

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**  
**Y**  
**UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS**



**Universidad  
de Alcalá**



**Universidad  
Rey Juan Carlos**

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

**PROYECTO DE FIN DE MÁSTER**

**BIODEGRADACIÓN DE HERBICIDAS CLORADOS  
EN REACTORES  
DE COLUMNA DE BURBUJEO**

**AUTOR:**

**David Zalacáin Domench**

**DIRECTORES:**

**Dr. Ana Karina Boltes Espínola (UAH)**

**Dr. Pedro Letón García (UAH)**

Alcalá de Henares, 16 de Junio de 2011

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	4
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
2.1- Herbicidas.....	5
2.2- Diurón.....	6
2.2.1- <i>Propiedades</i> .....	6
2.2.2- <i>Diurón en el Medio Ambiente</i> .....	7
2.3- Toxicidad.....	8
2.4- Degradación del diurón.....	8
2.4.1- <i>Degradación por Variovorax SRS16</i> .....	9
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	12
4.1- Materiales.....	12
4.1.1- <i>La columna de burbujeo</i> .....	12
4.2- Metodología del proceso de biodegradación.....	14
4.2.2- <i>Cultivo en suspensión</i> .....	14
4.2.3- <i>Cultivo inmovilizado</i> .....	14
4.3- Toma de muestras y posterior análisis.....	15
4.3.1- <i>Material empleado</i> .....	15
4.3.2- <i>Métodología utilizada en el cultivo en suspensión</i> .....	16
4.3.3- <i>Métodología utilizada en el cultivo inmovilizado</i> .....	16
4.4- Determinación de las concentraciones de diurón y succinato mediante HPLC.....	18
4.4.1- <i>Método de elución y rectas de calibrado</i> .....	18
4.5- Extracción en fase sólida.....	21
4.5.1- <i>Metodología para realizar la SPE (Solid Phase Extraction)</i> .....	21
4.6- Ensayo de ecotoxicidad.....	22
4.6.1- <i>Metodología seguida en este ensayo</i> .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	24
5.1- Biodegradación de diurón en el cultivo en suspensión.....	24
5.2- Biodegradación de diurón en el cultivo inmovilizado.....	27
5.2.1- <i>Proceso de inmovilización</i> .....	27
5.2.2- <i>Biodegradación de diurón</i> .....	27
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	34
<b>9. ANEXOS</b> .....	36
- ANEXO 1: Medio de cultivo R2B.....	36
- ANEXO 2: Medio de cultivo MSN.....	37

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Molécula de diurón .....	6
<b>Figura 2.</b> Rutas de degradación del diurón .....	8
<b>Figura 3.</b> Mineralización de diurón por parte del consorcio <i>Arthrobacter globiformis</i> D47 y <i>Variovorax sp.</i> SRS16 .....	10
<b>Figura 4.</b> Columna de burbujeo con recirculación interna ( <i>airlift</i> ) .....	12
<b>Figura 5.</b> Esquema del flujo dentro del <i>airlift</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Esquema de la toma de muestras para el cultivo inmovilizado .....	17
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica del flujo de bombeo para el método del diurón .....	19
<b>Figura 8.</b> Recta de calibrado obtenida para el diurón .....	19
<b>Figura 9.</b> Representación de un cromatograma de diurón y sus metabolitos .....	20
<b>Figura 10.</b> Recta de calibrado obtenida para el succinato .....	20
<b>Figura 11.</b> Representación de un cromatograma de succinato y sus metabolitos .....	21
<b>Figura 12.</b> Evolución de la biomasa del cultivo en suspensión en el reactor .....	24
<b>Figura 13.</b> Representación de la concentración de succinato en el <i>airlift</i> con el cultivo en suspensión ....	25
<b>Figura 14.</b> Evolución de la concentración de diurón en la columna con el cultivo en suspensión .....	25
<b>Figura 15.</b> Comparación de la biomasa y de las concentraciones de diurón y succinato en el <i>airlift</i> .....	26
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 26	
<b>Figura 17.</b> Evolución del pH en el <i>airlift</i> con el cultivo inmovilizado en biolita .....	28
<b>Figura 18.</b> Representación de la concentración de succinato, con el cultivo inmovilizado en biolita .....	28
<b>Figura 19.</b> Evolución de la concentración de diurón en la columna con el cultivo inmovilizado .....	29
<b>Figura 20.</b> <i>Variovorax</i> SRS16 sobre biolita .....	29
<b>Figura 21.</b> Biofilm de <i>Variovorax</i> SRS16 sobre biolita .....	29
<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicoquímicas del diurón .....	6
<b>Tabla 2.</b> Comparación de las velocidades de degradación de diurón .....	30

## 1. RESUMEN

El uso masivo de herbicidas en la agricultura, y más en concreto de diurón, ha dado lugar a su detección en aguas subterráneas, superficiales y suelos, aún después de años de haberse utilizado. Esto ha llevado a los expertos a plantear diversas soluciones para remediar la contaminación. Una estrategia de biorremediación es la biomagnificación por parte de bacterias. Este proyecto se enmarca dentro de estas tecnologías de descontaminación, ya que se trabajó con *Variovorax sp.* SRS16, bacteria aislada recientemente de suelos contaminados con herbicidas clorados.

El trabajo consistió en evaluar la degradación de diurón por parte de *Variovorax sp.* SRS16 y estudiar la formación de una biopelícula sobre un soporte inerte. Para ello se utilizó un reactor de columna de burbujeo con recirculación interna (*airlift*), que trabajó de manera aerobia y en el que se añadían los diferentes nutrientes, así como el inóculo de bacterias y el herbicida a degradar. Es el primer trabajo donde se reporta el cultivo de esta cepa mineralizadora de diurón en un reactor a escala laboratorio, ya que anteriormente sólo había sido cultivada en Erlenmeyers.

Al inicio del proyecto se estudió la reacción con el cultivo de *Variovorax sp.* SRS16 en suspensión, y se determinó que, efectivamente, se producía una degradación de diurón por la acción de dicha bacteria, calculándose la velocidad de biodegradación en este tipo de reactor. La siguiente fase del proyecto consistió en intentar que las bacterias *Variovorax sp.* SRS16 formasen una biopelícula sobre un soporte sólido.

## 2. INTRODUCCIÓN

La agricultura, tal y como la conocemos desde las últimas décadas hasta la actualidad, no se entendería sin el uso de pesticidas, cuyo objetivo es el de mejorar la productividad y, también, la calidad de las cosechas. Esta utilización de herbicidas en la producción agrícola, así como en áreas urbanas e industriales, ha dado lugar a la detección de residuos en las aguas continentales y subterráneas, convirtiéndose en una de las principales fuentes contaminantes. Debido al uso masivo de estos herbicidas, en cantidades de hasta varios kilogramos por hectárea, se han encontrado concentraciones en el agua dulce en un rango que varía desde picogramos hasta microgramos por litro (*Schwarzenbach et al. 2006*). Incluso se han hallado concentraciones de miligramos por litro (*Caux et al. 1998*).

La continuada, y cada vez más importante, contaminación de los ecosistemas, ha suscitado la necesidad de la sociedad de conocer los riesgos que conlleva su uso descontrolado para los ecosistemas donde son vertidos, así como para la salud humana. Numerosos estudios se han llevado a cabo en los últimos años para desarrollar tecnologías de depuración más eficientes, que permitan alcanzar mayores eficiencias de degradación de estos contaminantes (*Stasinakis et al. 2009, Farré et al. 2006*).

### 2.1- Herbicidas

Uno de los mayores grupos de herbicidas detectados en las aguas potables europeas son los herbicidas pertenecientes a la familia de las fenilureas. Este tipo de herbicidas se empezó a comercializar en la década de los cincuenta y se utiliza sobre todo en el control de cultivos de algodón, frutas, cereales y otros usos agrícolas. El mecanismo de acción de estos compuestos se basa en su entrada a las plantas a través de las raíces, desde ahí son transportados por la savia hasta las hojas, donde se produce la inhibición de la fotosíntesis.

Se ha demostrado que varios componentes de este grupo pueden ser disruptores endocrinos y que pueden tener algún tipo de efecto genotóxico o ecotóxico (*Caux et al. 1998, Lintelmann et al. 2003, Tixier et al. 2001*).

Los principales, y más persistentes, compuestos dentro de esta familia de herbicidas son dos:

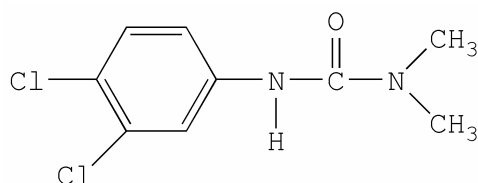
- Diurón [N – (3,4 – diclorofenil) – N, N – dimetilurea]
- Linurón [N – (3,4 – diclorofenil) – N – metoxi – N – metilurea]

## 2.2- Diurón

El diurón es un contaminante que se bioacumula en ciertos organismos, y generalmente se muestra persistente en el suelo, el agua y los sedimentos. Este compuesto es ligeramente tóxico para los mamíferos y las aves, mientras que es moderadamente tóxico para los invertebrados acuáticos. Sin embargo, su principal producto de degradación, la 3,4 – dicloroanilina (DCA), posee una toxicidad más alta y también es persistente en suelo, agua y aguas subterráneas.

### 2.2.1- Propiedades

En su forma pura es un sólido cristalino incoloro, cuya fórmula molecular se muestra en la Figura 1, y que presenta una gran estabilidad química a temperatura ambiente. Su punto de fusión es de aproximadamente 158 °C y su estructura química se descompone a temperaturas superiores a 180 °C. Su coeficiente de partición octanol – agua es moderadamente bajo ( $\log K_{ow} = 2,6$ ) lo que nos indica su tendencia a ser soluble en agua y en disolventes orgánicos polares, pero escasamente soluble en hidrocarburos.



**Figura 1.** Molécula de diurón

El diurón tiene una constante de partición suelo – fracción orgánica de 485, lo que determina su afinidad de adsorción por las partículas orgánicas del suelo, por tanto, al tener un alto valor de  $K_{oc}$ , la capacidad de adsorción es alta y se reparte de manera heterogénea en el suelo.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas del diurón

<b>Fórmula (IUPAC)</b>	3 – (3,4 – diclorofenil) 1,1 – dimetilurea	<b>Punto de fusión</b>	158 – 159 °C
<b>Fórmula molecular</b>	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	<b><math>K_{oc}</math></b>	485
<b>Peso molar (<math>g\ mol^{-1}</math>)</b>	233,10	<b>Log <math>K_{ow}</math></b>	2,6
<b>Solubilidad en agua a 20 °C</b>	42 mg $L^{-1}$	<b>Presión de vapor a 25 °C</b>	0,009 mPa

### 2.2.2- Diurón en el Medio Ambiente

El principal uso del diurón es como herbicida agrícola, ya que inhibe la fotosíntesis al impedir la producción de oxígeno (Wessels y Van der Veen, 1956) y bloquear la transferencia de electrones a nivel del fotosistema II de los microorganismos fotosintéticos y de las plantas. Se ha recurrido a este compuesto para controlar una gran variedad de plantas de hoja perenne, malas hierbas y musgos, así como en muchos cultivos agrícolas de frutas, algodón, caña de azúcar, alfalfa y trigo con unas tasas de aplicación de  $1,8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ .

