromàtic que dona lloc a la formació de l'àcid 2-hidroxi-4-fenoximucònic i la lactona corresponent. La hidroxilació del fenil es produeix sempre en l'anell no halogenat i aquest fet reforça la idea de que existeix un producte intermedi trihidroxilat en l'anell no halogenat, el qual no es va detectar en aquest treball, entre l'àcid mucònic i els hidroxifenil èters. Finalment s'obté com a producte final de degradació el 4-bromofenol, el qual no es pot confirmar que es produeixi a partir de l'àcid mucònic o per un trencament enzimàtic directe de l'enllaç éter del difenil éter halogenat. A la figura 5.2 es mostra la via de degradació proposada en aquest article.



**Figura 5.2.** Via de degradació de 4-bromodifenil éter mitjançant *T. versicolor* (Hundt et al., 1999).

Hundt et al. (1999) van estudiar la implicació de diferents enzims produïts pel fong en la degradació del compost bromat. Es comprova que no es produeix la degradació del compost mitjançant el fong en presència de 1-aminobenzotriazole, el



qual és un inhibidor de l'enzim intracel·lular citocrom P450, i d'altra banda, tampoc es produeix degradació del contaminant en presència de sobrenedant amb una alta activitat de lacasa i manganès peroxidasa. Aquests resultats suggereixen que en el primer pas de degradació del 4-bromoBDE, que correspon a la reacció d'hidroxilació, es trobaria implicat un sistema enzimàtic intracel·lular no ligninolític, el qual podria ser el citocrom P450.

A banda del treball publicat per Hundt et al. (1999), n'existeix un altre de degradació de PBDEs mitjançant un fong ligninolític, on s'estudia la degradació de la mescla comercial decaBDE mitjançant un fong de podridura blanca sense especificar (Zhou et al., 2007). Aquest article suposa la primera evidència de la possibilitat de degradar la mescla de decaBDE en condicions aeròbies. A més a més, en aquest article s'estudia l'efecte sobre la degradació de decaBDE de la concentració de surfactant Tween 80 en medi líquid, el qual s'utilitza per augmentar la solubilitat del contaminant en fase aquosa i per tant, també la seva biodisponibilitat per a ser degradat, en un rang entre 0 i 1000 mg/L, i del oligosacàrid  $\beta$ -ciclodextrina, que s'utilitza en aplicacions ambientals per potenciar la degradació en sòl i en medi líquid, en un rang entre 0 i 900 mg/L. En tots els experiments realitzats es va treballar amb una concentració teòrica inicial de mescla de 1,6 mg/L si es solubilitzés totalment tota la quantitat inicial de mescla afegida però s'ha de tenir en compte que això no és així, sinó que la solubilització es produeix de forma progressiva a mesura que la part dissolta de contaminant és degradada pel fong. Els resultats de l'article mostren que el fong és capaç de degradar la mescla comercial amb un percentatge màxim de degradació del 96,5% per a un temps de 10 dies i una concentració de Tween 80 de 500 mg/L. Per a concentracions més elevades de surfactant, el fong es troba inhibit en el seu creixement i per tant, és important escollir la concentració inicial de surfactant adequada per maximitzar el rendiment del procés de degradació. D'altra banda, es comprova que la presència de  $\beta$ -ciclodextrina afavoreix la degradació de decaBDE però en un menor rang que la presència de Tween 80, obtenint un valor màxim de degradació de 78,4% al cap de 10 dies. En aquest treball s'ha comprovat que el fong ligninolític és capaç de degradar el decaBDE, però no es van realitzar els anàlisis pertinents per detectar possibles productes de degradació del contaminant per suggerir una via de degradació del decaBDE mitjançant el fong. En aquest cas, tampoc es va estudiar quins enzims secretats pel fong es troben implicats en la degradació del fong.

Posteriorment, es va publicar un treball on s'estudia la degradació per separat de 13 PBDEs, des de monoBDEs fins a hexaBDEs, en condicions aeròbies però en aquest cas mitjançant diferents soques bacterianes, sent el primer estudi on es demostra la degradació dels tetraBDEs i pentaBDEs més rellevants i un hexa-BDE (Robrock et al., 2009). Es van provar quatre soques bacterianes diferents, *Rhodococcus* RR1, *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190, *Rhodococcus jostii* RHA1 i *Burkholderia xenovorans* LB400, tenint en compte que, prèviament, les dues últimes havien demostrat la seva capacitat per degradar policlorodifenils (PCBs) (Seto et al., 1995; Arnett et al., 2000), contaminants amb una estructura molt semblant als PBDEs. La soca RHA1 es va escollir per estudiar la degradació de la mescla comercial de pentaBDEs. Per al primer experiment, les concentracions inicials adicionades van ser de l'ordre de 17 µg/L per cada congènere i per tant, sensiblement més baixes que la concentració de decaBDE en l'experiment de degradació amb fong de podridura blanca (Zhou et al., 2007). Els resultats mostren que les dues soques bacterianes degradadores de PCBs són les més eficients tant en percentatge de degradació com en varietat de PBDEs degradats, sent els compostos BDE 149 (2,2',3,4',5',6-hexaBDE) i BDE 153 (2,2',4,4',5,5'-hexaBDE) els que RHA1 no va poder degradar i també BDE 138 (2,2',3,4,4',5'-hexaBDE) en el cas de LB400. Pel que fa a les dues altres soques, es va comprovar que no són adequades per a un procés de degradació de PBDEs amb un nombre elevat de broms, perquè només van ser capaces de degradar el 4-monoBDE i un dels dos di-BDEs provats. D'altra banda, aquest estudi mostra que l'eficiència degradadora disminueix a mesura que augmenten el nombre de broms per molècula. Per tal de demostrar que realment es produeix la degradació, es van escollir dos dels 13 PBDEs testats, el BDE 3 (4-monoBDE) i el BDE 47 (2,2',4,4'-tetraBDE), pels quals s'havia obtingut un alt percentatge de degradació amb les dues soques degradadores més eficients i es va augmentar la concentració inicial substancialment. Els resultats de l'experiment van mostrar la formació d'ions bromur en tots els casos però amb magnituds diferents, en el cas de RHA1 s'obté un percentatge de despumació molt elevat, entre un 80 i un 100%, el que implica que el bacteri és capaç de trencar tots els enllaços carboni-brom i no s'acumula cap producte bromat de degradació al produir-se una desbromació pràcticament total, sent el primer estudi on es demostra la desbromació completa d'un PBDE en condicions estequiomètriques. En canvi, per la soca B400 només es produeix una desbromació del 10%, produint-se l'acumulació de productes bromats en lloc de la desbromació de contaminants. En aquest últim cas, es va detectar la formació d'un compost monoBDE hidroxilat per la degradació del 4-monoBDE, el que suggereix que per aquesta soca la degradació es

produeix per una reacció d'hidroxilació, tal com s'ha descrit en altres casos detallats prèviament.

Respecte a la degradació de la mescla de pentaBDEs es demostra que la soca RHA1 és capaç de degradar els principals compostos d'aquesta mescla amb percentatges de degradació superiors al 45%.

### 5.1.2.2 Degradació anaeròbia

Respecte a la degradació anaeròbia, existeix un major nombre de referències de degradació per a les tres mescles comercials de PBDEs estudiades en aquest capítol, tant en medi sòlid com en medi líquid.

El procés de degradació per bacteris en condicions anaeròbies segueix sempre la via de la desbromació reductiva, que consisteix en la substitució progressiva dels àtoms de brom enllaçats als anells difenil éter per àtoms d'hidrogen formant-se PBDEs de menor bromació a partir dels seus precursors més bromats. Aquest tipus de degradació correspon al mateix tipus de reacció que té lloc en la degradació anaeròbia de TCE i PCE per bacteris (Bradley, 2003). El principal problema d'aquesta via de degradació, tal com succeeix amb la degradació anaeròbia de TCE i PCE (Freedman i Gossett, 1989), és que els productes resultants són més tòxics que els seus precursors, al tenir una solubilitat i biodisponibilitat més elevada pel seu menor nombre de broms, i per tant, un tractament basat en la degradació anaeròbia pot comportar un augment de la toxicitat del medi en lloc de la seva depuració.

El primer estudi en que es demostra la degradació de les mescles de decaBDE i octaBDEs en condicions anaeròbies en fase aquosa correspon a un treball publicat per He et al. (2006). En aquest estudi es va treballar amb la soca bacteriana *Sulfurospirillum multivorans* i diferents soques de l'espècie *Dehalococcoides* (*D. Ethenogenes* 195 i EC195, *D. BAV1* i un cultiu amb diferents espècies de *Dehalococcoides* (ANAS)). Tenint en compte en tots els casos, la degradació dels PBDEs es produeix per co-metabolisme, és necessària la presència d'un compost que actuï com a acceptor d'electrons per a que tingui lloc la degradació dels compostos bromats, i en aquest cas, es va utilitzar el TCE com a acceptor d'electrons. Els resultats presentats en aquest article mostren que *S. multivorans* és capaç de degradar el decaBDE transformant-lo en diferents congèneres octaBDE i heptaBDE, però no és capaç de degradar la mescla de octaBDE en congèneres de menor

bromació. En el cas dels compostos etilens clorats, es coneix que aquesta soca només pot degradar els de major cloració (TCE i PCE), el qual concorda amb el fet que només pugui desbromar el decaBDE i no els composts menys bromats presents en la mescla de octaBDE. En el cas de les espècies *Dehalococcoides*, es va comprovar que són capaces de degradar la mescla de octaBDE però cap d'elles va poder degradar la mescla de decaBDE. Els productes resultants del procés de degradació corresponen a PBDEs de menor bromació als presents a la mescla i diferents depenent de la soca emprada, compostos des de heptaBDE fins a pentaBDE (*D. Ethenogenes* 195), congèneres tetraBDEs i diBDEs (mescla de *D. BAV1* i *D. Ethenogenes* EC195).

Posteriorment, Robrock et al. (2008) van estudiar la degradació anaeròbia en fase aquosa dels cinc principals components de la mescla d'octaBDEs. A més a més, es va estudiar la degradació dels dos PBDEs amb una major presència en el medi ambient: BDE 47 (2,2',4,4'-tetraBDE) i BDE 99 (2,2',4,4',5-PentaBDE) (Eriksson et al., 2002; Staskal et al., 2005), que es formen per la degradació de PBDEs de major bromació i també són components de la mescla comercial de pentaBDEs. A partir d'una mescla de soques *Dehalococcoides* (ANAS195), la soca degradadora de PCE *Dehalobacter restrictus* i el bacteri degradador de pentaclorofenol *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1, es comprova que tots els compostos provats són biodegradats pels tres cultius seguint un via de desbromació reductiva molt similar per a tots els cultius i exhibint una preferència per eliminar els broms enllaçats en les posicions meta- i para-dels anells fenil éter. En el cas de *D. restrictus* i *D. hafniense* es suggereix que la degradació es produeix per co-metabolisme amb el PCE com a acceptor d'electrons o que els enzims degradadors produïts pel bacteri no estan induïts només per la presència de PBDEs. En canvi, en la cas del cultiu ANAS195, els PBDEs són degradats sense la presència d'una altre compost que actuï com a acceptor d'electrons.

Respecte a la degradació de les mescles comercials de PBDEs en medi sòlid, el fet d'haver detectat concentracions relativament significatives, sobretot de la mescla menys soluble en fase aquosa (decaBDE), tant en sediments (Zegers et al., 2003; Eljarrat et al., 2004) com en llots de depuradora (Hale et al., 2001; Sellstrom et al., 2005; Knoth et al., 2007) implica que l'estudi de la degradació de les diferents mescles en aquest medi també és important. Fins a l'actualitat, la degradació anaeròbia de la mescla de decaBDE ha estat més estudiada que la degradació de les altres dues mescles comercials.

El primer estudi de degradació de la mescla decaBDE en llot, que de fet correspon al primer estudi que demostra la degradació de decaBDE en condicions anaeròbies, va ser publicat per Gerecke et al. (2005). El llot on té lloc la degradació i que va servir com a inòcul, en aquest cas provenia d'un digestor anaerobi mesofílic d'una depuradora de tractament d'aigües urbanes situada a Dübendorf, Suïssa. Els resultats mostren que la degradació del decaBDE es produeix per desbromació reductiva, formant-se com a productes dos compostos nonaBDEs diferents i varis octaBDEs. Aquest treball es complementa amb un altre publicat posteriorment per Gerecke et al. (2006), on es compara la degradació de decaBDE en un llot de depuradora, procedent del mateix digestor anaerobi que l'article previ, amb la d'altres compostos no PBDEs que s'utilitzen com a retardants de flama, com el hexabromociclododecà i el tetrabromobisfenol A. Els resultats d'aquest estudi mostren que els tres compostos poden ser degradats en condicions anaeròbies i que el decaBDE és el compost amb un major temps de vida mig (700 dies). Cal comentar que en cap dels dos articles és realitza un estudi dels microorganismes presents al llot i quins d'ells es troben implicats en la degradació de decaBDE. Altres estudis publicats posteriorment també demostren la degradació de decaBDE tant en llot procedent d'una depuradora de tractament d'aigües urbanes (Shin et al., 2010) com en sediments (Tokarz et al., 2008). En aquest segon estudi, es comprova que el decaBDE es degrada via desbromació reductiva provocant un increment de la quantitat de congèneres de menor bromació (nona, octa, hepta i hexaBDEs).

Els estudis de degradació anaeròbia en medi sòlid de les mescles comercials de pentaBDEs i octaBDEs són molt escassos. En el cas de la mescla de penta-BDEs, existeix un estudi publicat per Vonderheide et al. (2006) on es va posar en contacte un sòl contaminant amb aquesta mescla amb un cultiu de diferents microorganismes anaerobis. Al cap d'un temps curt, es va comprovar que el compost que es troba en major proporció a la mescla, el BDE 99, s'havia degradat quasi completament, així com altres PBDEs presents en una proporció molt menor (hexaBDEs i pentaBDEs). D'altra banda, per a un mateix temps, es va observar un augment de la quantitat de BDE 47, el qual és el segon compost amb major proporció en la mescla. En aquest article s'argumenta que possiblement l'augment de la quantitat d'aquest compost podria ser causat pel fet que sigui un producte de la degradació de PBDEs de major bromació, principalment del BDE 99. De fet, posteriorment es va demostrar que aquest tetraBDE és producte de degradació del compost pentaBDE esmentat (Robrock et al., 2008).

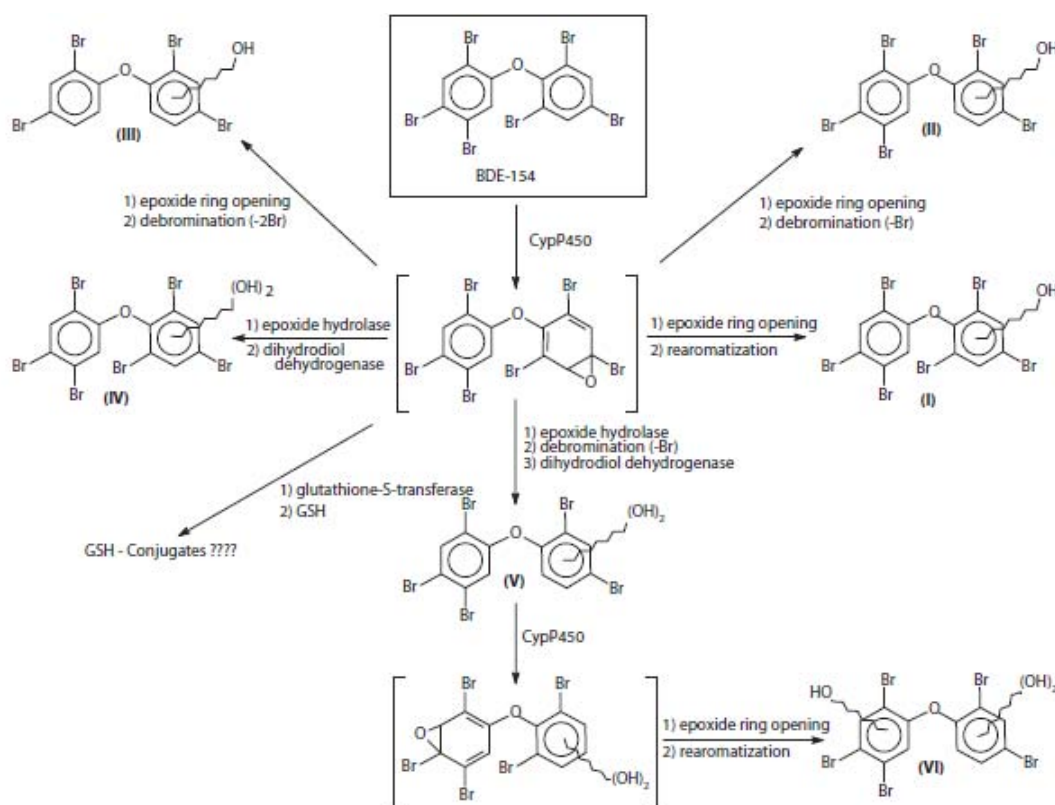
D'altra banda, la degradació de la mescla d'octaBDEs en sòl i sediments ha estat recentment estudiada per Lee i He (2010). Es van utilitzar sòls i sediments de tres localitzacions diferents, Wuhan i Guiyu (Xina), Singapur i San Francisco (EEUU), i es va realitzar una bioaugmentació dels microorganismes anaerobis autòctons per afegir posteriorment la mescla a les mostres. Els resultats mostren que es produeix degradació per desbromació reductiva amb la formació d'un rang ampli de productes, des de hexaBDEs fins a monoBDEs, amb predominança dels isòmers de tetraBDE. En aquest treball també es va realitzar un anàlisi genètic dels microcosmos i es va comprovar que en la majoria de cultius hi eren presents espècies de *Dehalococcoides*, per la qual ja s'havia demostrat que era capaç de degradar PBDEs (He et al., 2006; Robrock et al., 2008).

### 5.1.2.3 Degradació de PBDEs en mamífers

La degradació de PBDEs en mamífers també ha estat estudiada de cara a conèixer el comportament d'aquests compostos a l'interior del cos i els productes que es formen, sabent que es poden bioacumular en diferents òrgans (Domingo et al., 2008; Yu et al., 2010) amb el conseqüent risc per la salut d'animals i humans (Darnerud, 2003; Ellis-Hutchings et al., 2006; Hardy et al., 2009). Entre tots els PBDEs, principalment s'ha estudiat la degradació del decaBDE, mitjançant experiments en rates alimentades amb diferents dosis del compost. En la major part d'aquests estudis es suggereix que el decaBDE es metabolitza, a partir de reaccions oxidatives de deshalogenació, en metabòlits hidroxilats i metoxi-hidroxilats de menor bromació. D'altra banda, també existeixen estudis de degradació d'altres PBDEs en rates, com són el 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154) (Hakk et al., 2009) i el 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE 100) (Hakk et al., 2006). Respecte aquest últim, els productes de degradació detectats corresponen a mono- i di-OH-tetraBDEs i a un mono-OH-pentaBDE, els quals es suggereix que es formen per un procés oxidatiu, que en el cas dels OH-tetraBDEs comporta també la desbromació del compost originari. En aquest treball no es suggereix quin sistema enzimàtic s'hi troba implicat.

En el cas del BDE 154, la via de degradació suggerida dona lloc a diferents tipus de PBDEs hidroxilats: mono- i di-OH-hexaBDEs; mono-, di- i tri-OH-pentaBDEs; i un mono-OH-tetraBDE. Es comprova que el citocrom P450 es troba implicat en el primer pas de degradació del compost, que correspon a la formació d'un intermediari epòxid

reactiu, el qual dóna lloc als diferents productes PBDEs hidroxilats. A la figura 5.3 es pot observar la via de degradació suggerida pel BDE154 en mamífers.



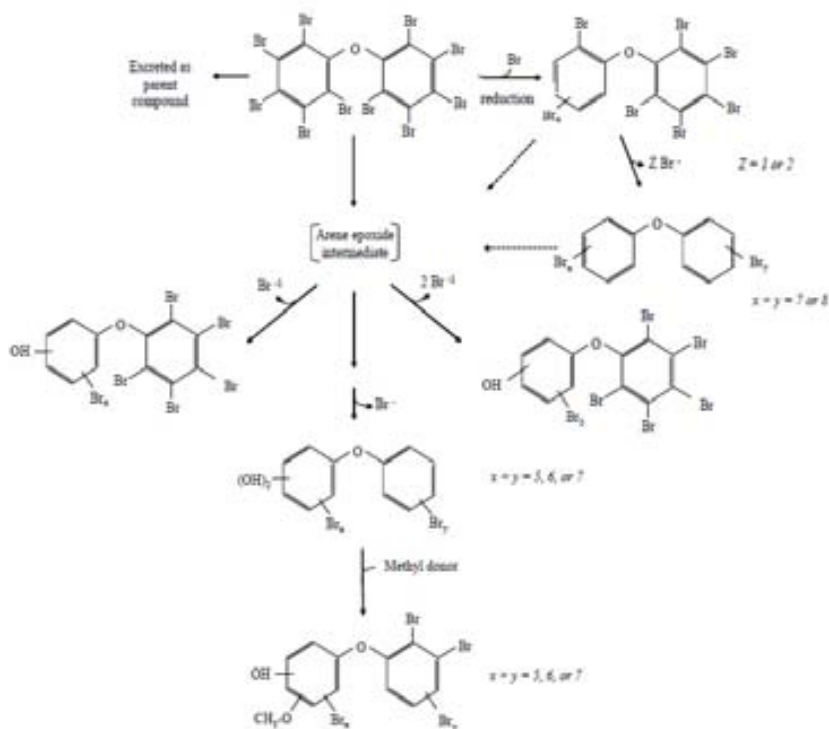
**Figura 5.3.** Via de degradació metabòlica suggerida pel BDE 154 en rates (Hakk et al., 2009).

En el cas del decaBDE, el procés de degradació en mamífers suggerit consisteix en una primera desbromació reductiva en el que un, dos o tres àtoms de brom poden ser substituïts per àtoms d'hidrogen seguit d'una oxidació per formar els metabòlits hidroxilats, que es formen a partir d'un epòxid intermediari que s'hidrolitza en un dihidrol i es rearomatitza seguit d'una reacció de metilació (Sandholm et al., 2003). En aquest estudi es van detectar traces de tres nonaBDEs, el qual podria ser un indicatiu de la desbromació reductiva com a primer pas de degradació, i tretze metabòlits hidroxilats, però només tres, un hidroxioctaBDE, un hidroxinonaBDE i un hidroximetoxihexaBDE, es trobaven en suficient concentració per a portar a terme anàlisis més precisos. D'altra banda, es suggereix que també existeix la possibilitat d'una oxidació del decaBDE com a primer pas per formar directament l'epòxid intermediari sense que tingui lloc la desbromació reductiva (Sandholm et al., 2003). En l'estudi portat a terme per Morck et al. (2003), es van identificar diversos productes hidroxilats, des del metoxihidroxipentabromat fins al metoxihidroxihéptabromat, el qual coincideix en part dels metabòlits obtinguts per Sandholm et al. (2003). A més a més, en els dos articles es comprova que els substituents metoxi- i hidroxio- es troben sempre en el

mateix anell aromàtic quan ambdós hi són presents. D'altra banda, en l'article publicat per Morck et al. (2003) també es van trobar traces de metabòlits de PBDEs de menor bromació que el decaBDE, indicant que la desbromació seria el primer pas de la degradació del contaminant. En els dos articles es suggereix la implicació del citocrom P450 en les diferents reaccions d'oxidació per formar els metabòlits hidroxilats, però no en la desbromació reductiva proposada com a pas inicial. Per a la desbromació reductiva, en cap dels dos treballs s'indica quin sistema enzimàtic s'hi troba implicat i en cas que es produís com a pas inicial, la reacció ha de tenir lloc en condicions anaerobi-reductives.

Respecte a l'existència del primer pas de degradació consistent en una desbromació reductiva, en l'article publicat per Huke i Smith (2007) sobre degradació de decaBDE en rates, es detecta la presència de diferents PBDEs de diferent bromació, tres nonaBDEs, quatre octaBDEs i un heptaBDE, el qual confirmaria l'existència del procés de desbromació reductiva com a primer pas en la degradació de decaBDE en mamífers. En aquest cas, tampoc és suggereix la implicació d'un sistema enzimàtic concret com a responsable del procés de desbromació reductiva i no es van realitzar anàlisis per detectar metabòlits hidroxilats.

A la figura 5.4 es mostra la via de degradació de decaBDE en mamífers proposada segons els estudis d'investigació en rates.



**Figura 5.4.** Via de degradació de decaBDE en mamífers (Morck et al., 2003; Sandholm et al., 2003).



En l'apartat de resultats es mostra els diferents estudis de degradació de les tres mescles descrites prèviament mitjançant *T. versicolor* en forma de pèl·lets. A més a més, s'estudien les respectives vies de degradació, els respectius productes de degradació i els enzims implicats en la degradació del decaBDE. A més a més, s'estudia l'efecte sobre la degradació del decaBDE de diferents tipus de surfactants afegits al medi per augmentar la solubilitat del contaminant.

## **5.2 Resultats i discussió**

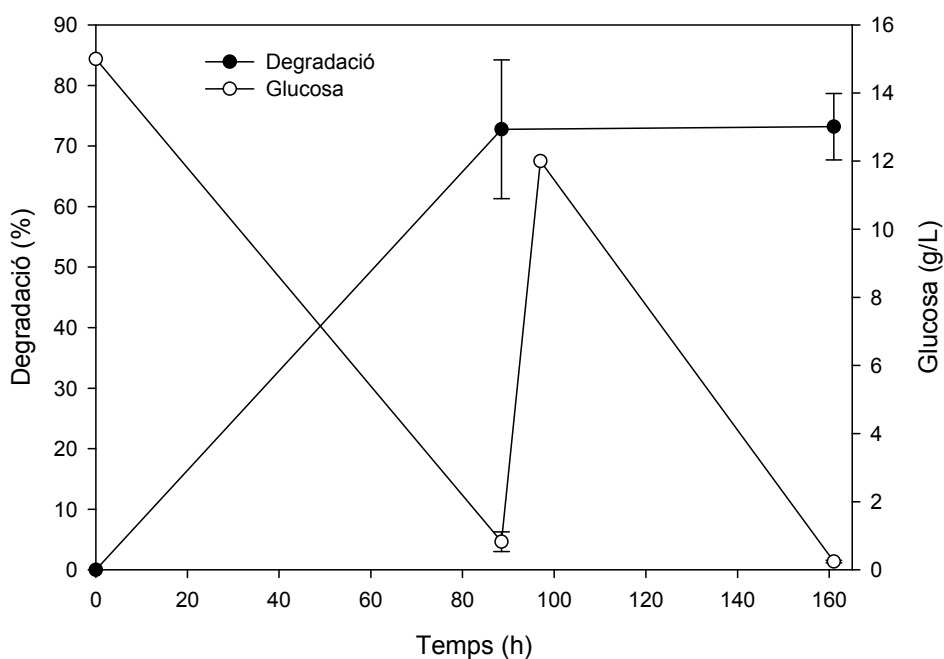
### **5.2.1 Degradació de decaBDE en fase aquosa**

#### **5.2.1.1 Determinació de la capacitat de degradació de decaBDE**

En primer lloc, es va estudiar si el fong era capaç de degradar el compost decaBDE en fase aquosa en un percentatge significatiu. Per a portar a terme el tractament, es va utilitzar el fong en forma de pèl·lets, que és la morfologia habitual utilitzada en el nostre grup de recerca per als experiments de degradació de contaminants en fase aquosa (Blánquez, 2005; Marco-Urrea, 2007; Borràs, 2011). Respecte a la quantitat inicial de decaBDE i a la concentració de surfactant Tween 80, que s'utilitza per augmentar la solubilitat del contaminant, es va treballar amb 100 µg inicials de contaminant per ampolla, que un cop afegit el medi, correspondrien a una concentració de 10 mg/L, si el compost fos totalment soluble en fase aquosa, i es va treballar amb una concentració de surfactant de 500 mg/L, la qual s'ha comprovat que és la concentració amb la que s'obté el màxim percentatge de degradació del contaminant en experiments mitjançant una soca no especificada de fong de podridura blanca (Zhou et al., 2007). D'altra banda, es va afegir la quantitat de pèl·lets necessària a cada ampolla per tenir una concentració aproximada de 3,5 g/L (pes sec) i un volum de 10 mL de medi definit (MD).

A la figura 5.5 es mostra l'evolució de la concentració de glucosa i del percentatge de degradació de decaBDE mitjançant *T. versicolor*, que es calcula comparant el valor de concentració de contaminant obtingut a les ampolles amb fong viu amb l'obtingut a les ampolles amb fong autoclavat, a banda d'utilitzar control abiòtics per comprovar que no es produeix pèrdua o degradació abiòtica de contaminant no associada al procés de degradació mitjançant el fong durant l'experiment. Es pot observar que el percentatge de degradació de decaBDE

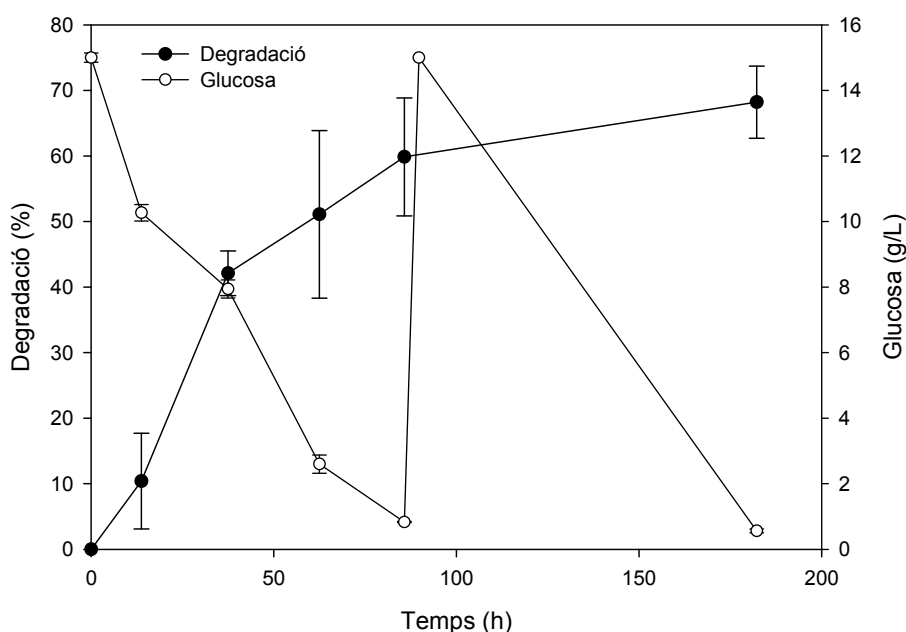
augmenta a mesura que avança l'experiment fins assolir un valor de  $73 \pm 5\%$  per a un temps de 161 h. Aquest valor obtingut al final de l'experiment és significatiu i demostra que el fong és capaç de degradar el contaminant sota les condicions experimentals provades. Respecte a l'evolució de la degradació de decaBDE, es pot observar que a partir d'un temps de 88,5h es produeix una aturada en la degradació de contaminant. En aquest cas, no hi ha una causa clara que justifiqui aquesta aturada de la degradació, perquè no hi ha variacions importants en el consum de glucosa en cap moment de l'experiment, el que significa que el sistema metabòlic del fong es troba actiu i que en principi, el fong no es troba inhibït per la presència del contaminant o d'algun dels productes de degradació presents al medi. Respecte a l'enzim lacasa, en aquest experiment només es va mesurar la seva activitat per a un temps de 88,5 hores, obtenint un valor de  $73 \pm 7$  U/L, que indica que el fong ha produït l'enzim durant l'experiment però no podem conèixer la seva evolució al llarg del temps per relacionar-la amb la de la degradació de decaBDE.



**Figura 5.5.** Evolució de la concentració de glucosa i degradació de decaBDE en fase aquosa mitjançant *T. versicolor* en forma de pèl·lets per a una concentració inicial de 10 mg/L.

Un cop es va comprovar que s'assolia un percentatge de degradació elevat per a una concentració inicial de decaBDE de 10 mg/L, es va realitzar un segon experiment en les mateixes condicions experimentals però disminuint la concentració inicial de decaBDE fins a 2 mg/L, és a dir, es van addicionar inicialment 20 µg de contaminant en 10 mL de medi definit a cada ampolla. En aquest segon experiment, es va realitzar un mostreig més freqüent durant les 100 primeres hores, que correspon al període de

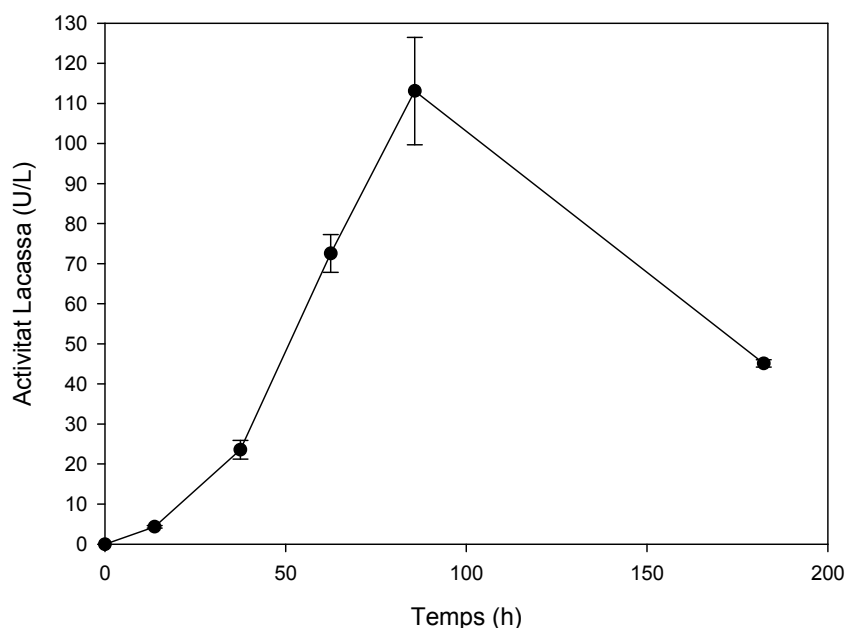
temps on es produeix una major degradació, per tal de poder descriure amb més detall l'evolució de la degradació de contaminant al llarg del temps. A la figura 5.6 s'observa que per a un temps experimental final de 182 hores s'obté un percentatge de degradació del  $68 \pm 5\%$ , el qual és lleugerament inferior a la degradació obtinguda en l'experiment anterior, confirmant d'aquesta manera que el fong també és capaç de degradar-lo de forma significativa si aquest es troba en una concentració més baixa. Respecte a l'evolució de la degradació de decaBDE, es pot observar que aquesta es podria ajustar a una cinètica enzimàtica tipus Michaelis Menten i no arriba a aturar-se en cap del moment, a diferència del que va succeir en l'experiment de degradació previ. Per tant, és possible que s'hagués obtingut un percentatge de degradació major en cas d'haver allargat l'experiment. Respecte al consum de glucosa, es pot observar que per a un temps de 90 hores, la quantitat inicial afegida, que correspon a una concentració de 15 g/L, pràcticament s'havia esgotat i es va creure oportú realitzar una addició puntual per evitar un possible efecte limitant sobre el procés de degradació per manca de substrat primari.



**Figura 5.6.** Evolució de la concentració de glucosa i degradació de decaBDE en fase aquosa mitjançant *T. versicolor* en forma de pèl·lets per a una concentració inicial de 2 mg/L.

Respecte a l'evolució de l'activitat lacasa al llarg de l'experiment, a la figura 5.7 es pot comprovar que els valors d'activitat enzimàtica que s'assoleixen són sensiblement inferiors als assolits en la degradació d'altres contaminants mitjançant el fong, com TCE (Marco-Urrea et al., 2008a) o colorants (Blánquez et al., 2004; Casas et al., 2007), on s'han obtingut valors màxims d'activitat superiors a 1000 U/L. En el

cas del decaBDE es va obtenir un valor màxim de  $113,1 \pm 13,4$  U/L per a un temps de 86 hores. D'altra banda, a la figura 5.7 es pot observar que després d'obtenir el valor màxim d'activitat, el valor de la lacasa disminueix significativament i aquest fet coincideix amb una disminució de la degradació de contaminant a partir d'aquest temps, fet que pot portar a pensar que la lacasa podria estar implicada en la degradació del contaminant i que és necessari estudiar en detall més endavant.



