

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Y

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS



**MASTER OFICIAL EN HIDROLOGÍA
Y GESTIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS**

PROYECTO DE FIN DE MASTER

**BIOESTIMULACIÓN DE MICROORGANISMOS DEL SUELO
PARA LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS**

AUTOR:

José Fernando Rodrigo Quejigo

DIRECTOR:

Dr. Karina Boltes Espínola (UAH).

Alcalá de Henares, 16 de Junio de 2011

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción	
2.1. Características físico-químicas del Dibenzotiofeno.....	5
2.2. Biodegradación de Dibenzotiofeno.....	6
2.3. Bioelectrogénesis: Pilas microbianas de combustible (MFC _s).....	9
3. Objetivos del trabajo.....	13
4. Metodología	
4.1. Muestreo.....	14
4.2. Ensayos de biodegradación.	
4.2.1. Componente y montaje.....	14
4.2.2. Ensayos de biodegradación.....	15
4.2.3. Pulsos.....	17
4.2.4. Desorción del Dibenzotiofeno.....	18
4.2.5. Análisis de DBT con HPLC.....	19
4.2.6. Eficiencia de una pila	20
4.3. Ensayos de Ecotoxicidad del Dibenzotiofeno	
4.3.1. Preparación del ensayo.....	22
4.3.2. Cálculo de la ecotoxicidad.....	23
4.4. Ensayos de ATP.....	24
5. Resultados	
5.1. Caracterización del suelo....	25
5.2. Diferencia de potencial eléctrico en pilas sedimentarias.....	25
5.3. Biodegradación del Dibenzotiofeno.....	29
5.4. Ensayos de Ecotoxicidad.....	33
5.5. Ensayos de ATP.....	35
6. Discusión	
6.1. Características del suelo.....	36
6.2. Diferencia de potencial eléctrico en pilas sedimentarias.....	36
6.3. Biodegradación del Dibenzotiofeno.....	38
6.4. Ensayos de Ecotoxicidad.....	39

6.5. Ensayos de ATP.....	40
7. Conclusiones	41
8. Bibliografía	42
9. Anejos	
9.1. Cálculos de la concentración de DBT.....	45
9.2. Ensayo de algas.....	47
9.3. Ensayo de ATP.....	60

1. RESUMEN

El Dibenzotiofeno (DBT) es un hidrocarburo policíclico aromático, constituyente del crudo petrolífero. Este compuesto y sus alquil derivados son utilizados como compuestos modelo en estudios de desulfuración, siendo difícil eliminarlos en las fracciones más pesadas del petróleo.

Las pilas microbianas de combustible (en inglés denominadas Microbial Fuel Cells, MFCs) son dispositivos que utilizan el metabolismo de las bacterias para producir una corriente de energía, a partir de la oxidación anaerobia de un amplio rango de sustratos (Tender *et al.*, 2002). Las pilas microbianas contienen un ánodo de grafito que actúa como aceptor de los electrones que provienen de dicha oxidación. Este ánodo está separado por una membrana de difusión de protones del cátodo de grafito aerobio donde el oxígeno es reducido formándose agua. Esta reducción del oxígeno puede ser un proceso biótico ó abiótico. Así, las pilas microbianas de combustible son dispositivos que ofrecen una alternativa para solventar la limitación de aceptores de electrones, favoreciendo la degradación anaerobia de contaminantes (Bond *et al.*, 2002). A este proceso se le denomina bioelectrogénesis.

Hay diversas adaptaciones del modelo general de las pilas microbianas de combustible. En este caso se han utilizado pilas microbianas sedimentarias, donde el ánodo se encuentra enterrado en un sedimento anaerobio mientras que el cátodo queda expuesto en la fase acuosa aeróbica que cubre el sedimento.

En el presente proyecto se ha ensayado la biodegradación anaeróbica del dibenzotiofeno en suelos contaminados bajo condiciones electrogénicas, bajo condiciones de biodegradación anaeróbica natural (control) y bajo condiciones no electrogénicas con aporte de un donador de electrones (lactato), demostrándose la importante mejora del proceso biológico de degradación cuando esta se lleva a cabo en una pila microbiana sedimentaria

De forma paralela y con el fin de evaluar la peligrosidad de la presencia de dibenzotiofeno en ecosistemas acuáticos, se han realizado ensayos de ecotoxicidad sobre algas verdes unicelulares, calculándose el valor de la concentración que provoca una inhibición del 50% de la población de algas (EC50). Por otra parte, como una forma de valoración del contenido microbiano activo en el ánodo de las pilas microbianas, se ha medido el contenido de ATP de las células inmovilizadas en estos ánodos de grafito.

2. INTRODUCCION

2.1. Características Físico-Químicas del Dibenzotiofeno

El Dibenzotiofeno ($C_{12}H_8S$) es un hidrocarburo policíclico aromático azufrado, compuesto de dos anillos bencénicos unidos por uno anillo tiofénico. Supone la mayor reserva de azufre en los combustibles fósiles (Kertesz *et al*, 2001).

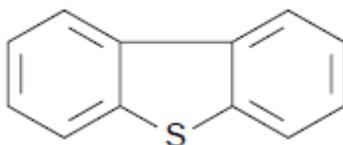


Figura 1: Molécula de Dibenzotiofeno.

El dibenzotiofeno (de aquí en adelante, nombrado como DBT) es una sustancia recalcitrante, difícil de eliminar de las diferentes fracciones del crudo, siendo por ello la molécula modelo en los estudios de desulfuración, junto con sus alquil derivados (Kilbane, J.J. 1990).

Durante la combustión de los combustibles fósiles, se produce la emisión de productos sulfurados a la atmósfera, tales como óxidos de azufre, que en contacto con el vapor de agua, se transforma en ácido sulfúrico, principal compuesto de la lluvia ácida. Este hecho, ha impulsado restricciones severas en los niveles de azufre de los combustibles. A nivel Europeo la Directiva 2003/17/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de marzo de 2003, por la que se modifica la Directiva 98/70/CE relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo, impuso que a partir del 1 de enero de 2009, el contenido máximo de azufre en los gasóleos de automoción y en las gasolinas no puede superar los 10 mg/kg.

El DBT es una sustancia apolar, con una límite de solubilidad en agua de 1,47 mg/L a 25 grados centígrados, siendo la solubilidad decreciente con la disminución de temperatura. Por el contrario, es muy soluble en acetonitrilo, etanol y benceno (Lide, D.R. 1994).

Su Coeficiente de adsorción de carbono orgánico (K_{oc}) oscila entre 5,3 y 18,9 con un valor medio de 11,120 (Yang *et al*, 1997). Estos valores y la determinación de su isoterma como lineal, apuntan hacia la tendencia del DBT a permanecer inmóvil en el suelo. De hecho el azufre del dibenzotiofeno y sus derivados puede persistir más de 3 años en el medio ambiente (Gundlach, E.R. *et al*, 1983). Debido a esta elevada persistencia el DBT puede acumularse en

los suelos o sedimentos de sitios donde se han producido vertidos, siendo frecuente encontrarlo en diversos entornos como el suelo y sedimentos de agua superficial y subterránea.

En el siguiente cuadro se resumen algunas de las características físico-químicas del DBT.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL DIBENZOTIOFENO (DBT)	
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₈ S
Masa molar	184,25 g/mol
Temperatura de ignición	> 450 °C
Solubilidad en el agua	1,5 mg/l(25 °C)
Punto de fusión	95-98 °C
Punto de ebullición	331-333 °C

Tabla 1: Características físico-químicas del DBT

No hay datos aún en literatura sobre la toxicidad del DBT en algas verdes unicelulares. Si los hay en cambio de *Daphnia magna*, cuyo LC50 (la concentración que resulta letal para el 50% de la población de dicho organismo) es 466 µg/L/48 horas (límite de confianza 95%: 324-708 µg/L/48 horas) (Eastmond, A. 1988).

2.2. Biodegradación del Dibenzotiofeno

La investigación sobre la degradación del DBT ha estado tradicionalmente enmarcada dentro de la industria petrolífera, donde de forma mayoritaria se ha eliminado, junto a otros componentes azufrados, mediante procesos de hidrodesulfuración. En dichos procesos se hace reaccionar una fracción petrolífera con hidrógeno gas, en presencia de un catalizador a altas temperaturas y presiones, transformándose el azufre en ácido sulfhídrico, un gas fácil de separar.

Paralelamente a la creciente restricción de las normativas de contenido en azufre en los combustibles, se implementó la investigación de los procesos de BIODESULFURACIÓN. En estos procesos los microorganismos toman el azufre de las moléculas aromáticas. Actualmente se continúa reforzando la investigación en esta área con el objeto de poder disponer en el futuro de diseños a nivel industrial para llevar a cabo la biodesulfuración, como un complemento a los procesos de hidrodesulfuración, pues de forma experimental son capaces de rebajar hasta 10 ppm los niveles de azufre en los combustibles (Kilbane, J.J. 2006) y ayudarían a rebajar el alto consumo energético del proceso de remoción del azufre de la industria del petróleo (Lizama *et al.*, 1995).

Así, la biodesulfuración aprovecha la especificidad de las enzimas y los bajos costes de las biotransformaciones, que se llevan a cabo en condiciones muy suaves de presión y temperatura, para la eliminación selectiva de azufre en los combustibles fósiles, lo cual resulta en un ahorro energético y un mayor potencial de eliminación del azufre, en forma de sulfito/sulfato o de sulfuro de hidrógeno.

En 1990 se confirmó que el producto mayoritario en la degradación bacteriana del DBT era el 2-hidroxibifenil (de aquí en adelante, nombrado como 2HBP), lo que suponía que las bacterias reducían los compuestos orgánicos sulfurados rompiendo en enlace carbono- azufre (Kim *et al*, 1990), siendo *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 la primera bacteria confirmada capaz de metabolizar el azufre de la molécula del DBT de forma selectiva sin verse afectado el valor energético del combustible (Kilbane, J.J. 1988). Esto fue un gran avance para el uso de la biodesulfuración en la industria de los combustibles fósiles pues es objetivo primordial que el esqueleto carbonado de las moléculas del combustible no se vea afectado para no disminuir su poder energético.

Así, las reacciones de los microorganismos capaces de degradar el DBT se pueden clasificar en:

- Oxidación del azufre: El DBT se comporta como un aceptor de electrones y se transforma en dibenzotiofeno sulfona y derivados hidroxilados (Lizama *et al*, 1995).
- Escisión carbono-carbono (Mecanismo destructivo): El esqueleto de carbono es destruido siguiendo la ruta de Kodama lo que no es favorable en la industria del petróleo, pues se disminuye el poder combustible del crudo (Kodama *et al*, 1973).
- Escisión específica del azufre (mecanismo no destructivo): deja el esqueleto de carbono del DBT intacto, sin rebajar el poder calorífico del petróleo (Monticello, D.J. 2000). Se produce como producto final el 2-HBP a través de la ruta 4S.

Los procesos de biodesulfuración pueden clasificarse según el tipo de metabolismo que lleven a cabo los microorganismos que los realizan, diferenciando metabolismo anaerobio (reductivo), aerobio (oxidativo) y aerobio facultativo (mixto), en función de la presencia o ausencia de oxígeno, ya que este actúa como aceptor de electrones en el proceso.

En el presente trabajo se va a evaluar la biodegradación anaerobia del DBT con población bacteriana indígena del suelo contaminado, poniendo especial atención en los procesos de biodesulfuración no destructiva. En estas condiciones la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans*

M6, es capaz de transformar el 42 % de DBT (Kim *et al*, 1990), generando 2-HBP, con ruptura del enlace C-S. Hay otras bacterias capaces de convertir el DBT en 2-HBP anaeróbicamente pero la desulfuración es muy baja. Dicha desulfuración, donde las bacterias utilizan el DBT como fuente de azufre, se lleva a cabo mediante la denominada ruta 4S, que se refleja a continuación en la figura 2.

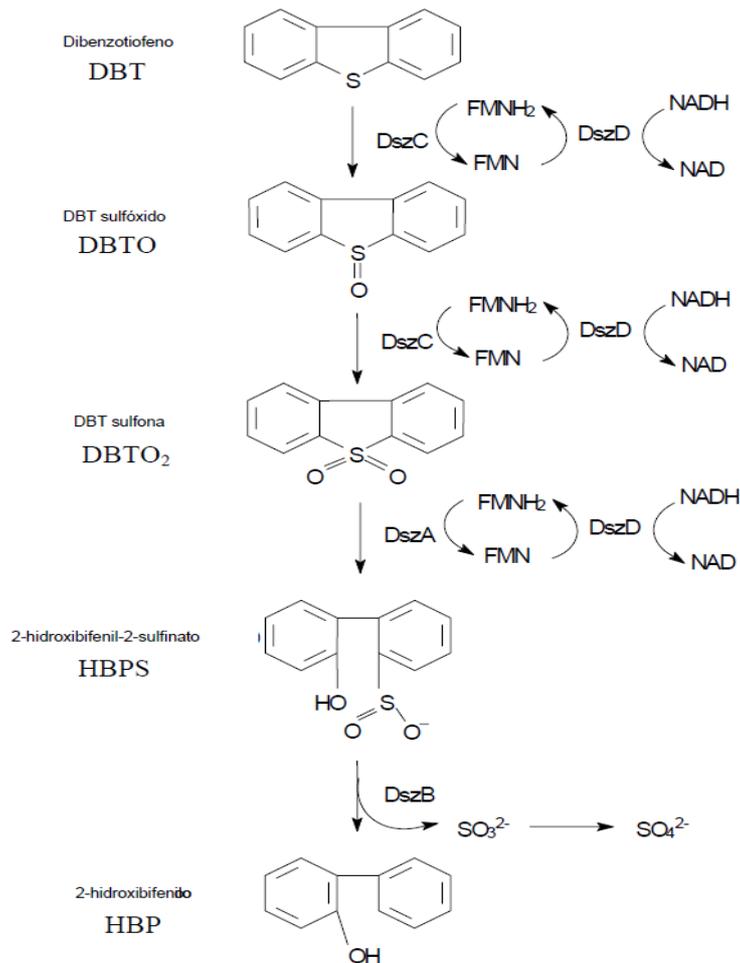


Figura 2: Ruta 4s. Desulfuración no destructiva del DBT.

La ruta es denominada 4S pues consta de 4 pasos enzimáticos catalizados por las enzimas DszC, DszA, DszD, DszB. La producción de las enzimas de la ruta está inducida por el DBT y reprimida por el sulfato o productos que contienen azufre en su molécula como los aminoácidos cisteína y metionina (Oldfield *et al*, 1997). Igualmente la acumulación de HBP también inhibe el crecimiento y la desulfuración (nekodzuka *et al*, 1997), siendo específicamente un potente inhibidor del segundo y cuarto paso de la ruta. En medio bifásico, el efecto de inhibición se ve atenuado, dado que el HBP es soluble en aceite.

Los genes que codifican estas enzimas constituyen el sistema *dsz*, y exceptuando el gen *dszd*, que se encuentra en el cromosoma de la célula, el resto están situados en un plásmido lineal.

En el año 2005 se aisló una bacteria denominada *Mycobacterium goodii* X7B que puede degradar el 2-HBF, a través de la denominada *ruta 4S extendida*, formando metoxibifenil (2-MBP) (Li, F. *et al*, 2005). El mecanismo aún no está claro y hasta ahora no se han reportado más cepas capaces de producir este producto metoxilado a partir del 2-HBP.

2.3 Bioelectrogénesis: pilas microbianas de combustible (MFCs)

Los microorganismos del suelo pueden degradar una gran diversidad de compuestos, entre ellos, los hidrocarburos aromáticos en condiciones anaerobias, pero aún así, estos compuestos persisten en los sedimentos y el suelo debido a la escasez de un aceptor de electrones que sostenga la respiración microbiana. (Widdel and Rabus, 2001)

Dentro de las técnicas de descontaminación *in situ* del medio natural por vía biológica, y que en conjunto se conocen como “biorremediación”, las hay que estimulan la población autóctona mediante la adición de estos aceptores de electrones (oxígeno, nitrato, sulfato y Fe (III)). Dichas técnicas presentan varios problemas para su aplicación pues se requiere un suministro continuado de los aceptores, con la dispersión que normalmente ocurre cuando se introduce un compuesto en un sistema abierto, además de los costes y energía que demandan estas operaciones de manipulación. A estos factores, hay que sumarle que muchos de los aceptores de electrones que se aportan sufren un rápido consumo abiótico, como el oxígeno mediante reacciones con el Fe (II) ((Borden *et al*, 1997).

Las pilas Microbianas de combustible ó Microbial Fuel Cells (de aquí en adelante, nombradas como MFCs ó Pilas microbianas), son dispositivos que ofrecen una alternativa para solventar la limitación de aceptores de electrones, favoreciendo la degradación anaerobia de contaminantes (Lovley, D. 2006). Estos dispositivos utilizan el metabolismo de las bacterias para producir una corriente de energía, a partir de la oxidación de un amplio rango de sustratos. Las pilas microbianas contienen un ánodo de grafito que actúa como aceptor de los electrones que provienen de la oxidación anaerobia de compuestos orgánicos. Este ánodo está separado por una membrana de difusión de protones del cátodo de grafito aerobio donde el oxígeno es reducido formándose agua. Esta reducción del oxígeno puede ser un proceso biótico ó abiótico.

Hay diferentes adaptaciones de las MFCs. Una de ellas son las pilas microbianas de combustible sedimentaria (de aquí en adelante nombradas como SMFCs ó pilas sedimentarias). En este diseño el ánodo se encuentra enterrado en un sedimento anaerobio, que haría las veces de

cámara anódica, mientras que el cátodo quedaría expuesto en la fase acuosa aeróbica que cubre el sedimento (figura 3).

