

4. BIODEGRADACIÓ DE COMPOSTOS ORGÀNICS PER CONSORCIS METANOGÈNICS

4.1. Introducció

L'obtenció de metà com a producte final de la degradació de compostos orgànics és un procés que involucra diversos grups de bacteris, el darrer dels quals és el dels bacteris metanogènics.

De manera majoritària, l'estudi de la capacitat biodegradadora de consorcis metanogènics es duu a terme en vials tancats i a partir de cultius d'enriquiment inoculats directament del medi, sense fer subcultius. Així s'ha estudiat la degradació de l'esqualè i de l'1-hexadecè (Schink, 1985); la fermentació metanogènica de metantiol, i dimetilsulfur (Finster *et al*, 1992), la biodegradabilitat anaeròbia de surfactants (Salanitro *et al*, 1995); el potencial de biodegradació anaeròbia de diversos compostos orgànics (Madsen *et al*, 1995); la biodegradació anaeròbia del benzè (Kazumi *et al*, 1997), compost aromàtic d'estabilitat coneguda i pel que s'obtenen fases de latència de més de 400 dies; la toxicitat dels compostos organosulfurats al metabolisme microbià (Londry i Sufliata, 1998); la metanització de β -hexaclorociclohexà i de tetraclorur de carboni (Van Eekert *et al*, 1998 a i b); i de compostos sofrats heterocíclics (Kim *et al*, 1999).

La capacitat biodegradadora metanogènica anaeròbia pot fer-se amb cultius obtinguts a partir del medi, fent successius **enriquiments discontinus** amb medi fresc. D'aquesta manera s'ha observat la degradació d'àcids dicarboxílics (Matthies i Schink, 1993); de toluè (Chaudhuri i Wiesmann, 1996); de percloroetilè en concentracions elevades (Cabirol *et al*, 1998); la reducció d'etè a età (Koene-Cottaar i Schraa, 1998); i l'obtenció de metà a partir de n-hexadecà (Zengler *et al*, 1999). Cal esmentar però que en alguns treballs els successius enriquiments discontinus comportaren una disminució progressiva del metà obtingut (Finster *et al*, 1992). Un resum dels estudis esmentats, de biodegradació metanogènica en reactors discontinus pot veure's a la **taula 4.1**.

Taula 4.1. Resum de les referències consultades de biodegradació de compostos orgànics per consorcis metanogènics utilitzant cultius discontinus.

Font de carboni	Origen inòcul	Referències
Esqualè	Sediment negre anòxic de riu contaminat; fang depuradora	Schink, 1985
1-hexadecè	Sediment negre anòxic de riu contaminat; fang depuradora	Schink, 1985; Aquesta tesi
Metantol i dimetilsulfur	Sediment marí Sediment de maresmes	Finster <i>et al</i> 1992
Àcids dicarboxílics de cadena llarga (C ₆ – C ₁₀)	Fangs de tractament d'aigües residuals, sediments negres anòxics de diverses	Matthies <i>et al</i> , 1993
22 compostos orgànics	Fang depuradora, sediment marí, aigua de maresmes.	Madsen <i>et al</i> , 1995
Surfactants aniònics i no aniònics	Fang primari, secundari i de digestor anaeròbic de depuradora	Salanitro <i>et al</i> , 1995
Toluè	Excrements de boví	Chaudhuri i Wiesmann, 1995
Benzè	Aquífers contaminats per gasolina, petroli i abocadors de lixiviats	Kazumi <i>et al</i> , 1997
Percloroetilè	Fang digestor anaerobi de depuradora	Cabirol <i>et al</i> , 1998
Etè	Mescla de sediment de riu i fang de digestor anaerobi	Koene-Cottaar i Schraa, 1998
Compostos organosulfurats	Fang contaminat amb petroli	Londry i Sufliita, 1998
β-hexaclorociclohexà Tetraclorur de carboni	Fang d'un digestor anaerobic de depuradora d'aigües residuals en refinaria de sucre	Van Eeckert <i>et al</i> , 1998 a i b
Sulfolà, tiolà	Sòl (capa freàtica) i fang de digestor anaeròbic de tractament d'aigües residuals	Kim <i>et al</i> , 1999
1-hexadecantol	Fang de depuradora urbana	Aquesta tesi

L'obtenció de **cultius enriquits amb reactors continus** i la utilització d'aquests per a la **posterior inoculació en vials tancats** porta generalment a temps de degradació més curts que en cultius o enriquiments discontinus. Amb ells s'ha mostrat la degradació

metanogènica del lactat (McCartney i Oleszkiewicz, 1993) de la que s'han estudiat les condicions de competència amb els sulfatoredutors; la degradació d'àcids grassos volàtils (Aguilar *et al*, 1995); la interacció entre metanògens, sulfato-redutors i bacteris acetogènics en la degradació anaeròbia de benzoat (Li *et al*, 1996); la biodegradabilitat de compostos aromàtics amb substituents al N, d'alquilfenols i de tints nitrogenats (Razo-Flores *et al*, 1996, 1997); de butirat i valerat (James *et al*, 1998); de propilenglicol (Veltman *et al*, 1998); i l'efecte de compostos sofrats sobre la metanogènesi (Lin *et al*, 1999).

La **biodegradació** dels compostos estudiats es dedueix a partir de l'**augment de metà**, analitzant la composició del gas de la part superior del vial principalment per **cromatografia de gasos**, tot i que en la biodegradació anaeròbia de força compostos orgànics també es forma diòxid de carboni, aquest compost és més fàcilment absorbit pel medi que no el metà, pel que no resulta un bon indicador de la metanogènesi (Salanitro *et al*, 1995). Una altra manera de comprovar la **biodegradabilitat** metanogènica és fent **readdicció de substrat** als subcultius una vegada que s'ha estabilitzat el creixement bacterià, i mesurant si aquest torna a produir-se. Amb aquest mètode s'ha estudiat la biodegradació anaeròbia per consorcis metanogènics de toluè i o-xilè (Edwards i Grbic-Galic, 1994); i de compostos aromàtics heterocíclics amb oxigen, sofre o nitrogen (Dyreborg *et al*, 1997).

Pel que fa als **mecanismes de degradació** en condicions anaeròbies de compostos orgànics de cadena llarga, es creu que la degradació de l'acetat és el pas limitant en la seva descomposició (Smith i Mah, 1966 *in* Aguilar *et al*, 1995) ja que són oxidats a àcids i segueixen la β -degradació, produint per tant acetat que es trenca posteriorment donant metà i diòxid de carboni; així s'ha aconseguit la degradació completa d'1-hexadecè a metà i diòxid de carboni (Schink, 1988). En canvi el camí seguit per a la degradació anaeròbia de compostos benzenoids difereix del de la degradació aeròbia (Elder i Kelly, 1994). També s'ha observat la degradació de tetraclorur de carboni en fang autoclavat, el que s'ha interpretat com un procés químic de degradació (Van Eekert *et al*, 1998).

L'estudi dels **intermedis de degradació** s'ha fet amb diversos mètodes com la identificació per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (Zink i Lorber, 1995; Dzryga i Blotevogel, 1997); addició d'inhibidors (Rothfuss *et al*, 1993) cromatografia de gasos, cromatografia de capa fina, HPLC, ressonància magnètica nuclear i assajos d'activitat enzimàtica (Elder i Kelly, 1994). També hi ha un model de simulació teòric, anomenat <Methane> (Vasiliev *et al*, 1994; Vavilin *et al*, 1995) dels processos de degradació anaeròbia de matèria orgànica. No totes les molècules són igualment biodegradables, un estudi dels requeriments estructurals per a la biodegradació anaeròbia de compostos orgànics (Rorije, 1998) conclou que els fragments més importants lligats a la biodegradabilitat, o biòfors, són els tiols alifàtics i aromàtics, que no necessiten aclimatació.

En el **present treball** s'ha estudiat la **degradació d'1-hexadecè i n-hexadecantiol** amb cultius d'enriquiment de bacteris metanògens inoculats amb fang d'un digestor anaerobi de la depuradora de Manresa, fets en vials tancats. S'han escollit aquests dos compostos perquè, en tenir 16 àtoms de carboni tenen significació geoquímica ja que són abundants els compostos cadenes lineals de 16 i 18 àtoms de carboni en mostres geoquímiques de diverses procedències (de las Heras, 1991; Cabrera, 1999). La **biodegradabilitat** s'ha establert de **dues maneres**: a partir de la comparació de la producció de metà entre els cultius d'enriquiment i cultius blanc inoculats amb fang estèril, i amb la readdició de compost una vegada s'havia arribat a una proporció constant de metà. S'han dut a terme enriquiments, les condicions dels quals poden veure's a l'apartat 4.2.

Els **productes intermedis de degradació** s'han estudiat per extracció i posterior anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses del medi de cultiu en fase exponencial, i per anàlisi del gas obtingut a la part superior del vial en fase estacionària, pel mateix mètode esmentat a l'apartat 3.4 de la memòria.

4.2. MATERIAL I MÈTODES

4.2.1. Preparació dels cultius amb acetat

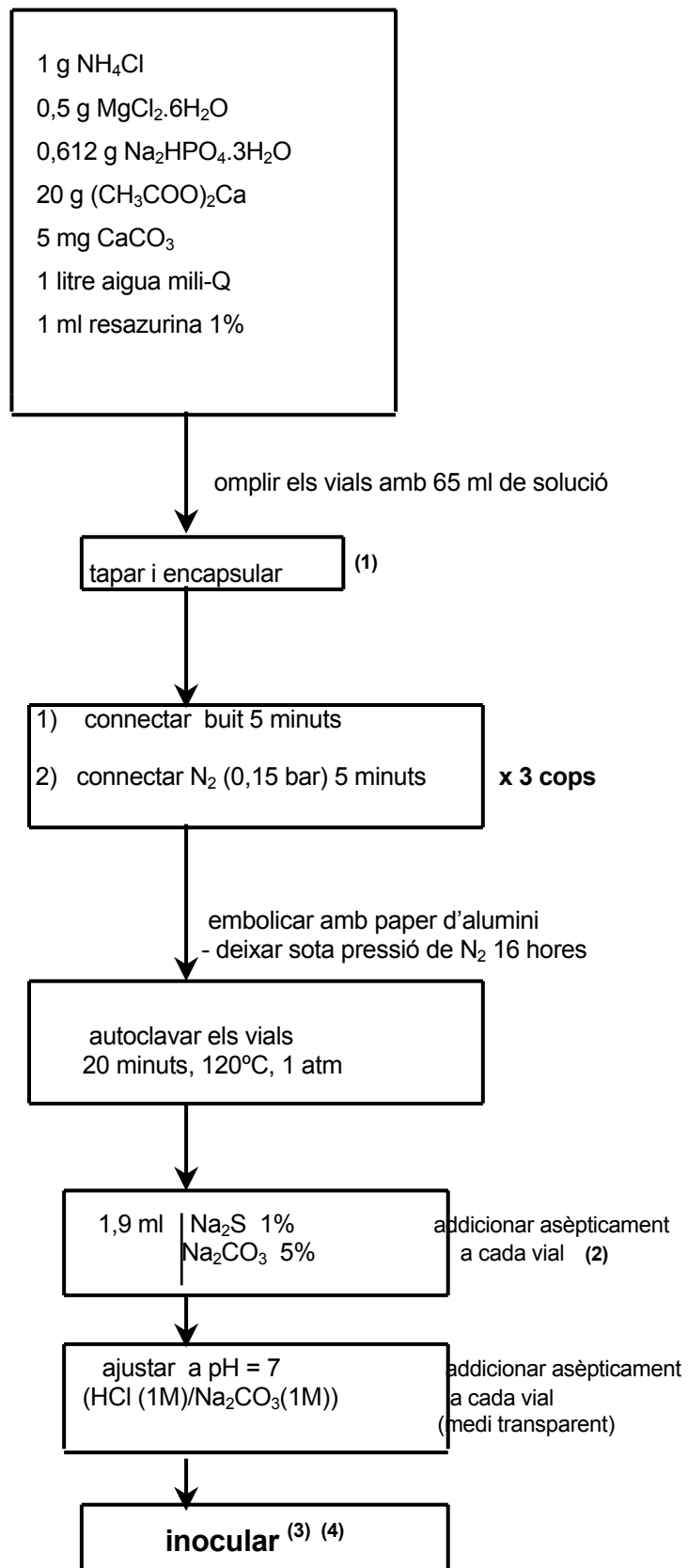
S'han preparat cultius amb acetat com a substrat, els anomenats genèricament cultius (Ac) i subcultius a partir d'ells anomenats Ac(s). (**Taules 4.2 i 4.3**)

L'objectiu dels **cultius d'enriquiment Ac** és obtenir **una concentració elevada de bacteris metanògens**. S'ha treballat amb 8 rèpliques anomenades des d'**Ac-1 fins a Ac-8**, inoculades amb fang del digestor anaerobi de la Depuradora d'Aigües Residuals de Manresa. Els cultius **Ac-B1 i Ac-B2** són **blancs**, inoculats amb fang esterilitzat amb autoclau (20 minuts, 1 atm, 120°C).

Els **subcultius Ac(s)** s'obtenen prenent com a **inòcul els cultius Ac**.

A la **figura 4.1** pot veure's el protocol de preparació dels cultius que utilitzen acetat com a substrat, que és molt similar a la descrita al capítol 3 de la present memòria. Per tal de fer més breu el temps de preparació dels medis, en el moment de deixar els vials sota atmosfera de nitrogen durant 16 hores, s'han connectat en paral·lel sis medis (**Figura 4.2**) mitjançant tubs en T de vidre i tubs de viton a una clau de tres vies connectada alhora a una trompa de buit i al corrent de nitrogen. S'ha escollit el viton per a fer les connexions per dos motius: un d'ells és que està lliure de ftalats, que interferirien a les anàlisis de les extraccions dels cultius per CG-MS; l'altre és que és més flexible que el tefló, també lliure de ftalats, i permet un bon ajustament de les juntures.

Com pot veure's a la imatge (**Figura 4.2**), els gasos entren i surten de cada cultiu mitjançant una agulla hipodèrmica connectada a una xeringa. Les xeringues s'han farcit amb cotó hidròfob estèril, que actua com a filtre. També s'ha treballat amb un cultiu, anomenat **B-F (Taula 4.2)** inoculat amb fang de depuradora, que no conté cap substrat afegit, aquest cultiu té l'objectiu de fer de blanc per detectar el possible metà generat pel propi fang.

Figura 4.1. Mètode de preparació dels cultius amb acetat.

⁽¹⁾A partir del tancament dels cultius, totes les addicions i extraccions són efectuades utilitzant xeringues farmacèutiques amb agulles hipodèrmiques. Després d'autoclavar són a més a més efectuades amb xeringues i entorn estèril, a la flama.

⁽²⁾La solució es prepara al moment d'utilitzar-la.

⁽³⁾ Els cultius Ac són inoculats amb 5 ml de fang procedent d'un digestor anaerobi de la Depuradora d'Aigües de Manresa, en condicions asèptiques.

⁽⁴⁾ Els cultius Ac(s) van ser inoculats amb 6 ml de cultiu d'enriquiment Ac (veure **Taula 4.3**).

4.2.2. Preparació dels cultius amb 1-hexadecà i n-hexadecantiol

El procediment de preparació pot veure's a la **figura 4.3**. Els substrats, 1-hexadecà o n-hexadecantiol, tots dos líquids i immiscibles amb l'aigua, són afegits just abans d'inocular. El motiu de fer-ho així és que la quantitat de líquid és molt petita i podria ser extreta involuntàriament en comprovar el pH dels medis. Per tal que el substrat es repartís per tot el volum, s'ha agitat vigorosament a mà (50 vegades) després d'inocular, procediment descrit anteriorment (Zengler, 1999), que permet que les petites gotes quedin adherides als grànuls del fang.

La quantitat de substrat que s'ha posat ha estat l'equivalent a 50 mg C/litre, quantitat descrita per Madsen *et al* (1995) en la degradació anaeròbia de l'hexadecà.

S'han realitzat diferents tipus de cultius, les característiques dels quals poden veure's a les **taules 4.2 i 4.3**:

- Cultius **inoculats** directament amb **fang de depuradora**, amb **n-hexadecantiol** com a font de carboni. Quatre rèpliques que s'han anomenat **TI-1, TI-2, TI-3 i TI-4**. S'ha fet un **blanc** amb fang estèril (20 minuts, 100°C, 1 atm), anomenat **TI-B**. Als cultius TI-2 i TI-3 s'ha efectuat una **readdició d'n-hexadecantiol** (5,2 µl/ cultiu) al cap de **55 dies** de l'inòcul, quan la quantitat de metà ja era constant.

- Cultius **inoculats** directament amb **fang de depuradora**, amb **1-hexadecà** com a font de carboni. S'han fet quatre rèpliques, anomenades **HD-1, HD-2, HD-3 i HD-4**. S'han fet **blancs** amb fang

estèril (20 minuts, 100°C, 1 atm), anomenats **HD-B1** i **HD-B2**. Als cultius HD-2 i HD-3 s'ha efectuat una **readdició d'1-hexadecè** (4,8 µl/cultiu) al cap de **55 dies** de l'inòcul, quan la quantitat de metà ja era constant.

- Cultius corresponents a un **segon enriquiment en n-hexadecantol**. S'han inoculat a partir de TI-4. S'han fet tres rèpliques: **TI(S)1, TI(S)2 i TI(S)3**.

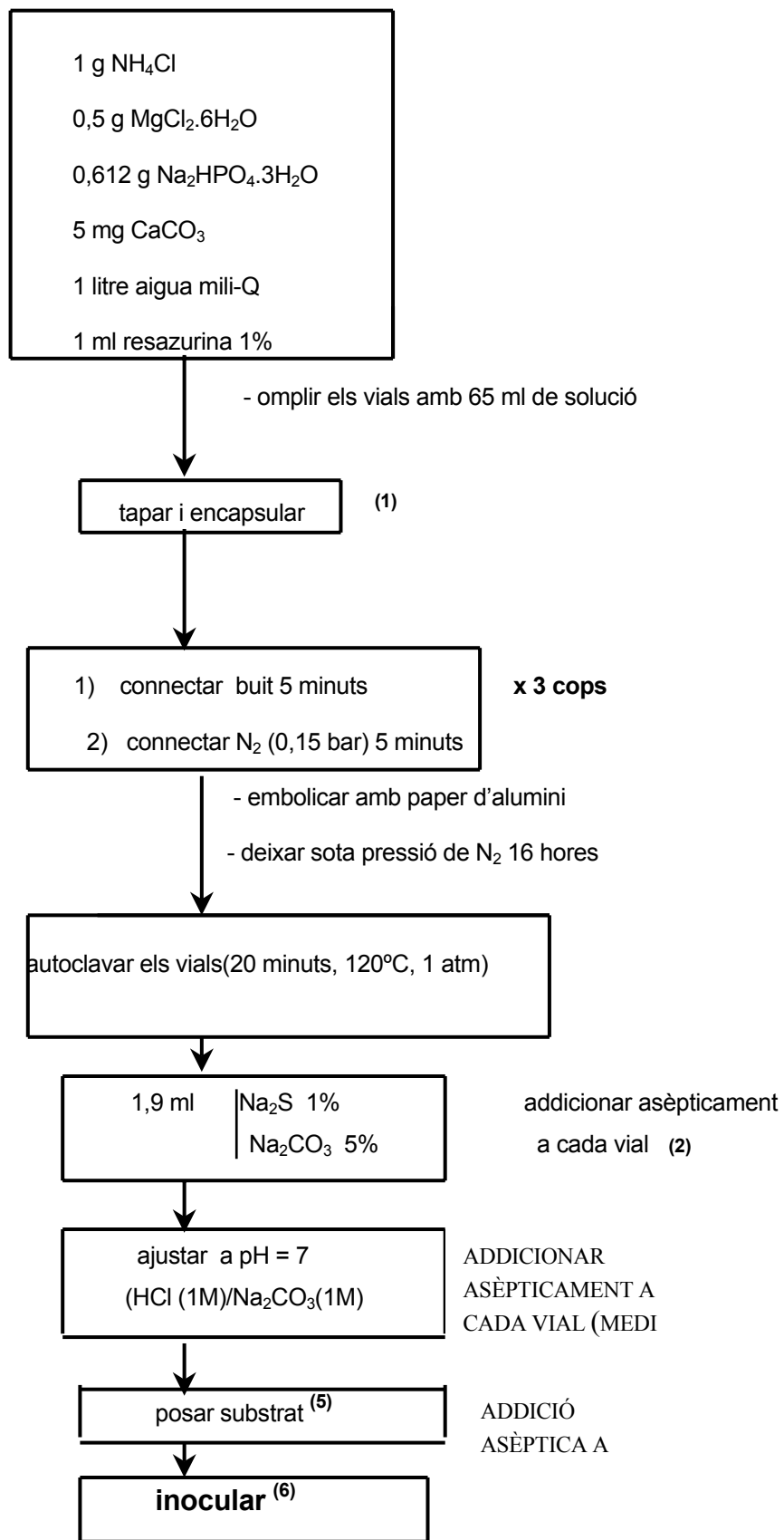
- Cultius inoculats a partir dels cultius d'enriquiment en acetat utilitzant n-hexadecantol com a font de carboni. S'anomenen **TI(Ac)-1 a TI(Ac)-6**.