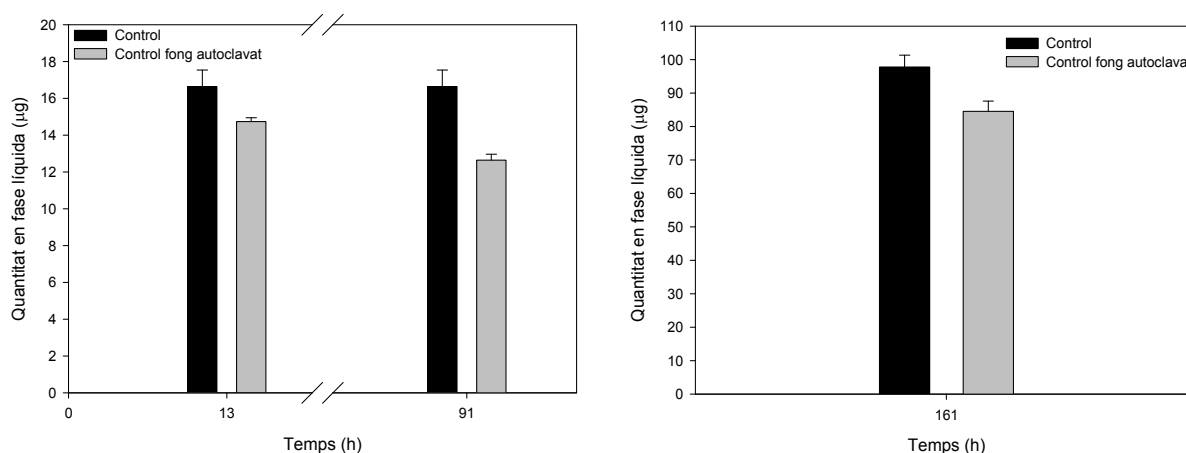
**Figura 5.7.** Evolució de l'activitat lacasa al llarg de l'experiment de degradació de decaBDE mitjançant *T. versicolor* per a una concentració inicial de 2 mg/L.

Ara bé, si es comparen els valor de lacasa obtinguts en els dos experiments, es dedueix que aquest contaminant no indueix la producció d'aquest enzim, en primer lloc, pels valors baixos d'activitat obtinguts en els dos experiments i també pel fet que, un augment de concentració de contaminant no suposa un augment de l'activitat enzimàtica, contràriament al que succeeix amb l'activitat en presència de compostos inductors d'aquest enzim (Marco-Urrea et al., 2008a).

En els experiments de degradació de decaBDE per a les dues concentracions inicials provades es va comprovar que la massa de contaminant adsorbida en el fong va ser elevada, el que implica que aquest és biodisponible i pot entrar a l'estructura interna del fong, i sempre s'ha de tenir en compte per quantificar la massa de decaBDE degradada. A la figura 5.8 s'observa la disminució de la quantitat de decaBDE obtinguda a causa de l'adsorció en el fong en els dos experiments, la qual es va quantificar a partir de les ampolles amb fong autoclavat. En l'experiment de degradació amb una concentració inicial de decaBDE de 2 mg/L inicials, el percentatge

d'adsorció passa d'un  $11 \pm 6\%$  a les 13 hores a un  $24 \pm 6\%$  a les 91 hores i en el cas d'una concentració inicial de 10 mg/L, el percentatge d'adsorció és d'un  $13,5 \pm 4,8\%$  per a un temps de 161 hores. Respecte a la quantitat de contaminant adsorbida, és possible que si aquest accedeix a l'estructura interna del fong, part d'ell acabi també sent degradat pel sistema enzimàtic intracel·lular, si aquest es troba implicat en la degradació del contaminant, aspecte que es presenta més endavant en l'apartat de resultats. Per tal de comprovar si s'obté una adsorció de contaminant similar en el cas de treballar amb fong autoclavat que amb fong no autoclavat, es va realitzar una prova d'adsorció per a una mateixa concentració inicial de contaminant amb fong inactivat tèrmicament i fong inactivat amb azida sòdica, la qual impedeix el transport actiu del contaminant entre l'exterior i l'interior del fong, a una concentració de 5 g/L en fase aquosa. S'obté un percentatge d'adsorció considerablement més elevat pel fong autoclavat ( $30 \pm 4\%$ ) que pel fong amb azida sòdica ( $6 \pm 2\%$ ). Aquest fet implica que en el cas de cultiu amb fong viu, la quantitat de contaminant adsorbida podria ser inferior que en el cas del fong autoclavat, a banda de que part del contaminant pot ser degradat un cop s'ha adsorbit en el fong. Aquests dos aspectes no s'han tingut en compte a l'hora de quantificar la degradació de contaminant (figures 5.5 i 5.6). Per tant, els valors presentats corresponen als percentatges mínims de degradació obtinguts però és molt possible que en realitat fossin superiors.

De fet, si no es té en compte l'adsorció s'obtenen valors d'eliminació superiors al 85% per ambdues concentracions inicials al finalitzar l'experiment, el que comporta que només un percentatge residual molt baix de contaminant es detecta en fase aquosa al finalitzar el procés de degradació.



**Figura 5.8.** Evolució de la concentració de decaBDE per la seva adsorció en el fong en l'experiment de degradació amb 2 mg/L (esquerra) i 10 mg/L inicials (dreta).

Tal com s'ha comentat prèviament en la introducció, el decaBDE estava considerat durant un llarg temps com un compost pràcticament no tòxic, per la seva baixa disponibilitat. En aquest apartat s'ha demostrat que aquest contaminant és clarament biodisponible pel fong en fase aquosa en presència de Tween 80. Tenint en compte que en les aigües residuals que s'aboquen al medi ambient és freqüent la presència de diferents tipus de surfactants, com per exemple alquilbenzens sulfonats lineals o compostos polietoxilats, utilitzats en processos industrials o en detergents (Cantero et al., 2005; Terzic et al., 2005), el decaBDE present en aquestes condicions és molt possible que també sigui biodisponible, constituint així un compost tòxic pels éssers vius i fàcilment acumulable en els diferents nivells de la cadena tròfica.

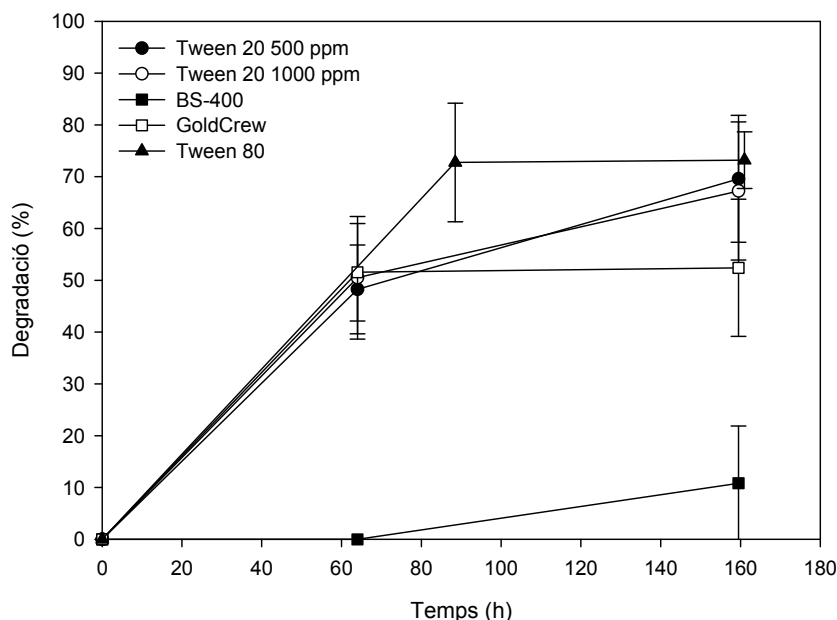
#### **5.2.1.2 Avaluació de l'efecte de diferents surfactants**

Estudis de degradació de decaBDE mitjançant fongs de podridura blanca han demostrat que el surfactant Tween 80 és molt efectiu a l'hora de potenciar la seva degradació (Zhou et al., 2007). Aquests autors demostren que s'obté un 54,3% més de degradació si s'afegeix Tween 80 al medi en una concentració de 500 mg/L, que correspon a la concentració de surfactant amb la qual s'obté una major degradació, respecte a no afegir-ne. El principal inconvenient d'aquest surfactant de cara a una possible aplicació in-situ és el seu elevat cost. Per aquesta raó, es va decidir estudiar l'efecte d'altres surfactants en la degradació de decaBDE i es va escollir dos surfactants comercials que s'utilitzen per a processos de bioremediació in-situ, com són BS-400 (IEPSorbents) i Goldcrew (GoldCrew\_Company), els quals són significativament més econòmics que el Tween 80, i un surfactant àmpliament utilitzat en recerca com Tween 20 (Sigma-Aldrich), amb un preu molt similar al Tween 80. En el cas del Tween 20, es va utilitzar per comprovar si s'obtenia una diferència significativa de degradació respecte a treballar amb Tween 80, pel fet que en presència d'aquest últim, es poden formar espècies oxidants que poden augmentar l'eficiència de degradació del contaminant, però això no succeeix en presència de Tween 20. Tots els surfactants provats, inclòs el Tween 80, són no iònics, que significa que no tenen càrrega a la part polar, però sí que posseeixen una successió de grups lleugerament hidròfils i la unió d'aquests grups és el que confereix l'elevada solubilitat a aquestes molècules en fase aquosa.

L'experiment amb els diferents surfactants es va realitzar amb una concentració inicial de decaBDE de 10 mg/L, 10 mL de medi definit i una concentració de pèl·lets aproximada de 3,5 g/L (pes sec) per a un temps final de degradació de 160 hores. Es

van utilitzar dues concentracions diferents de Tween 20, 500 mg/L i 1000 mg/L i una concentració (v/v) de BS-400 del 5% i de Goldcrew del 14%, que en el cas dels dos surfactants comercials, corresponen a valors estàndards recomanats pels subministradors.

A la figura 5.9 s'observa la degradació de decaBDE pels diferents surfactants comparada amb la degradació de contaminant amb Tween 80 obtinguda en un experiment anterior (figura 5.5). Aquesta figura mostra que el màxim percentatge de degradació s'obté amb Tween 80, però la degradació obtinguda amb Tween 20 per a les dues concentracions provades és molt similar. En el cas del Tween 80, es troba descrit que, s'obtenen percentatges de degradació superiors als obtinguts amb altres surfactants, com poden ser Tween 20 o Triton X-100, a causa de la seva utilització en el procés de degradació d'hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) mitjançant el fong. Aquest fet es deu a que l'enzim extracel·lular fúngic lacasa és capaç de trencar la molècula de Tween 80 formant àcid oleic, el qual pot augmentar la generació de radicals perlipídics que poden actuar com a espècies degradadores d'aquests contaminants (Borràs et al., 2010). En el cas del decaBDE, es comprova la utilització de Tween 80, tot i la seva propietat per convertir-se en substrat per la formació d'espècies oxidants, no suposa un avantatge respecte a la utilització de Tween 20 en quant a resultats de degradació.



**Figura 5.9.** Evolució de la degradació de decaBDE mitjançant *T. versicolor* per a una concentració inicial de contaminant de 10 mg/L per als diferents surfactants utilitzats.

Respecte als surfactants comercials, el BS-400, a una concentració (v/v) del 5%, no és útil per aplicar en la degradació de decaBDE a l'obtenir una degradació final de només un  $11 \pm 11\%$  i per al Goldcrew, s'obté en principi una degradació menor per a temps final ( $52 \pm 13\%$ ), però a causa de l'elevada desviació estàndard associada a aquest valor, la diferència de degradació de contaminant obtinguda respecte Tween 80 i Tween 20 no es pot considerar estadísticament significativa i seria, en principi, un candidat interessant per estudiar en major profunditat el seu efecte en el procés de degradació mitjançant el fong.

En el cas del Tween 20, queda demostrat que té la mateixa eficiència per augmentar la solubilitat del contaminant que el Tween 80 per a una mateixa concentració (500 mg/L). Al no haver realitzat un estudi detallat de l'efecte del Tween 20 sobre el procés de degradació, és possible que aquesta no sigui la concentració òptima però sí s'ha comprovat que, tal com succeeix amb Tween 80 (Zhou et al., 2007), no és necessari treballar amb una concentració de surfactant superior a 500 mg/L perquè no s'obté un major percentatge de degradació. Ara bé, com en el cas del Tween 80, aquest surfactant no és el més idoni per ser utilitzat per a tractaments de bioremeiació in-situ al suposar el seu ús un cost elevat.

Respecte als dos surfactants comercials utilitzats, el BS-400 no és adequat per potenciar procés de degradació de decaBDE, probablement per no ser capaç d'augmentar la solubilitat i no pel fet que pugui ser perjudicial pel sistema fisiològic del fong, perquè s'ha obtingut un consum de glucosa en presència d'aquest surfactant molt similar a l'obtingut en presència dels altres surfactants, amb un valor aproximat de 0,03 g/(h·g pes sec). Tot i això, abans de descartar definitivament aquest surfactant per aquest procés, seria recomanable realitzar una comparació de la degradació de decaBDE per a diferents concentracions de BS-400. D'aquesta manera seria possible comprovar si és possible assolir valors de degradació similars als obtinguts en presència de Tween 80 i Tween 20, tenint en compte que la concentració utilitzada de BS-400 correspon a un valor estàndard recomanat pel fabricant i que, com s'ha demostrat que en el cas del Tween 80, la concentració de surfactant té un efecte important en la degradació de decaBDE (Zhou et al., 2007). Pel que fa al Goldcrew, els resultats de degradació mostren que aquest producte té un potencial interessant de cara a ser utilitzat en processos de bioremeiació de decaBDE, sobretot pel fet que és un producte més econòmic que el Tween 80 i el Tween 20. Per tant, seria recomanable realitzar un estudi per trobar la concentració òptima de surfactant o allargar el procés de degradació i així comprovar quin percentatge de degradació final



es pot assolir. A més a més, seria interessant estudiar el seu efecte en el procés de degradació en el cas d'estudiar el tractament d'un sòl contaminat amb decaBDE mitjançant el fong.

### 5.2.2 Determinació de la via de degradació de decaBDE

Els treballs publicats prèviament sobre degradació biològica de diferents compostos PBDEs en condicions aeròbies coincideixen en la formació de PBDEs hidroxilats de menor bromació que els contaminants bromats originaris (Schmidt et al., 1992; Hundt et al., 1999; Kim et al., 2007; Robrock et al., 2009). En el cas de l'únic article publicat de degradació d'un PBDE mitjançant *T. versicolor* (Hundt et al., 1999), també es va estudiar la implicació de l'enzim intracel·lular citocrom P450 i dels enzims extracel·lulars lacasa i manganès peroxidasa en el procés de degradació i es suggereix que el citocrom P450 sí es troba implicat en el primer pas de la degradació del 4-bromoBDE i en canvi, els altres enzims no. Coneixent aquest precedent i per treballs publicats on es suggereix la implicació del citocrom P450 en la degradació de decaBDE en mamífers (Morck et al., 2003; Sandholm et al., 2003), es va estudiar la implicació d'aquest sistema enzimàtic en la degradació de decaBDE mitjançant *T. versicolor* i també si l'enzim lacasa hi està implicat mitjançant un experiment utilitzant el sistema lacasa-mediador.

L'oxidació de contaminants per lacasa normalment es troba limitada a compostos aromàtics amb un grup fenòlic, però en presència de compostos de baix pes molecular, coneguts com mediadors, pot oxidar també altres compostos. Els mediadors s'utilitzen principalment en la indústria paperera en els processos de blanqueig, perquè permeten l'oxidació d'alcohols benzílics o fenols-o-eterificats, els quals són substrats no fenòlics, i alhora inhibeixen la repolimerització dels radicals oxidats. Els principals inconvenients d'aquests compostos de cara a la seva aplicació industrial és el seu cost elevat i la seva toxicitat. El sistema lacasa-mediador va ser descrit per primer cop per Bourbonnais i Paice (1990), els quals van utilitzar la sal de diamoni de l'àcid 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfònic (ABTS) per oxidar compostos no fenòlics. Posteriorment s'han utilitzat altres compostos com a mediadors, com són l'àcid vilúric (VA), 3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenol (DMHAP) i l'hidrat 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT). Altres aplicacions del sistema lacasa-mediador són la decoloració d'efluents procedents de la indústria tèxtil (Wong i Yu, 1999; Knutson i Ragauskas, 2004) i la degradació d'altres compostos xenobiòtics com alquens o hidrocarburs policíclics aromàtics (Majcherczyk et al., 1998; Han et al.,

2004). Tot i que l'objectiu principal d'utilitzar els compostos mediadors no és estudiar la seva futura aplicabilitat en un procés de bioremeiació de decaBDE, al ser compostos tòxics, és important estudiar si la seva presència potencia la degradació del contaminant mitjançant l'enzim lacasa, perquè es coneix que el fong és capaç de produir de forma natural certs compostos que poden actuar de mediadors en la degradació de contaminants mitjançant la lacasa i aquest estudi permet comprovar la magnitud del seu efecte en la degradació de decaBDE, en el cas que la lacasa s'hi trobés implicada.

Tot i que generalment s'ha associat la capacitat degradadora dels fongs de podridura blanca a les peroxidases i lacases, hi ha estudis que demostren que aquests tipus d'enzims no s'hi troben implicats, com la degradació de TCE i PCE per *Trametes versicolor* (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2008a) o la degradació de TCE per *Phanerochaete chrysosporium* (Yadav et al., 2000). Per tant, a banda dels enzims extracel·lulars, els fongs de podridura blanca utilitzen mecanismes enzimàtics alternatius en la degradació de contaminants, com les monooxigenases pertanyents al sistema citocrom P450. Fa uns anys es van identificar i caracteritzar per primer cop els gens del citocrom P450 per *T. versicolor* (Ichinose et al., 2002).

### 5.2.2.1 Estudi *in vitro* amb lacasa comercial i mediadors

L'estudi de la degradació *in vitro* de decaBDE mitjançant lacasa comercial es va realitzar en absència i presència dels mediadors ABTS, HOBT, VA i DMHAP, amb una concentració de 1 mM en el cas de HOBT i 0,8 mM pels altres mediadors. Per a tots els casos, es va afegir la quantitat d'enzim comercial necessària per obtenir una activitat enzimàtica en fase aquosa al voltant de 180 U/L, que correspon a un valor semblant a la mesurada en els experiments previs de degradació d'aquest contaminant amb fong, i es va treure mostra al cap de 38 hores.

A la taula 5.1 es pot comprovar que en cap cas es produeix una degradació significativa de contaminant al cap de 38 hores, a l'obtenir una massa de decaBDE en les diferents ampolles amb lacasa i lacasa-mediador molt semblants al control. Només en el cas del sistema lacasa-DMHAP s'obté una lleugera disminució de massa de contaminant, equivalent a un percentatge del 14%, que suggereix que s'ha produït certa degradació per l'acció del sistema lacasa-mediador, però aquesta no és comparable amb la que s'obté mitjançant la degradació fúngica, que correspon a un valor de degradació del  $42 \pm 3\%$  per a un temps de 37,5 h. Per tant, els resultats de

degradació obtinguts no permeten demostrar que l'enzim lacasa es trobi implicat en el primer pas de degradació de decaBDE.

**Taula 5.1.** Resultats de degradació de decaBDE amb lacasa i mediadors per a una concentració inicial de contaminant de 2 mg/L i un temps de 38 hores.

	Massa DecaBDE ( $\mu\text{g}$ )
Control	17 $\pm$ 2
Lacasa sense mediador	17,0 $\pm$ 0,7
Lacasa + ABTS	16,3 $\pm$ 0,3
Lacasa + HOBT	17,5 $\pm$ 0,9
Lacasa + VA	18,6 $\pm$ 0,8
Lacasa + DMHAP	15 $\pm$ 1

### 5.2.2.2 Estudi *in vivo* amb inhibidors del citocrom P450

Per comprovar si, tal com es troba descrit per a la degradació d'altres contaminants, com el TCE o PCE, mitjançant *T. versicolor* (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2008a), el sistema enzimàtic citocrom P450 es troba implicat en la degradació de decaBDE, es va realitzar un experiment en presència del fong i del compost 1-aminobenzotriazole (ABT) en el medi en una concentració suficientment elevada, 5 mM, per provocar la inhibició de l'expressió d'aquest sistema enzimàtic per part del fong. Els resultats de degradació mitjançant el fong obtinguts en presència de l'inhibidor es comparen amb els obtinguts en els controls abiòtics i amb fong autoclavat, i els cultius sense presència de l'inhibidor. A la taula 5.2 es pot observar que hi ha una gran diferència entre la disminució de massa obtinguda en el cultiu sense inhibidor respecte al cultiu amb inhibidor. A més a més, pel cultiu amb inhibidor s'obté una disminució de massa de contaminant inferior a l'obtinguda en el control amb fong autoclavat. Per tant, els resultats suggereixen que el citocrom P450 es troba implicat en el primer pas de degradació de decaBDE. El fet que la degradació del contaminant es produeixi mitjançant un enzim intracel·lular implica que el compost ha de ser biodisponible per a poder ser degradat, perquè en primer lloc ha d'entrar a l'interior del fong per a ser degradat posteriorment pel citocrom P450. Per tant, a partir dels resultats de degradació de decaBDE obtinguts amb el fong (apartat 5.2.1) i tenint en compte que l'enzim responsable de la seva degradació és intracel·lular, es confirma que aquest contaminant és clarament biodisponible pel fong en presència de surfactant, i per tant, la presència d'aquest compost en aigües residuals juntament amb surfactants que incrementin la seva solubilitat, pot comportar efectes nocius pels microorganismes presents al medi i en general per a l'ecosistema.

**Taula 5.2.** Massa de decaBDE final en absència i presència d'inhibidor de citocrom P450 per a una concentració inicial de contaminant de 2 mg/L i un temps de 37,5 hores.

	Massa DecaBDE ( $\mu\text{g}$ )
Control abiòtic	16,6 $\pm$ 0,9
Control fong autoclavat	12,6 $\pm$ 0,3
Cultiu sense inhibidor	6,7 $\pm$ 0,3
Cultiu + ABT	14,4 $\pm$ 0,1

Els resultats obtinguts en aquest estudi concorden amb la via de degradació de decaBDE descrita per mamífers (Morck et al., 2003; Sandholm et al., 2003) i amb la via de degradació del 4-bromoBDE mitjançant *T. versicolor* (Hundt et al., 1999). El fet que el mateix sistema enzimàtic del fong es trobi implicat en la degradació del decaBDE i del 4-monoBDE podria indicar que el citocrom P450 és l'enzim responsable de la degradació de qualsevol compost de la família dels PBDEs, però per confirmar-ho és necessari realitzar els pertinents estudis d'inhibició enzimàtica durant el procés de degradació per a cadascun dels compostos.

### 5.2.2.3 Mineralització de DecaBDE

Prèviament, s'ha demostrat que *T. versicolor* és capaç d'oxidar altres contaminants, mitjançant la via de degradació del citocrom P450, compostos recalcitrants fins a produir  $\text{CO}_2$ , com és el cas del TCE i PCE (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2008a). D'una banda, tenint en compte aquest fet i que els experiments de degradació de decaBDE amb inhibidors del citocrom P450 suggereixen que aquest sistema enzimàtic es troba implicat en el primer pas de la seva degradació i d'altra banda, que en les mostres de degradació per a diferents temps, analitzades per HPLC i per cromatografia de gasos-espectrometria de masses, no es va detectar la formació de PBDEs de menor bromació ni PBDEs metoxilats, es van realitzar experiments de degradació amb [ $^{13}\text{C}$ ]-decaBDE per estudiar si el fet de no detectar els compostos mencionats en el medi és causat per un elevat grau de mineralització del contaminant per part del fong.

El primer experiment de degradació es va portar a terme addicionant inicialment 14,7  $\mu\text{g}$  de [ $^{13}\text{C}$ ]-decaBDE en 10 mL de medi definit, que corresponen a una concentració teòrica inicial de 1,47 mg/L, amb 16 g/L de glucosa, concentració més elevada de l'habitual al no poder realitzar addicions puntuals d'aquest substrat durant l'experiment, per a un temps total de 7 dies. La quantitat de decaBDE marcat utilitzada va ser menor a la dels experiments previs a causa de disposar d'una solució stock

amb una quantitat molt baixa de decaBDE marcat. Com a control es va utilitzar un triplicat d'ampolles amb les mateixes condicions experimentals que l'ampolla amb contaminant marcat però amb compost sense marcar, de forma que no s'hi ha de produir la formació de  $^{13}\text{CO}_2$ .

La producció de  $^{13}\text{CO}_2$  provinent del [ $^{13}\text{C}$ ]-DecaBDE es va analitzar mitjançant la tècnica de CG-EMRI. Aquesta tècnica mesura la relació isotòpica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  de la fase gas respecte a la d'un patró internacional V-PDB (Viena Pee Dee Belemnite). Aquesta relació isotòpica s'expressa en unitats de delta per mil ( $\delta^{13}\text{C}$ ), segons l'expressió:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_s}{R_r} - 1 \right) \cdot 1000$$

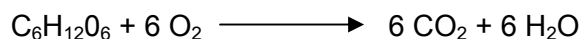
On  $R_s$  i  $R_r$  són les relacions de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la mostra i la de l'estàndard V-PDB, respectivament.

Per tal d'utilitzar aquesta tècnica, en principi era necessari que la mostra acomplís els següents requeriments:

Una concentració mínima de  $\text{CO}_2$  total de 400 mg/L a la fase gas.

Una relació isotòpica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  inferior al 2%, donat que valors superiors saturen l'aparell.

Respecte al primer requeriment, hi ha dues fonts de  $\text{CO}_2$  a la fase gas: la provinent del consum de glucosa i la present de forma natural en l'aire. Tot i que les mostres s'oxigenen durant 1 minut i es tanquen immediatament, possiblement resta una concentració de  $\text{CO}_2$  residual, però que no hem tingut en compte per ser restrictius. Respecte a la glucosa, la reacció deguda al seu metabolisme pel fong seria:

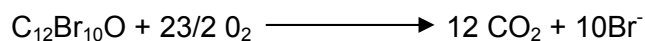


Es van afegir 10 mL amb una concentració de glucosa de 16 g/L. Per tant, es podrien generar  $5,3 \cdot 10^{-3}$  mols de  $\text{CO}_2$ .

Suposant que el rendiment en l'assimilació de la glucosa per part del fong és del 50%, els mols de  $\text{CO}_2$  alliberats serien de  $2,67 \cdot 10^{-3}$  mols  $\text{CO}_2$ . Considerant que el volum a la fase gas és de 110 mL, podem calcular la concentració de  $\text{CO}_2$  a la fase gas provinent del metabolisme de la glucosa, que correspondria a 1175 ppm  $\text{CO}_2$ .

Segons aquestes dades, amb 16 g/L es superen amb escreix els 400 mg/L necessaris per realitzar l'analítica.

En quant a la relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , es suposa que el decaBDE es mineralitza segons la reacció:



Sabent que el [ $^{13}\text{C}$ ]-decaBDE es troba marcat isotòpicament en els dotze carbonis (99%) i suposant que el decaBDE es mineralitza completament (per sobredimensionar la quantitat de  $^{13}\text{C}$ ), s'obtindria:

$$14,7 \mu\text{g } [^{13}\text{C}]\text{-decaBDE} \cdot \frac{1 \text{ mol } [^{13}\text{C}]\text{-TCE}}{971,08 \text{ g } [^{13}\text{C}]\text{-TCE}} \cdot \frac{12 \mu\text{mol } ^{13}\text{CO}_2}{1 \mu\text{mol } [^{13}\text{C}]\text{-decaBDE}} \cdot \frac{99 \mu\text{mol } ^{13}\text{CO}_2}{100 \mu\text{mol } \text{CO}_2} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{10^6 \mu\text{mol}} = 1,79 \cdot 10^{-7} \text{ mol } ^{13}\text{CO}_2$$

I la relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  es pot calcular segons:

$$\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} = \frac{1,79 \cdot 10^{-7} \text{ mol } ^{13}\text{CO}_2}{2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mol } ^{12}\text{CO}_2} \cdot 100 = 6,7 \cdot 10^{-3} \%$$

que és inferior al llindar del 2% que satura el sistema analític.

Per tant, és factible la quantificació de  $\text{CO}_2$  generat mitjançant aquesta metodologia.

A la taula 5.3 es mostren els valors de relació isotòpica obtinguts al finalitzar l'experiment de degradació de decaBDE marcat, tant pel cultiu amb el contaminant marcat com pel cultiu utilitzat de control, on es va quantificar una degradació del 70% al cap de 7 dies. Tenint en compte que l'error associat a l'equip d'anàlisi és de  $\pm 0,5\%$  VPDB, que la diferència de relació isotòpica entre el cultiu amb el contaminant marcat i el cultiu utilitzat de control és inferior a aquest error i que s'ha produït una degradació de decaBDE elevada, no és possible afirmar que tingui lloc la formació de  $^{13}\text{CO}_2$  a partir dels resultats obtinguts i per tant, que es produeixi mineralització de decaBDE durant el procés de degradació.

**Taula 5.3.** Valors de relació isotòpica obtinguts en el primer experiment de degradació de decaBDE marcat mitjançant *T. versicolor* per a un temps de 7 dies.

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰VPDB)
Cultiu amb [ $^{13}\text{C}$ ]-decaBDE	-26,3
Control amb [ $^{12}\text{C}$ ]-decaBDE	-26,6 $\pm$ 0,1

A partir dels resultats obtinguts en aquest experiment, es dedueix que no es produeix mineralització en el procés de degradació de decaBDE o que la fracció de  $^{13}\text{CO}_2$  formada per la degradació de decaBDE és tan baixa respecte a la de  $^{12}\text{CO}_2$  formada pel consum de glucosa, que el procés analític no és prou sensible per detectar-la. Per tant, es va decidir realitzar un segon experiment canviant les condicions experimentals per augmentar la relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  i comprovar si d'aquesta manera era possible detectar la formació de diòxid de carboni marcat. Per tal d'augmentar aquesta relació es pot augmentar la quantitat inicial de contaminant marcat o disminuir la quantitat inicial de glucosa. En aquest cas, la primera opció no era viable perquè, com s'ha comentat anteriorment, es disposava d'una quantitat molt petita de contaminant marcat isotòpicament i per tant, es va decidir disminuir la quantitat inicial de glucosa. Es van preparar dues ampolles amb una quantitat inicial de contaminant marcat de 15,9  $\mu\text{g}$  en cadascuna d'elles. La concentració inicial de glucosa va ser de 6 g/L amb un volum de 10 mL de medi definit en una ampolla i 5 mL de medi en l'altre per un temps de degradació de 7 dies amb els respectius controls per triplicat amb decaBDE sense marcar. En el cas de l'ampolla amb 10 mL de medi, es complien els dos requeriments per poder utilitzar la tècnica d'anàlisi perquè la concentració de  $^{12}\text{CO}_2$  format a partir del consum de glucosa i la relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  eren, seguint els mateixos supòsits que l'experiment anterior, de 400 mg/L i de 0,0179%, respectivament, amb un augment de relació isotòpica de 2,7 cops respecte l'experiment anterior. En el cas de l'ampolla amb 5 mL de medi, el valor de relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  era de 0,038%, augmentant 5,2 cops la relació respecte al primer experiment, però el supòsit d'un valor mínim de concentració de  $^{12}\text{CO}_2$  en fase gas no es complia, perquè el valor de concentració era de 200 mg/L. Per tant, en aquest segon cas no estava garantit l'obtenció d'un pic en el cromatograma a partir del qual calcular la relació isotòpica, però els resultats analítics obtinguts van permetre realitzar aquest càlcul en aquestes condicions.

A partir de la taula 5.4, es comprova que el valor de relació isotòpica obtingut per als cultius amb decaBDE marcat és, en els dos casos, inferior als controls de

degradació amb contaminant no marcat, on es va quantificar una degradació final del 75%, i per tant, tampoc en aquest cas es pot demostrar la formació de  $^{13}\text{CO}_2$  en les ampolles de degradació de decaBDE marcat a partir dels resultats obtinguts.

**Taula 5.4.** Valors de relació isotòpica en el segon experiment de degradació de decaBDE marcat mitjançant *T. versicolor* per a un temps de 7 dies.

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰VPDB)
Cultiu amb [ $^{13}\text{C}$ ]-decaBDE (V= 10 mL)	-26,3
Control amb [ $^{12}\text{C}$ ]-decaBDE (V= 10 mL)	-25,6 ± 0,8
Cultiu amb [ $^{13}\text{C}$ ]-decaBDE (V= 5 mL)	-26,1
Control amb [ $^{12}\text{C}$ ]-decaBDE (V= 5 mL)	-25,9 ± 0,1

Els dos experiments realitzats suggereixen que no es produeix una mineralització significativa de decaBDE per a les diferents concentracions inicials de contaminant provades. Ara bé, segons els càlculs previs, les relacions  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  que es podien obtenir a partir del procés de degradació en els condicions més favorables eren molt baixes i existeix la possibilitat que si realment es produeix mineralització de contaminant, el valor es trobi per sota el límit de detecció de la tècnica analítica. Per tant, per poder descartar la hipòtesi de la mineralització del contaminant seria necessari treballar amb una quantitat de decaBDE marcat significativament superior a la utilitzada.

#### 5.2.2.4 Mesura d'ions bromur alliberats al medi per la degradació de decaBDE

Tal com es descriu més endavant, en l'apartat 5.2.4, a causa del procés de degradació de decaBDE mitjançant el fong, es produeix l'alliberament d'ions bromur al medi per la seva progressiva substitució en la molècula de contaminant per ions hidroxil, donant lloc a compostos PBDE hidroxilats de menor bromació que el decaBDE. Per tant, un augment de la concentració d'ions bromur al medi entre l'inici i el final de l'experiment indicaria que s'ha produït la degradació del contaminant i en el cas de disposar d'un nombre representatiu de valors de micromols de bromur alliberats enfront micromols de decaBDE degradat, és possible realitzar un ajust de la relació entre els corresponents valors i conèixer el percentatge de contaminant desbromat completament al finalitzar l'experiment.



Respecte a la degradació de decaBDE per a les dues concentracions inicials provades, 2 mg/L i 10 mg/L, si es produís la desbromació completa del contaminant s'obtidria una concentració de ions brom al medi de 1,67 i 8,33 mg/L, respectivament. Tenint en compte aquests valors, es va realitzar un calibrat de bromurs des de 0,25 fins a 10 mg/L.

Un cop es van analitzar mostres de degradació de decaBDE en medi definit per a una concentració inicial de contaminant de 2 mg/L, es va observar que el possible pic de bromurs que hauria d'aparèixer en l'anàlisi per cromatografia iònica, per a un temps aproximat de 7,9 min, coincidia amb la cua del pic anterior en l'anàlisi, que correspon als ions sulfat. Com que la concentració de sulfats és aproximadament d'unes 400 mg/L i per tant, molt més elevada que la de bromurs, el pic corresponent al primer emmascarava el possible pic corresponent al segon i impossibilitava la seva quantificació. Per tal de solucionar aquesta problemàtica experimental, es va realitzar un tractament de les mostres, previ a l'anàlisi per cromatografia iònica, per tal de provocar la precipitació dels sulfats presents a les mostres i poder quantificar la concentració de bromurs en el medi. El tractament va consistir en l'acidificació del medi amb àcid nítric concentrat i l'addició d'hidròxid de calci ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) en excés per provocar la seva precipitació com a sulfat de calci ( $\text{CaSO}_4$ ).