También se puede emplear como un herbicida de amplio espectro en zonas urbanas e industriales, por ejemplo en carreteras, líneas de ferrocarril ( $3 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), o como un ingrediente activo en las pinturas anti-incrustantes de los barcos y en formulaciones de alguicidas, utilizados frecuentemente en fuentes ornamentales y en acuicultura.

Debido a su alta persistencia, que varía de un mes a un año, el diurón se puede encontrar en muchos entornos como el suelo, los sedimentos y el agua (Field et al. 2003, Okamura et al. 2003). En el suelo teniendo en cuenta su baja volatilidad y su alto  $K_{oc}$ , el diurón se encuentra en la fase sólida, antes que en la fase gaseosa o líquida. Una vez que este herbicida se ha adsorbido al suelo, puede pasar a las aguas subterráneas mediante procesos de lixiviación y percolación. En consecuencia, se ha detectado diurón en: lagos, ríos, aguas subterráneas, aguas y sedimentos marinos e incluso en la lluvia de zonas urbanas y rurales. El diurón por lo general, se encuentra en concentraciones traza (nanogramos por litro a microgramos por litro), pero se han llegado a encontrar concentraciones más altas, de miligramos por litro, por ejemplo, en el agua de drenaje de los suelos agrícolas y en la escorrentía de huertos de frutas.

Los factores que hacen que un herbicida sea, o no, peligroso para el medio ambiente, son su movilidad y su tendencia a la degradación. El diurón cumple con estas dos características, alta movilidad y poco degradable en el medio ambiente, por lo que, en consecuencia, el diurón se ha incluido en la lista de la Comisión Europea de sustancias prioritarias de los recursos de agua dulce europeos y en la “*Second Drinking Water Contaminant Candidate List*” de la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA). En España esta sustancia se encuentra regulada bajo la Directiva CE 76/464 del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático y también por la Directiva 93/58/CEE del Consejo, de 29 de Junio de 1993, por la que se modifica el Anexo II de la Directiva 76/895/CEE relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas (MMAyMRyM).

### 2.3- Toxicidad

Con respecto a los procesos de biodegradación del diurón es fundamental considerar y analizar la toxicidad del diurón, así como la de su principal metabolito, la 3,4 – dicloroanilina (DCA). Los principales efectos tóxicos de la ingestión crónica de diurón en mamíferos son la pérdida de peso y las anomalías en la sangre, el hígado y el bazo, mientras que en humanos no se observan síntomas significativos después de una exposición oral (Giacomazzi y Cochet, 2004). Para los peces el diurón es moderadamente tóxico, al mismo tiempo que es ligeramente tóxico para las aves y los invertebrados acuáticos.

Muchos estudios confirman la toxicidad de la 3,4 – dicloroanilina (DCA) sobre varios organismos, como son el pez cebra, microalgas, protozoos, fitoplancton, dafnia e incluso en bacterias (Guilhermino et al. 1998, Tixier et al. 2001).

### 2.4- Degradación del diurón

Las bajas concentraciones de diurón en el Medio Ambiente son principalmente el resultado de la interacción de procesos como: la dilución, la sorción y los procesos de degradación tanto bióticos, como abióticos, donde el principal proceso es la biodegradación. En 1973, Geissbuhler demostró por primera vez la implicación de los microorganismos en la degradación del diurón, comparando la degradación del diurón en un suelo esterilizado y en otro no esterilizado.

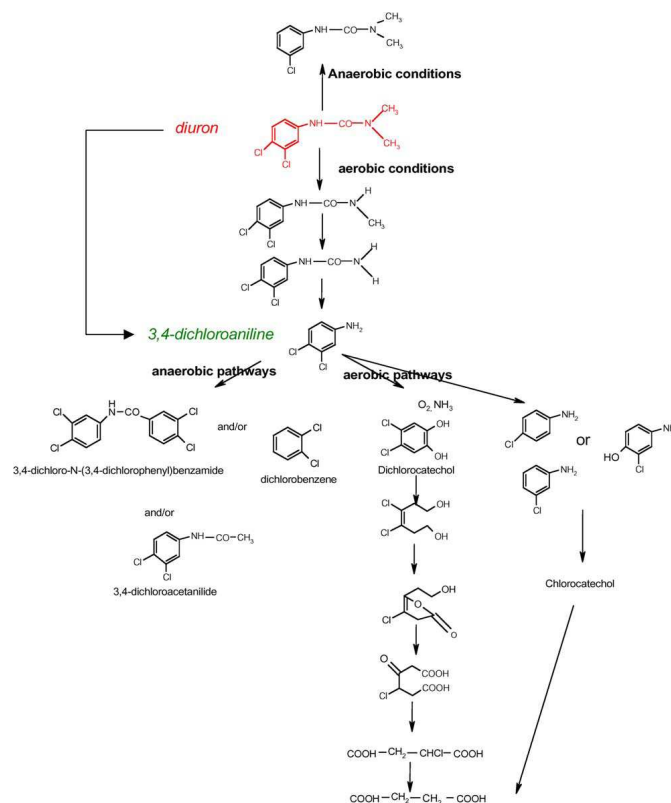


Figura 2. Rutas de degradación del diurón



Las diferentes rutas del proceso de biodegradación del diurón (Figura 2) dan lugar a diversos metabolitos, que incluso pueden llegar a ser aún más tóxicos, como es el caso de la 3,4-dicloroanilina (DCA). Otros metabolitos producidos son: el 1- (3,4-Diclorofenil) -3-metilurea (DCPMU), el 1- (3,4-diclorofenil) urea (DCPU) o el 3- (3-clorofenil) -1,1-dimetilurea (CPDMU).

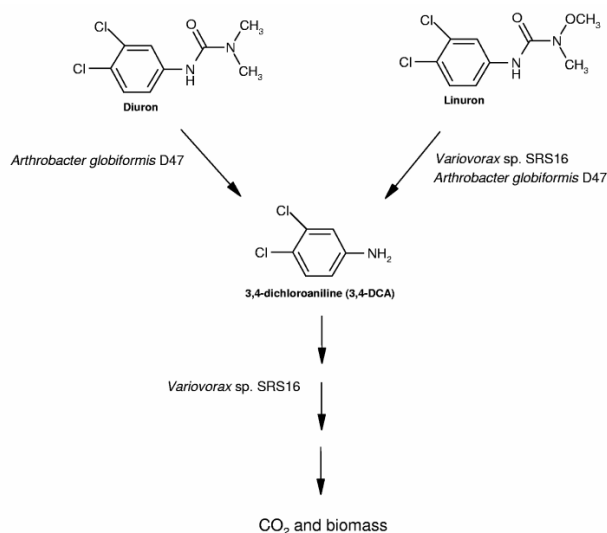
#### 2.4.1- Degradación por *Variovorax* SRS16

Es conocida la capacidad de degradar herbicidas por parte de algunas comunidades específicas de microorganismos, aunque se ha demostrado que las bajas concentraciones de herbicida pueden reducir de manera significativa la velocidad y el grado de degradación (*Toräng et al. 2003, de Liphay et al. 2007, Sørensen et al. 2007*). Por ello una estrategia de remediación de la contaminación por herbicidas en los recursos de agua potable es la biomagnificación usando bacterias. La completa mineralización del herbicida requiere unas cepas muy especializadas, que difícilmente se van a encontrar en las comunidades del medio donde se haya producido la contaminación.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los principales grupos de herbicidas detectado en las aguas europeas es el perteneciente a la familia de las fenilureas, cuya degradación es el objeto de este proyecto. Algunas bacterias capaces de mineralizar linurón han sido aisladas de suelos agrícolas (*Dejonghe et al. 2003, Breugelmans et al. 2007*) y recientemente ha sido caracterizada la primera bacteria, *Variovorax* sp. SRS16, capaz de mineralizar los dos herbicidas más importantes de este grupo: el diurón y el linurón (*Sørensen et al. 2005, 2008*). La cepa de *Variovorax* sp. SRS16 fue aislada en un suelo agrícola danés y posteriormente caracterizada en el laboratorio (*Sørensen et al. 2005*) y se depositó en la Colección del Instituto Pasteur (París, Francia) con el número de acceso CIP 108393.

El Doctor Sebastian Sørensen, y su grupo de investigación del Departamento de Geoquímica de la Universidad de Copenhague (Dinamarca), elaboraron un trabajo en el año 2005 en el que consiguieron aislar la cepa SRS16 de *Variovorax* sp. y la confirmaron como una bacteria mineralizadora de linurón, capaz de usar el herbicida como fuente de carbono, nitrógeno y energía. La mineralización de linurón debida a la cepa SRS16 fue probada y verificada en un amplio rango de concentraciones, que iba desde 0,1 hasta 1.000 miligramos por litro.

En el año 2008, este mismo grupo de investigación, construyó un consorcio de dos bacterias para conseguir la mineralización del diurón y linurón, mediante la combinación de las capacidades degradativas de diurón del organismo *Arthrobacter globiformis* (cepa D47) y las capacidades degradativas de linurón de *Variovorax* sp. SRS16 (Figura 3).



**Figura 3.** Mineralización de diurón por parte del consorcio *Arthrobacter globiformis* D47 y *Variovorax* sp. SRS16

Este consorcio construido se utilizó para iniciar la degradación y mineralización de diurón en suelos sin posibilidades de atenuación natural. Este enfoque condujo al hallazgo de que *Variovorax* sp. SRS16 era capaz de mineralizar diurón en un cultivo puro, siempre que fuese complementado con sustratos de cultivo adecuados, convirtiéndose así en la primera bacteria conocida en mineralizar diurón. En comparación con el consorcio, la cepa SRS16 posee un menor grado de mineralización, lo que indica que la asociación formada por las cepas D47 y SRS16, es candidata para formar parte en la biorremediación de suelos y aguas contaminadas por diurón, linurón y su metabolito 3,4 – DCA.

Hasta la actualidad, todos estos trabajos acerca de la de degradación de diurón por parte de *Variovorax* sp. SRS16, se llevaron a cabo a pequeña escala, en placas de Petri o formando biopelículas en matraces Erlenmeyer. Por tanto este proyecto es pionero, ya que se va estudiar la biodegradación de este herbicida en un reactor del tipo *airlift*, a mayor escala que los anteriores. Estos reactores han sido muy empleados en la tecnología ambiental, pero nunca hasta ahora se había experimentado con ellos para realizar dicha degradación por parte de la bacteria *Variovorax* sp. SRS16.