- Cultius inoculats a partir del cultius d'enriquiment en acetat utilitzant 1-hexadecè com a font de carboni: sis cultius anomenats des d' **HD(E)-1 fins HD(E)-6**.

-S'ha fet un blanc, inoculat a partir dels cultius d'enriquiment en acetat, sense cap altre font de carboni, anomenat **B(Ac)**. per tal de detectar el metà possible a partir de l'inòcul als cultius **TI(Ac)** i **HD(Ac)**.



Figura 4.2 Muntatge per treure l'aire dels cultius i posar-los sota atmosfera de nitrogen.

Figura 4.3. Preparació dels cultius amb substrats 1-hexadecè o n-hexadecantíol

(5) 4,8 µl 1-hexadecè o 5,2 µl d'n-hexadecantíol, segons correspongui

(6) Veure **Taula 4.3**

Taula 4.2. Dades dels cultius corresponents a un primer enriquiment a partir de fang de depuradora.

<i>nom vial</i>	<i>substrat</i>	<i>pH</i>	<i>tipus cultiu</i>	<i>procedència inòcul</i>	<i>observacions</i>
AC-1	ACETAT CALCI	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	
AC-2	ACETAT CALCI	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	
AC-3	ACETAT CALCI	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	INÒCUL PER TI(AC)4,5,6
AC-4	ACETAT CALCI	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	INÒCUL PER B(AC)
AC-5	ACETAT CALCI	7,1	1ER ENRIQUIMENT	FANG	INÒCUL PER HD(AC)4,5,6 I PER AC(S) 3.4.5
AC-6	ACETAT CALCI	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	INÒCUL PER AC(S) 1,2; PER TI(AC)1.2.3 I PER HD(AC)1.2.3
AC-7	ACETAT CALCI	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	
AC-8	ACETAT CALCI	7,1	1ER ENRIQUIMENT	FANG	
AC-	ACETAT CALCI	7,0	BLANC	FANG	COMENÇA A PRODUIR METÀ ALS 42 DIES
AC-	ACETAT CALCI	7,0	BLANC	FANG	COMENÇA A PRODUIR METÀ ALS 49 DIES
B-F	----	7,0	BLANC	FANG	
TI-1	N-	7,1	1ER ENRIQUIMENT	FANG	
TI-2	n-hexadecantíol	7,1	1ER ENRIQUIMENT	fang depuradora	readdició substrat als 55 dies
TI-3	N-	7,0	1ER ENRIQUIMENT	fang depuradora	readdició substrat als 55 dies
TI-4	N-	7,0	1ER ENRIQUIMENT	fang depuradora	inòcul per Ti(S)1,2,3
TI-B	N-	7,1	blanc	fang esterilitzat	
HD-1	1-HEXADECÈ	7,1	1ER ENRIQUIMENT	FANG	
HD-2	1-HEXADECÈ	7,0	1ER ENRIQUIMENT	FANG	readdició substrat als 55 dies
HD-3	1-HEXADECÈ	7,0	1er enriquiment	fang depuradora	readdició substrat als 55 dies
HD-4	1-hexadecè	7,0	1er enriquiment	fang depuradora	inòcul per HD(S)1,2,3
HD-B1	1-hexadecè	7,0	blanc	fang esterilitzat	
HD-B2	1-hexadecè	7,0	blanc	fang esterilitzat	

Taula 4.3 Cultius corresponents a segons enriquiments o fets a partir de cultius preenriquits.

<i>nom vial</i>	<i>substrat</i>	<i>pH</i>	<i>procedència inòcul</i>	<i>observacions</i>
Ac(S)-1	acetat calci	7,0	Ac-6	
Ac(S)-2	acetat calci	7,0	Ac-6	
Ac(S)-3	acetat calci	7,0	Ac-5	
Ac(S)-4	acetat calci	7,0	Ac-5	
Ac(S)-5	acetat calci	7,0	Ac-5	
B(Ac)	-----	7,0	Ac-4	blanc
TI(Ac)-1	n-hexadecantol	7,2	Ac-6	
TI(Ac)-2	n-hexadecantol	7,1	Ac-6	
TI(Ac)-3	n-hexadecantol	7,0	Ac-6	
TI(Ac)-4	n-hexadecantol	7,0	Ac-3	
TI(Ac)-5	n-hexadecantol	7,2	Ac-3	
TI(Ac)-6	n-hexadecantol	7,0	Ac-3	
TI(S)-1	n-hexadecantol	7,0	TI-4	
TI(S)-2	n-hexadecantol	7,0	TI-4	
TI(S)-3	n-hexadecantol	7,0	TI-4	
HD(Ac)-1	1-hexadecè	7,0	Ac-6	
HD(Ac)-2	1-hexadecè	7,2	Ac-6	
HD(Ac)-3	1-hexadecè	7,0	Ac-6	
HD(Ac)-4	1-hexadecè	7,0	Ac-5	
HD(Ac)-5	1-hexadecè	7,0	Ac-5	
HD(Ac)-6	1-hexadecè	7,1	Ac-5	
HD(S)-1	1-hexadecè	7,0	HD-4	
HD(S)-2	1-hexadecè	7,0	HD-4	

4.2.3. Mesura del creixement bacterià

La mesura del creixement de bacteris metanògens s'ha fet mesurant la producció de metà i el seu augment al cap del vial, tal i com es descriu a l'apartat 3.3 de la memòria.

Les mesures s'han pres periòdicament des de l'inici dels cultius fins observar una proporció constant de metà al llarg del temps. Als cultius HD-2, HD-3, TI-2 i TI-3 s'ha efectuat una readdició de substrat al cap de 55 dies de l'inòcul, i el metà s'ha seguit mesurant fins que ha tornat a estabilitzar-se en el temps.

4.2.4. Extracció del cultiu i anàlisi per CG-EM

L'extracció dels cultius s'ha efectuat a la fase estacionària, segons procediments descrits anteriorment (Nishihara i Koga, 1987a) L'esquema del procés pot veure's a la **figura 4.4**. El blanc s'ha efectuat utilitzant 20 ml d'aigua destil.lada en lloc de cultiu.

En resum, 20 ml de cultiu s'han agitat a temperatura ambient durant 2 hores amb $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ (10:5:8,4 ml), seguidament la fase orgànica s'ha agitat en un bany d'ultrasons amb $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ (2,5:2,5 ml) durant 5 minuts, s'ha tret la fase aquosa amb una pipeta pasteur i s'ha repetit el procés amb la fase orgànica dues vegades més. Posteriorment s'han afegit $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2,4 ml) a la fase orgànica i s'ha tornat a agitar a l'ultrasons cinc minuts, també fent aquest darrer pas un total de tres vegades. L'extracte orgànic s'ha concentrat per rotavaporació i s'ha procedit a l'acetòlisi amb àcid acètic i anhídrid acètic (3ml:2ml) 16 hores a 160°C i a la posterior metanòlisi àcida amb 6,6 ml CH_3OH al 5% HCl (3 hores a 100°C). La recuperació dels lípids es fa afegint $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (5:5:4,5 ml) i agitant la mostra dins d'un bany d'ultrasons durant 5 minuts, treient la fase aquosa i repetint el procés dins un total de tres vegades. La mostra es torna a concentrar per rotavaporació i s'evapora a sequetat sota corrent de nitrogen, en cas de no ser analitzada al moment, les mostres s'han mantingut a - 20°C.

En el moment abans d'injectar les mostres al cromatògraf, s'ha procedit a la derivatització amb N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) de Fluka Chemie AG, per tal d'obtenir els trimetilsililèters.

Les mostres derivatitzades han estat analitzades per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (Fisons MD-800). A continuació es detallen les característiques de la columna capil·lar emprada.

Columna capil·lar estàndard

Fase estacionària: DB-5MS

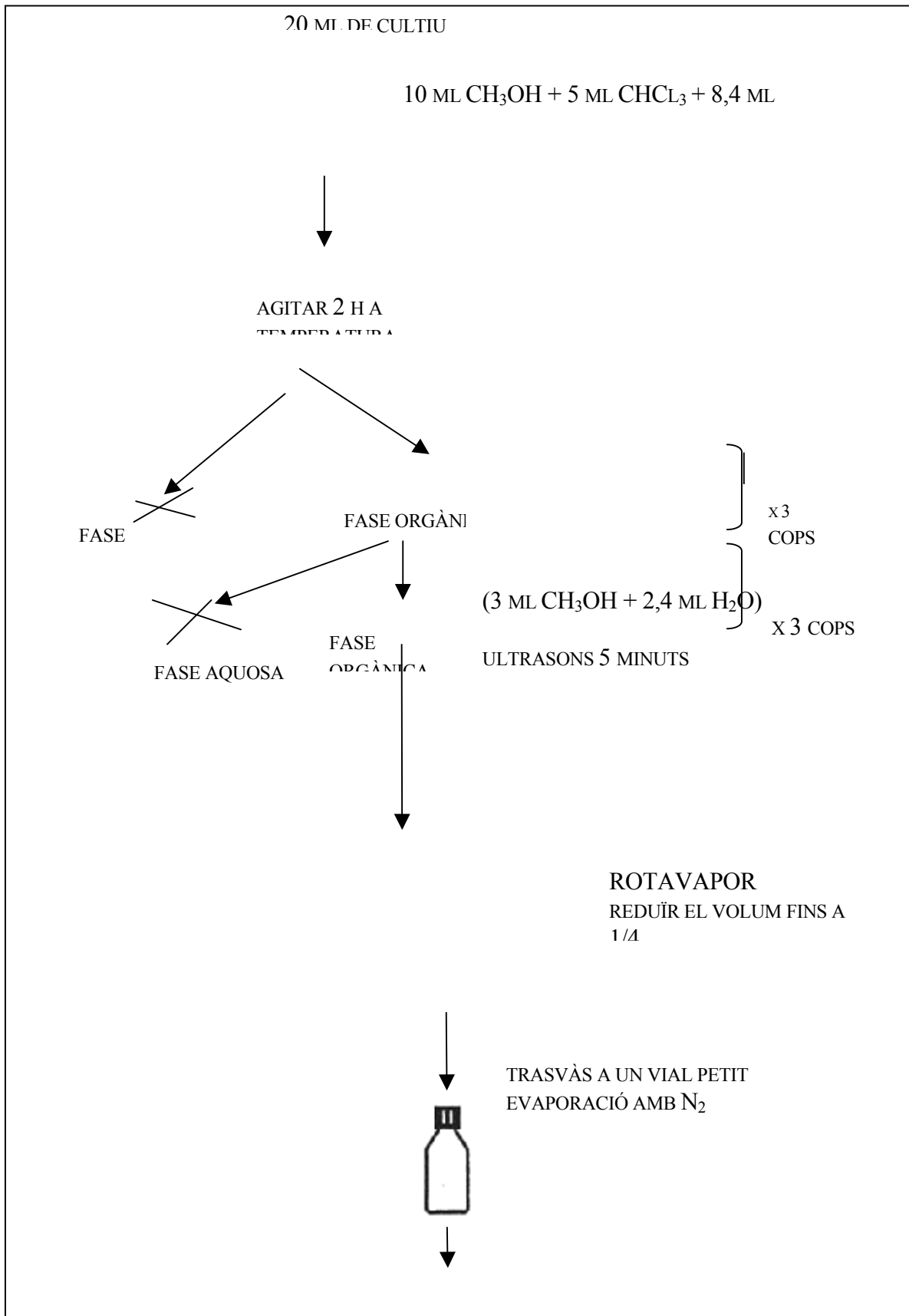
Espessor del recobriment: 0,1-15 μm .

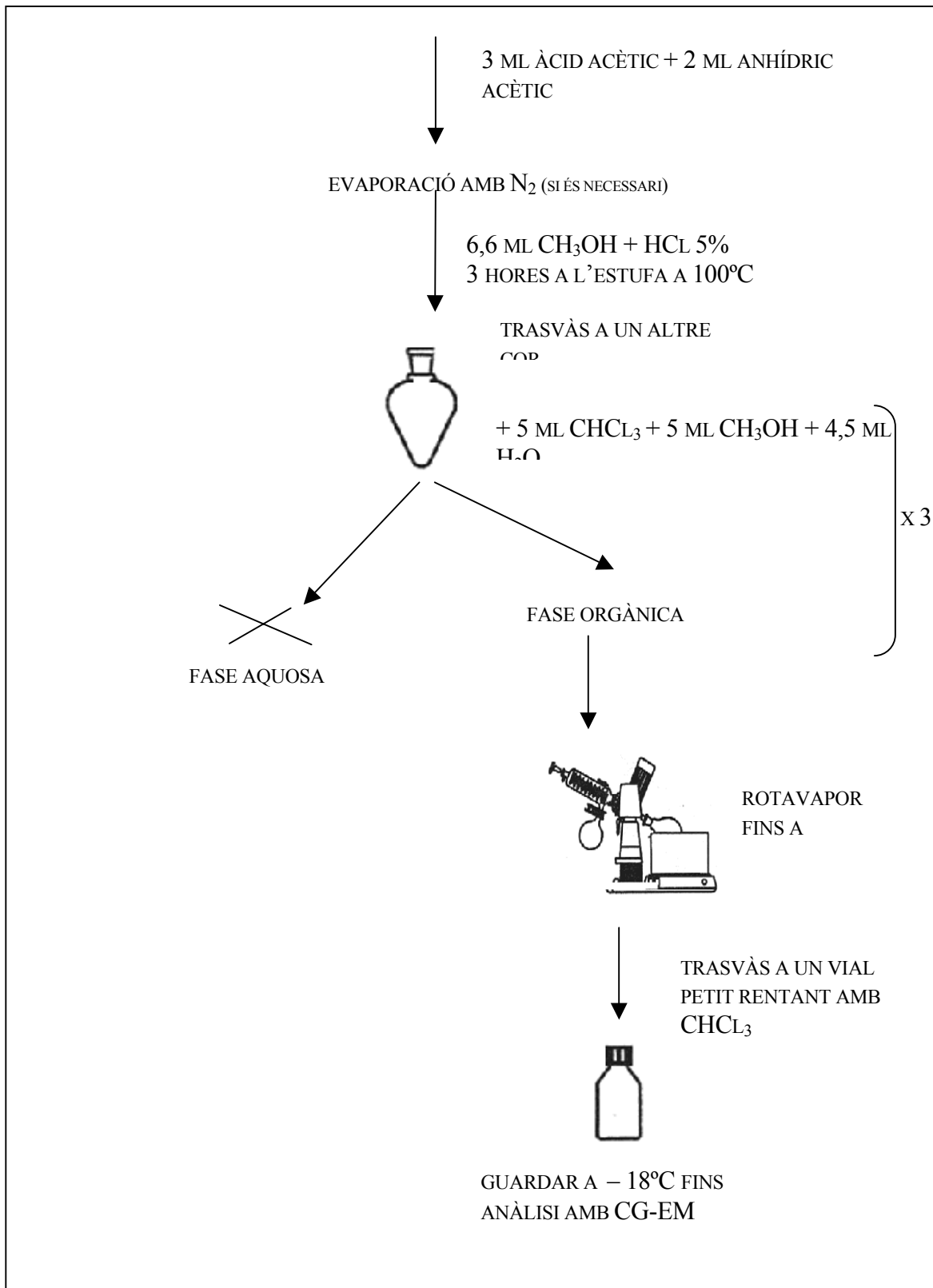
Longitud de la columna: 30 m

Diàmetre interior: 0,25 mm.

Pressió del gas portador (Heli): 2 ml/min.

La temperatura inicial del forn ha estat 60°C; després s'ha escalfat amb un primer pendent de 15°C/min fins assolir la temperatura de 150°C; en aquest moment la velocitat de canvi de temperatura ha estat de 4°C/min fins els 310 °C, que s'han mantingut 45 minuts. S'han començat a enregistrar els resultats a partir dels 6 minuts per tal de no registrar els dissolvents. Les masses detectades van de 50 a 800 Daltons.

Figura 4.4. Esquema de l'extracció dels cultius per a l'anàlisi per CG-EM



4.3 RESULTATS

4.3.1. CREIXEMENT DELS CULTIUS QUE UTILITZEN ACETAT

A la taula 4.4 es mostra la variació al llarg del temps del percentatge de metà a la part superior dels vials per a cadascun dels cultius d'enriquiment en acetat. A la taula 4.5 es mostren els resultats pels cultius inoculats amb fang estèril (Ac-9 a Ac-10) i amb fang fresc però sense substrat (B-F). Com que els cultius són posats inicialment en atmosfera de nitrogen, es considera inicialment un 100% de nitrogen i un 0% de metà. La proporció de metà va augmentant a mesura que es dona l'activitat bacteriana com pot veure's a les **taules 4.4 i 4.5**. A les **figures 4.5 i 4.6** es representen gràficament aquests resultats.

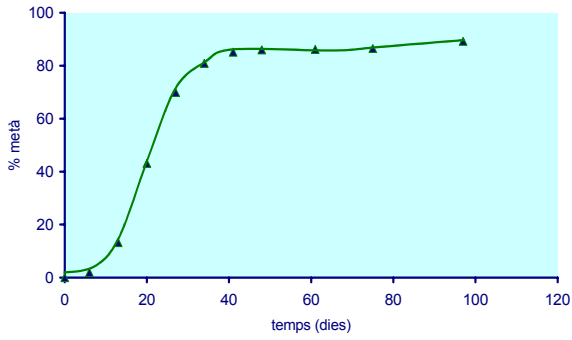
TAULA 4.4. PROPORCIÓ DE METÀ AL LLARG DEL TEMPS DELS CULTIUS AC

TEMPS	AC-1	AC-2	AC-3	AC-4	AC-5	AC-6	AC-7	AC-8	PROMIG AC1-
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1,9	1,8	9,6	6,6	23	19,2	14,4	20	12,1
13	13,2	12,6	29,4	29,6	53,7	46,5	42,1	41,5	33,6
20	43,1	41,5	61,2	62,1	77,5	57,5	55,3	61,2	57,4
27	69,9	72,7	73	71,3	80,8	69,8	70,9	75,1	72,9
34	80,9	74,9	81,7		86,1		79	76	79,8
41	85,1	82,3	83,2		84,8				83,9
48	86,3	78,8	83,8		86,4				83,8
61	86,1	78,3	85,3						83,2
75	86,5	83,9	87,5						86,0
97	89,2	85,3	89,2						87,9

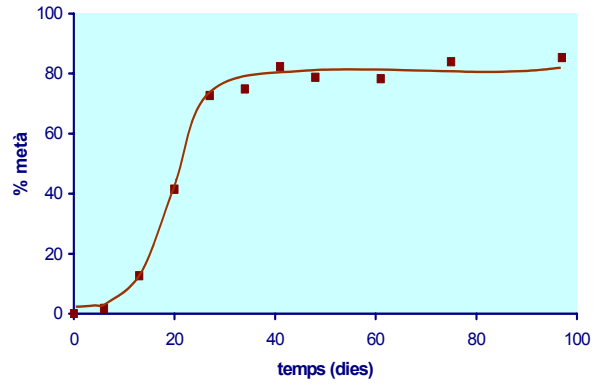
TAULA 4.5. PROPORCIÓ DE METÀ AL LLARG DEL TEMPS DELS CULTIUS BLANC AMB ACETAT: AC-B1 I AC-B2 S'HAN INOCULAT AMB FANG ESTERILITZAT I B-F AMB FANG FRESC SENSE SUBSTRAT.