Un cop es va aplicar el tractament previ i es van tornar analitzar les mostres de l'experiment de degradació de decaBDE amb una concentració inicial de 2mg/L, es va comprovar que, tot i addicionar hidròxid de calci en excés, no era possible provocar la precipitació total dels sulfats, obtenint un pic en l'anàlisi d'una magnitud entre 50 i 100 mg/L, que no permetia distingir clarament el possible pic corresponent als bromurs. Les mostres analitzades corresponien a temps de degradació de 60 i 182 hores i en algunes de les mostres apareix un pic per a un temps molt proper a 7,9 min, el qual es va quantificar com el corresponent a la concentració de bromurs, tot i que en tots els casos el pic es trobava solapat amb la cua del pic corresponent als sulfats. A la taula 5.5 es compara la concentració de bromurs mesurada amb l'esperada segons la degradació de decaBDE obtinguda a les corresponents mostres, suposant que el decaBDE degradat es desbromés completament. Es pot observar que en els casos en que va ser possible la quantificació del pic esmentat, s'obté una concentració de bromur superior a l'esperada. Per tant, el pic assignat als bromurs ha de correspondre a un altre compost present al medi que apareix per a un temps molt similar i d'altra banda, no s'observa als cromatogrames corresponents la presència d'algun altre pic que pugui correspondre als bromurs, possiblement per la presència del pic de sulfat

que l'emascara o pel fet que el límit de detecció de l'anàlisi és massa elevat per poder detectar la quantitat de bromurs formada a causa de la degradació de decaBDE.

**Taula 5.5.** Concentració de bromurs mesurada i esperada segons la degradació de decaBDE en l'experiment amb una concentració inicial de contaminant de 2 mg/L.

Mostres	Concentració Br <sup>-</sup> (mg/L)	Concentració Br <sup>-</sup> esperada (mg/L)
60h 1	0	0,8
60h 2	0	0,9
60h 3	2,2	0,7
182h 1	0	1,0
182h 2	1,4	1,0
182h 3	2,6	1,0

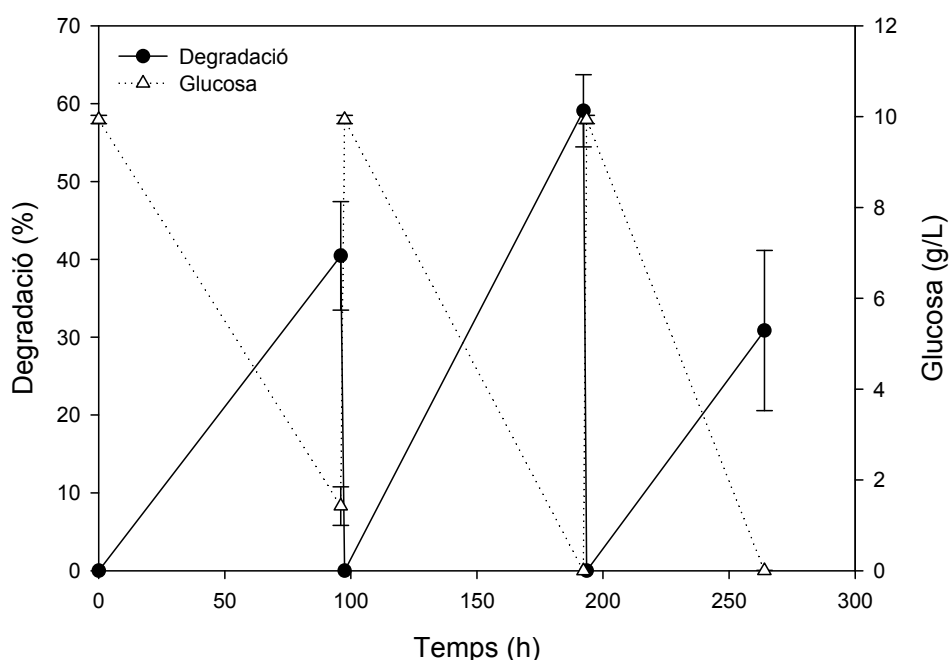
A partir dels resultats obtinguts, es va decidir no utilitzar l'anàlisi per cromatografia iònica per quantificar la concentració de bromurs i es va preferir realitzar, d'una banda, un experiment de degradació de decaBDE en batchs seqüencials amb reutilització del fong per tal de comprovar que principalment l'eliminació de contaminant es produeix per la seva degradació mitjançant el fong i no exclusivament per la seva adsorció en ell. D'altra banda, es va posar a punt una tècnica analítica per detectar els possibles productes de degradació de les diferents mescles de PBDEs i així poder obtenir les corresponents vies de degradació.

#### 5.2.2.5 Degradació de DecaBDE en discontinus seqüencials mitjançant la reutilització del fong

L'experiment de degradació de decaBDE en discontinus seqüencials va consistir en tres batchs consecutius amb renovació del medi de degradació i reutilització del fong. A la figura 5.10 es mostra l'evolució del percentatge de degradació i de la concentració de glucosa en els tres batchs consecutius amb una concentració inicial de decaBDE de 10 mg/L amb una durada d'unes 95 hores pels dos primers i de 70 hores pel tercer. Es pot observar que en el segon batch es va obtenir el valor de degradació de contaminant més elevat de tot l'experiment,  $59 \pm 5\%$  respecte a  $40 \pm 7\%$  al primer batch, i en el tercer es va obtenir el valor més baix, però que no és menyspreable ( $31 \pm 10\%$ ), tenint en compte que la durada de l'últim batch va ser clarament inferior als altres dos realitzats. En el cas que l'eliminació de decaBDE fos produïda exclusivament per la seva adsorció en el fong, a partir del segon batch, ja no s'hauria d'obtenir degradació de contaminant o en tot cas, un valor menyspreable, pel

fet que durant el primer batch s'assoleix un equilibri d'adsorció de decaBDE entre la fase sòlida, el fong, i la fase líquida i en el segon i tercer batch, al renovar el medi amb contaminant i reutilitzar la biomassa, aquest no s'hauria d'adsorbir més en el fong, al haver assolit l'equilibri en el batch previ. En canvi, com s'observa a la figura 5.10, es van obtenir percentatges de degradació significatius tant en el segon com en el tercer batch, el qual confirma que l'eliminació de contaminant es produeix principalment per la seva degradació mitjançant el citocrom P450 intracel·lular i no per la seva adsorció en el fong.

A més a més, es pot comprovar que l'activitat metabòlica del fong no es va veure afectada per la presència prolongada del contaminant, al ser consumida completament la glucosa addicionada a l'inici del segon i tercer batch.



**Figura 5.10.** Evolució de la degradació i de la concentració de glucosa obtinguda per a cadascun dels batchs de degradació de decaBDE mitjançant el fong.

### 5.2.3 Degradació de les mesclades comercials de pentaBDEs i d'octaBDEs

A partir de la comprovació de la capacitat del fong per degradar la mescla comercial decaBDE amb un elevat percentatge, es va decidir estudiar la degradació de les altres dues mesclades de PBDEs utilitzades comercialment en el passat, com són les de pentaBDEs i d'octaBDEs, i que actualment es detecten en el medi ambient en concentracions significatives a causa del seu alt caràcter recalcitrant, tot i la prohibició

del seu ús a la Unió Europea a partir de l'any 2004 i l'aturada definitiva de la seva producció a Estats Units aquell mateix any. A més a més, és important estudiar la degradació d'aquests compostos pel fet que també es poden acumular en el medi ambient per la descomposició del decaBDE per fotodegradació amb llum ultraviolada (Eriksson et al., 2004; Ahn et al., 2006b; Christiansson et al., 2009).

A la taula 5.6 es mostra la composició de les dues mescles obtinguda a partir dels valors de concentració resultants de l'anàlisi dels controls abiòtics, que es van utilitzar en l'experiment de degradació mitjançant el fong per quantificar la massa inicial dels components presents en les mescles. Cal remarcar que en el cas de la mescla de pentaBDEs, de la qual es coneix la composició original (cap. 9 - Annexes), es van poder quantificar 6 dels 27 compostos presents a la mescla, perquè eren els únics dels quals es disposava d'estàndard analític i per tant, de corba de calibratge de concentració. Aquests compostos corresponen a BDE 47 (2,2',4,4'-tetraBDE), BDE 100 (2,2',4,4',6-PentaBDE), BDE 99 (2,2',4,4',5-pentaBDE), BDE 154 (2,2,4,4',5,6'-heptaBDE), BDE 153 (2,2',4,4',5,5'-hexaBDE) i BDE 183 (2,2',3,4,4',5',6-heptaBDE), són els majoritaris de la mescla, excepte en el cas de BDE 183, representant el 92,5% de la seva composició total, segons la informació subministrada (cap. 9 - Annexes), i també són els que generalment es detecten en el medi ambient. Respecte a la mescla d'octaBDEs es van detectar 2 compostos, BDE 153 i BDE 183, els quals corresponen als majoritaris de la mescla segons la bibliografia consultada (WHO, 1994), i és probable no s'hagin detectat els altres compostos de la mescla al no disposar del corresponent estàndard analític. En aquest cas no és possible saber quins són els compostos no detectats al no disposar d'informació relativa a la composició de la mescla per part del subministrador del producte, Sigma Adrich.

L'experiment de degradació d'aquestes mescles es va realitzar en les mateixes condicions que els experiments de degradació de decaBDE realitzats prèviament, però variant la concentració inicial de contaminant. En aquest cas es va utilitzar una concentració inicial teòrica de mescla de 5 mg/L per ambdós casos per a un temps total de degradació de 14,5 dies.

**Taula 5.6.** Composició de les mescles d'octaBDEs i pentaBDEs a partir de l'anàlisi del control.

Components mescla		BDE 153		BDE 183			
octaBDEs							
Composició en la mescla (%)		14 ± 2		86 ± 3			
Components mescla		BDE 47	BDE 100	BDE 99	BDE 153	BDE 183	BDE 154
pentaBDEs							
Composició en la mescla (%)		34,2 ± 0,9	11,4 ± 0,4	42,7 ± 0,6	6,0 ± 0,6	1,9 ± 0,4	3,8 ± 0,2

A la taula 5.7 es pot observar el percentatge de degradació obtingut per a cadascun dels components detectats de les mescles i per a la suma de tots el PBDEs per cada mescla. Respecte a la mescla d'octaBDEs, es pot observar que es va produir una disminució important de la concentració dels dos compostos. També s'observa que l'adsorció dels dos compostos en el fong va ser molt elevada, el que provoca una diferència important entre el percentatge de degradació, que es calcula a partir de la diferència entre la massa de contaminant en el control amb fong autoclavat i en el cultiu amb fong viu, i el percentatge d'eliminació, que es calcula mitjançant la diferència entre el control abiòtic i el cultiu amb fong viu. Per a la suma de PBDEs de la mescla d'octaBDEs, es va obtenir una degradació mínima del  $27 \pm 7\%$  i una eliminació del  $67 \pm 7\%$ . Respecte al percentatge de contaminant que s'ha quantificat com adsorbit en el fong, existeix la possibilitat que part d'aquest fos degradat també pel sistema enzimàtic intern del fong després d'haver estat adsorbit, tot i que no va ser possible quantificar-ho. Aquesta hipòtesi pot ser certa si, com en el cas del decaBDE, l'enzim responsable de la degradació dels components de la mescla d'octaBDEs fos el sistema enzimàtic intracel·lular citocrom P450 o altres enzims intracel·lulars, el qual no s'ha comprovat experimentalment. En referència a aquest fet, s'ha demostrat que en el cas de la degradació del colorant Gris Lanaset G mitjançant *T. versicolor* en forma de pèl·lets, on es troba implicat el sistema enzimàtic intracel·lular del fong, el colorant adsorbit durant les primeres hores d'experiment, el qual provoca un enfosquiment de la superfície del fong, és posteriorment degradat i s'observa un important descoloriment del fong sense generar un augment de color de la fase líquida en contacte amb la biomassa (Blánquez et al., 2004).

Per tant, al calcular l'adsorció mitjançant el fong autoclavat, el percentatge de degradació presentat és el valor mínim que es pot afirmar que es va degradar però aquest podria ser superior depenent de quin percentatge de contaminant adsorbit

hagués estat posteriorment degradat pel fong. En tot cas, la diferència entre el percentatge de d'eliminació i de degradació obtingut denota que el procés d'adsorció del contaminant en el fong no es pot menysprear en cap dels dos casos.

**Taula 5.7.** Percentatge de degradació i desaparició per a tots els components detectats en les mescles d'octaBDE i de pentaBDE en l'experiment de degradació mitjançant *T. versicolor*.

Components mescla octaBDE		BDE 153	BDE 183				Total PBDEs	
% de degradació		5 ± 12	31 ± 7				<b>28 ± 7</b>	
% d'adsorció		93 ± 24	30 ± 2				<b>39 ± 4</b>	
% d'eliminació		98 ± 22	62 ± 8				<b>67 ± 7</b>	
Components mescla pentaBDE		BDE 47	BDE 100	BDE 99	BDE 153	BDE 183	BDE 154	Total PBDEs
% de degradació		33 ± 10	33 ± 11	38 ± 17	62 ± 18	46 ± 35	49 ± 9	<b>38 ± 13</b>
% d'adsorció		57 ± 3	57 ± 5	41 ± 4	31 ± 16	0	50 ± 11	<b>47 ± 2</b>
% d'eliminació		90 ± 10	90 ± 11	79 ± 17	93 ± 18	44 ± 22	99 ± 9	<b>85 ± 13</b>

Si es compara l'adsorció obtinguda per als components de la mescla d'octaBDEs amb l'obtinguda en els experiments de degradació del decaBDE (figura 5.8), s'observa que per als compostos menys bromats es va obtenir una adsorció significativament més elevada. Aquest fet es deu a la seva major solubilitat en fase aquosa i per tant, a la seva major biodisponibilitat per interaccionar amb la biomassa.

Respecte a la degradació dels components de la mescla de pentaBDE, a la taula 5.7 es pot observar que es va obtenir una eliminació important per a tots els components detectats, sent el compost BDE 183, que correspon al compost de major bromació present a la mescla i també el que es troba en menor proporció, el que es va eliminar en un menor percentatge. Es va obtenir una degradació mínima de la suma de tots els components del 38 ± 13% i una eliminació del 85 ± 13%. Tal com succeeix amb els components presents a la mescla d'octaBDEs, l'adsorció dels contaminants de la mescla en el fong no es pot menysprear i tal com s'ha comentat anteriorment, el valor de degradació que es presenta correspon al valor mínim que és segur que es va degradar, perquè és possible que una part del contaminant adsorbit en el fong fos posteriorment també degradat, però no és possible quantificar-ho. Respecte al percentatge d'adsorció calculat pel BDE 183 en la degradació de la mescla de pentaBDEs s'ha de comentar que no concorda amb el resultat obtingut per la mescla d'octaBDEs on sí es va obtenir una adsorció significativa. La causa d'aquesta diferència podria ser el fet que la seva concentració en la mescla de pentaBDEs és

molt baixa i en el cas del control amb fong autoclavat, al existir un error experimental associat elevat, la fiabilitat del valor obtingut és baixa.

Com a resum, és important comentar que a partir dels resultats que es presenten a la taula 5.7, es pot comprovar que el fong *T. versicolor* es capaç d'eliminar en un percentatge molt elevat tots els components majoritaris de les mescles de pentaBDEs i octaBDEs.

#### 5.2.4 Identificació dels productes de degradació de PBDEs

De cara a la detecció de possibles productes de degradació tant del decaBDE com de les mescles d'octaBDEs i de pentaBDEs, es va estudiar, per una banda, la possible formació de PBDEs de menor bromació que els compostos originaris mitjançant l'anàlisi per cromatografia de gasos-espectrometria de masses de les mostres de degradació per a diferents temps. En el cas del decaBDE, per a cap de les mostres analitzades (temps de degradació corresponents a 24h, 36h, 60h, 84h, 182h) es detecta la formació d'algun compost PBDE de menor bromació a aquest contaminant. Respecte a les mescles d'octaBDEs i de pentaBDEs, en l'anàlisi de les mostres corresponents a un temps de 168h no es detecta un augment de concentració per a cap dels components presents en cadascuna de les mescles ni tampoc s'aprecia la formació de cap PBDE que no es trobi present en la composició inicial de les respectives mescles. Per tant, a partir dels resultats obtinguts per a les tres mescles, es pot afirmar que la degradació de PBDEs mitjançant el fong no segueix la via de desbromació reductiva, que consisteix en la substitució progressiva dels àtoms de brom enllaçats als anells difenil éter per àtoms d'hidrogen formant PBDEs de menor bromació a partir dels seus precursors més bromats. Aquest fet és lògic tenint en compte que aquesta via de degradació és característica dels processos de degradació bacterians en condicions anaeròbies i en aquest cas, la degradació mitjançant el fong té lloc en condicions aeròbies.

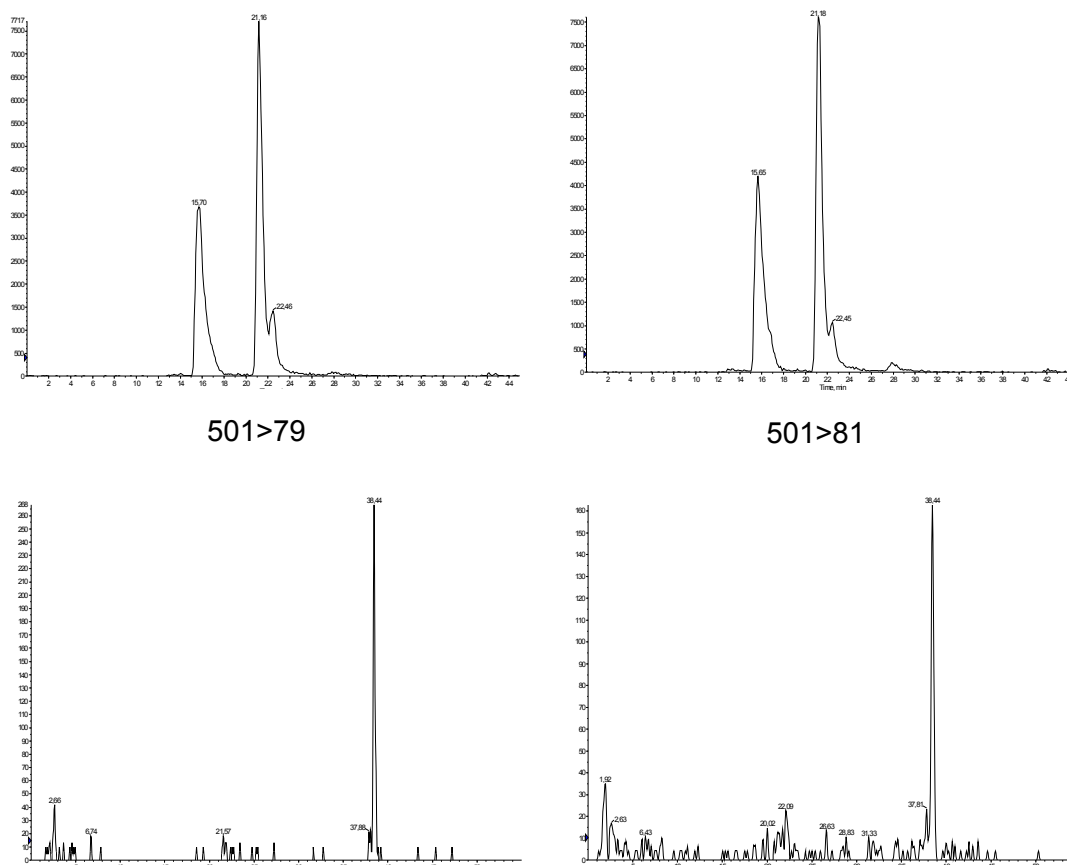
D'altra banda, a partir de la comprovació de la implicació del citocrom P450 però no de l'enzim lacasa en el primer pas de degradació de decaBDE mitjançant el fong, i tenint en compte que existeixen estudis de degradació en mamífers d'aquest contaminant (Morck et al., 2003; Sandholm et al., 2003) i d'altres PBDEs, com el BDE 154 (Hakk et al., 2009) i el BDE 100 (Hakk et al., 2006), on s'ha comprovat que també s'hi troba implicat aquest sistema enzimàtic intracel·lular, es va pensar que els productes de degradació de les mescles de PBDEs mitjançant el fong haurien de ser

molt similars als detectats en la degradació en mamífers. Aquests productes corresponen a metabòlits hidroxilats i metoxi-hidroxilats, només en el cas del decaBDE, de menor bromació que els compostos originaris. Per aquesta raó es va posar a punt un anàlisi mitjançant cromatografia líquida-espectrometria de masses per detectar PBDEs hidroxilats (OH-PBDEs) i metoxi-hidroxilats.

Respecte a les mescles de pentaBDEs i octaBDEs, es van analitzar les mostres corresponents a un temps de degradació de 12, 24, 72 i 169 h per tal de detectar la formació d'OH-PBDEs i PBDEs metoxi-hidroxilats. A les mostres corresponents a un temps de 12 h, es va identificar un metabòlit de degradació en cadascuna de les mescles (Figures 5.11 i 5.12). Per a la mescla de PentaBDEs, es va detectar un pic corresponent a la transició d'un tetra-OH-PBDE (501>79 i 501>81). En el cas de la mescla d'octaBDEs, es va detectar un pic corresponent a un hexa-OH-PBDE (654>79 i 654>81). La identificació d'OH-PBDEs es va basar en els següents criteris: (i) És necessari obtenir respostes simultànies per a les dues monitoritzacions per reacció selectiva (SRM de l'anglès *Selected reaction monitoring*) realitzades; (ii) L'àrea de la senyal ha de ser com a mínim 3 cops superior a la senyal del soroll; i (iii) la diferència de la intensitat relativa de pic respecte als valors teòrics obtinguts amb les solucions estàndards no pot ser superior a  $\pm 15\%$ . Tots aquests criteris es van complir per als dos pics detectats, amb una proporció SRM1/SRM2 de 0,98 (1,09 per l'estàndard analític) i 1,1 (1,17 per l'estàndard analític) per als congèneres tetra- i hexa-OH-PBDEs, respectivament. Aquests resultats confirmen la seva identificació com a congèneres d'OH-PBDEs. Tot i això, el temps de retenció per aquests dos pics detectats no concorda amb cap dels estàndards d'OH-PBDE disponibles. Per tant, es conclou que han de correspondre a un altre congènere de tetra-OH-BDE i hexa-OH-BDE diferent dels inclosos en les solucions estàndard analítiques disponibles.

Per a les mostres corresponents a temps superiors (24, 72 i 169 h), no es va detectar cap pic corresponent a un compost OH-PBDE per cap de les dues mescles. S'assumeix que els OH-PBDEs generats per a un temps de 12h van ser degradats pel fong en les següents 12 hores d'experiment. Aquesta assumpció també podria explicar els resultats obtinguts en l'experiment de degradació de decaBDE mitjançant el fong, tenint en compte que la primera mostra correspon a un temps de degradació de 24 h, on no es detecta la formació de congèneres d'OH-PBDEs en cap de les mostres analitzades.



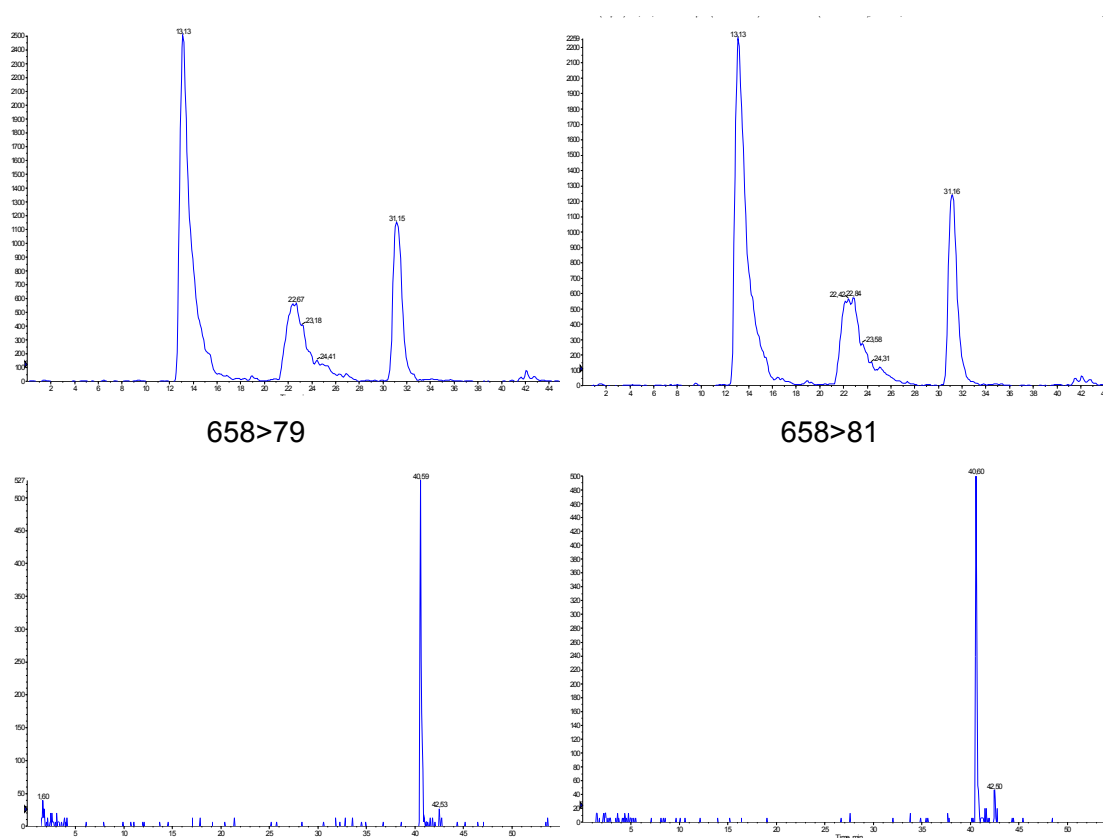


**Figura 5.11.** Cromatogrames obtinguts per a les dues transicions realitzades on es mostra el pic detectat per a un temps de degradació de 12 h, corresponent a un tetra-OH-BDE (part inferior), i els pics corresponents als estàndards de tetra-OH-PBDES dels que es disposa (3-OH-BDE47, 5-OH-BDE47 i 6-OH-BDE47) (Part superior).

Respecte a la possible formació de PBDEs metoxi-hidroxilats per la degradació de les diferents mescles de PBDEs mitjançant el fong, en cap de les mostres de degradació analitzades es va detectar la presència d'aquest tipus de metabòlits.

La detecció d'un tetra-OH-BDE i un hexa-OH-BDE per l'acció degradadora del fong en les mescles de pentaBDEs i octaBDEs, respectivament, per a un temps de 12h, indica que la via de degradació mitjançant el fong correspondria a una hidroxilació dels composts PBDEs, mitjançant la progressiva substitució dels àtoms de brom per ions hidroxil. En el cas del decaBDE no ha estat possible la detecció de cap producte hidroxilat, però tenint en compte que no es disposava de mostres de degradació per a temps inferiors a 24 h, és factible que per aquest temps, els possibles OH-PBDEs formats ja s'hagin degradat, tal com succeeix en la degradació de les mescles de pentaBDEs i octaBDEs. Per tant, és possible que la degradació de decaBDE mitjançant el fong també es produeixi mitjançant la progressiva hidroxilació del

compost, però seria necessari disposar de resultats de l'anàlisi de mostres per a temps de degradació de 12 h o menys per tal de confirmar aquesta possibilitat.



**Figura 5.12.** Cromatogrames obtinguts per a les dues transicions realitzades on es mostra el pic detectat per a un temps de degradació de 12 h, corresponent a un hexa-OH-BDE (part inferior), i els pics corresponents als estàndards de hexa-OH-PBDES dels que es disposa (3-OH-BDE154 i 6-OH-BDE157) (Part superior).

La via de degradació de les diferents mescules mitjançant *T. versicolor* proposada en aquest apartat concorda parcialment amb la que té lloc en la degradació de decaBDE (Morck et al., 2003; Sandholm et al., 2003), BDE 154 (Hakk et al., 2009) i BDE 100 (Hakk et al., 2006) en mamífers. En el cas dels dos últims, els quals són components de la mescla de pentaBDEs, al no poder identificar el tetra-OH-BDE format en la degradació mitjançant el fong, no és possible comprovar si aquest compost coincideix amb el format en la degradació de BDE 154 i BDE 100 en mamífers. Tot i això, la semblança dels productes formats en el procés de degradació mitjançant el fong respecte a la degradació en mamífers, permet suposar que en el cas de les mescules de pentaBDEs i octaBDEs, el citocrom P450 també és el responsable del primer pas de degradació, fet que no s'ha comprovat al no haver realitzat proves amb inhibidors del citocrom P450 amb aquestes mescules.

### 5.3 Conclusions

- *Trametes versicolor* és capaç de degradar les mescles de decaBDE, d'octaBDEs i de pentaBDEs en presència de surfactants amb percentatges d'eliminació entre el 65 i el 95%.
- S'han detectat productes de degradació on s'han substituït broms per hidroxils però no s'han detectat PBDEs de menor bromació ni metabòlits metoxi-hidroxilats.
- La detecció de productes hidroxilats junt amb els resultats obtinguts en les proves amb inhibidors del citocrom P450 permeten concloure que aquest sistema enzimàtic és el responsable del primer pas de degradació d'aquests compostos.





---

## Capítol 6

# Degradació de contaminants mitjançant el procés de biooxidació avançada amb *Trametes versicolor*

---

- Una part de la resultats continguts en aquest capítol es troben pendants de ser publicats com a articles:

Vilaplana, M., García, A. B., Caminal, G., Guillén, F., Sarrà, M., 2011. Optimisation of trichloroethylene degradation by *Trametes versicolor* under quinone redox cycling conditions using an experimental design technique. Enviat a *Biodegradation*.

Vilaplana, M., Caminal, G., Guillén, F., Sarrà, M., 2011. Scale-up to reactor system of carbamazepine degradation by *Trametes versicolor* under quinone redox cycling conditions and study of different operational configurations of this process. Article en preparació.







## Resum

El procés de biooxidació avançada consisteix en l'oxidació de contaminants en fase aquosa mitjançant radicals hidroxils, els quals es troben induïts per un procés biològic on el fong s'hi troba implicat. Els resultats que es presenten en aquest capítol es troben distribuïts en tres grans apartats.

En el primer apartat es mostra l'estudi de la capacitat del procés de biooxidació avançada per degradar el decabromodifenil éter (decaBDE). Per a concentracions inicials de contaminant de 2 i 10 mg/L, amb la utilització dels surfactants Tween 80 i Tween 20, no s'obté una degradació significativa mitjançant el procés biològic de producció de radicals hidroxils. La prova de producció de TBARS (de l'anglès *Thiobarbituric acid reactive substances*), que s'utilitza com a mesura indirecta de la producció de radicals hidroxils, en presència i absència de contaminant al medi suggereix que la producció de radicals hidroxils no es veuria afectada per la presència d'aquest al medi a les dues concentracions inicials provades als experiments de degradació. Finalment, un experiment de degradació, amb les mateixes concentracions inicials de decaBDE provades anteriorment, mitjançant la producció de radicals hidroxils pel procés Fenton químic, pel qual s'obté una producció de radicals hidroxils més elevada amb un temps més curt que el procés de biooxidació avançada, mostra que no s'obté una degradació apreciable per a cap de les condicions provades.

El segon apartat es centra, principalment, en l'optimització de la degradació de tricloroetilè (TCE) en ampolles de sèrum mitjançant el procés de biooxidació avançada usant una tècnica de disseny experimental. Per una banda, s'estudia l'efecte de la velocitat d'agitació i de la relació de volum entre la fase gas i la fase líquida mitjançant l'aplicació de la metodologia de disseny de composició central (DCC). Els resultats mostren que la velocitat d'agitació té un efecte important i positiu en la degradació de TCE i que existeix una interacció entre els dos factors. Aquest fet significa que la relació de volums fase gas-fase líquida té un efecte significatiu per a baixes velocitats d'agitació mentre que per a valors elevats no té un efecte important en el procés de degradació. D'altra banda, es mostra també l'efecte de la concentració de biomassa en la degradació de contaminant mitjançant la utilització de diferents nivells de biomassa i els resultats demostren que té un efecte positiu en la degradació per a valors inferiors a 1,6 g pes sec/L. Els resultats mostren que la combinació òptima de factors per assolir la degradació màxima de TCE correspon a la velocitat d'agitació (200 rpm) i la relació volums fase gas-fase líquida (4,4) màximes, i a una concentració de biomassa

de 1,6 g pes sec/L. Un cop finalitzada l'optimització del procés de degradació de TCE, s'ha realitzat un experiment de degradació de TCE en un reactor hermètic de tanc agitat de 2 L de volum. Els resultats mostren que, tot i existir producció de TBARS, el percentatge de degradació obtingut és menyspreable.

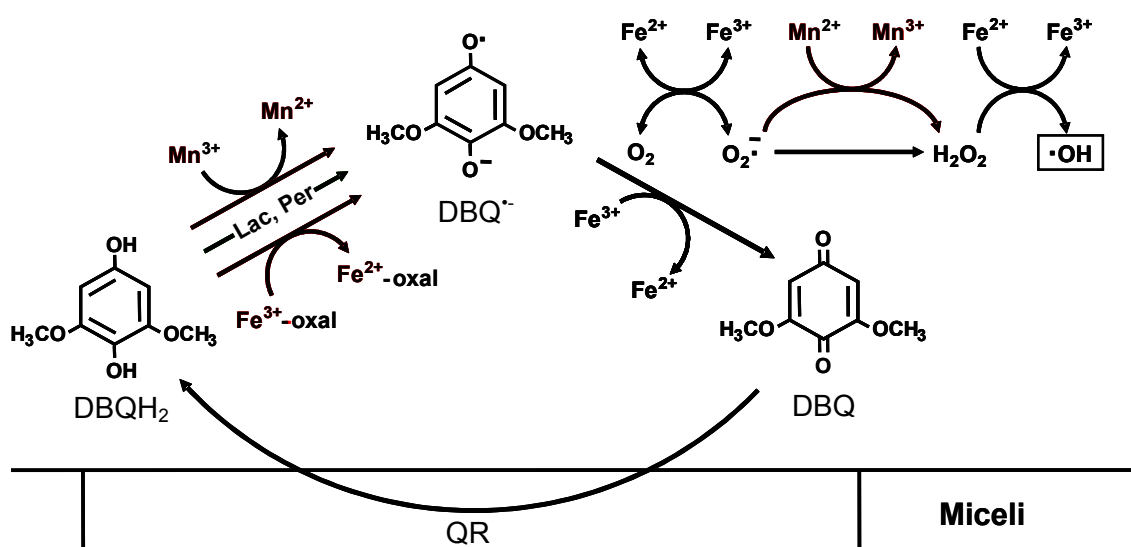
Finalment, en el tercer apartat es presenta l'aplicació en reactor del procés de biooxidació avançada per degradar la carbamazepina, la qual s'ha escollit com a contaminant a estudiar al comprovar la impossibilitat d'obtenir un percentatge de degradació significatiu de TCE en el reactor hermètic de tanc agitat. A partir de la comparació del percentatge de degradació de carbamazepina obtingut en diferents sistemes experimentals en discontinu, s'ha escollit un reactor de vidre fluiditzat per polsos d'aire, on s'obté una degradació del 67,1% al cap de 6 hores, per l'aplicació del procés en reactor. S'ha treballat en dues formes d'operació diferents: en discontinu seqüencial i en continu. En el primer cas, s'ha comprovat que es possible mantenir el percentatge de degradació en valors similars durant sis tractaments en discontinu consecutius, obtenint percentatges de degradació entre 34,4 i 47,1%, produint-se una disminució important de la degradació en el setè i últim batch, on s'obté un percentatge de degradació del 19,6%. En aquest experiment s'ha observat un augment progressiu de la velocitat de consum de 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ), substrat consumit pel fong que possibilita la formació final del radicals hidroxils, a partir del quart tractament en discontinu i aquest fet coincideix amb una progressiva disminució del percentatge de degradació de carbamazepina. Respecte al tractament en continu, s'ha comprovat que es possible degradar la carbamazepina en aquesta forma d'operació, però els percentatges de degradació obtinguts per als diferents períodes són clarament inferiors als obtinguts en el reactor discontinu seqüencial, a l'obtenir valors inferiors al 30% en tots els casos.

## 6.1 Introducció

Els processos d'oxidació avançada (AOP de l'anglès *Advanced oxidation processes*) es troben englobats dins dels tractaments fisicoquímics i es presenten com una alternativa als processos de tractament biològic per a compostos recalcitrants. Els AOP consisteixen en processos fisicoquímics de producció de radicals hidroxils ( $\cdot\text{OH}$ ), els quals són capaços d'oxidar els compostos recalcitrants presents en fase aquosa. Els radicals hidroxils tenen un gran poder d'oxidació, amb un potencial redox estimat de 2,8 V respecte l'elèctrode estàndard d'hidrogen (Lawton i Robertson, 1999), i

actuen com a oxidants no-selectius dels agents químics presents en solució aquosa, donant productes deshidrogenats o hidroxilats com a derivats, i en certs casos, assolint la mineralització total del compost químic.