### 3. OBJETIVOS

Para la realización de este proyecto se han planteado claramente dos objetivos:

- Evaluar la capacidad de biodegradación del herbicida diurón por parte de un cultivo de bacterias *Variovorax* sp. SRS16, en un reactor aerobio del tipo columna de burbujeo con recirculación interna (*airlift*). Esta capacidad se va a evaluar con el microorganismo suspendido e inmovilizado sobre un soporte sólido, comparando los resultados conseguidos en ambos métodos.
- Estudiar la formación por parte de la bacteria *Variovorax* sp. SRS16, de una biopelícula sobre un soporte inerte, como es la biolita. El cultivo de bacterias inmovilizadas sobre soportes sólidos, permite conseguir abundantes cantidades de biomasa activa en forma de biopelícula.

## 4. METODOLOGÍA

En este apartado se describen los equipos, reactivos y materiales utilizados en el trabajo.

### 4.1- Materiales

#### 4.1.1- La columna de burbujeo

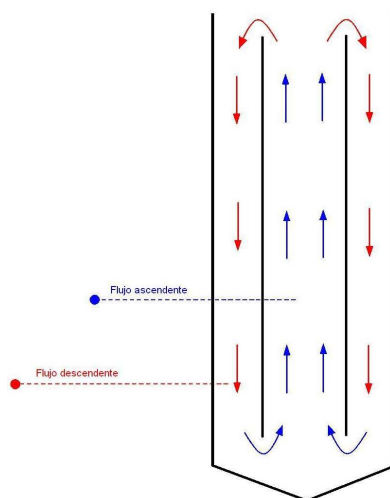
El principal elemento de este trabajo es el reactor, la columna de burbujeo con recirculación interna, *airlift* (Figura 4), cuya principal característica es la recirculación cíclica del fluido. La columna está construida en vidrio y tiene una capacidad de 1,1 litros, mientras que su altura y su diámetro son 45 y 7 cm. respectivamente.



En su interior posee un tubo concéntrico, también de vidrio, elevado 6 cm. sobre el fondo del reactor y con un diámetro de 5 cm. El flujo del gas entra por una placa porosa ubicada en la base de la columna, asciende por el interior del tubo situado coaxialmente a la columna y desciende por el exterior del tubo hasta llegar otra vez a la placa porosa donde vuelve a ascender, como se ve en la Figura 5.

**Figura 4.** Columna de burbujeo con recirculación interna (*airlift*)

La forma de operar del reactor fue en discontinuo, lo que se caracteriza porque el medio de cultivo y las bacterias que lo van a degradar se introducen en la columna al principio del proceso y se dejan reaccionar durante un período de tiempo determinado, en presencia continua de oxígeno.



**Figura 5.** Esquema del flujo dentro del *airlift*

Un compresor, situado en el exterior del laboratorio, suministraba el aire que le llegaba a la columna, y antes de su entrada, se le colocó un caudalímetro Aalborg, del modelo *Mass Flowmeter GFM 37*, para controlar el caudal de aire que accede al reactor. La parte superior de la columna de burbujeo tiene una salida en donde se le acopló un condensador para evitar al máximo las pérdidas por evaporación. Todas estas conexiones se realizaron mediante tubos de silicona de diferente grosor.

El resto de material empleado fue el siguiente:

- Para el inóculo de las bacterias se utilizaron cultivos puros de *Variovorax* SRS16, con el número de acceso CIP 108393 de la Colección del Instituto Pasteur, donados por grupo investigador del Doctor Sørensen (Universidad de Copenhague, Dinamarca).
- Medio de cultivo complejo R2B, que se genera a partir de una mezcla de sales concentradas (Anexo 1) a un pH de entre 7,1 y 7,2. Este medio se utiliza para el crecimiento de las bacterias en los matraces Erlenmeyer.
- El medio de cultivo MSN se construye a partir de tres soluciones que contienen distinta proporción de sales (Anexo 2). Se parte de una solución tampón y otra que contiene nutrientes, a las que se añade la solución que aporta los elementos traza. Después de ajustar el pH como en el medio R2B, entre 7,1 y 7,2, se introduce en el autoclave para esterilizarlo y, posteriormente, se le añade una solución de FeCl<sub>3</sub>. Este medio MSN es el que se va a introducir en la columna de burbujeo junto a unas determinadas cantidades de succinato, como fuente de carbono de los microorganismos, y de diurón, como fuente de nitrógeno, para su posterior degradación.
- pHmetro modelo *conductivity meter 524*, de la marca Crison. Para ajustar el pH se utilizan soluciones de NaOH y HCl.
- Incubadora B.Braun-Biotech SA, de agitación orbital, modelo *Certomat* que mantiene a las bacterias a una temperatura constante de 30 °C y en estado de agitación.
- Centrífuga miniSpin, modelo *Eppendorf*.
- Estufa P-Selecta, que se encuentra a 50 °C.
- Autoclave P-Selecta, modelo *Presoclave-II*, utilizada para esterilizar por calor los materiales y los medios empleados en este trabajo.

## **4.2- Metodología del proceso de biodegradación**

### **4.2.2- Cultivo en suspensión**

La metodología seguida para la realización del inóculo de bacterias fue la siguiente:

Para realizar el inóculo de *Variovorax* SRS16 se tomaron 5 tubos eppendorf que contenían el cultivo puro facilitado por el grupo de investigación del Dr. Sebastian R. Sørensen (Universidad de Copenhague, Dinamarca) y se centrifugaron a 4.000 revoluciones y durante 5 minutos, para poder retirar el sobrenadante (glicerol) y quedarnos solamente con las bacterias. Se lavaron los eppendorf con el medio R2B y se volvió a repetir la operación, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Una vez hecho esto se resuspendieron las bacterias con el medio R2B para volcar el contenido en el matraz Erlenmeyer. En dicho matraz se obtuvo un volumen de 150 mL y se introdujo en la incubadora toda una noche a 30 grados con agitación constante.

Al día siguiente se prepararon los volúmenes de succinato y de diurón a partir de unas disoluciones concentradas, para que tuviesen una concentración de 3 ppm el diurón y de 2 g/L el succinato. Al final en la columna había 1 litro de medio MSN, 30 mL de succinato, 80 mL de diurón y 100 mL del inóculo de *Variovorax* SRS16. Se fijó un caudal de aire de 0,8 L/minuto.

### **4.2.3- Cultivo inmovilizado**

Al comienzo de esta fase del proyecto se procedió a realizar un cultivo de bacterias, que se llevó a cabo sobre tres soportes sólidos: arena de mar, arena de río y biolita. De entre estos cultivos, se tomaron 100 mL del sobrenadante de un Erlenmeyer que contenía un cultivo de bacterias *Variovorax* SRS16 inmovilizadas en arena de río, que estaban creciendo con el medio R2B. Este inóculo de bacterias fue el que se introdujo en el *airlift* junto con el medio de cultivo y los diferentes nutrientes, para iniciar la reacción. Se deseaba que en el reactor hubiese una concentración de 1 g/L de succinato, por lo que a partir de una concentración madre de 80 g/L, se añadieron 12,5 mL. Para el diurón, se utilizó un volumen de 100 mL cuya concentración eran 100 mg/L (ppm), para conseguir una concentración de 1 ppm. A estos volúmenes de succinato y diurón, 12,5 y 100 mL respectivamente, se le añadió medio MSN hasta llegar a 1 litro. Es entonces cuando se introdujeron en la columna 900 ml del medio de cultivo (MSN+ succinato+ diurón), 100 gramos de biolita, previamente lavada con agua milliQ y secada en la estufa a 50 grados, y los 100 mL del cultivo de *Variovorax* SRS16. Mientras que el caudal de aireación medido en la entrada del reactor fue de 1,2 L/minuto.

A este caldo se le dejó reaccionar durante dos meses y medio, en los que la columna se iba rellenando con agua destilada o medio de cultivo MSN, para conseguir un nivel constante y poder seguir así con la recirculación, ya que el reactor sufría una elevada evaporación. El objetivo de mantener este caldo tanto tiempo fue el de intentar inmovilizar las bacterias sobre el sólido, para que formasen una biopelícula sobre la biolita.

Una biopelícula se puede definir como una estructura compleja de células y productos celulares, como son los polímeros extracelulares (*Characklis, 1990*). El desarrollo de la biopelícula, o *biofilm*, está influenciado por varios procesos incluyendo la adsorción y desorción de los microorganismos respecto al sólido, la afinidad de los microorganismos con la superficie, y la capacidad de crecimiento y desprendimiento de la propia biopelícula.

Una vez pasado este tiempo comenzó otro ciclo de reacción. Para ello se retiró el máximo medio posible de la columna manteniendo la biolita, en la que cabía suponer que ya se había formado la biopelícula, para asegurar así que las concentraciones de nutrientes que se introducían de nuevo, eran las correctas. En este caso se añadieron unas concentraciones de 8 g/L de succinato y de 1 mg/L de diurón, y se trabajó con un caudal de aire de 1,7 L/minuto.

### **4.3- Toma de muestras y posterior análisis**

#### **4.3.1- Material empleado**

- Jeringas esterilizadas de 1, 25 y 50 mL
- Tubos esterilizados de 10 y 50 mL
- Filtros Millex GV de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Pipetas Pasteur.
- Bomba de vacío y filtros de 0,45 micras.
- Centrifuga de la marca Heraeus y del modelo *Multifuge 3 L-R*, con capacidad para 6 tubos de 50 mL
- Espectrofotómetro Shimadzu, *modelo UV-1800*, para las medidas de la Densidad Óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros. Está conectado a un ordenador con el software UVProbe 2.31, de forma que se registren los datos de la absorbancia.
- Microscopio electrónico de barrido ZEISS, modelo *DSM 950 (Digital Scanning Microscope)* situado en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Alcalá.

#### 4.3.2- Metodología utilizada en el cultivo en suspensión

Al estimar que la reacción que iba a tener lugar en el *airlift* era relativamente rápida, se supuso un periodo de reacción de 48 horas, en el que se extrajeron 7 muestras. Ya añadido el medio de cultivo, el diurón y el succinato, y una vez que el reactor hubo entrado en funcionamiento se sacó la primera muestra, a tiempo cero, para tenerla como referencia de las concentraciones iniciales de todos los compuestos. A partir del tiempo cero, se sacaron 7 muestras a diferentes intervalos de tiempo, hasta llegar a los 2 días, para evaluar como varían los parámetros.

Cada una de ellas tenía un volumen de 10 mL y se extrajeron mediante unas jeringas esterilizadas de 25 mL. Nada más sacarlas, y para evitar la sedimentación, se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro. Después, las muestras se pasaron por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilizarlas por filtración y poder analizarlas en el HPLC. Dichas muestras se colocaron en 7 viales, que se dejaron en el frigorífico hasta su posterior análisis.

Una vez se analizaron las muestras en el HPLC, se procedió a realizar el ensayo de ecotoxicidad con algas verdes unicelulares.