TEMPS (DIES)	AC-B1	AC-B2	B-F
0	0	0	0
7	0	0	0
14	0	0	0
21	1,8	0	0
28	0	0	0
35	0	0	0
42	22	0,6	0
68	54,1	24,4	0
75	73,4	65,6	0
97	73,3	74,5	0

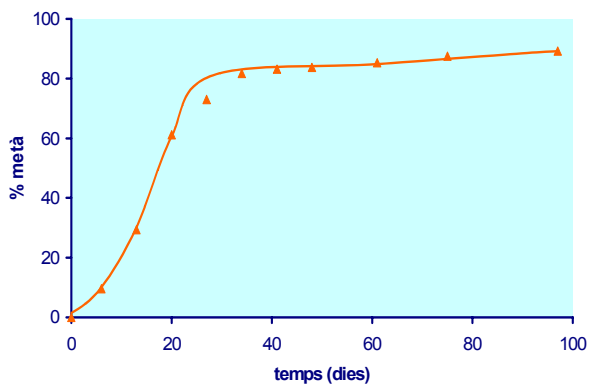
a) creixement Ac-1



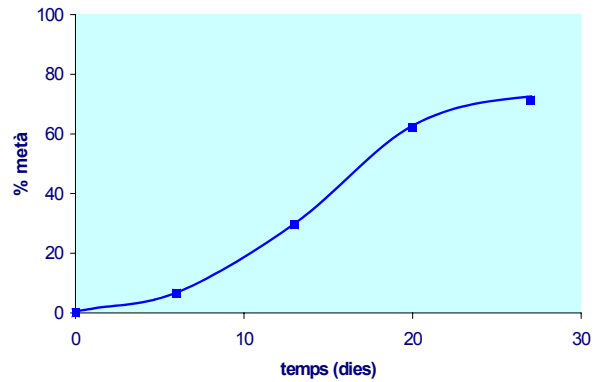
b) creixement Ac-2



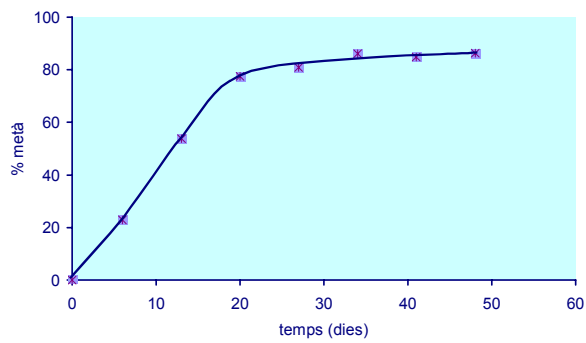
c) creixement Ac-3



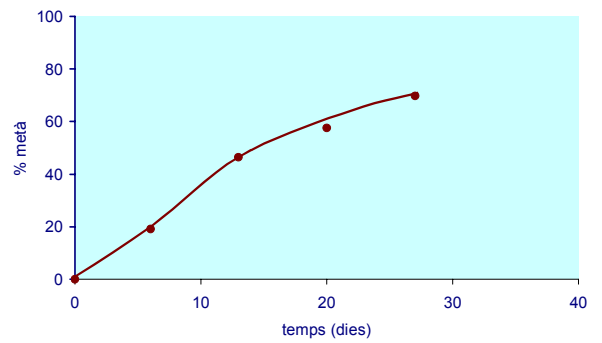
d) creixement Ac-4

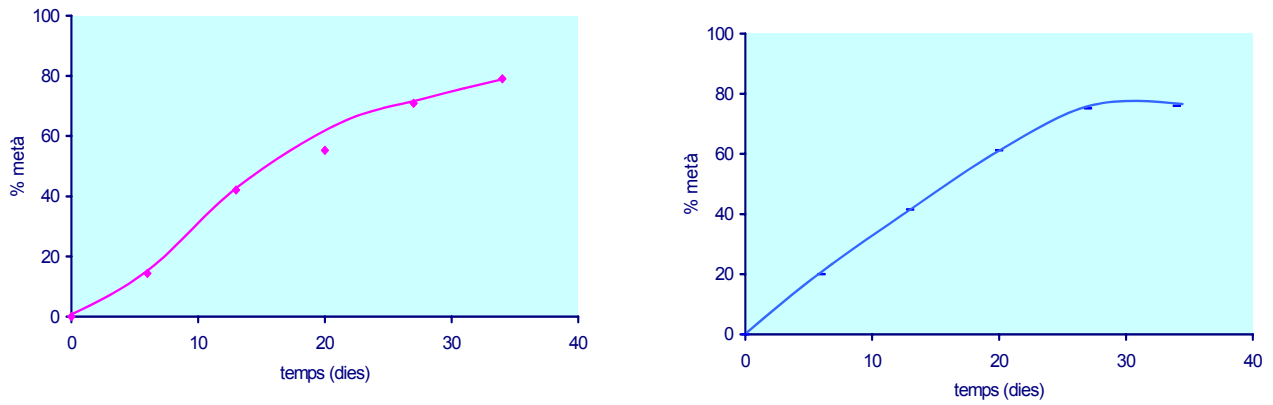


e) creixement Ac-5



f) creixement Ac-6





j) creixement promig cultius Ac 1-8

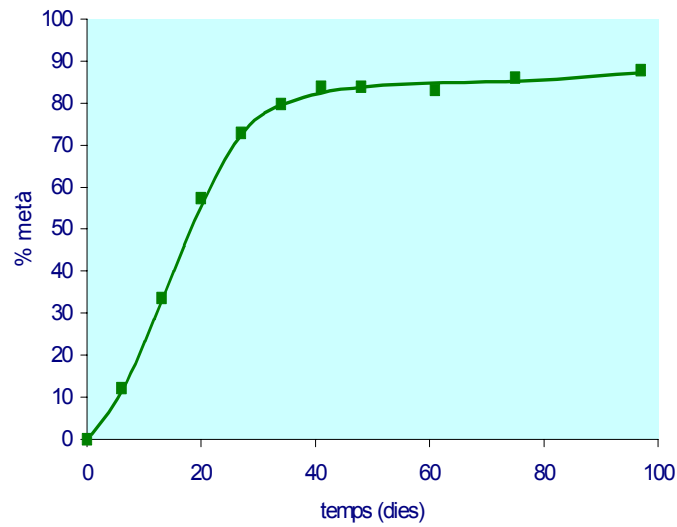


FIGURA 4.5. CREIXEMENT DELS CULTIUS EN ACETAT

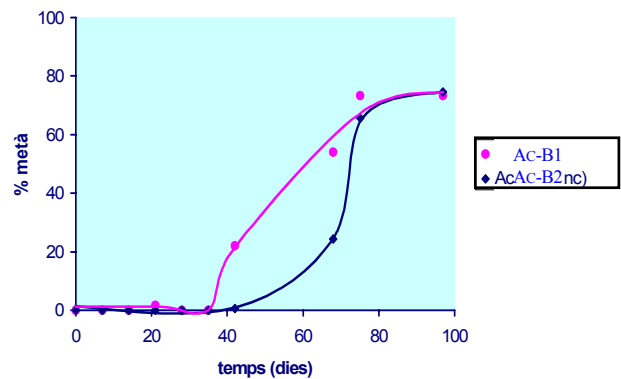


Figura 4.6. Evolució de cultius inoculats amb fang esterilitzat, amb substrat acetat.

- Als cultius Ac-7 i Ac-8 el tap del vial va sortir per sobrepressió del metà al cap de 34 dies de l'inòcul, inutilitzant-se així els cultius. Per evitar aquest fet en altres cultius es va procedir a treure'n la sobrepressió amb una agulla hipodèrmica estèril (Veltman *et al*, 1998; Zengler *et al*, 1999). Als cultius Ac-3, Ac-4, Ac-5 i Ac-6 van deixar de prendre's mesures al moment que van ser utilitzats com a inòculs per altres cultius.

4.3.1.1. CULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT QUE UTILITZEN ACETAT COM A SUBSTRAT

Aquests cultius han estat anomenats d'Ac(S)-1 a Ac(S)-5 (**taula 4.3**). En ells no s'ha detectat producció de metà, com pot veure's a la **taula 4.6**. El cultiu B(Ac) és un blanc, que no conté acetat i que s'ha inoculat a partir d'un cultiu preenriquit amb acetat per tal de detectar el metà base dels cultius preenriquits amb acetat.

Taula 4.6. Proporció de metà al llarg del temps en cultius preenriquits en acetat que utilitzen acetat com a substrat.

temps (dies)	Ac(S)-1	Ac(S)-2	Ac(S)-3	Ac(S)-4	Ac(S)-5	B(Ac)
0	0	0	0	0	0	0
6			0	0		
10	0	0				0
13			0	0		
17	0	0				0
20			0	0		
24	0	0				0
37	0	0				0
44	0	0				0
48			0	0		
72	0	0				0

4.3.2. CREIXEMENT DELS CULTIUS QUE DEGRADEN N-HEXADECANTIOL

La degradació d'n-hexadecantíol per part de consorcis metanogènics s'ha establert a partir de la producció de metà en cultius que utilitzen aquest compost com a únic substrat carbonat. Les condicions i procedència dels inòculs poden veure's a les **taules 4.2 i 4.3**.

4.3.2.1 Cultius inoculats a partir del medi que utilitzen n-hexadecantíol com a substrat

S'ha treballat amb quatre rèpliques, anomenades TI-1, TI-2, TI-3 i TI-4. Totes elles inoculades amb fang de digestor anaerobi de la depuradora de Manresa. La rèplica TI-1 s'ha utilitzat com a control, a les TI-2 i TI-3 s'ha efectuat una readdició d'n-hexadecantíol (5,2 µl n-hexadecantíol/cultiu) al cap de 55 dies d'inocular-les, quan la producció de metà s'havia estabilitzat. La rèplica TI-4 ha servit d'inòcul per als cultius preenriquits en n-hexadecantíol; després d'utilitzar-la no es prenen més dades del seu creixement. El cultiu TI-B és un blanc inoculat amb fang autoclavat (20 minuts, 1atm, 120°C).

A la **taula 4.7**, hi ha els percentatges de metà al llarg del temps generats per aquests cultius. Aquests resultats es representen gràficament a la **figura 4.7**.

Amb la lògica excepció dels blancs, TI-B i B-F, (**taules 4.2 i 4.7**) tots aquests cultius han generat metà, que ha pogut detectar-se ja a la primera mesura, al cap de 7 dies de l'inòcul.

Taula 4.7. Percentatges de metà al llarg del temps en cultius inoculats a partir de fang de digester anaerobi de depuradora que utilitzen com a substrat carbonat n-hexadecantiol.

temps (dies)	TI-1(control)	TI-2	TI-3	TI-4	TI-B	promig (TI-2+TI-3)/2
0	0	0	0	0	0	0
7	4,6	4,7	3,3	3,3	0	4,7
14	8,2	10,5	9,1	8,3	0	9,4
21	9,7	10,8	9,9	10,3	0	10,4
28	11,1	12,9	12,4		0	12,7
35	14,2	16,6	10,3		0	13,5
42	14	16,2	14,4		0	15,3
49	15,8	16,4	16,5		0	16,5
56	14,6	19,2	15,9		0	17,6
62	17,3	18,3	17,6		0	18
69	17,2	19,7	18,4		0	19,1
76	17,2	23,6	23		0	23,3
98	17	23	22,7		0	22,9

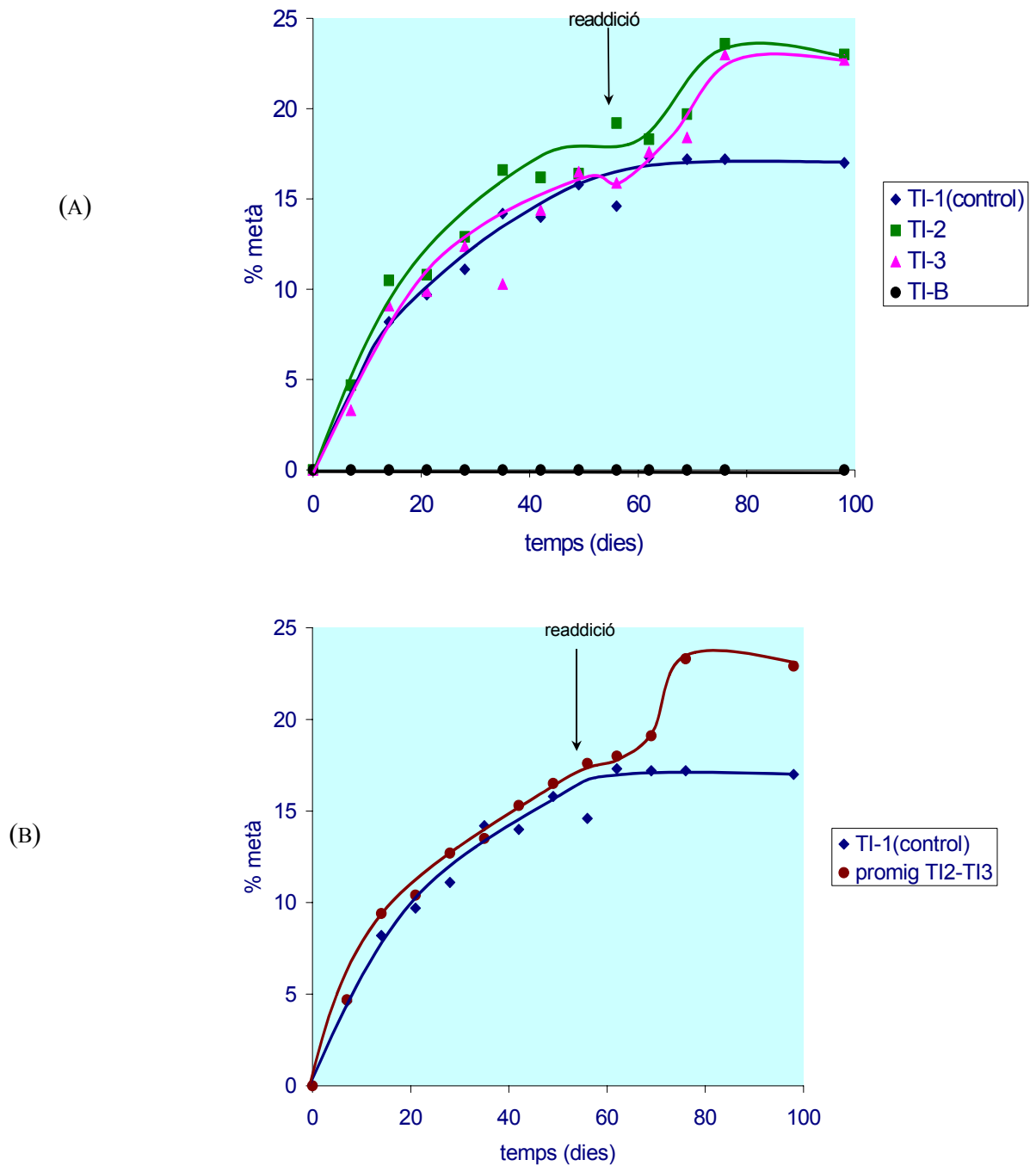


FIGURA 4.7. DEGRADACIÓ D'N-HEXADECANTIOL EN CULTIUS INOCULATS AMB FANG DE DIGESTOR ANAEROBI DE DEPURADORA. A LES RÈPLIQUES TI-2 I TI-3 S'HA EFECTUAT READDICIÓ DE SUBSTRAT (5,2 μ L N-HEXADECANTIOL/CULTIU) AL CAP DE 55 DIES DE L'INÒCUL. TI-5 S'HA INOCULAT AMB FANG AUTOCLAVAT.
 (a) PERCENTATGE DE METÀ A CADA CULTIU
 (b) COMPARACIÓ ENTRE EL PERCENTATGE DE METÀ AL CULTIU CONTROL I AL PROMIG DELS CULTIUS ON S'HA FET READDICIÓ.

4.3.2.2 CULTIUS INOCULATS A PARTIR DE CULTIUS D'ENRIQUIMENT QUE UTILITZEN N-HEXADECANTIOL COM A SUBSTRAT.

ELS CULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT (TI(AC)- 1, TI(AC)-2 I TI(AC)-3) HAN ARRIBAT A PRODUÏR ENTRE UN 6 I UN 7% DE METÀ AL LLARG DE L'EXPERIMENT; MENTRE QUE ELS CULTIUS PREENRIQUITS AMB N-HEXADECANTIOL (TI(S)-1 I TI(S)-2) NO HAN PRODUÏT GENS DE METÀ. ELS RESULTATS PODEN VEURE'S A LA **TAULA 4.8** I LA **FIGURA 4.8**

TAULA 4.8. PERCENTATGES DE METÀ MESURATS PER A CULTIUS AMB N-HEXADECANTIOL PREENRIQUITS AMB ACETAT (TI(AC)-1, TI(AC)-2 I TI(AC)-3) I PREENRIQUITS AMB N-HEXADECANTIOL (TI(S)-1 I TI(S)-2).

TEMPS	TI(AC)-1	TI(AC)-2	TI(AC)-3	TI(S)-	TI(S)-
0	0	0	0	0	0
7				0	0
11	0	0,3	0,6		
14				0	0
18	0,5	1	0,7		
21				0	0
26	2,1	5,4	5,5		
27				0	0
31	3,3	6,2	6,7		
34				0	0
38	6,2	6,2	6,1		
41				0	0
45	6	6,8	6,6		
69				0	0
73	6	6,8	6,7		

4.3.3. CREIXEMENT DELS CULTIUS QUE DEGRADEN 1-HEXADECÈ

La degradació d'hexadecè per part de bacteris metanògens s'ha establert a partir de la producció de metà en cultius que utilitzen aquest compost com a únic substrat carbonat. Les condicions i procedències dels inòculs poden veure's a les **taules 4.2 i 4.3**.

4.3.3.1. CULTIUS INOCULATS A PARTIR DEL MEDI QUE UTILITZEN 1-HEXADECÈ COM A SUBSTRAT

S'HA TREBALLAT AMB QUATRE RÈPLIQUES, ANOMENADES HD-1, HD-2, HD-3 i HD-4. TOTES ELLES INOCULADES AMB FANG DE DIGESTOR ANAEROBI DE LA DEPURADORA DE MANRESA. LA RÈPLICA HD-1 S'HA UTILITZAT COM A CONTROL, A LES HD-2 I HD-3 S'HA EFECTUAT UNA READDICIÓ D'1-HEXADECÈ (4,8 µL HEXADECÈ/CULTIU) AL CAP DE 55 DIES D'INOCULAR-LES, QUAN LA PRODUCCIÓ DE METÀ S'HAVIA ESTABILITZAT. LA RÈPLICA HD-4 HA SERVIT D'INÒCUL PER ALS CULTIUS PREENRIQUITS EN 1-HEXADECÈ; DESPRÉS D'UTILITZAR-LA COM A INÒCUL NO ES PRENEN MES DADES DEL SEU CREIXEMENT. EL CULTIU HD-B1 ÉS UN BLANC INOCULAT AMB FANG AUTOCLAVAT (20 MINUTS, 1 ATM, 120°C).

A LA **TAULA 4.9** HI HA ELS PERCENTATGES DE METÀ AL LLARG DEL TEMPS GENERATS PER AQUESTS CULTIUS. AQUESTS RESULTATS ES REPRESENTEN GRÀFICAMENT AL GRÀFICS **4.9**.

TOTS AQUESTS CULTIUS HAN GENERAT METÀ A EXCEPCIÓ DELS BLANCS, HD-B1, HD-B2 I B-F (**TAULA 4.2**), SI BÉ EN DUES RÈPLIQUES VA DETECTAR-SE METÀ AL CAP D'UNA

SETMANA DE L'INOCULACIÓ, EN LES ALTRES DUES NO VA COMENÇAR A DETECTAR-SE FINS ALS 14 DIES DESPRÉS DE L'INÒCUL.