Hi ha una gran varietat de processos d'oxidació avançada per tractar compostos xenobiòtics, entre els quals es troben els processos de radiació ultraviolada combinat amb peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o ozó ( $\text{O}_3$ ), el sistema Fenton químic ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ ), la combinació d'ozó amb peròxid d'hidrogen i la fotocatàlisi. Tots aquests tractaments s'han estudiat àmpliament i s'han aplicat amb èxit en nombroses ocasions per a la remeiació de contaminants, com en el cas dels hidrocarburs alifàtics clorats (Hirvonen et al., 1996; Weeks et al., 2000; Kan et al., 2007; Young et al., 2008) o contaminants emergents (Klavarioti et al., 2009). D'altra banda, una possibilitat viable per a la degradació de compostos recalcitrants i que ha estat poc estudiada és la producció de radicals hidroxils mitjançant l'acció d'un microorganisme sota condicions de cicle redox, el qual es coneix com sistema biològic tipus Fenton o procés de biooxidació avançada. Aquest procés es basa en la inducció de radicals  $\cdot\text{OH}$  en microorganismes ligninolítics, com són els fongs de podridura blanca, basant-se en un procés cíclic redox utilitzant quinona com a substrat. Va ser descrit per primer cop pel fong *Pleurotus Eryngii* (Gomez-Toribio et al., 2009a) i també s'ha demostrat que es pot produir en presència de *Trametes versicolor*. A la figura 6.1 es mostra l'esquema de les reaccions que tenen lloc durant el procés de producció d'hidroxils pel procés de biooxidació avançada en presència d'un fong ligninolític.



**Figura 6.1.** Esquema de les principals reaccions en la producció de radicals hidroxils mitjançant un fong ligninolític en condicions de cicle redox (Gomez-Toribio et al., 2009b).

El procés consisteix en la incubació del fong de podridura blanca amb una quinona derivada de la lignina (2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona, DBQ), ions ferro quelats ( $\text{Fe}^{3+}$ -oxalat) i ions manganès ( $\text{Mn}^{2+}$ ). Sota aquestes condicions el fong redueix la quinona a hidroquinona ( $\text{DBQH}_2$ ) a través de l'enzim intracel·lular quinona reductasa (QR) i llavors, la hidroquinona s'oxida a semiquinona ( $\text{DBQ}^{\cdot-}$ ) per l'acció dels enzims ligninolítics extracel·lulars del fong (lacassa (Lac) i peroxidases (Per)), amb  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalat i  $\text{Mn}^{3+}$  com a catalitzadors, els quals es redueixen. A continuació, el reactiu de Fenton es forma per l'autooxidació de la semiquinona catalitzada pel  $\text{Fe}^{3+}$  present en el medi, generant com a productes  $\text{Fe}^{2+}$  i el radical superòxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ( $\text{DBQ}^{\cdot-} + \text{Fe}^{3+}\text{-oxalat} \rightarrow \text{DBQ} + \text{Fe}^{2+}\text{-oxalat}$ ; i  $\text{Fe}^{2+}\text{-oxalat} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-oxalat} + \text{O}_2^{\cdot-}$ ), seguida per la dismutació del radical superòxid ( $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{HO}_2^{\cdot} + \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ), la qual es veu potenciada en presència de  $\text{Mn}^{2+}$ , el qual s'oxida, i finalment, la reacció de Fenton amb la formació de radicals hidroxil ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}\text{-oxalat} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}\text{-oxalat}$ ). Com que el radical hidroxil és l'oxidant més potent produït per cultius de fong de podridura blanca (Backa et al., 1993) i és un oxidant no selectiu, aquest procés permet degradar contaminants que siguin molt difícils de degradar a través d'un tractament biològic. A més a més, aquestes espècies oxidants es produeixen ràpidament en el medi extracel·lular i es pot assolir una elevada eliminació dels contaminants durant les primeres hores de tractament sense la necessitat d'una adaptació del fong al contaminant (Gomez-Toribio et al., 2009a, , 2009b).

La producció biològica de radicals hidroxils es pot mesurar indirectament mitjançant l'estimació de la producció de les substàncies reactives de l'àcid 2-tiobarbitúric, conegudes com a TBARS, a partir de 2-desoxiribosa i la hidroxilació de l'àcid 4-hidroxibenzoic produint àcid 3,4-dimetoxibenzoic, perquè s'ha comprovat que existeix una elevada correlació entre la formació de TBARS i la formació d'hidroxils (Gomez-Toribio et al., 2009a). Altres substàncies reactives als radicals hidroxils i que permeten mesurar la seva producció de forma indirecta són el colorant 2',7'-diclorhidrat fluoresceïna (DCHF) i la sal de diamoni d'àcid 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfònic (ABTS). En el cas del DCHF, aquest es transforma, al ser oxidat pels radicals hidroxils, en un producte altament fluorescent, 2',7'-diclorofluoresceïna, el qual és detectat mitjançant tècniques fluorimètriques (Chen et al., 2010). En el cas de l'ABTS, la seva oxidació per radicals provoca la formació del corresponent radical catió ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ) i permet seguir les cinètiques de producció de radicals mitjançant la tècnica d'espectroscòpia de UV-visible (Heckert et al., 2008). A banda de les tècniques indirectes de mesura de la producció de radicals hidroxils, existeixen les tècniques de mesura directa, les quals són més precises però requereix

un equipament específic. Aquest és el cas de l'espectroscòpia per ressonància paramagnètica d'electrons (RPE), on un agent captador de spin, com pot ser el N-òxid de 5,5-dimetil-1-pirrolina, s'utilitza com a sonda per detectar la formació de  $\cdot\text{OH}$  (Lipovsky et al., 2009).

A partir d'estudis previs, s'ha demostrat que *T. versicolor* és capaç de degradar una gran varietat de contaminants mitjançant la producció extracel·lular de radicals hidroxils, com és el cas de diferents hidrocarburs clorats (Marco-Urrea et al., 2009a), els isòmers benzè, toluè, etilbenzè i xilè (BTEX) (Aranda et al., 2010) i productes farmacèutics i de cura personal (PCPPs de l'anglès *Personal care products and pharmaceuticals*) (Marco-Urrea et al., 2009c). Aquests compostos, en la majoria de casos, també poden ser degradats pel sistema enzimàtic del fong (Marco-Urrea et al., 2006; Marco-Urrea et al., 2008a; Marco-Urrea et al., 2009b). Per tant, aquest procés de remeiació és indicat per augmentar la velocitat i en alguns casos l'eficiència de degradació de compostos recalcitrants en comparació a la seva eliminació per enzims produïts pels fongs de podridura blanca, on normalment és necessari un temps de degradació de varis dies per obtenir un percentatge de degradació elevat. Per exemple, en el cas dels compostos pertanyents al grup dels PCPPs, com la carbamazepina, l'àcid clofíbric, l'atenolol o el propranolol, s'obtenen percentatges de degradació del 80% o superiors al cap de 6 hores (Marco-Urrea et al., 2009c).

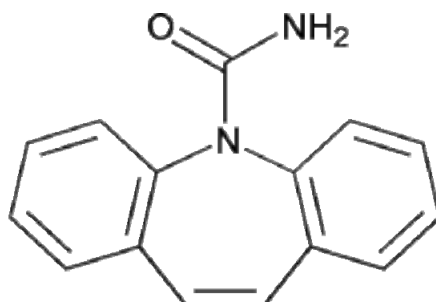
El procés de biooxidació avançada, a banda d'accelerar el procés de degradació de contaminants respecte la degradació mitjançant enzims ligninolítics, pot esdevenir, tal com s'ha comentat anteriorment, una alternativa de gran utilitat en el cas de contaminants que no puguin ser degradats mitjançant tractaments biològics. Com a exemples, els casos del fenol i del 1,3,5-triclorbenzè, els quals no poden ser degradats mitjançant l'enzim lacassa produït per *P. eryngii* (Munoz et al., 1997) i mitjançant el fong *T. versicolor* (Marco-Urrea et al., 2009d), respectivament, però en canvi sí poden ser degradats mitjançant els radicals hidroxils produïts pel sistema Fenton biològic (Marco-Urrea et al., 2009a; Gomez-Toribio et al., 2009b).

L'objectiu principal d'aquest estudi és demostrar si és possible desenvolupar aquest procés i realitzar una optimització del mateix perquè en un futur sigui factible la seva aplicació en condicions reals, tenint en compte que els estudis sobre la producció extracel·lular de radicals hidroxils mitjançant fongs ligninolítics publicats fins a l'actualitat es poden considerar com "Proves de concepte" (PoC de l'anglès *Proof of*

concept), al haver treballat, en tots els casos, amb volums a nivell d'uns pocs mil·lilitres.

A l'hora de realitzar el canvi d'escala del procés de biooxidació avançada a reactor, el contaminant finalment escollit per treballar amb diferents sistemes experimentals i amb diferents formes d'operació ha estat la carbamazepina, el qual s'ha considerat com un model de contaminant no volàtil i soluble.

La carbamazepina, l'estructura molecular de la qual es mostra a la figura 6.2, és un fàrmac antiepilèptic, que s'ha usat de forma extensa tant a Europa com a Nord-Amèrica durant les últimes dècades i per tant, és un compost que s'ha detectat en freqüència en el medi aquàtic (Sacher et al., 2008; Mompelat et al., 2009; Sim et al., 2011). A més a més, s'ha observat que les plantes de depuració d'aigües urbanes no són capaces de degradar aquest compost quan es troba present en afluents líquids i per tant, la carbamazepina, juntament amb altres PCPPs, mereix una atenció especial pel seu potencial d'acumulació en el cicle de l'aigua, el qual finalitza en el consum d'aigua potable pels humans. Aquest compost no es troba considerat com a tòxic per la fauna aquàtica (Andreozzi et al., 2002), però no es poden descartar els seus possibles efectes crònics i sinèrgics en presència d'altres contaminants (Jos et al., 2003). Segons la legislació europea vigent en classificació i etiquetatge de productes químics (92/32/EEC), la carbamazepina es troba classificada com a "R52/53 Perillós pels organismes aquàtics i pot causar efectes adversos a llarg termini en el medi aquàtic".



**Figura 6.2.** Estructura molecular de la carbamazepina.

## 6.2 Resultats i discussió

### 6.2.1 Degradació de decabromodifenil éter

En el cas del decabromodifenil éter (decaBDE), mitjançant el sistema enzimàtic de *T. versicolor* es poden obtenir percentatges de degradació d'aquest contaminant propers al 80% per un temps de 7 dies (capítol 5). Tot i els resultats de degradació elevats que s'han obtingut, el procés de biooxidació avançada permet obtenir en molts casos percentatges de degradació iguals o superiors que el procés de degradació mitjançant el sistema enzimàtic del fong en un temps significativament més curt, com s'ha demostrat amb compostos PCPPs (Marco-Urrea et al., 2009c) o BTEX (Aranda et al., 2010), entre d'altres. Per tant, en el cas del decaBDE, és interessant estudiar la seva degradació mitjançant aquest procés de cara a comparar els resultats obtinguts mitjançant els dos tipus de procés.

En aquest apartat es presenta l'estudi de la degradació de decaBDE mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox. En l'experiment 1, es va treballar amb una concentració inicial de decaBDE de 2 mg/L, la qual és una concentració provada anteriorment en la degradació mitjançant el fong amb resultats satisfactoris, i una concentració inicial de DBQ i de Tween 80 de 0,5 mM i 500 mg/L, respectivament. En aquest cas, l'experiment es va allargar fins a un temps de 24h, perquè per a un temps de 6h, no s'havia esgotat la quinona al medi i per tant, la producció de radical hidroxils no estava exhaurida. A la taula 6.1 es mostra el percentatge de degradació de decaBDE obtingut mitjançant el procés de biooxidació avançada comparant-lo amb el percentatge de degradació que s'obté en el control amb fong i medi de cicle redox (MCR) però sense  $\text{Fe}^{3+}$ -oxalat ni  $\text{Mn}^{2+}$ , el qual s'utilitza per quantificar la degradació associada al sistema enzimàtic del fong i poder corregir la degradació obtinguda en les ampolles experimentals. Es pot comprovar que el valor de degradació obtingut és clarament inferior a l'obtingut en el control. Per tant, tenint en compte que la quinona addicionada inicialment va ser consumida pràcticament en la seva totalitat al finalitzar l'experiment (taula 6.1), es dedueix que, en principi, els radicals hidroxils produïts mitjançant el procés Fenton biològic no són capaços de degradar el decaBDE de forma apreciable i que la degradació obtinguda en les ampolles experimentals es deu a la via enzimàtica.

**Taula 6.1.** Resultats de degradació i concentració final de DBQ obtinguts en els diferents experiments de degradació de decaBDE en fase aquosa mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox.

	% Degradació	C <sub>DBQ</sub> (mM)
Ampolla experimental (Exp. 1 – 24h)	15 ± 3	0,0
Ampolla control (Exp. 1 – 24h)	36 ± 7	-
Ampolla experimental amb Tween 80 500 mg/L (Exp. 2 – 6h)	5 ± 24	0,36 ± 0,07
Ampolla experimental amb Tween 20 500 mg/L (Exp. 2 – 6h)	15 ± 3	0,3 ± 0,1
Ampolla experimental amb Tween 20 1000 mg/L (Exp. 2 – 6h)	6 ± 3	0,3 ± 0,1
Ampolla experimental amb Tween 20 500 mg/L (Exp. 2 – 24h)	10 ± 8	0,56 ± 0,06
Ampolla control (Exp. 2 – 6h)	16 ± 1	-

Els radicals hidroxils tenen un gran poder d'oxidació i en principi, si un contaminant es troba solubilitzat en fase aquosa en una concentració significativa, és factible sigui degradat de forma apreciable. Respecte a l'experiment 1, és possible que la baixa concentració inicial de decaBDE, 2 mg/L, junt amb el fet que, tot i la presència de Tween 80 al medi, el compost no es trobava solubilitzat totalment en condicions inicials, va provocar que els radicals hidroxils reaccionessin majoritàriament amb els altres components presents al medi i no amb el contaminant, i per aquesta raó no s'aprecia degradació de decaBDE associada al procés de biooxidació avançada.

Tenint en compte la suposició anterior, es va decidir realitzar un altre experiment (experiment 2) amb un augment substancial de la quantitat inicial de decaBDE fins a una concentració inicial de 10 mg/L. A banda d'augmentar la quantitat inicial de contaminant, també es va utilitzar MCR amb surfactant Tween 20, amb una concentració de 500 mg/L i 1000 mg/L, per comprovar si s'obtenia un major degradació que amb MCR amb Tween 80. A més a més, per assegurar que a l'inici de l'experiment la fracció de decaBDE corresponent es trobés solubilitzada en la fase aquosa, es va addicionar el contaminant a totes les ampolles 12 hores abans i aquestes es van deixar agitant, fins a l'inici de l'experiment, en un agitador orbital a 150 rpm sense fong ni DBQ, però amb aigua milliQ en la fracció de medi que li corresponia. A la taula 6.1 es pot observar que, en aquest cas, tampoc s'obté un percentatge de degradació superior en les ampolles experimentals respecte a l'ampolla control. En quant a l'evolució de la concentració de DBQ, es pot observar que per a un temps de 6 hores, i també per a la mostra a les 24 hores, després d'haver



realitzat una addició de DBQ a les 6h, la concentració de DBQ residual és significativament més elevada del valor que es podia esperar.

Una possible explicació al fet de no obtenir una degradació apreciable de decaBDE mitjançant el procés de cicle redox amb quinona és que la presència del contaminant al medi afecti negativament a la producció de radicals hidroxils. Per tal de comprovar aquesta suposició, es va realitzar una prova de producció de TBARS en medi MCR, amb surfactant Tween 80 a una concentració de 500 mg/L, en presència de decaBDE, amb una concentració inicial de 2 i 10 mg/L, i en absència de contaminant. Per tal d'assegurar que la part corresponent de decaBDE es trobava solubilitzada a l'iniciar l'experiment, es van deixar agitant les ampolles amb el contaminant i la part proporcional d'aigua milliQ sense reactius durant les 12 hores prèvies a l'inici de l'experiment. Al cap de 4 hores d'iniciar la prova, es va obtenir un valor de TBARS de  $3,4 \pm 0,3$  mU<sub>532</sub>/min a les ampolles en absència de decaBDE i uns valors de  $3,26 \pm 0,06$  i  $4,8 \pm 0,8$  mU<sub>532</sub>/min a les ampolles amb decaBDE a una concentració de 2 i 10 mg/L, respectivament. A partir dels resultats obtinguts es pot observar que en tots els casos s'obté una producció de TBARS similar i per tant, aquest fet indica que la presència de decaBDE en el medi per a les dues concentracions provades no afecta negativament a la producció de radicals hidroxils mitjançant el fong sota condicions de cicle redox.

Un cop es va comprovar que la producció de TBARS no disminueix per a la presència de decaBDE en el medi i que, tot i això, no és possible degradar aquest compost mitjançant el procés de biooxidació avançada a una concentració inicial de contaminant elevada, 10 ppm, es va realitzar la prova definitiva per determinar si els radicals hidroxils són capaços de degradar el decaBDE en fase aquosa. Aquesta prova consisteix en produir els radicals hidroxils a través del procés Fenton químic, utilitzant peròxid d'hidrogen com a reactiu. Aquest procés produeix, per a les mateixes condicions estequiomètriques, un nombre de mols de radicals hidroxils significativament més elevat i a una major velocitat que el procés Fenton biològic. Per realitzar aquesta prova, es va treballar amb concentracions inicials de decaBDE de 2 i 10 mg/L, i amb els surfactants Tween 20 i Tween 80, amb concentracions de 500 mg/L i 1000 mg/L en els dos casos. En aquest cas, també es va realitzar una agitació prèvia durant 12 hores de les ampolles amb contaminant i fase aquosa però sense els reactius. Al cap de 4 hores de l'inici de l'experiment, que correspon a un temps en que ja s'hauria d'haver produït una eliminació de decaBDE significativa si la reacció mitjançant radicals hidroxils fos eficient, es va analitzar la concentració de contaminant a cadascuna de les ampolles experimentals. En tots els casos es va obtenir un

percentatge de degradació inferior al 5%, sent els valors corresponents a la desviació estàndard superiors als de degradació obtinguts.

Per tant, un cop s'ha comprovat que no es possible degradar de forma apreciable el decaBDE mitjançant cap dels processos Fenton, es conclou que aquest contaminant no és indicat per a ser degradat mitjançant el procés de biooxidació avançada, perquè al tenir una solubilitat en fase aquosa tan baixa, tot i la presència de surfactant en el medi, els radicals hidroxils que es formen no són capaços d'oxidar la fracció de contaminant solubilitzada sinó que reaccionen amb els altres productes presents al medi. L'estudi de la degradació de decaBDE mitjançant el cicle redox han mostrat que una de les limitacions d'aquest procés d'oxidació és la impossibilitat de degradar compostos amb una solubilitat en aigua molt baixa. Per tant, a l'hora d'aplicar el procés de biooxidació avançada per a degradar un contaminant concret, és bàsic tenir en compte si la seva solubilitat en aigua és prou elevada per poder obtenir un rendiment de degradació elevat.

### **6.2.2 Degradació de tricloroetilè**

La degradació de tricloroetilè mitjançant la inducció en *T. versicolor* de la producció de radicals hidroxils via cicle redox ha estat portada a terme prèviament en tubs tancats de 8 mL amb l'obtenció d'una degradació màxima de TCE de  $10,0 \pm 0,3$  mg/g pes sec, que va equivaldre, en aquest cas, a un percentatge de degradació del 30% (Marco-Urrea et al., 2009a). A més a més, el balanç d'ions clorur alliberats i l'augment de  $\delta^{13}$  en els anàlisis de relació isotòpica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  produït a partir del procés de degradació evidencien que una part del TCE degradat es mineralitza. Tot i això, al cap de cert temps, tant el cicle redox amb quinona com la degradació de TCE s'aturen.

Per tal de millorar la degradació de TCE i allargar la reacció al llarg del temps, en aquest apartat es mostra la degradació de TCE mitjançant el fong sota condicions de cicle redox en ampolles de sèrum de major volum (161 mL). Aquest canvi de volum permet l'augment de la relació entre la fase gas i la fase líquida respecte l'existent en els tubs tancats utilitzats prèviament i conseqüentment, es disposa d'una major quantitat d'oxigen per a la degradació de TCE. A més a més, al realitzar els experiments en ampolles de sèrum, és possible realitzar addicions puntuals de solució concentrada de DBQ durant l'experiment mitjançant una xeringa a través del tap de butil, i comprovar, d'aquesta manera, el seu efecte sobre la degradació final de TCE.

En els experiments previs de degradació de TCE mitjançant el procés de cicle redox amb quinona s'havia comprovat que l'exhauriment de l'oxigen i la DBQ eren les principals limitacions del procés (Marco-Urrea et al., 2009a). El TCE és altament volàtil i consegüentment, per tal d'evitar pèrdues de contaminant es requereix un sistema experimental hermèticament tancat, el qual limita la possible addició de reactius, com per exemple oxigen, durant el procés. A més a més, DBQ té una baixa solubilitat i per tant no és possible utilitzar una alta concentració d'aquest substrat, tenint en compte que també podria ser tòxica en aquest cas.

En els experiments de degradació de TCE mitjançant el procés tipus Fenton biològic en ampolles de sèrum, la relació de volums entre la fase gas i la fase líquida va augmentar en 1,7 cops respecte als experiments previs en tubs tancats i es va obtenir un notable augment de la degradació de contaminant per a un temps de 6h. Es va assolir una degradació de TCE de  $14 \pm 1$  mg/g pes sec en comparació amb una degradació de  $10,0 \pm 0,3$  mg/g pes sec en experiments en tubs. Aquest resultat suggereix que l'oxigen podria ser un factor limitant en aquest procés, perquè es va aconseguir millorar el rendiment de degradació de TCE gràcies a l'augment del volum de fase gas.

En experiments anteriors de degradació de compostos BTEX (benzè, toluè, etilbenzè and xilè) mitjançant el procés de cicle redox amb quinona, es va comprovar que la degradació dels contaminants s'atura per a un cert temps, que correspon a un temps de 6 hores, a causa de l'esgotament de la DBQ i l'oxigen (Aranda et al., 2010). Durant l'experiment en ampolles de sèrum, es va realitzar una addició ocasional de DBQ per a un temps de 6 hores, quan aquesta s'havia esgotat, per tal de comprovar quin compost s'esgota primer i provoca l'aturada del procés de degradació. Al cap de 6h d'addicionar la DBQ, la degradació de TCE havia augmentat des de  $14 \pm 1$  mg/g pes sec fins a  $23 \pm 4$  mg/g pes sec. Aquest fet implica que l'oxigen encara no s'havia exhaurit perquè la degradació va continuar a l'addicionar la solució de DBQ.

Com a conseqüència, aquest resultat indica que el primer factor limitant és la DBQ, provocant l'aturada del procés de cicle redox. L'addició de DBQ va implicar un augment important del volum de fase líquida a causa de la seva baixa solubilitat. A causa d'aquest augment de volum, la concentració de TCE a la fase líquida va disminuir provocant una reducció del rendiment de degradació en comparació amb l'obtingut en el període previ a l'addició de DBQ. Aquest fet es deu a que la degradació de TCE mitjançant radicals hidroxils, la qual es podria ajustar a una cinètica de

degradació de pseudo-primer ordre, depèn directament de la concentració de TCE a la fase líquida (Weeks et al., 2000; Chen et al., 2001). Futures investigacions s'haurien de centrar en buscar una quinona tant eficient com la DBQ en quant a la producció de  $\cdot\text{OH}$  i més soluble que aquesta.

En referència a l'oxigen, tot i que és el segon factor limitant del procés, la seva addició durant l'experiment no és viable perquè les ampolles sèrum han d'estar hermèticament tancades per evitar pèrdues de TCE.

Tot i que s'ha demostrat que el TCE pot ser degradat mitjançant el procés de biooxidació avançada en ampolles de sèrum, és important estudiar els diferents paràmetres que influeixen la degradació de TCE per tal d'optimitzar el procés i obtenir el màxim rendiment de degradació de contaminant possible en aquest sistema experimental.

#### **6.2.2.1 Optimització de les condicions d'operació**

En aquest apartat es mostra l'aplicació de la metodologia de disseny de composició central (DCC) per estudiar l'efecte de les variables velocitat d'agitació i relació de volums entre la fase gas i la fase líquida ( $V_G/V_L$ ) en la degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox.

Per tal d'aplicar aquesta metodologia, es van realitzar nou combinacions de les dues variables independents, implicant l'execució d'un total de 27 experiments al realitzar totes les combinacions per triplicat. El rang de velocitats es va escollir tenint en compte que el tipus d'equip utilitzat era un agitador orbital, i es va treballar entre 90 i 200 rpm, al observar que per a velocitats inferiors a 90 rpm no s'obtenia suficient moviment de líquid a les ampolles i velocitats superiors a 200 rpm generaven problemes operacionals amb les ampolles de sèrum. Respecte al rang de volums de líquid es va tenir en compte que es tractés un volum significatiu de líquid en tots els casos sense limitar la degradació a causa de la falta d'oxigen.

Un cop es va estudiar l'efecte d'aquestes dues variables, es va utilitzar la seva combinació òptima respecte a la degradació de TCE per estudiar l'efecte de la concentració de biomassa en la degradació de contaminant i d'aquesta manera obtenir la combinació òptima dels tres factors experimentals estudiats que permetés obtenir la màxima degradació de contaminant mitjançant el procés de biooxidació avançada.

### Superfície de resposta i anàlisi estadístic de la degradació de tricloroetilè

El rendiment de degradació de TCE obtingut per a un temps de 6 hores (taula 6.2) es va usar per ajustar el model polinòmic de segon ordre com a funció de la velocitat d'agitació i la relació de volum fase gas-fase líquida.

**Taula 6.2.** Matriu de disseny i valors de resposta de la degradació de TCE.

Experiments	Valors reals		Valors codificats		Resposta
	Velocitat d'agitació (rpm)	$V_G/V_L$	Velocitat d'agitació	$V_G/V_L$	Degradació de TCE (mg/g pes sec)
1	90	2,4	-1,414	0	9,32
2	90	2,4	-1,414	0	8,68
3	90	2,4	-1,414	0	8,09
4	106	1,0	-1	-1	20,73
5	106	1,0	-1	-1	19,62
6	106	3,8	-1	1	11,15
7	106	3,8	-1	1	14,56
8	145	4,4	0	1,414	12,92
9	145	4,4	0	1,414	7,75
10	145	4,4	0	1,414	10,49
11	145	2,4	0	0	10,59
12	145	2,4	0	0	9,40
13	145	0,5	0	-1,414	14,72
14	145	0,5	0	-1,414	16,03
15	145	0,5	0	-1,414	17,75
16	184	1,0	1	-1	21,32
17	184	1,0	1	-1	23,58
18	184	1,0	1	-1	23,39
19	184	3,8	1	1	25,14
20	184	3,8	1	1	24,77
21	184	3,8	1	1	25,76
22	200	2,4	1,414	0	23,39
23	200	2,4	1,414	0	18,90
24	200	2,4	1,414	0	17,82

Dels 27 experiments realitzats, 3 d'ells es van descartar a causa d'incidències experimentals. La taula 6.2 mostra diferències apreciables en la degradació de

contaminant entre els diferents experiments, amb un rang de valors des de 7,7 fins a 25,8 mg TCE/g pes sec.

La taula 6.3 mostra els valors dels coeficients  $b_i$  pertanyents al model ajustat. Els resultats evidencien que el model de segon ordre és adequat per representar els valors experimentals i a més a més, tots els paràmetres són significatius. Però el valor del coeficient de correlació ( $R^2$ ) és 0,705, el qual indica que és possible que altres factors a banda dels que s'han estudiat poden afectar al procés de degradació. No obstant, per a un sistema complex com l'estudiat, aquest nivell de correlació és molt comú i els resultats es poden usar per predir bastant satisfactòriament els nivells de degradació dins el rang estudiat.

**Taula 6.3.** Valors dels coeficients  $b_i$  i anàlisi estadístic del model ajustat.

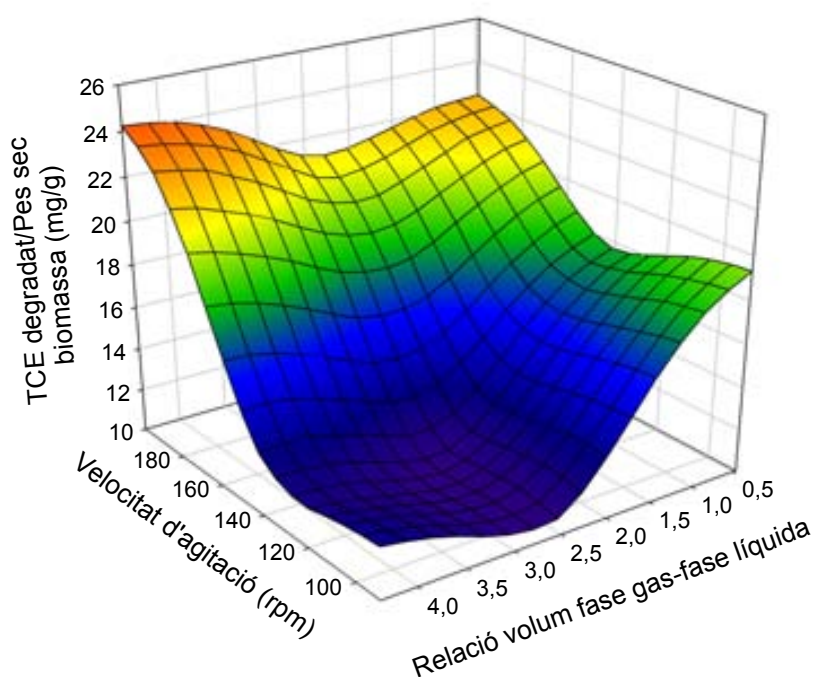
Coeficient	Valor del coeficient	Error estàndard	t-ratio	Valor P
$b_0$	9,964	2,750	3,624	0,002
$b_1$	4,209	0,832	5,056	<0,0001
$b_2$	-1,677	0,837	-2,004	0,060
$b_{11}$	3,643	1,542	2,362	0,030
$b_{22}$	3,098	1,542	2,009	0,059
$b_{12}$	2,536	1,241	2,044	0,055

### **Efecte de la velocitat d'agitació i de la relació de volum entre la fase gas i la fase líquida en la degradació de tricloroetilè**

Els valors dels coeficients que es mostren a la taula 6.3 indiquen que la velocitat d'agitació té un efecte positiu i major en la degradació de TCE que la relació de volums entre la fase gas i la fase líquida. El fet que l'augment de la velocitat d'agitació impliqui un efecte positiu en la degradació de contaminant no és sorprenent pel fet que millora la transferència de contaminant i d'oxigen entre les dues fases. És important operar a la màxima velocitat de transferència de matèria per tal d'evitar les possibles limitacions de transferència de matèria entre fases i obtenir la màxima degradació de contaminant.

D'una banda, el valor del coeficient  $b_2$  mostra que la relació de volum entre la fase gas i la fase líquida té un efecte negatiu en la degradació de TCE, però el seu efecte quadràtic és positiu i significatiu. D'altra banda, l'anàlisi estadístic mostra que la

interacció entre els dos factors té un efecte positiu i significatiu en la degradació de contaminant. L'efecte d'ambdós factors pot ser analitzat de forma més acurada si es representa la superfície de resposta com es mostra a la figura 6.3. A partir d'aquesta representació, es pot obtenir la combinació òptima de factors per tal de maximitzar la degradació de TCE. En aquest cas, aquesta combinació correspon a la màxima velocitat d'agitació (200 rpm) i relació de volums (4,4) dins el rang estudiat. La figura 6.3 mostra que la degradació de contaminant és molt semblant per qualsevol dels valors de relació de volums dins el rang de major velocitat d'agitació, entre 180 i 200 rpm, perquè la màxima diferència de degradació de TCE entre les diferents combinacions en aquest rang és aproximadament del 13%.



**Figura 6.3.** Superfície de resposta de la degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox per a diferents velocitats d'agitació i relacions de volum fase gas-fase líquida.

La relació de volums entre la fase gas i la fase líquida a una velocitat d'agitació entre 160 i 180 rpm tampoc té un efecte significatiu en la degradació de TCE, perquè en aquest rang de velocitats tots els valors de degradació són molt similars per qualsevol relació de volums. Per tant, la relació de volums no té un efecte important en la degradació de contaminant si la velocitat d'agitació es troba entre 160 i 200 rpm perquè aquest factor sembla ser suficientment elevat per evitar limitacions en la transferència de matèria per qualsevol de les relacions de volums provada. En canvi, per a una velocitat d'agitació inferior a 160 rpm, la relació de volums té un efecte important en la degradació de contaminant, la qual augmenta considerablement si el

procés de degradació té lloc a una relació baixa de volum entre la fase gas i la fase líquida, i té el seu efecte màxim per a una velocitat d'agitació de 90 rpm. El fet que la diferència màxima de degradació entre les diferents relacions de volums s'obtingui al operar a la mínima velocitat d'agitació no és sorprenent perquè la transferència de matèria de TCE depèn de la velocitat d'agitació.

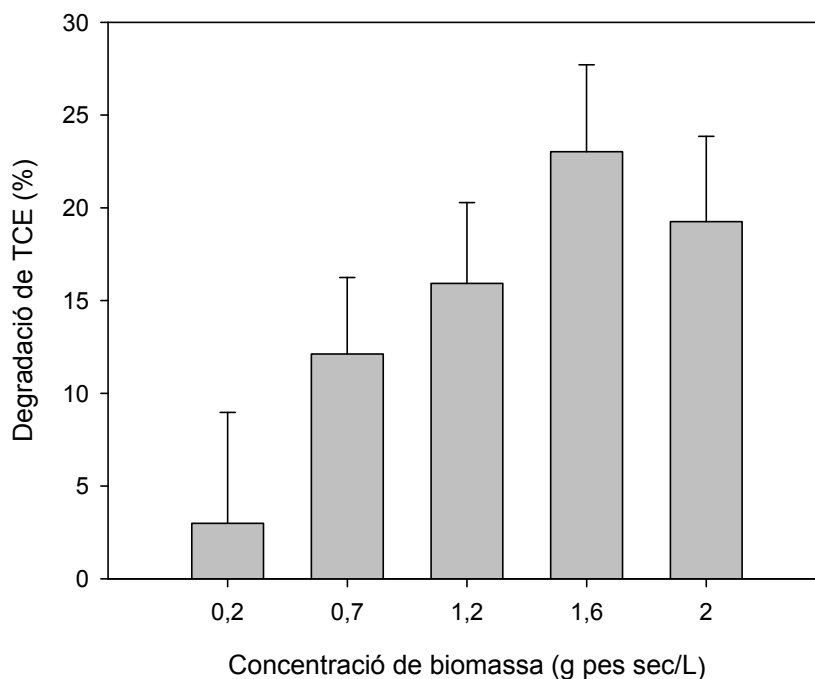
Un cop realitzada l'optimització del procés en relació a la velocitat d'agitació i la relació entre el volum de fase gas i fase líquida, es va concloure que els valors màxims de degradació de TCE s'obtenen per a una velocitat d'agitació entre 180 i 200 rpm i qualsevol relació de volums entre 0,5 i 4,4. Al comprovar que la relació de volums no és un paràmetre important si la velocitat d'agitació és superior a 180 rpm, es va escollir la màxima velocitat d'agitació (200 rpm) i la mínima relació de volums (0,5) per comprovar l'efecte de la concentració de biomassa en la degradació de TCE.

#### **Efecte de la concentració de *T. versicolor* en la degradació de tricloroetilè**

Per tal d'estudiar l'efecte de la concentració de fong en la degradació de contaminant, es va escollir un rang ampli de valors de biomassa, treballant des de una concentració de fong de 0,2 g pes sec/L fins a un valor de 2 g pes sec/L, per tal de disposar d'una elevada probabilitat d'obtenir el màxim de degradació de contaminant dins el rang de treball escollit. Teòricament, nivells elevats de biomassa haurien de significar un elevat rendiment de degradació però alhora un elevat consum d'oxigen per part del fong. Com a conseqüència, la transferència de massa d'oxigen de la fase gas a la fase líquida pot ser encara més crítica i per tant, tenir un efecte important en el rendiment de degradació de contaminant.