#### 4.3.3- Metodología utilizada en el cultivo inmovilizado

Durante el periodo de inmovilización, de dos meses y medio, se sacaron muestras para ir controlando las concentraciones de succinato y de diurón que había en el biorreactor, mediante un análisis en el HPLC. También se determinó la absorbancia de las muestras, a través del espectrofotómetro, para evaluar si se estaba produciendo un crecimiento bacteriano. Aunque esta densidad óptica presenta cierta interferencia, ya que no solamente mide las bacterias que hay, sino que también mide los sólidos disueltos en el medio, sí que se utiliza para estimar este crecimiento bacteriano.

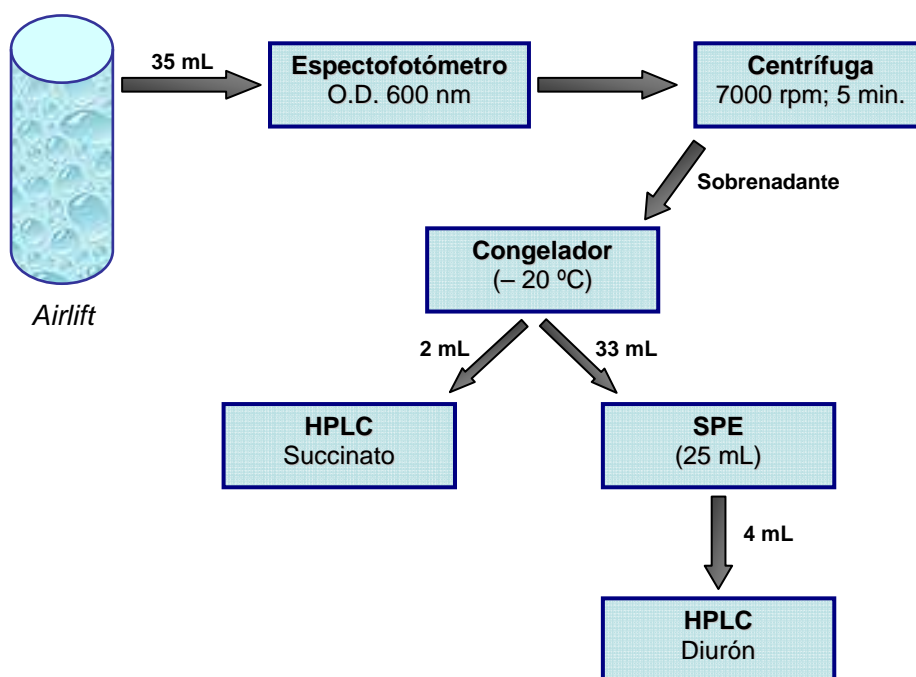
Debido a la baja concentración de diurón, se hace necesario realizar una preconcentración para poder observar más claramente las concentraciones que nos muestra el cromatograma, la medida en el HPLC. Para ello se recurre al tratamiento de las muestras con la técnica de la extracción en fase sólida (SPE), que permite la concentración del analito en un volumen más pequeño de disolvente.

Una vez pasado este tiempo en el que las bacterias ya han podido formar el biofilm, comienza otro ciclo de reacción, y la metodología seguida fue muy similar a la de la fase anterior, con un tiempo de reacción de 48 horas en donde se sacaron 7 muestras.

El tratamiento de todas las muestras fue siempre el mismo, para evitar posibles errores en el manejo y análisis de las mismas (Figura 6). Con una jeringa estéril de 50 mL, y evitando succionar



la biolita, se extrajeron de la columna 35 mL del caldo, que se depositaron en un tubo de ensayo de 50 mL. Con una pipeta Pasteur se traspasó parte de esta muestra a una cubeta para la medida de la densidad óptica en el espectrofotómetro. El contenido de la cubeta se volvió a depositar en el tubo de ensayo, que se transfirió a un tubo de centrifuga, para introducirlo en la misma. La muestra se centrifugó durante 5 minutos y a 7000 revoluciones por minuto, para conseguir detener la reacción y evitar que las bacterias siguieran degradando el medio. Una vez centrifugadas las muestras, se guardó el sobrenadante de éstas, en el arcón congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se recuperaron del congelador y se procedió a su extracción en fase sólida. Antes de ello se pasó un volumen de 2 mL de cada muestra a través del filtro de  $0,22\ \mu\text{m}$ , y a continuación se introdujo en un vial de topacio para la medida de la concentración de succinato en el HPLC. Del volumen restante (33 mL) se utilizaron 25 para la SPE, en donde se obtuvo un volumen eluido de 4 mL de metanol y muestra, para su posterior medida de diurón. A los 8 días de haber comenzado la reacción se tomó la última muestra para observar las concentraciones finales tanto de succinato como de diurón.



**Figura 6.** Esquema de la toma de muestras para el cultivo inmovilizado

Para poder tener más claro si el objetivo de la creación de un biofilm se estaba llevando a cabo, se tomaron dos muestras de biolita para observarlas en el microscopio electrónico de barrido. La preparación de las muestras, para su posterior visualización en el SEM, se llevó a cabo en varias fases. La primera fase de todas fue la introducción de las dos muestras en un recipiente adecuado, en las cápsulas de papel Whatman. Posteriormente, se procedió a la fijación–deshidratación de las muestras, introduciendo las cápsulas en diversos recipientes que contenían las distintas soluciones. Estas dos primeras fases se realizaron en el laboratorio, mientras que para la siguiente, el punto crítico de secado, las muestras se llevaron al Servicio de Microscopía de la Universidad de Alcalá.

Se recogieron las muestras y se colocaron en los portamuestras cilíndricos de aluminio, mediante un adhesivo de doble cara. Para finalizar, se volvieron a llevar las muestras al Servicio de Microscopía, en donde le aplicaron la última fase, el metalizado, que consistía en cubrir la muestra con una fina capa de oro de 30 nm.

#### **4.4- Determinación de las concentraciones de diurón y succinato mediante HPLC**

Para la caracterización de las muestras y, más concretamente, para la determinación cuantitativa de sus componentes, se utilizó la Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*).

Se empleó el siguiente material y equipamiento:

- HPLC *Varian Prostar 220*.
- *Autosampler Varian Prostar 410*.
- Detector de haz de diodos (*Diode Array*) *Varian Prostar 335 LC*, para la detección de diurón y metabolitos.
- Detector índice de refracción *Varian Star 9040*, para la detección de succinato.

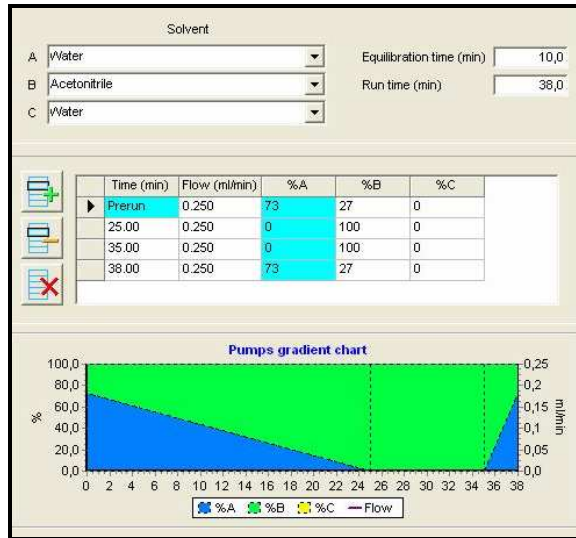
Todos controlados mediante el software *Galaxie Chromatography Data System (Varian)*.

- Columna analítica *Kromasil C18 (Phenomenex)*, cuyas medidas son 150 x 4,60 mm, 5 µm y 100 Å. Se utilizó para la medida del diurón a temperatura ambiente.
- Columna analítica *Phenomenex Col.Supelcogel C610H (Supelco)* 30 cm x 7.8 mm. Esta columna se empleó, sumergida en un baño de agua a unos 45 °C, para medir la concentración de succinato.
- Disolventes: formados por agua desionizada y el disolvente orgánico acetonitrilo para el método del diurón, y agua desionizada con 0.1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para el succinato.
- Viales de topacio para HPLC: con una capacidad máxima de almacenamiento de 2 mL.

##### **4.4.1- Método de elución y rectas de calibrado**

La medida del diurón en el HPLC se obtiene a través de un método, cuyas características son las siguientes: es capaz de medir entre unas longitudes de onda de 200 a 300 nm. El tiempo de retención es de 22,7 minutos, mientras que el flujo de bombeo es de 0,25 mL/minuto. Los volúmenes de flujo y de lavado son 50 y 750 µL. En la Figura 7 se observa como varía el flujo de la fase móvil respecto al tiempo. Al inicio y al final del método, se emplea un mayor porcentaje (73

) de agua desionizada, mientras que desde los 25 hasta los 35 minutos de medida, se emplea únicamente acetonitrilo.

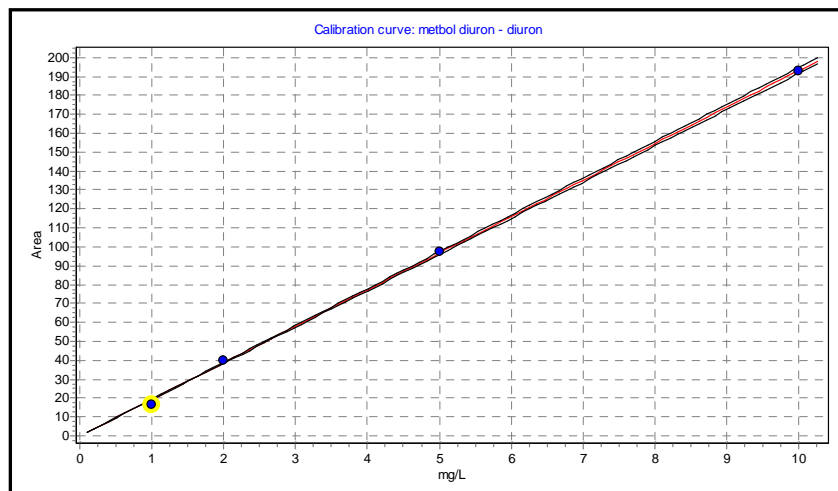


**Figura 7.** Representación gráfica del flujo de bombeo para el método del diurón

La ecuación de la recta de calibrado del diurón (Figura 8), cuya  $r^2$  es igual a 0'9995, es:

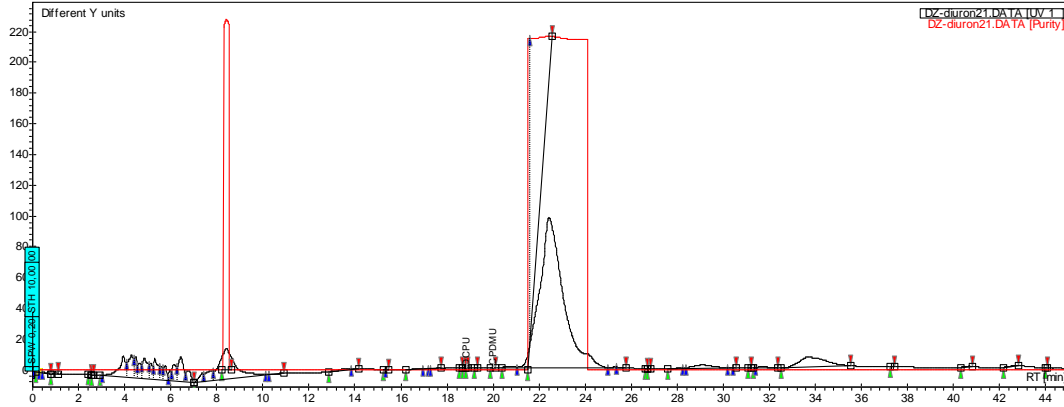
$$y = 19,32 \cdot x$$

La variable independiente (x) corresponde a la concentración en mg/L, mientras que la variable dependiente (y) es el área que se encuentra debajo del pico del cromatograma.