TAULA 4.9. PERCENTATGES DE METÀ AL LLARG DEL TEMPS PELS CULTIUS INOCULATS DEL MEDI QUE UTILITZEN 1-HEXADECÈ COM A SUBSTRAT.⁽¹⁾

TEMPS (DIES)	HD-1 (CONTROL)	HD-2	HD-3	HD-4	HD-B1 (BLANC)	PROMIG (HD-2+HD-3)/2
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	5,2	8,5	0	2,6
14	7,2	10,3	6,5	10,3	0	8,4
21	12,8	15,7	8,8	13,6	0	12,3
28	13,1	16,6	15,1		0	15,9
35	14,5	15,9	12,9		0	14,4
42	15,2	15,2	13		0	14,1
49	16,4	18,6	17,3		0	18
56	16,7	16,6	17,9		0	17,3
62	16,9	20,4	19,3		0	19,9
69	17,2	20,8	19,8		0	20,3
76	16,6	23,3	21		0	22,2
98	17,9	23	22,1		0	22,6

⁽¹⁾ A LES RÈPLIQUES HD-2 I HD-3 S'HA FET UNA READDICIÓ D'1-HEXADECÈ (4,8 µL/CULTIU) ALS 55 DIES DE L'INÒCUL.

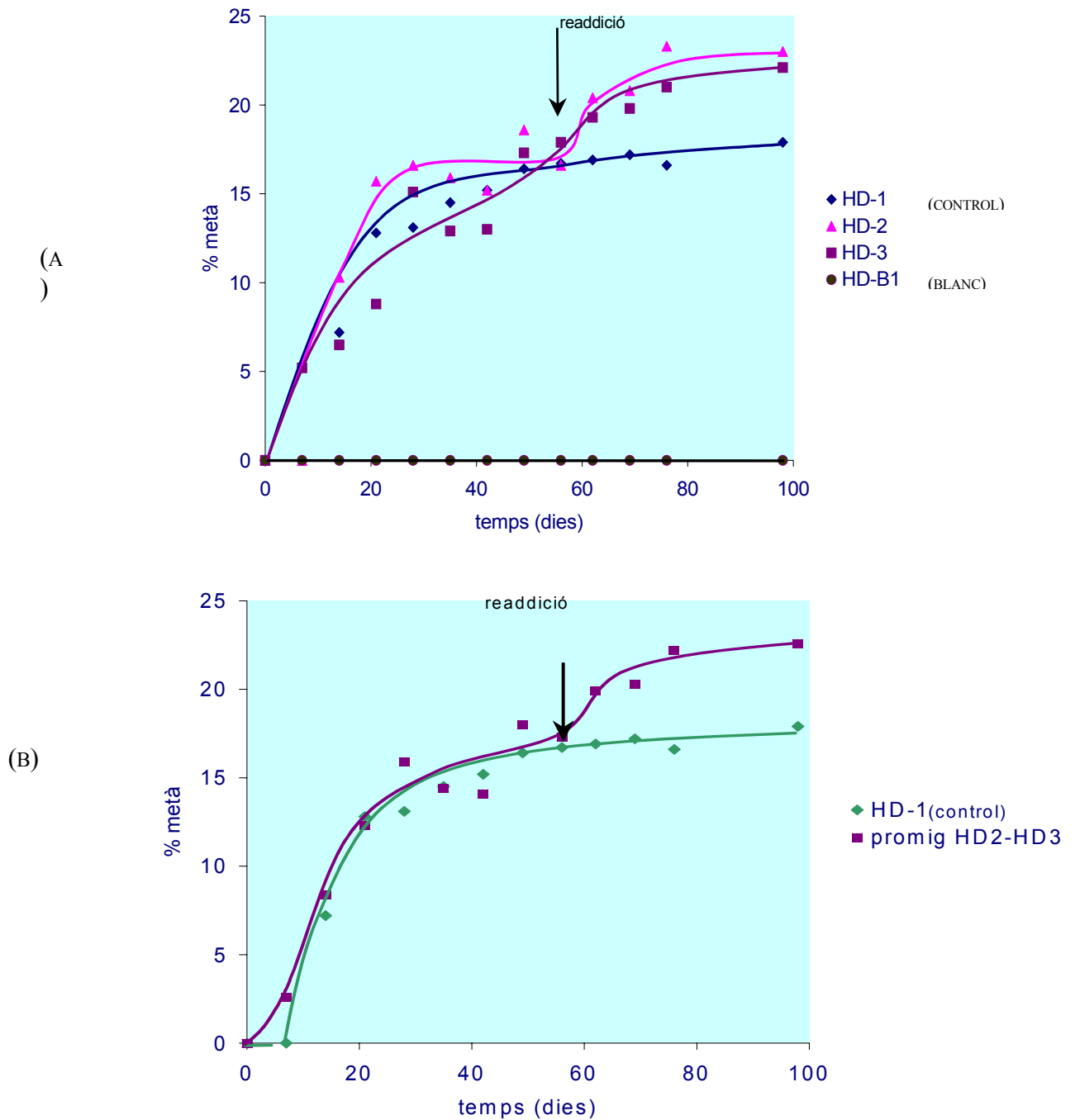


FIGURA 4.9. DEGRADACIÓ D'1-HEXADECÈ EN CULTIUS INOCULATS AMB FANG DE DIGESTOR ANAEROBI DE DEPURADORA. A LES RÈPLIQUES HD-2 I HD-3 S'HA EFECTUAT READDICIÓ DE SUBSTRAT ($4,8 \mu\text{L}$ 1-HEXADECÈ/CULTIU) AL CAP DE 55 DIES. HD-B1 S'HA INOCULAT AMB FANG AUTOCLAVAT.

(a) vials per separat.

(B) COMPARACIÓ DEL PROMIG DELS CULTIUS ALS QUALS S'HA EFECTUAT READDICIÓ AMB EL CONTROL.

4.3.3.2. CULTIUS INOCULATS A PARTIR DE CULTIUS PREENRIQUITS QUE UTILITZEN 1-HEXADECÈ COM A SUBSTRAT.

Aquests cultius han produït molt poc o gens metà, no arribant en cap cas a l' 1% al final de l'experiment (73 dies).

LES DUES RÈPLIQUES INOCULADES A PARTIR DE CULTIUS PREENRIQUITS AMB 1-HEXADECÈ, HD(S)-1 i HD(S)-2 NO HAN PRODUÏT GENS DE METÀ. DE LES TRES RÈPLIQUES, HD(AC)-1, HD(AC)-2 i HD(AC)-3, INOCULADES A PARTIR DE CULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT, UNA D'ELLES NO HA PRODUÏT METÀ I A LES ALTRES DUES S'HA COMENÇAT A DETECTAR ALS 18 DIES DE L'INOCULACIÓ EN QUANTITATS MOLT PETITES. A LA **TAULA 4.10** ES MOSTREN ELS RESULTATS DE LES PROPORCIONS DE METÀ AL LLARG DEL TEMPS PER AQUESTS CULTIUS, QUE ES REPRESENTEN GRÀFICAMENT A LA **FIGURA 4.10**.

TAULA 4.10. PROPORCIÓ DE METÀ A LA PART SUPERIOR DEL VIAL PER CULTIUS AMB 1-HEXADECÈ INOCULATS A PARTIR DE CULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT (CULTIUS HD(AC)) O AMB 1-HEXADECÈ (CULTIUS HD(S)).

TEMPS	HD(AC)	HD(AC)-2	HD(AC)-3	HD(S)-1	HD(S)-2
0	0	0	0	0	0
7				0	0
11	0	0	0		0
14				0	0
18	0	0,6	0,5		
21				0	0
26	0	0,6	0,8		
27				0	0
30				0	0
31	0	0,6	0,6		
34				0	0
38	0	0,6	0,6		
41				0	0
45	0	0,6	0,5		
47					
49				0	0

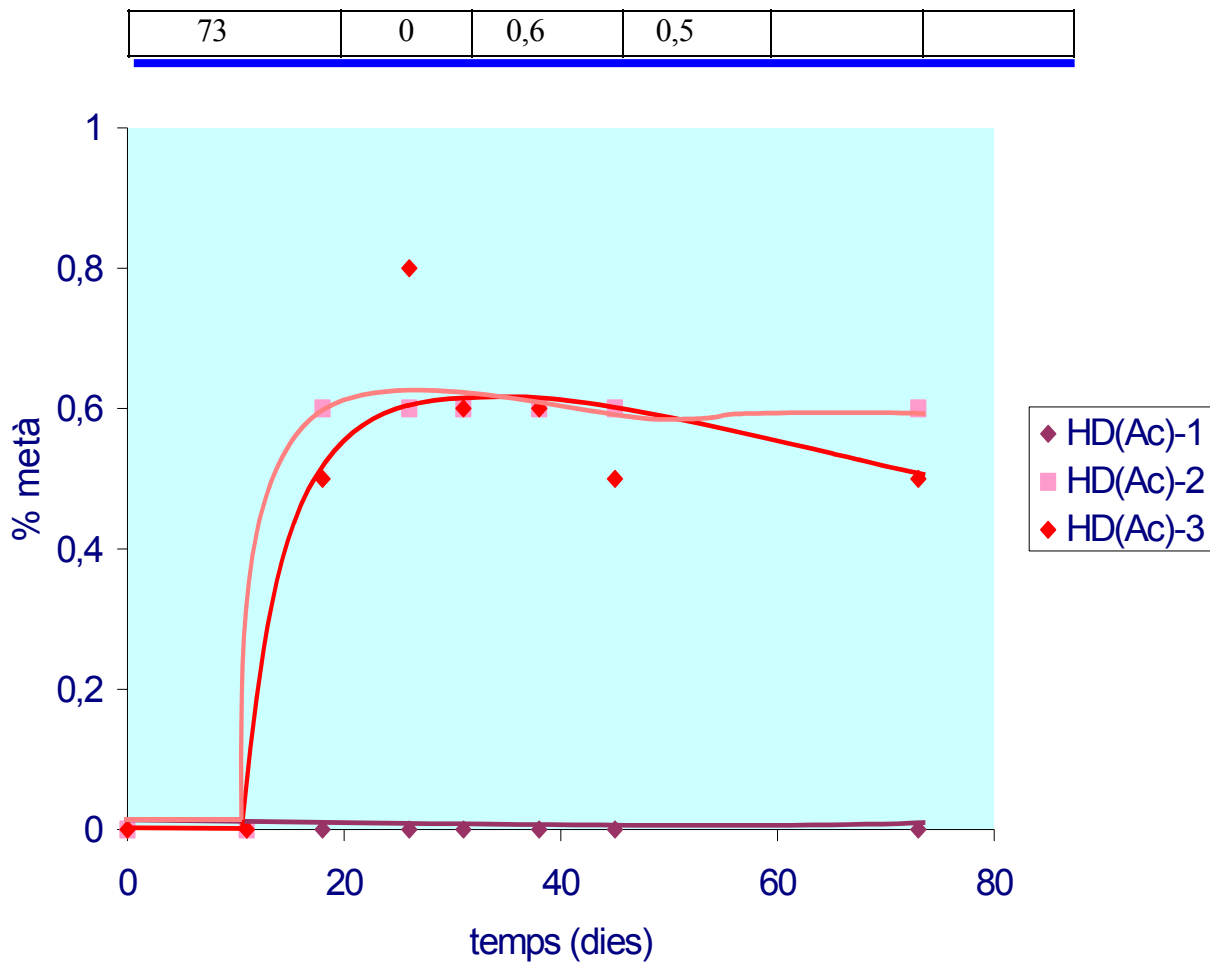


FIGURA 4.10. PRODUCCIÓ DE METÀ PER CULTIUS QUE UTILITZEN 1-HEXADECÈ COM A FONT DE CARBONI INOCULATS A PARTIR DE CULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT.

4.3.4. BIODEGRADACIÓ DE L'HEXADECÈ I L-N-HEXADECANTIOL

LA BIODEGRADACIÓ DELS SUBSTRATS S'HA **SEGUIT** A PARTIR DE **LES ANÀLISIS DELS GASOS DE LA PART SUPERIOR DEL VIAL** (COM A L'APARTAT 3.4) I PER **EXTRACCIÓ DEL CULTIU** I POSTERIOR ANÀLISI PER CROMATOGRÀFIA DE GASOS ACOBLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSES.

4.3.4.1. COMPOSICIÓ DELS GASOS A LA PART SUPERIOR DEL VIAL

4.3.4.1.1. Cultius que han crescut amb n-hexadecantiol

Els cromatogrames obtinguts en analitzar els gasos dels cultius que han crescut amb n-hexadecantiol es mostren a la **figura 4.11**. El cromatograma inferior correspon a un cultiu blanc inoculat amb fang estèril. Pot observar-se que els cultius presenten dos pics amb un temps de retenció pròxim o un sol pic, més ample, tot i que no han donat informació sobre la biodegradació dels substrats com es presenta a continuació. Al cultiu blanc només es forma un pic.

Els espectres de masses dels gasos de la part superior del vial dels cultius que han crescut amb n-hexadecantiol (**figura 4.12**) presenten els pics corresponents a metà ($m/z=16,15,14$), diòxid de carboni ($m/z=44$), productes de la biodegradació metanogènica; també s'hi observen els pics corresponents al nitrogen ($m/z=28$) del medi i a l'heli ($m/z=4$), el gas portador. El cultiu que presenta un segon pic, el seu espectre mostra que és de vapor d'aigua ($m/z=18$) degut a la vaporització del medi, mentre que no es detecta cap compost volàtil de sofre com l'àcid sulfhídric, el metantiol, el dimetilsulfur o d'altres. El pic del cultiu blanc presenta dues masses prominents, la del nitrogen ($m/z =28$) i la de l'heli ($m/z=4$).

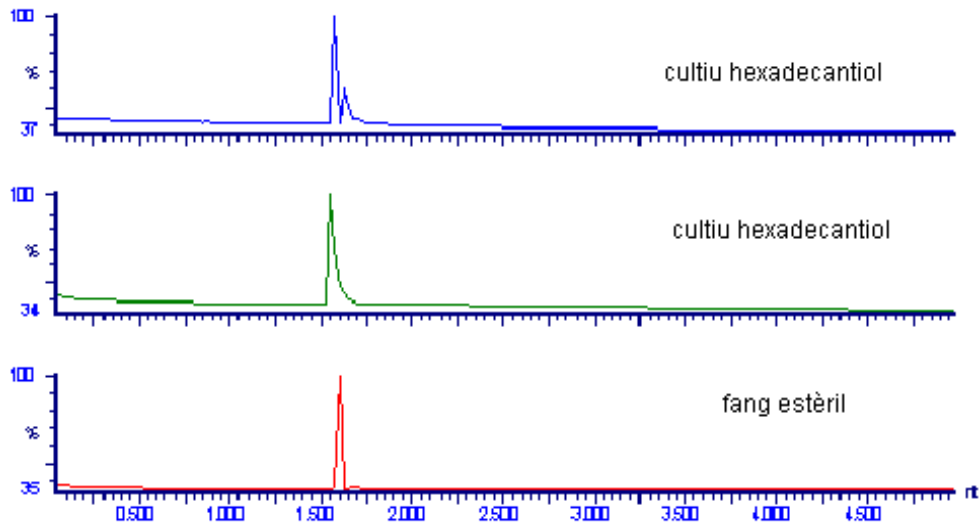


Figura 4.11. Cromatograma dels gasos de la part superior del vial de cultius que han crescut degradant n-hexadecantiol. El cromatograma de la part inferior de la figura correspon a un cultiu blanc, inoculat amb fang estèril.

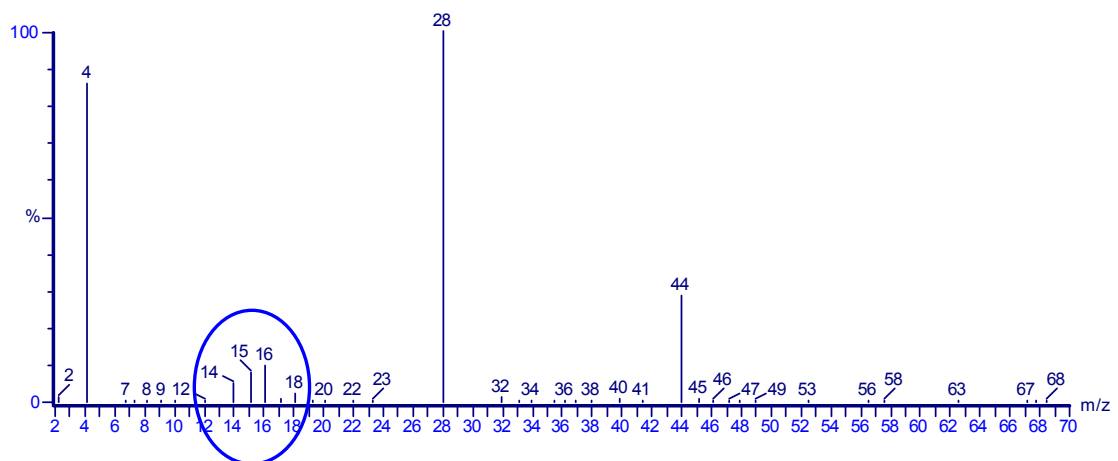


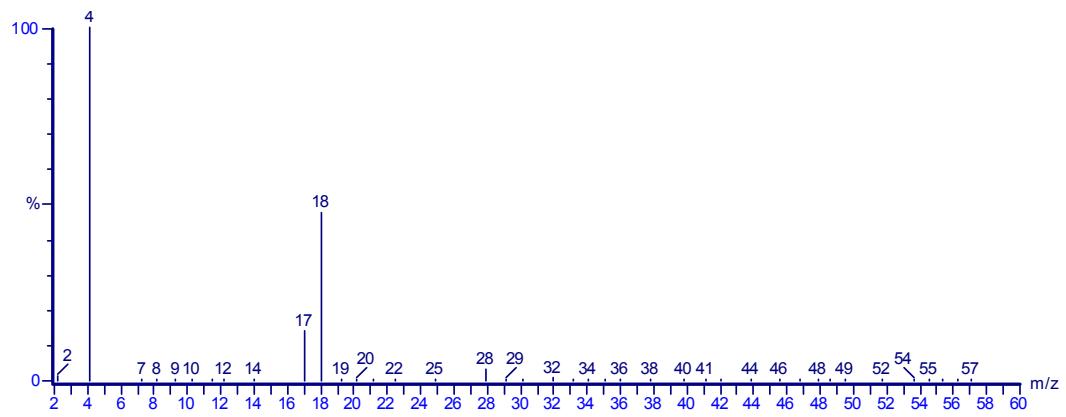
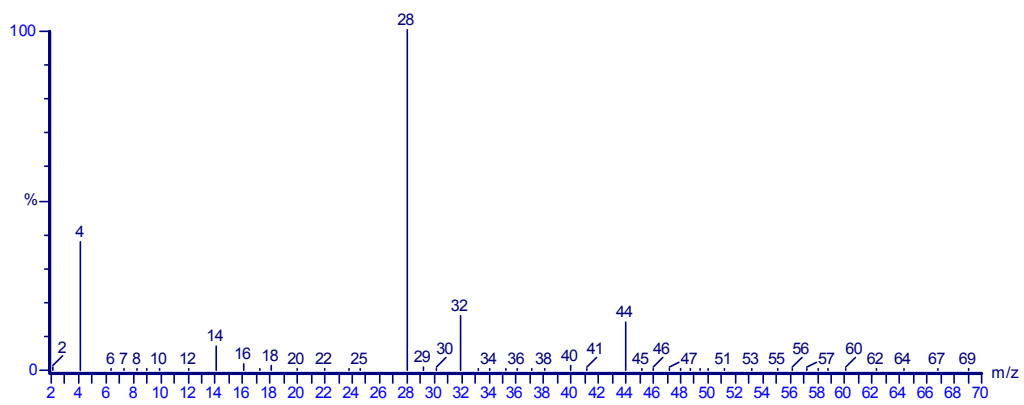
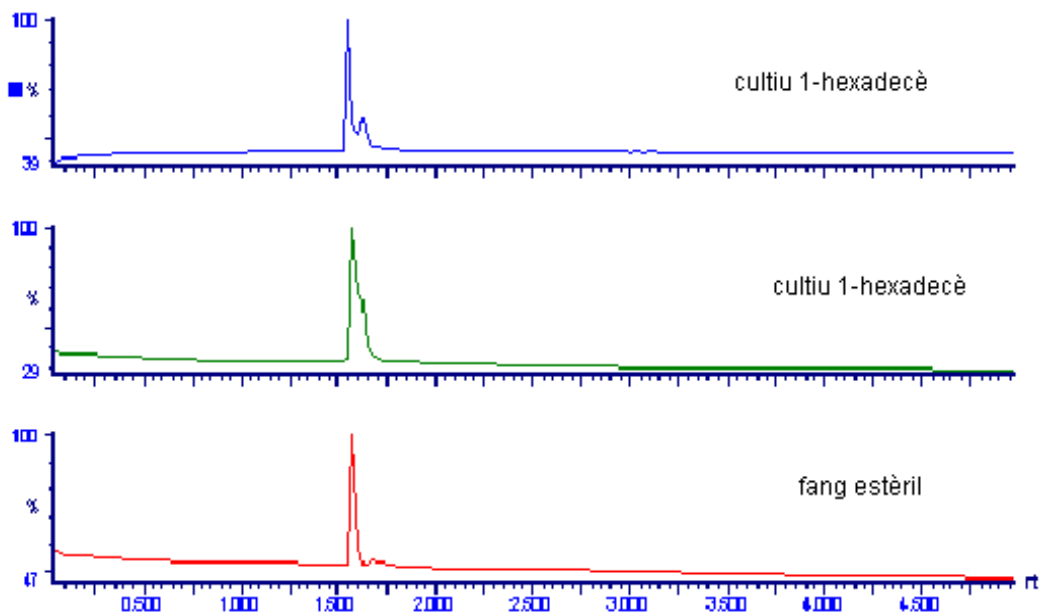
Figura 4.12 (a)**(b)****(c)**

FIGURA 4.12. ESPECTRES DE MASSES DELS GASOS DE LA PART SUPERIOR DEL VIAL DE CULTIUS AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL INOCULATS A PARTIR DE FANG DE DEPURADORA (FIGURA 4.11)

- (a) espectre del primer pic d'un cultiu (els fragments encerclats corresponen al metà).
 (B) ESPECTRE DEL SEGON PIC D'UN CULTIU ON HI PREDOMINA L'HELI SOBRE L'AIGUA.
 (C) ESPECTRE DEL BLANC INOCULAT AMB FANG ESTÈRIL I SUBSTRAT ON HI PREDOMINA EL NITROGEN.