Els percentatges de degradació de TCE obtinguts per als diferents nivells de biomassa es mostren a la figura 6.4. Aquest paràmetre té un efecte positiu en la degradació de TCE si els seu valor és inferior a 1,6 g pes sec/L i el màxim percentatge de degradació (23%) es va obtenir per aquesta concentració de biomassa.





**Figura 6.4.** Efecte de la concentració de biomassa en la degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox (Velocitat d'agitació de 200 rpm i relació de volum entre la fase gas i la fase líquida de 0,5).

### Degradació de tricloroetilè en reactor

A partir dels resultats de degradació de TCE mitjançant el procés de biooxidació avançada en ampelles de sèrum, es va comprovar que la disponibilitat d'oxigen i la baixa concentració de DBQ són les principals limitacions a l'hora de tractar un contaminant volàtil mitjançant el procés de cicle redox amb quinona. Una possible solució per evitar la limitació per aquests dos factors és disposar d'un sistema experimental hermètic on sigui possible addicionar oxigen i DBQ durant l'experiment. Per aquesta raó, es va portar a terme un canvi d'escala del procés de degradació de TCE mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox i es va realitzar un experiment en un reactor hermètic de tanc agitat d'acer inoxidable de 2 L de volum, el qual disposa d'una vàlvula d'introducció de gas, que permet introduir oxigen al reactor durant el procés de degradació, i d'un accessori d'introducció de líquid per a addicions puntuals de DBQ. Es va treballar amb una concentració inicial de TCE en fase líquida de 75 mg/L i es van realitzar dues addicions puntuals de solució DBQ, a les 6h i a les 13,5h, per tal d'allargar el procés de degradació. A més a més, es van realitzar addicions puntuals d'oxigen durant el procés per evitar el seu exhauriment.

Teòricament, el percentatge de degradació de TCE que s'obtingués en el reactor hermètic hauria de ser, en principi, superior als obtinguts en els experiments previs

realitzats en ampolles de sèrum (Apartat 6.2.2) i tubs tancats (Marco-Urrea et al., 2009a), al no existir limitacions per falta d'oxigen o DBQ durant el procés de degradació. En canvi, al finalitzar l'experiment es va comprovar que per a un temps de 24h, la degradació de TCE obtinguda era menyspreable, tot i que s'havia produït un apreciable consum de DBQ durant tot l'experiment i que en principi, l'oxigen no s'havia exhaurit en cap moment.

A partir del resultat obtingut en aquest experiment, es va concloure que hi havia dues possibles explicacions que podrien justificar el fet de no haver obtingut un percentatge de degradació apreciable de TCE en reactor. La primera era que, tot i produir-se un consum important de DBQ, no es produïa la formació de radicals hidroxils durant el procés de degradació en el reactor i la segona era que, globalment, el sistema experimental utilitzat no és adequat per degradar TCE mitjançant el procés de biooxidació avançada. Per tal de comprovar si es produïa la formació de radicals hidroxils durant el procés de degradació en reactor, es va realitzar una prova de producció de substàncies TBARS sense la presència de TCE. Es va obtenir un valor de TBARS de 2,71 mU<sub>532</sub>/min per a un temps de 3 hores. Per tant, aquest resultat confirma que es produeix la formació de radicals hidroxils durant el procés de biooxidació avançada en el reactor hermètic, però el fet d'obtenir una degradació de TCE menyspreable indica que aquest sistema experimental no és viable per a portar a terme la degradació de compostos volàtils mitjançant el procés de cicle redox amb quinona.

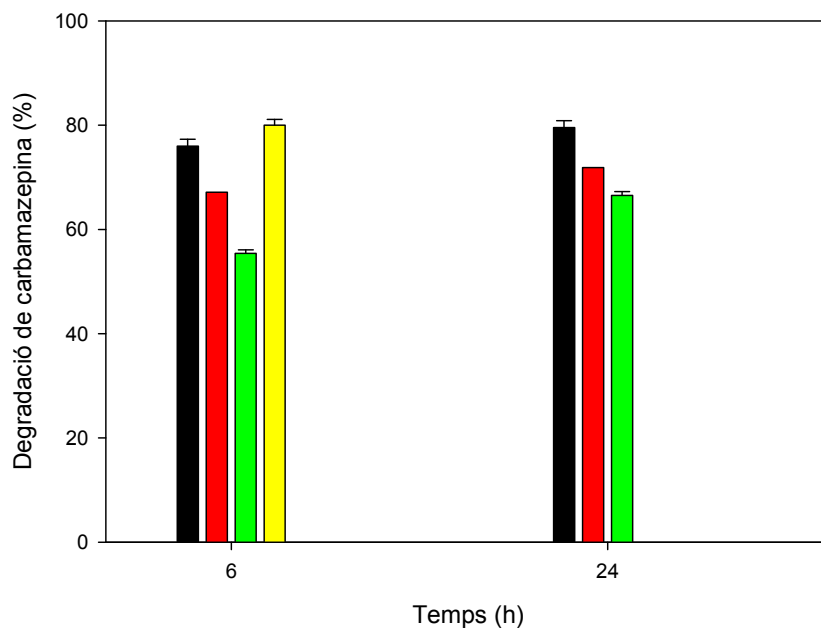
Respecte als tres factors estudiats prèviament per tal d'optimitzar la degradació de TCE en reactor, el tipus d'agitació és el que varia en major grau a l'operar en el reactor respecte a les ampolles de sèrum, al disposar d'un agitador mecànic de pales en el reactor i treballar amb un agitador orbital en el cas de les ampolles de sèrum. Per tant, és possible que, en el cas d'aplicar el procés de degradació en reactor, tant el valor òptim d'agitació obtingut prèviament com, en general, el rang de velocitats estudiat en els experiments amb ampolles sèrum (90-200 rpm) no sigui l'adequat i aquest fet, entre d'altres factors, fos una de les causes de no haver obtingut una degradació significativa de TCE en reactor.

### **6.2.3 Degradació de carbamazepina en reactor mitjançant el procés de biooxidació avançada**

Un cop es va comprovar que no era possible portar a terme la degradació de TCE en reactor mitjançant el fong sota condicions de cicle redox, es va estudiar l'aplicació d'aquest procés en reactor amb un altre contaminant. Es va escollir un contaminant que pogués ser degradat en un elevat percentatge mitjançant aquest procés i que no presentés dificultats operacionals importants, com poden ser una baixa solubilitat en fase aquosa o una elevada volatilitat. El contaminant escollit va ser la carbamazepina, la qual compleix els requeriments anteriorment exposats (Marco-Urrea et al., 2009c). L'aplicació del procés de cicle redox per degradar un compost no volàtil permet treballar sense limitació per falta d'oxigen, a diferència del cas del TCE, i és possible addicionar volums puntuals de DBQ concentrada durant l'experiment, per tal d'allargar el procés de degradació.

#### **6.2.3.1 Comparació de la degradació de carbamazepina en diferents reactors operant en discontinu**

Es van escollir tres models diferents de reactor per portar a terme la degradació de carbamazepina mitjançant el procés de cicle redox amb quinona. Els sistemes experimentals escollits corresponen a un reactor agitat mecànicament de 2 L d'acer inoxidable, un bioreactor de vidre fluiditzat per polsos d'aire de 1,5 L i ampolles de vidre de 1 L amb agitació orbital. La concentració inicial de contaminant va ser de 10 mg/L en tots els casos. Els resultats de degradació de carbamazepina obtinguts per a cadascun dels reactors i per a un temps de 6 i 24 hores, es mostren a la figura 6.5, juntament amb els resultats obtinguts en experiments previs de degradació d'aquest contaminant en ampolles sèrum de 125 mL (Marco-Urrea et al., 2009c). Es pot observar que el reactor amb agitació mecànica és el menys eficient de tots els sistemes experimentals provats i respecte als altres sistemes, els percentatges de degradació són similars entre ells, obtenint un major percentatge de degradació en les ampolles de 125 mL.



**Figura 6.5.** Percentatge de degradació de carbamazepina mitjançant *T. versicolor* sota condicions de cicle redox per a temps de tractament de 6 i 24 hores. Tractaments: ampolles de 1 L (negre); bioreactor de polsos d'aire (vermell); Reactor amb agitació mecànica (verd); ampolles sèrum de 125 mL (groc). Incubacions es van realitzar amb  $3,4 \pm 0,1$ ;  $3,8$ ;  $3,4$  i  $1,5 \pm 0,2$  g pes sec/L, respectivament.

Tot i que es va addicionar un volum determinat de DBQ per a un temps de 6 hores en tots els experiments, excepte en les ampolles de 125 mL, el percentatge de degradació va augmentar menys d'un 12% en tots els casos per a un temps de 24 hores (figura 6.5). És probable que aquesta disminució brusca del rendiment de degradació de contaminant respecte a les 6 primeres hores d'experiment, es trobi relacionada amb el fet que la velocitat de degradació de carbamazepina mitjançant radicals hidroxils és, en principi, directament proporcional a la concentració de contaminant en fase líquida, tal com succeeix en altres processos de degradació de compostos farmacèutics per radicals hidroxils (Razavi et al., 2009). Aquest fet és un inconvenient important pel procés de degradació si es desitja allargar la reacció per a un temps superior a 6 h, perquè la DBQ és poc soluble en fase aquosa i a l'hora de realitzar addicions puntuals d'aquest substrat per evitar que s'exhaureixi, el volum a addicionar ha de ser elevat, provocant una disminució significativa de la concentració de contaminant i en conseqüència, també de la velocitat de degradació del procés.

Tot i que les ampolles de sèrum de 125 mL i les ampolles de vidre de 1 L són els sistemes experimentals amb una major eficiència de degradació de carbamazepina, no són sistemes viables per a realitzar un canvi d'escala del procés, perquè és necessari utilitzar un agitador orbital per agitar les ampolles i si s'ha de tractar un volum elevat,

---

no és viable usar un agitador orbital a nivell industrial. Per tant, el sistema experimental més adequat per realitzar el canvi d'escala és el bioreactor de polsos d'aire.

### 6.2.3.2 Formes d'operació per degradar carbamazepina en reactor

#### Reactor discontinu seqüencial

Un cop es va comprovar que el bioreactor de polsos d'aire és una opció viable pel canvi d'escala del procés de cicle redox, es van realitzar experiments en reactor discontinu seqüencial (SBR de l'anglès *Sequenced batch reactor*) en aquest sistema experimental per tal d'investigar si és possible reutilitzar la biomassa per tractar diferents afluents amb carbamazepina mitjançant el procés de cicle redox amb quinona.

La taula 6.4 mostra que els percentatges de degradació de carbamazepina que es van obtenir en l'experiment en SBR són inferiors al valor obtingut en l'experiment previ en batch (figura 6.5), però el percentatge de degradació es va mantenir en valors similars durant sis batchs consecutius fins que es va produir una disminució important de la degradació de contaminant en el setè batch. En relació a l'estructura de la biomassa, aquesta no va semblar afectada d'una forma significativa per la seva reutilització, perquè la morfologia dels pèl·lets no va variar durant l'experiment. A més a més, la velocitat de consum de glucosa, la qual és un indicador de l'activitat metabòlica de la biomassa durant el procés, no va disminuir significativament des del primer fins a l'últim batch. La glucosa addicionada a l'inici de cadascun dels batchs (0,75 g/L) es va exhaurir en tots els casos al finalitzar el batch i aquest fet suggereix que l'activitat metabòlica del fong no es va veure afectada d'una forma significativa per l'alt poder oxidant dels radicals hidroxils produïts durant el cicle redox.

Per tant, la reutilització de biomassa podria ser una estratègia viable per tractar diferents afluents contaminats amb carbamazepina ja que s'ha comprovat que l'activitat enzimàtica es manté activa durant un període llarg i no es produeix una disminució significativa del percentatge de degradació de contaminant durant els successius batchs.

**Taula 6.4.** Percentatge de degradació de carbamazepina i de velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) obtingut en SBR amb reutilització de biomassa sota condicions de cicle redox.

Nombre de batch	Degradació de carbamazepina (%)	Velocitat de consum de DBQ(H <sub>2</sub> ) (mM/(h·g pes sec))
1 <sup>er</sup>	43,1	0,12
2 <sup>on</sup>	41,9	0,11
3 <sup>er</sup>	47,7	0,14
4 <sup>t</sup>	36,3	0,15
5 <sup>è</sup>	34,4	0,18
6 <sup>è</sup>	38,4	0,19
7 <sup>è</sup>	19,6	0,26

La velocitat de consum de DBQ per als diferents batchs també va ser investigada. L'anàlisi d'aquest compost inclou a determinació de la DBQ i de la DBQH<sub>2</sub>, expressat com a DBQ(H<sub>2</sub>), i el valor de concentració obtingut correspon a la suma de les dues concentracions. És important comentar que la quinona es va consumir completament al final de cadascun dels batchs realitzats.

La taula 6.4 mostra que la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) pel fong incrementa al llarg del temps. Si es compara aquesta velocitat amb el percentatge de degradació de carbamazepina per als diferents batchs (taula 6.4), es pot observar que ambdós paràmetres estan correlacionats negativament a partir del quart batch: lleuger augment de la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) fins al sisè batch, que coincideix amb un lleuger descens en el percentatge de degradació de carbamazepina. Aquesta correlació es posa més de manifest en l'últim batch, on s'obté la velocitat més elevada de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) junt amb el major descens de degradació de contaminant. Aquests resultats indiquen que probablement aquest últim es degui a un descens en la producció de radicals hidroxils ocasionat per un consum més elevat de la quinona implicada en la seva inducció.

Davant aquests resultats és necessari qüestionar-se sobre la causa de l'augment de la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>), perquè la resposta podria ajudar a prevenir que succeís i/o atenuar els seus efectes negatius en la degradació de carbamazepina. Gomez Toribio et al. (2009a; 2009b) van demostrar que el consum de DBQ(H<sub>2</sub>) per *P. eryngii*, incubat sota diferents condicions que conduïen a la producció de diferents nivells de radicals <sup>•</sup>OH, es devia a la seva oxidació per aquests últims. Per tant, és probable que l'obtenció de percentatges similars de degradació de carbamazepina i de velocitats similars de consum de quinona durant els tres primers batchs (taula 6.4) es

deuen a l'atac indiscriminat dels radicals  $\cdot\text{OH}$  sobre ambdós compostos. Del quart batch en endavant, l'augment de la velocitat de consum de  $\text{DBQ}(\text{H}_2)$  no es pot atribuir a una major producció de radicals hidroxils al no observar un augment en la degradació de carbamazepina. Aquesta deducció indica que a partir del quart batch actua un mecanisme diferent de degradació de quinona. Pel fet que la DBQ és un producte de despolimerització de la lignina i els fongs de podridura blanca, com *T. versicolor*, són capaços de degradar completament aquests compostos intracel·lularment, és probable que l'augment del consum de  $\text{DBQ}(\text{H}_2)$  a partir del quart batch es degui a l'acció dels enzims intracel·lulars que de manera natural estan implicats en la seva degradació, els quals es poden haver induït després d'un període d'adaptació del fong a aquesta quinona. Desafortunadament, es coneix poc sobre els mecanismes implicats en la degradació dels productes majoritaris que procedeixen de la despolimerització de la lignina, com aldehids, àcids aromàtics i quinones. En general s'assumeix que la degradació d'aquests compostos implica varies reaccions d'hidroxilació de l'anell aromàtic fins a la generació de compostos dihidroxilats de tipus catecòlic que són substrat de dioxigenases de ruptura intracel·lulars. En aquest sentit, s'ha de mencionar l'aïllament i purificació d'una dioxigenasa intracel·lular de *P. chrysosporium* que presenta activitat sobre la 1,2-hidroquinona (catecol) i la 2-hidroxil-1,4-hidroquinona (Rieble et al., 1994).

A banda de la possible oxidació de  $\text{DBQ}(\text{H}_2)$  per part del sistema enzimàtic intracel·lular del fong, és possible que existeixin altres factors que tinguin un efecte desfavorable creixent en l'activitat enzimàtica del fong i en conseqüència, en l'eficiència del procés de cicle redox, a mesura que es repeteix el tractament en discontinu. Aquests factors podrien correspondre a la presència d'una concentració baixa de font de carboni en el MCR o a la falta de font de nitrogen en el medi.

Per tant, es va creure oportú estudiar l'efecte de la concentració de glucosa sobre el procés de degradació de carbamazepina al operar en reactor discontinu seqüencial amb reaprofitament de biomassa. Per aquesta raó, es va portar a terme un experiment en SBR amb MCR en absència de glucosa per tal de comprovar si s'obtenien percentatges de degradació diferents en aquest experiment en comparació als valors obtinguts en l'experiment en SBR amb MCR amb glucosa. La taula 6.5 mostra que el percentatge de degradació de carbamazepina obtingut en el primer batch és similar als valors de degradació que es mostren a la taula 6.4. En canvi, el percentatge de degradació de carbamazepina disminueix significativament fins a valors al voltant el 20% de degradació en el segon i tercer batch, tot i que la quinona

es va exhaurir en ambdós casos. Per tant, aquesta disminució sobtada de la degradació de carbamazepina indica que la presència d'una concentració baixa de glucosa al medi com a font de carboni es necessària per obtenir un percentatge de degradació elevat i mantenir l'eficiència del procés de cicle redox si es realitzen diferents batchs repetits.

**Taula 6.5.** Percentatge de degradació de carbamazepina i de velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) obtinguts en SBR amb reutilització de biomassa sota condicions de cicle redox usant MCR sense glucosa.

Nombre de batch	Degradació de carbamazepina (%)	Velocitat de consum de DBQ(H <sub>2</sub> ) (mM/(h·g pes sec))
1 <sup>er</sup>	47,1	0,06
2 <sup>on</sup>	20,2	0,10
3 <sup>er</sup>	19,3	0,22

### Reactor en continu

A partir de comprovar que *T. versicolor* es pot reutilitzar diferents cops per degradar carbamazepina sota condicions de cicle redox i per tant, que la biomassa és capaç de mantenir-se activa en el procés de degradació per a un període llarg de temps, es va realitzar un experiment en reactor en continu per degradar carbamazepina mitjançant el procés de cicle redox per comprovar si s'obté degradació de contaminant en un tractament en continu i a part d'això, si es pot mantenir l'eficiència de degradació durant un cert període de temps en aquestes condicions.

La taula 6.6 mostra els resultats de degradació i de velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) obtinguts en el tractament en reactor en continu. Hi ha una disminució significativa de degradació de carbamazepina quan té lloc la degradació en continu en comparació amb el reactor en batch realitzat abans de l'inici de l'etapa en continu. En el primer període, el qual comença per a un temps de 2,75 h, quan s'inicia el període en continu, i acaba a les 23 h, les condicions dels cabals d'entrada es fixen de cara a proporcionar les mateixes condicions experimentals que l'experiment en SBR realitzat prèviament. El temps de residència hidràulic (TRH) va ser de 1,92 h i la concentració de carbamazepina a l'afluent es va fixar en un valor de 6,73 mg/L per mantenir una concentració aproximada de contaminant a l'interior del reactor de 4 mg/L, d'acord amb la velocitat de degradació de carbamazepina obtinguda en experiments previs en reactor en batch sota condicions de cicle redox. La concentració de DBQ a l'afluent es va fixar en 0,5 mM per mantenir una concentració aproximada de substrat en el reactor



de 0,2 mM, assumint que la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) seria igual a l'obtinguda en els experiments previs en reactor en batch. Per tant, era d'esperar que s'obtingués percentatges de degradació similars en el procés en continu que en els experiments de reactor en batch, però es va obtenir una degradació significativament més baixa. En relació al consum de DBQ(H<sub>2</sub>), es pot observar que es produeix un augment important en l'etapa en continu respecte al batch previ. Aquest augment pot ser la causa de la disminució en l'eficiència de degradació del contaminant, tal com va succeir en l'experiment en SBR amb reutilització de biomassa (taula 6.4).

**Taula 6.6.** Resultats de degradació de carbamazepina i de velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) obtingut en degradació en continu sota condicions de cicle redox.

Nombre de període (Temps experimental – h)	Degradació de carbamazepina (%)	Velocitat de degradació de carbamazepina (mg/(h·g pes sec))	Velocitat de consum de DBQ(H <sub>2</sub> ) (mM/(h·g pes sec))
Batch inicial (0h-2,75h)	67,8	0,66	0,05
1 <sup>er</sup> (2,75h-23h)	30,0	0,20	0,11
2 <sup>on</sup> (23h-49h)	14,1	0,10	0,14
3 <sup>er</sup> (49h-54,5h)	21,3	0,16	0,23
3 <sup>er</sup> (54,5h-69h)	0,0	0,0	0,23
Batch final (69h-73,75h)	20,1	0,09	0,19

Com que la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) va ser més elevada que l'esperada, el cabal de quinona a l'afluent es va augmentar a l'inici del segon període, el qual comença per a un temps de 23 h i acaba per a un temps de 49 h. El TRH va ser de 1,6 h i les concentracions de carbamazepina i DBQ a l'afluent van ser de 5,6 mg/L i 0,58 mM, respectivament. Tot i el lleuger augment de DBQ a l'afluent, la velocitat de degradació de carbamazepina obtinguda al segon període va ser inferior que l'obtinguda al primer període. Respecte a la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>), aquesta va augmentar al segon període respecte al primer.

Al final del segon període, per a un temps de 49 h, com que la concentració de DBQ al reactor era molt baixa, la seva concentració a l'afluent es va augmentar fins a 0,8 mM. A més a més, la concentració de carbamazepina es va fixar en 5,96 mg/L i el TRH en 1,7 h. Aquestes condicions es van mantenir fins al final del procés en continu,

que correspon a un temps de 69 h. Un cop es va augmentar la concentració de DBQ a l'afluent, la velocitat de degradació de carbamazepina va augmentar en un 60% en l'interval 49h-54,5h en relació al període previ. En canvi, la concentració de carbamazepina mesurada en el volum d'efluent del reactor acumulat pel següent interval (54,5h-69h) indica que no es va produir degradació durant les últimes 14,5 hores del tercer període. Tot i que no es van realitzar canvis en els cabals d'entrada i que la DBQ va ser consumida per part del fong fins i tot a una velocitat major que els períodes previs, el fet de no existir degradació de carbamazepina durant l'últim interval del tercer període indica que probablement s'aturés la generació de radicals hidroxils per aquest temps i com a conseqüència, es produís l'exhauriment del procés de biooxidació avançada pel tractament en continu.

Per tal de comprovar si la causa de no obtenir degradació de carbamazepina durant el tercer període del procés era que la biomassa havia perdut la seva capacitat per reduir la DBQ a DBQH<sub>2</sub>, que correspon al primer pas del procés de producció de radicals hidroxils, es va reutilitzar la biomassa per realitzar un experiment de degradació en batch amb renovació del MCR amb glucosa (0,75 g/L). La taula 6.6 mostra que el fong sota condicions de cicle redox encara va ser capaç de degradar la carbamazepina, però amb una eficiència molt menor a l'obtinguda en el batch previ al tractament en continu, tot i que les condicions experimentals van ser les mateixes en els dos casos. Respecte al consum de DBQ(H<sub>2</sub>), aquest es va mantenir en un nivell semblant a l'últim període del tractament en continu, fet que corrobora l'increment de consum de quinona observat al llarg del tractament en continu.

El tractament en reactor en continu realitzat mostra que és possible degradar la carbamazepina en aquestes condicions durant un temps elevat. Tot i això, al no assolir un percentatge de degradació elevat en règim continu, s'ha de considerar que aquest experiment és útil com una primera aproximació a l'aplicació del procés de biooxidació avançada en aquesta forma d'operació, però de cara a una futura aplicació en condicions reals, seria necessari realitzar una investigació més exhaustiva per tal de millorar l'eficiència del procés.

Si es comparen els resultats de degradació obtinguts per a les dues formes d'operació utilitzades, es comprova que el tractament en SBR usant RCM amb glucosa és més efectiu que el tractament en continu. Per tant, de cara a tractar un afluent contaminat amb carbamazepina de volum gran, l'opció més indicada seria l'operació en SBR, després d'haver comprovat que és possible mantenir un percentatge de

degradació significatiu durant un nombre elevat de batchs, fet que no succeeix en el procés en continu, on el percentatge de degradació disminueix al cap d'un temps curt d'iniciar el tractament.

Respecte a l'important increment de la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>) al llarg del temps registrat en les dues formes d'operació provades, els resultats obtinguts indiquen que, en ambdós casos, té una influència important en la degradació de contaminant, la qual té tendència a disminuir a mesura que augmenta la velocitat de consum de quinona per part del fong. Per tant, aquest és un paràmetre molt important a ser estudiat per tal de millorar l'aplicació del procés de biooxidació avançada per a tractaments a temps llargs, tenint en compte que, tal com s'ha comentat anteriorment, no es coneix en detall els mecanismes de degradació de DBQ per part del fong alternatiu a l'oxidació pels propis radicals hidroxils. De fet, si no s'aconseguís solucionar aquesta problemàtica i no fos possible evitar la disminució de l'eficiència de degradació de carbamazepina al augmentar la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>), aquest podria ser un inconvenient realment important per a l'aplicació del procés de cicle redox en reactor en condicions reals, ja fos operant en SBR o en continu.

### 6.3 Conclusions

- La 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona presenta la principal limitació per l'aplicació del concepte de cicle redox en un procés de degradació, degut a la seva baixa solubilitat i a la seva toxicitat.
- En el cas de compostos volàtils, s'hi afegeix, a més a més, la limitació per oxigen, al ser necessari treballar en reactors hermètics.
- Com en el cas del tractament en fong, es desestima l'aplicació d'aquest procés per a la degradació de compostos volàtils en efluents.
- El procés de biooxidació avançada no és adequat per a compostos poc solubles, com és el cas del decaBDE.
- S'ha aconseguit degradar la carbamazepina, la qual s'ha utilitzat com a model de contaminant no volàtil i soluble, en reactor en diferents formes d'operació.

- S'ha evidenciat que l'ús del miceli de *T. versicolor* sota condicions de cicle redox per a llargs períodes de temps comporta un augment de la velocitat de consum de DBQ(H<sub>2</sub>), probablement per vies diferents a la degradació dels propis radicals hidroxils. Per tant, és possible que hi hagi un sistema enzimàtic intracel·lular que s'estimula per la presència prolongada de DBQ.
- El nostre treball permet concloure que el següent pas ha de ser la substitució de la DBQ per un compost fenòlic que no presenti les limitacions que s'han evidenciat.

---

**Capítol 7**  
Aplicació de l'anàlisi isotòpic  
d'elements estables en la  
degradació de compostos  
recalcitrants mitjançant  
*Trametes versicolor*

---









## Resum

En aquest capítol s'estudia l'aplicació de l'anàlisi isotòpic d'elements estables (CSIA de l'anglès *Compound specific isotope analysis*) per estudiar el fraccionament isotòpic del carboni i també, en alguns casos, de l'hidrogen, provocat per la degradació de diferents compostos recalcitrants mitjançant *T. versicolor*. Els compostos escollits han estat metil tert-butil éter (MTBE), etil tert-butil éter (ETBE), tricloroetilè (TCE), tetracloroetilè (PCE), toluè i etilbenzè.

De tots els contaminants emprats, només en el cas del TCE i el PCE s'han obtingut percentatges de degradació elevats, amb valors de  $67 \pm 10$  i  $59 \pm 9\%$  al cap de 156 h, respectivament. Pels altres contaminants, els percentatges de degradació obtinguts es troben a voltant del 30% o inferiors i per tant, al no ser valors de degradació suficientment elevats, l'aplicació posterior del CSIA no permet obtenir resultats concloents sobre el grau de fraccionament isotòpic obtingut.

En el cas del TCE i el PCE, els resultats del CSIA indiquen que el procés de degradació mitjançant el fong no provoca un fraccionament significatiu del carboni en cap dels dos contaminants i s'obté un valor del factor d'enriquiment de  $-0,11$  i  $-0,5\%$  pel TCE i PCE, respectivament.

En el cas dels altres contaminants, tot i que els resultats de fraccionament obtinguts no es poden considerar com a concloents, s'intueix que el fraccionament del carboni i l'hidrogen, en el cas del MTBE i l'ETBE, i del carboni, pel toluè i l'etilbenzè, provocat per la degradació mitjançant el fong és baix.

## 7.1 Introducció

Els principals elements presents en els compostos orgànics són el carboni, l'hidrogen, el nitrogen, l'oxigen i el sulfur. A més a més, en el cas dels contaminants orgànics recalcitrants, el clor també és un element abundant. Per tots aquests elements, existeixen almenys dos isòtops estables amb diferents masses espectromètriques (igual nombre de protons, diferent nombre de neutrons) (taula 7.1). En el cas dels contaminants orgànics d'origen antropogènic, els elements més importants són el carboni, l'hidrogen, l'oxigen i el clor.

**Taula 7.1.** Elements principals dels contaminants orgànics recalcitrants amb les respectives abundàncies isotòpiques naturals i diferències relatives de massa (Meckenstock et al., 2004).

Elements	Abundància isotòpica relativa (%)	Diferència de massa relativa
H <sup>2</sup> /H	99,98/0,02	2,00
<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C	98,89/1,11	1,08
<sup>14</sup> N/ <sup>15</sup> N	99,64/0,36	1,07
<sup>16</sup> O/ <sup>18</sup> O	99,76/0,02	1,13
<sup>32</sup> S/ <sup>34</sup> S	94,02/4,21	1,06
<sup>35</sup> Cl/ <sup>37</sup> Cl	75,53/24,47	1,06

A partir de la relació isotòpica dels elements que es mostren a la taula 7.1 i pel fet que aquests elements es troben presents en contaminants orgànics detectats en aqüífers, es va desenvolupar l'anàlisi isotòpic d'elements estables (CSIA), que és una tècnica utilitzada en els darrers anys per caracteritzar i avaluar la biodegradació de compostos orgànics en aqüífers contaminats. Aquesta tècnica es basa en el canvi en la relació isotòpica (R) que es produeix entre la fracció lleugera i la fracció pesada dels elements d'un contaminant pel fet que, en un procés de biodegradació, generalment es produeix un major trencament dels enllaços químics que contenen isòtops lleugers que dels que contenen isòtops pesats (Hofstetter et al., 2008), tenint en compte que només el procés de biodegradació altera significativament la composició isotòpica d'un contaminant en un aqüífer, ja que processos com la dilució, l'evaporació o l'adsorció-desorció d'un contaminant, entre d'altres, no afecten a la seva composició isotòpica d'una forma significativa (Hofstetter et al., 2008). Aquest canvi en la relació isotòpica que es produeix per la degradació del compost és causat per una major energia de punt zero, que correspon a l'energia de l'estat fonamental del sistema, en el cas dels isòtops lleugers respecte als isòtops pesats (Bigeleisen i Wolfsberg, 1958) i que implica que és necessària una menor energia d'activació per trencar un enllaç format per isòtops lleugers que per isòtops pesats i per tant, la velocitat de reacció és major en el primer cas que en el segon.

El CSIA s'utilitza principalment per analitzar la relació isotòpica dels principals elements dels compostos orgànics, carboni i hidrogen, i és de gran utilitat, com a alternativa a altres mètodes de detecció, per demostrar la biodegradació d'un contaminant en condicions *in-situ* a partir de la detecció de fraccionament isotòpic en

diverses mostres provinents de diferents punts de mostreig de l'aqüífer, tenint en compte que, per exemple, la legislació requereix una evidència directa de degradació per validar un procés d'Atenuació Natural, el qual consisteix en la remeiació *in-situ* d'un sòl o aigües subterrànies, mitjançant processos físics, químics o biològics, sota condicions favorables i sense la intervenció de l'home, per així reduir la massa, toxicitat, mobilitat, volum o concentració dels contaminants presents a la zona de tractament (EPA, 1999). Una altra aplicació de la tècnica de fraccionament isotòpic és la identificació de la font de contaminació en condicions *in-situ* per un compost concret, tenint en compte que per a un mateix contaminant, segons el seu procés de producció, la relació isotòpica dels seus elements pot variar i si es disposa de les diferents relacions isotòpiques pel compost segons la seva producció, és possible identificar l'origen de la contaminació detectada en un hàbitat natural (Meckenstock et al., 2004).

A l'analitzar un contaminant per CSIA, el valor de relació isotòpica s'ha d'expressar sempre respecte a un estàndard internacional per tal de poder ser comparat a qualsevol laboratori del món i el valor resultant es coneix com relació isotòpica en notació de  $\delta$  ( $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^2\text{H}$ , en el cas del carboni i l'hidrogen, expressats com a tant per mil (‰)). Pel carboni, l'estàndard (V-PDB) correspon a la relació isotòpica mesurada en un fòssil del cretaci, *Belemnitella americana*, trobat a la formació Pee Dee, a South Carolina (EEUU), i per l'hidrogen, l'estàndard correspon a la composició isotòpica de l'aigua pura (V-SMOW). Per aquests dos elements, es pot afirmar que existeix fraccionament isotòpic si la diferència per a  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^2\text{H}$  abans i després del procés de degradació és superior a  $\pm 0,5$  i  $\pm 5\%$ , respectivament, els quals es consideren els errors típics associats al procés de mesura. D'altra banda, per poder realitzar una avaluació quantitativa de la degradació *in-situ* és necessari disposar del factor de fraccionament isotòpic ( $\alpha$ ) o del factor d'enriquiment isotòpic ( $\epsilon$ ), els quals s'obtenen en estudis de laboratori sota condicions controlades (Meckenstock et al., 2004; Schmidt et al., 2004).

En el cas de compostos que continguin carboni i hidrogen en la seva estructura molecular i en que s'observi una important dispersió entre els diferents valors de factor d'enriquiment d'aquests dos elements obtinguts en els diferents processos de degradació biològica, es pot utilitzar l'anàlisi isotòpic de dues dimensions, on es combina l'anàlisi isotòpic del carboni i de l'hidrogen (Elsner et al., 2005; Zwank et al., 2005), per tal d'aportar major informació en la identificació de la via de degradació d'un compost en condicions *in-situ*. Aquest anàlisi es basa en la forta relació que existeix entre la variació de  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^2\text{H}$  per a cadascun dels processos de degradació d'un

compost, de la que s'obté una relació característica associada al procés inicial de reacció que pot facilitar la seva identificació entre totes les possibles reaccions químiques o enzimàtiques que poden tenir lloc, ja siguin per vies metabòliques aeròbies o anaeròbies, si aquest es produeix en condicions *in-situ*.

Per tal d'obtenir els valors dels diferents factors esmentats és necessari realitzar un procés de càlcul que es detallarà a continuació utilitzant el carboni com a model.

A partir de l'abundància relativa dels isòtops d'un element concret presents en un compost, és possible calcular la relació isotòpica ( $R=^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). Per tal de comparar el valor obtingut amb altres valors referenciats a la bibliografia sobre processos de degradació, és necessari expressar aquesta relació respecte a l'estàndard internacional (V-PDB), obtenint la relació isotòpica en notació de  $\delta$ :

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{mostra}} - R_{\text{estàndard}}}{R_{\text{estàndard}}} \right) \cdot 1000 \quad (7.1)$$

Si s'aplica l'equació de Rayleigh simplificada per a un sistema tancat pels valors resultants d'un procés de degradació d'un contaminant, és possible obtenir la relació entre les relacions isotòpiques del compost per a un temps determinat respecte la inicial ( $R_t/R_0 = (\delta_t + 1000)/(\delta_0 + 1000)$ ) i la concentració del compost per al mateix temps respecte la inicial:

$$\ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right) = \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \cdot \ln\left(\frac{\text{Conc}_t}{\text{Conc}_0}\right) \quad (7.2)$$

A partir del pendent resultant de la relació lineal que s'estableix en l'equació 7.2, es pot calcular el factor de fraccionament isotòpic ( $\alpha$ ) o el factor d'enriquiment isotòpic ( $\epsilon$ ), que s'expressa en unitats de tant per mil (‰):

$$\alpha = \frac{1}{\text{pendent} + 1} \quad (7.3)$$

$$\epsilon = \text{pendent} \cdot 1000 \quad (7.4)$$

En el cas que es desitgi calcular el valor resultant de l'anàlisi isotòpic de dues dimensions, és necessari representar les corresponents  $\delta^{13}\text{C}$  enfront  $\delta^2\text{H}$  obtinguts al llarg del temps en ambdós casos i trobar el valor del pendent de la regressió lineal del gràfic resultant ( $\Lambda$ ). D'altra banda, el valor de  $\Lambda$  es pot assimilar al quocient resultant de la divisió entre el factor d'enriquiment de l'hidrogen i del carboni ( $\Lambda = \Delta\delta^{13}\text{C}/\Delta\delta^2\text{H} \approx \epsilon\text{H}/\epsilon\text{C}$ ). Els principals avantatges d'aquest anàlisi són la facilitat per obtenir els resultats a partir de les dades *in-situ* i el fet d'evitar l'efecte dels processos limitants sense fraccionament isotòpic i altres efectes de dilució perquè ambdós elements se'n veuran afectats de la mateixa manera (Elsner et al., 2005). Tot i això, s'ha comprovat que, en alguns casos, per a diferents valors de  $\Lambda$  obtinguts a partir de diferents processos de degradació *in-situ* no és possible distingir clarament si es tracta d'un procés de degradació aerobi o anaerobi (Rosell et al., 2007) i per tant, segons el cas, altres tipus d'anàlisis són necessaris a banda d'aquest per identificar la via de degradació.

