



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA**

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**BIODEGRADACIÓ D'HIDROCARBURS  
ALIFÀTICS CLORATS PER FONGS  
LIGNINOLÍTICS**

Memòria de Tesi Doctoral

Ernest Marco Urrea

Bellaterra, 2007

**Títol:** Biodegradació d'hidrocarburs alifàtics clorats per fongs ligninolítics

**Realitzat per:** Ernest Marco Urrea

**Dirigit per:** Glòria Caminal Saperas i Xavier Gabarrell Durany

Programa de Doctorat de Ciències Ambientals.

Departament d'Enginyeria Química.

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria.

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. 2007.

Aquest treball ha estat finançat pel Ministeri de Ciència i Tecnologia (Comissió Espanyola de Ciència i Tecnologia) dins del projecte PPQ2000-0645-C02-01 i per una beca de la Generalitat de Catalunya (2002FI00227).

Una part del treball d'aquesta memòria es va realitzar en els laboratoris del departament de Microbiologia i Genètica Molecular de la Michigan State University a càrrec del Dr. C. Adinarayana Reddy, a qui agraïm la seva col·laboració en aquesta recerca.

GLÒRIA CAMINAL SAPERAS, Científica Titular del CSIC a la Unitat de Biocatàlisis Aplicada associada al IIQAB i XAVIER GABARRELL DURANY, Professor Titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat en Ciències Ambientals Ernest Marco Urrea ha realitzat sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química el treball que amb el títol "**Biodegradació d'hidrocarburs alifàtics clorats per fongs ligninolítics**", es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

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

Bellaterra, desembre de 2006

Dra. Glòria Caminal Saperas

Dr. Xavier Gabarrell Durany

Reunit el Tribunal que ha de jutjar aquesta Tesi Doctoral "Biodegradació d'hidrocarburs alifàtics clorats per fongs ligninolítics", presentada pel Llicenciat en Ciències Ambientals Ernest Marco Urrea, i en compliment d'allò establert en el Reial Decret 778/1998 (BOE 01.05.98), ha acordat concedir per la qualificació de

Cerdanyola del Vallès, a de de 2007

PRESIDENT

SECRETARI

1<sup>er</sup> VOCAL

2<sup>on</sup> VOCAL

3<sup>er</sup> VOCAL

Vull dedicar aquesta Tesi al meu pare, la meva mare i germana.

I a la meva altra petita família, que es troba en els entorns de  
l'Ateneu Candela, per demostrar-me i demostrar-nos  
cada dia que és possible fer realitat els nostres  
sognis si els compartim i  
els posem a caminar  
preguntant.

# Summary

Trichloroethylene (TCE) and perchloroethylene (PCE) are chlorinated aliphatic hydrocarbons which have been widely used in industrial cleaning solutions. TCE and PCE are ranked sixteenth and thirty first, respectively, on the EPA 2005 Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA; commonly known as Superfund) priority list for hazardous substances. Since TCE and PCE are among the most common organic pollutants found in groundwater, there have been many investigations in the past to study microbial degradation and bioremediation of environments contaminated by TCE and PCE. Most of the studies to date have focused on reductive dechlorination of TCE and PCE to less chlorinated ethenes by anaerobic bacteria. However, in many of the studies, these compounds were shown to undergo incomplete dehalogenation to toxic products (such as *cis*-1,2-dichloroethylene) and carcinogenic intermediate (such as vinyl chloride), which poses an important limitation to the use of these bacteria for bioremediation purposes.

In Chapter 1, a revision of the principal uses, the point source releases and mobility of TCE and PCE in the environment was carried out. A description of the fundamental technologies to remediate chlorinated solvents was also considered, and the ligninolytic enzymes of white-rot fungi implicated in the transformation and mineralization of organopollutants was shown. Finally, the legal framework to regulate the TCE and PCE contaminated environments was described.

In Chapter 2, the materials and methods used in this thesis were described in detail.

In Chapter 3, the objectives of the thesis were described. The overall objective of this work was the establishment of the knowledge base for the treatment of TCE and PCE contaminated waters by white-rot fungi using a bioreactor, and the establishment of an accurate experimental and analytical methodology. Some specific objectives were proposed for this aim:

- i)* Demonstration of the ability of a wide range of white-rot fungi to degrade TCE and choice of the most efficient strain for further experiments.
- ii)* Study of the main factors which may have influence in TCE degradation.
- iii)* Identification of TCE degradation end-products.
- iv)* Study of the enzymatic mechanism involved in TCE degradation
- v)* Suggestion of a TCE degradation pathway.
- vi)* Approximation of the main key factors involved in the design of a bioreactor for the treatment of TCE-contaminated waters.

Since PCE was thought to be non-biodegradable in the presence of oxygen, except for a *Pseudomonas* strain, the main objective for this compound was to test its degradability by the white-rot fungus selected previously. Subsequently, the same specific objectives detailed for TCE will be broached for PCE.

In Chapter 4, a brief approach of the main methodological problems involved in TCE and PCE experiments was described, and a proposal of methodology was started up.

In Chapter 5, the ability of several species of white-rot fungi, including *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* and *Irpex lacteus*, to degrade substantial levels of TCE in pure cultures was demonstrated. *P. chrysosporium*, included as a positive control in this study, was previously shown to mineralize TCE. Our results, in conformation with earlier studies, showed that *P. chrysosporium* exhibits lower TCE degradation in low nitrogen medium than in malt extract medium, in which lignin peroxidases (LiP) and manganese peroxidases (MnP) are known to be completely suppressed. As far as we know, it was the first demonstration of the ability of *G. lucidum* to degrade a xenobiotic pollutant. Since the extent of TCE degradation by *T. versicolor* was substantially greater than that shown by the other fungi, it became the obvious choice for further study.

For a range of concentrations of TCE between 2-20 mg/l, a 52.9% of the maximum chloride concentration expected, if all the degraded TCE was fully mineralized, was obtained for *T. versicolor*. A high percent of degradation (aprox. 80%) was observed in cultures incubated under static conditions and inoculated with blended mycelial inoculum for a range of concentrations between 2-10 mg/l. However, *T. versicolor* pellets and continuous shaking showed a higher degradation rate, which is more relevant for remediation strategies using a bioreactor. A highest chloride release from TCE degradation occurred by increasing the glucose concentration in the media and reoxygenating cultures during incubation.

Carbon dioxide and 2,2,2-trichloroethanol were identified as the byproducts generated during the degradation of TCE by *T. versicolor* using [<sup>13</sup>C]-TCE as the substrate. The chloride balance indicated that one half of the TCE degraded is mineralized and the remaining TCE tends to accumulate as 2,2,2-trichloroethanol. Unlike TCE, 2,2,2-trichloroethanol is not considered carcinogenic and this is a distinct advantage in comparison to bacterial systems.

Our results showed that TCE was an inducer of laccase production in *T. versicolor*, but *in vitro* experiments showed that neither laccase nor any of the wide array of mediators tested were able to cause oxidation of TCE. Cytochrome P450 appeared to play a key role in TCE degradation, as evidenced by means of cytochrome P450 inhibition experiments using 1-aminobenzotriazole, a known cyt. P450 inhibitor. Chloral (trichloroacetaldehyde) was identified as an important intermediate of the TCE degradation pathway. The suggested TCE degradation pathway in *T. versicolor* appears to be similar to that previously reported in mammals and is mechanistically different from bacterial TCE degradation.

In Chapter 6, the ability of a fungus to degrade PCE under aerobic conditions was demonstrated for the first time. Approximately, a 40% of degradation was achieved in cultures of *T. versicolor* spiked with 5 mg/l of PCE. Trichloroacetic acid (TCA) was identified as the main intermediate using [<sup>13</sup>C]-PCE as the substrate. Chloride released and TCA produced were stoichiometric with PCE degradation. Our studies using the inhibitor 1-aminobenzotriazole, suggested that a cytochrome P-450 system may be involved in PCE degradation by *T. versicolor*. Cultures that were re-oxygenated showed slightly higher levels of degradation, chloride release and TCA generation, but not as much as

one would have expected. Finally, a degradation pathway was suggested, which was analogous to that described in mammalian systems.

In Chapter 7 an approach of some of the factors which may influence the treatment of real TCE and PCE contaminated waters by *T. versicolor* using a bioreactor was studied. *T. versicolor* was not able to degrade cis-1,2-dichloroethylene, which may be found in environments contaminated by TCE or PCE, but its presence at a concentration of 5 mg/l did not show inhibition of the growth rate. The fungus degraded 34.1 and 47.7 percent of PCE and TCE added as a mixtures (containing 5 and 10 mg/l, respectively). Percent degradation as well as chloride release from mixtures of TCE and PCE showed that *T. versicolor* degrades these mixtures as well as individually added TCE or PCE. A Michaelis-Menten kinetic equation related to TCE and PCE degradation was obtained with TCE degradation experiments for a wide range of concentrations. Finally, it was considered that Freundlich isotherm described the adsorption equilibrium between biomass and the chlorinated solvents, using heat-killed controls. This isotherm was validated in degradation conditions, obtaining a correct adjustment between the experimental and the simulated data.



# Índex

<b>CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. La contaminació del medi per percloroetilè i tricloroetilè.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Mobilitat en el medi.....	6
1.1.2. Degradació abiòtica.....	8
<b>1.2. Tractaments per a la degradació de TCE i PCE.....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Tractaments físics.....	10
1.2.2. Tractaments químics.....	13
1.2.3. Tractaments biològics.....	14
<b>1.3. Els fongs ligninolítics aplicats a la bioremediació.....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Aplicació dels fongs de podridura blanca en la bioremediació.....	17
1.3.2. El sistema ligninolític dels fongs de podridura blanca.....	18
<b>1.4. Normativa aplicada a la contaminació del medi per PCE i TCE.....</b>	<b>22</b>
1.4.1. Contaminació aquàtica.....	22
1.4.2. Contaminació del sòl.....	23
1.4.3. Contaminació atmosfèrica.....	23
<b>CAPÍTOL 2. OBJECTIUS GENERALS.....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTOL 3. MATERIALS I MÈTODES GENERALS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Microorganismes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Productes químics.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Compostos clorats i subproductes de degradació.....	28
3.2.2. Estudis d'inhibició del citocrom P450 i del sistema lacasa-mediadors.....	28
<b>3.3. Medis i condicions de cultiu.....</b>	<b>29</b>
3.3.1. Medis de creixement.....	29
3.3.2. Producció de l'inòcul.....	30
<b>3.4. Metodologia experimental.....</b>	<b>31</b>
3.4.1. Preparació de la mostra.....	32
3.4.1.1. Experiments <i>in vivo</i> .....	32
3.4.1.2. Experiments <i>in vitro</i> .....	32
3.4.2. Addició del compost clorat.....	33
3.4.3. Extracció de la mostra.....	33
3.4.4. Càlcul de la degradació del producte clorat.....	34
<b>3.5. Mètodes analítics.....</b>	<b>35</b>
3.5.1. Determinació de la concentració de glucosa.....	35
3.5.2. Determinació de la concentració de producte clorat.....	35

3.5.2.1. Procediment analític.....	35
3.5.2.2. Realització del calibratge.....	36
3.5.3. Anàlisi per ressonància magnètica nuclear.....	37
3.5.4. Anàlisi per cromatografia de gasos i espectrometria de masses de relació isotòpica.....	37
3.5.5. Determinació de l'activitat enzimàtica lacasa.....	37
3.5.6. Determinació de la concentració de clorurs en el medi.....	38
3.5.7. Determinació de la biomassa.....	38
3.5.8. Determinació del pH.....	38
<b>CAPÍTOL 4. POSADA A PUNT DE LA METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Introducció.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. Característiques del bioreactor.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3. Metodologia.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTOL 5. DEGRADACIÓ DE TCE PER FONGS LIGNINOLÍTIKS.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Introducció.....</b>	<b>46</b>
5.1.1. Descripció dels fongs ligninolítics <i>T. versicolor</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>P. chrysosporium</i> i <i>I. lacteus</i> .....	46
5.1.2. Biodegradació de TCE.....	48
5.1.2.1. Decloració reductiva anaeròbia per bacteris.....	48
5.1.2.2. Co-metabolisme aerobi per bacteris.....	50
5.1.2.3. Degradació aeròbia per fongs de podridura blanca.....	55
5.1.2.4. Metabolisme de TCE en mamífers.....	56
<b>5.2. Materials i mètodes.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3. Resultats i discussió.....</b>	<b>60</b>
5.3.1. Capacitat de degradació de TCE per diferents fongs ligninolítics i selecció de la soca més eficient.....	60
5.3.2. Estudi dels factors que influeixen en la degradació de TCE per <i>T. versicolor</i> .....	63
5.3.2.1. Efecte de la concentració inicial de TCE en la seva degradabilitat i en <i>T. versicolor</i> .....	63
5.3.2.2. Estudi amb <i>T. versicolor</i> en forma de pèl·let.....	67
5.3.2.3. Estudi amb <i>T. versicolor</i> pre-crescut en forma de micel·li dispers.....	73
5.3.3. Identificació dels subproductes de degradació de TCE per <i>T. versicolor</i> .....	77
5.3.3.1. Mineralització de TCE.....	78
5.3.3.2. Subproductes a la fase líquida mitjançant RMN.....	80
5.3.4. Estudi de la via de degradació de TCE per <i>T. versicolor</i> .....	83
5.3.4.1. Estudis <i>in vitro</i> amb lacasa comercial i mediadors.....	84

5.3.4.2. Estudis <i>in vivo</i> amb inhibidor del citocrom P450.....	85
5.3.4.3. Estudis de degradació <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> dels possibles intermediaris.....	87
5.3.5. Via proposada de degradació de TCE per <i>T. versicolor</i> .....	91
5.3.6. Conclusions.....	93
<b>CAPÍTOL 6. DEGRADACIÓ DE PCE PER <i>TRAMETES VERSICOLOR</i></b> .....	95
<b>6.1. Introducció</b> .....	96
6.1.1. Declaració reductiva anaeròbia de PCE i TCE per bacteris.....	97
6.1.1.1. Bacteris haloinspiradors.....	97
6.1.1.2. Co-metabolisme anaerobi per bacteris.....	101
6.1.2. Degradació aeròbia de PCE per <i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1.....	102
6.1.3. Metabolisme de PCE en mamífers.....	103
<b>6.2. Materials i mètodes</b> .....	104
6.2.1. Anàlisi per cromatografia de gasos i espectrometria de masses.....	105
<b>6.3. Resultats i discussió</b> .....	105
6.3.1. Evidència de la degradació de PCE per <i>T. versicolor</i> .....	105
6.3.1.1. Efecte de l'addició d'oxigen en la degradació de PCE.....	107
6.3.2. Identificació dels subproductes de degradació de PCE.....	108
6.3.2.1. Subproductes a la fase líquida mitjançant CG-EM.....	109
6.3.2.2. Subproductes a la fase líquida mitjançant RMN.....	111
6.3.2.3. Mineralització de PCE.....	113
6.3.3. Estudi de la via de degradació de PCE.....	114
6.3.3.1. Estudis <i>in vitro</i> amb lacasa comercial i mediadors.....	115
6.3.3.2. Estudis <i>in vivo</i> amb inhibidor del citocrom P450.....	115
6.3.3.3. Estudis de degradació <i>in vivo</i> dels possibles intermediaris.....	116
6.3.4. Via proposada de degradació de PCE per <i>T. versicolor</i> .....	118
6.3.5. Conclusions.....	119
<b>CAPÍTOL 7. ESTUDI DE VARIABLES QUE PODEN INFLUIR EN EL TRACTAMENT D'EFLUENTS REALS CONTAMINATS PER TCE I/O PCE</b> .....	121
<b>7.1. Introducció</b> .....	122
7.1.1. Biodegradació de cis-DCE.....	122
7.1.2. Barreges de PCE/TCE i efecte de les concentracions.....	124
7.1.3. Aproximació a l'aplicació en bioreactor.....	125
<b>7.2. Materials i mètodes</b> .....	125
<b>7.3. Resultats i discussió</b> .....	126
7.3.1. Degradació de cis-DCE per <i>T. versicolor</i> .....	126
7.3.2. Degradació de barreges de TCE i PCE per <i>T. versicolor</i> .....	127

7.3.3. Degradació de diferents concentracions de TCE i PCE amb pèl·lets de <i>T. versicolor</i> .....	131
7.3.3.1. Degradació de TCE.....	131
7.3.3.2. Degradació de PCE.....	134
7.3.4. Determinació de la isoterma d'adsorció de TCE i PCE amb pèl·lets de <i>T. versicolor</i> .....	136
7.3.5. Determinació de la cinètica de desaparició de TCE amb pèl·lets de <i>T. versicolor</i> .....	138
<b>7.4. Conclusions.....</b>	<b>142</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>145</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>149</b>
<b>Fitxes internacionals de seguretat química.....</b>	<b>173</b>

# Capítol 1

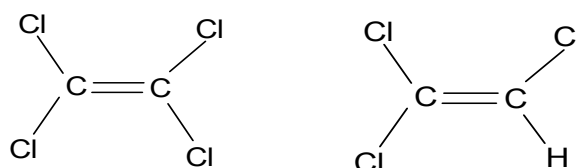
## Introducció General

### Resum

En aquest capítol es revisa el marc teòric general en el que es sustenta aquesta Tesi. En primer lloc s'indiquen quins son els principals usos, les vies d'emissió i la mobilitat en el medi del tricloroetilè (TCE) i el percloroetilè (PCE). També es descriu quins són els principals tractaments usats per l'eliminació d'aquests hidrocarburs alifàtics clorats, ja siguin físics, químics o biològics. Posteriorment s'introdueix l'aplicació dels fongs ligninolítics en la bioremediació de contaminants i els principals mecanismes enzimàtics implicats en aquests processos degradatius. Per últim, es fa referència al marc normatiu en el que es regula la contaminació en el sòl, aigües i aire per TCE i PCE.

## 1.1. La contaminació del medi per percloroetilè i tricloroetilè

Els dissolvents poden classificar-se segons la seva estructura química bàsica en alifàtics, alicíclics o aromàtics, i segons el seu grup funcional en halogenats, alcohols, cetones, glicols, esters, èters, àcids carboxílics, amines o amides. En aquest treball ens hem centrat en la biodegradació per fongs ligninolítics de percloroetilè (PCE) i tricloroetilè (TCE), que són dos hidrocarburs alifàtics clorats formats per dos carbonis units per un doble enllaç, sent el PCE la forma més oxidada de les dues.



**Figura 1.1.** Estructura química del PCE (esquerra) i TCE (dreta)

Aquests compostos es troben entre els contaminants industrials més habituals als sòls i a les aigües freàtiques d'arreu del món. Bianualment, l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (EPA) publica un llistat en el que classifica les substàncies perilloses més habituals als indrets contaminats d'aquest país segons la seva freqüència, toxicitat i el seu potencial d'exposició humana (CERCLA Priority List). L'any 2005 el TCE es trobava en el número 16 i el PCE en el 31, sobre un total de 275 substàncies (web ATSDR). Com a exemple de l'extensió de la contaminació d'aquests productes, dels 1233 indrets contaminats per residus perillosos identificats per l'EPA l'any 2002 a la seva Final National Priority List, el 42% mostraven contaminació per PCE i el 47% per TCE (Gossett, 2002). També, Squillace *et al.* (1999) va analitzar una mostra representativa de 406 aigües freàtiques urbanes dels Estats Units recol·lectades entre els anys 1985 i 1995 i que exclouïen zones on es coneixia que podia haver contaminació. Dels seus resultats es despenia que el 17% d'aquestes àrees estaven contaminades per PCE.

A Espanya s'han identificat punts negres de contaminació de PCE i TCE en aqüífers de la conca de l'Ebre, concretament a Arnedo (La Rioja) i Malpica (Saragossa) (web Greenpeace). A Catalunya s'han detectat diversos episodis de contaminació per aquests productes. Per exemple, en el municipi d'El Prat de Llobregat es van haver de prendre mesures per disminuir la concentració de TCE en l'aigua d'abastiment de la població que provenia pràcticament en la seva totalitat d'aigua subterrània. S'han detectat altres casos de contaminació per PCE i TCE en pous dels municipis de Valls-Montbrió (Tarragona), en el curs mig del Ter al nord de Girona o en l'aqüífer de la Vall Baixa del Llobregat que s'estén des del Papiol fins a Cornellà de Llobregat i Sant Boi de Llobregat (Luque, 1998).

Les principals aplicacions industrials del PCE són la neteja en sec de la roba i la síntesis d'altres productes químics, seguits de la neteja de peces metàl·liques. Altres usos menors inclourien la

seva aplicació com a biocida per al tractament de teixits contra insectes en els museus, com a additiu en medis de transferència de calor, com a dissolvent en pintures o en la composició d'alguns eliminataques. La producció de PCE a Europa ha experimentat una tendència a la disminució en el període comprès entre 1986-2004<sup>1</sup>, associat a un augment en l'eficiència de les rentadores en sec i a la utilització de sistemes amb circuits tancats; a un increment en el seu reciclatge i a la pressió exercida per la legislació ambiental. Alhora, s'ha observat una disminució en el rentat en sec a tota Europa, exceptuant Espanya, degut a què els teixits que es poden rentar amb aigua són cada vegada més comuns. Quant al seu ús com a intermediari químic, s'usa en la producció de nous dissolvents que reemplaçaran als prohibits en el Protocol de Montreal, tot i que la informació més recent disponible (any 2001) indicava que aquesta àrea d'aplicació havia disminuït.

D'altra banda, l'aplicació més estesa del TCE és la neteja de peces metàl·liques en desengreixadors a vapor. També s'utilitza aquest producte com a ingredient en adhesius, per a síntesis en la indústria química i per a la utilització directa del consumidor, com en el cas dels eliminataques. Cal assenyalar que s'usa a més petita escala com a dissolvent en diferents productes, incloent insecticides, olis i ceres. En el futur es preveu un increment en la demanda de TCE per a la síntesi de HFC 134a, donat que és un refrigerant alternatiu als clorofluorocarburs (CFCs), alguns dels quals s'han eliminat progressivament des de l'entrada en vigor del Protocol de Montreal. A la Taula 1.1 es troben els usos als que es destina el TCE i PCE produïts a la UE.

**Taula 1.1.** Aplicacions del TCE i PCE a la UE<sup>1</sup>

Aplicació	TCE	PCE
	Tones/any i percentatge sobre el total	Tones/any i percentatge sobre el total
Neteja en sec de roba	-	62400 (58)
Desengreixant peces metàl·liques	63410 (82)	14000 (13)
Intermedi químic	-	30000 (28)
Adhesius	6930 (9)	-
Consum domèstic	4620 (6)	-
Altres	2310 (3)	1600 (1)

<sup>1</sup> Les dades que fan referència al TCE són una mitjana per al període 1993-1996 i les del PCE són per l'any 1994. Les dades s'han extret a partir de CE, 2004 i 2005.

La Comissió Europea va realitzar una exhaustiva estimació de les quantitats anuals de TCE i PCE que s'alliberaven en el medi anualment durant el seu procés de producció, els seus diferents usos i la seva eliminació. Aquests càlculs es realitzaren en base a diferents escales espacials, a partir de dades reals i estimades d'emissió i considerant la mobilitat entre els diferents compartiments del medi. A la Taula 1.2 es resumeixen les emissions globals a la UE.

<sup>1</sup> Durant el període 1986-1994 la producció de PCE a Europa va passar de 340.800 a 164.000 tones i les vendes totals varen caure de 161.600 a 78.000 tones. Les vendes el 1998 varen ser lleugerament més reduïdes que les de 1994, les de 2001 de 63.500 tones i l'any 2004 de 54.000 tones (CE, 2005).

**Taula 1.2.** Emissions de TCE i PCE a la UE<sup>1</sup>

Fonts d'emissió	TCE				PCE			
	Kg/dia		% <sup>2</sup>		Kg/dia		% <sup>2</sup>	
	aire	aigua	aire	aigua	aire	aigua	aire	aigua
En la seva producció i com a intermedi	5744	45	3,8	0,3	1370	2	0,7	0,5
Durant el seu ús com a dissolvent	1356	1	0,9	0,0	-	-	-	-
Desengreixant de metalls	109023	12114	71,2	85,6	34562	384	18,8	86,7
En la producció d'adhesius	483	58	0,3	0,4	-	-	-	-
Durant l'ús dels adhesius	19006	0	12,4	0,0	-	-	-	-
En la producció d'altres productes	321	38	0,2	0,3	-	-	-	-
Durant l'ús d'aquests altres productes	11393	1266	7,4	8,9	-	-	-	-
Abocador	-	-	-	-	8219		4,48	
Neteja en sec	-	-	-	-	139208	57	75,9	12,8
Altres	5696	633	3,7	4,5				
<b>Total</b>	<b>153022</b>	<b>14155</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>183359</b>	<b>443</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<sup>1</sup> Les dades que fan referència al TCE són una mitjana per al període 1993-1996 i les del PCE són per l'any 1994. Les dades s'han extret a partir de CE, 2004 i 2005. <sup>2</sup>El percentatge està calculat sobre el total de cada compartiment.

Com es pot apreciar a la Taula 1.2, la via principal de les emissions de TCE i PCE és l'aire, degut a l'elevada volatilitat d'aquests productes. També es pot observar que les seves emissions estan directament relacionades amb la quantitat destinada a cada ús. Així, la principal font d'emissió de TCE es dona durant el seu ús com a desengreixant de metalls. Tanmateix el càlcul per a la seva estimació és difícil pel fet que la quantitat alliberada depèn de la quantitat de producte utilitzada en cada planta, de la seva grandària i de les mesures de control que apliquen per reduir les seves emissions. En el cas del PCE, la quantitat més significativa s'allibera en el procés de neteja en sec. Actualment hi ha dos tipus principals de màquines per a aquest tipus de neteja i les seves emissions depenen del sistema escollit. En el passat, el sistema més comú era el de circuit obert, en el que l'assecat final de la peça de roba es feia directament a l'atmosfera. Posteriorment, aquest sistema es va millorar afegint filtres de carbó actiu per adsorbir el dissolvent abans de l'assecat a l'exterior. L'altre sistema és el de circuit tancat, on els vapors del dissolvent es recuperen en el cicle d'assecat per condensació. Les emissions a l'atmosfera de dissolvent per als sistemes oberts sense carbó actiu són de 15,5 Kg/100 Kg de roba i de 2,0 kg/100 Kg de roba per al sistema obert amb carbó actiu i el tancat (CE, 2005). La contaminació aquosa en aquest procés es dona per l'addició d'aigua durant el rentat per eliminar impureses solubles en aigua i per la regeneració del filtre de carbó actiu en els sistemes que el contemplin.