**Figura 8.** Recta de calibrado obtenida para el diurón

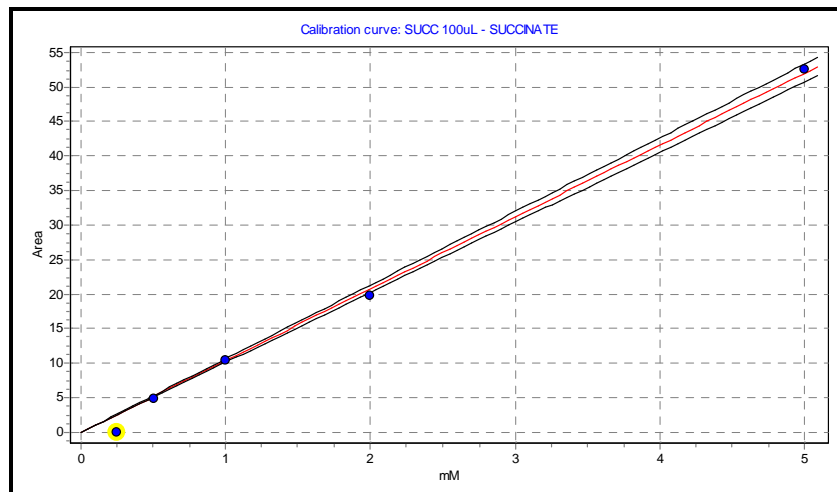
Un ejemplo de cromatograma para determinar la concentración de diurón, se muestra en la Figura 9, donde se observa que el pico de diurón aparece a los 22,7 minutos. También se observan pequeños picos, que corresponden a metabolitos del diurón.



**Figura 9.** Representación de un cromatograma de diurón y sus metabolitos

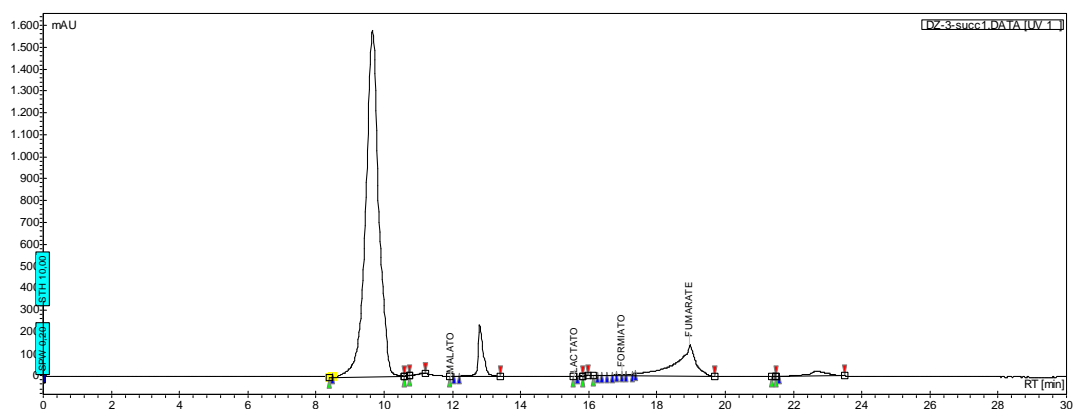
El método que se empleó para determinar la concentración de succinato en el HPLC tenía las siguientes características: el tiempo de retención es de 10 minutos, el flujo de bombeo es de 0,7 mL/minuto en condiciones isocráticas y el volumen de inyección 100  $\mu$ L. La recta de calibrado para el succinato (Figura 10) tiene un coeficiente de correlación de 0,9949 y su ecuación es:

$$y = 10,39 \cdot x$$



**Figura 10.** Recta de calibrado obtenida para el succinato

En la Figura 11, se expone un ejemplo de un cromatograma obtenido en el método del succinato. Se observan diferentes picos, de entre los que destaca el que aparece en torno a los 10 minutos, que es el correspondiente al succinato.



**Figura 11.** Representación de un cromatograma de succinato y sus metabolitos

#### **4.5- Extracción en fase sólida**

El material empleado fue el siguiente:

- Equipo de extracción: basado en una plataforma que contiene doce llaves donde se acoplan las jeringas de extracción, situada sobre un recipiente de cristal, donde va a parar el rechazo. En la parte inferior tiene una salida con un manómetro, para acoplar la bomba de vacío.
- Bomba de vacío, que va acoplada al equipo extractor para generar la succión que se necesita en esta operación.
- Jeringas de extracción Phenomenex, *strata-X 33u Polymeric Reversed Phase* <sup>30mg</sup>/<sub>3mL</sub>.
- Agua milliQ y Metanol *supragradient* de Scharlau: utilizados para limpiar, acondicionar y lavar el relleno polimérico de las jeringas, así como para realizar la extracción en sí, en la que sólo se utiliza el Metanol.

##### **4.5.1- Metodología para realizar la SPE (Solid Phase Extraction)**

El primer paso para la realización de la extracción en fase sólida fue la limpieza del equipo extractor, mediante la inyección de metanol y agua milliQ a través de las llaves, para poder colocar ahí las jeringas de extracción. A continuación se realizó la fase de acondicionamiento, en la que se pasaron, dos veces, 2 mL de metanol por cada jeringa. Una vez hecho esto, el equipo ya estuvo listo para poder introducir la muestra (etapa de carga) de 25 mL, y que había sido filtrada previamente por un filtro de 0,45 micras. Posteriormente, en el lavado, se hizo pasar tres veces por cada jeringa, un volumen de 2 mL de agua milliQ. Se desacoplaron las jeringas de las llaves y se

introdujeron en la estufa, durante 20 minutos a 30° C, para que se secasen. Por último tuvo lugar la elución, que consistió en el paso por dos veces de 2 mL de metanol por cada jeringa, y que se recogieron en unos tubos de ensayo. Por lo tanto se obtuvo un volumen eluido de 4 mL, a partir de un volumen de muestra de 25 mL.

#### **4.6- Ensayo de ecotoxicidad**

El objetivo de este ensayo de ecotoxicidad es determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento que produce una muestra que contiene diurón, en algas verdes unicelulares de la especie *Pseudokirchneriella subcapitata*. Fue llevado a cabo mediante una adaptación de la norma ISO 8692:2004 y OCDE TG 201.

El material necesario para la realización de este ensayo fue el siguiente:

- Inóculo de algas *Pseudokirchneriella subcapitata*: que se encontraba en la incubadora Aqualytic de MicroBioTest Inc. manteniéndolo con iluminación constante y a una temperatura entre los 23 y los 25 °C.
- Medio de cultivo de algas OCDE
- Espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1800: usado para la medida inicial de la Densidad Óptica del cultivo. Esta medición se realizó en una cubeta específica de forma alargada.
- Microplacas PCR Deltalab: poseen 96 pocillos donde se depositan las muestras. A estas microplacas, una vez hecha la medida de la absorbancia, se les colocó un film adhesivo en la parte superior, con el objetivo de evitar la evaporación, el derramamiento o la mezcla de las muestras.
- Lector de microplacas Rayto, modelo *RT-2100C Microplate Reader*: equipo que midió la densidad óptica de las muestras, previa agitación, a 630 nm.
- Pipetas multicanal: su cometido fue el de colocar las muestras en los diferentes pocillos y el de homogeneizar las muestras antes de la medida de la absorbancia.

##### **4.6.1- Metodología seguida en este ensayo**

Una vez preparado el inóculo de algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, se virtió en una cubeta alargada y se introdujo en el espectrofotómetro. En ella se obtuvo la densidad óptica del cultivo y, mediante una curva de regresión lineal, proporcionada por el fabricante, se determinó el número de células por mL. Como se obtuvo un gran número de células, se decidió realizar una dilución ½ con el medio de cultivo.

Con la pipeta multicanal se procedió a añadir las muestras, que fueron por duplicado, a los pocillos. En las dos primeras filas, y dado que se consiguieron siete muestras, se añadieron 200 µL de la muestra y 5 µL del cultivo de algas. En la fila 3 y 4 se realizó una dilución de las muestras  $1/10$ , adicionando 20 µL de muestra y 180 µL de medio de cultivo, más los 5 µL del cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata*. Por último, y para tener una concentración control, se rellenaron siete pocillos solamente con 200 µL del medio de cultivo y otros siete con 200 µL de medio más 5 µL del cultivo de algas.

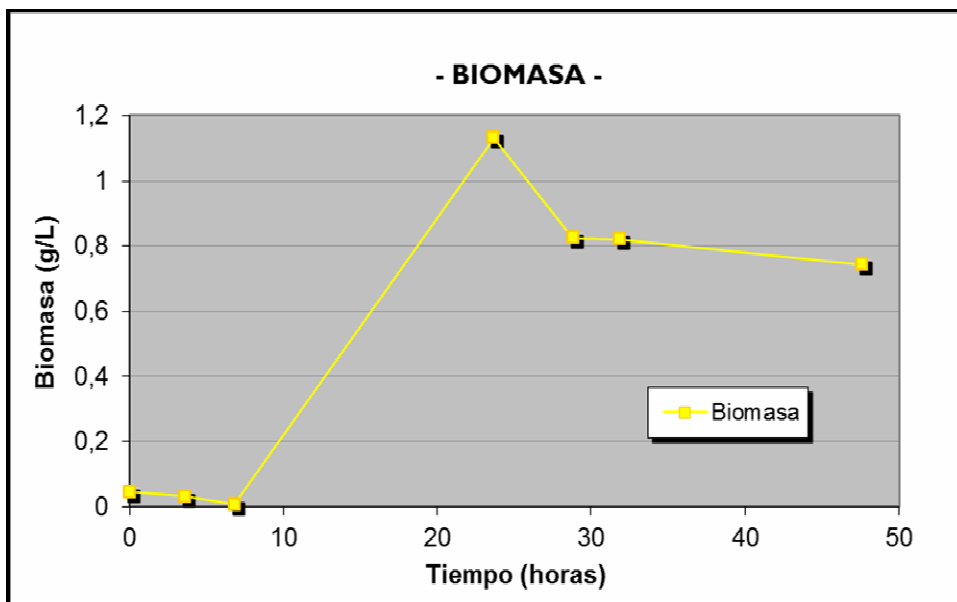
## 5. RESULTADOS

A lo largo de la experimentación y, con la intención de lograr los objetivos marcados, se han llevado a cabo numerosas medidas, que han dado lugar a los resultados que se muestran en este apartado.