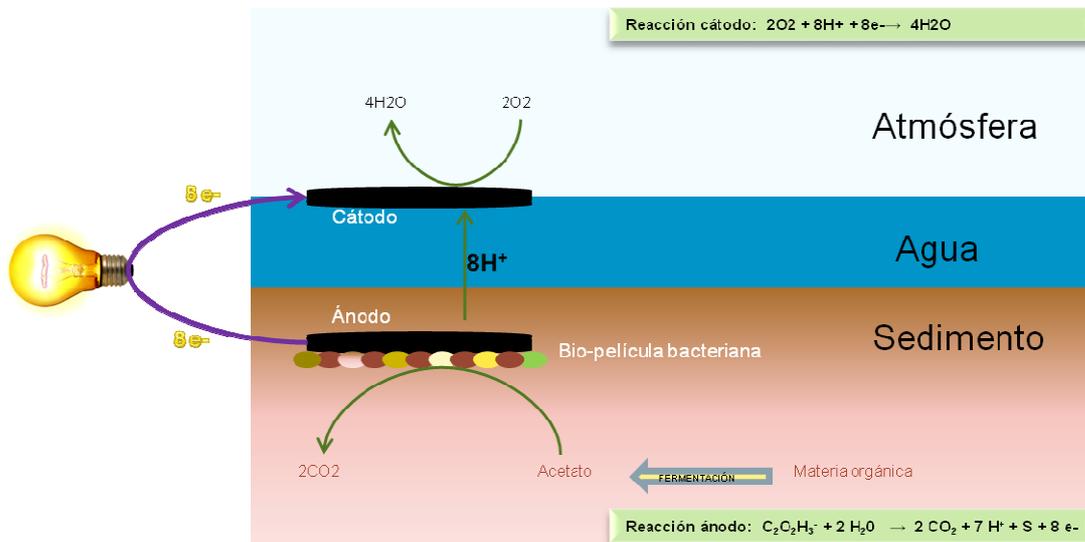


Figura 3: Pila microbiana de combustible sedimentaria (SMFCs).

Muchos microorganismos tienen capacidad de transferir electrones a electrodos de grafito enterrados en los sedimentos, y por ello se estima que existen una gran variedad de microorganismos que pueden oxidar en condiciones anaerobias los contaminantes presentes en el suelo (Lovley, D. 2003). Así los electrodos son un atractivo aceptor de electrones para estimular la degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos pues proporcionan un “sumidero” de electrones de bajo coste y mantenimiento a largo plazo.

Geobacter metallireducens fue el primer microorganismo en el que se confirmó la oxidación de benzoato con un electrodo como aceptor final de electrones (Bond *et al.*, 2002). Este microorganismo, al igual que el resto de bacterias electrogénicas (así se denominan por su capacidad final como productoras de electricidad) forman una biopelícula alrededor del electrodo (Imagen 1).

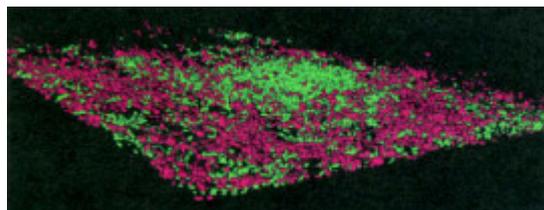


Imagen 1: Biopelícula bacteriana creciendo sobre un electrodo de grafito. (Microscopía de barrido confocal). Imagen tomada del libro Microbial fuel cells (Logan, B. 2002)

El creciente interés por la tecnología de las MFCs se debe en gran parte a *Geobacter sulfurreducens*, una bacteria con alta capacidad de producción de corriente. La búsqueda de fuentes de energía alternativas y limpias es actualmente una necesidad de primer orden. El descubrimiento de bacterias que pueden usarse para producir electricidad a partir de un amplio grupo de sustancias orgánicas y residuos hace de estos mecanismos una posible fuente de energía limpia (Franks *et al*, 2010).

La producción de energía es variable en estos dispositivos. Las reacciones en el cátodo y el metabolismo bacteriano producen pérdidas de energía y depende de estas el voltaje, normalmente de 0.3-0.5 Voltios, que se puede obtener en las MFCs a partir de sustratos orgánicos como la glucosa o el acetato y utilizando ánodos pequeños, en el rango de cm² (Logan, B. 2009). Se han llegado a obtener de forma experimental, 140 vatios/m³ de potencia en pilas fotosintéticas, una variante de las MFCs que aprovecha la energía solar para producir energía química, pero económicamente no es rentable aún reproducir el dispositivo a gran escala. (Rosenbaum *et al*, 2010).

Las pilas sedimentarias se han comenzado a utilizar para confirmar la eficacia de la bioremediación subterránea en condiciones anóxicas monitorizando con un electrodo in situ la zona contaminada, en concreto suelos contaminados con uranio VI (Iovley, D. 2003).

Una de las áreas más activas en la investigación de las MFCs es la producción de energía a partir de aguas residuales combinada con la oxidación de compuestos orgánicos ó inorgánicos. Muchos estudios están demostrando que algunos compuestos biodegradables complejos pueden producir electricidad como la celulosa, paja de trigo, el agua residual doméstica, residuos de la industria cervecera y del chocolate, mezclas de ácidos grasos, contaminaciones de petróleo y lixiviados de vertedero. El problema para su aplicación en la depuración de aguas residuales radica en la baja tasa de degradación del sustrato y en que los experimentos a escala de laboratorio requieren amplios estudios para su extrapolación a una escala de tratamiento en planta depuradora (Pant *et al*, 2009).

Quizá la aplicación práctica más importante hasta ahora de las Pilas microbianas, desde el punto de vista energético, es servir como fuente de energía de larga duración en ambientes remotos. Ya en 2008 se comenzó a utilizar equipos de registro electrónico de datos meteorológicos alimentados por estos dispositivos, transfiriéndose los datos a tiempo real por señales de radiofrecuencia (Tender *et al*, 2008). Este mismo año ha sido confirmada la efectividad de una pila bentónica (variante de las MFCS, en la que el cátodo está situado en agua de mar y el ánodo está dispuesto bajo los sedimentos anóxicos), como fuente de energía para un sensor de oxígeno

y un modem acústico sumergidos en el fondo del mar, con una plataforma capaz de acumular energía, y se están realizando pruebas para sensores de salinidad, presión, PH y velocidad del agua (Gong *et al*, 2011).

Sin embargo, es posible que la capacidad de las comunidades microbianas de una MFC para degradar un amplio rango de contaminantes en el medio ambiente sea una aplicación más interesante que la propia producción de electricidad, especialmente cuando esta tecnología puede ser usada como técnica de biorecuperación *in situ*. El uso de un electrodo como aceptor de electrones permite a las bacterias responsables de la degradación localizarse conjuntamente con el contaminante en el ánodo de grafito incrementándose los porcentajes de biodegradación.

Distintas cepas bacterianas del género *Geobacter* han demostrado ser importantes en la degradación de compuestos del petróleo y lixiviados de vertedero en aguas subterráneas (Rooney-Varga *et al* 1999) cobrando importancia las aplicaciones en biorecuperación de acuíferos. Recientemente, demostraron la posibilidad de acoplar la oxidación de hidrocarburos aromáticos (tolueno, benceno, naftaleno) llevada a cabo por *Geobacter metallireducens* con la transferencia de electrones en una pila sedimentaria (Zhang *et al*, 2010).

En el área de investigación de las pilas microbianas, en estos momentos se están poniendo a prueba nuevos diseños (como las pilas de cátodo doble) y materiales novedosos (separadores de fibra de vidrio, cepillos de fibra de grafito, etcétera) para afrontar los grandes retos de la investigación de las pilas microbianas, como son aumentar la energía que producen estos dispositivos, aumentar la eficiencia culombimétrica (número de culombios recuperados como corriente eléctrica, comparada con el número máximo teórico de culombios recuperables a partir del sustrato orgánico añadido al sistema) y reducir el coste de los materiales utilizados (Zhang *et al*, 2010).

3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Objetivos principales:

1. Evaluar la utilización de las pilas sedimentarias en la degradación in situ de un compuesto aromático heterocíclico (*dibenzotiofeno*), empleando la comunidad microbiana autóctona.
2. Comparar la biodegradación en condiciones electrogénicas, con la degradación natural y con la que se lleva a cabo en un suelo estimulado mediante adición de nutrientes (lactato).

De forma complementaria a este objetivo principal se han abordado 2 objetivos secundarios relacionados:

3. Determinar la toxicidad del DBT en algas verdes unicelulares y la capacidad de detoxificación de las SMFCs.
4. Valorar cuantitativamente la comunidad bacteriana en los ánodos de las pilas sedimentarias, a través de ensayos de ATP.

4. METODOLOGIA

4.1. Muestreo

Se han tomado muestras de suelo sedimentario de la localidad de Calasparra (Murcia). La muestra se ha recogido en un único punto y guardado en un recipiente hermético hasta el inicio de los ensayos.

Se ha realizado una caracterización físico-química del suelo debido a que ésta va a determinar las interacciones con el DBT y sus productos de degradación. Para la determinación de la textura, que es la relación existente entre los contenidos de las diferentes fracciones granulométricas que constituyen el suelo, se ha procedido al desagregado del suelo con trituración suave tras secado en bandeja y se han separado las distintas fracciones mediante tamizado para las arenas y sedimentación para separar limos y arcillas. Finalmente se han cuantificado las distintas fracciones en base a la clasificación que se muestra en la tabla 2 y determinado la clase textural.

FRACCIÓN GRANULOMÉTRICA	TAMAÑO
Fracción gruesa	Partículas >2mm (bloques, piedras, gravas)
Tierra fina	Partículas <2 mm
Arena	Partículas entre 2-0,05 mm (2-0,02 mm)
Limo	Partículas entre 0,05-0,002 mm (0,02-0,002 mm)
Arcilla	Partículas <0,002 mm

Tabla 2: Clasificación granulométrica según tamaño (escala granulométrica USDA).

Para la determinación del pH se han mezclado 10g de suelo con 25 ml de agua destilada y al cabo de una hora se ha medido con electrometría. En el filtrado se ha medido la conductividad mediante conductivimetría.

4.2. Ensayos de biodegradación

4.2.1. Componentes y montaje

Las pilas microbianas sedimentarias ó SMFCs se han elaborado en recipientes de material plástico que constituyen espacios estancos de igual tamaño. Los ánodos se han construido dentro de estructuras cilíndricas para impedir la difusión de los pulsos de contaminante. Se ha utilizado fieltro de grafito y grafito sólido formando un habitáculo para 7 gramos de suelo seco en su interior. El suelo utilizado en los ánodos (7 gramos en cada uno de ellos) no tiene

tratamiento previo, para conservar y reproducir lo más fielmente posible sus características naturales y por lo tanto su actividad biológica.

El ánodo está enterrado en 300 gramos de suelo, el cual se ha cubierto con una lámina de agua de 0,5 cm para evitar la difusión de oxígeno y generar condiciones anóxicas. El cátodo consiste en un fieltro de grafito flotando sobre el agua

Los ánodos y cátodos se han conectado a un multímetro programado para realizar medidas de potencial eléctrico cada 10 minutos en todas las pilas (foto 1). Se han utilizado resistencias de 1000Ω .

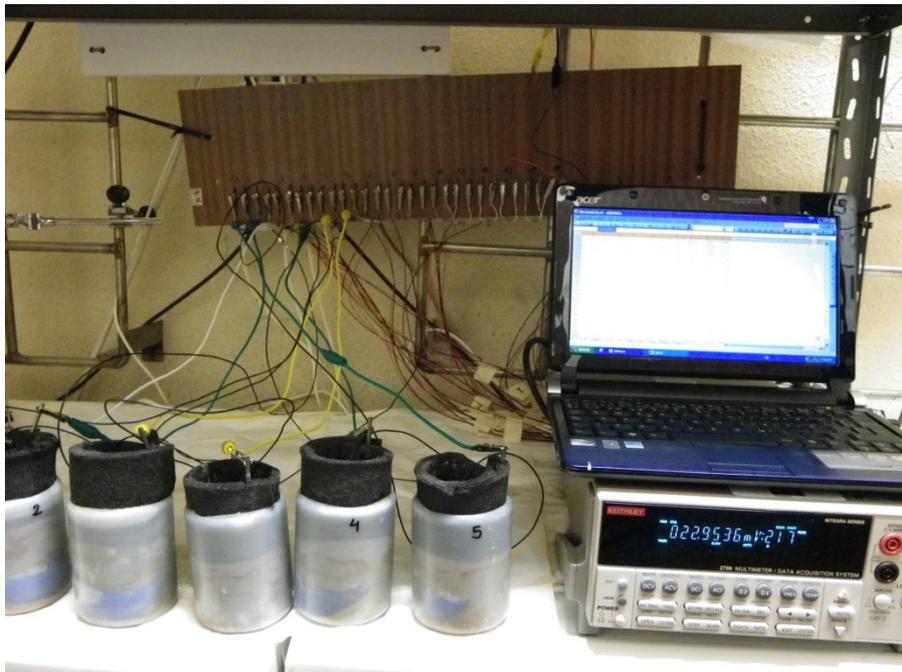


Foto 1: Multímetro realizando registro de la diferencia de potencial en las pilas sedimentarias.

Las pilas microbianas requieren de un tiempo de estabilización (4 semanas aproximadamente) una vez conectadas por lo que no se han realizado ensayos en ellas hasta que los potenciales se han mantenido estables.

4.2.2. Ensayos de biodegradación

Se han realizado ensayos de biodegradación anaeróbica del DBT en suelos contaminados bajo condiciones electrogénicas, bajo condiciones de biodegradación natural (control), y bajo condiciones de biodegradación con aporte de un donador de electrones, el lactato.

A continuación se especifican las características de cada uno de los ensayos de biodegradación realizados:

- ❖ Ensayo de biodegradación natural: Utilizado para ser comparado con las SMFC y ver si el proceso se ve favorecido en condiciones electrogénicas. Se han utilizado 9 pilas, con 10 gramos de suelo, sin conectar sobre las que se ha inyectado un pulso de DBT y se han realizado las extracciones inmediatamente después de dicho pulso de DBT, tras 1, 2, 7 y 14 días.
- ❖ Ensayo de biodegradación con aporte de lactato: Utilizado para analizar el efecto de un donador de electrones (lactato) en la tasa de degradación del DBT. Se han realizado 9 ensayos, con 10 gramos de suelo, sin conectar, sobre las que se ha inyectado un pulso de DBT y se han realizado las extracciones inmediatamente después del pulso de DBT, tras 1, 2, 7 y 14 días.
- ❖ Ensayo de biodegradación en condiciones electrogénicas: Se han utilizado 6 pilas conectadas al multímetro en las que se inyecta un pulso de DBT y se realizan extracciones inmediatamente después del pulso, tras 1, 2, 7, 14 y 28 días.
- ❖ Control abiótico: Esta pila se utiliza como indicador de que la generación de corriente está asociada a la actividad biológica. El suelo que conforma la cámara anódica, tanto dentro del ánodo, como fuera de éste, se autoclava y se expone a radiación ultravioleta con objeto de esterilizar el sedimento, eliminando la actividad biológica. Se le inyectan 2 pulsos de acetato a las 24 horas y a la semana tras el tratamiento.

Finalmente se han utilizado otras 2 pilas en condiciones electrogénicas. A una de ellas se le inyecta dos pulsos de DBT espaciados una semana respectivamente para ver si existe una optimización de la biodegradación con pulsos consecutivos en la misma pila. La otra pila se utiliza en los ensayos de ATP. Con anterioridad a dicho ensayo se mantiene conectada y se le aplica un pulso de acetato para confirmar que posee actividad microbiana.

En la siguiente tabla se representa de forma esquemática, los diferentes ensayos.

ENSAYOS EN CONDICIONES ELECTROGÉNICAS.

- **Pila T0:** Ánodo extraído inmediatamente después del pulso de DBT
- **Pila T1:** Ánodo extraído tras 1 día desde pulso de DBT
- **Pila T2:** Ánodo extraído tras 2 días desde el pulso de DBT
- **Pila T3:** Ánodo extraído tras 7 días desde pulso de DBT
- **Pila T4:** Ánodo extraído tras 14 días desde el pulso de DBT
- **Pila T5:** Ánodo extraído tras 28 días desde el pulso de DBT
- **Pila ATP:** Ánodo extraído tras 5 semanas para realizar el ensayo de ATP.
- **Pila DBT:** Pila con varios pulsos de DBT. Ánodo no extraído.
- **Pila abiótica:** Control abiótico.

ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN NATURALES.

- **Ensayo T0:** Suelo extraído inmediatamente después del pulso de DBT.
- **Ensayo T1a:** Suelo extraído tras 1 día desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T1b:** Suelo extraído tras 1 día desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T2a:** Suelo extraído tras 2 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T2b:** Suelo extraído tras 2 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T3a:** Suelo extraído tras 7 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T3b:** Suelo extraído tras 7 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T4a:** Suelo extraído tras 14 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T4b:** Suelo extraído tras 14 días desde el pulso de DBT.

ENSAYOS NO ELECTROGÉNICOS CON CONTACTO.

- **Ensayo T0+L:** Suelo extraído inmediatamente después del pulso de DBT.
- **Ensayo T1a+L:** Suelo extraído tras 1 día desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T1b+L:** Suelo extraído tras 1 día desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T2a+L:** Suelo extraído tras 2 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T2b+L:** Suelo extraído tras 2 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T3a+L:** Suelo extraído tras 7 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T3b+L:** Suelo extraído tras 7 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T4a+L:** Suelo extraído tras 14 días desde el pulso de DBT.
- **Ensayo T4b+L:** Suelo extraído tras 14 días desde el pulso de DBT.

Tabla 3: Ensayos de biodegradación del DBT

4.2.3. Pulsos

Las disoluciones para realizar los pulsos en las MFCs son las siguientes:

- ✓ Disolución de DBT 30 ppm (0,162 μ moles) en tampón fosfato.
- ✓ Disolución de acetato 20 milimolar en tampón fosfato.

Ambas disoluciones se han llevado a anaerobiosis mediante tratamiento con nitrógeno diez minutos en la fase líquida y gaseosa respectivamente. Los tubos se han sellado con tapón de goma y se han mantenido a 4°.

En todos los casos los pulsos se han realizado mediante inyección de 1 ml de disolución en el interior del ánodo.

4.2.4.Desorción del DBT

Trascurrido el tiempo de ensayo preestablecido para cada una de los ensayos, se ha procedido a la extracción del DBT para su posterior medida en HPLC (Figura 4).

En primer lugar se han extraído los ánodos de las pilas sedimentarias. Se han dejado el suelo y el grafito de forma separada en contacto con acetonitrilo, agitando 96 horas. Tras sonicar las muestras durante 60 minutos se han centrifugado a 5000 rpm durante 20 minutos y se ha filtrado la totalidad del sobrenadante a botes de boca ancha de cristal.

Finalmente se ha realizado una concentración de las muestras llevándolas a sequedad mediante evaporación y se han reconstituido en 2 ml de Acetonitrilo. Este volumen se ha pasado a viales para su medida en HPLC.