Els estudis de fraccionament isotòpic pels processos de biodegradació *in-situ* es van centrar primerament en els hidrocarburs aromàtics presents en la gasolina, focalitzant l'estudi sobre la relació isotòpica del carboni ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) (Meckenstock et al., 1999; Richnow et al., 2003a) i en menor mesura de l'hidrogen ( $^2\text{H}/\text{H}$ ) (Morasch et al., 2001). Però en els darrers anys, també s'han realitzat estudis referits al fraccionament isotòpic del metil tert-butil éter (MTBE) per biodegradació *in-situ* (Elsner, 2010). El MTBE ha estat un compost molt utilitzat fins fa pocs anys, a causa del seu baix cost, per augmentar el nombre d'octans de la gasolina, proporcionant una millor oxigenació del procés de combustió, i per tant una reacció més complerta i un millor funcionament del motor del vehicle. Com a conseqüència, aquest compost s'ha convertit en un dels contaminants orgànics volàtils que es detecten amb més freqüència en el medi ambient (Moran et al., 2005; Rosell et al., 2006), sent nombrosos els casos de contaminació d'aqüífers per la seva presència (Rosell et al., 2003; Shih et al., 2004; Martienssen et al., 2006). A l'actualitat, el MTBE està sent reemplaçat progressivament per l'etil tert-butil éter (ETBE) i el tert-amil metil éter (TAME) com additiu de la gasolina a la Unió Europea a causa de la incentivació a través de taxes per compostos com aquests derivats del bioetanol per la seva aplicació en les biogasolines. Per tant, a causa del gran augment de la producció d'aquests dos additius, és probable que es converteixin en contaminants emergents en aqüífers durant els pròxims anys, sobretot en el cas de l'ETBE.

Els estudis de degradació biològica de MTBE i ETBE s'han centrat en la seva degradació bacteriana i les vies de degradació biològica d'aquests compostos en condicions aeròbies es troben descrites per a diferents bacteris (Ferreira et al., 2006). La via de degradació aeròbia d'aquest compost consisteix en una hidroxilació inicial per l'acció d'un enzim monooxigenasa, amb la formació de tert-butoxi metanol, obtenint posteriorment com a producte intermedi tert-butilformat (TBF) i com a productes finals tert-butanol (TBA), format i formaldehid i la possible mineralització del contaminant formant-se CO<sub>2</sub> (Ferreira et al., 2006). En el cas de la degradació anaeròbia de MTBE, encara no s'ha descrit la seva via de degradació, però els indicis indiquen que es produeix una substitució nucleofílica amb la formació de TBA i metanol en alguns casos. Per a l'ETBE, la seva degradació per part dels bacteris en condicions aeròbies es produeix com a substrat de creixement, amb la implicació del sistema citocrom P450 en el primer pas de degradació formant-se tert-butoxi etanol, per donar lloc a tert-butil acetat com a producte intermedi i finalment, es forma TBA, el qual es pot acumular en el medi (Hernandez-Perez et al., 2001). A les taules 7.2 i 7.3 es presenta un resum dels resultats obtinguts en els principals estudis d'anàlisi de fraccionament isotòpic del carboni i hidrogen en ETBE i MTBE per la seva degradació amb diferents cultius microbiològics

**Taula 7.2.** Factors d'enriquiment del carboni i l'hidrogen amb el corresponent interval de confiança (IC) al 95% obtinguts per a diferents processos biològics de degradació d'ETBE.

Condicions de degradació	Cultiu	εC (‰)	±95% IC (‰)	εH (‰)	±95% IC (‰)	Referències
Òxiques (Laboratori)	<i>Aquicola tertiaricarbonis</i> L108	-0,68	0,06	-24	2	Rosell et al., 2007
Òxiques (Laboratori)	<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001	-0,8	0,1	-11	4	Rosell et al., 2007
Òxiques (Laboratori)	<i>Pseudonocardia</i> K1	-1,7	0,2	-73	7	McKelvie et al., 2009

**Taula 7.3.** Factors d'enriquiment del carboni i l'hidrogen amb el corresponent interval de confiança (IC) al 95% obtinguts per a diferents processos biològics de degradació de MTBE.

Condicions de degradació	Cultiu	$\epsilon C$ (‰)	$\pm 95\%$ IC (‰)	$\epsilon H$ (‰)	$\pm 95\%$ IC (‰)	Referències
Òxiques (Laboratori)	ConSORCI mixt	1,5 fins a -1,8	0,1	De -29 fins a -66	3 – 4	Gray et al., 2002
Òxiques (Laboratori)	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	-2,0 fins a -2,4	0,1 – 0,3	De -33 fins a -37	4 – 53,2	Gray et al., 2002
Òxiques (Laboratori)	<i>Methylibium</i> R8	-2,4	0,1	-42	4	Rosell et al., 2007
Òxiques (Laboratori)	<i>Aquicola tertiaricarbonis</i> L108	-0,48	0,05	ns (-0,2)	8	Rosell et al., 2007
Òxiques (Laboratori)	<i>Variovorax paradoxus</i> CL-8	-1,1	0,1	-18	1	Youngster et al., 2010
Òxiques (Laboratori)	<i>Pseudonocardia</i> K1	-2,3	0,2	-100	10	McKelvie et al., 2009
Òxiques (Laboratori)	Cultiu d'enriquiment US3-M	-2,29	0,03	-58	6	Bastida et al., 2010
Òxiques (Laboratori)	ConSORCI mixt	-1,4	0,4 (Desv. Est)	-	-	Lesser et al., 2008
Metanogèniques ( <i>in-situ</i> )	ConSORCI mixt	-1,05	0,03 (Desv. Est)	-	-	Lesser et al., 2008
Metanogèniques (Laboratori)	ConSORCI mixt	-7	1	-41	1	Youngster et al., 2010
Metanogèniques (Laboratori)	Cultiu d'enriquiment	-15 fins a -16	4 – 5	-	-	Somsamak et al., 2005
Metanogèniques (Laboratori i <i>in-situ</i> )	Cultiu d'enriquiment	-13	1	-16	5	Kuder et al., 2005
Metanogèniques (Laboratori)	Cultiu d'enriquiment	-9	5	-	-	Kolhatkar et al., 2002
Metanogèniques ( <i>In-situ</i> )	Cultiu nadiu	-8,1	0,85	-	-	Kolhatkar et al., 2002
Sulfat-reductores i metanogèniques (Laboratori)	Varis cultius d'enriquiment	-14,4	0,7	-	-	Somsamak et al., 2006

ns: Enriquiment no significatiu detectat

En el cas de el MTBE, a causa de la important variabilitat entre els diferents valors de factor d'enriquiment del carboni i l'hidrogen per als diferents processos de degradació, tal com es pot observar a la taula 7.3, és molt útil aplicar l'anàlisi isotòpic de dues dimensions. Per exemple, Kuder et al. (2005) obtenen un valor de  $\Lambda$  de 1 per un procés de degradació anaeròbia de MTBE, el qual és molt diferent del que s'obté pel procés de degradació aeròbi d'aquest compost mitjançant *M. petroleiphilum* PM1, que correspon a un valor de  $18 \pm 3$  (Gray et al., 2002; Elsner et al., 2005). La causa d'aquesta diferència es troba en el fet que la degradació aeròbia del MTBE causa un elevat fraccionament de l'hidrogen però un fraccionament relativament petit del carboni, a diferència del procés anaeròbi que produeix un fraccionament elevat pels dos elements. Per tant, aquest patró de fraccionament es pot utilitzar com a indicador del tipus de reacció de degradació biològica que està tenint en lloc en un procés *in-situ* (Zwank et al., 2005).

Altres components de la gasolina pels quals s'ha aplicat el CSIA per estudiar el fraccionament del carboni i l'hidrogen provocat pels diferents processos de degradació són els BTEX (benzè, toluè, etilbenzè i xilens). Aquests compostos volàtils es troben englobats dins del grup dels hidrocarburs monoaromàtics i s'han detectat en una gran quantitat d'hàbitats naturals. Les fonts de contaminació corresponen majoritàriament a pèrdues provinents de tancs d'emmagatzematge de petroli i gasolina i abocaments de petroli produïts en pous de producció, refineries, canonades i terminals de distribució.

Concretament, la degradació del etilbenzè i el toluè mitjançant bacteris s'ha estudiat extensament durant dècades (Jindrova et al., 2002; Chakraborty i Coates, 2004), però en el cas de la degradació mitjançant fongs els treballs publicats són molt escassos. Per als fongs de podridura blanca, la degradació d'etilbenzè i toluè s'ha descrit per *Phanerochaete chrysosporium* (Yadav i Reddy, 1993), estudi que va concloure que el sistema enzimàtic ligninolític no s'hi troba implicat.

Respecte l'aplicació del CSIA en els processos de degradació d'aquests dos compostos, es disposa d'un nombre extens de referències de fraccionament del carboni i l'hidrogen en el cas del toluè, però en el cas de l'etilbenzè, el nombre d'estudis és molt més reduït. En primer lloc, a la taula 7.4 és mostra els valors de factor d'enriquiment del carboni i l'hidrogen i els valors resultants de l'aplicació de l'anàlisi isotòpic de dues dimensions ( $\Lambda$ ) obtinguts pel toluè en diferents processos de degradació mitjançant bacteris.



**Taula 7.4.** Factors d'enriquiment pel carboni i l'hidrogen i valors de  $\Lambda$  per microorganismes degradadors del toluè.

Soca bacteriana	Condicions de degradació	$\epsilon C$ (‰)	$\epsilon H$ (‰)	$\Lambda$ ( $\approx \epsilon H / \epsilon C$ )	Referències
<i>R. opacus</i> B-4	Òxiques	$-1,8 \pm 0,3$	$-5 \pm 15$	$1 \pm 2$	Vogt et al., 2008
<i>P. Putida</i> F1	Òxiques	$-0,4 \pm 0,3$	$-28 \pm 10$	nd	Morasch et al., 2002
<i>P. Putida</i> mt-2	Òxiques	$-2,5 \pm 0,3$	$-159 \pm 11$	$68 \pm 5$	Mancini et al., 2006
<i>T. aromatica</i>	Nitratoeductores	$-2,7 \pm 0,1$	$-35 \pm 14$	$11 \pm 5$	Vogt et al., 2008
<i>Geobacter metallireducens</i>	Ferroeductores	$-1,8 \pm 0,3$	-	-	Meckenstock et al., 1999
<i>B. sulfoviridis</i>	Anòxic fototròfic	$-4,0 \pm 0,5$	$-23 \pm 6$	$4 \pm 3$	Vogt et al., 2008
ConSORCI bacterià	Metanogèniques	-0,5	-	-	Ahad et al., 2000
<i>D. cetonica</i>	Sulfatoeductores	$-2,6 \pm 0,2$	$-189 \pm 32$	$28 \pm 4$	Vogt et al., 2008

Respecte a l'etilbenzè, es disposa de dues publicacions en les que s'aplica el CSIA per tal de demostrar la degradació d'aquest compost en condicions *in-situ*. En l'article publicat per Richnow et al. (2003b), té lloc una disminució important de la concentració d'aquest compost en diferents punts de mostreig d'un aqüífer a Vejen (Dinamarca) i l'anàlisi del fraccionament del carboni en les mostres d'etilbenzè va permetre demostrar que aquesta disminució de concentració era provocada per un procés de degradació biològic, en aquest cas en condicions anaeròbies. El factor de fraccionament del carboni per l'etilbenzè ( $\alpha C$ ) va ser, en aquest cas, de 1,0021. En l'altre article referent a aquesta matèria i que va ser publicat per Mancini et al. (2002), es demostra l'existència de degradació d'etilbenzè en condicions *in-situ* en un aqüífer proper a un complex industrial a Dow Benelux BV (Països Baixos). En aquest cas es van detectar importants variacions de la relació isotòpica del carboni i de l'hidrogen en les diferents mostres recollides per a diferents temps, sent de l'ordre de  $2 \pm 0,5\%$  per  $\delta^{13}C$  i de  $50 \pm 5\%$  per  $\delta^2H$ , fet que va demostrar que la disminució de la concentració de contaminant era causada pel procés de degradació biològic que tenia lloc a l'aqüífer.

L'anàlisi de fraccionament isotòpic també s'ha aplicat en l'estudi de la degradació biològica d'altres contaminants detectats amb freqüència en el medi ambient, com és el cas del tricloroetilè (TCE) i el tetracloroetilè (PCE). Aquests compostos estan considerats com dos dels principals contaminants presents en aqüífers de tot el món industrialitzat i es troben inclosos a la llista de les principals substàncies perilloses més habituals en indrets contaminats dels EEUU (CERCLA Priority List) que l'agència de registre de substàncies tòxiques i malalties dels EEUU (ATSDR) publica cada dos anys (web ATSDR).

El fraccionament isotòpic del carboni en TCE i PCE a causa de la seva degradació s'ha estudiat a nivell de laboratori per a diferents processos biològics mitjançant bacteris, sobretot en condicions anaeròbies, de cara a poder aplicar posteriorment aquesta tècnica per demostrar l'existència de degradació *in-situ* d'aquests dos compostos en aqüífers. A la taula 7.5 es presenten els valors d'enriquiment isotòpic pel TCE i el PCE obtinguts en diferents estudis sobre processos de degradació bacteriana en condicions anaeròbies.

Respecte a l'aplicació del CSIA en la degradació de TCE i PCE en condicions aeròbies, existeix un estudi d'avaluació del fraccionament isotòpic del carboni resultant de la degradació de TCE, PCE i 1,2-diclorete (DCE), sent aquest últim un possible producte de degradació anaeròbia de TCE i PCE, en condicions *in-situ* (Pooley et al., 2009). En aquest estudi s'observa variació de la concentració de PCE al llarg del temps en diferents localitzacions de l'aqüífer, però es dedueix que aquesta no es deu a degradació mitjançant la biomassa bacteriana, al no observar variació de  $\delta^{13}\text{C}$  al llarg del temps. En canvi, es comprova que existeix degradació tant de TCE com de DCE a l'obtenir diferències de  $\delta^{13}\text{C}$  de fins al 20‰ entre diferents punts de mostreig de l'aqüífer contaminat. En el cas de l'aplicació d'aquesta tècnica en la degradació d'aquests compostos mitjançant fongs, no es disposa de cap referència bibliogràfica prèvia.

**Taula 7.5.** Valors d'enriquiment isotòpic del carboni amb el corresponent interval de confiança (IC) al 95% obtinguts a partir de la dechloració de TCE i PCE mitjançant bacteris deshalogenadors.

Soca bacteriana	$\epsilon\text{C TCE (‰)}$	$\pm 95\% \text{ IC (‰)}$	$\epsilon\text{C PCE (‰)}$	$\pm 95\% \text{ IC (‰)}$
<i>S. multivorans</i>	-18,7 <sup>b</sup>	4,2	-0,4 <sup>a</sup>	0,2
<i>S. multivorans</i>	-16,4 <sup>e</sup>	1,5	-	-
<i>S. halorespirans</i>	-18,9 <sup>b</sup>	10	-0,5 <sup>b</sup>	0,2
<i>D. michiganensis</i>	-3,5 <sup>c</sup>	0,2	ns	-
<i>G. lovleyi sz</i>	-8,5 <sup>c</sup>	0,6	ns	-
<i>Desulfotobacterium</i> pce-s	-12,2 <sup>d</sup>	2,3	-5,2 <sup>a</sup>	1,5
<i>Desulfotobacterium</i> viet1	-	-	-16,7 <sup>c</sup>	4,5
<i>Dehalobacter</i> <i>restrictus</i> per-k23	-3,3 <sup>e</sup>	0,3	-	-
<i>D. ethenogenes</i> 195	-13,7 <sup>c</sup>	1,8	-6,0 <sup>c</sup>	0,7
<i>D. ethenogenes</i> 195	-9,6 <sup>e</sup>	0,4	-	-
Cultius mixtes	-2,5 fins a - 16 <sup>d,e,f</sup>	-	-5,5 <sup>d</sup>	-
<i>Dehalococcoides</i> cbdb1	-11,2 <sup>g</sup>	2,6	-1,6 <sup>g</sup>	0,3

ns: Fraccionament no significatiu

a Nijenhuis i Zinder (2005)

b Cichocka et al. (2007)

c Cichocka et al. (2008)

d Slater et al. (2001)

e Lee et al. (2007)

f Bloom et al. (2000)

g Marco-Urrea et al. (2011)

En aquest capítol es mostra l'aplicació de l'anàlisi isotòpic d'elements estables per estudiar el fraccionament de carboni i en alguns casos d'hidrogen per la degradació de diferents contaminants mitjançant el fong *Trametes versicolor*. Els contaminants escollits corresponen als esmentats en la introducció d'aquest capítol. Els estudis de fraccionament isotòpic es van realitzar en motiu d'una estada doctoral al Centre de Recerca Mediambiental Helmholtz (UFZ), situat a Leipzig (Alemanya).

## 7.2 Resultats i discussió

### 7.2.1 Degradació de metil tert-butil éter i etil tert-butil éter

La degradació aeròbia de metil tert-butil éter (MTBE) i etil tert-butil éter (ETBE) mitjançant bacteris ha estat àmpliament estudiada (Ferreira et al., 2006) i el fraccionament isotòpic del carboni i l'hidrogen presents en aquests compostos per degradació aeròbia també ha estat estudiat en varies publicacions (Gray et al., 2002; Rosell et al., 2007; Lesser et al., 2008; McKelvie et al., 2009). En aquest apartat es mostra l'estudi de la degradació d'aquests dos contaminants en fase aquosa mitjançant *T. versicolor* i la posterior aplicació del CSIA per estudiar el fraccionament isotòpic que produeix aquest procés de degradació sobre els àtoms de carboni i hidrogen presents en els dos compostos.

Es va estudiar la degradació de MTBE i ETBE en fase aquosa mitjançant *T. versicolor* en forma de pèl·lets en ampolles de sèrum de 240 mL de volum total amb 35 mL de medi definit i per a una concentració inicial de contaminant de 20 mg/L a la fase líquida en ambdós casos.

Els màxims percentatges de degradació obtinguts per a el MTBE i l'ETBE en aquest experiment van ser del 16% per a un temps de 168 hores i del 36% per a un temps de 120 hores, respectivament, els quals són significativament inferiors als percentatges de degradació esperats per a un procés de degradació aerobi, tenint en compte que en el cas dels bacteris s'obtenen percentatges de degradació significativament més elevats tant si té lloc l'oxidació co-metabòlica (Fayolle et al., 2001) com si els dos contaminants són utilitzats com a substrats de creixement (Rosell et al., 2007). D'altra banda, els resultats de degradació obtinguts en aquest experiment suggereixen que l'ETBE és menys recalcitrant a la degradació per part del fong que el MTBE.

En relació a la formació de productes de degradació, en el cas de l'ETBE no es va detectar la presència de tert-butanol (TBA) al finalitzar l'experiment. En el cas del MTBE tampoc, però es va detectar la formació de tert-butilformat (TBF), el qual és un dels productes precursors del TBA en certes soques bacterianes, amb un màxim de concentració per a les 168 hores, suggerint que la reacció de degradació s'atura en aquest compost intermedi.

Respecte a l'evolució de la concentració d'oxigen al llarg del temps, aquest es va esgotar per a un temps de 96 hores i per tant, és possible que amb posterioritat a l'esgotament de l'oxigen, el procés de degradació es trobés limitat per aquest fet. Pel que fa a la glucosa, aquesta s'havia esgotat pràcticament, al finalitzar l'experiment (168 hores), però per a un temps de 120 hores, es disposava d'una concentració superior a 2 g/L en totes les ampolles experimentals.

Per aquest segon experiment es va realitzar també l'anàlisi del fraccionament isotòpic del carboni i l'hidrogen, tot i no obtenir percentatges de degradació significatius per a cap dels dos compostos. A les taules 7.6 i 7.7 es mostren els resultats del CSIA pel MTBE i l'ETBE.

**Taula 7.6.** Valors dels diferents paràmetres obtinguts a partir del CSIA respecte a la evolució de la concentració del MTBE per la degradació mitjançant *T. versicolor*.

Temps (h)	Conc. (mg/L)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)	$\delta^2\text{H}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)
Adsorció 168h	20,7 ± 0,3	-29,6 ± 0,1			-121 ± 4		
Degradació 168h 1	18,6 ± 0,5	-29,5 ± 0,1	1,001	-0,9	-119 ± 4	1,021	-16,5
Degradació 168h 2	18,5 ± 0,3	-29,4 ± 0,1	1,002	-2,3	-115 ± 4	1,060	-59,5

**Taula 7.7.** Valors dels diferents paràmetres obtinguts a partir del CSIA respecte a l'evolució de la concentració d'ETBE per la degradació mitjançant *T. versicolor*.

Temps (h)	Conc. (mg/L)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)	$\delta^2\text{H}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)
Adsorció 168h	20,6 ± 0,3	-20,0 ± 0,1	-	-	-153 ± 5	-	-
Degradació 96h	15,3 ± 0,3	na	-	-	-170 ± 6	nd	nd
Degradació 120h	13,6 ± 0,3	-21,2 ± 0,2	nd	nd	-173 ± 11	nd	nd
Degradació 168h 1	16,2 ± 0,2	-20,8 ± 1,0	nd	nd	-148 ± 4	1,031	-26,2
Degradació 168h 2	14,1 ± 0,2	-19,2 ± 0,1	1,002	-2,1	-158 ± 3	nd	nd

na no analitzat

nd enriquiment no significatiu detectat

Tal com es pot observar a la taula 7.6, en el cas del MTBE, es van obtenir valors  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^2\text{H}$  superiors per a les mostres de degradació que per a la mostra d'adsorció i per tant, és possible calcular el factor de fraccionament i d'enriquiment isotòpic, però és important comentar que pels dos elements, la major part de les diferències de  $\delta$  obtingudes entre la mostra de degradació i el control són inferiors a l'error típic associat al procés de mesura, que correspon a  $\pm 0,5\text{‰}$  pel carboni i  $\pm 5\text{‰}$  per l'hidrogen, tot i que en aquest cas, la desviació estàndard és significativament inferior a aquest error típic, sobretot en el cas del carboni. A més a més, existeix una dispersió

important entre els valors d'enriquiment isotòpic de les dues mostres de degradació per a un mateix temps tant pel carboni com per l'hidrogen. Si es comparen els valors de factor d'enriquiment obtinguts en aquest experiment amb els obtinguts en processos bacterians en condicions aeròbies (taula 7.3), es pot comprovar que pel MTBE s'obtenen valors semblants tant pel carboni com per l'hidrogen, però no és possible realitzar una comparació fiable amb els valors bibliogràfics perquè, a causa de la baixa degradació obtinguda mitjançant el fong, els errors associats als resultats de fraccionament són significatius en comparació amb les diferències de  $\delta$  obtingudes entre la mostra de degradació i el control. Per tant, els valors d'enriquiment isotòpic obtinguts pels dos elements només es poden considerar com a indicadors de la possible existència de cert fraccionament del carboni i l'hidrogen.

A partir dels valors del factor d'enriquiment pel carboni i l'hidrogen es pot calcular el valor resultant de l'anàlisi isotòpic de dues dimensions ( $\Lambda$ ), que subministra informació addicional de cara a identificar el procés de degradació si aquest es produeix en condicions *in-situ* i que correspon a un valor de 23. Ara bé, com s'ha comentat anteriorment, la fiabilitat d'aquest resultat és baixa.

Per a l'ETBE, a la taula 7.7 es pot observar que els resultats de  $\delta^{13}\text{C}$  i  $\delta^2\text{H}$  obtinguts per a les diferents mostres de degradació presenten una gran dispersió entre ells i només en un dels casos per a cadascun dels elements s'obté un valor de relació isotòpica superior en les mostres de degradació que en les d'adsorció i per aquests dos casos,  $\Delta\delta$  corresponent és lleugerament superior a l'error típic associat a l'anàlisi. Per tant, en el cas de l'ETBE, a partir dels resultats obtinguts, no és possible suggerir que es produeix fraccionament per cap dels dos elements.

A partir dels experiments realitzats s'ha comprovat que aquests dos compostos són en part recalcitrants pel procés de degradació amb el fong en les condicions experimentals utilitzades. De cara a poder demostrar que *T. versicolor* és capaç de degradar aquests dos compostos de forma significativa i poder verificar si es produeix fraccionament isotòpic o en cas contrari, que no és possible obtenir percentatges de degradació elevats mitjançant aquest procés de degradació, seria necessari realitzar una investigació més exhaustiva d'optimització de les condicions d'operació, sobretot respecte al medi de degradació.

### 7.2.2 Degradació de MTBE i ETBE mitjançant el procés de biooxidació avançada

A partir de l'acció del fong *T. versicolor*, utilitzant 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ) com a substrat i en presència de  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  com a catalitzadors, es pot portar a terme un procés de producció de radicals hidroxils (Gomez-Toribio et al., 2009a, , 2009b), els quals són capaços de degradar significativament, pel seu alt poder d'oxidació, un llarg ventall de contaminants recalcitrants, tal com fàrmacs (Marco-Urrea et al., 2009c), hidrocarburs alifàtics clorats (Marco-Urrea et al., 2009a) o compostos BTEX (Aranda et al., 2010), entre d'altres.

En aquest apartat es mostra l'aplicació del CSIA per determinar el fraccionament isotòpic del carboni i hidrogen, presents en el MTBE i l'ETBE, a causa de la seva degradació mitjançant el fong en condicions de cicle redox, el qual no s'ha estudiat prèviament. Per tal d'estudiar el procés de degradació d'aquests dos contaminants mitjançant el fong en condicions de cicle redox, es va realitzar un experiment en vials de 8 mL amb 4 mL de fase aquosa a una concentració inicial de 100 mg/L per ambdós compostos. Inicialment, la concentració de DBQ va ser de 0,5 mM i al cap de 6 hores d'experiment, es va realitzar una addició d'una solució concentrada de DBQ per evitar el seu exhauriment i la conseqüent aturada del procés de degradació. A la taula 7.8 es mostren els diferents percentatges de degradació de MTBE i d'ETBE obtinguts pel procés cicle redox en presència del fong.

**Taula 7.8.** Evolució del percentatge de degradació de MTBE i ETBE mitjançant *T. versicolor* en condicions de cicle redox en vials de 8 mL .

Temps (h)	% degradació ETBE	% degradació MTBE
1,3	12 ± 7	12 ± 1
2,2	10 ± 5	14 ± 3
3,2	12 ± 1	17 ± 2
4	20 ± 3	18 ± 1
6	10 ± 4	19 ± 7
24	18 ± 3	13 ± 3

A la taula anterior es pot observar que no es va obtenir un percentatge de degradació significatiu per a cap dels dos contaminants. D'altra banda, s'observa que es va produir una aturada de la degradació a partir de les 4 hores, probablement per l'esgotament de la DBQ abans de l'addició d'aquest substrat realitzada per a un temps de 6 hores. A més a més, es pot observar que l'addició de DBQ no va provocar un

augment del percentatge de degradació per cap dels dos contaminants, probablement pel fet que la concentració d'oxigen a l'ampolla ja era molt baixa o s'havia esgotat a l'addicionar el substrat.

Tot i obtenir percentatges de degradació baixos per als dos contaminants, es va detectar, en els dos casos, la formació de TBA a partir de les 2 hores d'experiment, obtenint valors màxims de concentració entre 4 i 5 mg/L. Aquest fet indica que té lloc la degradació per l'acció del procés biològic de cicle redox.

Degut a la baixa degradació, es va decidir realitzar l'anàlisi del fraccionament isotòpic del carboni i l'hidrogen només a una mostra corresponent a un dels temps experimentals per cada contaminant per comparar el resultat obtingut amb el del vial control, que correspon a la mostra amb fong i medi sense Fe<sup>3+</sup> ni Mn<sup>2+</sup>. A les taules 7.9 i 7.10 es mostra els valors dels diferents paràmetres calculats a partir de l'anàlisi de fraccionament isotòpic per aquest experiment.

**Taula 7.9.** Valors dels diferents paràmetres obtinguts a partir del CSIA respecte a l'evolució de la quantitat de MTBE en la degradació mitjançant *T. versicolor* en condicions de cicle redox.

Temps (h)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)	$\delta^2\text{H}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)
Control 24h	-29,9 ± 0,1			-42 ± 4		
Degradació 24h	-29,5 ± 0,1	1,001	-1,4	-31 ± 2	1,031	-34,2

**Taula 7.10.** Valors dels diferents paràmetres obtinguts a partir del CSIA respecte a l'evolució de la quantitat d'ETBE en la degradació mitjançant *T. versicolor* en condicions de cicle redox.

Temps (hores)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)	$\delta^2\text{H}$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)
Control 24h	-20,2 ± 0,1			-63 ± 5		
Degradació 24h	-19,9 ± 0,0	1,001	-0,9	-55 ± 2	1,030	-31,8

Els valors de relació isotòpica presentats a les dues taules anteriors mostren que, en el cas del carboni, la diferència entre el control i la mostra de degradació és inferior a l'error associat al procés de mesura, que correspon a un valor de ± 0,5‰, tant per el MTBE com per l'ETBE, però és superior al valor de les corresponents desviacions estàndards obtingudes. En el cas de l'hidrogen, les diferències de relació isotòpica obtingudes són proporcionalment més elevades que pel carboni, tenint en compte que l'error associats al procés de mesura és de ± 5‰ per l'hidrogen. Els resultats obtinguts en l'anàlisi de fraccionament isotòpic suggereixen que es produeix cert fraccionament isotòpic, sobretot en el cas de l'hidrogen, per l'acció degradadora dels radicals



hidroxils, però no és possible afirmar-ho perquè les diferències de relació isotòpica no són prou significatives. Per tal de poder refermar o contradir els resultats obtinguts, seria necessari realitzar un major nombre d'experiments per obtenir un percentatge de degradació considerablement major en aquest procés de degradació.

A partir dels valors de relació isotòpica, es calculen els respectius factors de fraccionament i d'enriquiment isotòpic. Com es pot observar a les taules 7.9 i 7.10 els valors del factor d'enriquiment obtinguts suggereixen que, tant pel carboni com per l'hidrogen, el procés de reacció mitjançant els radicals hidroxils provoca un fraccionament similar en els dos contaminants, a l'obtenir valors molt semblants entre ells, tot i que com s'ha comentat anteriorment, els resultats obtinguts només es poden considerar indicatius.

En aquest cas també es pot calcular el valor de  $\Lambda$ , que per el MTBE correspon a valor resultant de 25 i per l'ETBE, de 34. En primer lloc, la similitud de valors de  $\Lambda$  obtinguda pels dos contaminants suggereix la possibilitat que la via de degradació mitjançant radicals hidroxils sigui la mateixa pels dos contaminants.

De cara a comprovar si els valors de factor d'enriquiment del carboni i l'hidrogen i  $\Lambda$  obtinguts en la degradació de MTBE i ETBE mitjançant el fong en condicions de cicle redox són coherents, aquests es poden comparar amb un estudi de degradació d'aquests dos contaminants mitjançant el procés Fenton químic, on es compara l'eficiència de  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  com a catalitzadors, i mitjançant l'ús de permanganat potàssic ( $\text{KMnO}_4$ ) com a reactiu d'oxidació (Rosell et al., 2011). En aquest estudi es van obtenir percentatges de degradació molt elevats amb valors superiors al 95% pels dos contaminants. A la taula 7.11 es mostren els resultats dels factors d'enriquiment i de  $\Lambda$  obtinguts mitjançant el procés Fenton químic per a un temps de degradació pels dos contaminants de 1h pel  $\text{Fe}^{2+}$  i 40h pel  $\text{Fe}^{3+}$ , i mitjançant l'oxidació amb permanganat potàssic per a un temps de 120h pel MTBE i 7h per l'ETBE.

**Taula 7.11.** Factors d'enriquiment del carboni i l'hidrogen i de  $\Lambda$ , amb el corresponent interval de confiança (IC) al 95% en el casos que s'hagin pogut calcular, obtinguts mitjançant el procés Fenton químic i mitjançant la reacció amb  $\text{KMnO}_4$  (Rosell et al., 2011).

	$\epsilon_{\text{C}_{\text{MTBE}}} (\text{‰})$	$\epsilon_{\text{H}_{\text{MTBE}}} (\text{‰})$	$\Lambda_{\text{MTBE}}$	$\epsilon_{\text{C}_{\text{ETBE}}} (\text{‰})$	$\epsilon_{\text{H}_{\text{ETBE}}} (\text{‰})$	$\Lambda_{\text{ETBE}}$
Fenton ( $\text{Fe}^{3+}$ )	$-1,4 \pm 0,1$	$-31 \pm 9$	$25 \pm 5$	$-1,1 \pm 0,1$	-18	17
Fenton ( $\text{Fe}^{2+}$ )	$-1,2 \pm 0,2$	$-29 \pm 6$	$22 \pm 4$	$-0,6 \pm 0,2$	-18	23
$\text{KMnO}_4$	$-5,53 \pm 0,04$	$-109 \pm 4$	$20,1 \pm 0,5$	$-5,2 \pm 0,1$	$-128 \pm 24$	$24 \pm 4$

A partir de les taules 7.9, 7.10 i 7.11 es pot comprovar que, en el cas del factor d'enriquiment del carboni, els valors que s'obtenen, tant pel MTBE com per l'ETBE, pels processos Fenton biològic i Fenton químic són molt semblants entre ells. En el cas de l'hidrogen, els valors de factor d'enriquiment obtinguts pel MTBE també són molt semblants pels dos processos i en el cas de l'ETBE, existeix una certa diferència entre ells però es podria considerar que són del mateix ordre. Pel que fa a l'oxidació mitjançant  $\text{KMnO}_4$ , es pot observar que aquest procés provoca, en tots els casos, un fraccionament molt més elevat que els dos processos Fenton si es comparen els valors d'enriquiment isotòpic obtinguts per cadascun dels elements.

Pel que fa al valor de  $\Lambda$ , que relaciona la variació de la relació isotòpica de l'hidrogen amb la del carboni, en el cas del MTBE, si es comparen els valors obtinguts en els diferents processos (taules 7.9, 7.10 i 7.11), s'observa que s'obtenen valors realment similars, i en el cas de l'ETBE, la diferència és més elevada, però aproximadament s'obtenen valors d'ordre semblant per als tres processos.

Per tant, en primer lloc, la semblança entre els valors de factor d'enriquiment isotòpic i de  $\Lambda$  obtinguts pels processos Fenton biològic i químic suggereix que aquests causen un fraccionament isotòpic del carboni i l'hidrogen molt similar en cadascun dels compostos i que el tipus de reacció que té lloc és idèntica o molt similar, fet que és lògic tenint en compte que el responsable de l'oxidació dels contaminants en els dos processos és el radical hidroxil. En el cas del procés d'oxidació mitjançant  $\text{KMnO}_4$ , el fet d'obtenir valors de  $\Lambda$  semblants als altres processos suggereix que el tipus de reacció de degradació és similar a la dels processos Fenton biològic i químic, però en aquest cas discrimina el trencament dels enllaços formats per l'isòtop lleuger respecte als formats per l'isòtop pesat, tant pel carboni com per l'hidrogen.