### 5.1- Biodegradación de diurón en el cultivo en suspensión

Una vez comenzada la reacción, y a lo largo de 48 horas, se extrajeron 7 muestras. A través de las medidas de absorbancia a 600 nm, obtenidas en el espectrofotómetro, se determinaron las medidas de biomasa (Figura 12), gracias a la recta de calibración de la biomasa, que es:

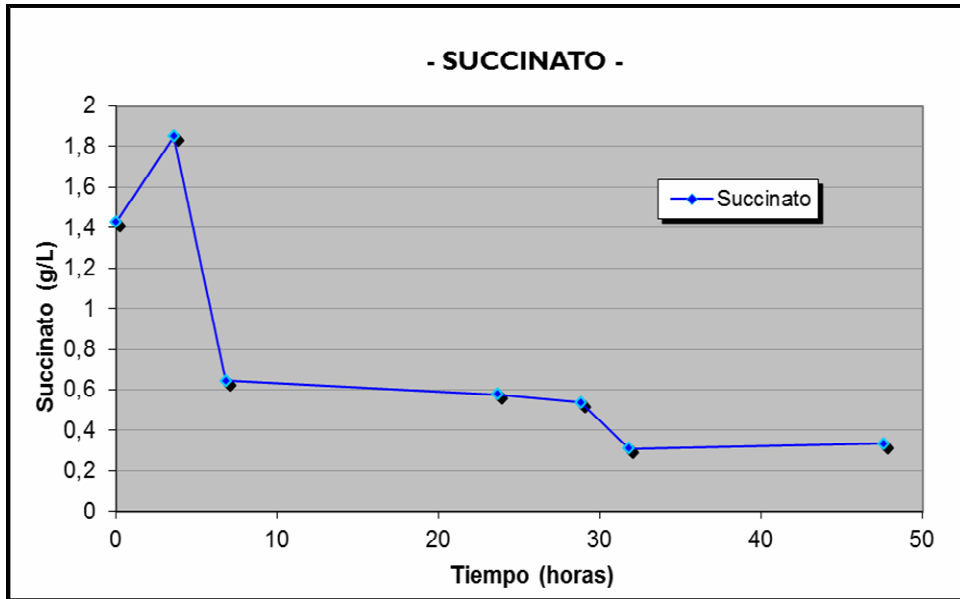
$$C_x \text{ (mg/mL)} = 3,874 \cdot \text{OD}(600)$$



**Figura 12.** Evolución de la biomasa del cultivo en suspensión en el reactor

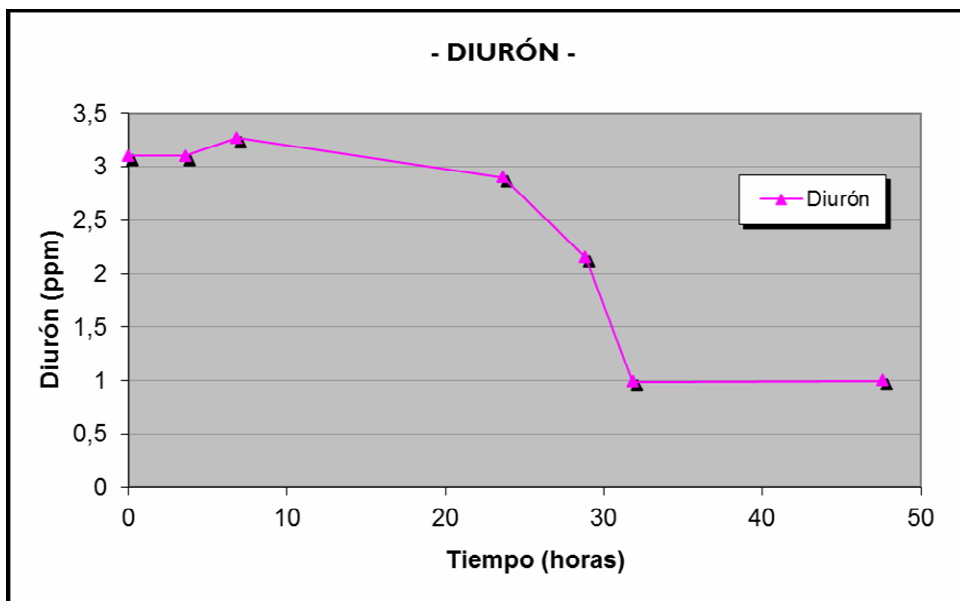
La degradación del succinato, es decir, como fue disminuyendo su concentración en el biorreactor, se determinó a través del HPLC y se muestra en la Figura 13.





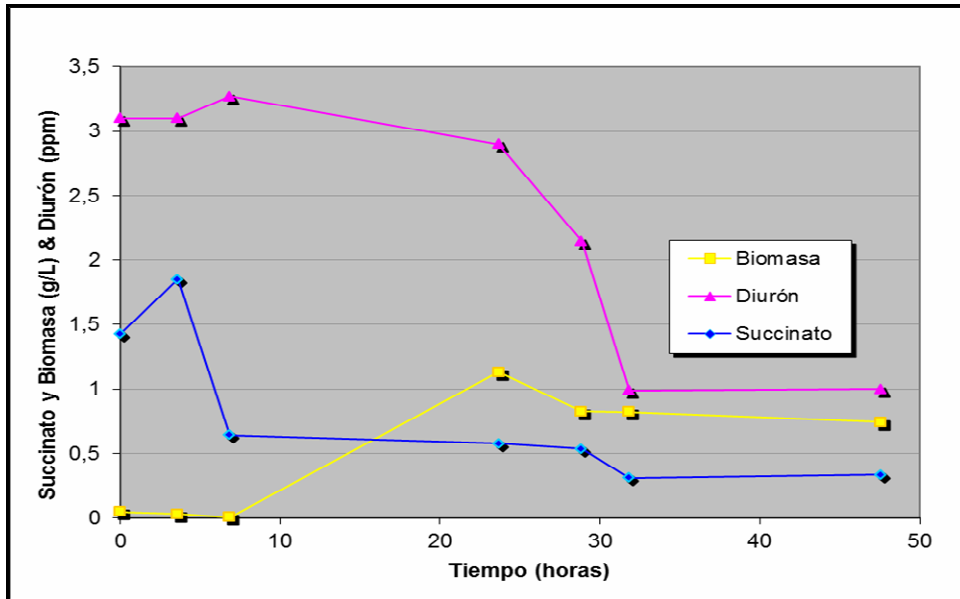
**Figura 13.** Representación de la concentración de succinato en el airlift con el cultivo en suspensión

En la Figura 14, se puede observar la evolución de la concentración y, por tanto, de la biodegradación del diurón por parte de las bacterias *Variovorax* SRS16.



**Figura 14.** Evolución de la concentración de diurón en la columna con el cultivo en suspensión

Comparando las tres gráficas se observa cómo va variando la biodegradación, respecto a estos tres parámetros (Figura 15).

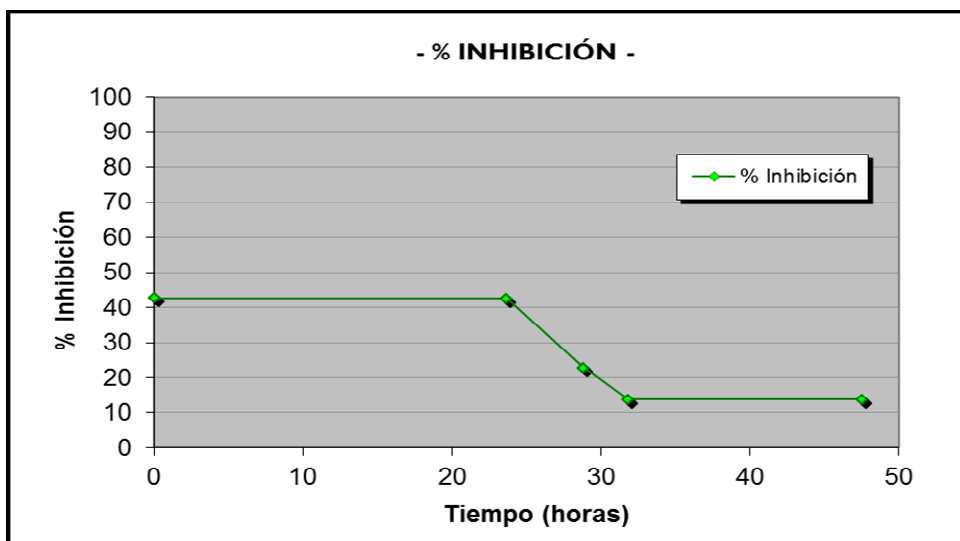


**Figura 15.** Comparación de la biomasa y de las concentraciones de diurón y succinato en el *airlift*

A partir de la Figura 15, se obtuvieron las velocidades de degradación. La velocidad de degradación del diurón en el tramo lineal de la curva, aproximadamente hacia las 25 horas, es de 0,234 mg diurón/L·h. Mientras que la velocidad específica de degradación, obtenida en el mismo tramo, es de 5,1 mg diurón/g biomasa·h.

También se logró obtener el rendimiento de formación de biomasa ( $Y_{xs}$ ) en el tramo lineal, que fue de 0,041 g biomasa/mg Succinato.

En el ensayo de ecotoxicidad se compararon las velocidades de crecimiento del alga en ausencia y en presencia de diurón. A partir de estas velocidades, se calculó un porcentaje de inhibición, que se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento de *Pseudokirchneriella subcapitata*

## **5.2- Biodegradación de diurón en el cultivo inmovilizado**

### **5.2.1- Proceso de inmovilización**

En primer lugar se comprobaron las características fluidodinámicas en el interior de la columna de los tres sólidos: arena de mar, arena de río y biolita, en donde se quería formar la biopelícula. Se observó que el soporte que mejor se comportaba era la biolita, ya que, al ser más ligera, se podía introducir una mayor cantidad en el reactor y alcanzaba una buena recirculación con un caudal de aireación más bajo. Tanto la arena de mar como la de río, al ser más densas, necesitaban grandes caudales para que recirculasen dentro del biorreactor.