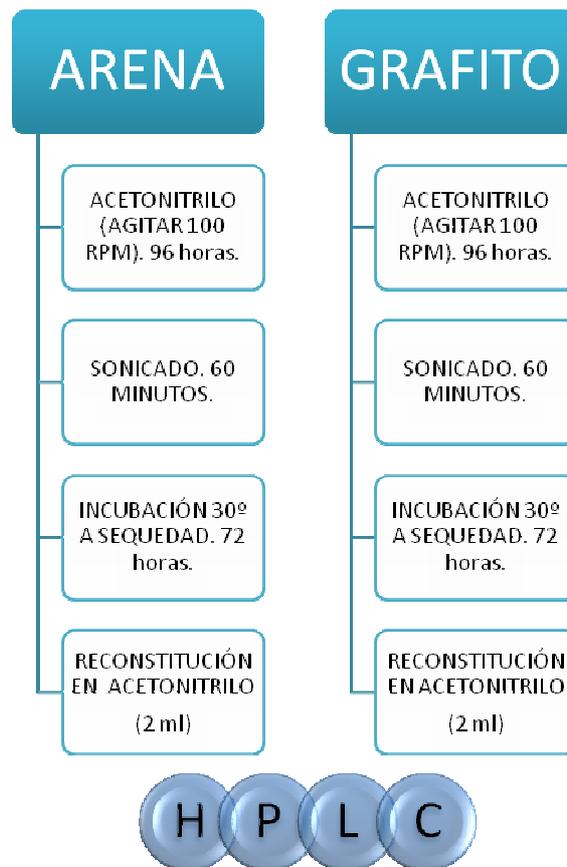


Figura 4: Proceso de desorción del DBT para su análisis en HPLC

4.2.5. Análisis de DBT con HPLC.

➤ Características del equipo empleado:

Para la determinación cuantitativa del DBT y sus productos de degradación, se ha empleado la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). El equipo de marca Varian, controlado mediante el software GALAXIE, consta de los siguientes componentes:

Bomba Varian Prostar 230 Consta de tres canales de bombeo independientes, que permite trabajar en gradiente de elución.

Autosampler Varian 410. Con capacidad para 84 viales de 2 ml de capacidad nominal. Consta además de un horno termostatazador de columnas

Detector diodo array Varian Star 9040: permite la detección simultánea en un amplio rango de longitudes de onda, tanto en el rango visible como en el ultravioleta

Columna analítica: se ha empleado una columna analítica marca Phenomenex. Concretamente una C8, 150 x 4,60 mm, 3 μ m y 100 Å.

➤ Método analítico

Como Eluyente se ha utilizado acetonitrilo y agua en proporción 60/40 con un flujo de bombeo constante a 1 ml/min. La detección se realiza a 2 longitudes de onda simultáneamente, 210 y 239 nm. El volumen de inyección de las muestras a analizar es de 50 μ l.

➤ Equipo y material auxiliar:

Campana de flujo laminar: Marca EUROAIRE modelo ASB120, para las operaciones de manipulación que requerían condiciones de esterilidad

Centrífuga: Marca EPPENDORF modelo 5804R, con rotor con capacidad máxima de carga de 6 x 85 ml y una velocidad máxima de agitación de 16100 rpm.

Equipo incubador de Braun-Biotech s.a. International: Para mantener a las algas a 23 °C \pm 2, bajo luz blanca y agitación continua.

Autoclave: Se emplea para la esterilización por calor del material y los medios empleados durante los ensayos.

Jeringa y filtros Millex gv de 0.22 μ m: Utilizados para filtrar los extractos obtenidos a partir de la SMFC.

Balanza de precisión: Marca Sartorius, modelo BP610. Esta balanza permite obtener pesadas del orden de miligramos con una fiabilidad de \pm 0,1 mg.

4.2.6. Eficiencia de una pila.

Una medida común de la eficiencia de una pila microbiana es la carga transferida ó número de culombios recuperados como corriente eléctrica, comparada con el número máximo teórico de culombios recuperables a partir del sustrato orgánico añadido al sistema.

La eficiencia depende de los microorganismos que están llevando a cabo la oxidación del sustrato orgánico y de los electrones generados por éste (Lee *et al*, 2008). De esta manera, para conseguir la mayor cantidad teórica de energía a partir de un sustrato orgánico, dicho sustrato necesita ser completamente oxidado y producirse una eficiente transferencia de electrones al ánodo.

La Intensidad de corriente transferida en el circuito cerrado de la pila, se calcula a través de la Ley de Ohm y calculando la integral de la curva de Intensidad (en amperios) frente al tiempo (en segundos) se obtiene carga trasferida en cada uno de los ensayos.

Con los datos de la carga transferida desde el ánodo al cátodo, y aplicando la ley de Faraday se obtienen los moles de electrones envueltos en el proceso de degradación de un compuesto orgánico.

Para hallar la eficiencia culómbimétrica, se compara los moles transferidos en la pila microbiana, con lo moles teóricos que genera la oxidación del sustrato. En el presente estudio se utilizan el DBT y el acetato.

La oxidación completa de un mol de DBT genera 56 moles de electrones y la de acetato genera 8 moles de electrones como se observa en las ecuaciones estequiométricas de la oxidación total del DBT y el acetato respectivamente en la siguiente figura.

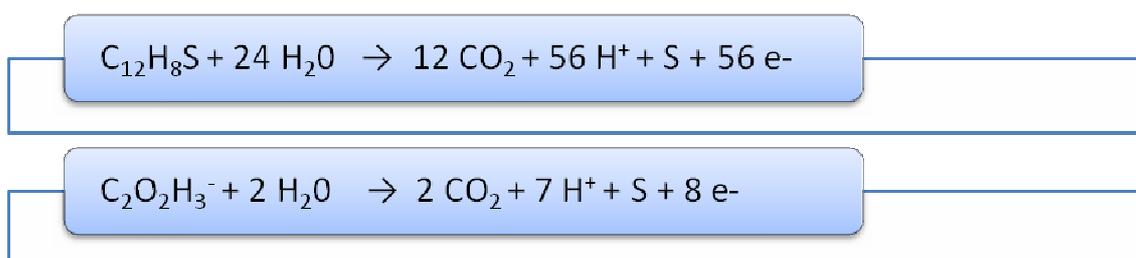


Figura 5: Ecuaciones de oxidación del acetato y DBT

4.3. Ensayo Ecotoxicidad del DBT

4.3.1. Preparación del ensayo

La norma internacional ISO 8692: 2004 especifica un método para la determinación de la inhibición del crecimiento de las algas verdes unicelulares por los efectos de las sustancias y mezclas contenidas en el agua o en el agua residual. En el caso que ocupa, se determinan los efectos inhibidores del *Dibenzotiofeno* (DBT). (Para más detalles consultar Anejo 2)

Para llevar a cabo el ensayo se cultivan varias generaciones de cepas de algas de una misma especie (*Pseudokirchneriella subcapitata*). El precultivo debe iniciarse entre 2 y 4 días antes del comienzo del análisis. El medio de crecimiento (Agua desionizada con diferentes volúmenes de 4 soluciones de nutrientes), se inocula con una concentración celular de 5×10^3 y 5×10^4 células por mililitro con objeto de mantener el crecimiento exponencial hasta que comience el ensayo. Este precultivo en fase exponencial de crecimiento se utiliza como inóculo para el ensayo. Se mide la concentración celular del precultivo inmediatamente antes de la utilización, a fin de calcular el volumen de inóculo necesario.

Se preparan los lotes de ensayo, mezclando 5 μ l del inóculo de algas unicelulares y 200 μ l de medio de ensayo (medio de crecimiento + DBT). En los diferentes medios de ensayo, se dispone de una concentración distinta del contaminante en (5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm, 0,625 ppm y 0,312 ppm). De cada una de las concentraciones se realizaron 4 réplicas. Junto a estos ensayos se dispusieron 4 réplicas de una solución testigo (medio de crecimiento y algas) y 4 réplicas de medio de crecimiento (blanco). En estas últimas 4 réplicas se añaden 5 μ l de medio de crecimiento para compensar el volumen que no se le añade de algas, finalizando todos los ensayos y réplicas con 205 μ l.

La placa Elisa sobre la que se disponen los ensayos se incuba durante un periodo de 96 horas durante el cual se mide la concentración celular en cada uno de ellos al menos cada 24 horas. La inhibición del crecimiento celular se mide como la disminución de la tasa de crecimiento en comparación con cultivos testigos (sin DBT: medio de crecimiento y algas) realizados en idénticas condiciones.

El mismo procedimiento desarrollado anteriormente con diferentes concentraciones de DBT puro, se repite con los extractos obtenidos en los ensayos electrogénicos de las pilas sedimentarias T0, T4 Y T5.

Las medidas fueron realizadas con el espectrofotómetro ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas). Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. Estos lectores disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son las que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de las muestras. En el caso que nos ocupa la densidad óptica se mide a 630 nm. El espectrofotómetro ELISA nos proporciona las medidas en unidades de absorbancia.

4.3.2. Cálculo de la ecotoxicidad

A partir de los datos obtenidos del crecimiento celular en cada uno de los ensayos y réplicas se realizan una serie de cálculos para obtener la toxicidad del DBT:

- La absorbancia media del medio de crecimiento (blanco) para los diferentes tiempos se restará a las medidas de absorbancia que se han realizado en la solución testigo (medio de crecimiento +algas) y en los diferentes lotes de ensayo (muestra de crecimiento + algas + muestra de ensayo (DBT)) con objeto de alcanzar una media de densidad óptica, como medida indirecta de la concentración de algas.
- Con los datos de densidad óptica obtenidos se traza la curva de crecimiento para cada uno de los ensayos, incluida la solución testigo. Esta curva sigue un desarrollo exponencial y aplicando logaritmos a cada uno de los términos de la función, se obtiene una nueva función lineal de la forma $Y = A + BX$ donde B, la pendiente de la recta, es la tasa de crecimiento específicas para cada uno de los ensayos. Una función de crecimiento lineal indica un crecimiento exponencial, mientras que la aparición de una meseta indica que los cultivos entran en fase estacionaria. En el caso de que, al final del tiempo de exposición, los cultivos testigo muestren una tasa de crecimiento en declive, los cultivos inhibidos pueden tener tendencia a alcanzar a los testigos, simulando falsamente una disminución en la tasa de inhibición. Para ello se calculan las tasas de crecimiento y la inhibición del crecimiento basándose en las medidas efectuadas en el periodo de crecimiento exponencial de los cultivos testigo.
- Partiendo de las 4 réplicas de cada ensayo, se obtienen 4 tasas de crecimiento para cada uno de los ensayos (la pendiente de la ecuación que hemos obtenido), con las que se calcula una media aritmética de la tasa de crecimiento. Una vez se dispone de una tasa

de crecimiento para cada ensayo realizado, y a través de la siguiente ecuación se calcula el porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ inhibición DEB muestra } i = 100 \frac{(\text{tasa de crecimiento solución testigo} - \text{tasa de crecimiento muestra } i)}{\text{tasa de crecimiento solución testigo}}$$

4.4. Ensayo de ATP en ánodos de SMFCs.

El ensayo de ATP permite disponer de una medida indirecta de la comunidad microbiana del ánodo que genera la actividad electrogénica en las pilas sedimentarias.

Consiste en un ensayo de bioluminiscencia para determinar cuantitativamente el ATP con una luciferasa luciérnaga recombinante y su sustrato d-luciferina. El ensayo se basa en las necesidades de ATP de la luciferasa para producir luz (emisión máxima 560 nm a PH 7). Estos ensayos son extremadamente sensibles. La mayoría de luminómetros detectan hasta 0,1 picómetros de ATP.

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



En las reacciones de bioluminiscencia, el compuesto luciferina se oxida, reacción que cataliza la enzima luciferasa, formando un peróxido intermedio que al romperse, genera moléculas producto. Una de las cuales, se encuentra en estado excitado o de alta energía, y cuando vuelve a su estado fundamental, se emite un fotón (luz).

Para llevar a cabo el ensayo se preparan 10 ml de reactivo, que utilizados junto a la solución estándar de ATP, se genera la recta de calibrado en el luminómetro a diferentes concentraciones de ATP.

Una vez trazada la recta de calibrado se realiza el test con el extracto de reactivo que obtenemos tras estar en contacto el grafito con el reactivo durante tres minutos a 30 grados centígrados. Los ensayos se realizan tanto con grafito felpa, como con grafito sólido pertenecientes a un ánodo que se mantuvo 4 semanas en condiciones electrogénicas (Pila ATP) y las medidas se realizan en un luminómetro marca Fluoroskan Ascent FL, modelo Thermo scientific.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización del suelo.

Los resultados de la caracterización físico-química del suelo se muestran a continuación en la tabla 4:

Parámetro	Resultado
Profundidad (cm)	0-20
% grava	62
% arcilla	36
% limo grueso	13,6
% limo fino	21,3
% arena	29
Clase Textural	Franco arcilloso
% humedad hasta saturación	44,74
Conductividad ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	339
PH	7,97
% materia orgánica	0,1766
%Carbono orgánico total	0,1024
% carbonato cálcico	52,03

Tabla 4: Caracterización físico-química del suelo utilizado en los ensayos.

El suelo utilizado en los ensayos tiene un contenido de materia orgánica muy bajo, y la humedad hasta saturación es superior al 44%, siendo su textura franco-arcillosa.

5.2. Diferencia de potencial eléctrico en pilas sedimentarias

En el gráfico 1 se observa un aumento de la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo progresivo tras el pulso de acetato en todas las pilas sedimentarias, siendo el periodo de respuesta de unas 30 horas en todos los casos.

PULSO DE ACETATO

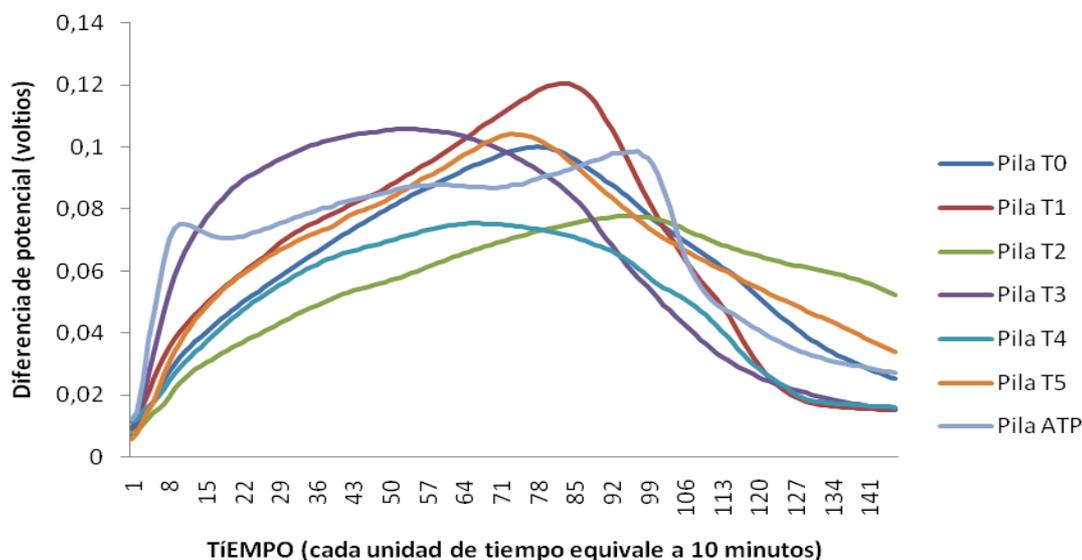


Gráfico 1: Medidas de la diferencia de potencial eléctrico registrados tras el pulso de acetato.

Tres semanas después se realiza en las mismas pilas un pulso de DBT, la sustancia contaminante en cuestión, obteniéndose también respuesta electrogénica, como se puede observar en el gráfico 2. En el caso de la pila T0, la diferencia de potencial cae a un nivel 0, pues ha sido extraído el ánodo para su análisis.

PULSO DBT

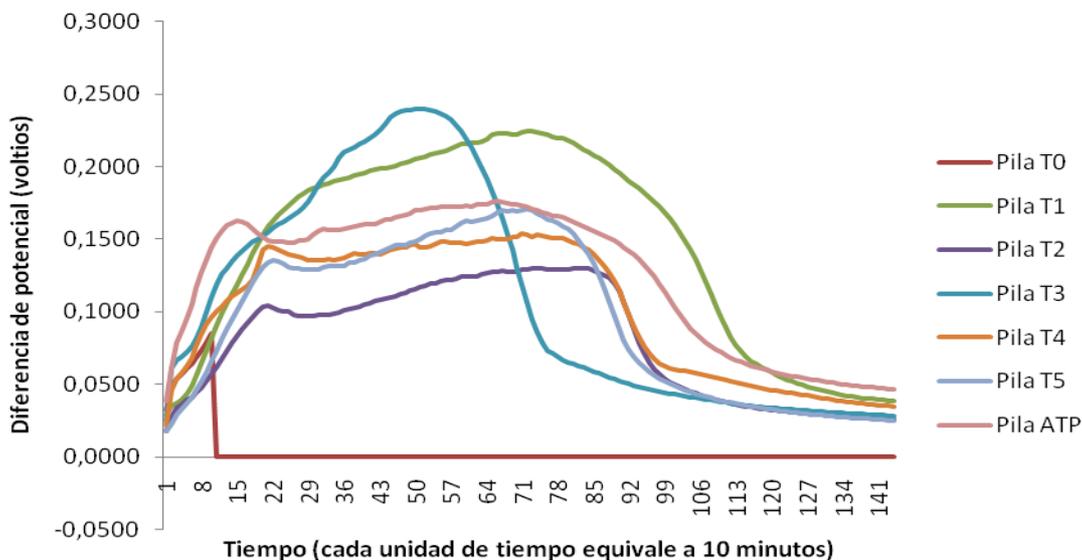


Gráfico 2: Medidas de la diferencia de potencial eléctrico registrados tras el pulso de DBT.

El gráfico 3 muestra la respuesta de forma comparada, de la pila T3 al pulso de acetato y al pulso con DBT.