La importància de l'estudi de la degradació de TCE i PCE ve originada principalment per la seva ubiqüitat en el medi, com s'ha esmentat anteriorment, i per la seva perillositat. Les raons de la seva prominència en el medi com a contaminant poden ser varies, entre aquestes destaquem:



- Aquests contaminants són considerats recalcitrants degut al seu elevat estat d'oxidació, que els fa difícilment degradables pels microorganismes i disminueixen les possibilitats d'atenuació natural (McCarty i Semprini, 1994).
- Com es pot observar a la Taula 1.2 les possibles fonts d'emissió abracen un ampli espectre d'escenaris, que fa plausible l'extensió de la seva contaminació en àmplies parts del territori.
- Degut a les seves característiques físico-químiques, el TCE i PCE poden acumular-se segons l'estratigrafia del subsòl. En aquests casos, el temps requerit per a la seva completa dissolució per a una acumulació habitual d'aquests productes pot ser de centenars d'anys sota condicions naturals (Johnson i Pankow, 1992). Alhora, aquestes zones d'acumulació (bassals) poden actuar durant aquest temps com a punts de difusió de la contaminació en la resta de l'aquífer, fent que quantitats relativament petites de TCE o PCE puguin contaminar extensions molt grans d'aquífers subterranis (Freeberg *et al.*, 1987).

Respecte la seva toxicitat sobre la salut humana, el PCE està classificat com a carcinogen de categoria 3 i el TCE de categoria 2, per la Directiva 67/548/CEE<sup>2</sup>. Formen part de la categoria 3 aquelles substàncies els efectes carcinògens de les quals són preocupants, però de les que no es disposa de suficient informació per a realitzar una avaluació satisfactòria; hi ha algunes proves realitzades amb animals però que resulten insuficients per incloure-les en la segona categoria. La categoria 2, en canvi, la formen aquelles substàncies que poden considerar-se carcinògenes per als éssers humans. En aquest cas, es disposa de suficients elements per suposar que l'exposició de les persones a aquestes substàncies poden produir càncer, i aquesta presumpció es fonamenta generalment en estudis apropiats a llarg termini en animals i amb altres tipus d'informació pertinent. Addicionalment el PCE està classificat com a substància mutagènica de categoria 3. A aquesta categoria pertanyen aquelles substàncies que són preocupants pels seus possibles efectes mutagènics però que els resultats obtinguts fins ara són insuficients com per classificar-la en la segona categoria.

Actualment existeixen diferents tecnologies que permeten la reducció i reutilització en origen del TCE i PCE en les seves principals aplicacions, tot i que amb aquestes mesures el seu alliberament en el medi no s'evita. Per tant, una alternativa factible és l'ús d'alguns dels productes alternatius al TCE i PCE que existeixen en el mercat i que en alguns casos han mostrat tenir una millor activitat que el compost original. Per a l'ús com a desengreixant, destaquen les mescles a base de p-cimè, que són molt efectives com a desengreixants, no són tòxiques, no perjudiquen la capa d'ozó i estan formades per productes tensioactius totalment biodegradables. Una altra possibilitat és la utilització d'hidrofluorèters, que tenen una baixa toxicitat, estabilitat química i tèrmica, no són inflamables i presenten una bona penetració, però el seu preu encareix el procés (web CAR/PL). En el cas de la neteja en sec amb PCE, una alternativa és la neteja humida. Alguns estudis indiquen que entre el 30-70% de les peces de roba netejades en sec per PCE poden fer-se satisfactòriament en humit si es

---

<sup>2</sup> La classificació sobre la perillositat del TCE s'estableix a la Directiva 2001/59/CE de 6 d'agost de 2001, per la que s'adaptava per vint-i-vuitè cop al progrés tècnic la Directiva 67/548/CEE que s'esmenta en el text. En el cas del PCE, la seva classificació es troba a la Directiva 96/54/CE de 30 de juliol de 1996, que suposa l'adaptació número vint-i-dos de l'esmentada Directiva 67/548/CEE.

controla el deteriorament i encongiment del teixit. L'aigua tendeix a inflar les fibres naturals i hidrofòbiques, fent que s'arruguin, s'encongeixin i perdin la seva forma i resistència, però el PCE té un efecte mínim sobre les propietats del teixit. La neteja d'aquests teixits en humit és possible si es controlen els diferents nivells d'acció mecànica durant el rentat i l'operació d'assecat. Una altra possibilitat és la neteja amb hidrocarburs, que és l'alternativa més estesa, i presenta una menor toxicitat i volatilitat (i per tant menor exposició pels usuaris) i és menys costosa que el PCE. Malauradament és menys eficaç per les taques olioses, és inflamable i millora les condicions per al creixement de bacteris, fent que les peces de roba puguin retenir olors desagradables. Darrerament s'estan desenvolupant noves tecnologies com la neteja amb diòxid de carboni líquid o l'ús d'èters glicònics o silicones que encara estan en fase d'experimentació (web CDCP).

### 1.1.1. Mobilitat en el medi

En aquest apartat tractarem el comportament d'aquests productes en el medi aquós i en el sòl, que són els compartiments que permeten identificar i delimitar més clarament les zones contaminades i aplicar possibles tècniques de bioremediació. A la Taula 1.3 es troben les principals propietats físico-químiques del TCE i PCE, que estan estretament relacionades amb la seva mobilitat i distribució en el medi, i a les que es farà referència al llarg d'aquest apartat.

**Taula 1.3.** Característiques físico-químiques del TCE i PCE

	Densitat 20 °C (g/cm <sup>3</sup> )	Solubilitat en aigua 20 °C (mg/l)	Densitat de vapor (Kg/m <sup>3</sup> )	Pressió de vapor (mm Hg) 25 °C	Constant de Henry 25 °C (adimensional)	Coefficient de partició octanol- aigua (log Kow)	Coefficient de partició de carboni (log Koc)
PCE	1,623	149	5,8	17,8	0,723	2,53	2,40
TCE	1,463	1100	0,42	57,9	0,392	2,29	2,29

En el sòl es poden delimitar dues zones importants segons la distribució de l'aigua: la saturada, que es caracteritza per tenir la majoria dels seus porus saturats d'aigua, i la no saturada (també anomenada d'aireació) que seria la franja compresa entre la superfície del terreny i la zona saturada. Quan el vessament al sòl és prou gran com per evitar la seva volatilització, el TCE i PCE poden migrar verticalment a través de la zona no saturada pels porus del sòl, essencialment per raó de la força de la gravetat. En el cas que el TCE i PCE s'aboquin en poca quantitat o en sòls secs la volatilitat serà probablement ràpida degut a la seva elevada pressió de vapor i baixa adsorció en el sòl (Wilson *et al.*, 1981).

Durant el procés de migració vertical, part del producte pot ser retingut en els porus del sòl per adsorció. Aquesta fracció s'anomena saturació residual i, si és prou important, pot evitar que el vessament arribi als aquífers. L'adsorció té una relació directa amb la textura del sòl, augmentant amb la quantitat de carboni orgànic present en el sòl o en els sediments (Grathwohl i Reinhard, 1993).

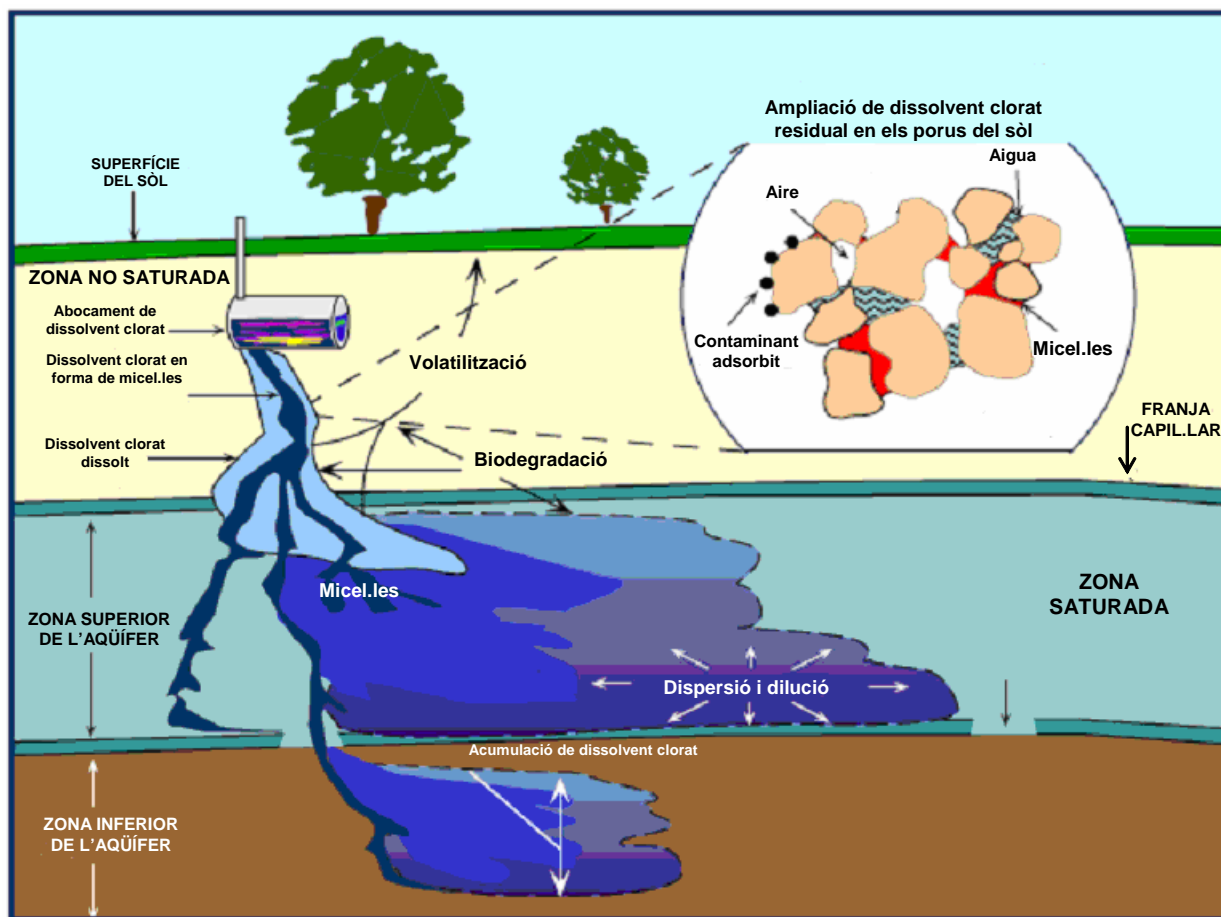
Tanmateix, la quantitat de TCE i PCE retinguda per aquest procés es considera negligible, de manera que aquests productes es trobaran relativament mòbils en el sòl en absència d'algun procés d'eliminació (Russell *et al.*, 1992). Alhora, l'estructura del sòl també serà decisiva en la seva mobilitat en la mesura que té una relació directa amb la porositat del sòl i presenta les vies preferents en les que el TCE i PCE es poden infiltrar en el seu interior (Huling i Weaver, 1991).

El TCE i PCE presents com a saturació residual en la zona no saturada poden migrar per via aquosa o gasosa. De fet, factors com les pluges i l'augment del nivell freàtic (per factors estacionals o nivell del mar, per exemple) poden mobilitzar el producte en aquesta fase i fer que arribin a la zona saturada del sòl. Així doncs, en la zona no saturada podem trobar el TCE i PCE en quatre fases: gasosa (present com a vapors), adsorbit o en equilibri amb el sòl o material de l'aquífer, aquosa (dissolts en la solució del sòl) i/o immiscible.

Si el volum de PCE i TCE és suficientment gran, aquests poden travessar la zona no saturada, arribar a la zona saturada i contaminar les aigües freàtiques. A la zona saturada, donada la manca d'aire, es considera que el TCE i PCE pot trobar-se distribuït en tres fases: adsorbida, aquosa i/o immiscible. Donat que les densitats d'aquests productes són superiors a les de l'aigua, poden continuar la seva migració vertical fins que s'exhaureixen pel procés de saturació residual o fins trobar-se amb una capa o unitat estratigràfica poc permeable. En aquest darrer cas, pot començar la seva migració lateral o bé la seva acumulació en el cas que la zona tingui forma de bol. A la Figura 1.2 es troba detallada, de manera esquemàtica, el comportament de TCE i PCE en el sòl degut a una fuga.

En el cas que el PCE i TCE siguin vessats a les aigües superficials, poden passar ràpidament a l'atmosfera a través de la volatilització, com ho manifesten els seus elevats valors de les constants de Henry (Taula 1.3). La seva velocitat de volatilització dependrà del grau de barreja del sistema aquós, el qual estarà en funció del moviment de l'aigua i de la velocitat del vent, el que pot portar a diferències considerables entre les velocitats d'evaporació mesurades en el laboratori i en el camp (Dilling *et al.*, 1975).

Segons la font consultada, el TCE i PCE es defineixen com a lleugerament solubles, pràcticament insolubles o insolubles en aigua. Tot i que la definició d'aquestes categories depèn de l'apreciació de cada autor, els seus valors de solubilitat indiquen que ambdós productes tenen una limitada solubilitat en aigua, sobretot el PCE (Taula 1.3). Tanmateix, el PCE ha estat detectat en aigua de pluja, el que demostra la seva potencialitat en dissoldre's en les gotes d'aigua (CE, 2005). En contacte amb l'aigua, el TCE i PCE són immiscibles. Això, juntament amb el fet que les seves densitats són superiors a les de l'aigua (Taula 1.3) fa que en contacte amb una capa aquosa el seu desplaçament sigui essencialment vertical fins trobar-se una capa menys permeable. En aquest cas es pot donar un moviment horitzontal del producte seguint el flux de l'aigua, de la mateixa manera que amb les aigües freàtiques del sòl.



**Figura 1.2.** Esquema de la distribució del TCE i PCE en el sòl

Un altre possible compartiment on el TCE i PCE poden acumular-se és en els organismes. El procés de bioacumulació és defineix com la quantitat d'un contaminant que un organisme pot acumular per absorció superficial, ingestió o altres vies. La magnitud de la bioconcentració, que s'expressa amb el factor de bioconcentració, depèn fortament de la característica hidrofòbica del contaminant (directament relacionada amb la constant octanol-aigua) i del contingut de lípids de l'organisme. El TCE i PCE presenten un valor del coeficient octanol-aigua relativament baix (Taula 1.3), indicant un baix potencial per a la seva bioacumulació. Estudis realitzats amb diferents peixos i algues no donen indicis que la bioacumulació sigui una de les principals vies de distribució (CE, 2004 i 2005).

### 1.1.2. Degradació abiòtica

Tant el TCE com el PCE poden reaccionar a l'atmosfera amb diferents espècies produïdes fotoquímicament, sent la reacció amb els radicals hidroxil el mecanisme predominant d'eliminació. Per al PCE es considera que la degradació fotoquímica és negligible a la troposfera, mentre que el TCE es pot degradar ràpidament.

Considerant una concentració mitjana de radicals hidroxil a l'atmosfera de  $5 \times 10^5$  molècules/cm<sup>3</sup>, el temps de vida mitja per al TCE és de 7 dies i per al PCE de 3,2 mesos (CE, 2004 i 2005). Per al PCE, aquest temps de vida mitja és suficientment gran com per permetre el seu transport des del punt d'emissió. Addicionalment, el fet que sigui més dens que l'aire (5,8 Kg/m<sup>3</sup> de densitat de vapor, veure Taula 1.3) fa que tendeixi a acumular-se a nivell de terra i per tant que augmentin les possibilitats d'exposició per als éssers humans. Això suposa un risc important degut a què la inhalació d'aquest contaminant pot produir efectes adversos per la salut. S'ha descrit que pot afectar al sistema nerviós i provocar vertigen, debilitat i pèrdua de coneixement, a més dels efectes tòxics descrits anteriorment (veure Fitxes internacionals de seguretat química al final del document). La reactivitat de PCE a la troposfera es considera suficientment baixa com per no contribuir de manera significativa a la producció d'ozó troposfèric i a l'esmog fotoquímic. Donat que la fracció que pot arribar a l'estratosfera és molt baixa (aproximadament un 1% del total de les emissions) el seu impacte en la reducció de l'ozó estratosfèric és molt reduït comparat amb el que provoquen altres compostos com els CFCs i el cloroform de metil.

S'han realitzat nombrosos estudis sobre els productes formats a partir de la degradació fotoquímica del TCE i PCE en aire sota condicions de laboratori. En aquests experiments, el producte majoritari de la degradació de PCE per radicals hidroxils ha estat clorur de tricloroacetil (CTCA), fosc, tetraclorur de carboni, diòxid de carboni i monòxid de carboni. En el cas del TCE, el producte majoritari ha estat clorur de dicloroacetil (CDCA), amb traces de fosc i clorur de formil.

Posteriorment es va demostrar que les vies de degradació descrites anteriorment estaven formades per dues reaccions competitives: l'addició de radicals hidroxils, per una banda, i la presència de clors provinents de la degradació del TCE i PCE, per una altra. Així, es va demostrar que l'addició de radicals hidroxil al PCE donava lloc a la formació de fosc, i que la presència de clor era la que produïa el CTCA (el qual posteriorment es pot degradar a tetraclorur de carboni). Anàlogament, per al TCE els radicals hidroxils produïen clorur de formil i fosc i el clor generava majoritàriament CDCA (Tuazon *et al.*, 1988; Itoh *et al.*, 1994). Aquestes dades són rellevants donat que en condicions reals el clor és poc abundant a l'atmosfera i per tant la via predominant de degradació serà la dels radicals hidroxil (Thüner *et al.*, 1999). El fosc, compost comú de degradació del TCE i PCE sota aquestes condicions, és considerat molt tòxic per inhalació segons la Directiva 2001/59/CE. Tant el CTCA com el CDCA, produïts majoritàriament en la degradació del PCE i TCE en presència de clor, poden hidrolitzar-se a l'atmosfera i formar l'àcid tricloroacètic i dicloroacètic respectivament, que pot ser precipitat al sòl o a les aigües en forma de pluja (CE, 2004 i 2005). Cal tenir en compte que l'àcid dicloroacètic s'ha utilitzat com a herbicida i, per tant, pot tenir conseqüències negatives per la flora.

Apart dels radicals hidroxil i els àtoms de clor existeixen altres espècies atmosfèriques com l'ozó, òxid de nitrogen o oxigen capaces de degradar el TCE i PCE. Tanmateix, es consideren vies de degradació negligibles degut a les seves baixes concentracions a l'atmosfera (Franklin, 1994).

Pel que fa a la seva degradació abiòtica en aigua, la seva eliminació per hidròlisi és produïda molt lentament i no és probable que sigui una via important. Les dades obtingudes a la bibliografia presenten una variabilitat molt important (Jeffers *et al.*, 1989; Dilling *et al.*, 1975).

## 1.2. Tractaments per a la degradació de TCE i PCE

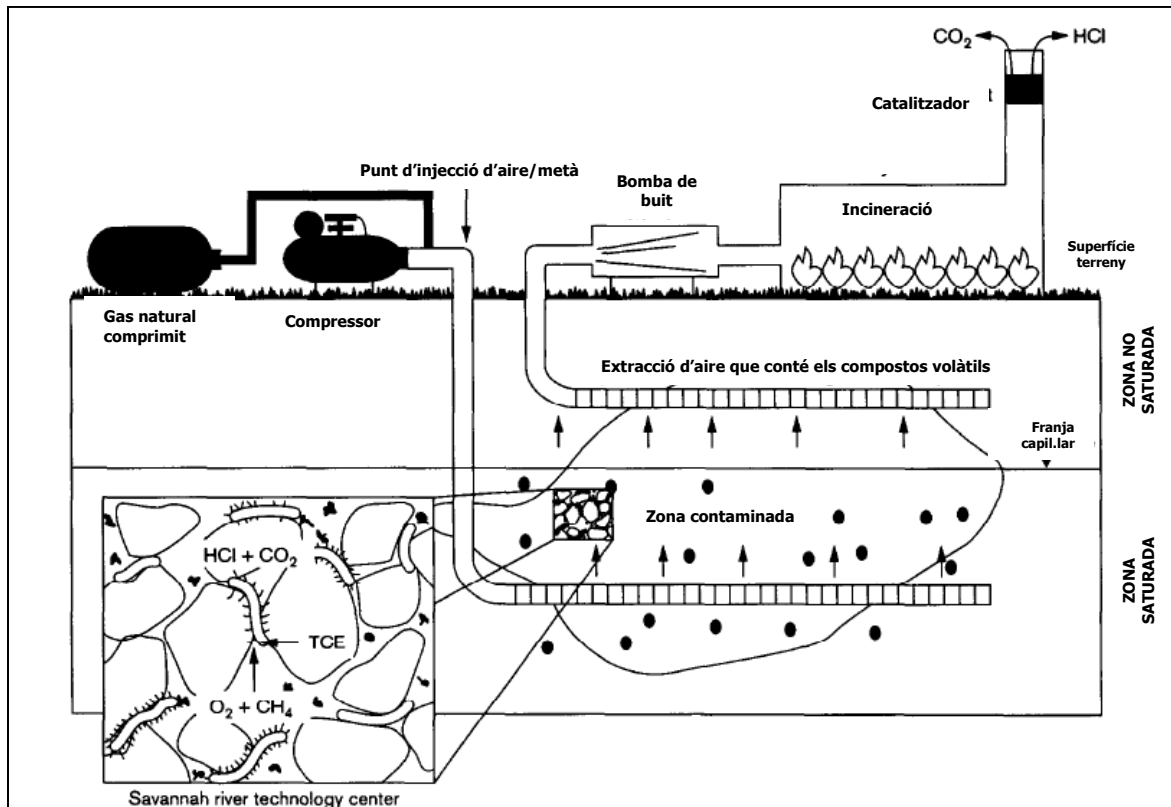
S'han descrit diferents tractaments possibles per a l'eliminació de TCE i PCE. En aquest apartat es fa un breu resum de les principals estratègies, classificant els tractaments segons siguin físics, químics o biològics. Tanmateix, a la literatura podem trobar altres tipologies de classificació segons el lloc on es realitza la remediació (*in situ* o *ex situ*) o el seu objectiu final (contenció, separació o tractament). Donat que aquesta Tesi tracta la degradació biològica de TCE i PCE, es farà especial èmfasis en aquelles tecnologies que utilitzen els microorganismes per transformar aquests contaminants a productes menys tòxics.

### 1.2.1. Tractaments físics

La majoria d'aquestes tractaments tenen com a objectiu la transferència del contaminant d'una fase líquida (dissolta en aigua o immiscible) a gasosa. Donat que no són tècniques degradatives, habitualment requereixen d'un tractament posterior o la combinació amb altres tractaments per transformar els contaminants. Entre els tractaments posteriors dels vapors de TCE i PCE s'inclouen la condensació, l'adsorció per carboni, l'oxidació tèrmica i la biodegradació mitjançant reactors. Pel que respecta a la biodegradació, el co-metabolisme de TCE present en els vapors d'extracció amb bacteris ha estat objecte d'estudi, però inicialment s'havien assolit velocitats de degradació reduïdes (Speitel *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1998). Posteriorment aquest tipus de tractament s'ha millorat de manera substancial utilitzant bioreactors amb sistemes de fibra buida amb cultius axènics de bacteris (Pressman *et al.*, 2000) i aplicant diferents sistemes d'alimentació del substrat per evitar l'efecte inhibitori entre aquest i el TCE (In-Gyung i Ok-Hyun, 2005). Recentment, s'ha dissenyat un nou bioreactor que manté fixat en una emulsió espumosa la soca *Burkholderia cepacia* G4. Aquest bioreactor degradava co-metabòlicament TCE amb una eficiència màxima d'entre el 82-96% quan el TCE i els vapors de toluè s'alimentaven seqüencialment per evitar l'efecte inhibitori entre el contaminant i el substrat primari de creixement del bacteri (Kan i Dehusses, 2006).

En aquest apartat es presentaran els següents tractaments físics: aireació, extracció per vapor, desorció tèrmica, bombeig i la mobilització i millora de la solubilització.

L'aireació (també anomenada *air sparging*) és una tècnica que es basa en la injecció d'aire o oxigen a l'interior del medi contaminat. Donat que el TCE i PCE tenen constants de Henry elevades i per tant un potencial elevat per transferir-se de la fase líquida a gasosa, els contaminants passen a la fase gas on poden ser extrets per sistemes d'extracció de vapor i tractar-se posteriorment. En la seva aplicació en aqüífers contaminats, aquesta tecnologia es pot millorar afegint juntament amb l'aire un co-substrat, com el propà o metà, per tal d'afavorir l'activitat microbiana en el medi. A la Figura 1.3 es pot observar un esquema d'aplicació d'aquest tractament a escala de camp per a la degradació co-metabòlica de TCE, on s'utilitza metà com a co-substrat i els pous d'injecció i extracció són horitzontals (Semprini, 1997).



**Figura 1.3.** Aplicació *in situ* del sistema d'aeració del sòl amb l'addició de metà com a co-substrat. La degradació co-metabòlica del TCE, estimulada per l'addició de metà, genera  $\text{HCl}$  i  $\text{CO}_2$ . L'aire és injectat a la zona saturada per un compressor i extreta de la no saturada per una bomba de buit. Els gasos extrets són incinerats i emesos a l'atmosfera (Semprini, 1997).

De la mateixa manera que altres tecnologies com el bombeig, l'aeració d'un aqüífer contaminat en condicions de camp presenta l'inconvenient que poden deixar una fracció residual adsorbida en el sòl durant l'extracció del contaminant, la qual pot mobilitzar-se posteriorment. La seva implementació implica conèixer la geologia del terreny on es vol aplicar, per tal d'evitar moviments incontrolats dels contaminants que s'hagin evaporat.