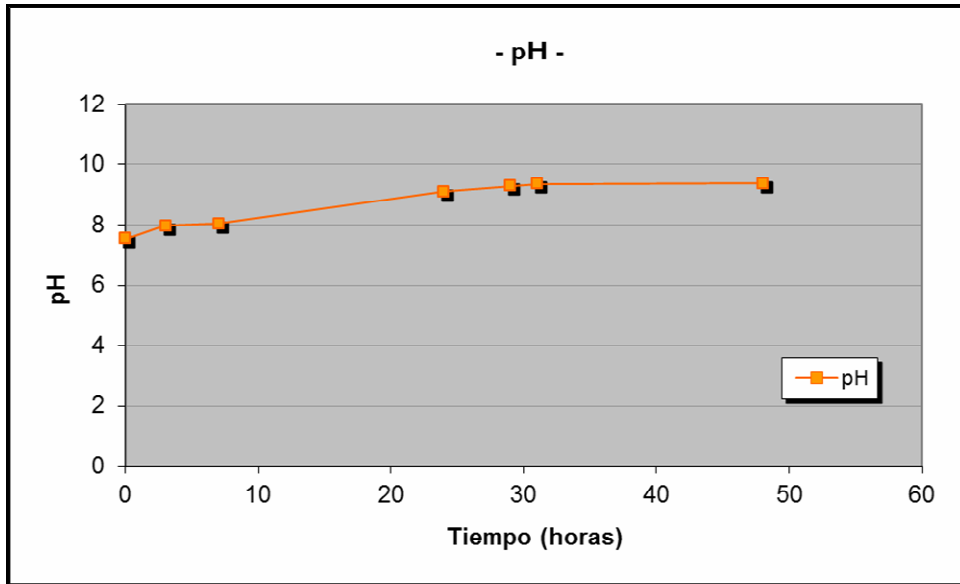
Al inicio del proceso, se adicionó a la columna de burbujeo una concentración de succinato de 1 g/L y 1 ppm de diurón. A los 15 días después de haber comenzado la reacción, se midió la concentración de succinato, que iba a ser la fuente de carbono para las bacterias *Variovorax* SRS16, y se observó que no había una disminución respecto a la concentración inicial. Debido a que no se producía la degradación de succinato, se optó por añadir otros 50 mL del inóculo inicial, para poder tener una mayor cantidad de bacterias en el reactor.

Al mes y medio de haber comenzado, se procedió a realizar la extracción en fase sólida de algunas muestras, ya que la concentración de diurón era tan pequeña que apenas se podía distinguir en el cromatograma obtenido en el HPLC. Después de la extracción se obtuvo una concentración de 0.725 ppm. Pasada una semana, se sacaron otras dos muestras y se les sometió a SPE, y el resultado que se alcanzó, volvía a ser parecido 0.56 y 0.728 ppm. A la semana siguiente la muestra arrojaba una concentración de diurón de 0.994 ppm. Este aumento de la concentración pudo ser debido a la elevada evaporación a la que estaba sometida la columna, por lo que se le añadieron 100 mL de medio MSN y se le colocó un condensador, para evitar en su mayor parte las pérdidas por evaporación. En esa semana también se midió la concentración de succinato y se observó que había desaparecido, entonces se añadió a la columna una concentración de 2 g/L de succinato.

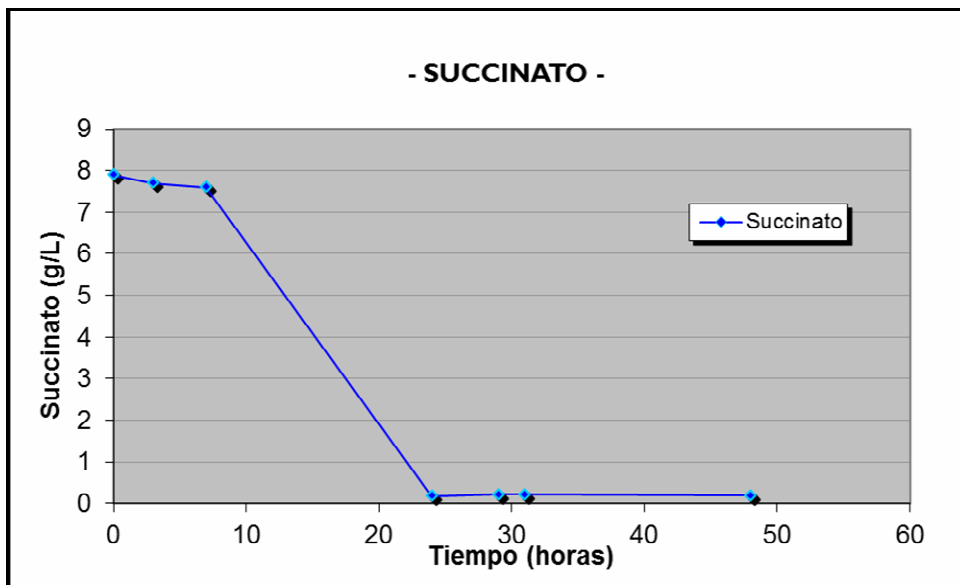
Pasados dos meses, se sacó una muestra para ver la concentración de diurón, que fue de 0.63 ppm, lo que reveló que había disminuido. Por lo que se optó por extraer el líquido sobrenadante que hubiera en la columna, dejando solamente la biolita.

### **5.2.2- Biodegradación de diurón**

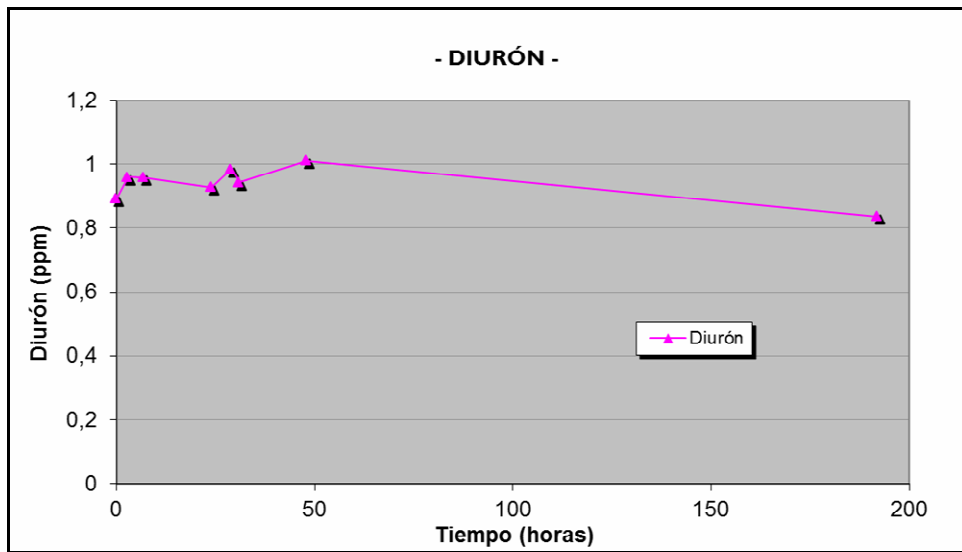
Una vez preparado el biorreactor para una nueva fase de reacción, y en un intervalo de 48 horas, se procedió a sacar 7 muestras. Esta observación proporcionó las siguientes medidas (Figuras 17, 18 y 19).



**Figura 17.** Evolución del pH en el *airlift* con el cultivo inmovilizado en biolita

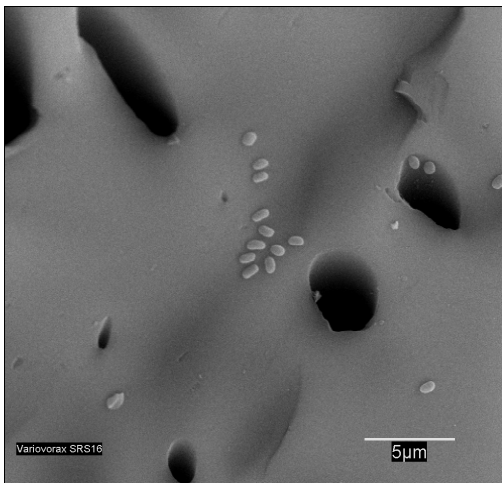


**Figura 18.** Representación de la concentración de succinato, con el cultivo inmovilizado en biolita

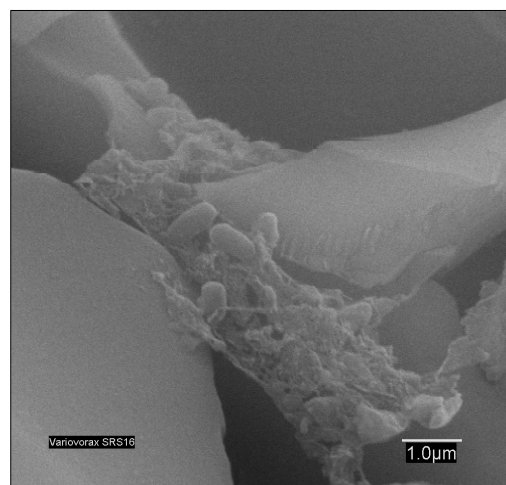


**Figura 19.** Evolución de la concentración de diurón en la columna con el cultivo inmovilizado

Al finalizar la realización de esta fase, se procedió a la extracción de una muestra de biolita para su observación en el microscopio electrónico de barrido, de la que se obtuvieron varias fotografías (Figuras 20 y 21).



**Figura 20.** *Variovorax* SRS16 sobre biolita



**Figura 21.** Biofilm de *Variovorax* SRS16 sobre biolita

## 6. DISCUSIÓN

En este apartado se realiza la interpretación de los resultados obtenidos en el trabajo y se comparan con otros estudios similares.

En la primera fase del proyecto, con el cultivo de bacterias en suspensión, los resultados de la Figura 12, nos dan idea del crecimiento bacteriano. Al inicio de la reacción nos encontramos con una fase de adaptación (latencia), que viene seguida de una fase exponencial, que va desde las 7 hasta las 24 horas, en la que se observa cómo se produce un crecimiento de forma muy rápida, y posteriormente la biomasa bacteriana se estabiliza, entrando así en la fase estacionaria, e incluso disminuye. Dicho comportamiento en la reacción sigue el claro patrón del crecimiento bacteriano.

La velocidad de degradación de diurón en el tramo lineal, obtenida en la Figura 15, puede ser comparada con otras velocidades de degradación de diurón calculadas en otras condiciones (Tabla 2). La velocidad que se ha obtenido en este proyecto, con el cultivo en suspensión en un *airlift*, no puede ser comparada con otra igual, ya que este es el primer trabajo en el que se ensaya con este tipo de operación. Las demás velocidades han sido determinadas a través de los resultados presentados en el artículo de Sørensen *et al.* 2008.