RESPUESTA ACETATO-DBT

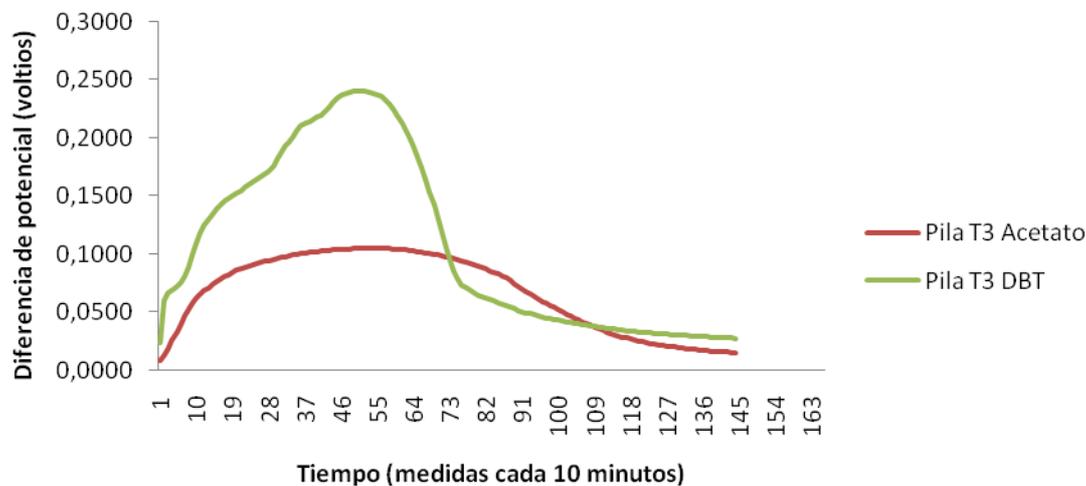


Gráfico 3: Respuesta comparativa de la diferencia de potencial en la pila sedimentaria 3 al pulso de acetato y DBT.

Los resultados obtenidos al realizar un segundo pulso de DBT en la pila DBT se muestran en el Gráfico 4 y el gráfico 5 muestra la respuesta del pulso de acetato en el control abiótico, cuyo suelo no tiene actividad biológica (estaba previamente autoclavado y expuesto a rayos ultravioletas)

PILA DBT

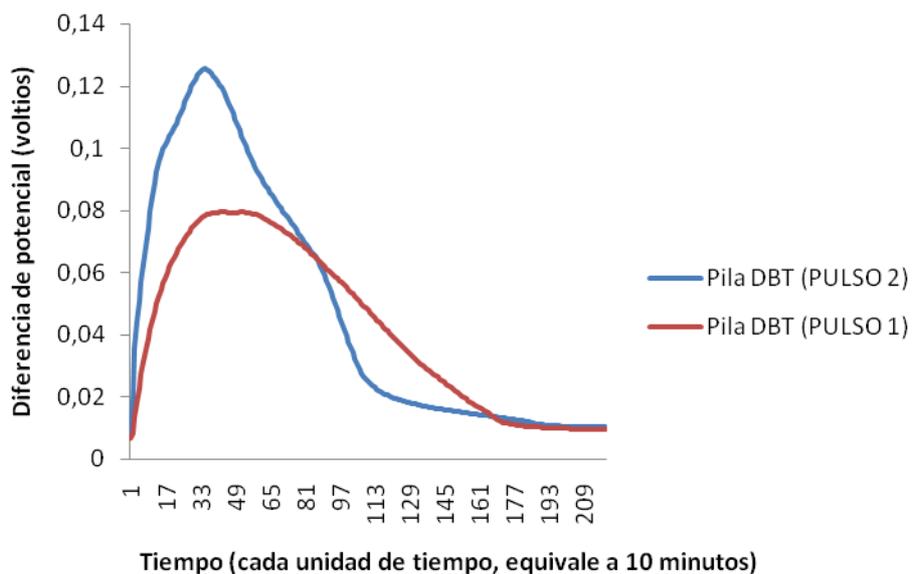


Gráfico 4: Medidas de la diferencia de potencial ante el doble pulso de DBT en la pila DBT

Pulso de acetato. Pila abiótica

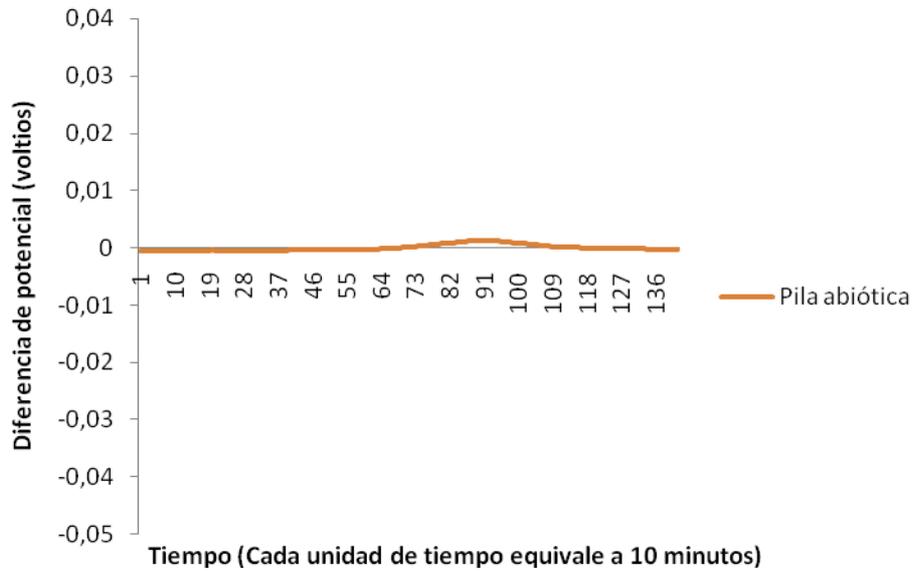


Gráfico 5: Respuesta de la pila abiótica al pulso de acetato.

El gráfico 6 muestra la intensidad (en Amperios) frente al tiempo (en segundos) de la pila T3, en respuesta al pulso de acetato. Se ha calculado el área de la función, que corresponde a la carga transferida entre el ánodo y el cátodo de esta pila. Dicho cálculo se ha realizado con el resto de las pilas sedimentarias para los pulsos de DBT y acetato. Los datos están recogidos en la tabla 4, junto con los milimoles de electrones que se han transferido en cada uno de los casos

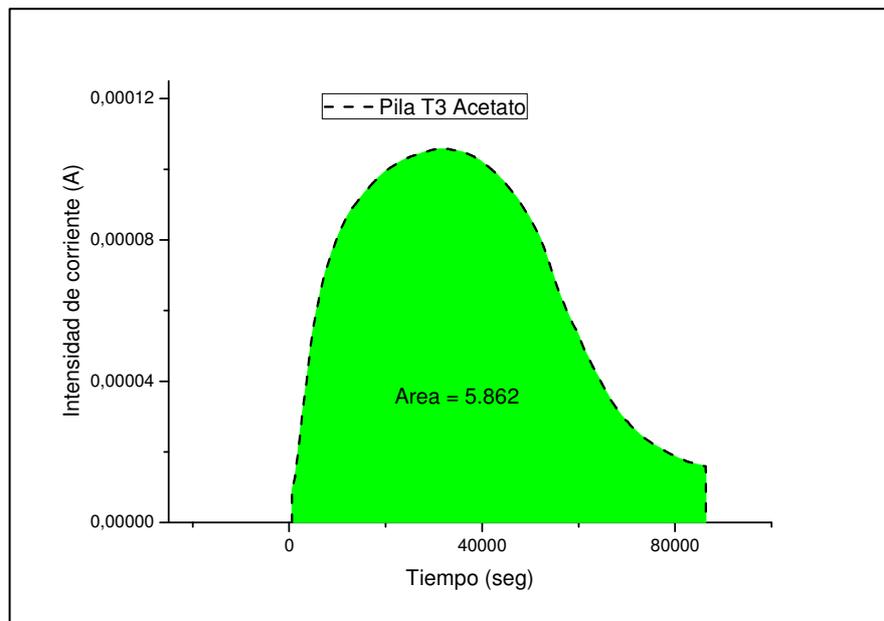


Gráfico 6: Área de la curva intensidad de corriente frente al tiempo

	Carga acetato ©	Carga DBT©	mMOLES Acetato	mMole DBT
Pila T0	5,565	ánodo extraído	0,058	ánodo extraído
Pila T1	5,849	12,494	0,061	0,129
Pila T2	4,932	6,921	0,051	0,072
Pila T3	5,862	9,361	0,061	0,097
Pila T4	4,348	8,767	0,045	0,091
Pila T5	5,869	8,217	0,061	0,085
Pila ATP	6,008	10,756	0,062	0,111

Tabla 5: Valores de carga (Q) y miniMoles de electrones transferidos en cada SMFCs.

Con objeto de calcular la eficiencia culómbimétrica, se ha comparado los moles transferidos en la pila microbiana, con lo moles teóricos que genera la oxidación total del DBT y del acetato.

En el pulso de acetato se introdujeron 0,020 milimoles que en oxidación total producen 0,160 milimoles de electrones. En los resultados empíricos se observa que se han generado una media de 0,057 milimoles de electrones., lo que implica una eficiencia de 35 %. En cambio en un pulso de DBT se introducen 0,000162 milimoles en la cámara anódica, que partiendo de la reacción estequiométrica de la oxidación de éste, deben producir 0,0090 milimoles de electrones. En los resultados de las pilas sedimentarias se observa una transferencia media de 0,097 minimoles de electrones, lo que supera en un orden de magnitud el rendimiento teórico.

5.3. Biodegradación del DBT.

Con las áreas de DBT obtenidas tras el análisis con HPLC de los extractos de suelo, se han realizado los cálculos de las concentraciones presentes del compuesto para los distintos ensayos. De esta manera, se ha comparado la velocidad de desaparición del contaminante bajo condiciones electrogénicas, bajo condiciones de degradación natural y bajo condiciones no electrogénicas con estimulación de un donador de electrones (lactato)

Para realizar los cálculos de concentración expresados como $\mu\text{moles DBT/g}$ suelo seco, se han tenido en cuenta los siguientes factores:

1. Gramos de suelo extraídos de los diferentes ensayos.
2. Factor de concentración de los extractos de suelo.
3. Contenido de humedad hasta saturación del suelo (44 %).

Los cálculos realizados en cada uno de los ensayos se encuentran en las tablas del anejo 1. El método de desorción del contaminante ha sido muy agresivo con objeto de extraer el máximo DBT posible siendo el porcentaje de recuperación de DBT inmediatamente después del pulso, de un 85,8 % para los ensayos de biodegradación natural, un 86,4 % para los ensayos electrogénicos y de un 84,6 para los ensayos no electrogénicos con aporte de lactato.

La cantidad de DBT extraída en cada uno de los ensayos a diferentes tiempos se ha representado en el gráfico 7.

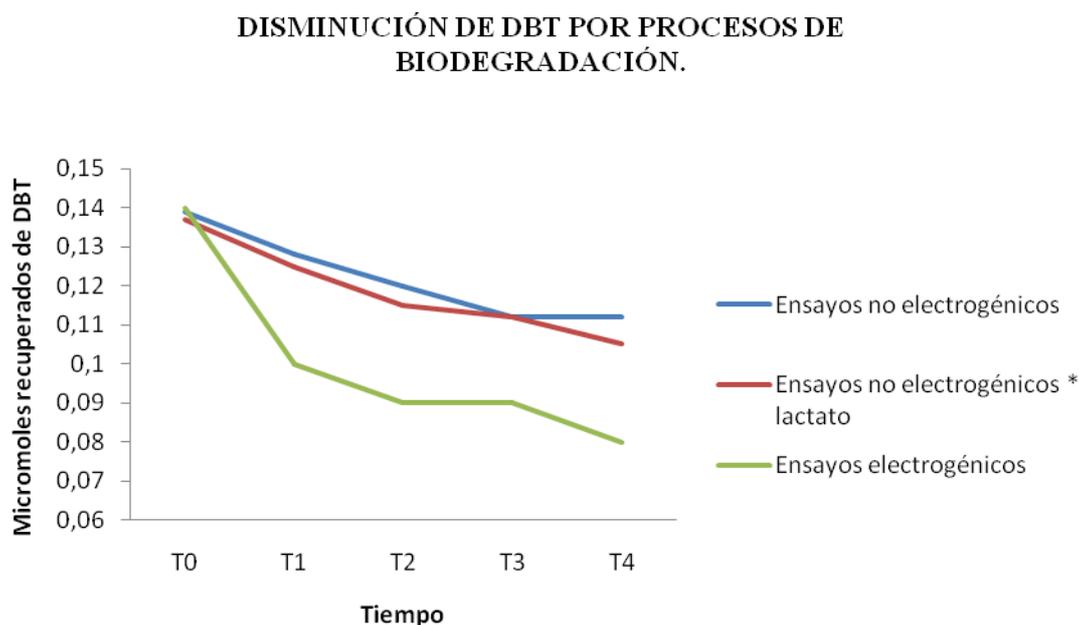


Gráfico 7: Micromoles recuperados de DBT en los diferentes ensayos.

En los ensayos no electrogénicos y no electrogénicos con lactato, los ensayos están duplicados para el T1, T2, T3 Y T4, por lo que se ha realizado una media entre las dos réplicas para cada tiempo. Así, en el gráfico 7 tenemos que:

- El T0 corresponde a los resultados de la pila T0, ensayo T0 y ensayo T0+L.
- El T1 corresponde a los resultados en la pila T1, media del ensayo T1 (a y b) y media del ensayo T1+L (a y b).
- El T2 corresponde a los resultados en la pila T2, media del ensayo T2 (a y b) y media del ensayo T2+L (a y b).

- El T3 corresponde a los resultados en la pila T3, media del ensayo T3 (a y b) y media del ensayo T3+L (a y b).
- El T4 corresponde a los resultados en la pila T4, media del ensayo T4 (a y b) y media del ensayo T4+L (a y b).

La velocidad de degradación del DBT en los ensayos electrogénicos se ajusta a una cinética de 2º grado (gráfico 8). A través del método integral se ha ensayado una ecuación cinética integrando y comparando la curva de los datos de concentración contra tiempo, respecto a los datos experimentales de concentración contra tiempo y se ha confirmado que el ajuste es satisfactorio para reacciones bimoleculares irreversibles de segundo orden, determinándose una constante cinética $k = 0,473 \text{ d}^{-1} \cdot \mu\text{moles}^{-1}$

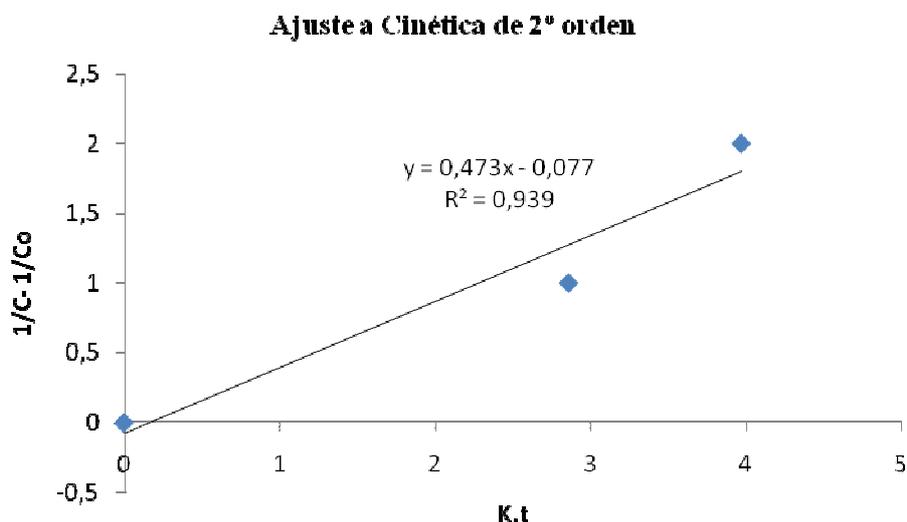


Gráfico 8: Ajuste a cinética de 2º orden de la biodegradación electrogénica del DBT.

El gráfico 8 muestra la respuesta de las pilas sedimentarias al pulso de DBT a lo largo de 10 días, tiempo aproximado que tardan en recuperar los niveles originales de diferencia de potencial.

PULSO DBT.

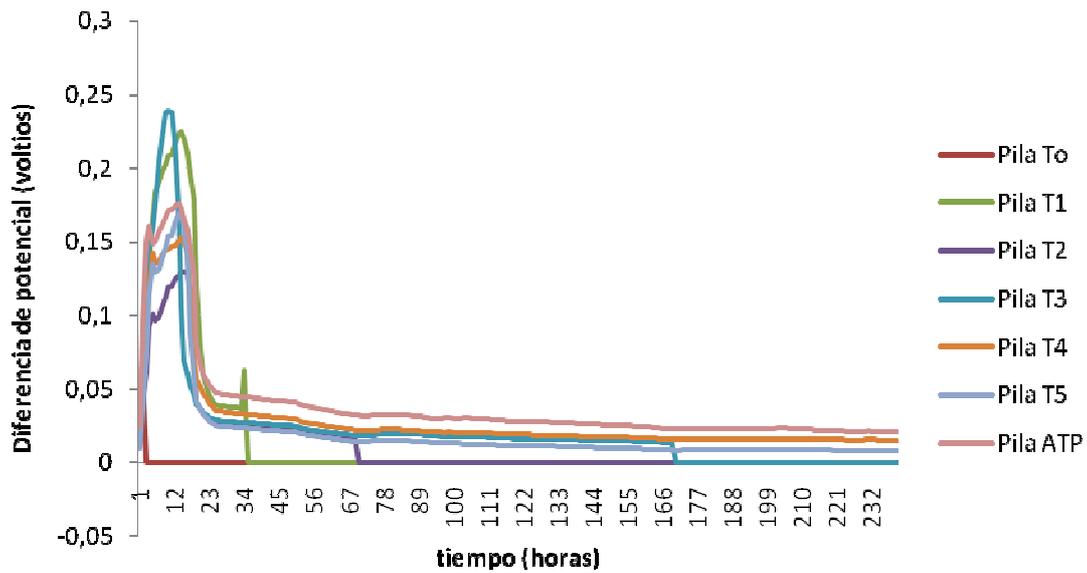


Gráfico 9: Respuesta de las SMFC al pulso de DBT hasta recuperación del estado inicial de diferencia de potencial.

En el siguiente gráfico se muestra el porcentaje de reducción del DBT en los diferentes ensayos y en los diferentes tiempos.