4.3.4.1.2. CULTIUS QUE HAN CRESCUT AMB 1-HEXADECÈ

A la figura 4.13 es mostren els cromatogrames obtinguts de l'anàlisi dels gasos de la part superior del vial pels cultius que han crescut en hexadecè (taula 4.2). Pot veure's que mentre que el blanc presenta un pic ben definit, els cultius mostren dos



pics o un pic ample. A continuació es mostren els espectres de masses corresponents.

FIGURA 4.13. CROMATOGRAMES DELS GASOS DE LA PART SUPERIOR DEL VIAL DELS CULTIUS CRESCUTS DEGRADANT 1-HEXADECÈ. EL CROMATOGRAMA DE LA PART SUPERIOR DE LA FIGURA CORRESPON A UN CULTIU BLANC, INOCULAT AMB FANG ESTERILITZAT.

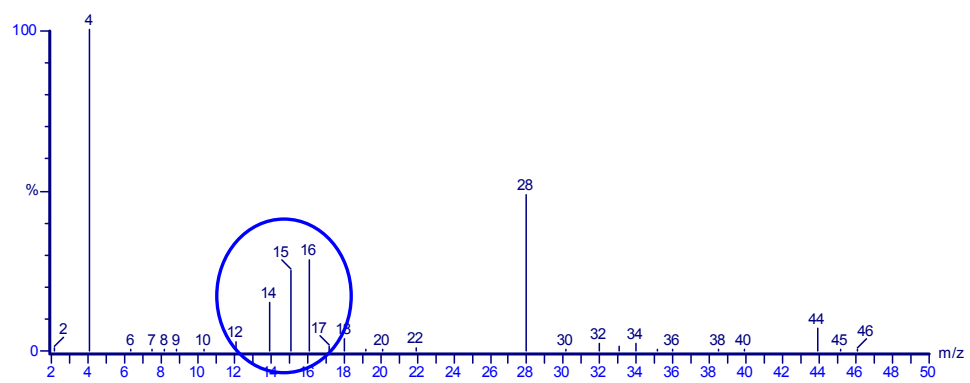


Figura 4.14. Espectre de masses corresponent als gasos de la part superior del vial dels cultius que han crescut en 1-hexadecà (primer pic). Els fragments encerclats corresponen al metà.

A la **figura 4.14** els pics corresponen als gasos diòxid de carboni ($m/z=44$) i metà ($m/z=16,15,14$) formats degut a la biodegradació bacteriana; nitrogen ($m/z=28$) de l'atmosfera inert; vapor d'aigua ($m/z=18$) del medi aquós i heli ($m/z=4$), el gas portador.

En les mostres que presenten un segon pic, l'espectre de masses d'aquest es pot veure a la **figura 4.15**. Els pics corresponen a vapor d'aigua ($m/z = 18$), provinent del medi de cultiu, i al gas portador, heli ($m/z = 4$).

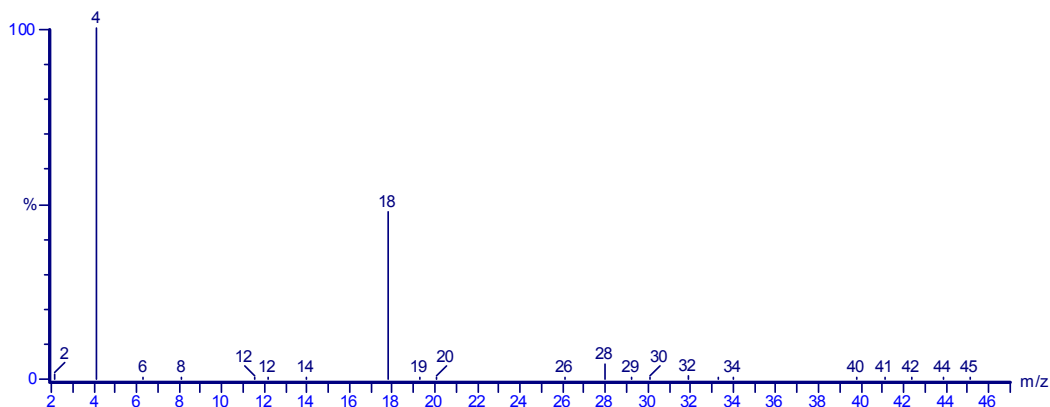


FIGURA 4.15. ESPECTRE DE MASSES CORRESPONENT ALS GASOS DE LA PART SUPERIOR DEL VIAL EN CULTIUS QUE HAN CRESCUT DEGRADANT 1-HEXADECÀ (SEGON PIC).

L'espectre dels gasos del cultiu blanc, inoculat amb fang prèviament esterilitzat, pot veure's a la **figura 4.16**. En ell s'aprecien els pics corresponents al nitrogen ($m/z = 28$) del medi inert, i al gas portador, heli ($m/z=4$)

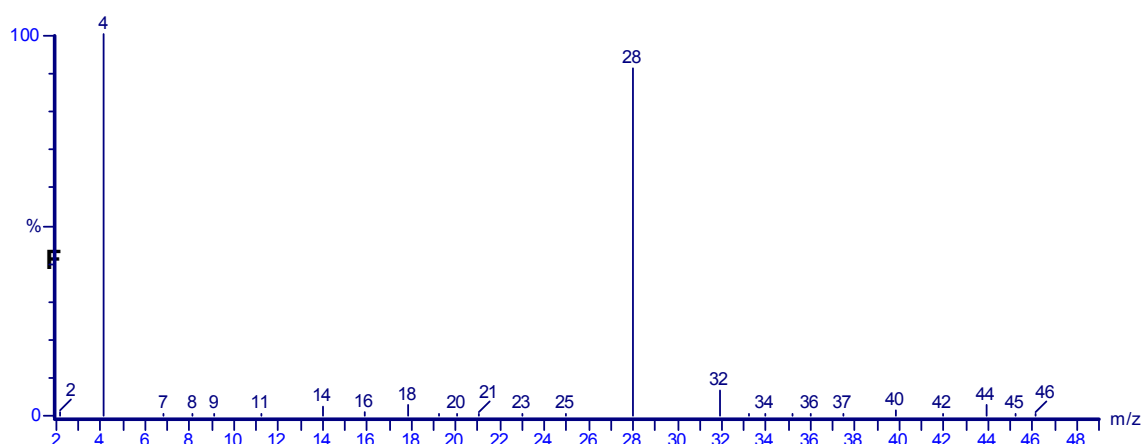


Figura 4.16. Espectre de masses dels gasos de la part superior del vial en un cultiu blanc, amb fang esterilitzat, amb 1-hexadecà com a font de carboni.

4.3.4.2. EXTRACCIÓ I ANÀLISI PER CG-EM

4.3.4.2.1. CULTIUS QUE DEGRADEN 1-HEXADECANTIOL

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts en les extraccions (**figura 4.4**). S'han efectuat extraccions en fang sense substrat (B-F, **taula 4.2**) en la fase estacionària d'un cultiu crescut degradant n-hexadecantol (TI-4, **taula 4.2**) i en una mostra matriu (TI-M) que s'ha preparat com un cultiu, però que s'ha extret un dia després d'inocular-lo (**taula 4.11**). L'extracció del cultiu que ha crescut degradant 1-hexadecantol mostra un perfil cromatogràfic (**figura 4.19**) similar al de la mostra matriu amb fang i 1-hexadecantol però sense creixement bacterià i al del blanc amb fang sense substrat, tot i que al cultiu i a la mostra matriu destaquen dos pics diferents del del fang: un d'ells s'ha identificat com a 1-hexadecantol i l'altre com el dímer dihexadecildisulfur.

NOM	TIPUS CULTIU
B-F	BLANC AMB FANG NO ESTÈRIL (SENSE SUBSTRAT)
TI-M	EFFECTE MARIU N-HEXADECANTIOL
TI-4	CULTIU CRESCUT AMB N-HEXADECANTIOL (TI-4 A LA TAULA 4.7)

TAULA 4.11. RELACIÓ ENTRE ELS NOMS DE LES MOSTRES I LES SEVES CARACTERÍSTIQUES PER A L'N-HEXADECANTIOL I EL BLANC AMB FANG.

A LA FIGURA 4.17 ES MOSTREN ELS FRAGMENTOGRAMES PER AL PIC MOLECULAR DE L'N-HEXADECANTIOL $m/z = 258$ PER A AQUESTES TRES MOSTRES. POT OBSERVAR-SE QUE SURT UN PIC PROMINENT TANT AL CULTIU COM A L'EFECTE MATRIU. L'ESPECTRE DE MASSES DEL MATEIX (FIGURA 4.18) S'HA IDENTIFICAT COM A N-HEXADECANTIOL PER LA PRESENCIA DELS PICS $m/z = 258$ (M^+) I $m/z 224$ ($C_{16}H_{32}$) CORRESPONENT A $M^+ - SH_2$, TRENCAMENT CARACTERÍSTIC EN ELS TIOLS, AIXÍ COM DELS FRAGMENTS DERIVATS DE LES PÈRDUES SUCCESSIVES DE CH_2 DEL $C_{16}H_{32}$.

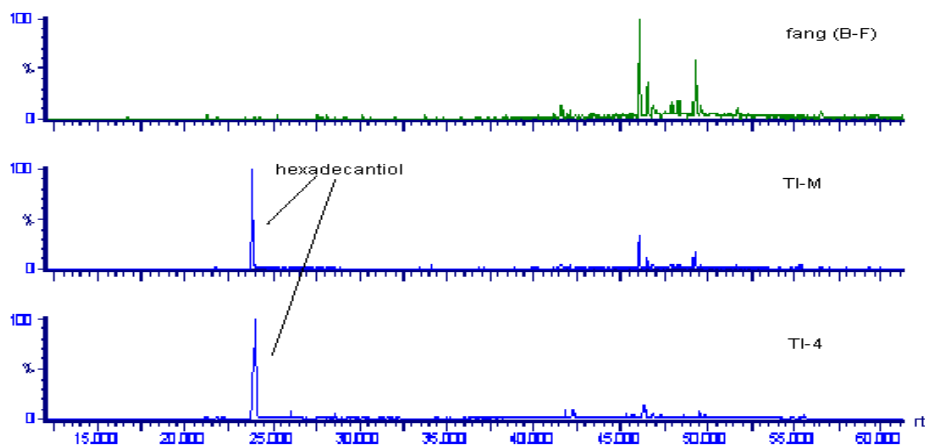


FIGURA 4.17. CROMATOGRAMA DE MASSES $m/z = 258$ PER AL FANG (B-F), MATRIU DE FANG AMB N-HEXADECANTIOL, (TI-M) I CULTIU CRESCUT AMB N-HEXADECANTIOL (TI-4).

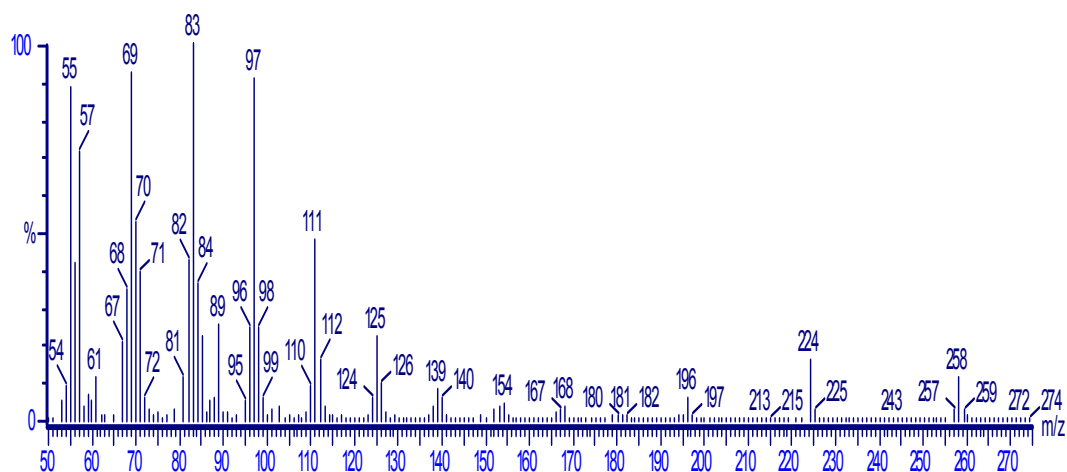


FIGURA 4.18. ESPECTRE DE MASSES DE L'N-HEXADECANTIOL.

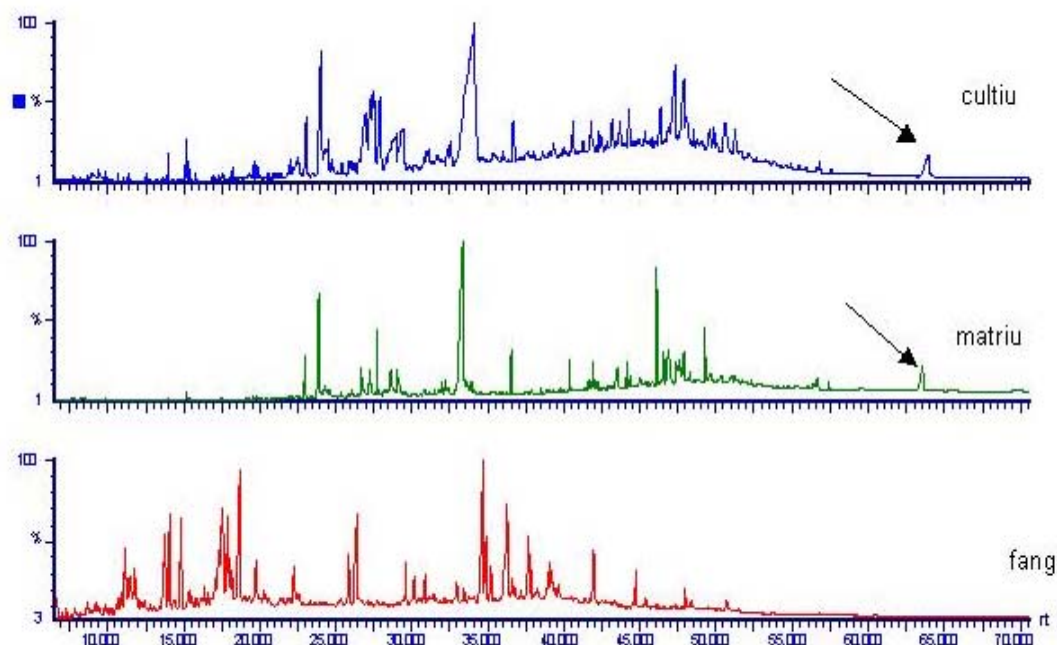


FIGURA 4.19: CORRENT IÒNIC TOTAL (TIC) CORRESPONENT ALS CROMATOGRAMES DEL FANG DE DEPURADORA, DEL CULTIU AMB SUBSTRAT HEXADECANTIOL I DE LA MOSTRA MARIU AMB HEXADECANTIOL. EL PIC ASSENYALAT CORRESPON AL DÍMER DIHEXADECILDISULFUR.

SI ES COMPAREN ELS CROMATOGRAMES DE CORRENT IÒNIC TOTAL DE LES TRES MOSTRES (**FIGURA 4.19**) S'OBSERVA UN PIC, A TEMPS DE RETENCIÓ ALT, TANT AL CULTIU COM A LA MOSTRA MARIU, QUE NO ÉS AL FANG. AQUEST PIC S'HA IDENTIFICAT COM A DIHEXADECILDISULFUR A PARTIR DEL SEU ESPECTRE DE MASSES (**FIGURA 4.20**), ON POT VEURE'S EL PIC MOLECULAR $M^+ = 514$ I ELS FRAGMENTS $M/Z = 290$ ($C_{16}H_{33}S_2H$) CORRESPONENT A LA PÈRDUA D'UN GRUP HEXADECIL I $M/Z = 257$ ($C_{16}H_{33}S$).

COMPARANT LES ÀREES DE N-HEXADECANTIOL (C_{16} -SH) I DIHEXADECILDISULFUR (C_{16} -S-S- C_{16}) EN LA MOSTRA MARIU I EN EL CULTIU S'OBTENEN LES RELACIONS SEGÜENTS:

$$(C_{16}\text{-S-S-}C_{16} / C_{16}\text{-SH})_{\text{MARIU}} = 0,52$$

$$(C_{16}\text{-S-S-}C_{16} / C_{16}\text{-SH})_{\text{CULTIU}} = 0,29$$

AQUESTS RESULTATS DONEN SUPORT AL FET QUE EL DÍMER, QUE JA HI ÉS INICIALMENT, NO AUGMENTA DURANT EL CREIXEMENT DEL CUTIU JA QUE LA QUANTITAT DE DÍMER RESPECTE L'HEXADECANTIOL ÉS DEL MATEIX ORDRE O LLEUGERAMENT INFERIOR AL CULTIU QUE A L'EFECTE MATRIU.

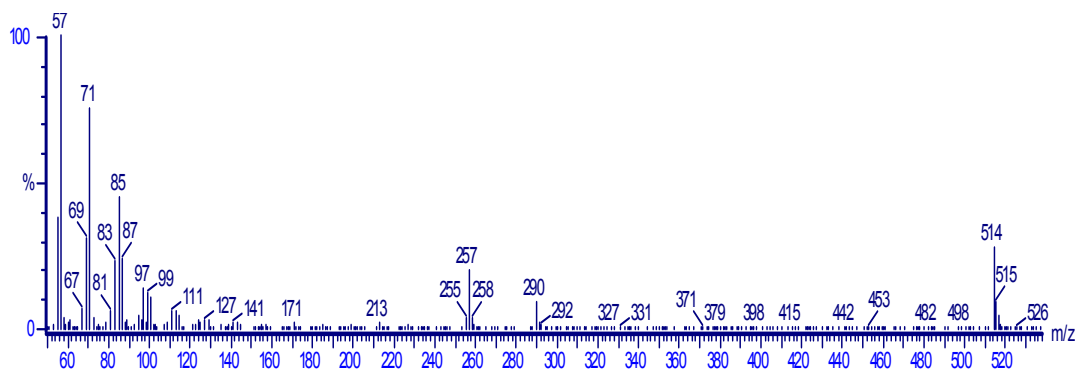


FIGURA 4.20. ESPECTRE DE MASSES DEL DIHEXADECILDISULFUR, DE LA MOSTRA MATRIU AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL.