L'extracció per vapor és similar a altres tecnologies com l'escalfament elèctric per resistència i l'escalfament per conductivitat elèctrica. Aquestes tècniques tenen en comú l'objectiu final d'incrementar la temperatura de la zona contaminada, aprofitant el fet que les propietats clau que governen el comportament dels dissolvents clorats en el medi són altament dependents d'aquesta variable. Així, amb un increment de la temperatura es facilita la volatilització dels dissolvents clorats degut a què les seves pressions de vapor augmenten. La seva mobilitat en el medi també incrementa amb la temperatura degut a la disminució de la viscositat i a l'augment de la solubilitat (EPA, 2004a). L'extracció per vapor es basa en la injecció de vapor en el medi contaminat per dissoldre, evaporar i mobilitzar els contaminants mitjançant equips d'extracció de líquids i vapor. L'avantatge d'aquest tractament és que la capacitat calorífica del vapor és relativament gran i proporciona més calor que la injecció d'aire calent. Entre les limitacions de la seva aplicació en el camp destaca la textura del sòl, donat que grandàries de porus petites impedeixen la penetració del vapor. També cal tenir en compte

l'heterogeneïtat geològica del subsòl, que pot provocar que el flux de vapor derivi cap a altres vies preferencials. Amb aquest tractament s'han assolit reduccions de TCE a les aigües subterrànies superiors al 90% (de 20000 µg/L a <1000 µg/L) en un període de 2 anys a una zona contaminada per TCE a Northlake, Illinois (les dades tècniques i econòmiques de la implantació d'aquest projecte es poden trobar a EPA, 2004a). Després d'aquest tipus de tractament la bioremediació pot ser una opció efectiva ja que la temperatura aplicada no ha de ser tant elevada que provoqui la esterilització del sòl i s'ha observat en experiments de camp que la dechloració reductiva pot donar-se durant la fase de refredament (Beyke i Powell, 2005).

La desorció tèrmica és un tractament en el que els residus són dipositats en forns rotatoris i escalfats mitjançant la injecció d'aire calent de manera que els contaminants i l'aigua es volatilitzen. Els gasos obtinguts són transportats per un sistema d'extracció de vapors fins al seu tractament final. Segons la temperatura d'operació del forn, aquest sistema es pot dividir en dos grups: desorció tèrmica a alta temperatura (320-560 °C) o a baixa temperatura (90-320 °C). En la seva aplicació en sòls contaminats, s'han assolit valors d'extracció d'entre 93-99,9% pel TCE i PCE, tot i que és un mètode car tant per la injecció de l'aire calent com per l'extracció i el tractament de grans volums de terreny (web IGME).

El bombeig i posterior tractament ha estat la tecnologia més comuna per a la remediació d'aigües subterrànies contaminades (EPA, 2004b). Com el seu nom indica, aquesta tècnica permet l'extracció de l'aigua contaminada per bombeig mitjançant un sistema de canonades. El seu tractament posterior és generalment l'*air stripping* (amb el que el contaminat és transferit de la fase líquida a gasosa per al seu posterior tractament) o l'adsorció per carbó actiu. L'aigua contaminada també pot ser tractada per bioreactors, que generalment permeten assolir nivells més elevats de biodegradació que en els sistemes *in situ*, donat que les variables de tractament són més controlables (Vidali, 2001). Les variables en el seu disseny inclouen el número de pous, la seva profunditat i la velocitat d'extracció de l'aigua contaminada. Aquest sistema requereix temps de funcionament habitualment llargs i té uns costos de manteniment i d'operació elevats (EPA, 2004c).

Per últim, els tractaments de mobilització i millora de la solubilització s'apliquen habitualment com a complements del sistema de bombeig. L'objectiu és augmentar la solubilitat i mobilitat dels contaminants en el medi mitjançant l'addició de surfactants i co-solvents, de manera que puguin ser eliminats de l'aquífer amb major eficiència. Tant els surfactants biodegradables com els co-solvents (habitualment etanol, metanol i isopropanol) són substrats que alhora s'han demostrat capaços d'estimular la bioremediació de PCE durant el post-tractament (Ramsburg *et al.*, 2004; Mvarick *et al.*, 2003). Durant la seva aplicació cal realitzar un control hidràulic de la zona per evitar la dispersió de la contaminació.



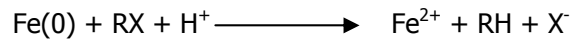
## 1.2.2. Tractaments químics

Aquests tractaments inclouen les transformacions redox del TCE i PCE. Amb l'oxidació química l'objectiu final és la mineralització completa dels contaminants a diòxid de carboni i aigua. Les tècniques oxidatives directes són aquelles en les que s'afegeix directament el reactiu que oxida el contaminant, sent la més significativa l'addició de permanganat de potassi. L'oxidació indirecta inclou tractaments amb els que es generen radicals hidroxil que poden degradar el contaminant. Entre aquestes tècniques trobem el tractament amb ozó a pH elevat, ozó més peròxid d'hidrogen, peròxid d'hidrogen més llum UV o els reactius Fenton. Per últim, la reducció química de TCE i PCE ha estat àmpliament estudiada amb metalls de valència zero, tot i que també és factible la seva reducció mitjançant l'electròlisi. En aquest apartat es descriu breument les tècniques més estudiades per a la degradació química del TCE i PCE.

L'oxidació de TCE i PCE amb permanganat de potassi ( $\text{KMnO}_4$ ) ha estat àmpliament demostrada tant en condicions de laboratori com en estudis de camp (Schnarr *et al.*, 1998; Yang i Schwartz, 1999). Els subproductes habituals de degradació són  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCl}$  i  $\text{MnO}_2$  precipitat. En comparació amb els reactius de Fenton, el permanganat és més soluble en aigua que el peròxid d'hidrogen i no té una dependència del pH tant gran, requerint valors de pH d'entre 3-10, mentre que pels reactius de Fenton és de 3-6. La seva aplicació en les aigües subterrànies es realitza habitualment mitjançant pous d'injecció. La velocitat d'oxidació del permanganat de potassi és relativament lenta, la qual cosa beneficia la seva aplicació *in situ* donat que permet la seva entrada en el medi porós sense reaccionar prèviament amb la matèria orgànica del sòl. Degut a l'acidesa dels subproductes, els sòls poc tamponats poden disminuir el pH de la solució del sòl i pot comportar la mobilització de metalls pesats. També, la precipitació d'òxids de manganès pot disminuir la permeabilitat del sòl (Li i Schwartz, 2004).

Els reactius de Fenton són el resultat de la reacció entre el peròxid d'hidrogen ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i l'ió ferrós ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que produeix radicals hidroxil, un fort oxidant capaç de degradar diferents compostos orgànics. S'han aplicat per al PCE i TCE a escala laboratori amb aigües subterrànies i fangs (Teel *et al.*, 2001; Suty *et al.*, 2004). D'aquests estudis es dedueix que la seva aplicació és altament dependent de la concentració de ferro en l'àrea d'aplicació i de la proximitat de l'àrea d'injecció del focus de contaminació degut a que el peròxid d'hidrogen es descomposa ràpidament. En experiments en batch i pH baixos (aproximadament 3) els reactius Fenton han estat capaços d'oxidar entre el 93-100% del TCE dissolt en aigua subterrània i entre el 98-100% de TCE presents en fangs de sòl (Chen *et al.*, 2001). Una de les seves limitacions és la necessitat de mantenir un pH reduït, la qual cosa és difícil en condicions naturals. Té l'avantatge de que els reactius necessaris són barats i no perillosos i que els subproductes obtinguts són innocus (web IGME).

Per últim, la dehalogenació de compostos orgànics és possible mitjançant la reducció amb metalls de valència-zero, en la que l'oxidació d'un metall com el  $\text{Fe}(0)$  a  $\text{Fe}(\text{II})$  està vinculada a la hidrogenòlisi, segons la següent reacció:



Les velocitats de reacció depenen del grau de dehalogenació dels compostos clorats. Aquest tractament ha estat aplicat de manera efectiva tant pel TCE com per PCE en tractaments d'aigües i sòls, i sovint s'ha combinat amb altres tècniques com la bioremediació o l'addició de surfactants (Janda *et al.*, 2004; Rosenthal *et al.*, 2004). La configuració que s'usa habitualment per a la seva aplicació en el camp són les barreres permeables reactives, que contenen en el seu interior Fe(0) i que s'han demostrat viables econòmicament (Schuth *et al.*, 2003). Els limitants d'aquest sistema són la profunditat de les barreres i la corrosió de les superfícies de ferro, sobretot degudes a la producció d'hidrogen a partir de l'aigua que reacciona amb el ferro, que disminueixen la velocitat de les reaccions dels contaminants. S'ha demostrat que utilitzant el pal·ladi com a catalitzador, juntament amb el Fe(0), es redueix el TCE molt més eficaçment, però malauradament el seu cost és prohibitiu (Kim i Carraway, 2003). Recentment s'ha demostrat la capacitat decloradora d'una emulsió estabilitzada per surfactants formada per una barreja oli-aigua i que conté en el seu interior nano- i micropartícules de Fe(0) (Quinn *et al.*, 2005). Així, els compostos clorats com el TCE es difonen a través de la membrana oliosa de la micel·la, reaccionen amb el ferro en el seu interior donant lloc a la decloració i els subproductes obtinguts s'expulsen a l'exterior. Aquestes micel·les s'han injectat directament a les zones aquoses del sòl, assolint reduccions de TCE superiors al 80% en el sòl i de 57-100% en les aigües subterrànies. Els subproductes obtinguts amb aquest sistema són essencialment etè, però també s'han identificat concentracions creixents de productes tòxics com clorur de vinil.

### 1.2.3. Tractaments biològics

El principal mecanisme de degradació d'etens clorats per microorganismes és la decloració reductiva (Sutherson i Payne, 2005), la qual es pot donar metabòlica o co-metabòlicament. En el primer cas els microorganismes tenen un guany energètic en la degradació, mentre que en el segon els enzims utilitzats pel metabolisme cel·lular actuen fortuïtament sense que el microorganisme es beneficiï energèticament. La decloració reductiva pot ocórrer en el medi de manera natural, quan els microorganismes responsables d'aquest procés es troben presents i actius en els espais contaminats. A aquest procés se l'anomena atenuació natural, i es pot monitorejar com a part del procés global de remediació d'un espai, considerant-lo aïlladament si el temps i nivells de degradació són acceptables, o combinant-lo amb altres estratègies (EPA, 1998).

La bioremediació *in situ* és una tecnologia en emergència per al tractament de les zones d'acumulació de cloroetens. El seu baix cost d'implementació, la limitada exposició humana al contaminant durant el tractament i el fet que s'evitin trastorns com les excavacions o el transport dels contaminants la fan, a priori, l'opció més desitjable. Aquestes tecnologies estan dissenyades per al tractament amb bacteris i inclouen la bioestimulació i la bioaugmentació.

La bioestimulació es basa en l'addició de nutrients i de donadors i acceptors d'electrons per tal d'estimular el creixement dels microorganismes degradadors dels contaminants. En el cas dels

nutrients les fonts principals són nitrogen, fòsfor i altres elements traça necessaris per al creixement bacterià. L'addició de donadors d'electrons implica substrats que actuen com a reductors en les reaccions redox utilitzades pels microorganismes per produir energia durant la declaració reductiva. L'hidrogen és el principal donador d'electrons per a la declaració reductiva (Yang i McCarty, 1998). En el mercat es troben preparats que alliberen lentament hidrogen i que són força insolubles, com l'Hidrogen Release Compound (HRC<sup>®</sup>), i d'altres més solubles i que alliberen hidrogen més ràpidament, com el lactat, molasses o àcid làctic. Un dels problemes sobre l'addició de donadors d'electrons és la possible competència amb els metanògens, donat que podrien impedir el creixement dels bacteris declaradors. Tanmateix s'ha demostrat que les poblacions de bacteris declaradors poden augmentar en els bassals d'etens clorats, on els metanògens es troben inhibits per les altes concentracions de TCE i PCE (Yang i McCarty, 2000). En els processos de degradació aeròbics s'afegeix habitualment oxigen com a acceptor d'electrons, i sota condicions anaeròbies l'ordre de preferència seria els nitrats, manganès (IV), ferro (III), sulfat i per últim el diòxid de carboni. La solubilitat i viscositat dels substrats en la bioestimulació són paràmetres que es seleccionen depenent dels objectius de la remediació i de les característiques del medi que es vol descontaminar. Per exemple, en aquells indrets on la contaminació es trobi en capes profundes serà més recomanable substrats amb densitats més elevades que l'aigua, com el lactat i les molasses, en comptes d'altres com l'etanol o metanol. Els substrats més viscosos romandran en l'aqüífer més temps i poden alliberar hidrogen més lentament reduint la necessitat de reinjecció, però s'obté una distribució menys uniforme en el medi.

La bioaugmentació s'utilitza quan les poblacions microbianes requerides es troben absents, en poca quantitat o no suficientment distribuïdes en el medi com per assolir unes velocitats acceptables de degradació. Així, si després de la implementació de la bioestimulació, amb la que es proporciona un ambient favorable per al creixement microbià, no s'observa declaració reductiva, una estratègia possible és la bioaugmentació. Hi ha nombroses soques capaces de realitzar la declaració reductiva de cloroetens i en el mercat existeixen preparats de barreges de soques per a aquesta finalitat (per exemple Bio-dechlor INOCULUM<sup>®</sup>). Per als fongs de podridura blanca, també s'han dissenyat inòculs de consorcis per a la degradació efectiva en el sòl de contaminants com el pentaclorofenol (Leštan i Lamar, 1996). La degradació microbiana de TCE i PCE prop de les zones d'acumulació genera una variació en el gradient de concentracions que augmenta la velocitat de transferència de la massa immiscible a la fase aquosa, disminuint el temps de permanència dels bassals (Cope i Hughes, 2001; Yang i McCarty, 2002). També s'ha proposat que els biosurfactants produïts pels microorganismes poden augmentar la mobilitat entre les diferents fases (Payne *et al.*, 2001) però cal realitzar més estudis en aquest sentit per determinar si el seu efecte pot tenir un impacte rellevant.

Les tecnologies per a la implementació de la bioremediació en el camp poden presentar diferents configuracions:

- Injecció directa. Aquest sistema preveu l'addició de microorganismes, nutrients, oxidants o reductors directament en l'aqüífer per diferents punts d'injecció o directament al sòl. El fluxe

natural de l'aigua es monitorea per determinar que la degradació dels productes es produeix a una distància acceptable de la font principal.

- Recirculació de l'aigua subterrània. Extreu l'aigua contaminada del lloc, afegeix els substrats *ex situ* i reinjecta posteriorment l'aigua "activada" al subsòl. Com a alternativa, l'extracció i la injecció també es poden dur a terme en un mateix pou a diferents punts d'alçada, creant una circulació vertical que permet un major control de les aigües freàtiques.
- Barreres permeables reactives. Estableixen una zona de bioremediació activa farcint una rasa amb materials rics en nutrients, oxidants o reductants. D'aquesta manera es permet la mobilitat de l'aigua freàtica impedit la del contaminant. Normalment el farciment de la barrera es barreja amb sorra o un altre material porós per tal de ser menys dens que el sòl que el rodeja i canalitzar l'aigua a través del mur per poder-lo tractar.
- Bioventej. Amb aquest tractament s'aireja el sòl per tal d'estimular l'activitat biològica *in situ* i promoure la bioremediació. En aquest procés, l'oxigen és alliberat a la zona no saturada dels sòls per aire a pressió a baixos cabals, per tal de proporcionar només l'oxigen necessari per mantenir l'activitat microbiana. Normalment s'utilitza per zones contaminades amb petroli. En el cas del TCE i PCE presenten l'inconvenient del risc de volatilitzar els productes, donada la seva elevada volatilitat. En tot cas, no s'utilitzaria per la degradació bacteriana de PCE donat que aquesta es produeix sempre en condicions anaeròbies.

Com a inconvenients de les tècniques de bioremediació destacaríem la possibilitat de formació de subproductes tòxics durant la degradació anaeròbia de TCE i PCE, tals com el clorur de vinil o cis-1,2-dicloroetè (cis-DCE). La seva acumulació en el medi es pot evitar mantenint les condicions metanogèniques del medi, una disponibilitat suficient de substrat i la presència de les poblacions microbianes dechloradores adients. La bioestimulació i bioaugmentació poden canviar les condicions de l'aquífer, podent alterar el seu pH i les condicions redox o incrementar la producció de metà, disminuint la qualitat de l'aigua. Alhora, la bioremediació pot ser efectiva per reduir la longevitat dels bassals i reduir a nivells baixos la contaminació, però és possible que no sigui factible assolir els nivells mínims que fixen les normatives (Moretti, 2005).

### **1.3. Els fongs ligninolítics aplicats a la bioremediació**

Tot i que bona part dels estudis de descontaminació biològica s'han centrat en bacteris per la facilitat que ofereixen en estudiar les seves vies metabòliques i per portar a terme construccions genètiques que permetin degradar específicament determinats contaminants, la capacitat dels fongs per transformar una gran varietat de compostos orgànics i mineralitzar-los fins a CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O ofereix un potencial indiscutible per al seu ús en bioremediació.

### 1.3.1. Aplicació dels fongs de podridura blanca en la bioremediació

Degut a la naturalesa dels enzims ligninolítics, les seves primeres aplicacions biotecnològiques van estar relacionades amb l'obtenció de pasta de paper mitjançant la delignificació de la fusta (permetent un estalvi energètic i de reactius químics) i amb la capacitat de tractament dels seus efluent (Eriksson i Kirk, 1985). Tanmateix, l'aplicació més prometedora i a la que s'estan dedicant més esforços d'investigació és la degradació de compostos xenobiòtics. A la Taula 1.4 es troben alguns dels compostos degradats pels fongs de podridura blanca.

**Taula 1.4.** Contaminants ambientals degradats per fongs de podridura blanca (Reddy i Mathew, 2001 ; Barr i Aust, 1994 ; Pointing, 2001)

<b>Categoria de producte degradat</b>	<b>Exemples</b>
Hidrocarburs aromàtics policíclics	Antracè, 2-metil antracè, 9-metil antracè, benzo(a)pirè, fluorè, naftalè, acenaftè, acenaftilè, fenantrè, pirè, bifenil.
Compostos organoclorats	Pesticides com Alachlor, Aldrin, Chlordane, DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)eta), Heptaclor, Lindane, Mirex, Atrazine. Clorofenols com pentaclorofenols, triclorofenols, i diclorofenols. Herbicides com l'àcid 2,4-diclorofenoxiacetic i l'àcid 2,4,5-diclorofenoxiacetic. Altres com PCB, dioxines, clorobenzens.
Colorants industrials	Azure B, Congo Red, Disperse Yellow 3, Orange II, Poly R, Reactive Black 5, Reactive Orange 96, Reactive violet 5, Remazol Brilliant Blue R, Solvent Yellow 14, Tropaeolin
Compostos nitrosubstituïts	Explosius químics tals com: 1,3,5-trinitrotoluen, 2,4-dinitrotoluen, 2-amino-4,6-dinitrotoluen, 1-cloro-2,4-dinitrobenzè, 2,4-dicloro-1-nitrobenzè, 1,3-dinitrobenzè, RDX.
Altres contaminants ambientals	BTEX (benzè, toluè, etilbenzè, o-,m-,p-xilens), alquilbenzens lineals sulfonats (LAS), tricloroetilè, tetraclorur de carboni.

La utilització de fongs de podridura blanca en la bioremediació ofereix nombroses avantatges. En primer lloc, aquests fongs catalitzen la degradació de la lignina i dels contaminants mitjançant un mecanisme de radicals lliures no específic, que permet degradar un ampli ventall de contaminants. L'origen no específic d'aquest mecanisme permet degradar barreges de contaminants, com la creosota o l'Aeroclor (Reddy, 1995). El fet que, en la seva majoria, siguin fongs cosmopolites, amplia el ventall de possibilitats de la seva aplicació i fa que siguin potencials degradadors naturals de compostos xenobiòtics en el medi.

A diferència dels bacteris, el seu sistema enzimàtic ligninolític és extracel·lular, el que possibilita la degradació de substrats sense necessitat d'internalitzar-los, permetent l'oxidació de compostos poc solubles en aigua, i augmentant la seva tolerància a concentracions de contaminants relativament altes. Així, els enzims extracel·lulars, alhora que degraden el producte poden protegir el

fong. Un exemple d'aquesta propietat aplicada als bacteris i a *P. chrysosporium* es troba detallada a Barr i Aust (1994) per al cas de la cianida.

Una altra particularitat d'aquests fongs és que, en la majoria dels casos, no requereixen un període de pre-acondicionament a un determinat tòxic. Degut a què el sistema degradador s'indueix per la limitació de nutrients, una font limitada de C o N pot iniciar la degradació sense necessitat a una exposició de nivells alts d'un contaminant (Reddy i Mathew, 2001).

Des d'un punt de vista de la seva aplicació en indrets contaminats, els substrats ideals de creixement d'aquests fongs són materials lignocel·lulòsics, tals com panotxes de blat de moro, serradures, clofolles de cacahuet o alfals (Boyle, 1995). Aquests substrats tenen uns costos associats reduïts, el que es presenta com una avantatge afegida. El fet que també puguin créixer en medis líquids permet el seu ús en bioreactors, tot i que la seva aplicació en condicions de camp ha estat molt reduïda (Pointing, 2001).

Per últim, els fongs de podridura blanca creixen per extensió de les seves hifes, de manera que poden tenir un major accés als contaminants en el sòl respecte a altres microorganismes com els bacteris.

Tanmateix, una característica comú en els estudis de degradació de contaminants en el sòl amb fongs de podridura blanca són els nivells generalment baixos de transformació i mineralització comparats amb els estudis a escala laboratori amb cultius submergits en medi líquid (Pointing, 2001). Entre els factors que poden contribuir a aquest fet destaquen la biodisponibilitat del contaminant i el creixement del fong. La biodisponibilitat del contaminant és habitualment baixa en el sòl (Breedveld i Karlson 2000) degut a la poca solubilitat del contaminant en aigua i a la seva adsorció en les partícules del terreny (Meulenber *et al.*, 1997). Mitjançant l'addició de surfactants no iònics s'ha incrementat la biodisponibilitat i la degradació de PAH en el sòl per fongs de podridura blanca (Bogan *et al.*, 1999), i aquesta aplicació podria generalitzar-se per a aquest tipus de tractament.

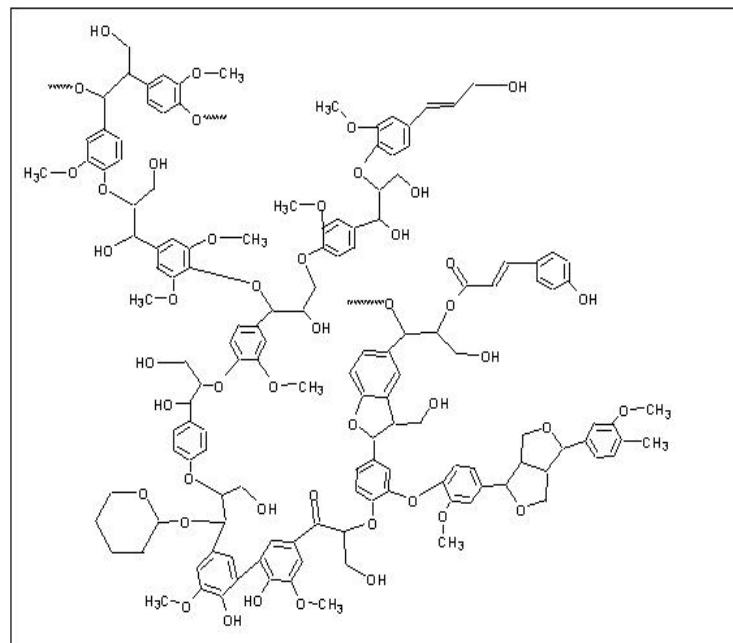
El creixement del fong es pot veure limitat per la seva interacció amb les poblacions microbianes autòctones. S'ha demostrat que els bacteris del sòl poden inhibir el creixement de *P. chrysosporium* sota condicions de laboratori, mentre que en altres estudis l'addició d'altres fongs de podridura blanca (*Pleurotus* sp.) al sòl ha provocat inhibició dels bacteris autòctons (Gramss *et al.*, 1999). Probablement, la coexistència dels inòculs de fong de podridura blanca i la microflora autòctona és desitjable, donat que s'ha demostrat que són capaces de mineralitzar PAH en forma de consorci (Gramss *et al.*, 1999). Altres factors que poden limitar el creixement dels fongs en el medi contaminat serien el dèficit en els seus requeriments nutricionals o les condicions poc favorables de pH o temperatura (Tekere *et al.*, 2001).

### **1.3.2. El sistema ligninolític dels fongs de podridura blanca**

La principal característica dels fongs de podridura blanca, i que els diferencia de la major part de microorganismes incloent els fongs de podridura marró i tova, és la seva habilitat de mineralitzar

tots els components de la lignina (Martínez *et al.*, 2005). S'ha descrit la capacitat ligninolítica d'altres microorganismes, com la d'alguns actinomicets, principalment *Streptomyces*, eubacteries i altres fongs de tipus ascomicet (com *Aspergillus* o *Fusarium*) tot i que la seva capacitat de degradació sembla limitada (Crawford i Crawford, 1988; Kirk i Farrell, 1987; Zimmermann, 1990).

La lignina és el segon compost orgànic renovable més abundant a la biosfera, superat només per la cel·lulosa (Orth i Tien, 1995). La lignina es troba a la paret cel·lular de la majoria de les plantes formant una matriu sobre les microfibrilles de cel·lulosa i hemicel·lulosa. Aquesta confereix una major rigidesa a les parets de les plantes, protegint les cèl·lules de l'ambient extern i aportant-li un cert caràcter hidrofòbic. Aquest polímer es sintetitza a partir de tres precursors alcohòlics diferents: *p*-cumaril, coniferil i alcohol sinapílic. La seva polimerització a l'atzar, després de la formació dels seus radicals corresponents, produeix una estructura totalment heterogènia i irregular, que acaba produint una macromolècula tridimensional, amorfa i insoluble en aigua (Figura 1.3) (Boominathan i Reddy, 1992).