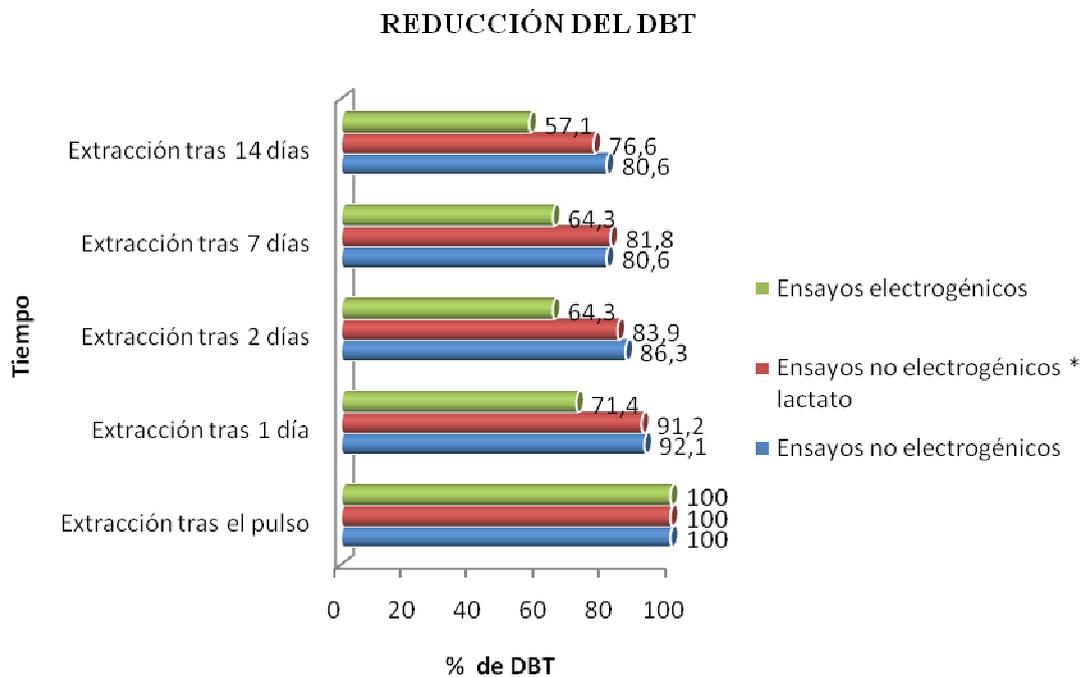


Gráfico 10: Variación en el porcentaje de DBT en las diferentes condiciones de ensayo.

5.4. Ensayos de Ecotoxicidad.

La solución testigo (medio de crecimiento +algas) muestra un crecimiento exponencial durante las 3 primeras medidas de la densidad óptica, correspondientes a tiempo 0, tiempo 1 y tiempo 2, (Gráfica 10).

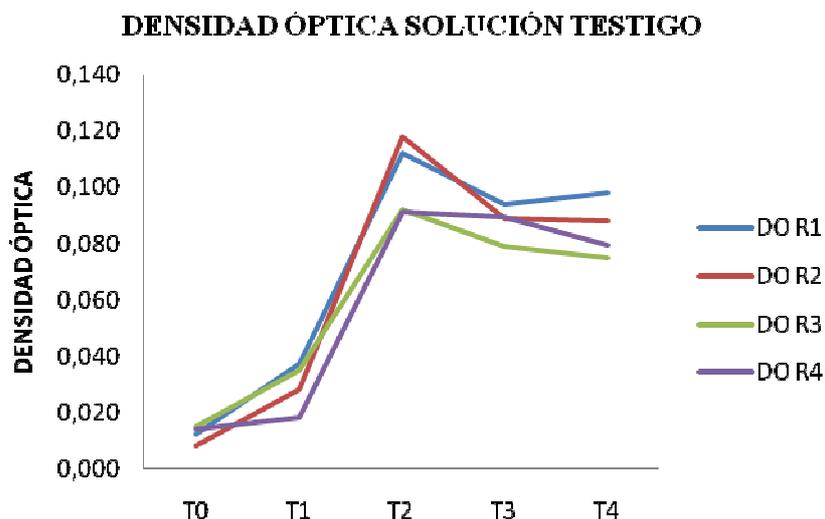


Gráfico 11: Evolución en el tiempo de la densidad óptica de la solución testigo (medio de cultivo +algas).

En la tabla 5 se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento celular respecto al crecimiento de la solución testigo (sin DBT) para cada uno de las concentraciones del DBT.

CONCENTRACIÓN (PPM)	% INHIBICIÓN
5	100
2,5	100
1,25	83,57
0,665	49,40
0,312	8,97

Tabla 6: Porcentaje de inhibición en el crecimiento de las algas verdes a diferentes concentraciones de DBT.

A partir de estas concentraciones se calculan la CE50 y la CE10, concentraciones de las muestras de ensayo que producen una disminución de un 50 % y el 10 % respectivamente en la tasa de crecimiento con respecto a las soluciones testigo. Para calcularla se ha representado la tasa de inhibición frente a la concentración del medio de ensayo de DBT, ajustando una función mediante análisis de regresión (gráfico 11). La ecuación que proporciona el ajuste de la función ($Y=33,89\ln(x)+60,41$, donde Y es el porcentaje de inhibición del crecimiento de algas y X es la concentración de DBT), se utiliza para poder calcular la CE50 y la CE10 (Tabla 6).

Parámetro Toxicológico	Concentración DBT (ppm)
EC10	0,3
EC50	0,8

Tabla 7: EC 50 Y EC10 del DBT en algas unicelulares verdes.

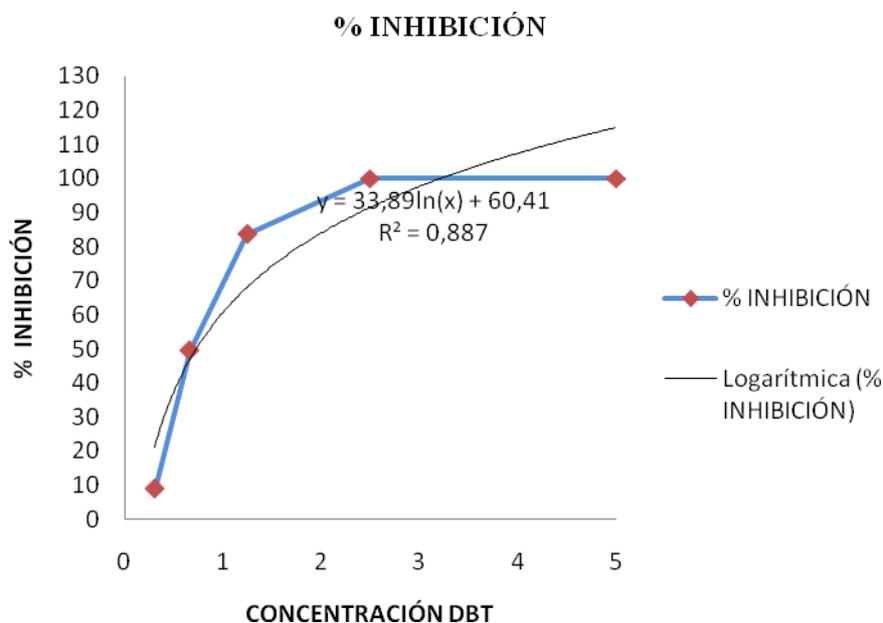


Gráfico 12: Porcentaje de inhibición en el crecimiento de las algas verdes a diferentes concentraciones de DBT.

Así, según la EC50 del DBT y en base a la Directiva 93/67/CEE de la Comisión, de 20 de julio de 1993, por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE del Consejo, esta sustancia es clasificada como muy tóxica.

Mediante HPLC se han analizado los extractos de las pilas sedimentarias y se ha determinado la concentración de DBT cada uno de ellos. La concentración que poseen cada uno de ellos no es proporcional, al grado de biodegradación que han experimentado, es simplemente la concentración de la que se disponía en cada una de las disoluciones utilizadas para el análisis en HPLC. En la siguiente tabla se especifica los PPM de DBT en cada uno de los extractos utilizados.

	CONCENTRACIÓN HPLC(μ MOLAR)	PPM
Ánodo pila T0	46	8,5
Ánodo pila T4	39	7,2
Ánodo pila T5	41,5	7,5

Tabla 8: Concentración de DBT en los extractos de las pilas microbianas.

Los resultados del porcentaje de inhibición con los extractos de los ensayos electrogénicos se muestran en la tabla 7.

	% INHIBICIÓN
Ánodo pila T0	98,4
Ánodo pila T4	79,4
Ánodo pila T5	81,67

Tabla 9: Porcentaje de inhibición del crecimiento de las algas verdes con los diferentes extractos de las pilas microbianas.

5.5. Ensayos de ATP.

Los resultados del ensayo de ATP en el luminómetro se muestran en la siguiente tabla. Las medidas se encuentran en unidades relativas de luz (RLU).

	replica 1 (200 µl)	replica 2 (200 µl)	replica 3 (200 µl)
Grafito felpa (0,22 gramos 1 ml))	0,00179	0,00186	0,0028
Grafito felpa (0,15 gramos, 1 ml))	0,00215	0,00165	0,0013
Grafito sólido (3,5 gramos, 5 ml)	0,00055	0,00057	0,00046

Tabla 10: Mediciones de ATP en luminómetros

6. DISCUSIÓN:

6.1. Caracterización del suelo:

El bajo contenido del suelo en materia orgánica influye en el desarrollo de la población bacteriana antes del aporte de los pulsos de acetato y DBT y por tanto en la respuesta en la diferencia de potencial de las pilas, manteniéndose con un nivel basal bajo, cercano a los 0 voltios.

El contenido de humedad hasta la saturación es superior al 44% y se ha tenido en cuenta al calcular las concentraciones de DBT por gramo de suelo seco obtenidas en los ensayos de biodegradación, realizando una corrección en cada una de ellas (ver tablas anejo 1).

6.2. Diferencia de potencial eléctrico en pilas sedimentarias.

La medida de la diferencia de potencial entre los electrodos nos permite realizar un seguimiento de los procesos de biodegradación en las pilas microbianas.

La diferencia de potencial entre ánodo y cátodo sigue una evolución similar con el pulso de acetato, y el pulso de DBT, aunque el pico máximo de potencial alcanzado con el DBT es mayor y se alcanza en un tiempo menor.

Al realizar un segundo pulso de DBT, la diferencia de potencial alcanzada en la pila DBT es mayor y que en el primer pulso, lo que indica una optimización de la degradación de los compuestos por parte de la población bacteriana del suelo, siendo una medida indirecta del aumento de la eficiencia coulombica de la pila. En cambio al realizar pulsos en el control abiótico, cuyo suelo no tiene actividad biológica no existe respuesta electrogénica, lo que pone de manifiesto que la degradación del compuesto se está produciendo por causas bióticas en el resto de ensayos.

Aumentar la eficiencia coulombimétrica es uno de los retos principales en la investigación de las Pilas microbianas. En la literatura se han reportado eficiencias máximas para el acetato del 70% en MFCs produciéndose diferencias de potencial de 0,3-0,5 voltios entre el ánodo y el cátodo (Pant *et al.*, 2009). Las eficiencias coulombicas del acetato en las pilas del presente estudio proporcionan porcentajes del 35%, que aun no siendo despreciables, son menores que los

anteriormente nombrados. Esto es debido a razones, como la biodegradación abiótica de la molécula en cuestión, la limitación de transferencia de materia y la limitación catódica.

Este último proceso tiene lugar cuando la concentración de oxígeno en el cátodo limita la reducción de dicha molécula por parte de los electrones transferidos desde el ánodo. En los cátodos de los ensayos electrogénicos se acumulan sedimentos con materia orgánica, factor que interacciona y estimula el desarrollo de bacterias aerobias heterótrofas, que utilizan el oxígeno como aceptor de electrones, disminuyendo rápidamente la concentración de éste. La limitación catódica se puede evitar utilizando materiales que inhiban el crecimiento de las bacterias aerobias heterótrofas, como puede ser las partículas de plata (AgNP₅), que además actúan como catalizador de la reducción del oxígeno por parte de los electrones que llegan del ánodo (Na *et al*, 2011). También se ha mejorado la disponibilidad de oxígeno en el cátodo utilizando carbono activo granulado, suspendido en el agua lo que aumenta considerablemente el área catódica (Song *et al*, 2011).

Con respecto a la limitación en la transferencia de materia hacia el ánodo, no ha sido un factor limitante en las pilas electrogénicas del presente estudio, dadas las reducidas dimensiones del habitáculo que contiene el ánodo. En los dispositivos de mayor dimensión es un factor decisivo a la hora de generar energía. En MFCs bentónicas, donde el ánodo está enterrado en los sedimentos marinos, se han certificado aumentos del 500 % en la densidad de potencia mejorando la transferencia de materia valiéndose de novedosos diseños del habitáculo que contiene el ánodo (Girguis *et al*, 2010).

Aún así, las comparaciones con los rendimientos de otras pilas se deben tener en cuenta en su justa medida, pues al margen de los factores que se han nombrado, también la arquitectura de las pilas afecta en la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo y por tanto es decisiva en la eficiencia coulombica del sustrato utilizado. Por arquitectura de la pila, se entiende el diseño y proporciones de ésta, siendo decisiva la distancia entre electrodos y el tamaño y material de estos.

Hay otros factores que influyen en la eficiencia coulombica, como si la pila ha sido inoculada con un cultivo puro o una población mixta de microorganismos, siendo mejores los rendimientos energéticos en pilas microbianas inoculadas con cultivos mixtos ó que utilizan la población indígena del suelo en caso de ser pilas sedimentarias, como en el presente estudio (Logan *et al*, 2009).

En referencia a la oxidación del DBT, su mineralización a CO₂, genera una transferencia de 0,0090 milimoles de electrones y los resultados empíricos indican una transferencia de 0,097 milimoles de media, un orden de magnitud por encima del rendimiento teórico. El etanol, en el que se encuentra diluido el DBT, es el causante de este desfase. El etanol es un sustrato fácilmente degradable anaeróbicamente por las bacterias, por lo que va a generar respuesta electrogénica. Antes de realizar los pulsos de DBT se ha intentado eliminar el etanol mediante burbujeo con nitrógeno, de forma que la carga transferida sea directamente proporcional al DBT degradado. Tras el burbujeo de la disolución de DBT, se ha medido el etanol mediante una cromatografía de gases (GC-MS), que confirma que aún existen trazas de etanol, del 0,2 % del volumen del pulso. La oxidación teórica de este volumen genera 0,240 milimoles de electrones que sumados a los generados por el DBT resultan 0,330 milimoles de electrones. En la práctica la transferencia es de 0,097 milimoles de electrones, por lo que el rendimiento de las pilas sedimentarias es de un 29 %.

6.3. Biodegradación del DBT

De la comparativa de cromatogramas cabe destacar que respecto al área de DBT que nos proporcionan, hay en todos los casos una reducción de la concentración del contaminante en cuestión, indicativa de los procesos de biodegradación en los ensayos electrogénicos y no electrogénicos.

En relación a los productos de degradación no aparecen rastros de los derivados del DBT. El análisis con HPLC no muestra presencia de estos compuestos en ninguno de los ánodos de las SMFCs de forma significativa. En algún caso aparecen mínimos picos prácticamente en el límite de detección. De igual manera ocurre respecto a la extracción del posible DBT y productos de degradación que pudieran haber quedado retenidos en grafito, por lo que se puede despreciar este factor de retención del contaminante en el filtro de grafito a la hora de realizar los cálculos de las concentraciones presentes tras los ensayos de biodegradación.

Los resultados muestran un rápido descenso en la cantidad de DBT en las MFCs conectadas respecto a las no conectadas en las primeras 48 horas. Tras las primeras 48 horas, la velocidad de desaparición del DBT se ralentiza, probablemente debido a que el contaminante a partir de una concentración residual resulta menos accesible para las bacterias electrogénicas (Girguis *et al*, 2010). Además, en términos generales, las bacterias se asocian a una superficie, en este caso el grafito, formando una biopelícula, lo que limita su movilidad para acceder al contaminante.

El hecho de una reducción del contaminante más elevada en las primeras horas de ensayo se corresponde con las medidas de potencial eléctrico registradas por el multímetro, donde, se

puede observar que gran parte de la reacción al pulso de DBT se produce en esta primera fase. Posteriormente sigue observándose una leve pero continua respuesta hasta 10 días después del pulso de DBT, donde se ha alcanzado el nivel inicial de diferencia de potencial, lo que se refleja también en la ralentización del ritmo de desaparición del DBT. Así, vemos una correlación entre la degradación del DBT y la respuesta electrogénica de las pilas sedimentarias.

El resultado más destacado de los ensayos resulta que la velocidad de desaparición del DBT por degradación bioelectrogénica es el doble que bajo condiciones de degradación natural y se llega a niveles de degradación no alcanzados en estas últimas condiciones (Dicha velocidad se cuadruplica si tenemos en cuenta las primeras 24 horas del ensayo). Además, comparando los perfiles de las curvas de degradación del contaminante, se observa que en condiciones naturales o estimuladas con lactato, el perfil de descenso del contenido de DBT en el suelo es lineal, mientras que si el proceso se lleva a cabo en condiciones electrogénicas, el perfil es exponencial, lo que finalmente se traduciría en una cinética de degradación de segundo orden.

Con respecto a los ensayos no electrogénicos con aporte de un donador de electrones, el lactato, no se observan diferencias significativas en la degradación del DBT, en referencia a los ensayos de biodegradación natural, lo que viene a confirmar el papel del aceptor de electrones como factor limitante en el proceso de biodegradación.

6.4. Ensayos de Ecotoxicidad.

Los resultados en los extractos de las pilas sedimentarias confirman que el porcentaje de inhibición es mayor cuanto mayor es la concentración de DBT, pero no podemos correlacionar los datos de inhibición que se han obtenido en el ensayo con concentraciones conocidas de DBT puro, con los datos de inhibición con los extractos de suelo. En estos últimos el grado de inhibición ha sido menor que en los ensayos de DBT puro, lo que apunta que los productos derivados del DBT y las diferentes sustancias extraídas del suelo pueden interaccionar de forma no conocida para rebajar el efecto tóxico del DBT. El suelo y el agua son siempre, una mezcla compleja de compuestos que dan lugar a efectos sinérgicos y antagónicos sobre los organismos sobre los organismos ensayados (Rodea-palomares *et al*, 2010).

6.5. Ensayos de ATP.

A tenor de los resultados (mostrados en URL, unidades relativas de luz), cercanos al ensayo en blanco de la recta de calibración que se ha realizado con anterioridad con la muestra estándar de ATP, se infiere que no ha sido posible la extracción bacteriana del ánodo.

Al solamente disponer de un ánodo para llevar a cabo los ensayos (Pila ATP), no se ha podido variar los valores de ciertos parámetros, tales como la superficie de grafito utilizada, el volumen del reactivo y el tiempo de contacto entre éste y el grafito para determinar cuáles son las condiciones óptimas para medir el ATP de la comunidad bacteriana ancladas en el grafito.