AMB L'OBJECTIU D'ESBRINAR SI L'HEXADECANTIOL SEGUEIX LA RUTA DE DEGRADACIÓ PASSANT A ÀCID HEXADECANOIC I POSTERIOR β -DEGRADACIÓ AMB PÈRDUES SUCCESSIVES D'ACETAT, EL QUE PORTARIA A LA PRODUCCIÓ D'ÀCIDS TETRADECANOIC, DODECANOIC I INFERIORS, ES PRESENTEN ELS RESULTATS QUE SEGUEIXEN. EN ELLS ES MOSTREN LES RELACIONS ENTRE ELS ÀCIDS DE MENYS DE 16 CARBONIS, QUE PODRIEN PROVENIR DE LA DEGRADACIÓ DE L'HEXADECANOIC, I ELS DE MÉS DE 16 ÀTOMS DE CARBONI, QUE PROVINDRIEN D'ÀCIDS DE MÉS DE 16 CARBONIS, I PER TANT NO RELACIONATS AMB LA BIODEGRADACIÓ DE L'N-HEXADECANTIOL. LES RELACIONS S'HAN FET EN BASE A L'ÀCID HEXADECANOIC, QUE ES PREN COM A REFERÈNCIA. (TAULA 4.12, FIGURES 4.21 I 4.22).

PER ALTRA BANDA LA COMPARACIÓ DELS CROMATOGRAMES DEL CULTIU I LA MOSTRA MATRIU MOSTREN DIFERÈNCIES ENTRE ELS CONTINGUTS D'HEXADECÈ I HEXADECÀ, ELS RESULTATS ES PRESENTEN A LA FIGURA 4.23 I A LA TAULA 4.13 I ES COMENTEN DETALLADAMENT A LA DISCUSSIÓ.

A LA TAULA 4.12 ES MOSTREN LES ÀREES DELS PICS CORRESPONENTS ALS ÀCIDS LINEALS PER AL CULTIU I LA MOSTRA MATRIU AMB SUBSTRAT 1-HEXADECANTIOL I PEL FANG, AIXÍ COM LA RELACIÓ ENTRE CADA ÀCID I L'ÀCID HEXADECANOIC. A LES FIGURES 4.21 I 4.22 S'HAN REPRESENTAT LES RELACIONS ENTRE LES QUANTITATS D'ÀCIDS LINEALS DE N ÀTOMS DE CARBONI, C_n , I LA QUANTITAT D'HEXADECANOIC A LA MOSTRA MATRIU, AL CULTIU I AL FANG.

TAULA 4.12. RELACIONS ENTRE LES QUANTITATS D'ÀCIDS CARBOXÍLICS LINEALS DE N ÀTOMS DE CARBONI, C_N AL FANG, A LA MOSTRA MATRIU I AL CULTIU AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTOL. * LES ÀREES, EN UNITATS ARBITRÀRIES, S'HAN ESTABLERT AMB EL SOFTWARE MASSLAB 2.13 ACOBLAT AL CROMATÒGRAF, A PARTIR DELS CROMATOGRAMES DE CORRENT IÒNIC TOTAL (**FIGURA 4.23**).

C_N	ÀREA* A FANG	ÀREA* A MATRIU Ti	àrea * a	C_N/C_{16} FANG	C_N/C_{16} MATRIU	C_N/C_{16} CULTIU
12	0	0	736898	0	0	0,01167
13	0	0	0	0	0	0
14	84272	120083	7641068	0.02506	0,01194	0,12097
15	0	474735	2951294	0	0,04720	0,04673
16	3362633	10058074	63162240	1	1	1
17	936048	2152898	7704637	0,27838	0,21407	0,12198
18	8981166	20949998	86966696	2,67083	2,08290	1,37688
19	853688	470427	9361314	0,25387	0,04677	0,14821
20	1069513	4761275	12181819	0,31806	0,47339	0,19287
21	273268	750852	1259529	0,081266	0,07465	0,01994
22	10676079	14858484	26189554	3,37492	1,47727	0,41464
23	742114	2977405	7497051	0,22069	0,29602	0,11869
24	6958012	9425763	33342248	2,06921	0,93713	0,52788
25	1449043	2399569	10171024	0,430925	0,23857	0,16103
26	3958384	7300446	36574912	1,17717	0,72583	0,57906
27	1344115	1839611	3651898	0,039973	0,18290	0,05782
28	0	3391757	82273408	0	0,33722	1,30257
29	0	0	0	0	0	0
30	231322	604437	33230518	0,684381	0	0,52611

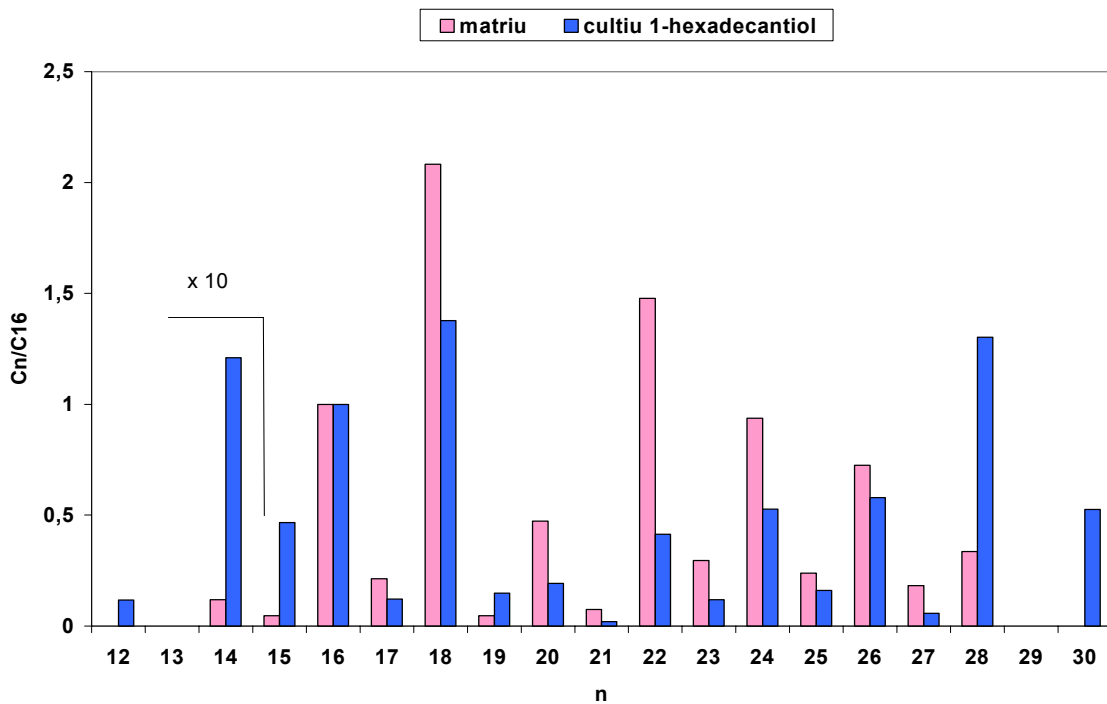


FIGURA 4.21. RELACIONS ENTRE LES QUANTITATS D'ÀCIDS LINEALS C_n (n = NOMBRE D'ÀTOMS DE CARBONI) I L'ÀCID HEXADECANOIC, A LA MOSTRA MARIU I AL CULTIU, AMB SUBSTRAT 1-HEXADECANTIOL.

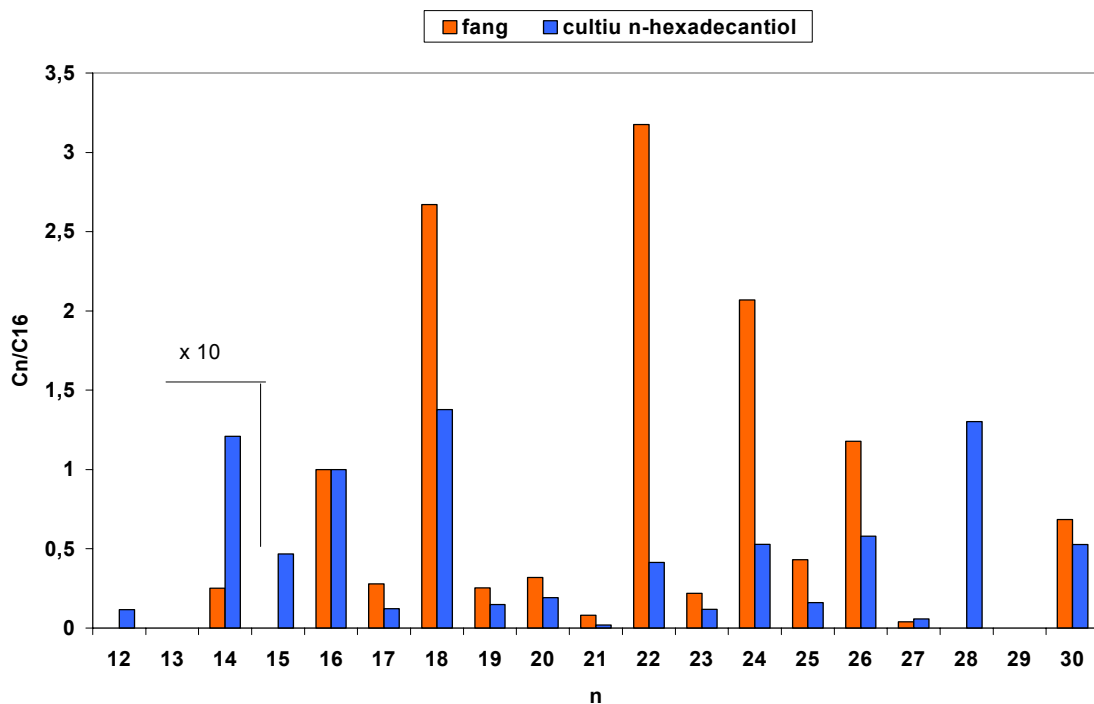


Figura 4.22. Relacions entre les quantitats d'àcids lineals C_n (n = nombre d'àtoms de carboni) i l'àcid hexadecanoic, al fang i al cultiu amb substrat 1-hexadecantiol.

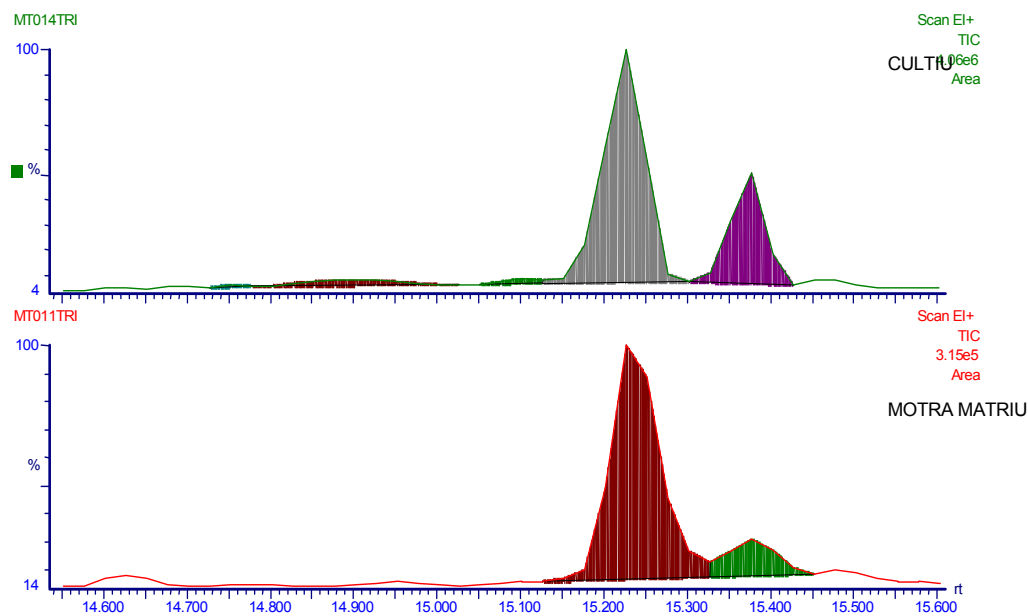


FIGURA 4.23. PICS DE L'HEXADECÈ I L'HEXADECÀ AL CULTIU I A LA MOSTRA Matriu AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL.

	MOSTRA Matriu N-HEXADECANTIOL	CULTIU N-HEXADECANTIOL
HEXADECÀ/HEXADECÈ (FIGURA 4.25)	0,15	0,39
HEXADECÈ/(HEXADECANTIOL + DIHEXADECILDISULFUR)x 100	3,4	6,7
HEXADECÀ/(HEXADECANTIOL + DIHEXADECILDISULFUR)x 100	0,85	2,59

TAULA 4.13. RELACIONS ENTRE DIVERSOS COMPOSTOS EN UN CULTIU AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL I EN UNA MOSTRA Matriu AMB EL MATEIX SUBSTRAT.

4.3.4.2.2. CULTIUS QUE DEGRADEN 1-HEXADECÈ

Per tal de detectar el pic de l'1-hexadecè i els possibles productes de degradació d'aquest compost s'han comparat els cromatogrames blanc (amb fang sense 1-hexadecè) amb el cultiu que ha crescut amb hexadecè i amb un cultiu del qual s'ha fet l'extracció un dia de l'inòcul quan encara no hi ha hagut producció bacteriana de metà per tal de valorar l'efecte matriu. A la **taula 4.14** poden veure's els noms i característiques d'aquestes mostres. A les **figures 4.24 i 4.25** es mostren els cromatogrames corresponents.

Taula 4.14 Noms donats a les mostres corresponents a les extraccions dels cultius que han crescut en 1-hexadecè.

NOM	TIPUS CULTIU
B-F	BLANC AMB FANG
HD-M	EFFECTE MATRIU 1-HEXADECÈ
HD-4	CULTIU CRESCUT AMB 1-HEXADECÈ (HD-4 A LA TAULA 4.5)

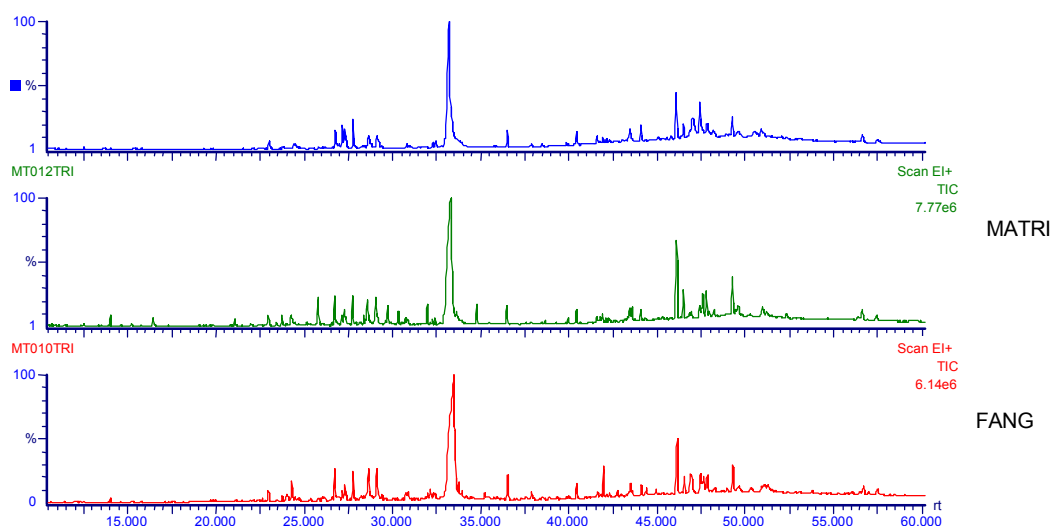


FIGURA 4.24 COMPARACIÓ DELS CROMATOGRAMES DE LES MOSTRES DE FANG, MATRIU I CULTIU AMB 1-HEXADECÈ.

SUBSTRAT

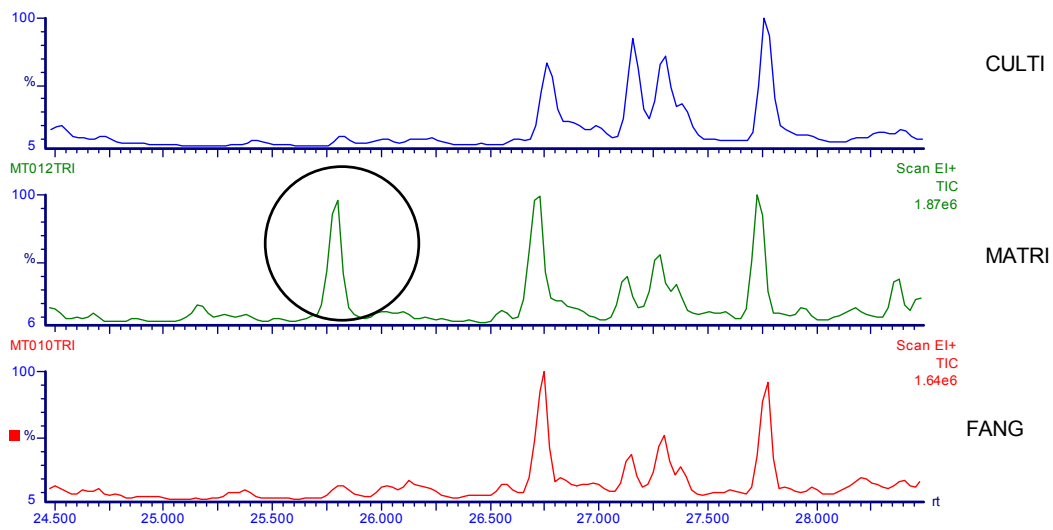


Figura 4.25. Ampliació d'una part dels cromatogrames de fang, matriu i cultiu amb 1-hexadecè en el que s'observa un pic diferencial a la mostra matriu, que s'ha identificat com el trimetilsilil derivat de l'àcid hexadecanoic (figura 4.26)

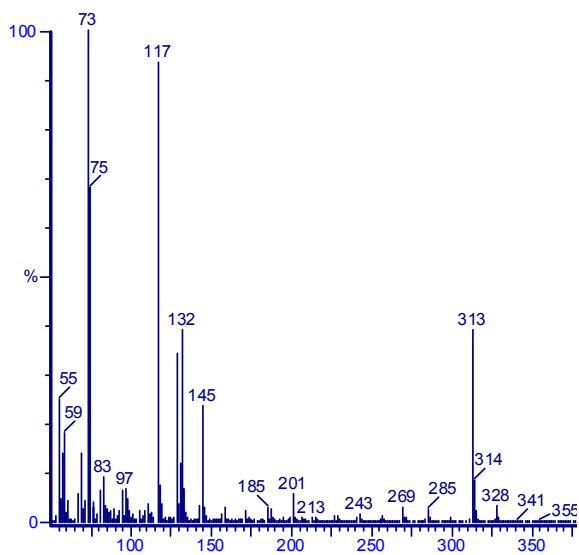


Figura 4.26 Espectre de masses del pic que diferencia els cromatogrames de la figura anterior 4.25 i que s'ha identificat com el trimetilsilil derivat de l'àcid hexadecanoic

COMPARANT ELS PERFILS CROMATOGRÀFICS DE LES TRES MOSTRES DESTACA UN PIC QUE ÉS PRESENT A LA MOSTRA MARIU ON S'HA POSAT 1-HEXADECÈ PERÒ NO HI HA HAGUT PRODUCCIÓ METANOGENÈICA, I QUE NO ES

PRESENTA NI AL CULTIU QUE HA DEGRADAT 1-HEXADECÈ NI AL FANG. A LA **FIGURA 4.26** ES MOSTRA L'ESPECTRE DE MASSES D'AQUEST PIC, QUE S'HA IDENTIFICAT COM EL TRIMETILSILILDERIVAT DE L'ÀCID HEXADECANOIC PEL PIC MOLECULAR M^+ (M/Z 328) M^+-CH_3 (M/Z 313), I ELS PICS CORRESPONENTS A L'ACABAMENT ÀCID $COOSiMe_3$ I $CH_2COOSiMe_3$ (M/Z 117 I 131). AQUESTS RESULTATS SUGGEREIXEN QUE L'1-HEXADECÈ POT HAVER SOFERT UNA OXIDACIÓ A N-HEXADECANOIC EN EL PROCÉS D'EXTRACCIÓ, QUE S'EFFECTUA EN MEDI ÀCID.