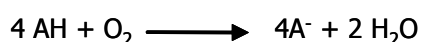


**Figura 1.3.** Possible estructura de la lignina

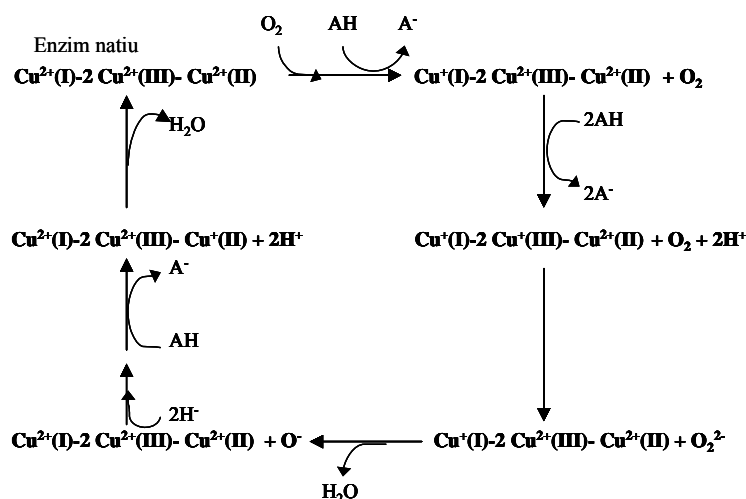
Els fongs de podridura blanca produeixen principalment dos tipus d'enzims amb activitat ligninolítica, les lacases i les peroxidases. Així com les lacases constitueixen un grup bastant homogeni en relació a la seva especificitat de substrat i a la seva acció, les peroxidases mostren una major variabilitat, distingint-se tres tipus diferents anomenats lignina peroxidasa (LiP), manganès peroxidasa (MnP) i peroxidasa versàtil (VP). Aquests enzims ligninolítics es caracteritzen per tenir una alta especificitat per l'acceptor electrònic i, degut a l'heterogeneïtat estructural de la lignina, una baixa especificitat pel donador electrònic. La principal diferència entre les lacases i les peroxidases es troba en la naturalesa de l'acceptor electrònic, ja que les lacases utilitzen O<sub>2</sub> mentre que les peroxidases usen una espècie parcialment més reduïda, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada espècie de fong té un patró determinat quant

a la seva producció enzimàtica. Així, es pot classificar els fongs de podridura blanca en cinc grups segons les diferents combinacions dels enzims produïts per cada un d'ells (Hatakka, 1994).

La lacasa (bencenodiol:oxigen oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) és l'enzim ligninolític que es coneix des de fa més temps i és el que es troba més àmpliament distribuït entre els fongs de podridura blanca. En general, la lacasa s'expressa en forma de diferents isoenzims, constitutius i/o induïbles. La lacasa conté quatre àtoms de coure per molècula, que es classifiquen en tres tipus (I, II i III) en funció de les seves propietats espectroscòpiques i paramagnètiques (Thurston, 1994; Yaroplov *et al.*, 1994). Aquests quatre àtoms de coure es troben directament implicats en el cicle catalític de l'enzim. A diferència d'altres oxidases, redueixen l'oxigen donant dos molècules d'aigua i catalitzen l'oxidació monoelectrònica i simultània de molts substrats orgànics. Així doncs, la reacció global pot simplificar-se d'aquesta manera:



El cicle catalític de la lacasa es troba en la Figura 1.4. En presència d'oxigen, el donador electrònic (AH) transfereix un electró al coure I, seguit d'una transferència posterior de dos electrons als coures de tipus III per oxidació de dos molècules de substrat. Els electrons acumulats són transferits a un àtom d'oxigen molecular, que donarà lloc a una molècula d'aigua a partir de la espècie  $\text{O}_2^{2-}$  i la formació d'un radical hidroxil dissociat ( $\text{O}^-$ ). A l'última etapa del cicle, s'oxida una altra molècula de substrat i s'acumula un electró en el coure II, que serà transferit al radical hidroxil amb la participació de dos protons del medi, donant lloc a la segona molècula d'aigua, tancant així el cicle enzimàtic. Mitjançant aquest mecanisme, les lacases generen radicals fenoxi a partir de compostos fenòlics. Aquests radicals són altament reactius i porten a noves oxidacions, ja siguin espontànies o per via enzimàtica (Thurston, 1994).



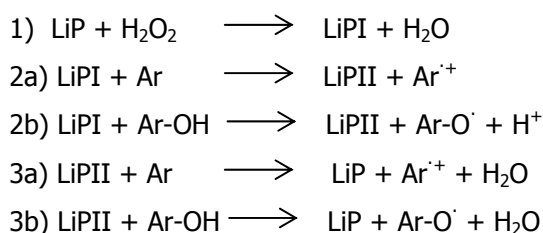
**Figura 1.4.** Esquema del cicle catalític de la lacasa

La lignina peroxidasa (diarilpropà:peròxid d'hidrogen oxidorreductasa, EC 1.11.1.14) va ser la primera peroxidasa descoberta implicada en la degradació de la lignina, concretament en cultius de *P.*



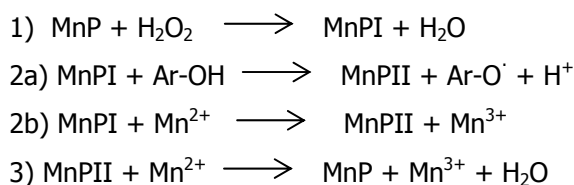
*chryso sporium* en condicions ligninolítiques (Tien i Kirk, 1983). Tot i que posteriorment es va descobrir en altres fongs, aquest enzim no és un dels components habituals dels sistemes ligninolítics dels fongs (Hatakka, 1994). La LiP és capaç d'oxidar estructures aromàtiques tant fenòliques com no fenòliques.

El seu cicle catalític consta de les següents etapes:



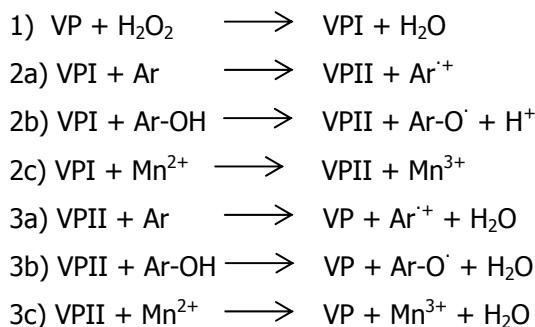
En l'estat inicial, el ferro present com a grup hemo en la peroxidasa es troba en el seu estat fèrric. Així, el peròxid d'hidrogen oxida per dos electrons l'enzim a un compost intermedi referit com a LiPI. A continuació, aquest capta un electró del compost aromàtic reduït, ja sigui fenòlic (Ar-OH) o no fenòlic (Ar), amb el que es produeix l'estat d'oxidació monovalent de l'enzim (LiPII) i el radical catió aromàtic (Ar<sup>·+</sup>) o fenoxil (Ar-O<sup>·</sup>) del substrat. Per últim, una oxidació addicional d'una altra molècula de substrat transforma la LiPII en l'estat original de l'enzim. El peròxid d'hidrogen que inicia el procés es format extracel·lularment pels fongs a partir dels enzims glixal oxidasa i superòxid dismutasa (Leonowicz *et al.*, 1999).

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



Respecte la lacasa, el Mn<sup>3+</sup> té l'avantatge de ser un agent oxidant difusible que pot arribar a unitat fenòliques de la lignina inaccessibles als enzims.

La peroxidasa versàtil, que encara no s'ha inclòs en les bases de dades de nomenclatura d'enzims, es va descobrir en cultius líquids de *Pleurotus eryngii* que contenien peptona com a font de nitrogen (Camarero *et al.*, 1999). Com el seu nom indica, aquest enzim presenta una major versatilitat catalítica pels donadors electrònics que la LiP i MnP, englobant l'especificitat de substrat d'aquestes. Així, d'una banda oxida compostos aromàtics fenòlics i no fenòlics com la LiP, i d'una altra oxida Mn<sup>2+</sup> com la MnP, fent que el seu cicle catalític estigui constituït per la suma dels cicles de la LiP i MnP descrits anteriorment (Gómez-Toribio, 2006):



Actualment també s'han descrit diferents enzims o sistemes enzimàtics en els fongs de podridura blanca que són capaços de reduir aldehids aromàtics i quinones (Muheim *et al.*, 1991; Constam *et al.*, 1991; Cameron i Aust, 2001; Gómez-Toribio *et al.*, 2001). La reducció dels aldehids aromàtics està catalitzada per un enzim intracel·lular anomenat aril-aldehid reductasa (aril-alcohol:NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa, EC 1.1.1.91). En la reducció de quinones pot participar un enzim extracel·lular, la cel·lobiosa deshidrogenasa (cel·lobiosa: acceptor 1-oxidorreductasa, EC 1.1.99.18) o una intracel·lular, la quinona reductasa (NAD(P)H:quinona-acceptor oxidorreductasa, E.C. 1.6.99.2). Addicionalment a aquests enzims, també s'ha descrit l'existència de sistemes redox transmembrana que poden reduir diferents compostos, entre els que es troba el xenobiòtic 2,4,6-trinitrotoluen (Stahl i Aust, 1993 a, b).

## 1.4. Normativa aplicada a la contaminació del medi per PCE i TCE

En aquest apartat es fa referència a la normativa bàsica vigent aplicable a un medi contaminat per TCE i PCE. Per a una major comprensió s'ha dividit entre els diferents compartiments en els que es poden trobar aquests contaminants, ja sigui el sòl, aigua o la seva emissió a l'atmosfera.

### 1.4.1. Contaminació aquàtica

La norma fonamental en matèria de protecció del medi aquàtic a Europa és la Directiva 2000/60/CE, mitjançant la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües, i a partir de la qual deriven un conjunt de normatives subsidiàries amb les que es fixen els límits màxims dels contaminants. Per tal de combatre la contaminació de les aigües aquesta Directiva estableix un llistat de 33 substàncies prioritàries que presenten un risc significatiu, entre les que no es troba present el TCE ni el PCE (Decisió 2455/2001/CE). Tanmateix, en l'article 17 ordena l'adopció de mesures específiques per prevenir i controlar la contaminació de les aigües subterrànies a través de la determinació d'uns criteris comuns. Sota aquest requeriment, s'ha elaborat una proposta de Directiva en matèria d'aigües subterrànies (CCE, 2003), en la que el TCE i PCE es troben en la llista mínima de substàncies per les que els Estats membres han d'establir uns límits de contaminació.

Quant a les aigües potables, una aigua destinada a consum humà haurà de tenir una concentració inferior a 10 µg/l per a la suma del PCE i TCE (Real Decret 140/2003 i Directiva 1998/83/CE). Als EEUU la concentració màxima tant per PCE com TCE a les aigües potables està fixada en 5 µg/l (EPA, 2002).

Per últim, a Catalunya la concentració màxima de TCE i PCE en aigües residuals no domèstiques que s'aboquin als sistemes públics de sanejament està limitada a 0,4 mg/l per a cada un d'aquests contaminants (Decret 130/2003).

### 1.4.2. Contaminació del sòl

Malgrat l'evident vulnerabilitat ecològica dels sòls, a la legislació europea i espanyola li han mancat instruments normatius per promoure la seva protecció. L'Agència Europea del Medi Ambient va estimar en 1999 que el nombre de terrenys contaminats a Europa occidental oscil·lava entre 300.000 i 1.500.000. La disparitat entre aquestes dades evidencia la manca d'acord per assolir una definició comuna de sòl contaminat així com la diferència de criteris a l'hora d'establir els nivells acceptables de risc, els objectius de protecció i els paràmetres d'exposició (CCE, 2002).

A Espanya, la Llei 10/1998 de Residus fa referència en els seus articles 27 i 28 a la realització d'un inventari de sòls contaminats que hauran de realitzar les Comunitats Autònomes i fixa les responsabilitats de la neteja d'un sòl declarat com a contaminat. No serà fins l'entrada en vigor del Real Decret 9/2005 quan es precisi la definició de sòl contaminat, s'estableixi la relació d'activitats susceptibles de contaminar el sòl i es regulin els nivells genèrics de referència per determinar si un sòl està contaminat o no. Aquests nivells genèrics de referència estan agrupats en relació a la seva perillositat per a la salut humana i pels ecosistemes, i es troben a la Taula 1.5.

**Taula 1.5.** Nivells genèrics de referència de TCE i PCE en els sòls per a la protecció de la salut humana i per a la protecció dels ecosistemes establerts al Real Decret 9/2005.

	Nivells genèrics de referència per a la protecció de la salut humana (mg/Kg pes sec) <sup>1</sup>			Nivells genèrics de referència per a la protecció dels ecosistemes (mg/Kg pes sec) <sup>2</sup>		
	Ús industrial <sup>3</sup>	Ús urbà <sup>4</sup>	Altres usos <sup>5</sup>	Organismes del sòl	Organismes aquàtics	Vertebrats terrestres
TCE	70	7	0,7	-	0,21	0,45
PCE	10	1	0,1	0,01	0,06	0,15

<sup>1</sup>Segons l'ús del sòl, <sup>2</sup>Segons el grups o grups d'organismes als que es vol protegir, <sup>3</sup>Sòl destinat al desenvolupament d'activitats industrials (excloent agràries i ramaderes), <sup>4</sup>Sòls destinats a construcció d'habitatges, oficines, equipaments i per activitats recreatives i esportives, <sup>5</sup>Sòls aptes per activitats agrícoles, forestals i ramaderes.

### 1.4.3. Contaminació atmosfèrica

Com s'ha mostrat a la Taula 1.2, l'ús de dissolvents en certes activitats industrials dona lloc a emissions de compostos orgànics a l'atmosfera, que poden ser nocives per la salut i produir

importants perjudicis als recursos naturals. Així, en el Real Decret 117/2003 es fixen uns valors límits d'emissió per les instal·lacions en les que es realitzen aquestes activitats.

Les frases de risc per aquests productes inclouen R: 40-52 i 53 (per al TCE) i R: 40-51 i 53 (per al PCE), segons dades del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (veure Fitxes internacionals de seguretat química al final del document). Així, tot i que per les activitats que habitualment s'usen aquests compostos (neteja en sec, neteja de superfícies metàl·liques, etc) el Real Decret estableix uns límits d'emissió particulars, per a determinades frases de risc aquests límits varien:

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

Donat que el TCE i PCE s'inclourien en ambdues situacions, el límit d'emissió dependrà del cabal màssic d'emissió de la instal·lació.

El Real Decret assenyala la possibilitat de reduir les emissions mitjançant l'ús de les millors tècniques disponibles o bé per altres vies com l'ús de productes alternatius no tòxics.

# Capítol 2

## Objectius generals

L'objectiu principal d'aquest treball de Tesi és establir les bases pel tractament d'efluents contaminats amb tricloroetilè (TCE) i percloroetilè (PCE) per fongs ligninolítics mitjançant un bioreactor. Per desenvolupar aquest objectiu general s'han tingut en compte els diferents nivells de coneixement actuals en aquesta àrea. En qualsevol cas, un objectiu comú per als dos contaminants ha estat el d'establir una metodologia experimental que garanteixi l'obtenció de resultats reproduïbles i la posada en marxa dels mètodes analítics adients.

En el cas del TCE s'havia descrit anteriorment la seva degradació/mineralització pel fong de podridura blanca *Phanerochaete chrysosporium*, però les vies de degradació suggerides havien estat dispars i no s'havien identificat altres subproductes apart del diòxid de carboni. En aquest cas, els objectius parcials fixats són:

- a) Determinar la capacitat de degradació de TCE per diferents fongs de podridura blanca i seleccionar la soca més eficient pels posteriors experiments.
- b) Estudiar les principals variables que poden influir en la degradació.
- c) Identificar els subproductes de degradació.
- d) Estudiar el sistema enzimàtic del fong implicat en la degradació.
- e) Suggestir una via de degradació.
- f) Realitzar una aproximació de les principals variables de disseny d'un bioreactor per al tractament d'aigües contaminades per TCE.

Pel PCE, en canvi, no hi havia cap estudi previ de degradació per fongs. Donat que fins fa relativament poc es considerava un producte no biodegradable en condicions aeròbies, l'objectiu inicial és testar la possibilitat de degradar PCE mitjançant la soca seleccionada anteriorment pel TCE. En el cas que el resultat sigui positiu, s'abordaran els objectius b), c), d), e) i f) establerts pel TCE per a aquest nou contaminant.



# Capítol 3

## Materials i mètodes generals

## 3.1. Microorganismes

S'ha treballat amb quatre fongs basidiomicets: *Trametes versicolor* (ATCC#42530), *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 (ATCC#34541), *Ganoderma lucidum* FP-58537-Sp (soca proporcionada pel Departament d'Agricultura dels Estats Units, USDA, Forest Products Laboratory, Madison, Wis.) i *Irpex lacteus* AX1 (soca aïllada en sòls agrícoles per la Long Term Ecological Research de la Michigan State University, East Lansing, MI). Totes les soques es mantenen a 25 °C en plaques Petri amb 20 g/l d'extracte de malta (Scharlau ref. 07-080-500) i 15 g/l d'agar bacteriològic i es resembren periòdicament.

## 3.2. Productes químics

### 3.2.1. Compostos clorats i subproductes de degradació

El tricloroetilè (99,5%), tetracloroetilè (99,9%), clorur de tricloroacetil (99%), cis-1,2-dicloroetilè (97%), i 2,2,2-tricloroetanol (99%) s'han obtingut de Sigma-Aldrich. El cloroform (estabilitzat amb etanol) és de Panreac. L'àcid fòrmic (98%) es va adquirir de Merck. L'àcid tricloroacètic en solució al 20% (p/v) va ser de Panreac. L'àcid dicloroacètic (98,5%) i l'anhidrid de cloral (98,5%) es van adquirir de Fluka. Al final del document es troben les Fitxes internacionals de seguretat química del tricloroetilè i tetracloroetilè.

Dels productes marcats isotòpicament, el TCE (1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 99%) es va obtenir de Cambridge Isotopes Laboratories i el PCE (1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 99%) d'Isotec.

### 3.2.2. Estudis d'inhibició del citocrom P450 i del sistema lacasa-mediadors

La lacasa purificada de *T. versicolor* es va adquirir de Fluka (referència 53739). Aquest enzim es troba liofilitzat i es conserva a -20 °C. Els mediadors utilitzats per potenciar l'activitat enzimàtica de la lacasa comercial han estat l'àcid volúric (AV) i l'hidrat 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT) de Fluka i el 3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenol (DMHAF) i la sal de diamoni de l'àcid 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfònic (ABTS) de Sigma-Aldrich.

L'inhibidor de citocrom P450 1-aminobenzotriazol (ABT) es va adquirir de Sigma-Aldrich.



## 3.3. Medis i condicions de cultiu

### 3.3.1. Medis de creixement

S'ha utilitzat quatre medis de creixement diferents pels fongs. Un cop preparats, s'han ajustat a pH 4,5 amb àcid nítric 1 M i s'han esterilitzat a l'autoclau durant 30 min a 121 °C.

- Medi d'extracte de malta (MEM). S'afegeixen 20 g/l d'extracte de malta en medi aquós.
- Medi de producció de lacasa (MD). Aquest medi s'emptra per a la inducció de la producció de lacasa durant el creixement de *T. versicolor*. A la Taula 3.1. es presenta la seva composició habitual. En aquells experiments on es modifiqui la quantitat de glucosa d'aquest medi s'especificarà convenientment, mantenint en tot cas la proporció amb la font de nitrogen establerta en el medi original.
- Medi de baix contingut en nitrogen (MBN). Medi de producció de MnP per *P. chrysosporium*. La seva composició es troba a la Taula 3.2.

**Taula 3.1.** Composició del medi MD

Glucosa	8 g/l
Tartrat d'amoni	3,3 g/l
Macronutrients	100 ml/l
Micronutrients	10 ml/l
Dimetil succínic	1,168 g/l

**Taula 3.2.** Composició del medi MBN

Glucosa	10 g/l
Tartrat d'amoni	0,22 g/l
Macronutrients	100 ml/l
Micronutrients	10 ml/l
Tiamina	0,1 g/l
Dimetil succínic	1,461 g/l

La composició de les solucions de micronutrients i macronutrients va ser descrita per Kirk *et al.*, 1986, i es descriu a la Taula 3.3. A diferència de la composició original, es van substituir els productes que contenen clors per altres anions com el sulfat, per tal que no interferissin en les analítiques en les que es quantifica el clorur provinent del trencament de la molècula dels productes clorats.

**Taula 3.3.** Composició dels macronutrients i micronutrients

Micronutrients	Concentració (g/l)	Macronutrients	Concentració (g/l)
Àcid nitril-tri-acètic	1,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,0	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,5	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,3
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1		
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01		
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,01		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01		
NaMoO <sub>4</sub>	0,01		

### 3.3.2. Producció de l'inòcul

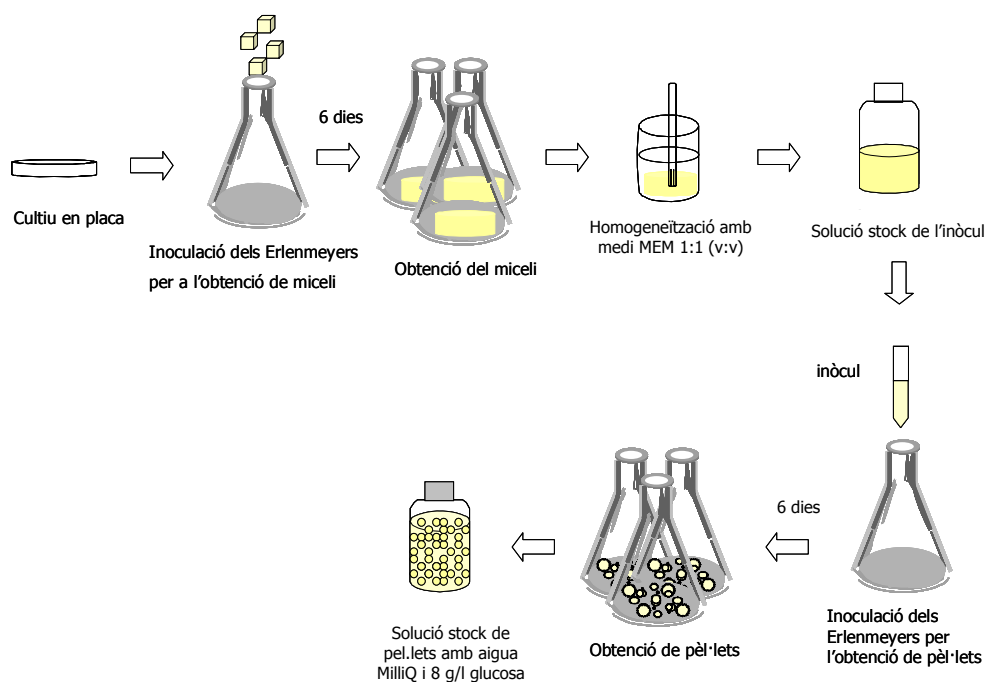
En els experiments de degradació els fongs s'han addicionat a partir de dos tipus diferents d'inòcul:

a) En forma de suspensió triturada. La metodologia per a l'obtenció d'aquesta suspensió ha estat diferent segons el fong:

- Per *T. versicolor*, *G. lucidum* i *I. lacteus*. De la zona de creixement del fong en una placa de manteniment s'extreuen quatre cubs d'agar de 1 cm<sup>2</sup> i es porten a 150 ml de medi MEM en un Erlenmeyer de 500 ml. Es mantenen a 25 °C i agitació orbital (135 rpm, r=25 mm) durant 6 dies. Transcorregut aquest temps es forma una densa capa de miceli que es separa del medi mitjançant un colador. Al miceli obtingut se li afegeix medi MEM en relació 1:1 (v/v) i es tritura amb un homogeneïtzador d'Ystral GmgH model X/10/20. La suspensió resultant es guarda a 4 °C o s'utilitza acte seguit per la formació de pèl·lets (Font *et al.*, 2003).
- Per *P. chrysosporium*. Per a aquest fong, l'obtenció de la suspensió triturada consta de dues etapes (Gabarrell, 1995):
  - Producció d'espores: es porta un cub d'agar de 1 cm<sup>2</sup> de la zona de creixement del fong a un Erlenmeyer que conté medi de manteniment i s'incuba a 25 °C durant quatre setmanes. La solució d'espores es prepara afegint aigua destil·lada esterilitzada i un nombre indefinit de boletes de vidre a l'Erlenmeyer, el qual s'agita per extreure les espores de l'agar. Posteriorment es filtra a través de cotó per eliminar les partícules de fong i agar. El recompte d'espores consisteix en un recompte visual al microscopi òptic mitjançant un portaobjectes Bürke (Brand) que té marcat un engraellat de cel·les de volum perfectament conegut (4×10<sup>-9</sup> l). Es pren sempre el mateix volum de mostra, una gota de la punta de la micropipeta de 100 µL, i es diposita sobre el portaobjectes. Es recobreix amb un cobreobjectes especial de forma que la pressió sigui sempre la mateixa, i es realitza el recompte amb l'ajuda del

microscopi òptic. El recompte d'espores es realitza en 24 d'aquests quadrats i es fa posteriorment la mitjana. Anteriorment s'havien practicat les dilucions adequades perquè el nombre d'espores per quadrat es trobés entre 10 i 20.

- o Producció de la suspensió triturada. La solució d'espores, de concentració coneguda, s'inocula en 50 ml de medi MBN en un flascó Fernbach de 3 litres, fins assolir una concentració aproximada de  $8 \times 10^6$  espores per flascó. Es porten a 37 °C durant 48h en condicions estàtiques i el cultiu obtingut es tritura de la mateixa manera que s'ha descrit per als altres fongs.
- b) En forma de pèl·lets. L'únic fong que s'ha addicionat en forma de pèl·lets en els experiments ha estat *T. versicolor*. Per a la seva obtenció s'afegeix 1 ml de la suspensió triturada del fong a 250 ml de medi MEM en Erlenmeyers de 1000 ml i es porten a un agitador orbital de 135 rpm durant 6 dies. Els pèl·lets formats es separen del medi i es renten amb aigua MilliQ en un colador. Posteriorment es ressuspenen en una solució de 8 g/l de glucosa (amb aigua MilliQ i esterilitzat prèviament a 121 °C durant 30 min) en relació. 1:1 (v/v) i es guarden a 4 °C o s'utilitzen a continuació per inocular les ampolles dels experiments (Blánquez *et al.*, 2004). A la Figura 3.1. es troba esquemàticament el procés seguit per a l'obtenció dels pèl·lets per *T. versicolor*.



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

## 3.4. Metodologia experimental

Tots els experiments s'han dut a terme en ampolles de sèrum (Wheaton) de 125 ml (161 ml reals) i s'han tancat amb taps de butil folrats de Tefló (Wheaton) i amb anelles d'alumini (Baxter

Scientific Products). Abans de cada experiment, cada ampolla s'ha esbandit amb aigua MilliQ per tal de minimitzar el seu contingut en clorurs i posteriorment s'han assecat a l'estufa.

A continuació es detallen els passos seguits en la preparació de les mostres, l'addició del producte clorat i la seva extracció per al seu posterior anàlisis.

### **3.4.1. Preparació de la mostra**

Distingirem entre els experiments realitzats amb fong (*in vivo*) i els realitzats amb el sistema lacasa-mediadors per a diferents productes clorats (*in vitro*):

#### **3.4.1.1. Experiments *in vivo***

A cada ampolla s'afegeix en primer lloc el medi i posteriorment el fong. En el cas de les ampolles en les que s'afegeix el fong en forma de suspensió triturada (ja sigui en condicions estàtiques o en agitació) el volum total ha estat de 10 ml (9 ml de medi i 1 ml de suspensió triturada del fong). Quan el fong s'afegeix en forma de pèl·lets, a cada ampolla s'afegeixen 10 ml de medi i 2 grams de pèl·lets humits. En aquest darrer cas, el volum de líquid afegit amb els pèl·lets es calcula a partir del pes sec inicial de la biomassa i les ampolles s'incuben en un agitador orbital a 135 rpm.