7. CONCLUSIONES.

1. La oxidación microbiana del Dibenzotiofeno bajo condiciones electrogénicas queda demostrada, quedando constancia a través de los registros de diferencia de potencial en las pilas sedimentarias de este proceso.
2. La utilización de Pilas sedimentarias en suelos contaminados por Dibenzotiofeno resulta interesante por su posible aplicación *in situ* y por el incremento de la velocidad y de los porcentajes de biorecuperación respecto a las condiciones de degradación natural, y a las condiciones de degradación con aporte de nutrientes. La degradación bioelectrogénica estimulada abre un nuevo campo de posibilidades para la descontaminación de este compuesto.
3. El aporte de un donador de electrones, no es un sistema eficiente para aumentar la tasa de degradación del dibenzotiofeno, remarcando el papel limitante en la bioremediación de suelos contaminados de un aceptor de electrones.
4. El DBT es un factor determinante en la disminución de la tasa de crecimiento de algas verdes unicelulares, siendo una sustancia muy tóxica según la normativa Europea en base a su EC50 en dichos organismos.
5. No se ha podido generar una valoración cuantitativa de la comunidad microbiana en los ánodos de las pilas sedimentarias, proceso que queda pendiente como tarea de investigación futura.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Bond, D.R.; Holmes, D.E.; Tender, L.M.; and Lovley, D.R. 2002. *Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments*. *Science* 295: 483-485.
- Borden, R.C.; Goin, R.T.; Kao, C.M. 1997. *Control of BTEX migration using a biologically enhanced permeable barrier*. *Ground water* 17: 70-80.
- Eastmond, A. 1988. *Dibenzothiophene*. *Arch Environ Contam Toxicology* 13 (1): 105-111.
- España. Real Decreto 60/2011, de 21 de Enero 2011. Boletín oficial del estado, 22 de Enero de 2011, número 19, P. 6854.
- Esteve, A.N; Rothermich,M; Sharma,M; Lovley,D. 2005. *Growth of Geobacter sulfurreducens under nutrient-limited conditions in continuous culture*. *Environ. Microbiol.* 5: 641-648.
- Europa. Directiva 93/67/CEE, de 20 de Julio de 1993 del parlamento Europeo y del consejo. Diario Oficial nº L 227 de 08/09/1993 P. 0009 - 0018
- Europa. Directiva 2003/17/CE, de 3 de Marzo de 2003 del Parlamento Europeo y Del Consejo. Diario Oficial de La Unión Europea. L76/10.
- Franks, A.E; Nevin, K.P. 2010. *Microbial fuel cells. A current review*. *Energies*. 3: 899-919.
- Girguis, P.; Nielsen, M.; Figueroa, I. 2010. *Harnessing energy from marine productivity using bioelectrochemical systems*. *Current opinion in Biotechnology*. 21: 252-258.
- Gong, Y.; Radachowsky, S.; Wolf. M.; Nielsen. N.; Girguis, P.; Reimers, C. 2011. *Benthic microbial fuel cell as direct power source for an acoustic modem and seawater oxygen/temperature sensor system*. *Environ Sci Technol*. 45(11):5047-53.
- Gundlach, E.R.; Boehm, P.; Marchand, M.; Atlas, R.; Ward, D.; Wolfe, D. 1983. *The fate of Amoco Cadiz oil*. *Science* 221, 122-129.
- Kertesz, M.A. and Wirtek, C. 2001. *Desulfuration and desulfonation: aplication of sulfur-controlled gene expression in bacteria*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 460-466.
- Kilbane, J. J. 1988. *Sulfur-Specific Microbial Metabolism of Organic Compounds*. Bioprocessing of Coals Workshop, Tysons Corner, Va., Aug. 16-18.
- Kilbane, J.J. 1990. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources, Conservation Recycling* 3, 69-79.
- Kilbane, J.J. 2006. *Microbial Biocatalyst developments to upgrade fossil fuels, current opinion in biotechnology*. 17:305-314.
- Kim, H.Y.; Kim, T.S.; Kim, B.H. 1990. *Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide*. *Biotechnol. Lett.* 12:761-764.
- Kodama, K.; Umehara, K.; Shimizu, K.; Yamada, K. 1973. *Identification of microbial products from dibenzothiophene and its oxidation pathway*. *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 37: 45-50.

- Lee, H.S.; Parameswaran, P.; Kato-Marcus, A.; Torres, C.I.; Rittmann, B.E. 2008. *Evaluation of energy-conversion efficiencies in microbial fuel cells (MFCs) utilizing fermentable and non-fermentable substrates. Water Res. 42, 1501–1510.*
- Li, F.; Xu, P.; Feng, Jinhui.; Meng, Ling.; Zheng, Y.; Luo, L.; Ma, C. 2005. *Microbial desulfurization of gasoline in a mycobacterium goodii X7B immobilized-cell system. Appl. Environ. Microbiol. 71, 276-281.*
- Lide, D.R. 1994. *Handbook of Data on Organic Compounds. Volume I. 3rd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton. V3: 2482.*
- Lizama, H.M.; Ladonna, A.; Wilkins, A.; Timothy, C.S. 1995. *Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria. Biotechnology Letters. 17:113-116.*
- Logan, B. *Microbial Fuel Cells.* Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2008. 213 pág.
- Logan, B. 2009. *Exoelectrogenic bacteria that Power microbial fuel cells. Nature Reviews Microbiology. 7:375-381.*
- Lovley, D. 2003. *Cleaning up with genomics: Applying molecular biology to bioremediation. Nature Reviews Microbiology. 1: 35-44*
- Lovley, D.R. 2006. *Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nat Rev Microbiol 4: 497-508.*
- Na, J.; Jeon, H.; Lee, J.; Chang, I. 2011. *Bifuncional silver nanoparticle cathode in microbial fuel cells for microbial growth inhibition with comparable oxygens reduction reaction activity. Environ. Sci. Technol. dx.doi.org/10.1021/es2000326.*
- Nekodzuka, S., Toshiaki, N.; Nakajima-Kambe, T.; Nobura, N.; Lu, J.; Nakahara, Y.1997. *Specific desulfurization of dibenzothiophene by Micobacterium strain G3. Biocatalysis Biotransformation 15, 21-27.*
- Oldfield, C.; Pogrebinsky, O.; Simmonds, J.; Olson, E. S.; Kulpa, C. H. 1997. *Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by Rhodococcus sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). Microbiology. 143, 2961-2973.*
- Organización Internacional para la Estandarización (ISO). Norma No. ISO 8692. Second edition, OCT.2004. Water quality – freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2004(E).
- Pant, D; Van Bogaert, G; Diels, L; Vanbroekhoven, K. A. 2009. *Review of de substrates used in microbial fuel cells for sustainable energy production. Bioresourc. Technol. 101, 1533-1543.*
- Rodea-palomares, I.; Petre, A.; Boltes, K.; Leganés, F.; Perdigón-Melón, J.A.; Rosal, R.; Fernandez-Piñas, F. 2010. *Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two acuatic bioluminescent organisms. Water research, 44: 427-438.*
- Rooney-Varga, J.N.; Anderson, R.T.; Fraga, J.L.; Ringelberg, D.; Lovley, D.R. *Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 3056-3064.*

- Rosenbaum, M.; He, Z.; Angenent, L. 2010. *Light energy to bioelectricity: Photosynthetic microbial fuel cells*. Current Opinion in Biotechnology, 21: 259-264.
- Song, T.; Yan, Z.; Zhao, Z.; Jiang, H. 2011. *Construction and operation of freshwater sediment microbial fuel cell for electricity generation*. Bioprocess biosyst eng. 34: 621-627.
- Tender, L.M; Reimers, C.E; Stecher, H.A; Holmes, D.E; Bond, D.R; Lowy, D.A; Pilobello, K; Fertig, S.J; Lovley, D.R. *Harnessing microbially generated power on the seafloor*. Nat. Biotechnol. 2002, 20, 821-825.
- Widdel, F.; Rabus, R. 2001. *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons*. Current Opinion in Biotechnology, 12:259–276
- Yang, G.; Zhang, Z.1997. *Adsorption of Dibenzothiophene on Marine Sediments Treated by a Sequential Procedure*. Interface Science. 192: 398-407.
- Zhang, T.; Gannon, S.M.; Nevin, K.P.; Franks, A.E.; Lovley, D.R. 2010. *Stimulating the anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons in contaminated sediments by providing an electrode as the electron acceptor*. Environ. Microb. 4: 1011-1020.

9. ANEJOS

9.1. ANEJO 1

Historial de los viales no electrogénicos	DBT t0	DBT t1a	DBT t1b	DBT t2a	DBT t2b	DBT t3a	DBT t3b	DBT t4a	DBT t4b
Pulso DBT 30 ppm (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Peso de DBT introducido(µg)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
MicroMoles de DBT introducido	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162
Concentración(µmolar)	162	162	162	162	162	162	162	162	162
MicroMoles de DBT introducido por gramo seco	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
Volumen de ACN para extracción(ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Suelo Húmedo recuperado(gr)	6	3,7	10,7	7,5	6	8	6	14	13
Suelo seco recuperado (gramos)	3,36	2,072	5,992	4,2	3,36	4,48	3,36	7,84	7,28
Recuperación de volumen de ACN(ml)	0,6	0,8	1,7	1,5	1,2	1,5	1,2	2,5	2,6
Volumen resuspendido tras reconcentrar(ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tiempo de aparición DBT en HPLC(min)	16,11	16,2	16,2	16,2	16,49	16,53	16,57	9,91	9,65
Área HPLC	10,1	5,8	16,51	11,3	8,5	10,7	8,2	19	19,1
Concentración HPLC	23,29	13,37	38,07	26,05	19,60	24,67	18,91	43,81	44,04
Micromoles en la disolución para HPLC	0,05	0,03	0,08	0,05	0,04	0,05	0,04	0,09	0,09
Micromoles corregidos por el peso total de suelo	0,139	0,129	0,127	0,124	0,117	0,110	0,113	0,112	0,121
Micromoles de DBT recuperados por gramo seco de suelo	0,0139	0,0129	0,0127	0,0124	0,0117	0,0110	0,0113	0,0112	0,0121

Historial de los viales no electrogénicos con lactato	DBT + L t0	DBT + L t1a	DBT + L t1b	DBT + L t2a	DBT + L t2b	DBT + L t3a	DBT + L t3b	DBT + L t4a	DBT + L t4b
Pulso dbt(30 ppm)+lactato 20 mM (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Peso de DBT introducido(µg)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
MicroMoles de DBT introducido	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162
Concentración(µmolar)	162	162	162	162	162	162	162	162	162
MicroMoles de DBT introducido por gramo seco	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
Volumen de ACN para extracción(ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Suelo Húmedo recuperado(gr)	4,2	3	10	5	5	5,5	5	14,5	15
Suelo seco recuperado (gramos)	2,352	1,68	5,6	2,8	2,8	3,08	2,8	8,12	8,4
Recuperación de volumen de ACN(ml)	0,5	0,5	1,5	1	0,9	1	1,4	1,5	1,8
Volumen resuspendido tras reconcentrar(ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tiempo de aparición DBT en HPLC(min)	16,4	16,2	16,2	16,37	16,27	16,53	16,63	9,93	9,93
Área HPLC	7	4,4	15,6	6,7	7,4	7,7	6,6	19,4	18,8
Concentración HPLC	16,14	10,15	35,97	15,45	17,06	17,75	15,22	44,73	43,35
Micromoles en la disolución para HPLC	0,032	0,020	0,072	0,031	0,034	0,036	0,030	0,089	0,087
Micromoles corregidos por el peso total de suelo	0,137	0,121	0,128	0,110	0,122	0,115	0,109	0,110	0,103
MicroMoles de DBT recuperados por gramo seco de suelo	0,0137	0,012	0,013	0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,010

Historial de los viales electrogénicos	Pila to	Pila t1	Pila t2	Pila t3	Pila t4	Pila t5
Pulso DBT 30 ppm (ml)	1	1	1	1	1	1
Peso de DBT introducido(μg)	30	30	30	30	30	30
MicroMoles de DBT introducido	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162
Concentración(μmolar)	162	162	162	162	162	162
MicroMoles de DBT introducido por gramo seco	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
Volumen de ACN para extracción(ml)	5	5	5	5	5	5
Suelo Húmedo recuperado(gr)	8	12	9	6	12	12
Suelo seco recuperado (gramos)	4,5	6,72	5,0	3,0	6,7	6,7
Recuperación de volumen de ACN(ml)	3	3,7	2,7	3,5	3,2	3,9
Volumen resuspendido tras reconcentrar(ml)	2	2	2	2	2	2
Tiempo de aparición DBT en HPLC(min)	9,5	16,6	16,21	16,09	18,47	17,25
Área HPLC	20	21	14	8,1	17	18
Concentración HPLC	46,11	48,42	32,28	18,68	39,20	41,50
Micromoles en la disolución para HPLC	0,09	0,10	0,06	0,04	0,08	0,08
Micromoles corregidos por el peso total de suelo	0,14	0,10	0,09	0,09	0,08	0,09
MicroMoles de DBT recuperados por gramo seco de suelo	0,021	0,014	0,013	0,012	0,012	0,012

9.2. ANEJO 2

INFORME DE ENSAYO: INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS ALGAS DE AGUA DULCE CON LAS ALGAS VERDES UNICELULARES (ISO 8692:2004)

La norma internacional ISO 8692: 2004 especifica un método para la determinación de la inhibición del crecimiento de las algas verdes unicelulares por los efectos de las sustancias y mezclas contenidas en el agua o en el agua residual. El método es aplicable a sustancias fácilmente solubles en agua.

Aplicando las modificaciones descritas en las normas ISO 14442 e ISO 5667-16, también pueden determinarse los efectos inhibidores de los materiales orgánicos e inorgánicos poco solubles, de los compuestos volátiles, de los metales pesados y de las aguas residuales. En el caso que nos ocupa, se determinan los efectos inhibidores del *Dibenzotiofeno* (DBT).

Para llevar a cabo el ensayo se cultivan varias generaciones de cepas de algas de una misma especie (*Pseudokirchneriella subcapitata*) (foto 1) en un medio definido, que contiene un rango de concentraciones de la muestra de ensayo (DBT), y que ha sido preparado mezclando cantidades adecuadas de medio de crecimiento, muestra de ensayo y un inóculo de células de algas en fase exponencial de crecimiento. Los lotes de ensayo se incuban durante un periodo de 72/96 horas durante el cual se mide la concentración celular en cada uno de ellos al menos cada 24 horas. La inhibición se mide como la disminución de la tasa de crecimiento en comparación con cultivos testigos (sin muestras de ensayo: medio de cultivo y algas) realizados en idénticas condiciones.

El ensayo tuvo lugar la semana del 14 de Marzo al 18 del mismo mes, con una duración de 92 horas, tomando medidas de la concentración celular de cada uno de los ensayos cada 24 horas, a las 14:00 horas de cada uno de los 5 días en los transcurre el ensayo. Las medidas fueron realizadas con el espectrofotómetro Elisa (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o

pocas longitudes de onda. Son las que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de las muestras. En el caso que nos ocupa la densidad óptica se mide a 630 nm.

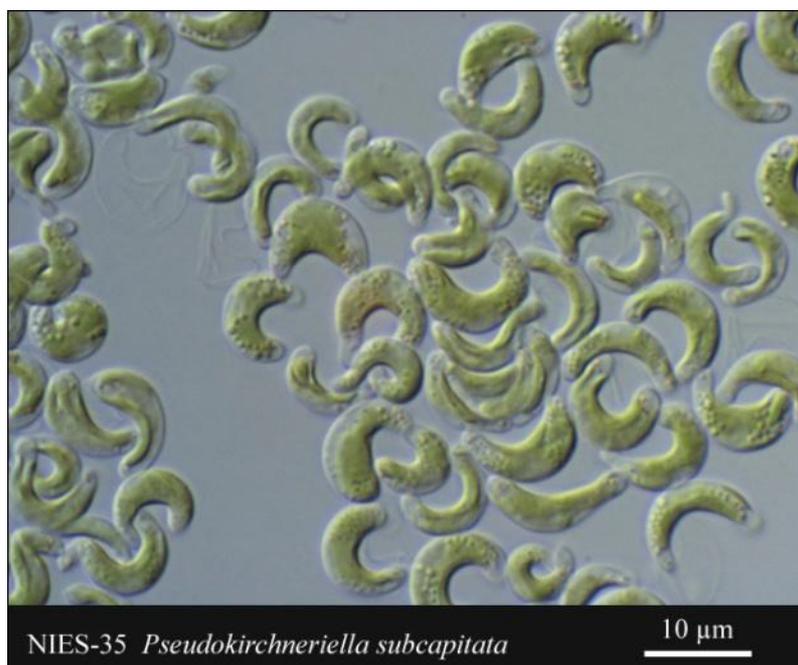


Foto 2: Imagen de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Las muestras de ensayo de DBT se prepararon desde una dilución original de dicho aromático a una concentración de 1000 ppm (partes por millón) en etanol. Las diluciones se llevaron a cabo en medio de crecimiento (mezcla de agua y nutrientes). Se prepararon 5 diluciones de DBT de 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm, 0,625 ppm y 0,312 ppm.

Se tomaron 200 μ l de cada una de las diferentes concentraciones de la mezcla de la muestra de ensayo y medio de crecimiento (medio de ensayo) y se dispusieron en una placa de pocillos múltiples para cultivo. De cada una de las concentraciones se realizaron 4 réplicas. Junto a estos ensayos se dispusieron 4 réplicas de una solución testigo (control negativo: medio de crecimiento y algas) y 4 réplicas de medio de cultivo.

A cada uno de los pocillos se le añadió 5 μ l de algas y en las réplicas de medio de cultivo se dispusieron 5 μ l de medio de cultivo más para que todos los ensayos finalizaran con un volumen de 205 μ l.