PER TAL D'ESTABLIR LA **RUTA DE BIODEGRADACIÓ** DE L'1-HEXADECÈ PER PART DEL CONSORCI BACTERIÀ VIA OXIDACIÓ A ÀCID HEXADECANOIC I POSTERIOR β -DEGRADACIÓ, S'HAN COMPARAT LES QUANTITATS D'ÀCIDS AL CULTIU, A LA MOSTRA MÀTRIU I AL FANG.

TAULA 4.14. RELACIONS ENTRE LES QUANTITATS D'ÀCIDS CARBOXÍLICS LINEALS DE N ÀTOMS DE CARBONI, C_N AL FANG, A LA MOSTRA MÀTRIU I AL CULTIU AMB SUBSTRAT 1-HEXADECÈ (HD). * LES ÀREES, EN UNITATS ARBITRÀRIES, S'HAN ESTABLERT AMB EL SOFTWARE MASSLAB 2.13 ACOBLAT AL CROMATÒGRAF, A PARTIR DELS CROMATOGRAMES DE CORRENT IÒNIC TOTAL (**FIGURA 4.24**).

C_N	ÀREA* A FANG	ÀREA* A MÀTRIU HD	àrea * a	C_N/C_{16} FANG	C_N/C_{16} MÀTRIU HD	C_N/C_{16} CULTIU HD
12	0	0	32434	0	0	0,00106
13	0	0	99736	0	0	0,00326
14	84272	289498	88966	0.02506	0,01619	0,00291
15	0	1735202	223024	0	0,09701	0,00730
16	3362633	17886322	30563051	1	1	1
17	936048	109981	1962096	0,27838	0,00615	0,06420
18	8981166	7033955	9644879	2,67083	0,39326	0,31557
19	853688	411008	170782	0,25387	0,02298	0,00559
20	1069513	1848458	922641	0,31806	0,10334	0,03019
21	273268	310257	293230	0,08127	0,01735	0,00959
22	10676079	9079305	5451649	3,37492	0,50761	0,17837
23	742114	1006174	739249	0,22069	0,05625	0,02419
24	6958012	6318749	4649148	2,06921	0,35327	0,15212
25	1449043	1547233	1466800	0,43092	0,08650	0,04799
26	3958384	5070795	5220270	1,17717	0,28350	0,17083
27	1344115	1431280	1574693	0,03997	0,08003	0,05152
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	231322	0	459276	0,684381	0	0,52611

A LA **TAULA 4.14** ES MOSTREN LES ÀREES DELS PICS CORRESPONENTS ALS ÀCIDS LINEALS (SILILATS + NO SILILATS) PER AL CULTIU I LA MOSTRA MÀTRIU AMB SUBSTRAT 1-HEXADECÈ, AIXÍ COM LA RELACIÓ ENTRE CADA ÀCID I

L'ÀCID HEXADECANOIC. A LES FIGURES 4.27 I 4.28 ES VEUEN LES RELACIONS D'ÀCIDS RESPECTE L'HEXADECANOIC PER AL CULTIU I LA MOSTRA Matriu I PER AL CULTIU I EL FANG, RESPECTIVAMENT.

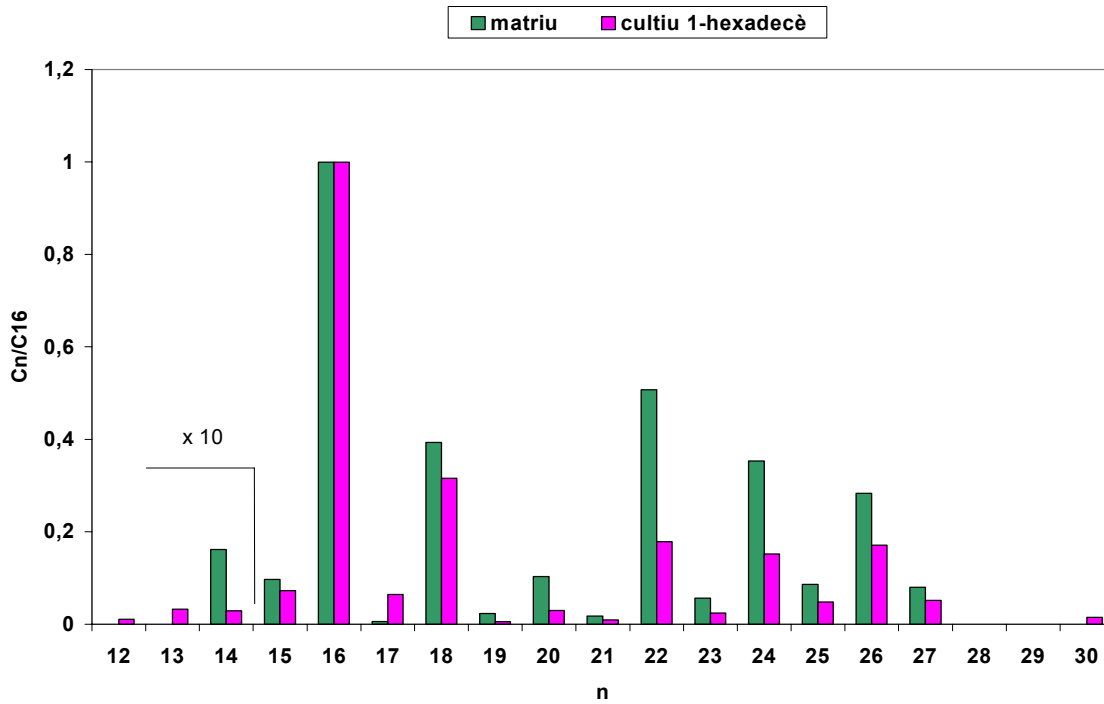


Figura 4.27. Relacions entre les quantitats d'àcids lineals C_n (n = nombre d'àtoms de carboni) i l'àcid hexadecanoic, a la mostra matriu i al cultiu, amb substrat 1-hexadecè

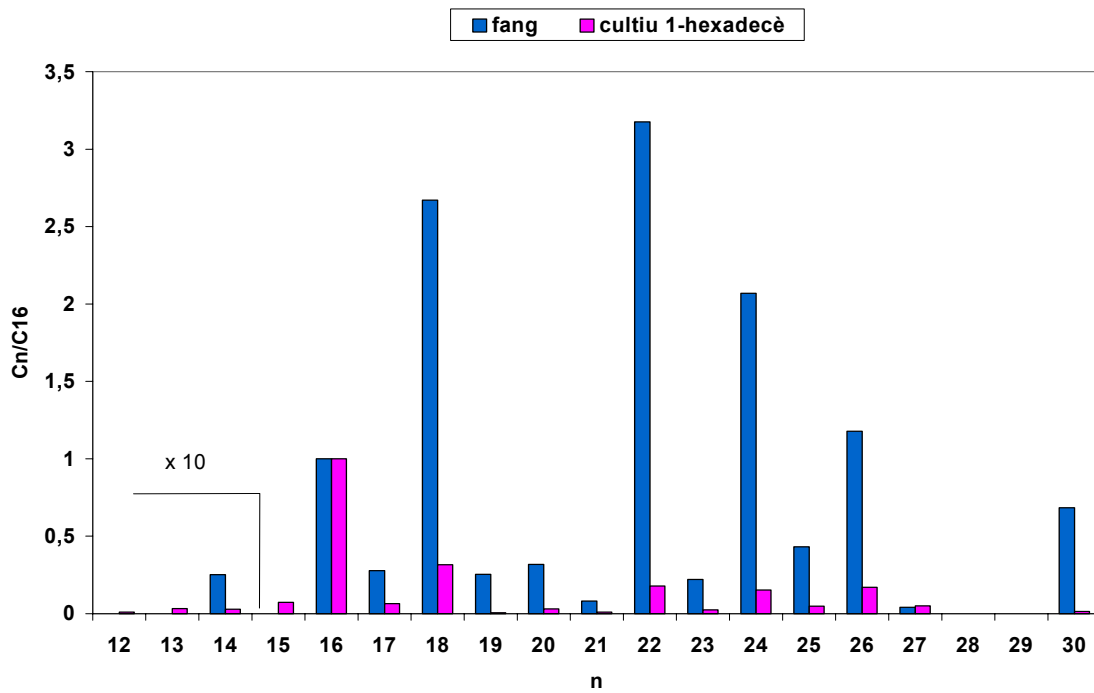


Figura 4.28 Relacions entre les quantitats d'àcids lineals C_n (n = nombre d'àtoms de carboni) i l'àcid hexadecanoic, al fang i al cultiu amb substrat 1-hexadecè.

4.4. DISCUSSIÓ

4.4.1. DISCUSSIÓ DEL CREIXEMENT BACTERIÀ

A PARTIR DELS RESULTATS OBTINGUTS A TOTS ELS CULTIUS S'OBSERVA QUE EN TOTS ELS CASOS EN QUÈ HI HA PRODUCCIÓ DE METÀ, LA REPRESENTACIÓ GRÀFICA DEL % METÀ VERSUS TEMPS PERMET DISTINGIR UNA FASE DE LATÈNCIA, UNA FASE DE CREIXEMENT EXPONENCIAL I UNA FASE ESTACIONÀRIA, FET QUE CORROBORA QUE **LA VARIACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE METÀ ÉS UN INDICADOR DEL CREIXEMENT DE BACTERIS METANÒGENS** (BALCH I WOLFE, 1976; MAWSON *ET AL*, 1992; VILA, 1993; HARADA *ET AL*, 1994; CHAUDHURI I WIESMANN, 1996; LI *ET AL*, 1996; VELTMAN *ET AL*, 1998; LOMANS *ET AL*, 1999). AMB LA MESURA DEL METÀ, PERÒ, NO POT VEURE'S LA FASE DE MORT CEL·LULAR, JA QUE EL METÀ QUEDA ACUMULAT A LA PART SUPERIOR DEL VIAL TANT SI LES CÈL·LULES NO EN PRODUEIXEN (FASE ESTACIONÀRIA) COM SI SÓN MORTES (FASE DE MORT).

PEL QUE FA ALS CULTIUS INOCULATS DEL MEDI QUE UTILITZEN ACETAT, POT OBSERVAR-SE QUE TOTES LES RÈPLIQUES CREIXEN DE MANERA SIMILAR: PRÀCTICAMENT NO HI HA FASE DE LATÈNCIA I SÓN ELS CULTIUS EN ELS QUE S'HA OBTINGUT UN PERCENTATGE DE METÀ MÉS ELEVAT, AL CAP DE 34 DIES DES DE L'INÒCUL TOTES SUPEREN UN 70% DE METÀ I UN 80% AL CAP DE 40 DIES.

EL FET QUE NO PRESENTIN FASE DE LATÈNCIA I QUE DE SEGUIDA COMENCI A HAVER-HI CREIXEMENT DE METANÒGENS POT EXPLICAR-SE PEL FET QUE L'ACETAT ÉS METABOLITZAT DIRECTAMENT PELS BACTERIS METANÒGENS. LES CONCENTRACIONS ELEVAVES D'ACETAT AL MEDI DE CULTIU (20 G ACETAT DE CALCI/LITRE, QUE EQUIVALEN A 3 G C/LITRE) SÓN UNA CONTRIBUCIÓ MOLT PROBABLE A L'ELEVAT PERCENTATGE DE METÀ OBTINGUT EN AQUESTS

CULTIUS EN COMPARACIÓ AMB ELS CULTIUS QUE DEGRADEN 1-HEXADECÈ O N-HEXADECANTIOL. EN AQUESTS LA CONCENTRACIÓ DE CARBONI ERA DE 0,05 G C/LITRE DE CULTIU. CAL DIR QUE TOT I QUE ES DESCONeix QUINA ÉS LA CONCENTRACIÓ MÀXIMA D'1-HEXADECÈ I N-HEXADECANTIOL TOLERABLE PEL CREIXEMENT DE BACTERIS METANÒGENS, S'HAN SEGUIIT ELS CRITERIS DE MADSEN *ET AL* (1995) DE POSAR 0,05 GC/LITRE EN ELS CASOS EN QUE ES DESCONeix LA TOXICITAT DEL SUBSTRAT.

ELS CULTIUS “BLANC”, AC-B1 I AC-B2, INOCULATS AMB FANG PRÈVIAMENT ESTERILITZAT, NO PRODUEIXEN METÀ DURANT ELS PRIMERS 40 DIES, QUE ÉS QUAN ELS ALTRES CULTIUS ARRIBEN FINS UN 80% DE METÀ. A LES MESURES FETES AL CAP DE 42 DIES DE L'INOCULACIÓ ES DETECTA METÀ A TOTS DOS, I AUGMENTA DE MANERA EXPONENCIAL ARRIBANT A MÉS DEL 70 % ALS 97 DIES, ÉS A DIR AL CAP D'UNS 50 DIES D'HAVER-NE COMENÇAT A PRODUÏR. UNA DE LES EXPLICACIONS D'AQUEST FET ÉS LA D'UNA ESTERILITZACIÓ INCORRECTA O DEFICIENT DEL FANG, PERÒ EL FET QUE AQUEST MATEIX FANG ESTÈRIL QUE S'HA UTILITZAT EN LA PREPARACIÓ D'AQUESTS BLANCS SIGUI L'UTILITZAT PER ALS BLANCS DELS CULTIUS AMB 1-HEXADECÈ I N-HEXADECANTIOL (HD-5 I TI-5), QUE NO HAN PRODUÏT METÀ EN CAP DELS DOS CASOS, OBRE LA VIA A ALTRES FORMULACIONS. EL COMPORTAMENT OBSERVAT ESTÀ D'ACORD AMB EL FET QUE ELS METANÒGENS SÓN ARQUEOBACTERIS I PER TANT ADAPTATS A SOBREVUIRE EN CONDICIONS EXTREMES; EL FET QUE L'ACETAT ÉS UN SUBSTRAT QUE POT SER CONSUMIT DIRECTAMENT PELS BACTERIS METANÒGENS POT EXPLICAR EL QUE AQUESTS CULTIUS “BLANC” HAGIN PRODUÏT METÀ. EN EL CAS DELS CULTIUS AMB 1-HEXADECÈ I N-HEXADECANTIOL ES NECESSITEN ALTRES GRUPS DE BACTERIS, QUE PROBABLEMENT HAN MORT AMB L'ESTERILITZACIÓ, QUE DEGRADIN AQUESTS COMPOSTOS PER A PRODUÏR L'ACETAT PER SER CONSUMIT PELS METANÒGENS I

FORMAR METÀ. EN AQUEST SENTIT S'HAN TROBAT TREBALLS QUE MOSTREN LA RESISTÈNCIA A L'ESTERILITZACIÓ DE LIPOSOMES ARQUEOBACTERIANS (CHOQUET *ET AL*, 1996).

EN ELS CULTIUS INOCULATS DIRECTAMENT DEL MEDI, FANG DE DIGESTOR ANAEROBI DE DEPURADORA, TANT SI EL SUBSTRAT ÉS ACETAT, 1-HEXADECÈ O N-HEXADECANTIOL, **CAL DESCARTAR LA PRODUCCIÓ DE METÀ DEGUDA AL PROPI FANG**, JA QUE EL CULTIU B-F (TAULES 4.2 I 4.5), INOCULAT AMB FANG I NO CONTÉ SUBSTRAT, NO HA FORMAT METÀ.

ALS SUBCULTIUS **PREENRIQUITS AMB ACETAT QUE UTILITZEN ACETAT COM A SUBSTRAT (AC(S)-1 A AC(S)-5) NO S'HA OBTINGUT METÀ**. AQUEST FET CONTRASTA AMB ALTRES AUTORS QUE OBTENEN CULTIUS ENRIQUITS AMB AQUEST MÈTODE (VEURE APARTAT 4.1). UNA EXPLICACIÓ POSSIBLE ÉS QUE EL MEDI AMB QUE S'HA TREBALLAT NO TINGUI PROU NUTRIENTS PER AL CREIXEMENT DELS BACTERIS METANÒGENS, TOT I QUE EN EL DISSENY DE L'EXPERIMENT ES VA PENSAR QUE AQUESTS NUTRIENTS JA ESTARIEN EN EL FANG DEL PRIMER INÒCUL. EN LA RESTA DE TREBALLS CONSULTATS O BÉ ES POSA SULFAT A PARTIR DEL SEGON ENRIQUIMENT (ZENGLER *ET AL*, 1999) O BÉ S' HI POSAVEN ELEMENTS TRAÇA (CHAUDHURI *ET AL*, 1996; CABIROL *ET AL*, 1998; KOENE-COTTAAR I SCHRAA, 1998) QUE AL TREBALL QUE ES PRESENTA ES VAN OMETRE PERQUÈ ES VA PENSAR QUE AMB EL FANG DEL PRIMER INÒCUL N'HI HAURIA PROU.

ELS RESULTATS DELS **CULTIUS INOCULATS DEL MEDI AMB 1-HEXADECÈ** COM A SUBSTRAT (HD-1 A HD-5), ÉS QUE **TOTS ELS CULTIUS PRODUEIXEN METÀ** A EXCEPCIÓ DEL BLANC INOCULAT AMB FANG ESTERILITZAT, HD-5, QUE NO PRODUEIX METÀ AL LLARG DELS 98 DIES QUE DURA L'EXPERIMENT. AQUESTS CULTIUS MOSTREN UNA FASE DE LATÈNCIA MÉS LLARGA QUE ELS D'ACETAT (**FIGURA 4.4**) I QUE ELS D'N-HEXADECANTIOL (**FIGURA 4.6**): A

DUES DE LES QUATRE RÈPLIQUES NO ES DETECTA METÀ FINS A LA SEGONA MESURA, AL CAP DE 14 DIES DE L'INOCULACIÓ. A LA **FIGURA 4.5 A)** POT VEURE'S QUE LA PRODUCCIÓ DE METÀ AUGMENTA FINS ESTABILITZAR-SE AL CAP D'UNS 30 DIES ALS CULTIUS HD-1 (CONTROL), HD-2 I HD-3; A LA MATEIXA **FIGURA 4.5 A)** S'OBSERVA UN NOU AUGMENT DE LA PRODUCCIÓ DE METÀ ALS CULTIUS HD-2 I HD-3 DESPRÉS DE LA READDICIÓ D'1-HEXADECÈ, EFECTUADA ALS 55 DIES DE L'INÒCUL. LA PRODUCCIÓ EN AQUESTES DUES RÈPLIQUES SEMBLA HAVER TORNAT A QUEDAR ESTABILITZADA AL CAP D'UNS 30 DIES MÉS, ÉS A DIR ALS 85 DIES DES DE L'INICI.

AQUESTES DADES CONCLOUEN QUE **ELS CULTIUS INOCULATS AMB FANG DE DIGESTOR ANAEROBI DE LA DEPURADORA DE MANRESA DEGRADEN METANOGÈNICAMENT L'1-HEXADECÈ**. LA DEGRADACIÓ D'AQUEST COMPOST AMB CULTIUS D'ENRIQUIMENT DE BACTERIS METANÒGENS HA ESTAT DESCRITA ANTERIORMENT I EL MECANISME TEÒRIC PROPOSAT ÉS L'OXIDACIÓ DEL DOBLE ENLLAÇ A ÀCID I LA POSTERIOR β -OXIDACIÓ, AMB LA CONSEQUENT PRODUCCIÓ D'ACETAT QUE PODEN CONSUMIR ELS BACTERIS METANÒGENS (SCHINK, 1985). EL FET QUE L'1-HEXADECÈ HA DE SER PRIMER DEGRADAT A ACETAT EXPLICA QUE AQUESTS CULTIUS TARDIN MÉS A FORMAR METÀ QUE NO ELS D'ACETAT.