Un cop addicionats el fong i el medi, la mostra s'oxigena superficialment durant 1 min i a una pressió de 30 KPa mitjançant una pipeta Pasteur de vidre connectada a una ampolla d'oxigen pur per una mànega de silicona. L'oxigenació és superficial donat que el bombolleig del medi pot desactivar els enzims del fong. Un cop oxigenada, es tanca immediatament amb taps de butil teflonats (Wheaton, Ref WH224100-75) i anelles d'alumini. Aquesta fase s'ha realitzat en la cambra de fluxe laminar per tal de mantenir les condicions estèrils dels medis i els materials, que prèviament s'han autoclavat a 121 °C durant 30 min.

A les ampolles amb fong viu se les anomenarà "ampolles experimentals". Paral·lelament, per a cada experiment s'han inclòs també dos tipus d'ampolles de control addicionals: l'ampolla abiòtica i l'ampolla amb fong autoclavat. L'ampolla amb fong autoclavat fa referència a cultius que han crescut en les mateixes condicions que els de les ampolles experimentals durant 7 dies, moment en el que s'han autoclavat a 121 °C durant 30 min. L'ampolla abiòtica només conté medi líquid, sense fong. A cada experiment s'especificarà el número de replicats realitzats per a cada tractament.

#### **3.4.1.2. Experiments *in vitro***

Les concentracions utilitzades a les ampolles per cada mediador han estat d' 1mM per a l'HOBT i 0,8 mM per a l'AV, DMHAP i ABTS. La concentració final de lacasa en les ampolles ha estat aproximadament de 5000 UA/l. Les ampolles control només contenien aigua MilliQ. En aquests experiments s'ha afegit un volum total de 10 ml de medi líquid (9 ml de solució dels mediadors i 1 ml

amb la solució de lacasa). Després de l'addició de l'enzim, les ampolles s'han tancat amb taps de butil teflonats i anelles d'alumini i s'ha afegit immediatament el producte clorat. Les ampolles s'han capgirat i s'han incubat a 25 °C en un agitador orbital a 135 rpm fins la presa de mostres.

### 3.4.2. Addició del compost clorat

Alguns dels compostos clorats emprats, i especialment el TCE i PCE, són volàtils i la seva correcta addició és crucial per tal d'assolir resultats fiables. Es poden distingir dues etapes:

- Preparació de la solució mare. Es prepara una solució mare del producte clorat en etanol en una ampolla de sèrum de 20 ml (24 ml reals). El volum total de la solució mare és 24 ml per tal de no deixar fase gas en la que es pugui desplaçar el producte clorat. En primer lloc s'afegeix l'etanol i l'ampolla es tanca amb un tap de butil teflonat i amb una anella d'alumini. Posteriorment, el producte clorat s'afegeix mitjançant una xeringa teflonada amb vàlvula de tancament (Serie A-2, Vici) a través del tap i es capgira l'ampolla immediatament, de manera que el líquid estigui en contacte amb el forat i es disminueixin les possibles pèrdues de producte. La concentració de la solució mare ha de ser aquella amb la que l'addició de 20 µl a les ampolles dels experiments s'assoleixi la concentració desitjada. Això és així donat que volums superiors a 20 µl d'etanol provocaven una disminució del pes sec en *T. versicolor* i *P. chrysosporium*. Aquesta fase es realitza en la cambra d'extracció de gasos i amb guants (EPI).
- Addició a les ampolles dels experiments. Prèviament, la superfície dels taps tant de la solució mare com de les ampolles dels experiments es passen per un cotó amarat d'etanol al 70%. A cada ampolla s'afegeixen 20 µl de la solució mare mitjançant una xeringa teflonada de 25 µl i a través dels taps, en la cambra de flux laminar i utilitzant guants (EPI). Un cop addicionat, les ampolles es capgiren per tal de minimitzar les pèrdues a través del possible forat, es col·loquen en una caixa i es porten a un agitador orbital a 135 rpm durant 30 minuts per tal de solubilitzar el producte clorat. Passat aquest temps, s'extreu les mostres de temps zero i la resta s'incuben segons les condicions de cada experiment, però sempre mantenint les ampolles capgirades.

### 3.4.3. Extracció de la mostra

Per a les analítiques rutinàries es realitzen dos tipus d'extraccions diferents. En ambdós casos, es realitza a la cambra d'extracció de gasos i amb guants (EPI).

- Per anàlisis dels productes clorats mitjançant la tècnica d'espai de cap (o *headspace*) estàtica i cromatografia de gasos. Independentment de la temperatura d'incubació dels cultius, les mostres es deixen equilibrar a 25 °C abans de la seva extracció. Amb una xeringa de plàstic de 1 ml s'extreu 1 ml de la mostra líquida de les ampolles experimentals a través del tap de butil teflonat i mantenint l'ampolla capgirada. Aquest volum es porta a uns vials de vidre de

10 ml (LaPhaPak, Ref 20090795), on s'ha afegit prèviament 4 ml d'una solució d'azida sòdica a l' 1% (p/v) per tal d'aturar l'activitat biològica. El volum de mostra s'afegeix mantenint en contacte l'agulla amb la solució d'azida sòdica. Immediatament després de l'addició, es tanca amb un segell d'alumini amb septa forrat de tefló (LaPhaPak, Ref 20030059). Les mostres es conserven a 4 °C fins el moment de la seva anàlisi, fins a un màxim de 5 dies.

- Extracció de la mostra líquida pels anàlisis de glucosa, clorurs, lacasa, pH i ressonància magnètica nuclear. De manera anàloga al punt anterior, s'extreu mostra líquida amb una xeringa de plàstic (poden ser volums superiors a 1 ml) i es filtren amb un filtre Millipore de 0,45 µm. En el cas que la mostra contingui massa biomassa, prèviament al filtrat es centrifuga durant 3 minuts a 6000 rpm amb una centrifuga Heraeus Sepatech, model Megafuge 1.0.

### 3.4.4. Càlcul de la degradació del producte clorat

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

- Balanços màssics. La massa total i la concentració en el medi líquid del producte clorat s'han calculat considerant els equilibris entre la fase líquida i gas. A la Taula 3.4 es troben els valors de les constants de Henry emprades pels principals productes clorats utilitzats.

**Taula 3.4.** Constants de Henry de diferents productes clorats a 24,8 °C (Gossett, 1987)

	H <sub>c</sub>
Percloroetilè	0,723
Tricloroetilè	0,392
cis-1,2- dicloroetilè	0,167
Cloroform	0,150

La massa total de producte clorat a l'ampolla (C<sub>T</sub>) es calcula sumant la massa obtinguda en la fase gas (C<sub>gas</sub>) i en la fase líquida (C<sub>líquida</sub>). La massa de producte en la fase líquida s'ha calculat a partir de la concentració obtinguda en la mostra extreta per a l'anàlisi mitjançant la tècnica d'espai de cap estàtica, considerant el factor de dilució de la mostra en el vial amb azida sòdica (1:5), i multiplicant el valor de la concentració pel volum de la mostra líquida a les ampolles. D'altra banda, la massa de producte en la fase gas s'obté en primer lloc calculant la seva concentració mitjançant l'equació de Henry:

$$C_{\text{gas}} = C_{\text{líquida}} \cdot H_c$$

on el valor de C<sub>líquida</sub> s'ha obtingut en els càlculs anteriors i H<sub>c</sub> és un valor tabulat (Taula 3.4); i posteriorment s'ha multiplicat el valor de C<sub>gas</sub> pel volum en la fase gas de l'ampolla experimental.

- Càlcul del percentatge de degradació. S'ha calculat, per cada interval prefixat, comparant la massa total de producte clorat en les ampolles experimentals respecte al de les abiòtiques.

Tots els valors de degradació s'han corregit pels valors d'adsorció a partir de les ampolles amb fong autoclavades. L'equació que s'ha aplicat és:

$$\% \text{ degradació} = \left( \frac{C_{T \text{ fong autoclavat}} - C_{T \text{ fong viu}}}{C_{T \text{ abiòtica}}} \right) \cdot 100$$

Tots els experiments s'han realitzat en discontinu (batch), així que les ampolles extretes en cada punt s'han sacrificat després de la seva anàlisi.

## 3.5. Mètodes analítics

### 3.5.1. Determinació de la concentració de glucosa

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

### 3.5.2. Determinació de la concentració de producte clorat

Distingirem entre el procediment analític per determinar la concentració dels productes clorats en les ampolles dels experiments i la preparació dels patrons per realitzar el calibrat.

#### 3.5.2.1. Procediment analític

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

Els vials de 10 ml que contenen la mostra a analitzar (veure apartat 3.4.3) es col·loquen en el carrusel de l'automostrejador de l'espai de cap (Agilent 7964 Headspace Sampler) i s'escalfen a 85 °C durant 50 minuts. Després d'aquest temps, 1 ml de la fase gas del vial s'injecta automàticament a un cromatògraf de gasos Agilent 6890N equipat amb una columna Agilent HP-5 (30x0,32x0,25) i un detector per ionització de flama (FID).

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

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

### 3.5.2.2. Realització del calibratge

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

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

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

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

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

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

Aquests vials de 10 ml s'analitzaran de forma rutinària mitjançant la tècnica de *headspace* estàtica i cromatografia de gasos (apartat 3.5.2.1). Donat que en l'extracció de les mostres experimentals es produeix una dilució 1:5 en el vial que conté l'azida sòdica (apartat 3.4.3), a la Taula 3.5 s'especifica quina és la concentració real en les ampolles experimentals per a cada solució patró. Com es pot observar, el rang del calibratge ha estat de 0-25 mg/l en el medi líquid de l'ampolla experimental.

Per a la recta de calibratge del cloroform i de l'àcid tricloroacètic s'ha procedit de manera anàloga a la del TCE i PCE, però a partir dels productes comercials descrits en l'apartat 3.2.1.



A l'Annex es troben les rectes de calibratge realitzades pel TCE, PCE, cloroform i àcid tricloroacètic amb les equacions corresponents.

### 3.5.3. Anàlisis per ressonància magnètica nuclear

Aquests anàlisis es van dur a terme al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els espectres de ressonància magnètica nuclear (RMN) es van obtenir en un espectròmetre BRUKER AV500 equipat amb una criosonda d'alta sensibilitat TCI i operant a 100,62 MHz per al  $^{13}\text{C}$ . La mostra es va preparar afegint 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (com a font de deuteri per fixar l'homogeneïtat dins el imant) en 500  $\mu\text{L}$  de la mostra aquosa a analitzar. L'espectre de  $^{13}\text{C}$  desacoblat es va obtenir mitjançant el mètode "inverse-gated" amb un temps de relaxació de 5 segons. Les dades van ser processades utilitzant una funció exponencial (amplada de línia de 2 Hz) prèviament a una Transformació de Fourier.

### 3.5.4. Anàlisis per cromatografia de gasos i espectrometria de masses de relació isotòpica

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

### 3.5.5. Determinació de l'activitat enzimàtica lacasa

L'activitat de lacasa es mesura utilitzant una versió modificada (Kaal *et al.*, 1993) del mètode per a la determinació de manganès peroxidasa de Paszczyński *et al.*, 1988.

El medi de reacció conté: 200  $\mu\text{L}$  de malonat sòdic 250 mM a pH 4,5, 50  $\mu\text{L}$  de 2,6-dimetoxifenol (DMP) 20 mM i 600  $\mu\text{L}$  de mostra. El DMP és oxidat per la lacasa inclús en absència de cofactors. Es mesura durant dos minuts la variació de l'absorbància a 468 nm i 30  $^{\circ}\text{C}$  en un espectrofotòmetre Varian Cary 3 UV/Vis equipat amb termòstat. Les unitats d'activitat (UA) es defineixen com el número de micromols de DMP oxidats per minut ( $\mu\text{mol DMP}/\text{min}$ ). El coeficient d'extinció del DMP és de 10000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### **3.5.6. Determinació de la concentració de clorurs en el medi**

La concentració de clorurs alliberats en el medi líquid durant la degradació dels productes clorats s'ha mesurat amb un cromatògraf iònic (Dionex ICS-1000) equipat amb una columna aniónica IonPack AS9-HC (Dionex). El volum d'injecció és de 25 µl i es realitza manualment. La fase mòbil és carbonat de sodi a una concentració de 9 mmol/l amb un cabal de 1 ml/min. El pic del clorur surt a un temps de retenció de 6,773 minuts.

A l'Annex es troba la recta de calibratge pels clorurs i la seva equació corresponent.

### **3.5.7. Determinació de la biomassa**

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

### **3.5.8. Determinació del pH**

La mesura de pH en les ampolles experimentals s'ha realitzat de manera qualitativa mitjançant paper indicador universal (rang 1-14).

# Capítol 4

## Posada a punt de la metodologia

### Resum

En aquest capítol es recullen breument els principals problemes metodològics que s'han abordat durant la realització de la part experimental d'aquesta Tesi degut a les característiques físico-químiques dels hidrocarburs alifàtics clorats amb els que s'ha treballat, i es proposa una metodologia de treball.

## 4.1. Introducció

Tradicionalment en el nostre grup de recerca (Biodegradació de contaminants industrials i valorització de residus) s'havia estudiat la biodegradació d'aigües residuals provinents de les almàsseres, de lleixius negres, tints i més recentment, hidrocarburs aromàtics policíclics per fongs ligninolítics. A diferència d'aquests compostos, els hidrocarburs alifàtics clorats com el TCE i PCE presenten una elevada volatilitat i altres característiques físico-químiques que condicionen el disseny dels experiments. Donat que aquest era el primer treball de recerca amb aquests productes es va haver de posar a punt la identificació i quantificació d'aquests productes per la tècnica de *headspace* estàtica i cromatografia de gasos i l'anàlisi dels clorurs per cromatografia iònica. Alhora, una part important del temps es va dedicar a l'obtenció d'una metodologia experimental apropiada per a l'obtenció de resultats acurats ja que els experiments inicials no donaven resultats reproduïbles.

L'aprenentatge d'aquesta metodologia es va realitzar en els laboratoris del departament de Microbiologia i Genètica Molecular a càrrec del Dr. C.A. Reddy i al departament d'Enginyeria Civil i Ambiental amb la col·laboració del Dr. Michael Dybas de la Michigan State University, a East Lansing (Estats Units).

Tot i que en l'apartat anterior s'ha descrit amb detall la metodologia utilitzada, hem considerat important incloure un capítol en el que descriure els principals inconvenients metodològics que hem hagut de resoldre en la part experimental d'aquesta Tesi i que no s'han vist reflectits al capítol de Materials i mètodes generals.

## 4.2. Característiques del bioreactor

Per l'elevada volatilitat del TCE i PCE quedava clar que el bioreactor havia d'estar hermèticament tancat, per això es va decidir realitzar els experiments en ampolles de sèrum i segellades amb anelles d'alumini. Un dels factors clau per assolir uns valors reproduïbles varen ser els taps de butil folrats amb Tefló, donat que aquest material no permet l'adsorció del TCE i PCE en el tap. Les diferències en els resultats obtinguts usant taps sense teflonar posaven en evidència la importància d'aquest fet.

Posteriorment es varen testar uns taps teflonats amb vàlvules de tancament (Vici), com els que es mostren a la Figura 4.1. Aquests taps tenien l'avantatge aparent de posseir una vàlvula que permetia la injecció de glucosa i oxigen, per exemple, en el cas que es volguessin realitzar experiments en continu en una mateixa ampolla de sèrum. Malauradament, els resultats no varen ser positius. Durant la incubació de les mostres la pressió a l'interior de l'ampolla per la generació de diòxid de carboni augmentava, de manera que a l'obrir la vàlvula per introduir la xeringa inevitablement hi havia pèrdues de la fase gas. D'altra banda, quan es capgirava l'ampolla per mantenir el líquid en contacte amb l'orifici i minimitzar les pèrdues de gas, es perdia líquid a l'obrir la

vàlvula. Tots aquests problemes, en canvi, no apareixien amb l'ús dels taps de butil folrats amb Tefló clàssics, ja que durant la injecció el butil pressionava l'agulla no permetent la sortida de gas o líquid.



**Figura 4.1.** Taps folrats amb tefló, (A) senzills i (B) amb vàlvules de tancament

### 4.3. Metodologia

Un punt important va ser la preparació de la solució mare del TCE i PCE. Evidentment no es podia realitzar amb el clàssic matràs aforat per la seva volatilitat i es va realitzar amb ampolles de sèrum de volum més reduït que les dels experiments i tancades amb taps teflonats i anelles d'alumini. Un punt crític va ser la seva preparació, degut a la baixa solubilitat en aigua del TCE i PCE i a la formació de micel·les en el fons de les ampolles per la seva densitat superior a la de l'aigua. Per tal de resoldre aquesta qüestió, es van realitzar diferents experiments preparant la solució mare amb aigua, i amb aigua amb diferents concentracions d'etanol, per veure si el TCE/PCE es dissolia, però els resultats no van ser positius en les condicions testades. Quan s'assolia una dissolució completa dels productes, la baixa concentració de la solució mare feia que s'haguessin d'afegir volums relativament grans a les ampolles dels experiments, fent que la relació líquid-gas a la solució mare es modifiqués substancialment portant a una variació en la concentració afegida a les diferents ampolles.

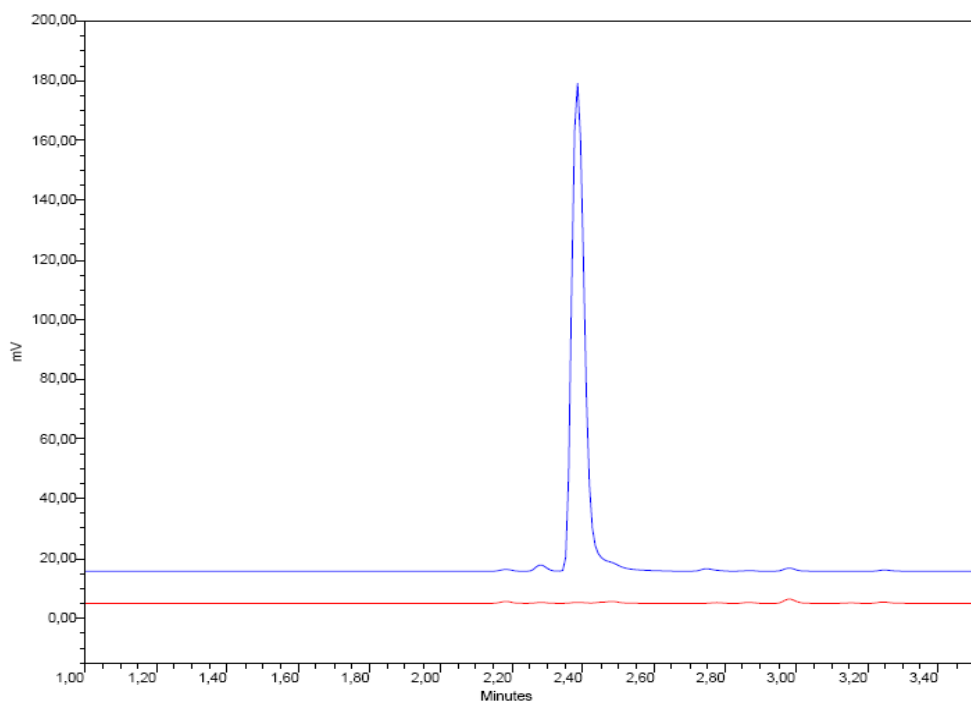
Per tant, es va decidir preparar la solució mare només amb etanol ja que el TCE i PCE són completament solubles en aquest dissolvent. Tanmateix, calia comprovar si l'etanol podia ser tòxic pels fongs, per tal d'establir el volum que calia afegir a les ampolles. Així, es van afegir 20 µL d'etanol a ampolles on s'havia afegit 9 ml de medi MEM i 1 ml de suspensió triturada dels fongs *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* i *Ganoderma lucidum*. Després de 7 dies a 25 °C, es van calcular els pesos secs de la biomassa per avaluar si provocava una inhibició en el seu creixement. Les dades es troben a la Taula 4.1.

**Taula 4.1.** Càlcul dels pesos secs de *T. versicolor*, *G. lucidum* i *P. chrysosporium* per evaluar la seva inhibició en el creixement per l'addició de 20 µL d'etanol<sup>1</sup>.

Fong	Pes sec control (mg)	Pes sec cultius amb 20 µL etanol (mg)
<i>P. chrysosporium</i>	16,8 ± 0,4	18,2 ± 0,5
<i>T. versicolor</i>	46,6 ± 1,3	42,7 ± 6,3
<i>G. lucidum</i>	48,9 ± 4,1	38,9 ± 5,6

<sup>1</sup> Les mitjanes s'han realitzat a partir de triplicats per cada tractament

Com s'observa, excepte en el cas de *G. lucidum* on hi ha una lleugera inhibició, la resta de fongs no mostren una disminució del seu pes sec. D'aquesta manera, es va decidir afegir aquest volum a les ampolles experimentals. Addicionalment, existia l'avantatge que en ser una quantitat tant reduïda la variació en el volum de la solució mare durant la seva addició era menyspreable, la qual cosa no afecta substancialment l'equilibri líquid-gas i ens asseguràvem que estàvem afegint la mateixa concentració a totes les ampolles. També es va observar que els fongs metabolitzaven ràpidament l'etanol com a font de carboni quan la glucosa s'exhauria del medi, a partir de la desaparició del pic d'etanol en els anàlisis de cromatografia de gasos per a la determinació de la concentració del productes clorats (veure apartat 3.5.2.1). A tall d'exemple, a la Figura 4.2 es troba un cromatograma extret d'un experiment de degradació de TCE per *T. versicolor*, on el pic d'etanol és visible el dia 0 i el dia 4 ha desaparegut completament. El mateix resultat es produeix en tots els fongs testats i en l'addició tant de TCE com de PCE.

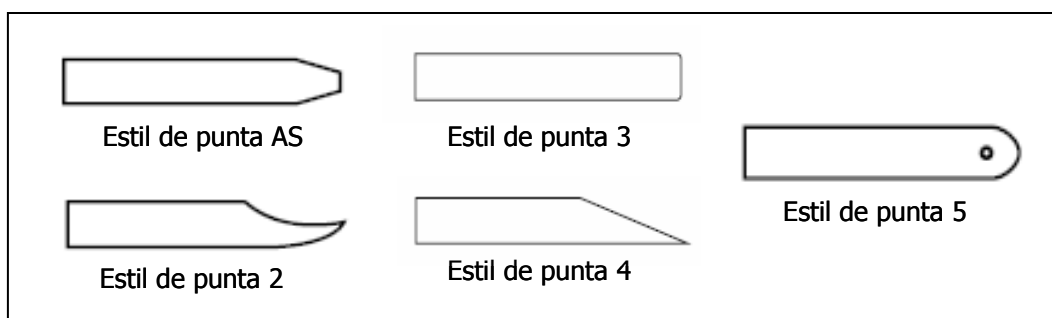


**Figura 4.2.** Pic d'etanol extret del cromatograma d'un cultiu de *T. versicolor* amb 15 ppm de TCE el dia 0 (—) i el 4 (—) d'incubació, on s'observa com l'etanol és metabolitzat pel fong.

Per afegir aquest volum tant reduït a les ampolles dels experiments, calia que la xeringa utilitzada fos molt precisa i tingués una elevada estanquitat en el seu interior. Aquestes característiques les acomplien les xeringues teflonades amb vàlvula de Vici (Serie A-2). Aquestes xeringues permeten emmagatzemar la mostra a l'interior de la xeringa mitjançant el seu mecanisme de vàlvules, i el fet que l'èmbol sigui teflonat evita la seva volatilització. En relació a la seva precisió, es va realitzar un calibrat de la xeringa de 25  $\mu$ l, pesant a la balança analítica volums de 20  $\mu$ l d'aigua destil·lada. La mitjana obtinguda considerant totes les mesures ( $n=15$ ) va ser de  $19,6 \pm 0,2$   $\mu$ g, que es

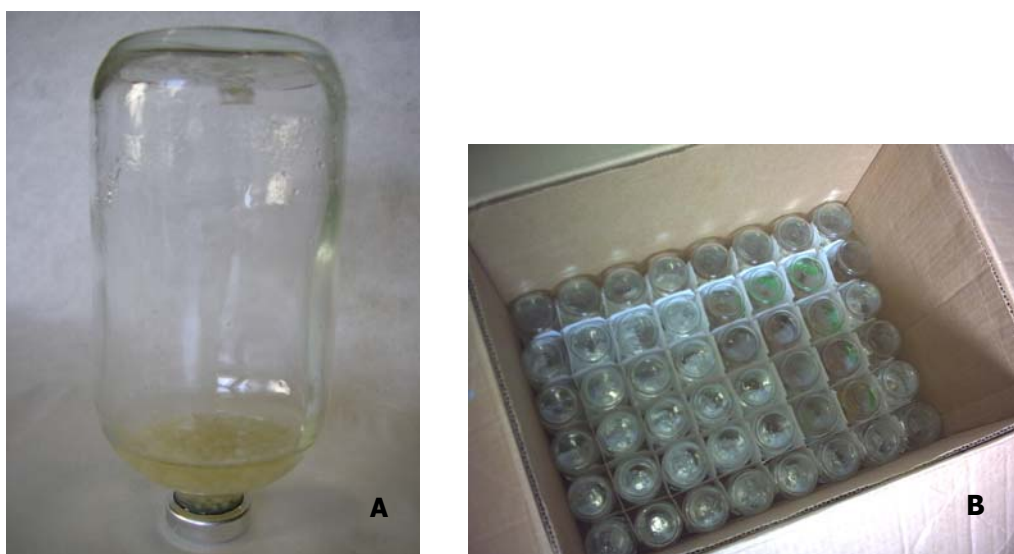
va considerar molt consistent. Una altra avantatge que presentaven aquestes xeringues era l'ampli ventall de volums disponibles (25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{L}$  i 1, 2, 5 i 10 ml).

Un cop escollida la xeringa, s'havia d'escollir l'agulla adient per minimitzar el dany del tap teflonat quan s'afegia el volum de la solució mare. Com es pot veure a la Figura 4.3 existien diferents models d'agulla. Es va escollir l'estil de punta número 5, donat que la seva forma arrodonida penetrava a través del tap sense trencar-lo. En canvi la número 2, per exemple, arrencava butil del tap durant l'extracció de l'agulla degut a la seva terminació en forma de ganxo.