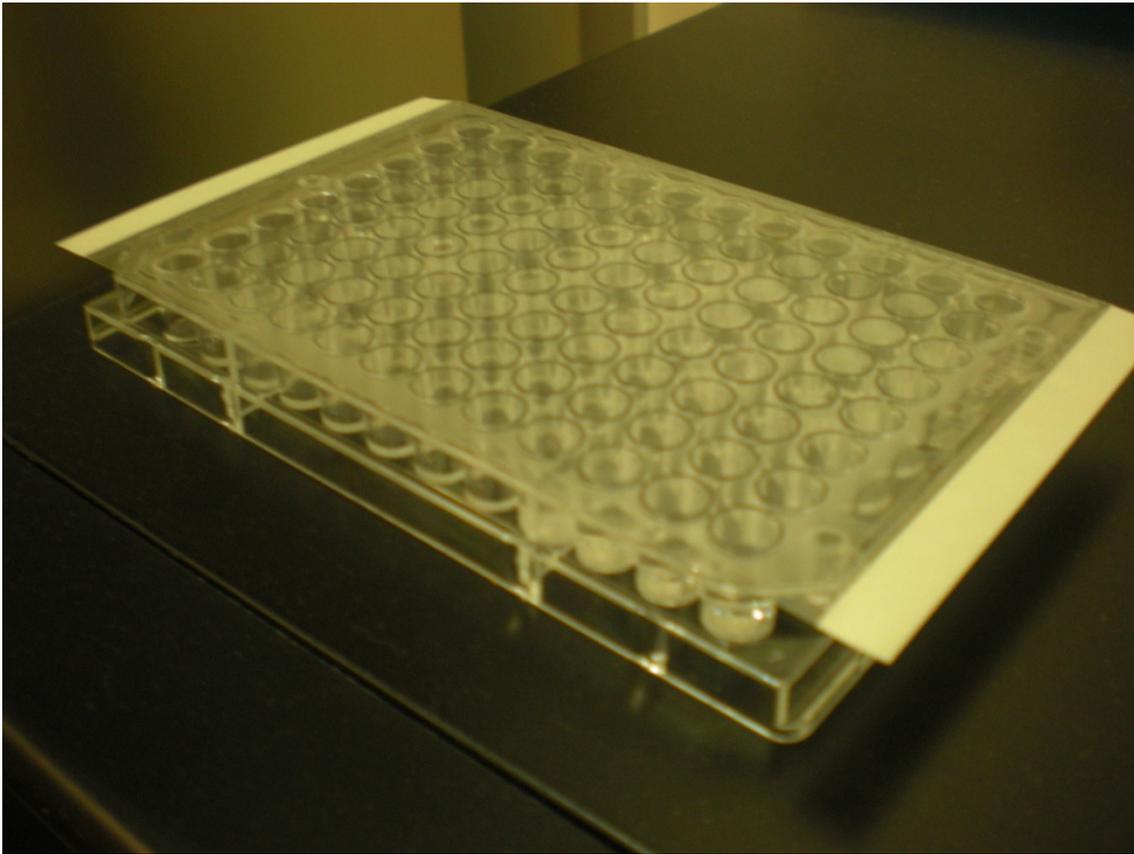


Foto 3: Placa de ensayo

A continuación se detalla el procedimiento:

- Preparación del medio de crecimiento:

Agua desionizada con conductividad menor a $10 \mu\text{s}/\text{cm}^2$ con añadido de diferentes volúmenes de 4 soluciones de nutrientes.

- Preparación del pre-cultivo de algas:

El precultivo debe iniciarse entre 2 y 4 días antes del comienzo del análisis. El medio de crecimiento se inocula con una concentración celular de 5×10^3 y 5×10^4 células por mililitro con objeto de mantener el crecimiento exponencial hasta que comience el ensayo. El precultivo debe incubarse cubierto, para evitar la contaminación del aire y para reducir la evaporación del agua, pero no debe estar herméticamente cerrados con el objeto de permitir el paso del CO_2 , incubándose a $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, bajo luz blanca continua. Los cultivos se agitan, remueven o airean, con el fin de mantener las células de algas en suspensión y de mejorar la transferencia gaseosa de CO_2 del aire al agua, así como para reducir la variación de PH.

Este precultivo en fase exponencial de crecimiento se utiliza como inóculo para el ensayo. Se mide la concentración celular del precultivo inmediatamente antes de la utilización, a fin de calcular el volumen de inóculo necesario. En el ensayo actual, dicho volumen es de 5 µl, para inocular aproximadamente unas 4×10^4 células.

- Elección de las concentraciones de la muestra de ensayo:

Es conveniente que las algas sean expuestas a distintas concentraciones de la muestra de ensayo que sigan una progresión geométrica. Para la preparación de muestras de ensayo no acuosas es necesaria la preparación de soluciones madre, disolviendo la muestra de ensayo en el medio de crecimiento.

- Preparación de los lotes de ensayo y de las soluciones testigo:

Los lotes de ensayo (medio de crecimiento + algas+ DBT) y las soluciones testigo se preparan mezclando los volúmenes apropiados de las muestras de ensayo, el medio de crecimiento y algas en los recipientes de ensayo. El volumen total, y la concentración celular deben ser los mismos en todos ellos. La concentración celular inicial debe ser lo suficientemente baja como para permitir la obtención de un crecimiento en fase exponencial.

Se preparan 4 replicados para cada una de las concentraciones de la muestra de ensayo.

Fase de Medida y cálculo:

Se mide la concentración celular en cada recipiente de ensayo al menos cada 24 horas. A partir de estas medidas se realizan una serie de cálculos que se especifican a continuación.

- A partir de las medidas de absorbancia realizadas en los ensayos con medio de cultivo, realizamos la media de este parámetro para cada uno de los tiempos dados. Así nos encontramos con 5 medidas medias de absorbancia para el medio de cultivo.

Tabla 4: Absorbancia media de las replicas del medio de cultivo.

MEDIO CULTIVO	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Media M.C(absorbancia)
	T0	0,025	0,021	0,017	0,017	0,02
	T1	0,03	0,026	0,043	0,045	0,028
	T2	0,07	0,052	0,071	0,064	0,062
	T3	0,086	0,066	0,092	0,104	0,076
	T4	0,114	0,116	0,104	0,125	0,109

- La absorbancia media de cada una de los días del medio de cultivo se restará a las medidas de absorbancia que se han realizado en la solución testigo (medio de cultivo +algas) y en los diferentes lotes de ensayo (muestra de ensayo + algas + muestra de ensayo (DBT)) con objeto de alcanzar una media de densidad óptica, como medida indirecta de la concentración de algas.
- Se traza la curva de crecimiento de cada una de las concentraciones de ensayo y de la solución testigo con los datos de densidad que hemos calculado restando la densidad óptica generada por el medio de cultivo. Esta curva sigue un desarrollo exponencial y aplicando logaritmos a cada uno de los términos de la función, obtenemos una nueva función lineal de la forma $Y= A+BX$ donde B, la pendiente de la recta es la tasa de crecimiento específicas para cada uno de los ensayos (ver tablas anexo 1). Una curva de crecimiento lineal indica un crecimiento exponencial, mientras que la aparición de una meseta indica que los cultivos entran en fase estacionaria. En el caso de que, al final del tiempo de exposición, los cultivos testigo muestren una tasa de crecimiento en declive, los cultivos inhibidos pueden tener tendencia a alcanzar a los testigos, simulando falsamente una disminución en la tasa de inhibición. Para ello se calculan las tasas de crecimiento y la inhibición del crecimiento basándose en la medidas efectuadas en el periodo de crecimiento exponencial de los cultivos testigo. En el presente ensayo se han tomado las 3 primeras medidas de cada uno de los ensayos, correspondientes a tiempo 0, tiempo 1 y tiempo 2, para realizar dichos cálculos (gráfico 1).

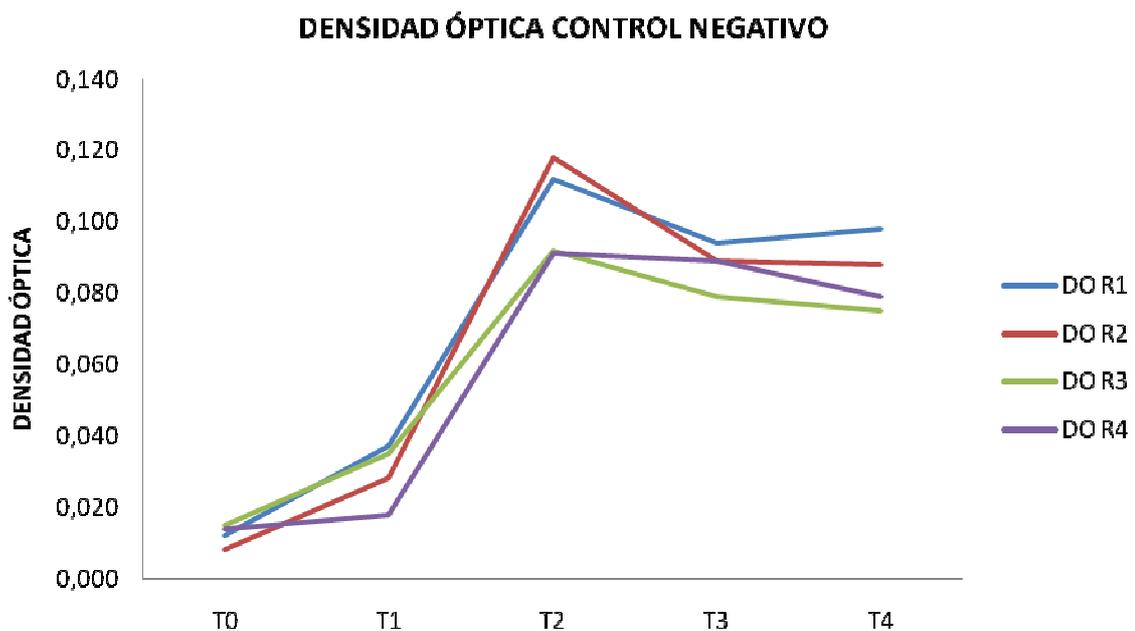


Gráfico 5: Densidad óptica de las diferentes réplicas del control negativo

- Partiendo de las 4 réplicas de cada ensayo, obtenemos 4 tasas de crecimiento para cada uno de los ensayos, con las que realizamos una media aritmética. Una vez hemos hallado medias y disponemos de una tasa de crecimiento para cada ensayo realizado, y a través de la siguiente ecuación calculamos el porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ inhibición DBT muestra } i = 100 (\text{tasa de crecimiento control negativo} - \text{tasa de crecimiento muestra } i) / \text{tasa de crecimiento muestra control}$$

A continuación aparecen las tablas para cada uno de los ensayos, con los cálculos realizados para obtener la tasa de crecimiento de estos:

MEDIO CULTIVO+ALGAS	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	DO R1	DO R2	DO R3	DO R4	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	LN DO R4
	T0	0,032	0,028	0,035	0,031	0,012	0,008	0,015	0,014	-	-	-	-
										4,423	4,828	4,200	4,269
	T1	0,065	0,056	0,063	0,046	0,037	0,028	0,035	0,018	-	-	-	-
										3,297	3,576	3,352	4,017
	T2	0,174	0,180	0,154	0,153	0,112	0,118	0,092	0,091	-	-	-	-
										2,189	2,137	2,386	2,397
	T3	0,170	0,165	0,155	0,165	0,094	0,089	0,079	0,089	-	-	-	-
										2,364	2,419	2,538	2,419
	T4	0,207	0,197	0,184	0,188	0,098	0,088	0,075	0,079	-	-	-	-
										2,430	2,430	2,590	2,538

PENDIENTE DE LA RECTA DE CRECIMIENTO DE LAS ALGAS	
1,12	R1
1,35	R2
0,91	R3
0,94	R4
1,08	MEDIA

MEDIO CULTIVO+ALGAS+DBT SPPM	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	DO R1	DO R2	DO R3	DO R4	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	LN DO R4
	T0	0,106	0,1	0,098	0,149	0,086	0,08	0,078	0,129	-	-	-	-
										2,453	2,526	2,551	2,146
	T1	0,119	0,107	0,094	0,145	0,091	0,079	0,066	0,117	-	-	-	-
										2,397	2,538	2,718	2,146
	T2	0,144	0,105	0,097	0,154	0,082	0,043	0,035	0,092	-	-	-	-
										2,501	3,147	3,352	2,386
	T3	0,134	0,099	0,097	0,135								
	T4	0,14	0,112	0,099	0,154								

PENDIENTE DE LA RECTA	
0,02	R1
0,31	R2
0,40	R3
0,12	R4
0,21	MEDIA

MEDIO CULTIVO+ ALGAS+DBT 2'5 PPM	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	DO R1	DO R2	DO R3	DO R4	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	LN DO R4
T0		0,09	0,058	0,055	0,091	0,07	0,038	0,035	0,071	-	-	-	-
										2,659	3,270	3,352	2,645
T1		0,099	0,065	0,067	0,103	0,071	0,037	0,039	0,075	-	-	-	-
										2,645	3,297	3,244	2,590
T2		0,112	0,072	0,061	0,119	0,05	0,01	-	0,057	-	-	-	-
								0,001		2,996	4,605		2,865
T3		0,18	0,102	0,115	0,175								
T4		0,195	0,141	0,158	0,224								

PENDIENTE DE LA RECTA	
0,17	R1
0,67	R2
	R3
0,11	R4
0,31	MEDIA

MEDIO CULTIVO+ ALGAS+DBT 1,25 PPM	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	DO R1	DO R2	DO R3	DO R4	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	LN DO R4
T0		0,089	0,072	0,048	0,082	0,069	0,052	0,028	0,062	-	-	-	-
										2,674	2,957	3,576	2,781
T1		0,102	0,081	0,06	0,096	0,074	0,053	0,032	0,068	-	-	-	-
										2,604	2,937	3,442	2,688
T2		0,158	0,134	0,102	0,157	0,094	0,072	0,04	0,095	-	-	-	-
										2,364	2,631	3,219	2,354
T3		0,17	0,142	0,11	0,154								
T4		0,198	0,163	0,186	0,205								

PENDIENTE DE LA RECTA	
0,15	R1
0,16	R2
0,18	R3
0,21	R4
0,18	MEDIA

MEDIO CULTIVO+ ALGAS+DBT 0,625 PPM	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	DO R1	DO R2	DO R3	DO R4	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	LN DO R4
	T0	0,065	0,037	0,038	0,045	0,045	0,017	0,018	0,025	-	-	-	-
										3,101	4,075	4,017	3,689
	T1	0,105	0,058	0,053	0,071	0,077	0,03	0,025	0,043	-	-	-	-
										2,564	3,507	3,689	3,147
	T2	0,164	0,125	0,11	0,149	0,102	0,063	0,048	0,087	-	-	-	-
										2,283	2,765	3,037	2,442
	T3	0,168	0,13	0,116	0,156								
	T4	0,212	0,163	0,15	0,226								

PENDIENTE DE LA RECTA	
0,41	R1
0,66	R2
0,49	R3
0,62	R4
0,54	MEDIA

MEDIO CULTIVO+ ALGAS+DBT 0,312 PPM	Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	DO R1	DO R2	DO R3	DO R4	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	LN DO R4
	T0	0,042	0,033	0,028	0,037	0,022	0,013	0,008	0,017	-	-	-	-
										3,817	4,343	4,828	4,075
	T1	0,079	0,061	0,042	0,067	0,051	0,033	0,014	0,039	-	-	-	-
										2,976	3,411	4,269	3,244
	T2	0,192	0,163	0,132	0,169	0,13	0,101	0,07	0,107	-	-	-	-
										2,040	2,293	2,659	2,235
	T3	0,194	0,153	0,143	0,174								
	T4	0,223	0,178	0,175	0,208								

PENDIENTE DE LA RECTA	
0,89	R1
1,03	R2
1,08	R3
0,92	R4
0,98	MEDIA

Determinación de CE r50 y CE r10:

- La CE r50 y la CE r10 es la concentración de la muestra de ensayo que produce una disminución de un 50 % y el 10 % respectivamente en la tasa de crecimiento con respecto a las soluciones control o testigo. Para ellos representamos la tasa de inhibición frente a la concentración del medio de ensayo que hemos utilizado, ajustando una recta

mediante análisis de regresión. Ambos parámetros son datos toxicológicos y en el caso del DBT son inferiores a 1 ppm.

Tabla 5: Porcentaje de inhibición en relación con la concentración del DBT

CONCENTRACIÓN (PPM)	% INHIBICIÓN
5	100
2,5	100
1,25	83,57
0,665	49,40
0,312	8,97

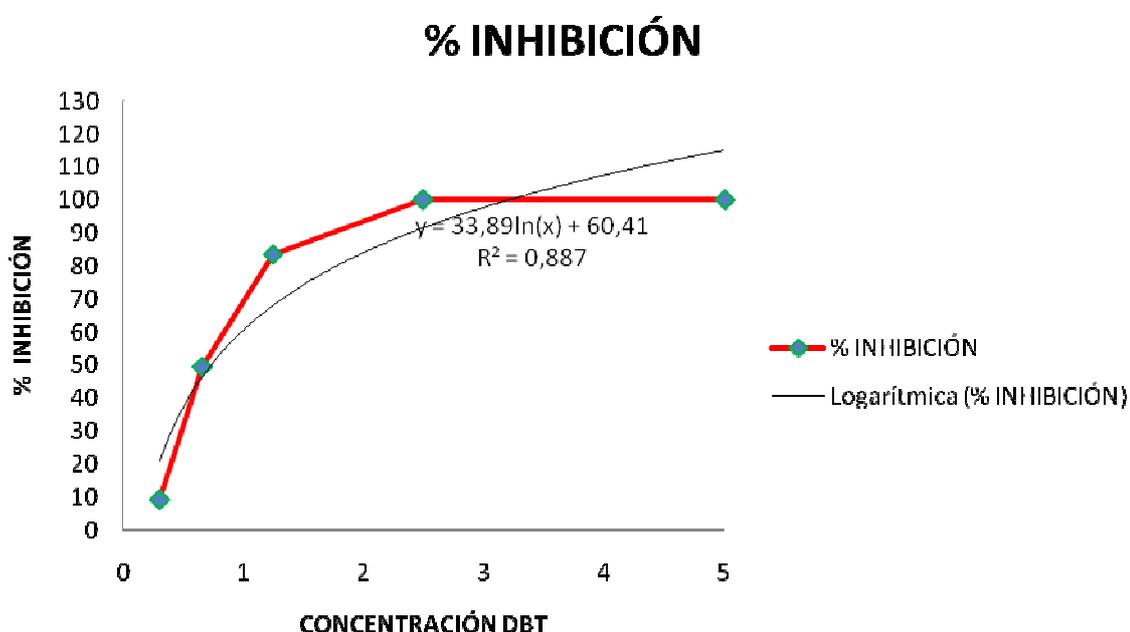


Gráfico 6: Inhibición crecimiento de algas

Inhibición del crecimiento en algas verdes unicelulares utilizando los extractos de los ensayos electrogénicos con DBT en pilas microbianas sedimentarias:

El mismo procedimiento desarrollado anteriormente con diferentes concentraciones de DBT puro, se repite con los extractos obtenidos en los ensayos electrogénicos en pilas sedimentarias.