**Tabla 2.** Comparación de las velocidades de degradación de diurón

Microorganismo	Soporte	Cantidad inicial de microorganismo	Concentración inicial diurón	Velocidad de degradación de diurón
<i>A.Globiformis</i> D47	Erlenmeyer (MSN)	10 <sup>6</sup> cell/mL	----	0,291 mg/L ·h
<i>Variovorax</i> sp. SRS16	Suelo	10 <sup>8</sup> cell/mL	10 mg/L	0,005 mg/L ·h
<i>Variovorax</i> sp. SRS16	Erlenmeyer (MSN)	10 <sup>6</sup> cell/mL	10 mg/L	0,012 mg/L ·h
<i>Variovorax</i> sp. SRS16	<i>Airlift</i> (MSN)	----	3 mg/L	0,234 mg/L ·h

Como se muestra en la Tabla 2, las velocidades de degradación de diurón por parte de *A.Globiformis* D47 y *Variovorax* sp. SRS16, con el cultivo creciendo en un matraz Erlenmeyer y con medio MSN, son mayores que cuando se aplica la bacteria *Variovorax* sp. SRS16 al suelo,

aunque en este caso la cantidad inicial de microorganismo sea mayor. Sin embargo, la velocidad cuando la bacteria *Variovorax* sp. SRS16 crece en Erlenmeyer es menor que la velocidad de degradación obtenida en este proyecto, cuando el cultivo se encuentra en un *airlift*. A su vez, la velocidad de degradación de *A. Globiformis* D47 es del mismo orden de magnitud que la obtenida en este trabajo.

La Figura 12 se puede relacionar con la Figura 14, la figura que muestra la degradación del diurón, ya que la franja donde se produce una mayor degradación de este compuesto va desde las 7 horas hasta las 32 horas del inicio del ensayo. Por otra parte, en la Figura 13, se observa cómo la concentración de succinato disminuye bruscamente en las primeras horas, lo que favorece el crecimiento de *Variovorax* SRS16. En la Figura 15 se puede realizar una comparación entre los tres gráficos anteriores, y se observa que es al final del primer día de reacción cuando la cantidad de biomasa aumenta en gran medida, y, por tanto, en las horas siguientes las concentraciones de succinato y de diurón disminuyeron considerablemente.

Respecto al gráfico que corresponde al porcentaje de inhibición de la velocidad de crecimiento de las algas (Figura 16), se observa un descenso de dicho porcentaje en el tiempo. Este descenso se relaciona con la concentración de diurón presente en el biorreactor, ya que es hacia las 24 horas cuando se inicia el descenso, por lo tanto coincide también con el máximo descenso de la concentración de diurón.

Cuando se confirmó que efectivamente se producía degradación de diurón en el cultivo en suspensión, se eligió biolita como soporte sólido para la biopelícula de *Variovorax* sp. SRS16. Dicho material presenta también el mejor comportamiento fluidodinámico. Una vez introducido el inóculo de bacterias y el medio de cultivo, se empezaron a sacar las muestras y se hizo un seguimiento tanto del succinato como del diurón. En el primer mes, apenas se pudo apreciar una disminución de la concentración de diurón, mientras que sí se observó una degradación del succinato. Pasados dos meses, la concentración de diurón disminuyó casi hasta la mitad, lo que nos indicó que la biopelícula se estaba empezando a formar.

En la siguiente fase de la reacción, en la que se renovó todo el caldo de cultivo y se dejaron únicamente a las bacterias que formaban parte de la biopelícula creada sobre la biolita, se sacaron muestras durante 48 horas. Como se puede apreciar en la Figura 17, el pH medido al inicio de la reacción era de 7,54, y al final de la misma alcanzó el valor de 9,38. Por lo que en el interior del reactor se produjo una basificación del medio, posiblemente debida a los metabolitos. Respecto al succinato (Figura 18), podemos distinguir un descenso bastante considerable en torno a las 24 horas del inicio de la reacción, lo que nos informa sobre la importante degradación de este

compuesto por parte de la biopelícula de *Variovorax* SRS16. Sin embargo, para el diurón (Figura 19) no se produce este descenso, sino todo lo contrario, la concentración se mantiene en torno a los niveles iniciales. Este hecho induce a pensar que la biopelícula no se ha desarrollado correctamente y no consigue degradar el herbicida.

Para tener una seguridad total, se procedió a extraer una muestra de biolita para su observación en el microscopio electrónico de barrido (Figuras 20 y 21). En la Figura 21, realizada a un mayor número de aumentos, se puede distinguir un pequeño grupo de bacterias que parece ser que están iniciando la formación del biofilm. Pero, en general, en las demás fotografías obtenidas (un ejemplo es la Figura 20), se pueden observar algunas bacterias sobre la superficie de la biolita, pero no se hallan agrupadas formando un biofilm, sino que se encuentran libres. La dificultad de formar el biofilm posiblemente sea debida a las elevadas fuerzas de rozamiento que se dan en el interior del reactor, como consecuencia de la turbulencia creada por la recirculación. Los efectos de cizalla impedirían por lo tanto el crecimiento de la biopelícula.



## 7. CONCLUSIONES

Una vez finalizado el proyecto, y teniendo siempre en cuenta los objetivos fijados, se llegó a las siguientes conclusiones:

Es posible la biodegradación de diurón por parte de un cultivo en suspensión de *Variovorax sp.* SRS16, en un reactor de columna de burbujeo con recirculación interna (*airlift*), lográndose así uno de los objetivos planteados al inicio del proyecto. Por tanto, se puede considerar esta biomagnificación, como un proceso de remediación de la contaminación de diurón en las aguas. Esta reacción alcanza unas velocidades de degradación bastante mayores que las que se han obtenido en otro tipo de ensayos, por lo que podría ser interesante seguir trabajando con este tipo de reactores para conseguir una más rápida degradación de diurón.

Respecto a la inmovilización de *Variovorax sp.* SRS16 sobre un soporte sólido, como es la biolita, se observó que no se llegó a alcanzar el segundo objetivo planteado, la formación de la biopelícula. Este hecho pudo ser debido al gran rozamiento entre las partículas de la biolita dentro del reactor. No obstante, se podría seguir el estudio buscando otras configuraciones de reactor que produzcan un menor rozamiento entre las partículas en suspensión.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahangar, A.G.; Smernik, R.J.; Kookana, R.S.; Chittleborough, D.J. 2009. *The effect of solvent-conditioning on soil organic matter sorption affinity for diuron and phenanthrene*. Chemosphere, 76: 1062 – 1066.
- Attaway, H.H.; Camper, N.D.; Paynter M.J.B. 1981. *Anaerobic Microbial Degradation of Diuron by Pond sediment*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 17: 96 – 101.
- Badawi, N.; Rønhede, S.; Olsson, S.; Kragelund, B.; Johnsen, A.; Jacobsen, O.; Aamand, J. 2009. *Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus Mortierella sp.* Environmental Pollution, 154: 2806 – 2812.
- Farré, M.J.; Doménech, X.; Peral, J. 2006. *Assessment of photo-Fenton and biological treatment coupling for Diuron and Linuron removal from water*. Water Research, 40: 2533 – 2540.
- Field, J.; Reed, R.; Sawyer, T.; Griffith, S.; Wigington, P.J. 2003. *Diuron Occurrence and Distribution in Soil and Surface and Ground Water Associated with Grass Seed Production*. Journal of Environmental Quality, 32: 171 – 179.
- Giacomazzi, S.; Cochet, N. 2004. *Environmental impact of diuron transformation: a review*. Chemosphere, 56: 1021 – 1032.
- Nicolella, C.; van Loosdrecht, M.C.M.; Heijnen, J.J. 2000. *Wastewater treatment with particulate biofilm reactors*. Journal of Biotechnology, 80: 1 – 33.
- Oturan, N.; Trajkovska, S.; Oturan, M.; Couderchet, M.; Aaron, J.J. 2008. *Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process “electro-Fenton”*. Chemosphere, 73: 1550 – 1556.
- Owsianiak, M.; Dechensne, A.; Binning, P.J.; Chambon, J.C.; Sørensen, S.R.; Smets, B.F. 2010. *Evaluation of Bioaugmentation with Entrapped Degrading Cells as a Soil Remediation Technology*. Environmental Science & Technology, 44: 7622 – 7627.
- Sharma, P.; Chopra, A.; Cameotra, S.S.; Suri, C.R. 2010. *Efficient biotransformation of herbicide diuron by bacterial strain Micrococcus sp. PS-1*. Biodegradation, 21: 979 – 987.
- Sharma, P.; Suri, C.R. 2010. *Biotransformation and biomonitoring of phenylurea herbicide diuron*. Bioresource Technology, 102: 3119 – 3125.

- Sørensen, S.R.; Rasmussen, J.; Jacobsen, C.S.; Jacobsen, O.S.; Juhler, R.K.; Aamand, J. 2005. *Elucidating the Key Member of a Linuron-Mineralizing Bacterial Community by PCR and Reverse Transcription-PCR Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 16S rRNA Gene Fingerprinting and Cultivation*. Applied and Environmental Microbiology, 7: 4144 – 4148.
- Sørensen, S.R.; Albers, C.N; Aamand, J. 2008. *Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by Variovorax sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium*. Applied and Environmental Microbiology, 8: 2332 – 2340.
- Sørensen, S.R.; Simonsen, A.; Aamand, J. 2009. *Constitutive mineralization of low concentrations of the herbicide linuron by Variovorax sp. strain*. FEMS Microbiology Letters, 292: 291 – 296.
- Stasinakis, A.S.; Kotsifa, S.; Gatidou, G.; Mamais, D. 2009. *Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions*. Water Research, 43: 1471–1479.
- Wang, P.; Keller, A.A. 2009. *Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersible soil primary size fractions*. Water Research, 43: 1448 – 1456.
- Web del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino ([www.marm.es](http://www.marm.es)).

## 9. ANEXOS

### - ANEXO 1: Medio de cultivo R2B

<b>Solución R2B</b>	<b>L<sup>-1</sup></b>
Extracto de levadura	0,5 g
Proteosa peptona	0,5 g
Ácidos casaminosos	0,5 g
Dextrosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
Piruvato de sodio	0,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 g
Añadir agua Milli-Q	1000 mL

## - ANEXO 2: Medio de cultivo MSN

<b>Solución Tampón</b>	<b>g/L</b>
68.0 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.36
89.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.78
500 mL agua MilliQ	
<b>Solución de Nutrientes + N</b>	<b>g/L</b>
2.5 g $\text{KNO}_3$	0.05
11.9 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.238
2.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
0.66 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0132
500 mL agua MilliQ	
<b>Solución de elementos traza</b>	<b>mg/L</b>
1.43 g $\text{H}_3\text{BO}_3$	2.86
0.77 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.54
0.0195 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.039
0.0105 g $\text{ZnCl}_2$	0.021
0.0205 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.041
0.0125 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
500 mL agua MilliQ	
<b>Solución de <math>\text{FeCl}_3</math></b>	<b>mg/L</b>
0.514 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.14
100 mL agua MilliQ	

### **Preparación de MSN**

10 mL de la solución tampón

10 mL de la solución de nutrientes + N

1 mL de la solución de elementos traza

Enrasar con Agua MilliQ hasta 1000 mL.

Ajustar el pH a 7.1 – 7.2 con 1.0 M NaOH.

Después de autoclavar y dejar enfriar el medio, añadir 1 mL de la solución de  $\text{FeCl}_3$ .