**Figura 4.3.** Estils de punta d'agulles

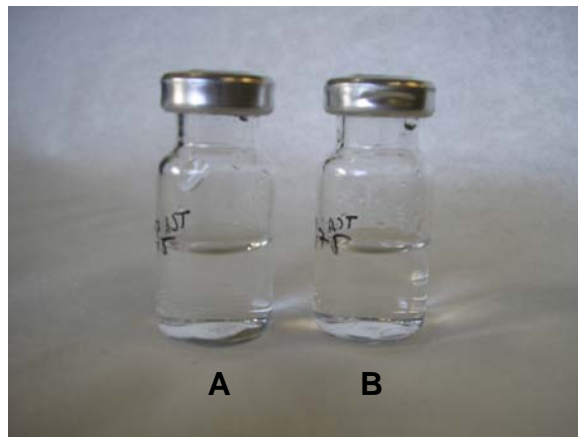
Un cop afegit el producte clorat a través del tap, les mostres s'incuben capgirant les ampolles de manera que el líquid del medi estigui en contacte amb l'orifici generat per l'agulla (veure Figura 4.4A) i s'emporten capgirades en una caixa (4.4B). D'aquesta manera, es minimitzen les possibles pèrdues per volatilització.



**Figura 4.4.** A) Cultiu de *T. versicolor* inoculat en ampolla de sèrum capgirada. B) Caixa on s'incuben les ampolles dels experiments

Tal i com es detalla a Materials i mètodes, l'extracció de la mostra per l'anàlisi mitjançant la tècnica d'espai en cap estàtica es realitza amb una xeringa de plàstic de 1 mL. Aquesta extracció no pot realitzar-se amb la xeringa teflonada perquè la neteja dels fragments de miceli que resten a

l'interior és molt difícil pel tipus de sortida de la xeringa i pot portar a una pèrdua de precisió posterior. Tanmateix, els resultats obtinguts amb aquestes xeringues de plàstic són satisfactoris. Es van realitzar diferents proves per discernir quina era la millor manera d'afegir el volum de la mostra líquida extreta al vial de 10 ml que contenia la solució d'azida sòdica per a l'anàlisi per *headspace* i cromatografia de gasos: afegint el volum de mostra sobre la solució, introduint la mostra a través de les parets del vial o mantenint en contacte l'agulla amb la solució. D'aquestes metodologies, la darrera era amb la que s'obtenia uns resultats més consistents, assolint uns resultats poc reproduïbles en la resta dels casos degut a la volatilització del producte. Una darrera qüestió era el segellament d'aquests vials de 10 ml que contenen la mostra. Durant l'anàlisi per *headspace* i cromatografia de gasos aquests s'escalfen a 85 °C durant 50 minuts, desplaçant el producte clorat a la fase gas. Per aquest motiu, calia ajustar amb precisió el segellador, ja que si quedava poc ajustat hi havia pèrdues de productes durant l'escalfament. D'altra banda, si s'ajustava excessivament l'anella es deformava generant vies preferents on la fase gas podia volatilitzar-se del vial (veure Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Vials de 10 ml amb mostra: A) ben segellat, B) amb una osca a l'anella

Per últim, tal i com s'ha esmentat en l'apartat 3.5.2.2, en la realització dels calibratges dels productes més volàtils els vials s'han mantingut a la nevera i posteriorment en gel per tal de desplaçar l'equilibri a la fase líquida i minimitzar les pèrdues per volatilització.



# Capítol 5

## Degradació de TCE per fongs ligninolítics

Part dels resultats d'aquest capítol han estat enviats per a la seva publicació en les següents revistes:

- Marco-Urrea, E., X. Gabarrell, G. Caminal, T. Vicent i C. A. Reddy. Aerobic degradation of trichloroethylene by white-rot fungi and its ability to degrade a mixture with tetrachloroethylene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Submitted.
- Marco-Urrea, E., T. Parella, X. Gabarrell, G. Caminal, T. Vicent i C. A. Reddy. Mechanistics of trichloroethylene mineralization by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res.* Submitted.

### Resum

En aquest capítol es demostra la capacitat de *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* i *Ganoderma lucidum* per degradar aeròbiament TCE. *T. versicolor* és el fong amb el que s'assoleixen percentatges de degradació més elevats, assolint valors propers o superiors al 80% per al rang de concentracions de 2-10 ppm, per la qual cosa ha estat el fong d'elecció pels experiments posteriors. S'ha observat que el TCE és un inductor de la lacasa, incrementant la seva producció amb la concentració del contaminant i mantenint activitats molt elevades en tots els casos. Per a la seva aplicació en bioreactor s'ha escollit l'addició del fong en forma de pèl·let, amb la que s'assoleix la degradació de TCE més ràpidament i presenta millors avantatges de manipulació. A major concentració de glucosa inicial i amb l'addició d'oxigen durant la incubació s'ha assolit un increment en la decloració de TCE mantenint el percentatge de degradació en cultius de *T. versicolor* en forma de pèl·lets. S'han identificat com a subproductes de degradació el diòxid de carboni i el 2,2,2-tricloroetanol. Els balanços de clorurs realitzats en tots els experiments indiquen que el 50% del TCE degradat passaria a CO<sub>2</sub> i l'altra meitat a 2,2,2-tricloroetanol. Els experiments d'inhibició suggereixen que el citocrom P450 podria estar implicat en la primera fase de la degradació de TCE, de manera similar al que succeeix en els mamífers. El cloral és probablement un intermediari en la degradació de TCE, donat que és degradat per *T. versicolor* generant els mateixos subproductes de degradació que amb el TCE.

## 5.1. Introducció

### 5.1.1. Descripció dels fongs ligninolítics *T. versicolor*, *G. lucidum*, *P. chrysosporium* i *I. lacteus*

Des del descobriment de les aplicacions dels enzims ligninolítics als anys 80, s'ha progressat molt en l'estudi dels fongs de podridura blanca i el seu sistema enzimàtic.

El primer fong en el que es van descobrir els enzims extracel·lulars LiP i MnP i en el que s'ha centrat gran part de la recerca sobre aquesta família de fongs ha estat *Phanerochaete chrysosporium*. Aquest fong presenta una elevada especificitat en la degradació de la lignina i també va ser el primer en demostrar la capacitat dels fongs de podridura blanca en mineralitzar un ampli ventall de contaminants (Bumpus *et al.*, 1985). A diferència de la resta de fongs del seu grup, a la natura adopta una aparença similar a la d'una teranyina i no adquireix forma de bolet, el que fa que sovint passi desapercebut (Figura 5.1A). Una altra característica particular és la seva elevada taxa de creixement a temperatures anormalment elevades (el seu òptim es situa als 37 °C). Les peroxidases extracel·lulars de *P. chrysosporium* es produeixen durant el metabolisme secundari, induïdes per la limitació d'un nutrient. La producció de LiP i MnP es troba completament suprimida en excés de C i N en el medi. En medi amb baix contingut en nitrogen, s'assoleix en primer lloc un pic de MnP i posteriorment apareix la LiP (Reddy, 1993). L'activació del sistema ligninolític també està influenciat per altres factors relacionats amb les condicions de cultiu com els nivells de Mn (II), l'agitació, l'oxigen, el substrat de creixement o el tampó usat en el medi. La producció de lacasa per *P. chrysosporium* es va demostrar 10 anys després dels de la LiP i MnP quan el fong creix en cel·lulosa (Srinivasan *et al.*, 1995). Tanmateix, l'aparició de la lacasa ja havia estat detectada prèviament en cultius de *P. chrysosporium* durant el tractament de lleixius negres de paperera (Gabarrell, 1995).

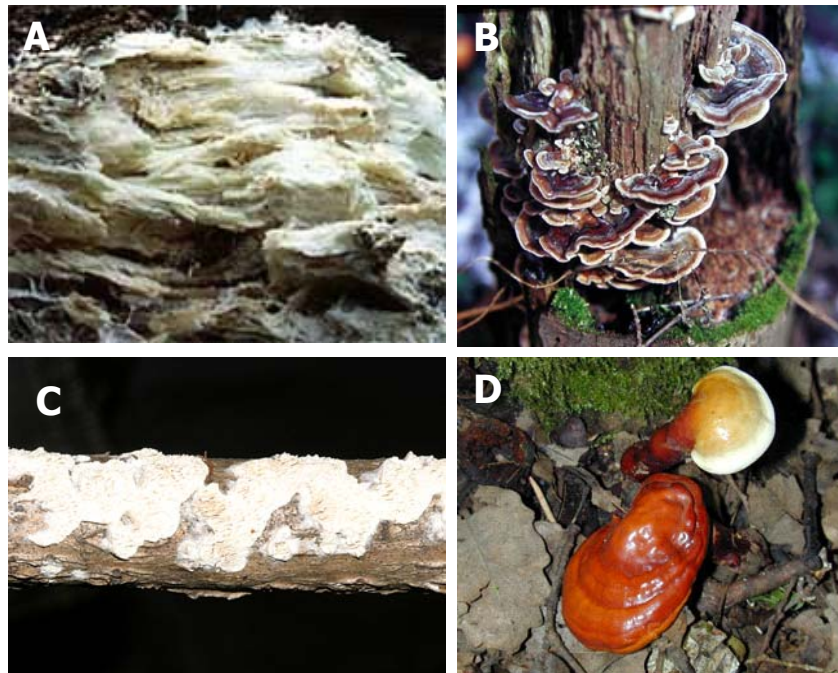
D'altra banda, *Trametes versicolor* és, juntament amb *P. chrysosporium*, un dels fongs de podridura blanca més emprats en programes de bioremediació i en altres aplicacions biotecnològiques. Aquest fong també és conegut com a fong de la cua de gall d'indi degut als colors que recobreixen la seva superfície, que passen d'una tonalitat fosca a marrons suaus, alternant-se amb altres bandes de color blau, taronja, grana i d'altres (veure Figura 5.1B). Es troba especialment en arbres planifolis i caducifolis, sobretot en fagedes, rouredes i alzinars (Limona, 1991). *T. versicolor* es troba amb més prominència durant la tardor i hivern, que és quan alliberen les seves espores (Gerhardt *et al.*, 2000) tot i que no s'ha descrit que ho faci en condicions de laboratori. Una característica particular d'aquest fong és la de ser un dels primers colonitzadors de la fusta i el de ser molt competitiu en contacte amb altres espècies de fongs. Tanmateix, a llarg termini hi ha altres fongs amb més capacitat de supervivència com els gèneres *Ganoderma*, *Fomes* i *Inontus* que tenen una major tolerància que *T. versicolor* a l'estrès fisiològic. Quant al seu sistema enzimàtic, *T. versicolor* mostra una forta estimulació del seu sistema ligninolític en medis on s'ha limitat la font de nitrogen

(Leatham i Kirk, 1983). Produeix lacasa de forma induïda o constitutiva tenint en ambdós casos una activitat catalítica similar (Sariaslani, 1989). Tot i que la lacasa és l'enzim produït de manera majoritària per aquest fong, també produeix LiP en medis limitats en nitrogen, i MnP (Hatakka, 1994). De la mateixa manera que *P. chrysosporium*, s'ha demostrat la seva capacitat per degradar un ampli espectre de productes xenobiòtics.

Tot i que la major part dels articles publicats sobre biodegradació amb fongs de podridura blanca fan referència als dos fongs anteriors, en els darrers anys hi ha hagut un augment en la recerca de noves espècies amb un elevat potencial d'aplicació futura per la seva elevada taxa de creixement i nivell de producció enzimàtica. Entre aquests fongs, trobem *Irpex lacteus* (Figura 5.1C), un fong gairebé desconegut per les seves aplicacions biotecnològiques fins fa cinc anys i que actualment és objecte d'un intens estudi. Entre les seves característiques destaquen la seva facilitat per colonitzar sòls no estèrils, la seva ubiqüitat en el medi i la seva capacitat per degradar compostos xenobiòtics (Novotný *et al.*, 2000). A diferència de *P. chrysosporium*, *I. lacteus* produeix la peroxidasa MnP i lacasa en medis rics en C i N (extracte de malta), així com també en medis amb baix contingut en nitrogen. La presència d'aquests enzims és estimulada en medis amb elevada concentració de nitrogen, on també produeix LiP (Novotný *et al.*, 2000). L'enzim produït majoritàriament pel fong és MnP i ha estat el principal enzim implicat en la degradació de compostos xenobiòtics per *I. lacteus*. Recentment s'han purificat i caracteritzat els enzims MnP i LiP per a aquest fong (Baborová *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2005). *I. lacteus* s'ha usat per a la degradació de pentaclorofenol (Lêstan i Lamar, 1996), PAHs (Cajthaml *et al.*, 2006; Song, 1999; Novotný *et al.*, 2000), TNT (Kim i Song, 2000 i 2003), diferents tints sintètics (Novotný *et al.*, 2004; Novotný *et al.*, 2001; Kasinath *et al.*, 2003), explosius (Fournier *et al.*, 2006) i en la decoloració i detoxificació d'efluents provinents de la indústria de l'oliva (Aggelis *et al.*, 2002).

Per últim, *G. lucidum*, també conegut com a "pipa" o "paella" a Catalunya degut a la seva semblança a una pipa de fumar pel seu peu totalment lateral, es troba comunament a alzinars i rouredes i en menor mesura a fagedes i castanys (Figura 5.1D). Aquesta espècie ja s'utilitzava fa milers d'anys en la farmacologia oriental. Actualment el seu estudi científic s'ha centrat en el seu ús medicinal, pels seus efectes positius davant les afeccions pulmonars, asma, problemes hepàtics, hipertensió i nivells elevats de colesterol. També s'ha demostrat efectiu contra l'insomni, la debilitat i les molèsties nervioses (un recull de les seves propietats es pot trobar a Jong i Birmingham, 1992). Com s'ha esmentat anteriorment, els fongs del gènere *Ganoderma* tenen major tolerància a l'estrès fisiològic que *T. versicolor* a la natura, de manera que són capaços de mantenir-se durant més temps lligats a la fusta en descomposició, tot i que presenten una menor efectivitat en la seva degradació. La seva baixa taxa de creixement ha motivat un escàs interès en l'estudi de les seves aplicacions ligninolítiques. Tanmateix, en les darreres fases de la degradació de la fusta aquest fong està exposat a nivells molt elevats de substàncies aromàtiques tòxiques, pel que els seus sistemes degradatius podrien tenir interès. *G. lucidum* produeix majoritàriament lacasa (especialment induïda en medis amb

alt contingut en nitrogen i en agitació) i en menor mesura MnP quan té com a substrat àlber (D'Souza, 1999). No es té coneixement del seu ús en la degradació de compostos xenobiòtics.



**Figura 5.1.** Fongs de podridura blanca a la natura (A) *Phanerochaete chrysosporium*, (B) *Trametes versicolor*, (C) *Irpex lacteus* i (D) *Ganoderma lucidum*.

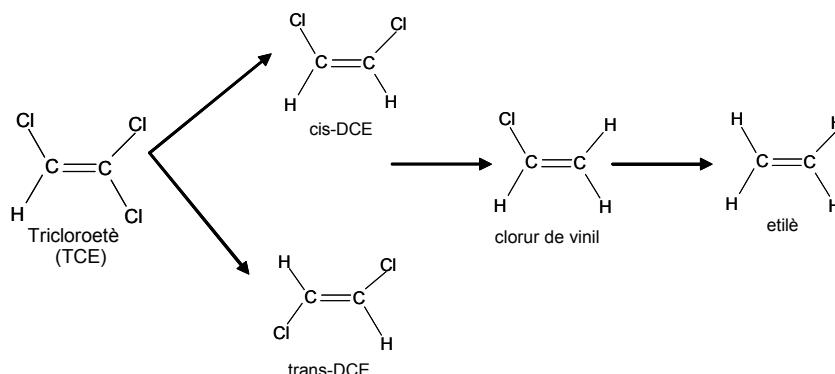
### 5.1.2. Biodegradació de TCE

En aquest apartat es fa referència a les principals vies de degradació de TCE descrites per organismes. En les aplicacions per bioremediació, el gruix de la recerca s'ha centrat en l'estudi bacterià, ja sigui en condicions aeròbiques (per co-metabolisme) o anaeròbiques (per dechloració reductiva anaeròbia directe o co-metabolisme). La viabilitat d'utilitzar fongs ligninolítics ha estat demostrada però el seu estudi s'ha limitat a un sol fong (*P. chrysosporium*) i els resultats obtinguts en dos únics treballs publicats presenten certa dissonància. Per últim, es descriu també les vies de degradació de TCE per mamífers, àmpliament estudiades des d'un punt de vista de l'anàlisi del seu risc per a la salut humana. Tanmateix, s'ha inclòs en aquest apartat pels paral·lelismes establerts entre aquesta via de degradació i la suggerida posteriorment en l'apartat de resultats per *T. versicolor*.

#### 5.1.2.1. Dechloració reductiva anaeròbia per bacteris

La dechloració reductiva anaeròbia, com el seu nom indica, implica el reemplaçament seqüencial d'un àtom de clor per un àtom d'hidrogen en condicions anaeròbiques i pot ocórrer tant directa com co-metabòlicament. En qualsevol cas, com s'observa a la Figura 5.2, el TCE passaria seqüencialment a dicloroetà (DCE), clorur de vinil i en alguns casos es dechloraria totalment fins a etilè. Dels tres

possibles isòmers que poden produir-se de DCE, el cis-1,2-dicloroetà (cis-DCE) predomina sobre la forma trans-1,2-dicloroetà (trans-DCE), mentre que la quantitat de 1,1-DCE es considera insignificant (Bouwer, 1994).



**Figura 5.2.** Decloració reductiva anaeròbia de TCE

En el cas de la decloració reductiva anaeròbia directa, també anomenada dehaloespiració, el contaminant clorat serveix com a acceptor d'electrons i usualment l'hidrogen com a donador directe d'electrons, produint un guany energètic pel bacteri a mesura que la molècula es va declorant. El primer bacteri en el que es va observar aquest fenomen va ser *Desulfomonile tiedjei* durant la decloració reductiva de 3-clorobenzoat (Shelton i Tiedje, 1984). D'altra banda, la molècula clorada també pot ser degradada fortuïtament per un enzim o cofactor produït durant el metabolisme microbià d'un altre compost en condicions anaeròbies, donant lloc a la decloració reductiva anaeròbia co-metabòlica (EPA, 2000).

La decloració reductiva de TCE fins a etilè s'ha demostrat des de fa anys mitjançant consorcis bacterians (Freedman i Gossett, 1989; DeBruin *et al.*, 1992, DiStefano *et al.*, 1992). La decloració reductiva d'alquens clorats per cultius axènics ha estat estudiada principalment pel PCE, que és la forma més oxidada de TCE i per tant la més favorable termodinàmicament per a la reducció anaeròbia. Però també s'ha observat en algunes soques la possibilitat d'utilitzar el TCE com a acceptor d'electrons, transformant aquest compost fins a productes menys clorats. Entre els bacteris capaços de declorar reductivament el TCE per dehaloespiració es troben diferents espècies del gènere *Desulfitobacterium*, *Sulfurospirillum* i *Dehalococcoides*. D'aquestes, només les del gènere *Dehalococcoides* són capaces de declorar completament la molècula fins a etilè, mentre que la majoria de la resta de soques la degraden incompletament fins a cis-DCE. D'altra banda, només la soca *M. thermophila* ha estat descrita en la reducció anaeròbia de TCE per co-metabolisme. Les principals característiques d'aquestes soques així com els enzims implicats en la dehalogenació es recullen en l'apartat 6.1.1, conjuntament amb la resta de soques decloradores de PCE.

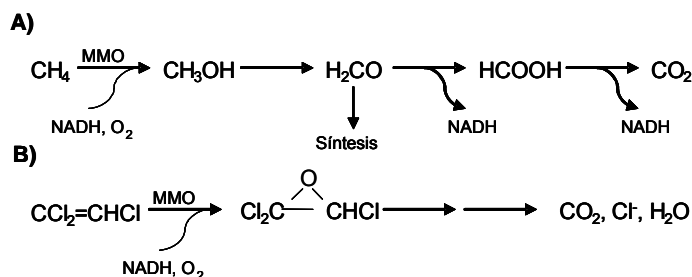
Les velocitats en la decloració reductiva anaeròbia són més altes en aquells compostos més halogenats, de manera que habitualment poden acumular-se en el medi quantitats importants de dicloroetilens i CV. Això suposa una limitació en la seva aplicació, donat que els primers són compostos tòxics i el CV és cancerigen i és considerat molt més perillós que el PCE o TCE (He *et al.*, 2002)

Durant la dehalorespiració de PCE i TCE es requereix l'addició de dos electrons per cada clorur eliminat, i per a la majoria dels bacteris aïllats l'hidrogen és un dels majors substrats (i en alguns casos l'únic) que pot servir com a donador directe d'electrons. En els sistemes naturals, l'hidrogen es troba disponible a través de la fermentació dels substrats orgànics. Sota condicions anaeròbies, aquests substrats s'hidrolitzen formant àcids grassos volàtils, els quals són oxidats per bacteris acetogènics fins a acetat, hidrogen i diòxid de carboni. Fennell i Gossett (1997) varen demostrar que l'hidrogen generat a partir de l'oxidació dels àcids grassos volàtils pels bacteris acetogènics serveix com a donador d'electrons durant la dehalogenació.

Per tal que la dechloració reductiva del TCE és dugui a terme és necessari conèixer les condicions redox del medi. Així, en presència d'oxigen, nitrat o sulfat la reacció no es produirà donat que aquests compostos són termodinàmicament més favorables que el TCE com a acceptors d'electrons. Un altre factor clau en aquest procés és la concentració d'hidrogen en el medi, donat que els bacteris dehalorespiradors poden competir millor amb els consorcis metanogènics quan la concentració d'hidrogen en el medi és baixa. D'aquesta manera, subministrant substrats orgànics que es fermentin només sota pressions parcials d'hidrogen baixes, com l'àcid propionic o butíric, es pot assolir una avantatge competitiva (Fennell i Gossett, 1997).

#### **5.1.2.2. Co-metabolisme aerobi per bacteris**

La degradació aeròbia bacteriana de dissolvents halogenats pot produir-se per la seva oxidació directa. En aquest procés, el compost halogenat serveix com a donador d'electrons i com a substrat de creixement primari pel bacteri, i els electrons generats per la seva oxidació són transferits posteriorment a un acceptor d'electrons com l'oxigen. Aquesta via és possible per als hidrocarburs alifàtics menys clorats (amb un o dos clors) tals com el clorometà (Vannelli *et al.*, 1998), diclorometà (Braus-Stromeyer *et al.*, 1993), dicloroetà (Vandenwijngaard *et al.*, 1992) i clorur de vinil (Hartmans i de Bont, 1992). En el cas del TCE, no s'ha aïllat cap bacteri capaç d'utilitzar aquest contaminant com a font de creixement i d'energia en condicions aeròbies, sent el principal mecanisme de degradació aerobi el co-metabolisme. Podem definir el co-metabolisme com la transformació fortuïta d'un compost orgànic per enzims o cofactors produïts pel microorganisme en presència d'un substrat de creixement o d'un altre compost transformable. Wilson i Wilson (1985) varen mostrar per primer cop que el TCE era susceptible de degradar-se aeròbiament per comunitats microbianes del sòl alimentades amb gas natural. Així, es va trobar que els processos implicats en el co-metabolisme de TCE per bacteris metanòtrofs eren els següents (veure Figura 5.3):



**Figura 5.3.** Degradació co-metabòlica de TCE per bacteris metanòtrofs.  
(A) Oxidació de metà, (B) Epoxidació de TCE.

Els metanòtrofs, que oxiden el metà com a font d'energia i creixement, utilitzaven una metà monooxigenasa (MMO) per catalitzar l'oxidació de metà a metanol. Aquest procés requereix energia o poder reductor en forma de NADH. Alhora, la MMO oxidava TCE fortuïtament fins a TCE epòxid, un compost inestable que es descomposa químicament donant varis productes (McCarty i Semprini, 1994). Des de llavors, un nombre creixent de microorganismes han mostrat la seva capacitat de degradar TCE en condicions aeròbies per co-metabolisme.

### ***Mecanismes de degradació i subproductes***

Alguns dels bacteris més representatius i els seus substrats de creixement primaris es troben a la Taula 5.1. Com es pot observar, tots els enzims responsables de la transformació de TCE són mono- o dioxigenases, que inicien l'oxidació de varis substrats com a font de creixement. Les oxigenases constitueixen un subgrup dels enzims classificats com a oxidoreductases, que són un dels sis majors grups enzimàtics. Tenen un ampli ventall de funcions en les cèl·lules, incloent la biosíntesis, la detoxificació i el co-metabolisme. Les oxigenases catalitzen la reducció de l'O<sub>2</sub> amb la incorporació d'un (monooxigenasa) o dos (dioxigenasa) àtoms d'oxigen en el substrat que es vol oxidar. Les monooxigenases requereixen un reductor per reduir el segon àtom d'oxigen a H<sub>2</sub>O, mentre que les dioxigenases no el requereixen necessàriament donat que ambdós àtoms d'O<sub>2</sub> es redueixen per la seva incorporació en el substrat. Totes les oxigenases tenen en comú la necessitat de passar l'O<sub>2</sub> a un estat reactiu, el que es realitza habitualment mitjançant la transferència d'electrons del grup prostètic dels enzims a aquesta molècula.

Els organismes degradadors de TCE es distingeixen en funció del substrat de creixement requerit per expressar l'oxigenasa degradadora. Tanmateix, la majoria d'aquests bacteris són capaços de créixer en molts altres substrats, alguns dels quals podrien estimular també l'expressió de l'oxigenasa degradadora de TCE. A més, un mateix substrat pot induir enzims substancialment diferents en altres bacteris. Com a exemple d'això darrer, a la Taula 5.1 es pot observar la diversitat d'enzims oxidants de toluè per a diferents bacteris.