PER ALTRA BANDA, COMPARANT LES DADES DE LES **TAULES 4.7 I 4.9**, **ELS CULTIUS AMB N-HEXADECANTIOL PRODUEIXEN METÀ MÉS RÀPID QUE ELS D'1-HEXADECÈ**. EN ELS CULTIUS AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL ES DETECTA METÀ A TOTES LES RÈPLIQUES A LA PRIMERA MESURA EFECTUADA AL CAP DE 7 DIES DE L'INOCULACIÓ, MENTRE QUE EN ELS DE SUBSTRAT 1-HEXADECÈ EN EL MATEIX TEMPS ES PRODUEIX METÀ A LA MEITAT DE LES RÈPLIQUES. UNA EXPLICACIÓ D'AQUEST FET ÉS QUE ELS TIOLS DE CADENA LLARGA, QUE TAMBÉ SÓN OXIDATS A ÀCIDS I SOFREIXEN β -OXIDACIÓ, FORMEN ÀCIDS MÉS FÀCILMENT QUE NO ELS ALQUENS. AQUEST FET CONCORDA AMB UN TREBALL PREVI (RORIJE *ET AL*, 1998)

QUE CONCLOU QUE ELS GRUPS TIOL SÓN ELS FRAGMENTS MÉS IMPORTANTS LLIGATS A LA BIODEGRADABILITAT.

ELS SUBCULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT QUE UTILITZEN COM A SUBSTRAT 1-HEXADECÈ (HD(AC) TAULA 4.8) PRODUEIXEN POC METÀ O GENS, NO ARRIBANT A L'1 % EN CAP CAS. VAL LA PENA ESMENTAR QUE LA PRODUCCIÓ DE METÀ COMENÇA A ESTABILITZAR-SE AL CAP D'UNS 30 DIES DE L'INÒCUL, QUE ÉS UN TEMPS MOLT SIMILAR ALS CULTIUS INOCULATS DIRECTAMENT DEL MEDI QUE UTILITZEN AQUEST SUBSTRAT. CAL NOTAR TAMBÉ QUE AQUEST METÀ NO PROVÉ DE L'INÒCUL, JA QUE EL BLANC B(AC) QUE NO TÉ SUBSTRAT, (TAULA 4.3) NO PRODUEIX GENS DE METÀ. ELS SUBCULTIUS PREENRIQUITS AMB 1-HEXADECÈ QUE UTILITZEN 1-HEXADECÈ COM A SUBSTRAT NO PRODUEIXEN GENS DE METÀ. AQUEST FET CONCORDA AMB ESTUDIS FETS UN ALTRE SUBSTRAT, CONCRETAMENT METANTIOL (FINSTER *ET AL*, 1992) EN ELS QUE L'ACTIVITAT METANOGENÈICA VA DISMINUÏNT EN ELS SUCCESSIUS ENRIQUIMENTS DISCONTINUS, PROBABLEMENT DEGUT A QUÈ ELS ENRIQUIMENTS DISCONTINUS NO COMPORTEM NECESSÀRIAMENT EL DESENVOLUPAMENT RÀPID DE L'ORGANISME MÉS ABUNDANT QUE DUU A TERME LA REACCIÓ PER LA QUÈ S'HAN SELECCIONAT, SINO LA DELS MICROORGANISMES MILLOR ADAPTATS A LES CONDICIONS DE L'ENRIQUIMENT.

PEL QUE FA ALS CULTIUS INOCULATS DEL MEDI QUE DEGRADEN N-HEXADECANTIOL (TI-1 A TI-5) TOTS PRODUEIXEN METÀ MENYS EL BLANC INOCULAT AMB FANG ESTÈRIL, TI-B. EL METÀ JA ES DETECTA AL CAP DE 7 DIES I COMENÇA A ESTABILITZAR-SE AL CAP D'UNS 40 DIES. A LA FIGURA 4.7 POT APRECIAR-SE COM LA PRODUCCIÓ DE METÀ AUGMENTA CLARAMENT DESPRÉS DE LA READDICIÓ DE N-HEXADECANTIOL, AL CAP DE 55 DIES DE L'INÒCUL, EN ELS CULTIUS HD-2 I HD-3. AQUESTA VARIACIÓ NO S'OBSERVA AL CULTIU

CONTROL HD-1. PER TANT POT CONCLoure'S QUE L'N-HEXADECANTIOL ÉS DEGRADAT A METÀ EN AQUESTS CULTIUS.

NO S'HA TROBAT CAP REFERÈNCIA, A LA BIBLIOGRAFIA CONSULTADA, DE LA METANITZACIÓ DE N-HEXADECANTIOL.

TOTES LES RÈPLIQUES DELS SUBCULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL (TI(AC)) PRODUEIXEN METÀ (FIGURA 4.8), SI BÉ EN UNA PROPORCIÓ MENOR QUE ELS CULTIUS INOCULATS DIRECTAMENT DEL MEDI. EN CANVI NO HI HA PRODUCCIÓ DE METÀ ALS SUBCULTIUS PREENRIQUITS AMB N-HEXADECANTIOL QUE UTILITZEN AQUEST MATEIX COMPOST COM A SUBSTRAT. L'EXPLICACIÓ POT SER LA MATEIXA QUE LA DELS CORRESPONENTS CULTIUS AMB 1-HEXADECÈ.

TAMBÉ CAL NOTAR QUE SI ES COMPAREN ELS RESULTATS DELS CULTIUS QUE DEGRADEN 1-HEXADECÈ I N-HEXADECANTIOL, TANT ELS INOCULATS DIRECTAMENT DEL MEDI (CULTIUS HD I TI, FIGURES 4.5 I 4.7), COM ELS SUBCULTIUS PREENRIQUITS AMB ACETAT (CULTIUS HD(AC) I TI(AC), FIGURES 4.6 I 4.8), EN TOTS ELS CASOS LA PROPORCIÓ DE METÀ ÉS SUPERIOR ALS CULTIUS QUE DEGRADEN EL TIOL I LA FASE DE LATÈNCIA ÉS MÉS CURTA, DEGUT A LA MAJOR BIODEGRADABILITAT DEL GRUP TIOL.

4.4.2. DISCUSSIÓ SOBRE LA DEGRADACIÓ DE L'1-HEXADECÈ I DE L'N-HEXADECANTIOL

ELS RESULTATS DE LA COMPOSICIÓ DELS GASOS A LA PART SUPERIOR DELS VIALS (FIGURES 4.9 A 4.13) INDIQUEN QUE HI HA UN AUGMENT DE METÀ I DE DIÒXID DE CARBONI TANT EN ELS CULTIUS QUE HAN DEGRADAT 1-HEXADECÈ COM EN ELS QUE HAN DEGRADAT N-

HEXADECANTIOL. AQUESTS RESULTATS CONCORDEN AMB UNA BIODEGRADACIÓ VIA OXIDACIÓ DE LA CADENA CARBONADA I POSTERIOR β -DEGRADACIÓ AMB LA CONSEQÜENT FORMACIÓ D'ACETAT QUE ÉS FINALMENT DEGRADAT A METÀ I DIÒXID DE CARBONI. CAL ESMENTAR QUE AQUEST MECANISME HA ESTAT DESCRIT ANTERIORMENT PER A 1-HEXADECÈ (ZEHNDER, 1988), PERÒ NO S'HA TROBAT A LA BIBLIOGRAFIA CONSULTADA PER A L'N-HEXADECANTIOL.

EN LA COMPOSICIÓ DELS GASOS EN ELS CULTIUS QUE HAN DEGRADAT N-HEXADECANTIOL, NO S'HAN DETECTAT COMPOSTOS VOLÀTILS QUE CONTINGUIN SULFUR. AQUEST FET CONCORDA AMB LA FORMACIÓ DE SULFURS, COMPOSTOS MAJORITÀRIAMENT INSOLUBLES, AMB CATIONS PROVINENTS DEL FANG DE DEPURADORA UTILITZAT COM A INÒCUL.

ELS RESULTATS DE LES **EXTRACCIONS DELS CULTIUS I POSTERIOR ANÀLISIS PER CG-EM** EN EL CAS DELS CULTIUS AMB **SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL (FIGURES 4.19 A 4.23)** PORTEN A ESTABLIR LES **DUES HIPÒTESIS** SEGÜENTS:

I) L'HEXADECANTIOL ÉS OXIDAT A ÀCID HEXADECANOIC I AQUEST A ACETAT VIA β -DEGRADACIÓ.

II) L'HEXADECANTIOL PASSA A 1-HEXADECÈ I AQUEST A N-HEXADECÀ

LA PRIMERA HIPÒTESI CONCORDA AMB LA BIODEGRADACIÓ CLÀSSICA EN UN DIGESTOR ANAEROBI (**FIGURA 2.3**) I EN EL FET QUE EL GRUP TIOL ES COMPORTA COM L'ALCOHOL (RORIJE *ET AL*, 1998) TOT I QUE CAP DELS TREBALLS PREVIS CONSULTATS HA ESTUDIAT LA BIODEGRADACIÓ D'N-HEXADECANTIOL SINO DE TIOLS DE CADENA CURTA. LA SEGONA

HIPÒTESI COMPORTA UNA PÈRDUA DE SULFHÍDRIC I FORMACIÓ D'1-HEXADECÈ I POSTERIOR REDUCCIÓ D'AQUEST ALQUÈ A ALCÀ. LA REDUCCIÓ ANAERÒBIA S'HA TROBAT DESCRITA PER AL PAS D'ETÈ A ETÀ (KOENE-COTTAAR I SCHRAA, 1998).

A LA FIGURA 4.21 POT VEURE'S QUE LA RELACIÓ D'ÀCIDS DE MENYS DE 16 ÀTOMS DE CARBONI RESPECTE L'HEXADECANOIC ÉS MAJOR EN EL CULTIU QUE A LA MOSTRA MARIU, MENTRE QUE LA RELACIÓ ENTRE ELS ÀCIDS DE MÉS DE 16 ÀTOMS DE CARBONI I L'HEXADECANOIC ÉS MENOR EN EL CULTIU QUE A LA MOSTRA MARIU. L'AUGMENT D'ÀCID PENTADECANOIC EN EL CULTIU POT EXPLICAR-SE COM PROPI DEL CREIXEMENT BACTERIÀ JA QUE HA ESTAT IDENTIFICAT EN NOU SOQUES DE BACTERIS METANÒGENS (TORNABENE I LANGWORTHY, 1978). EL MATEIX COMPORTAMENT S'OBSERVA SI ES COMPARA EL FANG AMB EL CULTIU (FIGURA 4.22). AQUESTES DADES CONCORDEN AMB UN AUGMENT DE L'ÀCID HEXADECANOIC (DEGUT A L'OXIDACIÓ DE L'N-HEXADECANTIOL) I LA SEVA POSTERIOR β -DEGRADACIÓ, I PORTEN A LA POSSIBLE VERACITAT DE LA PRIMERA HIPÒTESI.

Per altra banda comparant els cromatogrames de la mostra mariu i del cultiu s'observa una major proporció de la quantitat d'hexadecà respecte hexadecè al cultiu que a la mostra mariu (figura 4.23). També s'observa un augment de les proporcions d'hexadecè i d'hexadecà respecte la suma de les quantitats d'n-hexadecantiol + dihexadecildisulfur. (taula 4.13). Com que s'ha argumentat que el dihexadecildisulfur no és de procedència bacteriana, pot concloure's que la segona hipòtesi és també vertadera, és a dir que es dona un pas de n-hexadecantiol a alquè (fet que explica l'augment d'1-hexadecè en el cultiu respecte la mariu) i una posterior reducció de l'1-hexadecè a hexadecà. Aquest darrer pas pot atribuir-se a l'acció bacteriana amb molta més probabilitat, ja que en les condicions del medi de cultiu és poc afavorida químicament.

Com a resum dels resultats obtinguts per a la biodegradació de l'n-hexadecantíol per part del consorci bacterià estudiat pot concloure's que existeixen dues vies simultànies: una en la que el tiol és oxidat a àcid, que es posteriorment degradat per β -degradació donant successius acetats, que es trenquen produïnt metà; i una altra via en la que l'n-hexadecantíol passa a 1-hexadecè i aquest a hexadecà. A la figura 4.29 s'il.lustren aquestes vies.

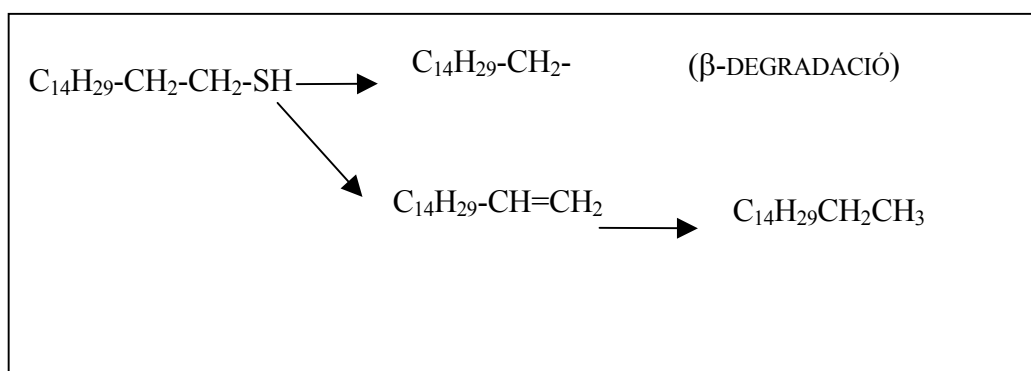


FIGURA 4.29. VIES DE DEGRADACIÓ DE L'N-HEXADECANTÍOL.

En el cas dels cultius amb substrat 1-hexadecè (figures 4.25 a 4.29) A partir de les figures anteriors s'observa que la relació entre les quantitats d'àcids respecte l'hexadecanoic disminueixen en el cultiu respecte les corresponents relacions al fang i a la matriu, també s'observen, si bé en quantitats molt petites, àcids de cadena menor que 16, que no es distingeixen al fang o a la mostra matriu. Tot i això la relació d'àcid tetradecanoic respecte l'hexadecanoic és major a la matriu i al fang que al cultiu. Aquest fet fa que no pugui afirmar-se amb certesa la ruta de degradació, ja que l'àcid tetradecanoic ha de ser el primer en obtenir-se en perdre un grup acetat l'àcid hexadecanoic. El fet que en el cultiu matriu s'observi una elevada quantitat d'àcid hexadecanoic, i no d'hexadecè, suggereix un primera oxidació bacteriana de hexadecè a hexadecanoic (la mostra matriu es va deixar tot un dia abans de fer l'extracció) però no descarta una oxidació química en el moment de l'extracció.

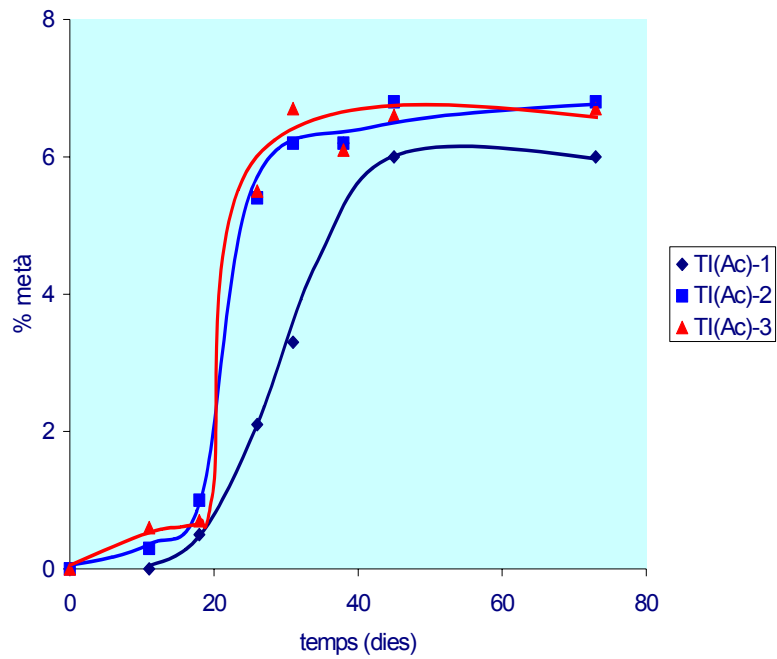


FIGURA 4.8 CREIXEMENT DELS CULTIUS QUE UTILITZEN N-HEXADECANTIOL PREENRIQUITS AMB ACETAT.

4.5. CONCLUSIONS

1. S'HAN OBTINGUT CULTIUS D'ENRIQUIMENT DE CONSORCIS METANOGENÈS CAPAÇOS DE DEGRADAR 1-HEXADECÈ I N-HEXADECANTIOL AMB INÒCUL PROCEDENT DE FANG DE DIGESTOR ANAEROBI DE DEPURADORA URBANA. TOT I QUE LA METANITZACIÓ DE L'1-HEXADECÈ HAVIA ESTAT DESCRITA (SCHINK, 1985); NO S'HAN TROBAT REFERÈNCIES PRÈVIES DE LA METANITZACIÓ D'N-HEXADECANTIOL.
2. S'HA OBSERVAT LA DEGRADACIÓ DE L'1-HEXADECÈ I N-HEXADECANTIOL PER PART DE CONSORCIS METANOGENÈS: HI HA HAGUT PRODUCCIÓ DE METÀ EN CULTIUS AMB SUBSTRAT 1-HEXADECÈ, QUE HA INCREMENTAT AMB LA READDICIÓ DE SUBSTRAT.
3. LA FASE DE LATÈNCIA DELS CULTIUS AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL ÉS MENOR QUE LA DELS CULTIUS AMB SUBSTRAT 1-HEXADECÈ. AQUEST FET ESTÀ D'ACORD AMB ESTUDIS ANTERIORS (RORIJE *ET AL*, 1998) QUE CONSIDEREN QUE EL GRUP ORGÀNIC TIOL ÉS EL FRAGMENT MÉS IMPORTANT LLIGAT A LA BIODEGRADABILITAT ANAERÒBIA D'UN COMPOST. LES PORPORIONS FINALS DE METÀ OBTINGUT SÓN SIMILARS PELS CONSORCIS DEGRADADORS DE 1-HEXADECÈ I DE N-HEXADECANTIOL.

4. LES PROPORCIIONS DE METÀ OBTINGUDES EN ELS SUBCULTIUS AMB SUBSTRAT 1-HEXADECÈ PREENRIQUITS AMB ACETAT, HD(AC), SÓN MENORS QUE LES DELS CULTIUS INOCULATS A PARTIR DEL MEDI, HD, SI BÉ TARDEN EL MATEIX TEMPS EN ESTABILITZAR LA PRODUCCIÓ DE METÀ. EN EL CAS DE SUBCULTIUS AMB SUBSTRAT 1-HEXADECÈ PREENRIQUITS AMB EL MATEIX SUBSTRAT, HD(S), NO S'HA OBTINGUT METÀ.

5. LES PROPORCIIONS DE METÀ OBTINGUDES EN ELS SUBCULTIUS AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL PREENRIQUITS AMB ACETAT, TI(AC), SÓN MENORS QUE LES DELS CULTIUS INOCULATS A PARTIR DEL MEDI, TI, SI BÉ TARDEN EL MATEIX TEMPS EN ESTABILITZAR LA PRODUCCIÓ DE METÀ. EN EL CAS DE SUBCULTIUS AMB SUBSTRAT N-HEXADECANTIOL PREENRIQUITS AMB EL MATEIX SUBSTRAT, TI(S), NO S'HA OBTINGUT METÀ.

6. L' N-HEXADECANTIOL POSSIBLEMENT HA ESTAT DEGRADAT MAJORITÀRIAMENT VIA OXIDACIÓ A ÀCID HEXADECANOIC I POSTERIOR β -DEGRADACIÓ, JA QUE S'OBSERVA UN AUGMENT DE LA QUANTITAT D'ÀCIDS CARBOXÍLICS MENORS DE 16 ÀTOMS DE CARBONI I UNA DISMINUCIÓ DELS MÉS LLARGS EN EL CULTIU RESPECTE AL FANG. LA RUTA DE DEGRADACIÓ PER AQUEST COMPOST HA ESTAT DESCRITA PER PRIMERA VEGADA EN AQUEST ESTUDI.

7. S'HA OBSERVAT UNA SEGONA VIA DE DEGRADACIÓ DE L'N-HEXADECANTIOL QUE PRIMER PASSA A 1-HEXADECÈ I AQUEST A HEXADECÀ. TAMPOC S'HAN

TROBAT REFERÈNCIES PRÈVIES DE DEGRADACIÓ ANAERÒBIA DE CAP TIOL PER AQUESTA VIA.