Los extractos utilizados en el ensayo son los pertenecientes al tiempo cero (tras 1 hora del pulso de DBT), tiempo 4 (tras 2 semanas del pulso de DBT) Y tiempo 5 (tras 4 semanas del pulso de

DBT). Con los análisis en HPLC que se han realizado de estos extractos se ha determinado la concentración de DBT cada uno de ellos. En los extractos con los que se realizan los ensayos, no es posible corregir la concentración del DBT por el factor de masa de suelo, o por el factor de dilución con acetonitrilo. La concentración que poseen cada uno de ellos no es proporcional por tanto, a el grado de biodegradación que han experimentado, es simplemente la concentración de la que se disponía en cada una de las disoluciones utilizadas para el análisis en HPLC. En la siguiente tabla se especifica los ppm DBT en cada uno de los estratos.

	Concentración HPLC(μ molar)	PPM
Ánodo electrogénico T0	46	8,5
Ánodo electrogénico T4	39	7,2
Ánodo electrogénico T5	41,5	7,5

Los datos de absorbancia, densidad óptica y tasas de crecimiento se pueden consultar al final del anejo 2. Aquí presentamos los datos de inhibición en los ensayos:

	% INHIBICIÓN
Ánodo tiempo cero	98,4
Ánodo tiempo 4	79,4
Ánodo tiempo 5	81,67

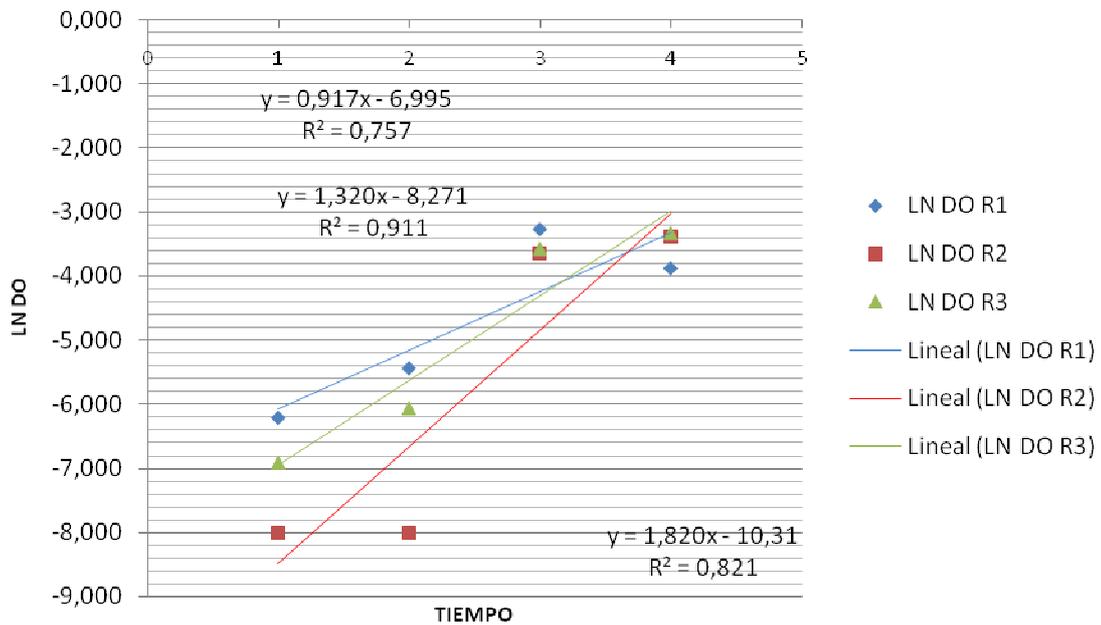
Los resultados confirman que el porcentaje de inhibición es mayor cuanto mayor es la concentración de DBT en los extractos analizados, pero no podemos correlacionar los datos de inhibición que se han obtenido en el ensayo con concentraciones conocidas de DBT puro, con los datos de inhibición con los extractos de suelo. En estos últimos el grado de inhibición ha sido menor que en los ensayos de DBT puro, lo que apunta que los productos derivados del DBT y las diferentes sustancias extraídas del suelo pueden interactuar de forma no conocida para rebajar el efecto tóxico del DBT.

Tiempo(Días)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Absorbancia media medio cultivo
T0	0,020	0,019	0,024	0,021
T1	0,028	0,019	0,030	0,026
T2	0,029	0,022	0,030	0,027
T3	0,033	0,027	0,034	0,031

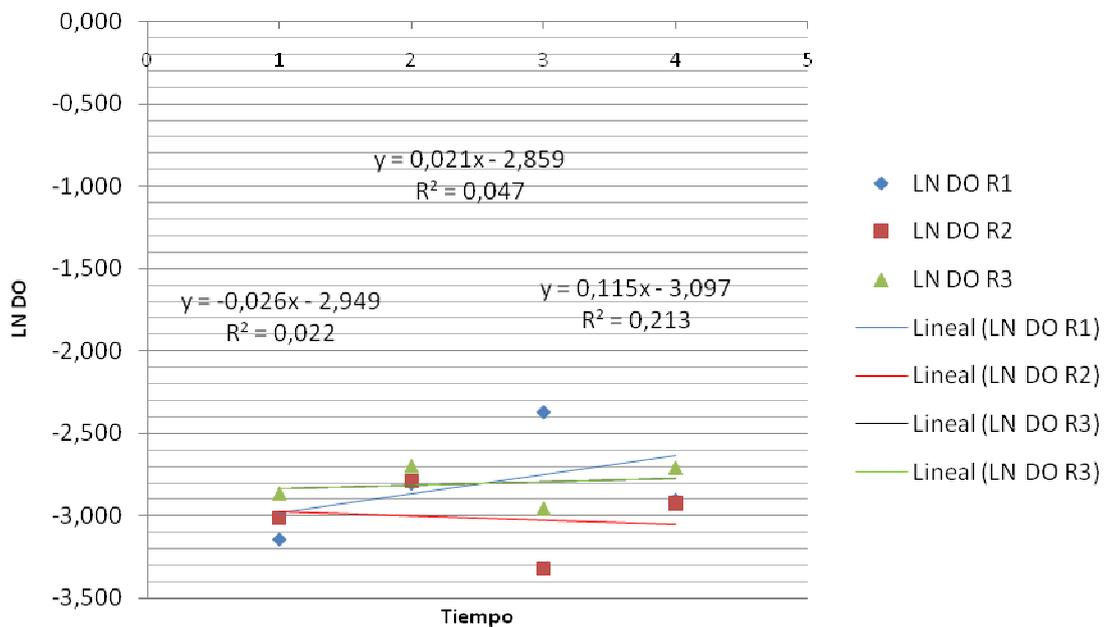
Tiempo(Días)	Repl ica 1	Repl ica 2	Repl ica 3	DO R1	DO R2	DO R3	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	PENDIENTE DE LA RECTA DE CRECIMIENTO DE LAS ALGAS	
T0	0,02 3	0,01 9	0,02 2	0,0 02	- 0,0 02	0,0 01	- 6,215	- 8,006	- 6,908	0,92	R1
T1	0,03 0	0,02 6	0,02 8	0,0 04	0,0 00	0,0 02	- 5,441	- 8,006	- 6,060	1,32	R2
T2	0,06 5	0,05 3	0,05 5	0,0 38	0,0 26	0,0 28	- 3,270	- 3,650	- 3,576	1,80	R3
T3	0,05 2	0,06 5	0,06 7	0,0 21	0,0 34	0,0 36	- 3,879	- 3,391	- 3,334	Tasa de crecimiento media	1,3 5
Tiempo(Días)	Repl ica 1	Repl ica 2	Repl ica 3	DO R1	DO R2	DO R3	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	PENDIENTE DE LA RECTA DE ENSAYOS ÁNODO T0	
T0	0,06 4	0,07 8	0,07 8	0,0 43	0,0 49	0,0 57	- 3,147	- 3,016	- 2,865	0,07	R1
T1	0,08 6	0,08 7	0,09 3	0,0 60	0,0 61	0,0 67	- 2,808	- 2,791	- 2,698	-0,03	R2
T2	0,07 6	0,06 3	0,07 9	0,0 93	0,0 36	0,0 52	- 2,375	- 3,324	- 2,957	0,02	R3
T3	0,08 6	0,08 5	0,09 8	0,0 55	0,0 54	0,0 67	- 2,907	- 2,925	- 2,708	Tasa de crecimiento media	0,0 21 6
Tiempo(Días)	Repl ica 1	Repl ica 2	Repl ica 3	DO R1	DO R2	DO R3	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	PENDIENTE DE LA RECTA DE ENSAYOS ÁNODO T4	
T0	0,05 9	0,06 9	0,07 8	0,0 38	0,0 48	0,0 49	- 3,270	- 3,037	- 3,016	0,37	R1
T1	0,08 2	0,08 1	0,08 5	0,0 56	0,0 55	0,0 59	- 2,876	- 2,894	- 2,825	0,25	R2
T2	0,12 6	0,11 3	0,1 9	0,0 93	0,0 83	0,0 73	- 2,375	- 2,489	- 2,617	0,21	R3
T3	0,14 5	0,13 5	0,12 5	0,1 14	0,0 99	0,0 94	- 2,174	- 2,316	- 2,368	Tasa de crecimiento media	0,2 77
Tiempo(Días)	Repl ica 1	Repl ica 2	Repl ica 3	DO R1	DO R2	DO R3	LN DO R1	LN DO R2	LN DO R3	PENDIENTE DE LA RECTA DE ENSAYOS ÁNODO T5	
T0	0,07 3	0,06 4	0,07 7	0,0 52	0,0 43	0,0 56	- 2,957	- 3,147	- 2,882	0,25	R1
T1	0,08 4	0,08 4	0,1 3	0,0 58	0,0 54	0,0 74	- 2,842	- 2,913	- 2,599	0,27	R2
T2	0,11 5	0,09 5	0,11 3	0,0 83	0,0 68	0,0 86	- 2,489	- 2,688	- 2,453	0,22	R3
T3	0,13 6	0,13 3	0,14 3	0,1 05	0,0 99	0,1 12	- 2,257	- 2,316	- 2,192	Tasa de crecimiento media	0,2 5

A continuación se muestran las rectas de ajuste a las medidas de densidad óptica del control negativo y de los diferentes extractos de las pilas sedimentarias:

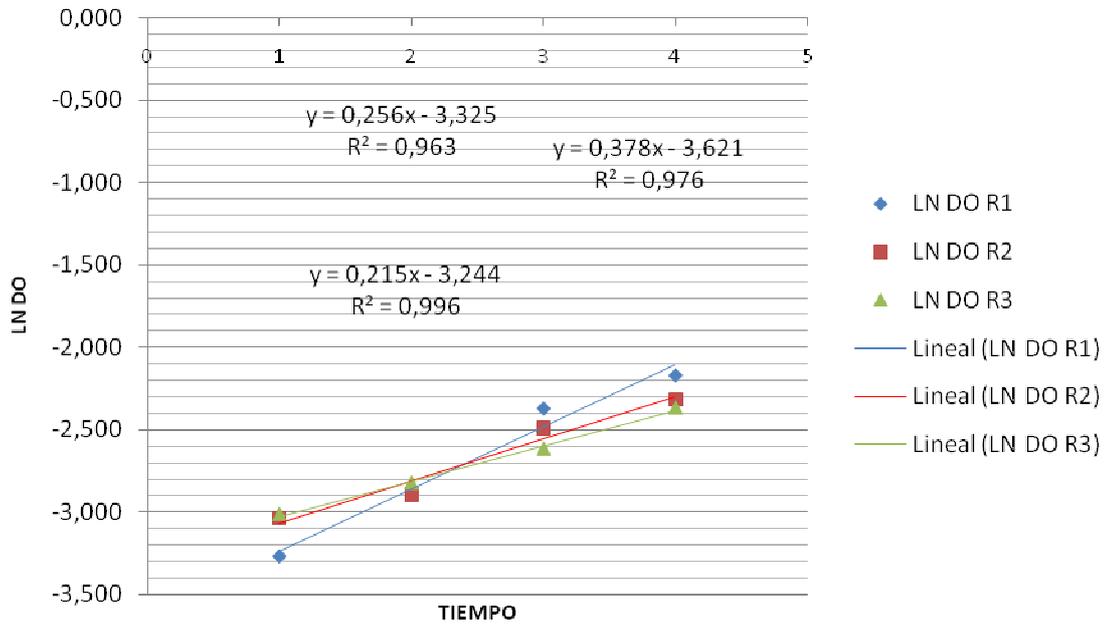
Control negativo-velocidad de crecimiento



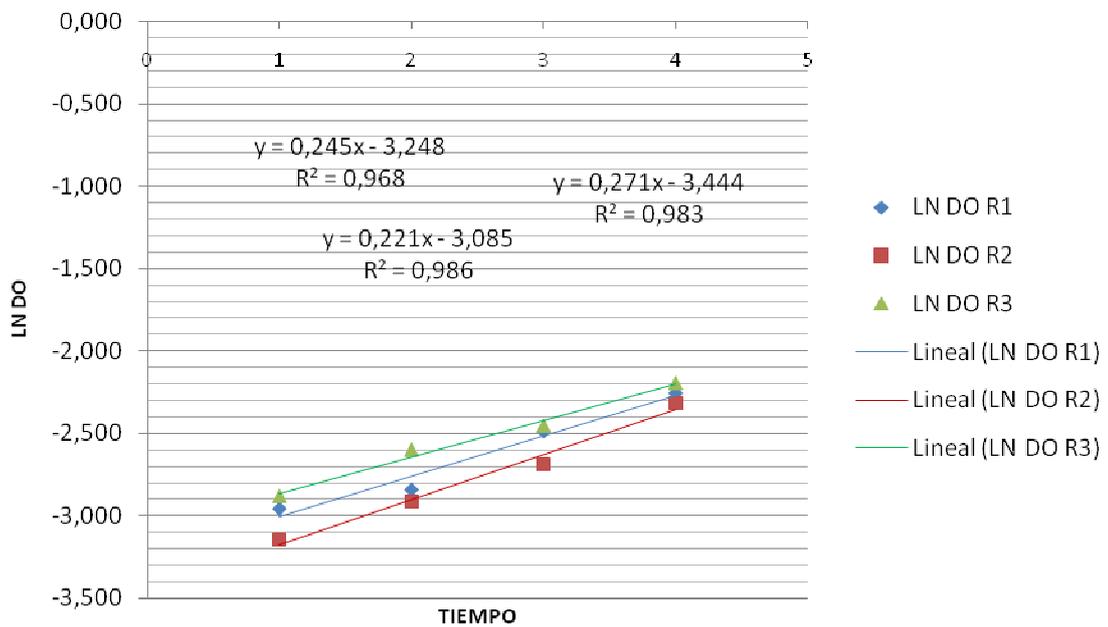
Arena ánodo tiempo cero



Arena ánodo tiempo 4



Arena ánodo 5



9.3. ANEJO 3

Ensayo de determinación de ATP (A22066) en el luminómetro.

Consiste en un ensayo de bioluminiscencia para determinar cuantitativamente el ATP con una luciferasa luciérnaga recombinante y su sustrato d-luciferina. El ensayo se basa en las necesidades de ATP de la luciferasa para producir luz (emisión máxima 560 nm a PH 7). Estos ensayos son extremadamente sensibles. La mayoría de luminómetros detectan hasta 0,1 picómetros de ATP.

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



En las reacciones de bioluminiscencia, el compuesto luciferina se oxida, reacción que cataliza la enzima luciferasa, formando un peróxido intermedio que al romperse, genera moléculas producto. Una de las cuales, se encuentra en estado excitado o de alta energía, y cuando vuelve a su estado fundamental, se emite un fotón (luz).



Ilustración 1: Reacción que tiene lugar en el ensayo de determinación de ATP.

➤ Contenidos del kit necesario para realizar el ensayo (Conservar a -20 grados centígrados protegido de la luz):

1. D-Luciferina (Pigmento responsable de la emisión de luz en bacterias, hongos y animales)
2. Luciferasa luciérnaga recombinante (Enzimas que producen la bioluminiscencia)
3. ATP
4. 20X reacción buffer.
5. DDT (ditiotreitól)

➤ Procedimiento:

Se ha llevado a cabo este ensayo con el objetivo de tener una medida indirecta de la comunidad microbiana que conforma la bio-película que lleva a cabo la actividad electrogénica en las pilas microbianas sedimentarias de combustible.

Para llevar a cabo el ensayo se preparan 10 ml de reactivo y utilizando estos junto a las solución estándar de ATP, se genera la recta de calibrado en el luminómetro a diferentes concentraciones de ATP. Una vez trazada la recta de calibrado se realiza el test con el extracto de reactivo que obtenemos tras estar en contacto el grafito con el reactivo durante tres minutos a 30 grados centígrados.

Al solamente disponer de un ánodo para llevar a cabo los ensayos no se ha podido variar los valores de ciertos parámetros de ensayo tales como la superficie de grafito utilizada, el volumen del reactivo y el tiempo de contacto entre éste y el grafito para determinar cuáles son las condiciones más acertadas para medir el ATP de la comunidad bacteriana anclada en el grafito.

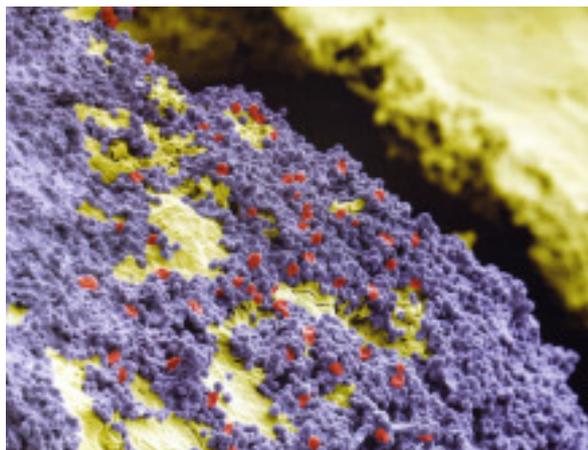


Foto 4: Bio-película microbiana

A tenor de los resultados (mostrados en URL, unidades relativas de luz), cercanos al ensayo en blanco de la recta de calibración que se ha realizado con anterioridad con la muestra estándar de ATP, se infiere que no ha sido posible la extracción bacteriana del ánodo. Los resultados son los siguientes:

	replica 1 (200 μ l)	replica 2 (200 μ l)	replica 3 (200 μ l)
Grafito felpa (0,22 gramos 1 ml)	0,00179	0,00186	0,0028
Grafito felpa (0,15 gramos, 1 ml)	0,00215	0,00165	0,0013
Grafito sólido (3,5 gramos, 5 ml)	0,00055	0,00057	0,00046