**Taula 5.1.** Exemples de bacteris que transformen TCE aeròbicament per co-metabolisme<sup>1</sup>

Substrat de creixement	Bacteri	Enzim	Velocitat d'oxidació de TCE	Velocitat d'oxidació del substrat	Referència
Etilè/Propilè	<i>Xanthobacter</i> Py2	Alquè	8,6	92	Ensign <i>et al.</i> , 1992
		monooxigenasa	16-95	116	Reij <i>et al.</i> , 1995
Propilè	<i>Rhodococcus corallinus</i> B-276	Alquè monooxigenasa	2,4	59	Saeki <i>et al.</i> , 1999
Amoni	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Amoni monooxigenasa	10,9	700-1700	Bedard i Knowles, 1989 Ely <i>et al.</i> , 1995
Fenol i 2,4-diclorofenoxiacetat	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP 134	Fenol hidroxilasa	0,2		Harker i Kim, 1990
		2,4-diclorofenol hidroxilasa	0,06		Harker i Kim, 1990
Butà	<i>Pseudomonas butanovora</i>	Butà monooxigenasa			Hamamura <i>et al.</i> , 1997
Propà	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB-5	Propà monooxigenasa			Wackett i Householder, 1989
Metà	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	Metà monooxigenasa particulada	4,1	82	DiSpirito <i>et al.</i> , 1992
		Metà monooxigenasa soluble	16,6 37,5		Joergensen, 1985 Oldenhuis <i>et al.</i> , 1991
Metà	<i>Methylomonas methanica</i> 68-1	Metà monooxigenasa soluble	38,8		Koh <i>et al.</i> , 1993
Toluè	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Toluè dioxigenasa	8		Heald i Jenkins, 1994
			1,8		Leahy <i>et al.</i> , 1996
Toluè	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Toluè 2-monooxigenasa	0,5	65,2	Sun i Wood, 1996
			8		Folsom <i>et al.</i> , 1990
Toluè	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	Toluè 4-monooxigenasa	9		Leahy <i>et al.</i> , 1996
			3	7,6	Shields i Reagin, 1992
Toluè	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluè 3-monooxigenasa	20		Leahy <i>et al.</i> , 1996
Toluè	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluè 3-monooxigenasa	2,4	71,2	Sun i Wood, 1996
Toluè	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluè 3-monooxigenasa	2,4	11,3	Olsen <i>et al.</i> , 1994

<sup>1</sup> Les velocitats d'oxidació estan expressades en mmol·min<sup>-1</sup> mg de proteïna<sup>-1</sup>

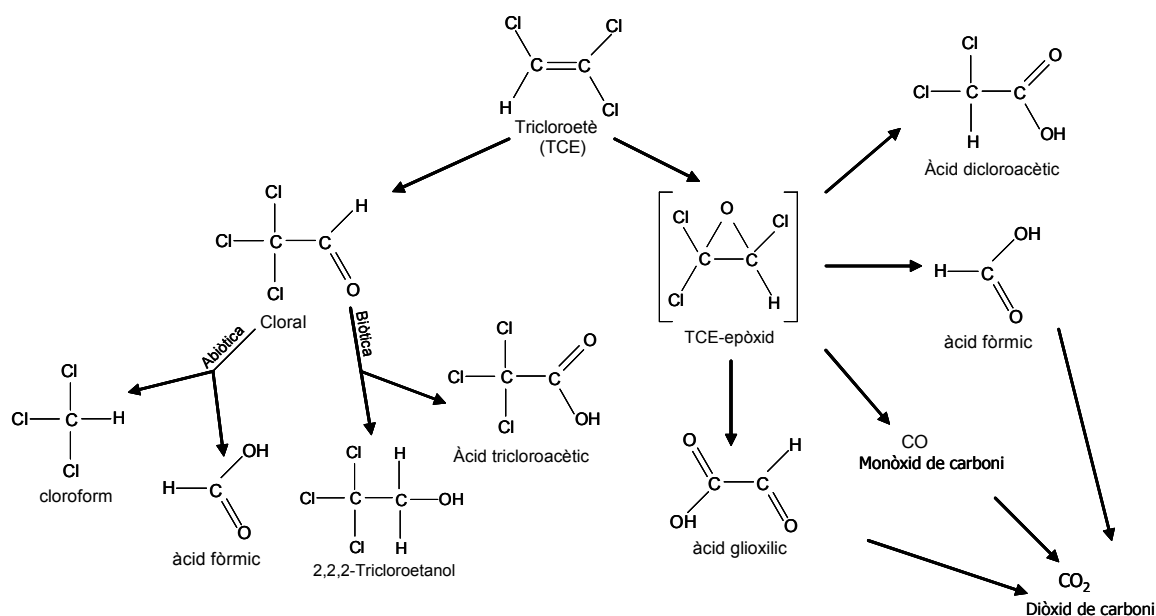
També poden apreciar-se diferències en la inducció de l'activitat degradadora de TCE pels bacteris presents a la Taula 5.1. Per exemple, el bacteri oxidant d'amoni *Nitrosomonas europaea* és restrictiu quant a l'ús d'amoni com a font d'energia pel creixement i l'expressió de l'oxigenasa no específica amb la que inicia l'oxidació de l'amoni, l'amoni monooxigenasa (AMO), és essencialment constitutiva. En contrast amb això, hi ha bacteris com *Ralstonia eutropha* que poden expressar dos



enzims degradadors de TCE completament diferents, una fenol hidroxilasa codificada cromosòmicament i una 2,4-diclorofenol hidroxilasa codificada en el plàsmid. D'altra banda, també existeixen bacteris oxidants de metà com la *Methylosinus trichosporium* OB3b que poden expressar dues formes diferents de MMO, la forma soluble (sMMO), molt inespecífica, i una altra associada a la membrana (pMMO), que pot oxidar menys compostos xenobiòtics que l'anterior.

A partir de la Taula 5.1 també es poden traçar de manera genèrica algunes de les particularitats de les cinètiques de degradació de TCE i del substrat de creixement per aquest tipus de bacteris. Així, per exemple, la màxima velocitat de degradació de TCE per a la majoria d'aquests bacteris és entre 10-100 vegades inferior a la velocitat d'oxidació dels substrats de creixement. Tanmateix, segons sigui el substrat de creixement, la cinètica de degradació de TCE pot variar de manera molt notable (Oldhenius *et al.*, 1991).

Els estudis més detallats realitzats per identificar la via de degradació de TCE per bacteris s'han realitzat amb enzims purs, on la possibilitat de transformacions addicionals catalitzades per altres enzims s'elimina. A la Figura 5.4 es poden observar els subproductes de degradació de TCE obtinguts per co-metabolisme aerobi.



**Figura 5.4.** Via de degradació de TCE per co-metabolisme aerobi en bacteris

S'ha observat que amb sMMO pura es genera glioxilat, format, dicloroacetat i CO com a productes majoritaris de l'oxidació de TCE (Fox *et al.*, 1990). L'addició de TCE-epòxid a medis lliures d'enzim donava lloc als mateixos productes i a velocitats de generació molt similars. Així, es va demostrar la generació de TCE-epòxid a partir de l'addició de sMMO en medis amb TCE (Fox *et al.*, 1990) i es va assenyalar que la descomposició no enzimàtica d'aquest compost és la que generava els productes observats. D'altra banda, amb sMMO també s'observava una petita quantitat de cloral (tricloroacetaldehid), producte que no s'obtenia a partir del TCE-epòxid. El cloral es convertia en

2,2,2-tricloroetanol i àcid tricloroacètic en cultius de bacteris oxidants de metà (Newman i Wackett, 1991). Els mateixos autors també observaren que el cloral podia transformar-se abiòticament a pH i temperatura elevades, donant cloroform i àcid fòrmic. Posteriorment, estudis amb toluè 2-monooxigenasa pura de *B. cepacia* G4 mostraren que els principals productes de l'oxidació de TCE per aquest enzim eren CO, format i glioxilat (Newman i Wackett, 1997). Una característica interessant del co-metabolisme de TCE per aquestes monooxigenases és que un dels productes majoritaris és el CO (del 53% per a sMMO i un 41% per a la toluè 2-monooxigenasa). Quant a les dioxigenases, els principals productes generats de l'oxidació de TCE per la toluè dioxigenasa de *P. putida* F1 és glioxilat i format, però no es produeix CO (Li i Wackett, 1992).

Aquests subproductes de degradació també s'han observat amb altres sistemes enzimàtics. El 2,2,2-tricloroetanol i cloral han estat detectats també com a productes de degradació de TCE en el bacteri oxidant de propà *M. vaccae* JOB-5 (Vanderberg *et al.*, 1995); i *Mycobacterium* sp TA27, un bacteri oxidant d'età, produïa àcid dicloroacètic, àcid fòrmic, àcid glioxílic i monòxid de carboni a partir de la formació de TCE-epòxid (Hashimoto *et al.*, 2002). En aquestes dues darreres soques, també s'ha descrit la mineralització del TCE.

### ***Limitacions del co-metabolisme aerobi de TCE per bacteris***

Entre els factors que poden influir en la capacitat de degradació del TCE en el co-metabolisme aerobi per bacteris es troben la limitació del reductor durant el procés de degradació i els efectes tòxics provocats pel contaminant.

En el primer cas, com s'ha esmentat anteriorment, una característica intrínseca de les monooxigenases és el requeriment d'un reductor per reduir un àtom de la molècula d'oxigen a aigua, mentre que l'altre àtom és introduït en el substrat. Durant el metabolisme dels substrats de creixement, el reductor invertit en l'activació inicial del substrat és recuperat posteriorment durant el seu metabolisme (veure Figura 5.3). Tanmateix, en presència d'un contaminant aquest és objecte d'una única reacció catalitzada per la oxigenasa i els productes obtinguts no són posteriorment metabolitzats per tal de reposar el reductor consumit. Així, en aquelles situacions on el microorganisme sigui exposat simultàniament a un substrat de creixement i a un contaminant, l'escassetat del reductor pot constrènyer l'extensió dels índexs de degradació. La magnitud d'aquesta limitació estarà en funció de les concentracions relatives dels dos substrats, les seves afinitats relatives per la monooxigenasa i les seves velocitats d'oxidació relatives (Arp *et al.*, 2001). Quan la concentració del substrat de creixement sigui molt elevada en relació a la del contaminant, l'efecte inhibitori produït per l'oxidació d'aquest darrer compost serà probablement petita. Tanmateix, a mesura que la concentració del contaminant augmenti també augmentarà progressivament la competència pels llocs actius de la monooxigenasa, disminuint així la velocitat d'oxidació del substrat de creixement i el subministrament de reductors a la monooxigenasa. Per tant, unes velocitats de degradació de TCE sostingudes requeriran un equilibri entre la concentració del contaminant i la de l'inductor o substrat de creixement, la qual cosa és certament difícil *in situ*.

L'altre factor que limita l'eficàcia del co-metabolisme de TCE és la citotoxicitat dels seus productes de transformació. Així, s'ha demostrat que el co-metabolisme de TCE causa la inactivació de les oxigenases degradadores en diferents classes de bacteri, incloent aquells oxidants d'amoni (*Nitrosomonas europaea*), metà (*Methylosinus trichosporium* OB3b), toluè (*Pseudomonas putida* F1) i butà (*Pseudomonas butanovora*, *Mycobacterium vaccae* i *Nocardioides sp.* CF8). Entre les possibles espècies químiques causants de la inactivació de les oxigenases s'han assenyalat el TCE epòxid i els clorurs d'acil, que es generen quan el TCE epòxid s'hidrolitza (van Hylckama Vlieg *et al.*, 1997). D'altra banda, s'ha observat que aquests efectes negatius no es limiten només a les oxigenases sinó que s'estenen a les cèl·lules dels bacteris. A tall d'exemple, es va observar que l'exposició de *B. cepacia* G4 a 250 µM TCE durant 90 min provocava un descens parcial de l'activitat de la toluè monooxigenasa (52%), mentre que la seva respiració vinculada a l'acetat disminuïa un 98% i el nombre de cèl·lules viables es reduïa en tres ordres de magnitud (Yeager *et al.*, 2001).

### 5.1.2.3. Degradació aeròbia per fongs de podridura blanca

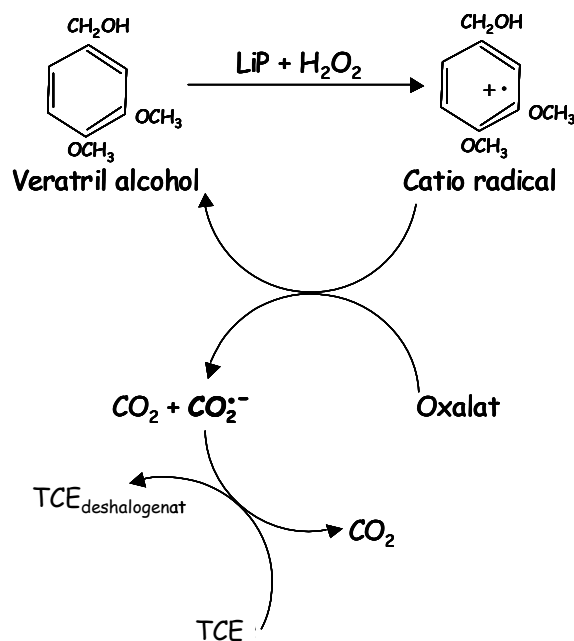
A diferència de la riquesa d'informació disponible pels bacteris, en el cas dels fongs de podridura blanca només s'ha descrit la degradació de TCE per *P. chrysosporium* en dos articles. En el primer, Khindaria *et al.* (1995) es centra en l'estudi del mecanisme de degradació del fong, mentre que en el segon Yadav *et al.* (2000) estudia les condicions òptimes de degradació del contaminant. A l'escassetat d'informació disponible, cal afegir que les conclusions a les que arriben ambdós articles són aparentment contradictòries en alguns aspectes i que no s'han identificat els possibles intermediaris de la seva degradació apart del CO<sub>2</sub>.

Yadav *et al.* (2000) obté uns percentatges de degradació amb 10 ppm de TCE superiors en medi d'extracte de malta (46,2%) i medi amb alt contingut en nitrogen (14,0%) que en baix contingut en nitrogen (6,5%) després de 21 dies d'incubació. En els dos primers medis, com s'ha explicat en apartats anteriors, la producció de LiP i MnP està totalment suprimida, mentre que en baix contingut de nitrogen es produeix tant LiP com MnP. Per tant, a partir d'aquests resultats es dedueix que hi hauria implicat un altre mecanisme degradatiu alternatiu al de les peroxidases. D'altra banda, Khindaria *et al.* (1995) realitza un experiment similar amb medis amb baix i alt contingut en nitrogen amb <sup>14</sup>C-TCE a la mateixa concentració que l'estudi anterior. En aquest cas el contaminant no es mineralitza en el medi no ligninolític, el que fa postular que les peroxidases, i concretament la LiP, té un paper important en la degradació d'aquest producte. D'aquesta manera, la via de degradació de TCE i concretament el paper que poden jugar les peroxidases en aquest procés, no ha quedat clarament establert pels fongs de podridura blanca.

Yadav *et al.* (2000) utilitza el medi amb extracte de malta pels posteriors experiments. Estudia l'efecte de la concentració de TCE en la degradació pel fong, exposant-lo a un rang d'entre 5-100 ppm. El percentatge de degradació disminueix a mesura que augmenta la concentració, però no s'observa un canvi significatiu en la biomassa del fong, excepte a 100 ppm on disminueix lleugerament. Per últim, es realitza un experiment amb <sup>14</sup>C-TCE amb el que determina que després de

21 dies d'incubació el 38,5% del producte es mineralitza a  $\text{CO}_2$ . La comparació del percentatge de degradació (46,2%) amb el de mineralització indica que gran part del producte degradat es mineralitzaria a  $\text{CO}_2$  i només una petita part podria acumular-se en forma d'altres subproductes.

Per la seva banda, Khindaria *et al.* (1995) realitza diferents experiments *in vitro* amb els que tracta de demostrar que la degradació del TCE és possible mitjançant una reducció química catalitzada per la LiP, tal i com es mostra a la Figura 5.5. Després de l'addició *in vitro* d'una barreja de LiP, veratril alcohol,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i oxalat o EDTA com a donadors d'electrons al contaminant, els autors observaven la formació de radicals dehalogenats de TCE. Donat que tots els components d'aquest sistema enzimàtic, amb l'oxalat com a donador d'electrons, són excretats pel fong es proposa que aquest mecanisme està implicat en la degradació de TCE. Així, el sistema LiP- $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidaria el veratril alcohol, que és produït per *P. chrysosporium* quan el seu medi de creixement es tant lignina com glucosa, formant el seu catió radical corresponent. Aquest catió radical podria oxidar l'oxalat fins a  $\text{CO}_2$  i al seu anió radical ( $\text{CO}_2^{\cdot-}$ ), el qual podria reduir finalment el TCE.



**Figura 5.5.** Mecanisme proposat per la degradació de TCE per *P. chrysosporium* mitjançant la reducció química de la LiP utilitzant oxalat com a donador d'electrons (Khindaria *et al.*, 1995).

#### 5.1.2.4. Metabolisme de TCE en mamífers

Els mamífers poden metabolitzar el TCE per dues vies, mitjançant la seva oxidació per citocrom P450 i per la seva conjugació dependent del glutatió. Aquestes vies de degradació són altament dependents dels teixits en els que es du a terme la degradació del contaminant, i les velocitats del seu metabolisme poden variar considerablement entre les diferents espècies investigades al laboratori (per exemple, rates, gats o conills) i les obtingudes pels éssers humans (Lipscomb *et al.*, 1997).

Les vies d'exposició de TCE en els éssers humans poden ser en forma de vapors, pel tracte gastrointestinal o per l'adsorció dèrmica. En qualsevol cas, el TCE és ràpidament adsorbit i distribuït pels diferents òrgans del cos (pulmons, fetge, ronyons, sistema nerviós) a través del sistema circulatori.

### ***Oxidació per citocrom P450***

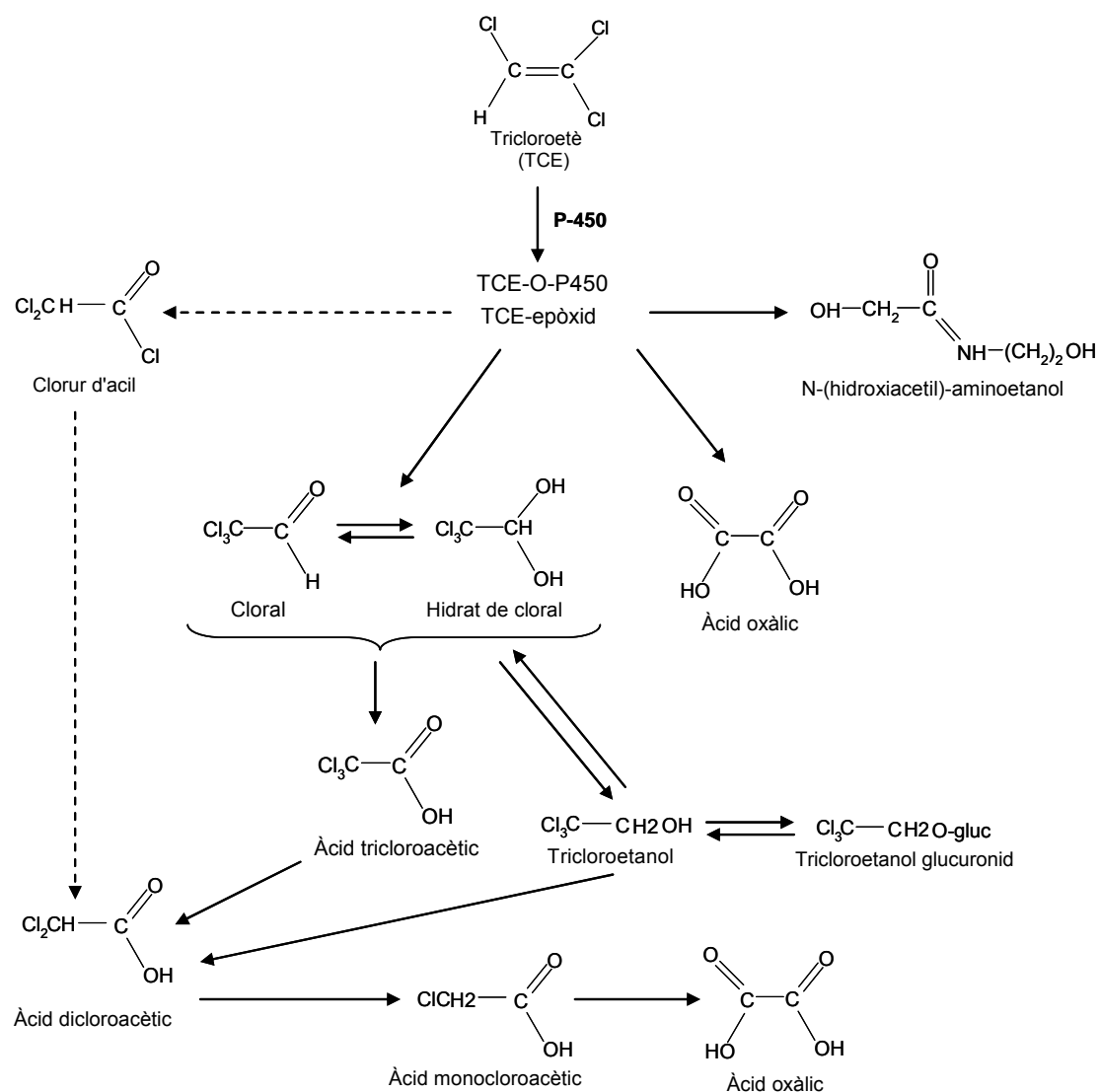
La via del citocrom P450 és quantitativament la predominant en el metabolisme de TCE per mamífers. El principal teixit on es du a terme és el fetge, tot i que hi ha varies isoformes P450 en molts altres teixits i en diferents quantitats. S'han identificat quatre isoformes diferents de citocrom P450 que estan implicades en el metabolisme de TCE: CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11/6 i CYP2E1, sent aquesta darrera la que presenta una major afinitat pel TCE.

La primera etapa en el metabolisme oxidatiu de molts alquens halogenats és la epoxidació. En el cas del TCE, s'ha proposat la seva biotransformació fins a un intermediari epòxid reactiu. Així, aquest epòxid donaria lloc a clorurs d'acil, que serien posteriorment hidrolitzats fins als corresponents àcids, o bé podrien formar aldehids que serien oxidats fins a àcids carboxílics o reduïts fins a alcohols. La presència d'hidrat de cloral, 2,2,2-tricloroetanol i àcid tricloroacètic com a metabòlits majoritaris de la degradació de TCE en mamífers està en consonància amb aquesta hipòtesis inicial (Goepfert *et al.*, 1995; Bloemen *et al.*, 2001).

Tot i aquestes evidències, s'ha generat una controvèrsia al voltant de la producció de l'epòxid com a intermediari. S'ha suggerit que no és un intermediari obligat en la formació de l'hidrat de cloral. Alhora, el grup hemo del citocrom P450 és destruït durant el metabolisme oxidatiu del TCE, i l'epòxid no destrueix aquest grup (Miller i Guengerich, 1982). Així, s'ha proposat que la majoria de TCE passaria a una molècula TCE-P450 oxigenada (TCE-O-P450) en estat de transició que donaria lloc a la formació de l'hidrat de cloral. Donada aquesta situació, actualment es creu que la implicació de l'epòxid en la primera etapa d'oxidació és probablement errònia però es requereixen més estudis per ratificar-ho (Lash *et al.*, 2000).

Després de la formació de l'epòxid de TCE o de TCE-O-P450, l'hidrat de cloral (en equilibri amb el cloral) és el metabòlit majoritari produït, i és ràpidament transformat en el fetge a altres productes. Addicionalment, també es pot produir àcid oxàlic, àcid dicloroacètic (a partir del clorur d'acil com a intermediari) i N-(hidroxiacetil)-aminoetanol (Figura 5.6). Aquests quatre metabòlits han estat identificats en l'orina d'humans i altres mamífers exposats a TCE (Lash *et al.*, 2000).

L'hidrat de cloral és posteriorment metabolitzat a 2,2,2-tricloroetanol o àcid tricloroacètic, els quals poden ser oxidats a àcid dicloroacètic. El 2,2,2-tricloroetanol també es pot glucuronidar formant l'espècie tricloroetanol glucuronid, que es pot regenerar fins a 2,2,2-tricloroetanol per recirculació enterohepàtica. Per últim, l'àcid dicloroacètic pot metabolitzar-se posteriorment fins a l'àcid monocloroacètic o l'àcid oxàlic.

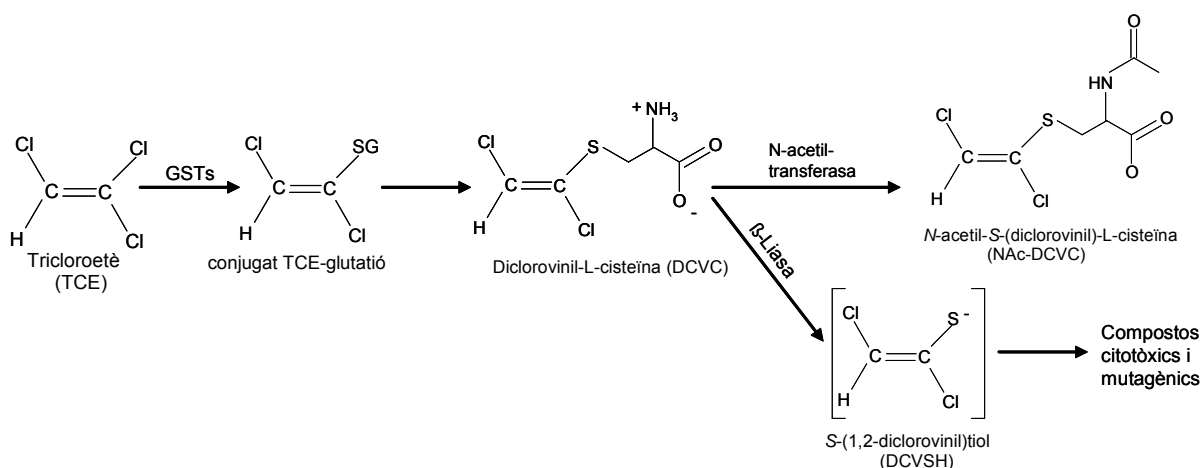


**Figura 5.6.** Via de degradació de TCE per citocrom P450

### **Metabolisme de TCE dependent del glutatió**

El glutatió (L-γ-glutamil-L-cistenilglicina, GSH) és un tripèptid constituït per tres aminoàcids (glutamat, cisteïna i glicina) que està present en grans quantitats en gairebé tots els organismes aerobis. La detoxificació de xenobiòtics o dels seus metabòlits es troba entre les funcions més importants del glutatió. El grup tiol (-SH) de la cisteïna pot realitzar un atac nucleòfil sobre el centre electròfil d'un ampli ventall de compostos, tant de manera espontània com catalitzada per les glutatió *S*-transferases (GSTs), donant lloc a la formació de productes menys tòxics i facilitant la seva eliminació (DeLeve i Kaplowitz, 1991). Les GSTs són una família d'isoenzims que contenen una regió hidrofòbica molt polimòrfica que pot unir-se a una gran varietat de substrats electròfils. Tanmateix, també s'ha trobat que la conjugació amb GSH juga un paper important en la bioactivació d'altres tipus de contaminants, entre els quals es troben alcans i alguns halogenats. En el cas del TCE, la conjugació amb GSH es produeix a velocitats que són generalment molt més baixes que l'oxidació per citocrom P450 i es considera que és una via de menor importància per als humans (Bloemen *et al.*,

2001). La conjugació amb el GSH es produeix principalment en el fetge, donat que les GSTs representen entre el 5-10% de les proteïnes solubles presents en aquest òrgan (Lash *et al.*, 2000), donant lloc al conjugat TCE-glutatió. Aquest compost és posteriorment metabolitzat per peptidases, produint un conjugat de cisteïna (veure Figura 5.7) que es pot donar en dues formes estereoisomèriques, la *S*-1,2- i la *S*-2,2-diclorovinil-L-cisteïna (DCVC). La formació d'aquest compost és el punt crític en el metabolisme de TCE per aquesta via, donat que pot ser detoxificat i posteriorment excretat o bé pot donar lloc a espècies que han estat associades amb nefrotoxicitat i nefrocarcinogenicitat. El principal metabòlit excretat per via urinària és la forma *N*-acetilada de DCVC, la *N*-acetil-*S*-(diclorovinil)-L-cisteïna (NAc-DCVC).