Ara bé, és important recordar que, els percentatges obtinguts de degradació dels dos contaminants mitjançant el fong sota condicions de cicle redox no són gaire elevats i en conseqüència, seria necessari augmentar la seva degradació substancialment per tal de confirmar la semblança de resultats obtinguda, tant del factor d'enriquiment isotòpic com de  $\Lambda$ , entre els diferents processos de degradació.

D'altra banda, si es compara el valor de  $\Lambda$  obtingut pel procés Fenton biològic per al degradació del MTBE ( $\Lambda=25$ ) amb els diferents valors de  $\Lambda$  obtinguts per degradació bacteriana en condicions aeròbies pel mateix contaminant, es comprova que hi ha casos en que els valors són semblants. Per exemple, per a la degradació mitjançant

*M. petroleiphilum* PM1 (Elsner et al., 2005), *Methylbium* R8 (Rosell et al., 2007) i el cultiu enriquit USM-3 (Bastida et al., 2010), els valors de  $\Lambda$  que s'obtenen són  $18 \pm 3$ ,  $17 \pm 1$  i  $24 \pm 2$ , respectivament. Aquest fet suggereix que, en tots els casos, el tipus de reacció de degradació que té lloc hauria de ser similar a la que té lloc pel procés Fenton biològic. En el cas de l'ETBE, els valors de  $\Lambda$  obtinguts per a la degradació mitjançant *A. tertiarycarbonis* L108, *R. ruber* IFP 2001 (Rosell et al., 2007) i *Pseudonocardia* K1 (McKelvie et al., 2009) són  $14 \pm 1$ ,  $10 \pm 3$  i  $49 \pm 4$ , respectivament. Si aquests valors es comparen amb l'obtingut mitjançant el procés de biooxidació avançada pel mateix contaminant, que correspon a un valor de 34, s'observa que, en aquest cas, la diferència és significativa i per tant, no és possible suggerir que es produeix el mateix tipus de reacció de degradació d'ETBE pels processos bacterians i pel procés Fenton biològic.

### 7.2.3 Degradació de tricloroetilè i tetracloroetilè

Tal com es demostra en els articles publicat per Marco-Urrea et al. (2006; 2008a), el fong *T. versicolor* és capaç de degradar el tricloroetilè (TCE) i el tetracloroetilè (PCE) en fase aquosa. En aquest apartat es mostra l'aplicació de l'anàlisi de fraccionament isotòpic pel procés de degradació d'aquests dos contaminants mitjançant el fong per tal de comprovar si s'obté un enriquiment del carboni significatiu en la fracció residual dels dos compostos al finalitzar el procés.

L'experiment es va portar a terme en ampolles de sèrum de 240 mL amb 15 mL de medi definit, amb una concentració inicial en fase líquida per a cadascun dels contaminants de 10 mg/L i la fase gas saturada d'oxigen. A la taula 7.12 es mostra el percentatge de degradació obtingut al llarg de l'experiment pels dos contaminants.

**Taula 7.12.** Valors de degradació de TCE i PCE obtinguts mitjançant *T. versicolor*.

Temps (hores)	% degradació TCE	% degradació PCE
72	$21 \pm 7$	$38 \pm 7$
120	$66 \pm 11$	$76 \pm 18$
156	$67 \pm 10$	$59 \pm 9$

La taula 7.12 mostra que els percentatges de degradació obtinguts, tant pel PCE com pel TCE, són superiors al 60% a partir d'un temps de degradació de 120 hores i per tant, els resultats que s'obtinguin de l'anàlisi d'enriquiment isotòpic han de ser concloents respecte al grau enriquiment isotòpic del carboni provocat pel procés de

degradació en la part no degradada de cadascun dels contaminants. A la taula 7.13 es mostra l'evolució de la concentració i de la relació isotòpica per a les mostres obtingudes pels dos contaminants al llarg del procés.

**Taula 7.13.** Valors de concentració i de relació isotòpica en relació  $\delta$  per TCE i PCE al llarg de l'experiment de degradació mitjançant *T. versicolor*.

Temps (hores)	TCE		PCE	
	Conc (mg/L)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Conc (mg/L)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Blanc 216h	6,9 ± 0,1	-29,5±0,1	9,2 ± 0,4	-25,7±0,1
Degradació 72h1	5,7	-29,0±0,3	5,6	-25,2±0,2
Degradació 72h2	4,3	-29,1±0,0	5,6	-25,4±0,1
Degradació 120h1	1,2	-28,9±0,2	0,0	-25,2±0,2
Degradació 120h2	3,1	-28,9±0,1	4,1	-25,1±0,1
Degradació 156h1	0,9	-28,7±0,1	3 ± 1	-25,1±0,2
Degradació 156h2	3,3 ± 0,4	-29,0±0,1	4,0 ± 0,2	-25,1±0,4

A partir de la taula 7.13 es pot comprovar que tot i l'elevada degradació obtinguda pels dos contaminants, la disminució de la relació isotòpica en notació  $\delta$  pel carboni és molt baixa i només en casos concrets és superior a l'error típic associat al procés de mesura ( $\pm 0,5\%$ ). A partir dels resultats obtinguts, es pot afirmar que el procés de degradació de TCE i PCE mitjançant el fong no provoca un fraccionament significatiu del carboni present en aquests contaminants i per tant, el procés de reacció és capaç de trencar amb una eficiència similar els enllaços formats per  $^{12}\text{C}$  i per  $^{13}\text{C}$ , tot i que l'energia d'activació necessària per trencar un enllaç format per aquest últim és major. A partir dels valors de la taula 7.13, es poden calcular els valors de factor de fraccionament i factor d'enriquiment pels dos contaminants, els quals es presenten a la taula 7.14. Els valors obtinguts refermen que, per cadascun dels contaminants, l'enriquiment de la fracció residual d'ambdós compostos és molt baixa.

**Taula 7.14.** Valors dels factors de fraccionament i enriquiment isotòpic pel TCE i PCE en l'experiment de degradació mitjançant *T. versicolor*.

TCE		PCE	
$\alpha$	$\epsilon$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)
1,0001	-0,11	1,001	-0,5

Si es comparen els valors de factor d'enriquiment del carboni obtinguts pel TCE i PCE en aquest experiment amb els respectius valors obtinguts en experiments de

degradació mitjançant bacteris (taula 7.5), es pot comprovar que per als diferents processos bacterians de degradació anaeròbia sí es produeix un enriquiment significatiu del carboni, tant pel TCE com pel PCE, i que per tant, els bacteris anaerobis estudiats fins ara trenquen amb una major eficiència els enllaços formats per  $^{12}\text{C}$  que per  $^{13}\text{C}$ , a causa de la menor energia d'activació necessària per trencar els enllaços formats per l'isòtop lleuger respecte al pesat. D'altra banda, en l'estudi publicat per Pooley et al. (2009), on s'estudia el fraccionament isotòpic del carboni per la degradació *in-situ* de TCE i PCE mitjançant un cultiu bacterià mixt en condicions aeròbies, es dedueix que la variació de la concentració de PCE detectada a diferents punts de mostreig de l'aqüífer al llarg del temps no és deguda al procés de degradació mitjançant el cultiu bacterià mixt present, perquè no s'obté un fraccionament isotòpic significatiu en el cas del PCE. En contraposició a aquesta deducció, en aquest capítol s'ha demostrat que és possible degradar el PCE en condicions aeròbies en un percentatge elevat però sense provocar un enriquiment en  $^{13}\text{C}$  respecte a  $^{12}\text{C}$  en la fracció residual del compost. En el cas del TCE, els resultats publicats per Pooley et al. (2009) mostren diferències de  $\delta^{13}\text{C}$  de fins el 20‰ entre diferents punts de mostreig de l'aqüífer i per tant, la seva degradació en aquest cas es produeix mitjançant un enzim que discrimina el trencament d'enllaços formats per  $^{12}\text{C}$  respecte als formats per  $^{13}\text{C}$ .

#### 7.2.4 Degradació de toluè i etilbenzè

Respecte a la degradació de toluè i etilbenzè mitjançant fongs de podridura blanca, s'ha descrit que la soca *Phanerochaete chrysosporium* és capaç de degradar aquests dos compostos en condicions aeròbies en un elevat percentatge (Yadav i Reddy, 1993).

L'experiment per estudiar la degradació d'aquests dos contaminants mitjançant *T. versicolor* es va portar a terme en ampolles de sèrum de 240 mL amb 15 mL de medi definit, una concentració inicial en fase líquida de cadascun dels contaminants de 13 mg/L i la fase gas saturada d'oxigen. A la taula 7.15 es mostren els percentatges de degradació obtinguts al llarg de l'experiment pels dos contaminants.

**Taula 7.15.** Degradació de toluè i etilbenzè mitjançant *T. versicolor*.

Temps (hores)	% degradació toluè	% degradació etilbenzè
48	22 ± 3	3 ± 3
72	28 ± 5	26 ± 5
168	28 ± 7	24 ± 5

A partir de la taula 7.15 es pot comprovar que el fong és capaç de degradar ambdós contaminants però els percentatges de degradació obtinguts no són gaire elevats al finalitzar l'experiment. A partir d'un temps de 72h, es pot observar que la degradació ja no augmenta, el qual indica que la reacció de degradació es va aturar, tot i la presència d'oxigen, el qual es va esgotar per a un temps al voltant de 120 hores, segons la mesura mitjançant el sensor d'oxigen utilitzat en les ampolles de sèrum. Els valors de degradació obtinguts pels dos contaminants en aquest experiment són molt inferiors als obtinguts en la degradació mitjançant *P. chrysosporium* (Yadav i Reddy, 1993), tenint en compte que es va obtenir un percentatge de degradació del  $71 \pm 3$  i del  $89 \pm 1\%$  pel toluè i l'etilbenzè, respectivament, per a una concentració inicial de cadascun dels contaminants 10 mg/L utilitzant medi d'extracte de malta per a un temps experimental de 5 dies. Per tant, en el cas de *T. versicolor* és possible que si es realitzen certes modificacions en les condicions experimentals de degradació, el fong sigui capaç de degradar ambdós contaminants amb un percentatge més elevat.

Tot i no assolir percentatges de degradació superiors al 50% pel toluè i l'etilbenzè, es va aplicar el CSIA per analitzar el fraccionament isotòpic del carboni a les mostres de degradació obtingudes a diferents temps (taula 7.16).

**Taula 7.16.** Valors de concentració i de relació isotòpica en relació  $\delta$  per toluè i etilbenzè al llarg de l'experiment de degradació mitjançant *T. versicolor*.

Temps (hores)	Toluè		Etilbenzè	
	Conc (mg/L)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Conc (mg/L)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Adsorció 168h	$10,0 \pm 0,1$	$-24,5 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,5$	$-29,6 \pm 0,2$
Degradació 48h1	$8,2 \pm 0,5$	$-24,5 \pm 0,1$	-	-
Degradació 48h2	$7,9 \pm 0,2$	$-24,4 \pm 0,1$	-	-
Degradació 72h1	-	-	$5,4 \pm 0,1$	$-29,3 \pm 0,0$
Degradació 72h2	$7,2 \pm 0,2$	$-24,3 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,7$	$-29,2 \pm 0,1$
Degradació 168h1	$7,3 \pm 0,0$	$-24,5 \pm 0,1$	-	-
Degradació 168h2	$7,6 \pm 0,1$	$-24,3 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$	$-29,3 \pm 0,1$

Els resultats de la taula 7.16 mostren que per a cap dels dos contaminants s'obté una diferència significativa entre el valor de relació isotòpica del control d'adsorció i de les mostres de degradació. De fet, en cap cas la diferència de relacions isotòpiques és superior a l'error típic associat al procés de mesura, que correspon a un valor de

$\pm 0,5\%$ , tot i que en aquest cas els valors de desviació estàndard obtinguts per a cadascuna de les mostres són inferiors a aquest error típic. Per tant, no és possible afirmar, per a cap dels dos compostos, que la degradació mitjançant el fong produeixi l'enriquiment isotòpic del carboni present en la fracció residual de contaminant no degradada. Tot i això, s'han calculat els valors dels factors de fraccionament i d'enriquiment isotòpic per a ser presentats com a valors indicatius d'un possible fraccionament isotòpic en els dos contaminants pel procés de degradació mitjançant el fong (taula 7.17).

**Taula 7.17.** Valors dels factors de fraccionament i enriquiment isotòpic pel toluè i etilbenzè en l'experiment de degradació mitjançant *T. versicolor*.

Toluè		Etilbenzè	
$\alpha$	$\epsilon$ (‰)	$\alpha$	$\epsilon$ (‰)
1,0004	-0,4	1,0011	-1,1

Els resultats que es mostren a la taula 7.17 suggereixen que el procés de degradació de toluè i etilbenzè mitjançant el fong no provoca un fraccionament significatiu del carboni però no és possible saber-ho amb claredat pel fet que no es va assolir un percentatge de degradació elevat. En el cas del toluè, si es compara el valor del factor d'enriquiment obtingut amb els dels diferents processos de degradació bacterians en condicions aeròbies (taula 7.4), s'observa que per a la degradació mitjançant *P. putida* F1 (Morasch et al., 2002), s'obté el mateix valor ( $\epsilon = 0,4 \pm 0,3$ ) i aquest fet concorda amb la hipòtesi del baix fraccionament del carboni provocat per la degradació mitjançant el fong. Ara bé, seria necessari assolir un percentatge de degradació considerablement més elevat tant pel toluè com per l'etilbenzè per tal de demostrar si el fraccionament del carboni pel procés de degradació mitjançant el fong és significatiu o no ho és.

Tots els resultats experimentals presentats en aquest capítol es van obtenir a partir dels experiments realitzats durant l'estada doctoral al Centre de Recerca Mediambiental Helmholtz. A causa de la curta durada d'aquesta estada, els resultats presentats són incomplets i en la majoria dels casos, no es poden extreure unes conclusions definitives sobre l'efecte fraccionador del processos de degradació mitjançant *T. versicolor*, sobretot pel fet que només es coneixia la capacitat degradadora del fong respecte el TCE i PCE però no respecte els altres contaminants. S'ha comprovat que el fong no ha estat capaç de degradar el MTBE, l'ETBE, el toluè i l'etilbenzè en un percentatge prou elevat com per a poder obtenir resultats de

fraccionament isotòpic precisos. Però s'intueix que el fraccionament produït pel fong en tots els casos ha estat baix i en el cas del MTBE, l'ETBE i el toluè podria ser semblant al que s'obté en una reacció química de tipus Fenton. Per tant, abans d'estudiar el fraccionament isotòpic d'aquests contaminants, és necessari optimitzar els corresponents processos de degradació per tal d'obtenir una degradació més elevada. Ara bé, aquest treball suposa una primera aproximació a l'anàlisi isotòpic d'elements estables i ha servit per conèixer el seu gran potencial com a tècnica d'anàlisi per a ser aplicada en el futur en tractaments de degradació de contaminants mitjançant *T. versicolor*, tenint en compte que s'ha demostrat que aquesta soca fúngica és capaç de degradar una gran varietat de compostos recalcitrants presents en el medi ambient (Blánquez et al., 2004; Marco-Urrea et al., 2009b; Marco-Urrea et al., 2009d; Borràs et al., 2010; Rodríguez-Rodríguez et al., 2010).

### 7.3 Conclusions

- Ha estat possible l'aplicació de l'anàlisi isotòpic d'elements estables en el procés de degradació de TCE i PCE mitjançant *T. versicolor* i s'ha comprovat que, en aquest cas, no es produeix, en cap dels dos compostos, un fraccionament isotòpic apreciable del carboni.
- Respecte als altres contaminants estudiats, els resultats obtinguts no són conclouents degut a que els percentatges de degradació assolits són inferiors als requerits per l'aplicació fiable del CSIA.



---

# **Capítol 8**

## **Conclusions globals**

---



Les principals conclusions extretes del treball de Tesi “Biodegradació de compostos orgànics halogenats amb *Trametes versicolor*” són les següents:

- Tot i que el fong ha demostrat la seva capacitat per degradar TCE i PCE, tant per via enzimàtica com per la producció de radicals hidroxils, la seva aplicació per tractar efluent reals és poc viable.
- En el cas de compostos retardants de flama bromats, és factible la seva aplicació, malgrat la seva baixa solubilitat, doncs els efluent reals acostumen a contenir tensioactius.
- Pel procés de biooxidació avançada, s’ha aconseguit passar de la “Prova de concepte” (PoC de l’anglès *Proof of concept*) a la possible aplicació en reactors.
- L’aprenentatge i posada a punt de l’anàlisi isotòpic d’elements estables durant l’estància realitzada al Centre de Recerca Mediambiental Helmholtz, situat a Leipzig, Alemanya, obre noves possibilitats d’estudi de la degradació de contaminants recalcitrants mitjançant fongs, tenint en compte que, actualment, la utilització d’aquesta tècnica en aquest àmbit és molt escassa.





---

# **Capítol 9**

## **Annexes**


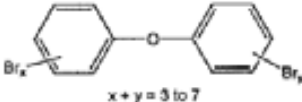
---







INFORMACIÓ DE LA COMPOSICIÓ DE LA MESCLA DE PENTABDES (TBDE-71X)  
SUBMINISTRADA PER WELLINGTON LABORATORIES (PÀG. 1 DE 3)

 <b>WELLINGTON LABORATORIES</b>			
<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS/DOCUMENTATION</b>			
<b>PRODUCT CODE:</b>	TBDE-71X	<b>LOT NUMBER:</b>	05500F16P
<b>COMPOUND:</b>	Great Lakes DE-71™, Pentabromodiphenyl Oxide		
<b>STRUCTURE:</b>			
		<b>CAS #:</b>	32534-81-9
<b>MOLECULAR FORMULA:</b>	$C_{12}H_{10-n}Br_nO$ (n= 3-7)	<b>MOLECULAR WEIGHT:</b>	Mixture
<b>CONCENTRATION:</b>	Neat (> 100 mg)	<b>SOLVENT(S):</b>	Not Applicable
<b>CHEMICAL PURITY:</b>	Mixture		
<b>LAST TESTED:</b> (m=1000000)	04/08/2005 (HRGC/HRMS)		
<b>RECOMMENDED STORAGE:</b>	Store at 4°C protected from light		
<b>EXPIRY DATE:</b>	Stability studies ongoing		
<b>DETAILS:</b>			
<p>DE-71™ is generally referred to as commercial pentabromodiphenyl ether, although it is a mixture of tri, tetra, penta, hexa and hepta brominated diphenyl ethers.</p> <p>A solution of DE-71™ was prepared in toluene. The individual polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) were first identified and semi-quantitatively determined using known standards and HRGC/LRMS.</p> <p>In order to quantitatively determine the PBDEs using isotopic dilution, DE-71™ was combined with MBDE-MXE (<math>^{13}C_{12}</math>-BDE surrogate mixture) and BDE-CVS-E-ISS (<math>^{13}C_{12}</math>-BDE-138 injection standard) and analyzed using HRGC/HRMS.</p> <p>The combined mixture was injected in triplicate and quantitated using a five point calibration curve (BDE-CVS-E). The BDE congeners detected, and their percent composition, are shown in Table A.</p> <p>In addition DE-71™, was also fractionated and analyzed using proton NMR to aid in the structural confirmation of the known individual PBDEs. Using proton NMR, previously unknown PBDEs were identified in the technical mixture.</p> <p>A total ion chromatogram (TIC) obtained using HRGC/HRMS analysis is shown in Figure 1. Isomers which have been identified are labelled using the same IUPAC system as for PCBs.</p> <p>The percent composition of the individual brominated diphenyl ethers are not certified.</p>			
<b>NOT FOR HUMAN/DRUG USE POTENTIALLY TOXIC TO HUMANS</b>			

**Table A: TBDE-71X Components and Percent Composition\***

Isomer #	PBDE Congener	Percent Composition
17	2,2',4-Tribromodiphenyl ether	0.099 ± 0.035
28	2,4,4'-Tribromodiphenyl ether	0.296 ± 0.043
	<b>Total Percent Tribromodiphenyl ethers</b>	<b>0.395 ± 0.056</b>
a	Unknown Tetrabromodiphenyl ether	0.061 ± 0.033
51 <sup>m</sup>	2,2',4,6'-Tetrabromodiphenyl ether	0.202 ± 0.033
49	2,2',4,5'-Tetrabromodiphenyl ether	0.750 ± 0.066
48 <sup>m</sup>	2,2',4,5-Tetrabromodiphenyl ether	0.082 ± 0.036
47	2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether	32.4 ± 1.4
b	Unknown Tetrabromodiphenyl ether	0.372 ± 0.003
66 & 42 <sup>m</sup>	2,3',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether (major)	0.904 ± 0.122
	2,2',3,4'-Tetrabromodiphenyl ether (minor)	
	<b>Total Percent Tetrabromodiphenyl ethers</b>	<b>34.8 ± 1.4</b>
104	2,2',4,6,6'-Pentabromodiphenyl ether	0.055 ± 0.006
102	2,2',4,5,6'-Pentabromodiphenyl ether	0.235 ± 0.016
100	2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether	8.93 ± 0.36
119	2,3',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether	0.089 ± 0.020
91 <sup>m</sup>	2,2',3,4',6-Pentabromodiphenyl ether	0.125 ± 0.082
99	2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether	43.9 ± 0.8
c	Unknown Pentabromodiphenyl ether	0.053 ± 0.010
d	Unknown Pentabromodiphenyl ether coelutes with unknown non-PBDE	< 0.067 ± 0.013
85	2,2',3,4,4'-Pentabromodiphenyl ether	2.42 ± 0.05
	<b>Total Percent Pentabromodiphenyl ethers</b>	<b>55.9 ± 0.9</b>
155	2,2',4,4',6,6'-Hexabromodiphenyl ether	0.312 ± 0.022
154	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether	3.30 ± 0.20
149	2,2',3,4',5,6'-Hexabromodiphenyl ether	0.053 ± 0.019
153	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodiphenyl ether	3.84 ± 0.13
139	2,2',3,4,4',6-Hexabromodiphenyl ether	0.656 ± 0.091
140	2,2',3,4,4',8'-Hexabromodiphenyl ether	0.167 ± 0.065
138	2,2',3,4,4',5'-Hexabromodiphenyl ether	0.963 ± 0.018
	<b>Total Percent Hexabromodiphenyl ethers</b>	<b>8.89 ± 0.27</b>
184	2,2',3,4,4',6,6'-Heptabromodiphenyl ether	0.047 ± 0.024
183	2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodiphenyl ether	0.131 ± 0.003
	<b>Total Percent Heptabromodiphenyl ethers</b>	<b>0.178 ± 0.024</b>
	<b>Total Percent Brominated Diphenyl Ethers</b>	<b>100.1 ± 1.7</b>

\* Peaks are in elution order on a 30 m DB5-HT column. Refer to Figure 1 for more information  
95% confidence interval (n=3)

(a,b,c,d) Peaks are labelled in Figure 1  
nmr Congener(s) were identified using proton NMR

Certified By:

  
B.G. Chittim

Date: 02/02/2007









---

# **Capítol 10**

## **Bibliografia**

---







- 
- Abrahamsson, K., Ekdahl, A., Collen, J., Pedersen, M., 1995. Marine algae - A source of trichloroethylene and perchloroethylene. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1321-1326.
  - Acebes, J.A., 2008. Biodegradación de fármacos  $\beta$ -bloqueantes mediante hongos ligninolíticos Master Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
  - Agrell, C., ter Schure, A.F.H., Sveder, J., Bokenstrand, A., Larsson, P., Zegers, B.N., 2004. Polybrominated diphenyl ethers (PBDES) at a solid waste incineration plant I: Atmospheric concentrations. *Atmos. Environ.* 38, 5139-5148.
  - Ahad, J.M.E., Lollar, B.S., Edwards, E.A., Slater, G.F., Sleep, B.E., 2000. Carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of toluene: Implications for intrinsic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 892-896.
  - Ahn, M.Y., Filley, T.R., Jafvert, C.T., Nies, L., Hua, I., 2006a. Birnessite mediated debromination of decabromodiphenyl ether. *Chemosphere* 64, 1801-1807.
  - Ahn, M.Y., Filley, T.R., Jafvert, C.T., Nies, L., Hua, I., Bezares-Cruz, J., 2006b. Photodegradation of decabromodiphenyl ether adsorbed onto clay minerals, metal oxides, and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 215-220.
  - Alvarez-Cohen, L., Speitel, G.E., 2001. Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. *Biodegradation* 12, 105-126.
  - Andreatti, R., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, A., 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Res.* 36, 2869-2877.
  - Aranda, E., Marco-Urrea, E., Caminal, G., Arias, M.E., Garcia-Romera, I., Guillen, F., 2010. Advanced oxidation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 181, 181-186.
  - Arnett, C.M., Parales, J.V., Haddock, J.D., 2000. Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp strain LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2928-2933.
  - Arp, D.J., Yeager, C.M., Hyman, M.R., 2001. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation* 12, 81-103.
  - Ashworth, R.A., Howe, G.B., Mullins, M.E., Rogers, T.N., 1988. Air water partitioning coefficients of organics in dilute aqueous-solutions. *J. Hazard. Mater.* 18, 25-36.

- ATSDR, 1997. Toxicological profile for trichloroethylene (Updated). Atlanta: Agency for Toxic Substances Disease Registry.
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T., Nilsson, T., 1993. Hydroxyl radical activity associated with the growth of white rot fungi. *Holzforschung* 47, 181-187.
- Baeza, J.A., Gabriel, D., Lafuente, J., 2002. In-line fast OUR (oxygen uptake rate) measurements for monitoring and control of WWTP. *Water Sci. Technol.* 45, 19-28.
- Bastida, F., Rosell, M., Franchini, A.G., Seifert, J., Finsterbusch, S., Jehmlich, N., Jechalke, S., von Bergen, M., Richnow, H.H., 2010. Elucidating MTBE degradation in a mixed consortium using a multidisciplinary approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 370-384.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 292-295.
- Bigeleisen, J., Wolfsberg, M., 1958. Theoretical and experimental aspects of isotope effects in chemical kinetics. *Adv. Chem. Phys.* 1, 15-76.
- Birchmeier, K.L., Smith, K.A., Passino-Reader, D.R., Sweet, L.I., Chernyak, S.M., Adams, J.V., Omann, G.M., 2005. Effects of selected polybrominated diphenyl ether flame retardants on lake trout (*Salvelinus namaycush*) thymocyte viability, apoptosis, and necrosis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1518-1522.
- Birnbaum, L.S., Staskal, D.F., 2004. Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental Health Perspectives* 112, 9-17.
- Blais, J.M., Macdonald, R.W., Mackey, D., Webster, E., Harvey, C., Smol, J.P., 2007. Biologically mediated transport of contaminants to aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1075-1084.
- Blázquez, P., 2005. Desenvolupament d'un procés a escala pilot per al tractament del colorant gris lanaset G amb *Trametes versicolor*. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., Vicent, T., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* 38, 2166-2172.
- Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* 38, 2166-2172.

- 
- Blázquez, P., Guieysse, B., 2008. Continuous biodegradation of 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 150, 459-462.
  - Bloemen, L.J., Monster, A.C., Kezic, S., Commandeur, J.N.M., Veulemans, H., Vermeulen, N.P.E., Wilmer, J.W., 2001. Study on the cytochrome P-450-and glutathione-dependent biotransformation of trichloroethylene in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 102-108.
  - Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edwards, E., Frape, S.K., 2000. Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: Implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2768-2772.
  - Boominathan, K., Reddy, C.A., 1992. Camp-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5586-5590.
  - Borràs, E., 2011. Evaluation of *Trametes versicolor* ability to bioremediate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in different matrices. *Tesi Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
  - Borràs, E., Caminal, G., Sarra, M., Novotny, C., 2010. Effect of soil bacteria on the ability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by *Trametes versicolor* and *Irpex lacteus* from contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2087-2093.
  - Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of nonphenolic substrates - an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.
  - Bradley, P.M., 2003. History and ecology of chloroethene biodegradation: A review. *Bioremediation Journal* 7, 81-109.
  - Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 2000. Aerobic microbial mineralization of dichloroethene as sole carbon substrate. *Environ. Sci. Technol.* 34, 221-223.
  - Breivik, K., Wania, F., Muir, D.C.G., Alaee, M., Backus, S., Pacepavicius, G., 2006. Empirical and modeling evidence of the long-range atmospheric transport of decabromodiphenyl ether. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4612-4618.
  - Cabirol, N., Villemur, R., Perrier, J., Jacob, F., Fouillet, B., Chambon, P., 1998. Isolation of a methanogenic bacterium, *Methanosarcina* sp. strain FR, for its ability to degrade high concentrations of perchloroethylene. *Can. J. Microbiol.* 44, 1142-1147.

- Cantero, M., Rubio, S., Perez-Bendito, D., 2005. Determination of non-ionic polyethoxylated surfactants in wastewater and river water by mixed hemimicelle extraction and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1067, 161-170.
- Casas, C., González, G., Lafuente, J., Lema, J.M., Montesinos, J.L., Roca, E., Solà, C., Valero, F., 1998. *Ingeniería Bioquímica*. 1a Edició. Editorial Síntesis.
- Casas, N., Blanquez, P., Gabarrell, X., Vicent, T., Caminal, G., Sarra, M., 2007. Degradation of orange G by laccase: Fungal versus enzymatic process. *Environ. Technol.* 28, 1103-1110.
- Cerniglia, C.E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 324-333.
- Chakraborty, R., Coates, J.D., 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 437-446.
- Chen, G., Hoag, G.E., Chedda, P., Nadim, F., Woody, B.A., Dobbs, G.M., 2001. The mechanism and applicability of in situ oxidation of trichloroethylene with Fenton's reagent. *J. Hazard. Mater.* 87, 171-186.
- Chen, X.P., Zhong, Z.F., Xu, Z.T., Chen, L.D., Wang, Y.T., 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* 44, 587-604.
- Cheng, H.R., Zhang, G., Jiang, J.X., Li, X.D., Liu, X., Li, J., Zhao, Y.C., 2007. Organochlorine pesticides, polybrominated biphenyl ethers and lead isotopes during the spring time at the Waliguan Baseline Observatory, northwest China: Implication for long-range atmospheric transport. *Atmos. Environ.* 41, 4734-4747.
- Chiang, P.C., Hung, C.H., Mar, J.C., Chang, E.E., 1998. Henry's constants and mass transfer coefficients of halogenated organic pollutants in an air stripping packed column. *Water Sci. Technol.* 38, 287-294.
- Cho, Y., Choi, S.I., 2010. Degradation of PCE, TCE and 1,1,1-TCA by nanosized FePd bimetallic particles under various experimental conditions. *Chemosphere* 81, 940-945.

- 
- Christiansson, A., Eriksson, J., Teclechiel, D., Bergman, A., 2009. Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 312-321.
  - Cichocka, D., Imfeld, G., Richnow, H.H., Nijenhuis, I., 2008. Variability in microbial carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene upon reductive dechlorination. *Chemosphere* 71, 639-648.
  - Cichocka, D., Siegert, M., Imfeld, G., Andert, J., Beck, K., Diekert, G., Richnow, H.H., Nijenhuis, I., 2007. Factors controlling the carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene during reductive dechlorination by *Sulfurospirillum* ssp and *Desulfitobacterium* sp strain PCE-S. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 98-107.
  - Coleman, N.V., Mattes, T.E., Gossett, J.M., Spain, J.C., 2002. Biodegradation of cis-dichloroethene as the sole carbon source by a beta-proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2726-2730.
  - Couto, S.R., Sanroman, M.A., Hofer, D., Gubitz, G.M., 2004. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory. *Eng. Life Sci.* 4, 233-238.
  - Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ. Int.* 29, 841-853.
  - Davis, E.F., Stapleton, H.M., 2009. Photodegradation pathways of nonabrominated diphenyl ethers, 2-ethylhexyltetrabromobenzoate and di(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate: identifying potential markers of photodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5739-5746.
  - de Wit, C.A., Alaee, M., Muir, D.C.G., 2006. Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic. *Chemosphere* 64, 209-233.
  - Deming, S.N., Morgan S.L., 1987. *Experimental Design: a Chemometric Approach*. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands.
  - Dewulf, J., Drijvers, D., Vanlangenhove, H., 1995. Measurement of Henry's Law constant as function of temperature and salinity for the low temperature range. *Atmos. Environ.* 29, 323-331.
  - Dewulf, J., Vanlangenhove, H., Everaert, P., 1998. Determination of Henry's law coefficients by combination of the equilibrium partitioning in closed systems and solid-phase microextraction techniques. *Journal of Chromatography A* 830, 353-363.

- Dimmer, C.H., McCulloch, A., Simmonds, P.G., Nickless, G., Bassford, M.R., Smythe-Wright, D., 2001. Tropospheric concentrations of the chlorinated solvents, tetrachloroethene and trichloroethene, measured in the remote northern hemisphere. *Atmos. Environ.* 35, 1171-1182.
- Doddapaneni, H., Yadav, J.S., 2004. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes *pc-1* (CYP63A1) and *pc-2* (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 559-565.
- Domingo, J.L., Marti-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., 2008. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend - A review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 248, 25-32.
- El Fantroussi, S., Naveau, H., Agathos, S.N., 1998. Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol. Prog.* 14, 167-188.
- Eljarrat, E., De La Cal, A., Raldua, D., Duran, C., Barcelo, D., 2004. Occurrence and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from the Cinca River, a tributary of the Ebro River (Spain). *Environ. Sci. Technol.* 38, 2603-2608.
- Ellis-Hutchings, R.G., Cherr, G.N., Hanna, L.A., Keen, C.L., 2006. Polybrominated diphenyl ether (PBDE)-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone concentrations in the rat during lactation and early postnatal development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215, 135-145.
- Ellis, D.E., Lutz, E.J., Odom, J.M., Buchanan, R.J., Bartlett, C.L., Lee, M.D., Harkness, M.R., Deweerdt, K.A., 2000. Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2254-2260.
- Elsner, M., 2010. Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations. *J. Environ. Monit.* 12, 2005-2031.
- Elsner, M., Zwank, L., Hunkeler, D., Schwarzenbach, R.P., 2005. A new concept linking observable stable isotope fractionation to transformation pathways of organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6896-6916.
- Eriksson, J., Green, N., Marsh, G., Bergman, A., 2004. Photochemical decomposition of 15 polybrominated diphenyl ether congeners in methanol/water. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3119-3125.

- 
- Eriksson, P., Viberg, H., Jakobsson, E., Orn, U., Fredriksson, A., 2002. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: Uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicol. Sci.* 67, 98-103.
  - Fakoussa, R.M., Frost, P.J., 1999. In vivo-decolorization of coal-derived humic acids by laccase-excreting fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 60-65.
  - Fayolle, F., Vandecasteele, J.P., Monot, F., 2001. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 339-349.
  - Ferreira, N.L., Malandain, C., Fayolle-Guichard, F., 2006. Enzymes and genes involved in the aerobic biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 252-262.
  - Fox, B.G., Borneman, J.G., Wackett, L.P., Lipscomb, J.D., 1990. Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* Ob3b - mechanistic and environmental implications. *Biochemistry* 29, 6419-6427.
  - Freedman, D.L., Gossett, J.M., 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2144-2151.
  - Gao, D.W., Du, L.N., Yang, J.L., Wu, W.M., Liang, H., 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 70-77.
  - Garant, H., Lynd, L.R., 1996. Perchloroethylene utilization by methanogenic fed-batch cultures - Acclimation and degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57-8, 895-904.
  - Georgi, A., Schierz, A., Trommler, U., Horwitz, C.P., Collins, T.J., Kopinke, F.D., 2007. Humic acid modified Fenton reagent for enhancement of the working pH range. *Appl. Catal. B-Environ.* 72, 26-36.
  - Gerecke, A.C., Giger, W., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.P.E., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2006. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge. *Chemosphere* 64, 311-317.

- Gerecke, A.C., Hartmann, P.C., Heeb, N.V., Kohler, H.P.E., Giger, W., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M., 2005. Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1078-1083.
- Goeptar, A.R., Commandeur, J.N.M., Vanommen, B., Vanbladeren, P.J., Vermeulen, N.P.E., 1995. Metabolism and kinetics of trichloroethylene in relation to toxicity and carcinogenicity - relevance of the mercapturic acid pathway. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 3-21.
- Gomez-Toribio, V., Garcia-Martin, A.B., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Guillen, F., 2009a. Induction of extracellular hydroxyl radical production by white rot fungi through quinone redox cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3944-3953.
- Gomez-Toribio, V., Garcia-Martin, A.B., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Guillen, F., 2009b. Enhancing the production of hydroxyl radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3954-3962.
- Gossett, J.M., 1987. Measurement of Henry's law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 21, 202-208.
- Gossett, J.M., 2002. Fishing for microbes. *Science* 298, 974-975.
- Gray, J.R., Lacrampe-Couloume, G., Gandhi, D., Scow, K.M., Wilson, R.D., Mackay, D.M., Lollar, B.S., 2002. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during biodegradation of methyl tert-butyl ether. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1931-1938.
- Griffin, B.M., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2004. Anaerobic microbial reductive dechlorination of tetrachloroethene to predominately trans-1,2-dichloroethene. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4300-4303.
- Guo, G.L., Tseng, D.H., Huang, S.L., 2001. Co-metabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas putida* in a fibrous bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 23, 1653-1657.
- Gutteridge, J.M.C., 1984. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.* 224, 761-767.
- Hakk, H., Huwe, J., Low, M., Rutherford, D., Larsen, G., 2006. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 36, 79-94.



- 
- Hakk, H., Huwe, J.K., Larsen, G.L., 2009. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague-Dawley rats. *Xenobiotica* 39, 46-56.
  - Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E., Gaylor, M.O., Mainor, T.M., 2006. Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media. *Chemosphere* 64, 181-186.
  - Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E.P., Gaylor, M.O., Mainor, T.M., Duff, W.H., 2001. Flame retardants - Persistent pollutants in land-applied sludges. *Nature* 412, 140-141.
  - Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1981. Formation of a thiobarbituric acid reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts - the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* 128, 347-352.
  - Han, M.J., Choi, H.T., Song, H.G., 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Microbiol.* 42, 94-98.
  - Hardy, M.L., Banasik, M., Stedeford, T., 2009. Toxicology and human health assessment of decabromodiphenyl ether. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 1-44.
  - Hashimoto, A., Iwasaki, K., Nakasugi, N., Nakajima, M., Yagi, O., 2002. Degradation pathways of trichloro ethylene and 1,1,1-trichloroethane by *Mycobacterium* sp TA27. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 385-390.
  - He, J.Z., Robrock, K.R., Alvarez-Cohen, L., 2006. Microbial reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Environ. Sci. Technol.* 40, 4429-4434.
  - Heckert, E.G., Seal, S., Self, W.T., 2008. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5014-5019.
  - Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., Ebersole, R.C., 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout north America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 485-495.
  - Hernandez-Perez, G., Fayolle, F., Vandecasteele, J.P., 2001. Biodegradation of ethyl t-butyl ether (E TBE), methyl t-butyl ether (MTBE) and t-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 117-121.

- Hirvonen, A., Tuhkanen, T., Kalliokoski, P., 1996. Treatment of TCE- and PCE-contaminated groundwater using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation processes. *Water Sci. Technol.* 33, 67-73.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T., 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 871-897.
- Hofstetter, T.B., Schwarzenbach, R.P., Bernasconi, S.M., 2008. Assessing transformation processes of organic compounds using stable isotope fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7737-7743.
- Hundt, K., Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F., 1999. Transformation of diphenyl ethers by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. *Biodegradation* 10, 279-286.
- Huwe, J.K., Smith, D.J., 2007. Accumulation, whole-body depletion, and debromination of decabromodiphenyl ether in male Sprague-Dawley rats following dietary exposure. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2371-2377.
- Hwang, Y.L., Olson, J.D., Keller, G.E., 1992. Steam stripping for removal of organic pollutants from water .2. vapor-liquid equilibrium data. *Ind. Eng. Chem. Res.* 31, 1759-1768.
- Ichinose, H., Wariishi, H., Tanaka, H., 2002. Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 658-664.
- Illman, W.A., Alvarez, P.J., 2009. Performance assessment of bioremediation and natural attenuation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 209-270.
- Jablonski, P.E., Ferry, J.G., 1992. Reductive dechlorination of trichloroethylene by the CO-reduced CO dehydrogenase enzyme complex from *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 96, 55-59.
- Janda, V., Vasek, P., Bizova, J., Belohlav, Z., 2004. Kinetic models for volatile chlorinated hydrocarbons removal by zero-valent iron. *Chemosphere* 54, 917-925.
- Jaward, F.M., Farrar, N.J., Harner, T., Sweetman, A.J., Jones, K.C., 2004. Passive air sampling of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides across Europe. *Environ. Sci. Technol.* 38, 34-41.
- Jindrova, E., Chocova, M., Demnerova, K., Brenner, V., 2002. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. *Folia Microbiol.* 47, 83-93.

- 
- Johannes, C., Majcherczyk, A., 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol.* 78, 193-199.
  - Jos, A., Repetto, G., Rios, J.C., Hazen, N., Molero, M.L., del Peso, A., Salguero, M., Fernandez-Freire, P., Perez-Martin, J.M., Camen, A., 2003. Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicol. Vitro* 17, 525-532.
  - Kan, E., Kim, S., Deshusses, M.A., 2007. Fenton oxidation of TCE vapors in a foam reactor. *Environ. Prog.* 26, 226-232.
  - Kao, C.M., Lei, S.E., 2000. Using a peat biobarrier to remediate PCE/TCE contaminated aquifers. *Water Res.* 34, 835-845.
  - Kengen, S.W.M., Breidenbach, C.G., Felske, A., Stams, A.J.M., Schraa, G., de Vos, W.M., 1999. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2312-2316.
  - Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar, B., Kirk, T.K., 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish-peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* 268, 475-480.
  - Khindaria, A., Grover, T.A., Aust, S.D., 1995. Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Technol.* 29, 719-725.
  - Kim, Y.M., Nam, I.H., Murugesan, K., Schmidt, S., Crowley, D.E., Chang, Y.S., 2007. Biodegradation of diphenyl ether and transformation of selected brominated congeners by *Sphingomonas* sp PH-07. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 187-194.
  - Kirk, T.K., Fenn, P., 1982. Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes. In *decomposer basidiomycetes: their biology and ecology*. A: Frankland, J.C., Hedger, J.N., Swift, M.J. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 67-90.
  - Kirk, T.K., Tien, M., Kersten, P.J., Mozuch, M.D., Kalyanaraman, B., 1986. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* - mechanism of its degradation of the nonphenolic arylglycerol beta-aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* 236, 279-287.

- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D., 2009. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* 35, 402-417.
- Knoth, W., Mann, W., Meyer, R., Nebhuth, J., 2007. Polybrominated diphenyl ether in sewage sludge in Germany. *Chemosphere* 67, 1831-1837.
- Knutson, K., Ragauskas, A., 2004. Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog.* 20, 1893-1896.
- Kolhatkar, R., Kuder, T., Philp, P., Allen, J., Wilson, J.T., 2002. Use of compound-specific stable carbon isotope analyses to demonstrate anaerobic biodegradation of MTBE in groundwater at a gasoline release site. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5139-5146.
- Krumholz, L.R., 1997. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1262-1263.
- Krumholz, L.R., Sharp, R., Fishbain, S.S., 1996. A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4108-4113.
- Kuder, T., Wilson, J.T., Kaiser, P., Kolhatkar, R., Philp, P., Allen, J., 2005. Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: Microcosm and field evidence. *Environ. Sci. Technol.* 39, 213-220.
- Kuramochi, H., Maeda, K., Kawamoto, K., 2007. Physicochemical properties of selected polybrominated diphenyl ethers and extension of the UNIFAC model to brominated aromatic compounds. *Chemosphere* 67, 1858-1865.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of 2 extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247-250.
- Lash, L.H., Fisher, J.W., Lipscomb, J.C., Parker, J.C., 2000. Metabolism of trichloroethylene. *Environmental Health Perspectives* 108, 177-200.
- Lawton, L.A., Robertson, P.K.J., 1999. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chem. Soc. Rev.* 28, 217-224.
- Lee, J.Y., Moon, C.H., Kim, J.H., Oh, B.T., 2007. Feasibility study of the bio-barrier with biologically-active tire rubbers for treating chlorinated hydrocarbons. *Geosci. J.* 11, 131-136.

- 
- Lee, L.K., He, J., 2010. Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers by anaerobic bacteria from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 794-802.
  - Lee, P.K.H., Conrad, M.E., Alvarez-Cohen, L., 2007. Stable carbon isotope fractionation of chloroethenes by dehalorespiring isolates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4277-4285.
  - Leighton, D.T., Calo, J.M., 1981. Distribution coefficients of chlorinated hydrocarbons in dilute air-water systems for groundwater contamination applications. *J. Chem. Eng. Data* 26, 382-385.
  - Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M., Rogalski, J., 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27, 175-185.
  - Lesser, L.E., Johnson, P.C., Aravena, R., Spinnler, G.E., Bruce, C.L., Salanitro, J.P., 2008. An evaluation of compound-specific isotope analyses for assessing the biodegradation of MTBE at Port Hueneme, CA. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6637-6643.
  - Li, S.Y., Wackett, L.P., 1992. Trichloroethylene oxidation by toluene dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 443-451.
  - Liang, J., Komarov, S., Hayashi, N., Kasai, E., 2007. Recent trends in the decomposition of chlorinated aromatic hydrocarbons by ultrasound irradiation and Fenton's reagent. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 9, 47-55.
  - Lipovsky, A., Tzitrinovich, Z., Friedmann, H., Applerot, G., Gedanken, A., Lubart, R., 2009. EPR study of visible light-induced ROS generation by nanoparticles of ZnO. *J. Phys. Chem. C* 113, 15997-16001.
  - Lyew, D., Guiot, S., 2003. Effects of aeration and organic loading rates on degradation of trichloroethylene in a methanogenic-methanotrophic coupled reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 206-213.
  - Mackay, D.M., Cherry, J.A., 1989. Groundwater contamination - pump-and-treat remediation. *Environ. Sci. Technol.* 23, 630-636.
  - Majcherczyk, A., Johannes, C., Huttermann, A., 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 335-341.
  - Mancini, S.A., Hirschorn, S.K., Elsner, M., Lacrampe-Couloume, G., Sleep, B.E., Edwards, E.A., Lollar, B.S., 2006. Effects of trace element concentration on enzyme

controlled stable isotope fractionation during aerobic biodegradation of toluene. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7675-7681.

- Mancini, S.A., Lacrampe-Couloume, G., Jonker, H., Van Breukelen, B.M., Groen, J., Volkering, F., Lollar, B.S., 2002. Hydrogen isotopic enrichment: An indicator of biodegradation at a petroleum hydrocarbon contaminated field site. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2464-2470.
- Marco-Urrea, E., 2007. Biodegradació d'hidrocarburs alifàtics clorats per fongs ligninolítics. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Marco-Urrea, E., Aranda, E., Caminal, G., Guillen, F., 2009a. Induction of hydroxyl radical production in *Trametes versicolor* to degrade recalcitrant chlorinated hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 100, 5757-5762.
- Marco-Urrea, E., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., Vicent, T., Reddy, C.A., 2006. Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7796-7802.
- Marco-Urrea, E., Nijenhuis, I., Adrian, L., 2011. Transformation and carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene to trans-dichloroethene by *Dehalococcoides* sp strain CBDB1. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1555-1562.
- Marco-Urrea, E., Parella, T., Gabarrell, X., Caminal, G., Vicent, T., Reddy, C.A., 2008a. Mechanistics of trichloroethylene mineralization by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70, 404-410.
- Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Caminal, G., Vicent, T., 2009d. Dechlorination of 1,2,3-and 1,2,4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* 166, 1141-1147.
- Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009b. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765-772.
- Marco-Urrea, E., Radjenovic, J., Caminal, G., Petrovic, M., Vicent, T., Barcelo, D., 2009c. Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibrac acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res* 44, 521-532.
- Martienssen, M., Fabritius, H., Kukla, S., Balcke, G.U., Hasselwander, E., Schirmer, M., 2006. Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products. *J. Contam. Hydrol.* 87, 37-53.

- 
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Gutierrez, A., del Rio, J.C., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8, 195-204.
  - Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D.S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., Rokhsar, D., 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* 22, 695-700.
  - Maymo-Gatell, X., Chien, Y.T., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276, 1568-1571.
  - Maymo-Gatell, X., Nijenhuis, I., Zinder, S.H., 2001. Reductive dechlorination of cis-1,2-dichloroethene and vinyl chloride by *Dehalococcoides ethenogenes*. *Environ. Sci. Technol.* 35, 516-521.
  - McKelvie, J.R., Hyman, M.R., Elsner, M., Smith, C., Aslett, D.M., Lacrampe-Couloume, G., Lollar, B.S., 2009. Isotopic fractionation of methyl tert-butyl ether suggests different initial reaction mechanisms during aerobic biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2793-2799.
  - Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C., Richnow, H.H., 2004. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.* 75, 215-255.
  - Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H., 1999. C-13/C-12 isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* 1, 409-414.
  - Metcalf, E., 1985. *Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales*. 2a edició. Editorial Labor.
  - Miller, G.S., Milliken, C.E., Sowers, K.R., May, H.D., 2005. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to trans-dichloroethene and cis-dichloroethene by PCB-dechlorinating bacterium DF-1. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2631-2635.
  - Miller, R.E., Guengerich, F.P., 1982. Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P450 - Evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochemistry* 21, 1090-1097.

- Misra, C., Gupta, S.K., 2001. Hybrid reactor for priority pollutant-trichloroethylene removal. *Water Res.* 35, 160-166.
- Mohn, W.W., Tiedje, J.M., 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56, 482-507.
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803-814.
- Moran, M.J., Zogorski, J.S., Squillace, P.J., 2005. MTBE and gasoline hydrocarbons in ground water of the United States. *Ground Water* 43, 615-627.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Meckenstock, R.U., 2001. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: Mechanistic and environmental aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4842-4849.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., Meckenstock, R.U., 2002. Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5191-5194.
- Morck, A., Hakk, H., Orn, U., Wehler, E.K., 2003. Decabromodiphenyl ether in the rat: Absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Drug Metab. Dispos.* 31, 900-907.
- Mori, T., Kitano, S., Kondo, R., 2003. Biodegradation of chloronaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 380-383.
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A.T., Martinez, M.J., 1997. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr. Microbiol.* 34, 1-5.
- Munz, C., 1985. Air-water phase equilibria and mass transfer of volatile organic compounds. Tesis Doctoral. Stanford University.
- Newell, C.J., Cowie, I., McGuire, T.M., McNab, W.W., 2006. Multiyear temporal changes in chlorinated solvent concentrations at 23 monitored natural attenuation sites. *J. Environ. Eng.-ASCE* 132, 653-663.
- Newman, L.M., Wackett, L.P., 1991. Fate of 2,2,2-trichloroacetaldehyde (chloral hydrate) produced during trichloroethylene oxidation by methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2399-2402.



- 
- Nielsen, R.B., Keasling, J.D., 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethene DNAPLs by a culture enriched from contaminated groundwater. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 160-165.
  - Nijenhuis, I., Zinder, S.H., 2005. Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1664-1667.
  - Noell, A., 2009. Estimation of sequential degradation rate coefficients for chlorinated ethenes. *Practical Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 13, 35-44.
  - Oldenhuis, R., Oedzes, J.Y., Vanderwaarde, J.J., Janssen, D.B., 1991. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* Ob3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 7-14.
  - Ollero de Castro, P., Fernández, E., 1997. Control e instrumentación de procesos químicos. 1a Edició. Editorial Síntesis.
  - Ozdemir, C., Dursun, S., Karatas, M., Sen, N., Sahinkaya, S., 2007. Removal of trichloroethylene (TCE) in up flow anaerobic sludge blanket reactors (UASB). *Biotechnol. Equip.* 21, 107-112.
  - Perelo, L.W., 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard. Mater.* 177, 81-89.
  - Pinsach, J., de Mas, C., Lopez-Santin, J., 2006. A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochem. Eng. J.* 29, 235-242.
  - Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 20-33.
  - Pooley, K.E., Blessing, M., Schmidt, T.C., Haderlein, S.B., Macquarrie, K.T.B., Prommer, H., 2009. Aerobic biodegradation of chlorinated ethenes in a fractured bedrock aquifer: quantitative assessment by compound-specific isotope analysis (CSIA) and reactive transport modeling. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7458-7464.
  - Popp, J.L., Kirk, T.K., 1991. Oxidation of methoxybenzenes by manganese peroxidase and by  $Mn^{3+}$ . *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 145-148.
  - Ptak, T., Schirmer, M., Teutsch, G., 2000. Development and performance of a new multilevel groundwater sampling system. A: Wickramanayake, G.B., Gavaskar, A.R., Kelley, M.E., Nehring, K.W. (Eds.). *Risk, Regulatory, and Monitoring Considerations -*

Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus, p. 95-102.

- Razavi, B., Song, W.H., Cooper, W.J., Greaves, J., Jeong, J., 2009. Free radical induced oxidative and reductive degradation of fibrate pharmaceuticals: kinetic studies and degradation mechanisms. *J. Phys. Chem. A* 113, 1287-1294.
- Reddy, C.A., Mathew, Z., 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. A: Gadd, G.M. (Ed.). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press. Cambridge, UK., p. 52-78.
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U., 2003a. Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *J. Contam. Hydrol.* 65, 101-120.
- Richnow, H.H., Meckenstock, R.U., Reitzel, L.A., Baun, A., Ledin, A., Christensen, T.H., 2003b. In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *J. Contam. Hydrol.* 64, 59-72.
- Rieble, S., Joshi, D.K., Gold, M.H., 1994. Purification and characterization of a 1,2,4-trihydroxybenzene 1,2-dioxygenase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 176, 4838-4844.
- Robbins, G.A., Wang, S., Stuart, J.D., 1993. Using the static headspace method to determine Henry law constants. *Anal. Chem.* 65, 3113-3118.
- Robrock, K.R., Coelhan, M., Sedlak, D.L., Alvarez-Cohen, L., 2009. Aerobic biotransformation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by bacterial isolates. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5705-5711.
- Robrock, K.R., Korytar, P., Alvarez-Cohen, L., 2008. Pathways for the anaerobic microbial debromination of polybrominated diphenyl ethers. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2845-2852.
- Rodriguez-Rodriguez, C.E., Marco-Urrea, E., Caminal, G., 2010. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresour. Technol.* 101, 2259-2266.
- Rosell, M., Barcelo, D., Rohwerder, T., Breuer, U., Gehre, M., Richnow, H.H., 2007. Variations in C-13/C-12 and D/H enrichment factors of aerobic bacterial fuel oxygenate degradation. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2036-2043.

- 
- Rosell, M., Gonzalez-Olmos, R., Rohwerder, T., Georgi, A., Kopinke, F.D., Richnow, H.H., 2011. Evaluating isotopic fractionation of fuel oxygenates during chemical oxidation for understanding aerobic biodegradation mechanisms. *Chemosphere* (in preparation).
  - Rosell, M., Lacorte, S., Barcelo, D., 2006. Analysis, occurrence and fate of MTBE in the aquatic environment over the past decade. *Trac-Trends Anal. Chem.* 25, 1016-1029.
  - Rosell, M., Lacorte, S., Ginebreda, A., Barcelo, D., 2003. Simultaneous determination of methyl tert.-butyl ether and its degradation products, other gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Catalonian groundwater by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 995, 171-184.
  - Ryu, S.A., Park, S.J., 1999. A rapid determination method of the air/water partition coefficient and its application. *Fluid Phase Equilib.* 161, 295-304.
  - Sacher, F., Ehmann, M., Gabriel, S., Graf, C., Brauch, H.J., 2008. Pharmaceutical residues in the river Rhine - results of a one-decade monitoring programme. *J. Environ. Monit.* 10, 664-670.
  - Saeki, S., Mukaia, S., Iwasaki, K., Yagi, O., 1999. Production of trichloroacetic acid, trichloroethanol and dichloroacetic acid from trichloroethylene degradation by *Methylocystis* sp strain M. *Biocatal. Biotransform.* 17, 347-357.
  - Sanchez-Prado, L., Llompart, M., Lores, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., 2005. Investigation of photodegradation products generated after UV-irradiation of five polybrominated diphenyl ethers using photo solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 1071, 85-92.
  - Sandholm, A., Emanuelsson, B.M., Wehler, E.K., 2003. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. *Xenobiotica* 33, 1149-1158.
  - Schmidt, S., Wittich, R.M., Erdmann, D., Wilkes, H., Francke, W., Fortnagel, P., 1992. Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp strain Ss3. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2744-2750.
  - Schmidt, T.C., Zwank, L., Elsner, M., Berg, M., Meckenstock, R.U., Haderlein, S.B., 2004. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 283-300.

- Segev, O., Kushmaro, A., Brenner, A., 2009. Environmental impact of flame retardants (persistence and biodegradability). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 478-491.
- Sellstrom, U., De Wit, C.A., Lundgren, N., Tysklind, M., 2005. Effect of sewage-sludge application on concentrations of higher-brominated diphenyl ethers in soils and earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9064-9070.
- Semer, R., Banerjee, P., 2001. Anaerobic bioremediation of trichloroethene near Duluth International Airport. A: Magar, V.S., Fennell, D.E., Morse, J.J., Alleman, B.C., Leeson, A. (Eds.). *Anaerobic Degradation of Chlorinated Solvents*. Battelle Press, Columbus, p. 157-164.
- Semprini, L., 1997. Strategies for the aerobic co-metabolism of chlorinated solvents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 296-308.
- Seto, M., Kimbara, K., Shimura, M., Hatta, T., Fukuda, M., Yano, K., 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp strain Rha1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3353-3358.
- Sharma, P.K., McCarty, P.L., 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 761-765.
- Shih, T., Rong, Y., Harmon, T., Suffet, M., 2004. Evaluation of the impact of fuel hydrocarbons and oxygenates on groundwater resources. *Environ. Sci. Technol.* 38, 42-48.
- Shin, M., Duncan, B., Seto, P., Falletta, P., Lee, D.Y., 2010. Dynamics of selected pre-existing polybrominated diphenylethers (PBDEs) in municipal wastewater sludge under anaerobic conditions. *Chemosphere* 78, 1220-1224.
- Sim, W.J., Lee, J.W., Lee, E.S., Shin, S.K., Hwang, S.R., Oh, J.E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179-186.
- Slater, G.F., Lollar, B.S., Sleep, B.E., Edwards, E.A., 2001. Variability in carbon isotopic fractionation during biodegradation of chlorinated ethenes: Implications for field applications. *Environ. Sci. Technol.* 35, 901-907.

- 
- Somsamak, P., Richnow, H.H., Haggblom, M.M., 2005. Carbon isotopic fractionation during anaerobic biotransformation of methyl tert-butyl ether and tert-amyl methyl ether. *Environ. Sci. Technol.* 39, 103-109.
  - Somsamak, P., Richnow, H.H., Haggblom, M.M., 2006. Carbon isotope fractionation during anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether under sulfate-reducing and methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1157-1163.
  - Song, M., Chu, S.G., Letcher, R.J., Seth, R., 2006. Fate, partitioning, and mass loading of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) during the treatment processing of municipal sewage. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6241-6246.
  - Sponza, D.T., 2002. Trichloroethylene (TCE) removal during anaerobic granulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *J. Environ. Sci. Health Part A-Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 37, 213-236.
  - Stafiej, A., Pyrzyńska, K., Regan, F., 2007. Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection. *J. Sep. Sci.* 30, 985-991.
  - Staskal, D.F., Diliberto, J.J., DeVito, M.J., Birnbaum, L.S., 2005. Toxicokinetics of BDE 47 in female mice: Effect of dose, route of exposure, and time. *Toxicol. Sci.* 83, 215-223.
  - Staudinger, J., Roberts, P.V., 1996. A critical review of Henry's law constants for environmental applications. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26, 205-297.
  - Stephanopoulos, G., 1984. *Chemical process control*. Prentice Hall International Editions.
  - Streets, S.S., Henderson, S.A., Stoner, A.D., Carlson, D.L., Simcik, M.F., Swackhamer, D.L., 2006. Partitioning and bioaccumulation of PBDEs and PCBs in Lake Michigan. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7263-7269.
  - Subramanian, V., Yadav, J.S., 2008. Regulation and heterologous expression of P450 enzyme system components of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 205-213.
  - Sung, Y., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., Löffler, F.E., 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1980-1987.
  - Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2003. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-

oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp nov. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2964-2974.

- Tandoi, V., Distefano, T.D., Bowser, P.A., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1994. Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and halogenated ethanes by a high rate anaerobic enrichment culture. Environ. Sci. Technol. 28, 973-979.
- Tartakovsky, B., Manuel, M.E., Guiot, S.R., 2005. Degradation of trichloroethylene in a coupled anaerobic-aerobic bioreactor: Modeling and experiment. Biochem. Eng. J. 26, 72-81.
- Tartakovsky, B., Manuel, M.F., Guiot, S.R., 2003. Trichloroethylene degradation in a coupled anaerobic/aerobic reactor oxygenated using hydrogen peroxide. Environ. Sci. Technol. 37, 5823-5828.
- Terzenbach, D.P., Blaut, M., 1994. Transformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene by homoacetogenic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 123, 213-218.
- Terzic, S., Matosic, M., Ahel, M., Mijatovic, I., 2005. Elimination of aromatic surfactants from municipal wastewaters: comparison of conventional activated sludge treatment and membrane biological reactor. Water Sci. Technol. 51, 447-453.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology-(UK) 140, 19-26.
- Tien, M., Kirk, T.K., 1983. Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science 221, 661-662.
- Tokarz, J.A., Ahn, M.Y., Leng, J., Filley, T.R., Nies, L., 2008. Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers in anaerobic sediment and a biomimetic system. Environ. Sci. Technol. 42, 1157-1164.
- Travis, C.C., Doty, C.B., 1990. Can contaminated aquifers at superfund sites be remediated? Environ. Sci. Technol. 24, 1464-1466.
- van der Ven, L.T.M., van de Kuil, T., Verhoef, A., Leonards, P.E.G., Slob, W., Canton, R.F., Germer, S., Hamers, T., Visser, T.J., Litens, S., Hakansson, H., Fery, Y., Schrenk, D., van den Berg, M., Piersma, A.H., Vos, J.G., 2008. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. Toxicology 245, 109-122.
- van Eekert, M.H.A., Schroder, T.J., van Rhee, A., Stams, A.J.M., Schraa, G., Field, J.A., 2001. Constitutive dechlorination of chlorinated ethenes by a methanol degrading methanogenic consortium. Bioresour. Technol. 77, 163-170.

- 
- Van Hamme, J.D., Wong, E.T., Dettman, H., Gray, M.R., Pickard, M.A., 2003. Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1320-1324.
  - Van Hylckama Vlieg, J.E.T., De Koning, W., Janssen, D.B., 1996. Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3304-3312.
  - Verce, M.F., Gunsch, C.K., Danko, A.S., Freedman, D.L., 2002. Cometabolism of cis-1,2-dichloroethene by aerobic cultures grown on vinyl chloride as the primary substrate. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2171-2177.
  - Vilaplana, M., Marco-Urrea, E., Gabarrell, X., Sarra, M., Caminal, G., 2008. Required equilibrium studies for designing a three-phase bioreactor to degrade trichloroethylene (TCE) and tetrachloroethylene (PCE) by *Trametes versicolor*. *Chem. Eng. J.* 144, 21-27.
  - Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.L., 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21, 722-736.
  - Vogt, C., Cyrus, E., Herklotz, I., Schlosser, D., Bahr, A., Herrmann, S., Richnow, H.H., Fischer, A., 2008. Evaluation of toluene degradation pathways by two-dimensional stable isotope fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7793-7800.
  - Vonderheide, A.P., Mueller-Spitz, S.R., Meija, J., Welsh, G.L., Mueller, K.E., Kinkle, B.K., Shann, J.R., Caruso, J.A., 2006. Rapid breakdown of brominated flame retardants by soil microorganisms. *J. Anal. At. Spectrom.* 21, 1232-1239.
  - Vonderheide, A.P., Mueller, K.E., Meija, J., Welsh, G.L., 2008. Polybrominated diphenyl ethers: Causes for concern and knowledge gaps regarding environmental distribution, fate and toxicity. *Sci. Total Environ.* 400, 425-436.
  - Wackett, L.P., Gibson, D.T., 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1703-1708.
  - Wan, Y.S., Mackay, D., 1986. A critical review of aqueous solubilities, vapor pressures, Henry law constants, and octanol-water partition coefficients of the polychlorinated biphenyls. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 15, 911-929.
  - Wang, H.M., Yu, Y.J., Han, M., Yang, S.W., Li, Q., Yang, Y., 2009. Estimated PBDE and PBB congeners in soil from an electronics waste disposal site. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 789-793.

- Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, K.S., Hwang, H.M., 2008. Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2205-2212.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267, 23688-23695.
- Weeks, K.R., Bruell, C.J., Mohanty, N.R., 2000. Use of Fenton's reagent for the degradation of TCE in aqueous systems and soil slurries. *Soil. Sediment. Contam.* 9, 331-345.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22, 161-187.
- William, H., Cummins, M.D., 1984. Design scale-up suitability for air stripping columns Public work. October 1984.
- Witt, M.E., Klecka, G.M., Lutz, E.J., Ei, T.A., Grosso, N.R., Chapelle, F.H., 2002. Natural attenuation of chlorinated solvents at Area 6, Dover Air Force Base: groundwater biogeochemistry. *J. Contam. Hydrol.* 57, 61-80.
- Wong, Y.X., Yu, J., 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 33, 3512-3520.
- Wu, W.M., Shi, J., Hickey, R.F., 2008. Long-term performance of co-metabolic degradation of trichloroethylene in a fluidized bed reactor fed with benzene, toluene and xylene. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 513-523.
- Wymore, R.A., Lee, M.H., Keener, W.K., Miller, A.R., Colwell, F.S., Watwood, M.E., Sorenson, K.S., Jr., 2007. Field evidence for intrinsic aerobic chlorinated ethene cometabolism by methanotrophs expressing soluble methane monooxygenase. *Bioremediation Journal* 11, 125-139.
- Yadav, J.S., Bethea, C., Reddy, C.A., 2000. Mineralization of trichloroethylene (TCE) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 28-34.
- Yadav, J.S., Doddapaneni, H., Subramanian, V., 2006. P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1165-1169.



- 
- Yadav, J.S., Reddy, C.A., 1992. Noninvolvement of lignin peroxidases and manganese peroxidases in 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Lett.* 14, 1089-1092.
  - Yadav, J.S., Reddy, C.A., 1993. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 756-762.
  - Yadav, J.S., Reddy, C.A., 1993. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and mixtures of 2,4-D and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2904-2908.
  - Yang, Y.R., McCarty, P.L., 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3591-3597.
  - Yang, Y.R., McCarty, P.L., 2000. Biologically enhanced dissolution of tetrachloroethene DNAPL. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2979-2984.
  - Young, C., Lim, T.M., Chiang, K., Scott, J., Amal, R., 2008. Photocatalytic oxidation of toluene and trichloroethylene in the gas-phase by metallised (Pt, Ag) titanium dioxide. *Appl. Catal. B-Environ.* 78, 1-10.
  - Youngster, L.K.G., Rosell, M., Richnow, H.H., Haggblom, M.M., 2010. Assessment of MTBE biodegradation pathways by two-dimensional isotope analysis in mixed bacterial consortia under different redox conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 309-317.
  - Yu, H.Y., Guo, Y., Zeng, E.Y., 2010. Dietary intake of persistent organic pollutants and potential health risks via consumption of global aquatic products. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2135-2142.
  - Zegers, B.N., Lewis, W.E., Booij, K., Smittenberg, R.H., Boer, W., De Boer, J., Boon, J.P., 2003. Levels of polybrominated diphenyl ether flame retardants in sediment cores from Western Europe. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3803-3807.
  - Zhou, J., Jiang, W.Y., Ding, J.A., Zhang, X.D., Gao, S.X., 2007. Effect of Tween 80 and beta-cyclodextrin on degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by White Rot Fungi. *Chemosphere* 70, 172-177.
  - Zwank, L., Berg, M., Elsner, M., Schmidt, T.C., Schwarzenbach, R.P., Haderlein, S.B., 2005. New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1018-1029.

## RECURSOS WEB

- ATSDR, Agency for toxic substances & disease registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/>. Accessed 15 Setember 2010.
- EPA, 1997. Presumptive remedy: supplemental bulletin multi-phase extraction (MPE) technology for VOCs in soil and groundwater. PB97-963501. <http://www.cluin.org/download/toolkit/finalapr.pdf>.
- EPA, 1999. Monitored natural attenuation of chlorinated solvents. U.S. EPA remedial technology fact sheet. EPA/600/F-98/022. Accessible a <http://www.cluin.org/download/remed/chl-solv.pdf>.
- EPA, 1999. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. Directive 9200.4-17P. Accessible a <http://www.epa.gov/oust/directiv/d9200417.pdf>.
- EPA, 2000. Engineered approaches to in situ bioremediation of chlorinated solvents: fundamentals and field applications. EPA 542-R-00-008 Accessible a <http://www.epa.gov/tio/download/remed/engappinsitbio.pdf>.
- EPA, 2002. List of drinking water contaminants & MCLs. EPA 816-F-02-013. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.
- EPA, 2009. DecaBDE phase-out Initiative. <http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/deccadbe.html>.
- EPATools, On-line tools for site assessment calculation. <http://www.epa.gov/athens/learn2model/part-two/onsite/henryslaw.html>.
- GoldCrew\_Company, <http://www.goldcrew.net/index.html>.
- Huling, S.G., Weaver, J.W., 1991. Groundwater issue: dense nonaqueous phase liquids EPA office of solid waste and emergency response, office of research and development. Accessible a <http://www.epa.gov/tio/tsp/download/issue8.pdf>.
- IEP Sorbents [http://www.iepsorbents.es/panel/galeria/35/Catalogo\\_IEP\\_2009.pdf](http://www.iepsorbents.es/panel/galeria/35/Catalogo_IEP_2009.pdf).
- IHCP, 2004. European union risk assesment report: trichloroethylene. <http://europa.eu.int>.
- IHCP, 2005. European union risk assesment report: tetrachloroethylene. <http://europa.eu.int>.
- Sigma-Aldrich, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).

- 
- Sims, J.L., Suflita, J.M., Russell, H.H., 1992. Groundwater issue: in-situ bioremediation of contaminated groundwater. EPA office of solid waste and Emergency response, office of research and development. Accessible a <http://www.epa.gov/tio/tsp/download/issue11a.pdf>.
  - WHO, 1994. Brominated diphenyl ethers. Environmental health criteria 162. World Health Organisation. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>.

## LEGISLACIÓ

- Decisió 2455/2001/CE del Parlament Europeu i del Consell, de 20 de novembre de 2000, per la que s'aprova la llista de substàncies prioritàries en l'àmbit de la política d'aigües, i per la que es modifica la Directiva 2000/60/CE.
- Decret 130/2003 de la Generalitat de Catalunya, de 13 de maig, pel qual s'aprova el Reglament dels serveis públics de sanejament.
- Directiva 1998/83/CE del Consell de 3 de novembre de 1998, relativa a la qualitat de les aigües destinades al consum humà.
- Directiva 2000/60/E del Parlament Europeu i del Consell de 23 d'octubre de 2000, per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües.
- Directiva 2008/105/CE del Parlament Europeu i del Consell, del 16 de desembre de 2008, relativa a les normes de qualitat ambiental en l'àmbit de la política d'aigües, per la qual es modifiquen i deroguen les anteriors Directives 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y per la qual es modifica la Directiva 2000/60/CE.
- Llei 10/1998, de 21 d'abril, de Residus.
- Real Decret 9/2005, del 14 de gener de 2005, per la que s'estableix la relació d'activitats potencialment contaminants del sòl i els criteris i estàndards per a la declaració de sòls contaminats.
- Real Decreto 117/2003, de 31 de gener de 2003, sobre limitació d'emissions de compostos orgànics volàtils degudes a l'ús de dissolvents en determinades activitats.
- Real Decreto 140/2003, del 7 de febrer de 2003, pel qual s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà.
- Real Decreto 1514/2009, del 2 d'octubre de 2009, pel qual es regula la protecció de les aigües subterrànies contra la contaminació i el seu deteriorament.