**Figura 5.7.** Via de degradació de TCE per glutatió

Una altra possibilitat és el trencament de DCVC per una  $\beta$ -liasa en els ronyons o fetge, que donaria lloc a l'espècie *S*-(1,2-diclorovinil)tiol (DCVSH), que és químicament inestable i pot donar a diferents metabòlits associats a la citotoxicitat i mutagenicitat.

## 5.2. Materials i mètodes

La metodologia experimental emprada i els mètodes analítics utilitzats per determinar la concentració dels hidrocarburs alifàtics clorats, el contingut de glucosa, clorurs, l'activitat de la lacasa, el pes sec de la biomassa, els anàlisis per ressonància magnètica nuclear, els anàlisis per cromatografia de gasos i espectrometria de masses de relació isotòpica i pH estan descrits al capítol 3 de Materials i mètodes generals.

L'addició d'oxigen i glucosa durant la incubació en aquells experiments on s'especifiqui es realitza mitjançant una xeringa de plàstic esterilitzada a través dels taps de butil. En el cas de la glucosa, s'afegeix 1 ml a les ampolles a partir d'una solució mare concentrada i esterilitzada a 121 °C durant 30 minuts. Pel que respecta a l'oxigen, s'afegeix el volum corresponent a cada ampolla a partir de l'oxigen pur contingut en una bossa Tedlar a través del seu port d'injecció.

## 5.3. Resultats i discussió

### 5.3.1. Capacitat de degradació de TCE per diferents fongs ligninolítics i selecció de la soca més eficient

Es realitza un experiment en condicions estàtiques amb 10 ppm de TCE en el líquid per comprovar si els fongs ligninolítics *T. versicolor*, *I. lacteus* i *G. lucidum* tenen la capacitat de degradar aquest contaminant. Els fongs es varen afegir en forma de suspensió triturada. *P. chrysosporium* es va incloure en aquest experiment com a control positiu, ja que era l'únic fong ligninolític que prèviament havia demostrat la seva capacitat per degradar TCE (Yadav *et al.*, 2000, Khindaria *et al.*, 1995). Tots els fongs es varen testar amb medi MEM, però en el cas de *T. versicolor* es va incloure el MD, un medi productor de lacasa, i per *P. chrysosporium* el MBN, en el que es produeixen les peroxidases LiP i MnP. La temperatura d'incubació va ser de 25 °C, excepte en el cas de *P. chrysosporium* en MBN que es va portar a 37 °C, la seva temperatura òptima.

Com s'observa a la Taula 5.2, el TCE és degradat per totes les soques testades. En aquestes condicions, els resultats obtinguts mostren que *T. versicolor* presenta millors característiques per a la biodegradació de TCE en comparació amb qualsevol altre dels fongs emprats en aquest experiment. El percentatge de degradació assolit per *T. versicolor* després dels 12 dies d'incubació és substancialment superior, situant-se entre el 44-45% tant en medi definit (MD) com en extracte de malta (MEM). En MD s'indueix la producció de lacasa per *T. versicolor*, en canvi el MEM és utilitzat com a medi de creixement del fong per ser molt ric en nutrients però la producció de lacasa, LiP i MnP és molt reduïda. Tanmateix, el percentatge de degradació en ambdós medis és molt similar.

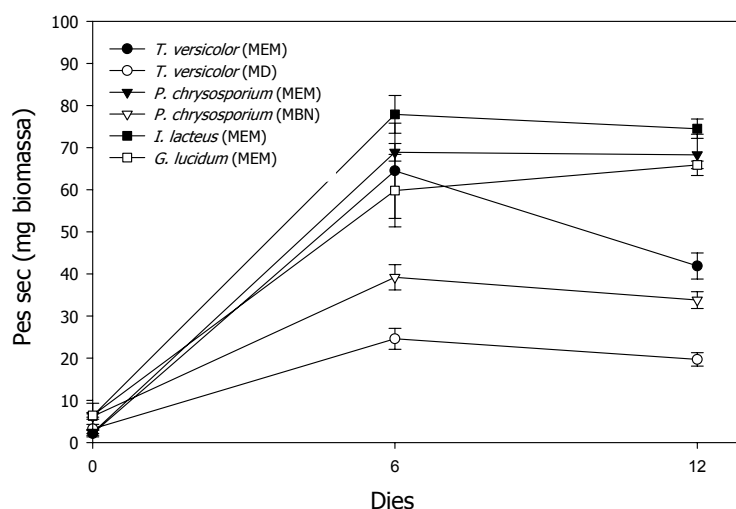
**Taula 5.2.** Percentatge de degradació de TCE per diferents fongs ligninolítics

Fong i medi	% Degradació	
	6 dies	12 dies
<i>T. versicolor</i> (MD)	29,5 ± 2,3	45,0 ± 0,4
<i>T. versicolor</i> (MEM)	6,1 ± 0,25	44,1 ± 2,2
<i>I. lacteus</i> (MEM)	16,3 ± 1,3	19,5 ± 1,4
<i>G. lucidum</i> (MEM)	6,5 ± 0,5	10,7 ± 0,8
<i>P. chrysosporium</i> (MEM)	5,3 ± 0,3	21,6 ± 1,5
<i>P. chrysosporium</i> (MBN)	8,8 ± 0,8	9,7 ± 0,7

En el MD de *T. versicolor* s'assoleix el major percentatge de degradació de TCE però és el medi en el que es produeix un menor creixement de biomassa (veure Figura 5.8), essent més de tres vegades inferior a la de *P. chrysosporium* en MEM (19,7 ± 1,6 mg vs 68,3 ± 4,9 mg). Això és degut a que no s'ha afegit tiamina en el MD perquè allibera clorurs i interferiria en els anàlisis d'aquests ions que es realitzaran amb posterioritat. Com a element destacable de cara a la seva aplicació en el camp,



cal assenyalar que *T. versicolor* té una temperatura òptima de creixement de 25 °C, mentre que per *P. chrysosporium* és de 37 °C.



**Figura 5.8.** Evolució de la biomassa dels fongs incubats amb 10 ppm de TCE en el líquid.

Altres autors també han mostrat que *T. versicolor* és capaç de degradar compostos xenobiòtics més eficientment que altres fongs ligninolítics, incloent *P. chrysosporium*, i inclús tenir una major capacitat per resistir concentracions més elevades de compostos xenobiòtics (Alleman *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2005).

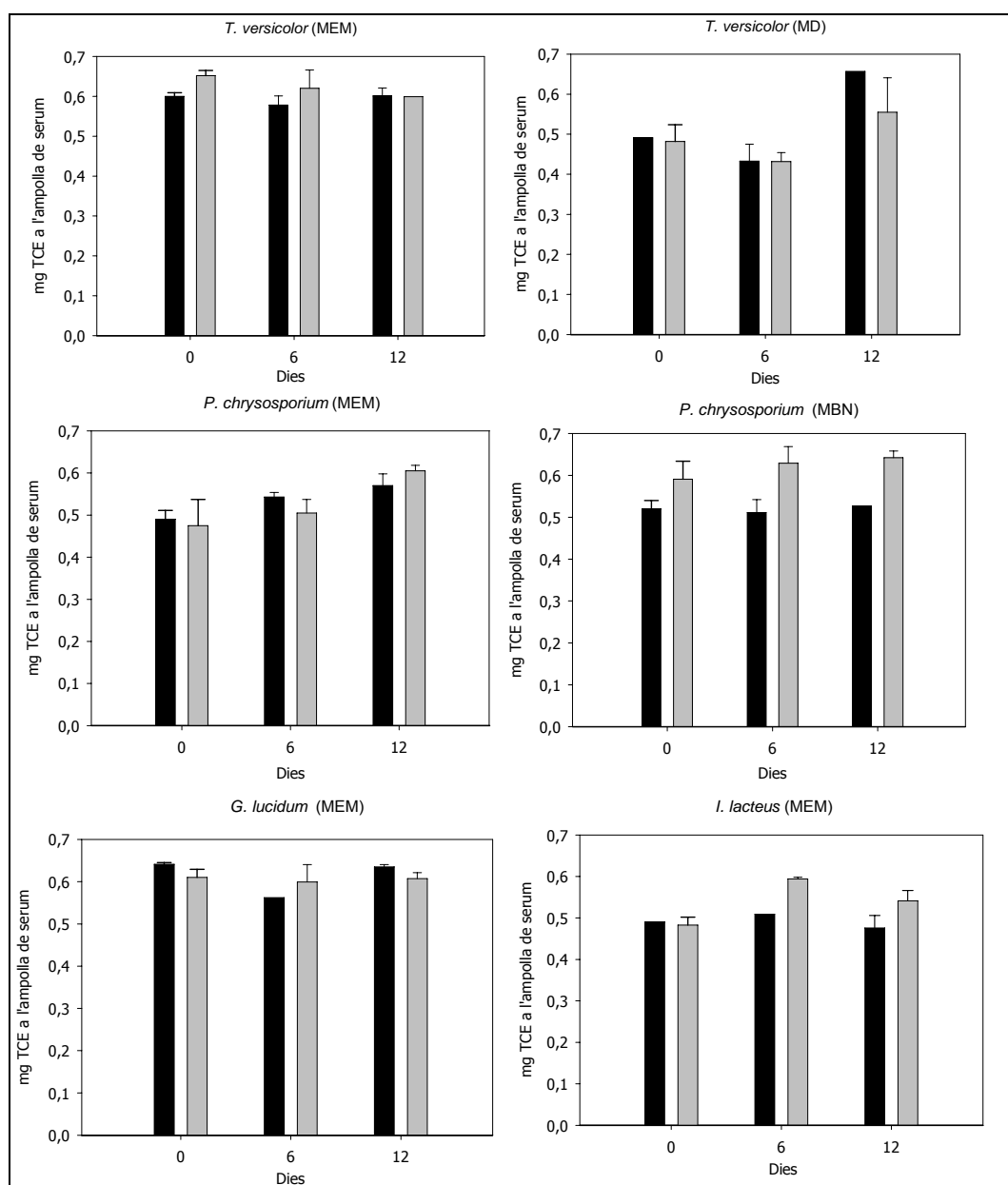
Els resultats obtinguts amb *P. chrysosporium* es troben en consonància amb els obtinguts per Yadav *et al.* (2000), en els que es mostrava que aquest fong assolía percentatges de degradació de TCE superiors en MEM (on la producció de peroxidases es troba completament suprimida) respecte al MBN. Tot i que la degradació de compostos xenobiòtics per fongs ligninolítics s'ha associat generalment a la producció de les peroxidases i lacases, hi ha un nombre creixent de literatura en el que s'assoleix la degradació de compostos xenobiòtics en medis on la seva producció es troba completament inhibida (Kullman i Matsumura, 1996; Jackson *et al.*, 1999; Yadav i Reddy, 1993).

Per *I. lacteus* es van assolir valors de degradació comparables als assolits per *P. chrysosporium* en MEM. *I. lacteus* produeix MnP i lacasa extracel·lular en MEM, i la degradació de productes com el pirè (Song, 1999) i benzo(a)antracè (Cajthaml *et al.*, 2006) s'han assolit amb aquest medi de cultiu.

D'altra banda, *G. lucidum* va mostrar uns índexs de degradació molt baixos, similars als assolits per *P. chrysosporium* en MBN. Segons D'Souza *et al.* (1999), quan *G. lucidum* creix en MEM produeix quantitats negligibles de lacasa però no produeix ni LiP ni MnP. Tot i que l'article que s'ha esmentat anteriorment fa referència als diferents enzims ligninolítics que produeix aquest fong i per tant s'augura el seu ús potencial en la bioremediació, la degradació de TCE constitueix la primera evidència de degradació d'un compost xenobiòtic per *G. lucidum*.

En tots els casos, la desaparició de TCE en les ampolles experimentals va ser deguda al metabolisme del fong, donat que tots els valors van ser corregits per l'adsorció i possible volatilització

amb els cultius autoclavats, tal i com s'explica a l'apartat de Materials i mètodes generals. Tanmateix, era interessant comprovar la importància de l'adsorció en el procés de degradació de TCE. A la Figura 5.9 s'han graficat, pels diferents fongs i per cada temps d'incubació, els mg de TCE a les ampolles amb fong autoclavat i a les abiòtiques. Així, es produiria adsorció quan la quantitat de TCE fos substancialment superior en les ampolles abiòtiques respecte a la del fong autoclavat.



**Figura 5.9.** Quantitat de TCE en les ampolles abiòtiques (barres grises) i amb fong autoclavat (barres negres) per diferents temps d'incubació

Com es pot observar, no hi ha uns valors d'adsorció significatius, excepte en el cas de *I. lacteus* (13,1±1,6% d'adsorció de mitjana en els dies 6 i 12 d'incubació) i de *P. chrysosporium* en MBN (16,3±3,7 % d'adsorció de mitjana per tots els períodes d'incubació). En aquest darrer cas, el fong

presenta una morfologia diferent a la de la resta de fongs, amb un aspecte més mocós degut a un polisacàrid que és excretat pel fong en aquestes condicions (Blánquez *et al.*, 2001).

A partir d'aquests resultats, una via possible per continuar aquesta recerca seria optimitzar les condicions de degradació de TCE pels fongs que presenten uns índexs de degradació més reduïts. Tanmateix el nostre grup de recerca té més experiència en estudis de degradació amb *T. versicolor* en bioreactor (Blánquez *et al.*, 2004 i 2006) i, precisament, ha estat amb aquest fong amb el que s'han assolit valors de degradació més elevats. Alhora, donat que *T. versicolor* presenta altres característiques desitjables que s'han esmentat amb anterioritat, s'ha escollit aquest fong per a la continuació d'aquesta Tesi.

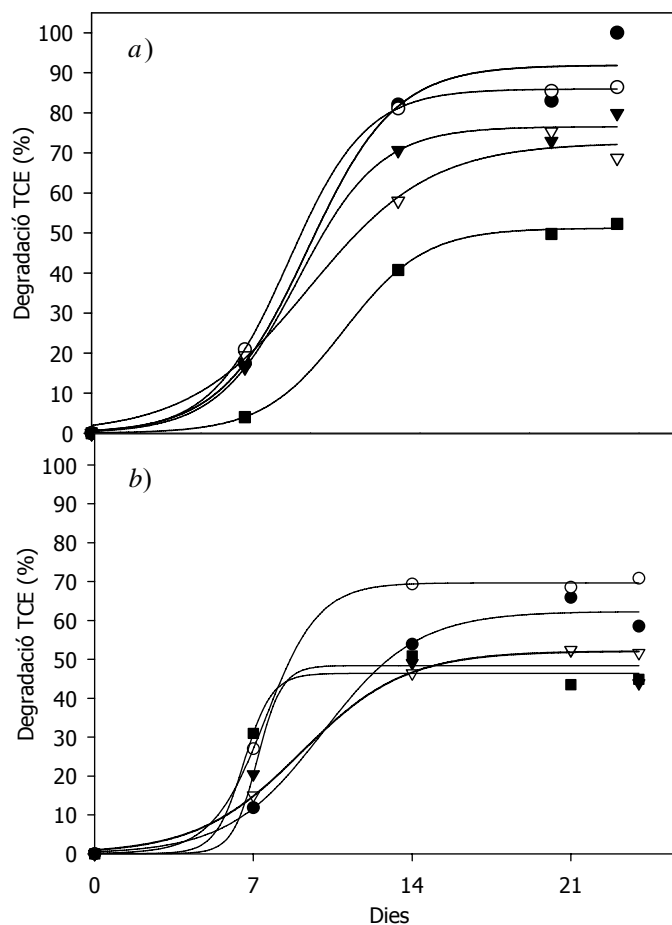
### **5.3.2. Estudi dels factors que influeixen en la degradació de TCE per *T. versicolor***

Aquest apartat es centra en l'estudi dels factors que poden influir en la degradació de TCE per *T. versicolor*. Inicialment, s'estudia la capacitat d'aquest fong per degradar diferents concentracions de TCE. Posteriorment, s'estudia l'efecte d'inocular el fong pre-crescut en el medi amb TCE en dues morfologies diferents (pèl·lets i micel·li dispers) amb l'objectiu d'escurçar el temps de tractament. En aquest cas, els experiments es realitzaran en condicions d'agitació per tal de millorar la transferència de matèria i l'assoliment dels equilibris en el procés. També s'ha estudiat l'efecte de l'addició d'oxigen i glucosa durant la incubació i s'han modificat les concentracions inicials de glucosa en els medis.

#### **5.3.2.1. Efecte de la concentració inicial de TCE en la seva degradabilitat i en *T. versicolor***

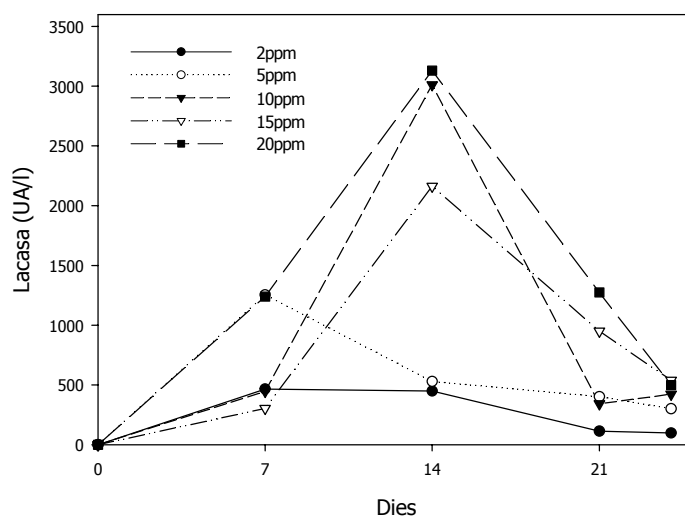
En els medis contaminats per PCE (com a precursor del TCE) o directament per TCE, aquests productes es poden trobar presents en el medi en un ampli ventall de concentracions. En aquest experiment es va voler determinar l'efecte de diferents concentració de TCE sobre el creixement de *T. versicolor* i la seva capacitat de degradació en condicions d'incubació estàtiques. Es van afegir concentracions de TCE de 2, 5, 10, 15 i 20 ppm en el líquid utilitzant com a medis de creixement tant MEM com MD, i el fong es va inocular en forma de suspensió triturada.

Com es pot observar a la Figura 5.10, la fase de latència que es produeix en els primers set dies és precedida per un increment en la degradació del contaminant, que s'estabilitza a partir de la segona setmana i es manté en aquests nivells fins al final del període d'incubació. Per a cada concentració de TCE, els índexs de degradació són superiors en MD que en MEM. En els dos medis s'aprecia que el percentatge de degradació de TCE tendeix a disminuir a mesura que augmenta la concentració inicial de TCE, tot i que la degradació neta de TCE és superior a altes concentracions. És ressenyable el fet que en MD s'assoleixin percentatges de degradació propers o superiors al 80% a partir dels 14 dies d'incubació per l'interval de concentracions de 2-10 ppm de TCE, no identificant-se TCE en les ampolles experimentals amb 2 ppm de contaminant al final del període d'incubació.



**Figura 5.10.** Percentatges de degradació assolits amb diferents concentracions de TCE per *T. versicolor* en medi definit (a) i extracte de malta (b). Les concentracions de TCE en el líquid són de 2 (●), 5 (○), 10 (▼), 15 (▽) i 20 (■) ppm.

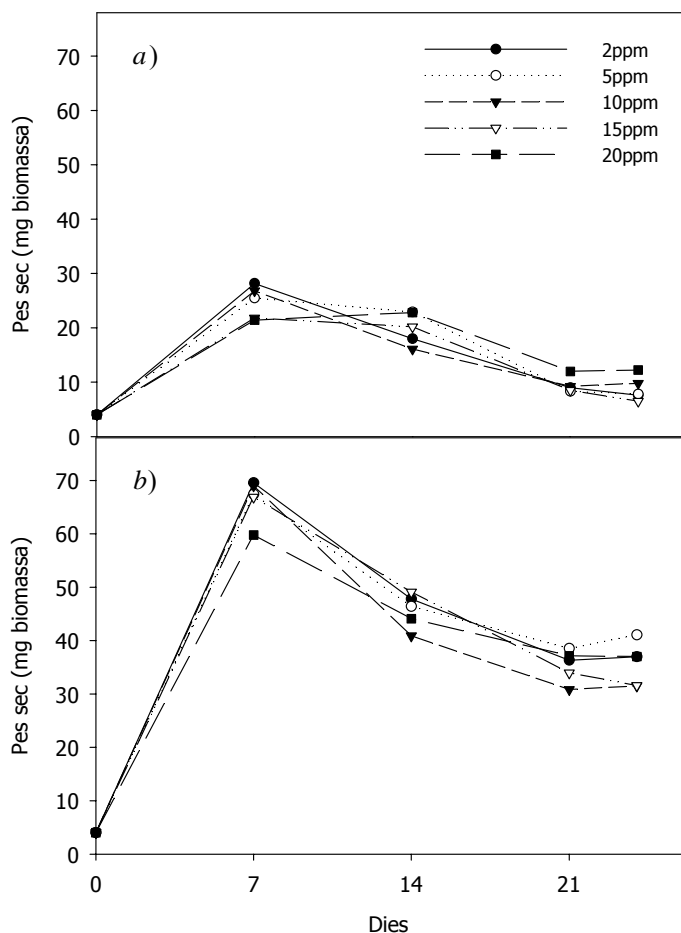
En els cultius amb MD es va mesurar l'activitat extracel·lular de la lacasa, donat que és un medi productor d'aquest enzim. Com es pot observar a la Figura 5.11, la seva activitat enzimàtica augmenta a mesura que també ho fa la concentració de TCE. La màxima activitat de lacasa en els cultius amb 20 ppm de TCE (3131,1 UA/l) va ser d'entre 2 i 4 vegades superiors als de les concentracions de 5 i 2 ppm (1253,7 i 465,9 UA/l respectivament) i 14 vegades superiors als controls incubats sota les mateixes condicions que les anteriors però sense TCE (226,2 UA/l). Aquests resultats indiquen que el TCE és un inductor de la lacasa per *T. versicolor*, la qual cosa es troba en consonància amb el fet que aquest fong produeixi de manera inductiva i constitutiva aquest enzim amb patrons d'activitat similars (Sariaslani, 1989). La producció de lacasa s'ha demostrat induïda per altres compostos xenobiòtics com herbicides (Mougin *et al.*, 2002), compostos cloroaromàtics (Galhaup *et al.*, 2002), clorur de cadmi (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002) i metalls pesants (Lorenzo *et al.*, 2006).



**Figura 5.11.** Activitat enzimàtica de lacasa a diferents concentracions de TCE en cultius de *T. versicolor* cultivats en medi definit

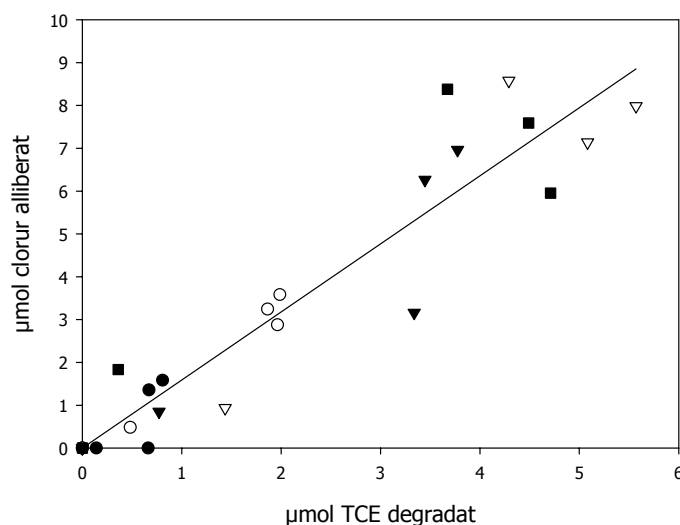
És interessant observar la coincidència que es produeix entre la caiguda de l'activitat de lacasa, després dels 14 dies d'incubació (excepte en els cultius amb 5 ppm), i l'estabilització en la degradació de TCE (comparar Figura 5.10 i 5.11). Aquest resultat suggereix la possible implicació de l'enzim lacasa en el mecanisme de degradació, i aquest aspecte s'haurà d'estudiar en detall amb posterioritat. Tanmateix, també s'han assolit valors de degradació elevats en MEM on l'activitat de la lacasa, així com de les peroxidases, és molt reduïda.

L'efecte de les diferents concentracions de TCE en el creixement del fong és insignificant. A la Figura 5.12 es pot apreciar que el pes sec del micel·li és similar per a totes les concentracions testades, no apreciand-se una inhibició significativa en el seu creixement. Aquesta tolerància per al rang de concentracions estudiat suggereix l'ús potencial d'aquest fong per la bioremediació d'espais contaminats per TCE.



**Figura 5.12.** Evolució de la biomassa amb diferents concentracions de TCE per *T. versicolor* en MD (a) i MEM (b).

Donat que la biodegradació d'hidrocarburs alifàtics clorats normalment porta a l'alliberament de clorurs en el medi (Shim *et al.*, 2001), la degradació de TCE per *T. versicolor* s'ha corroborat a través de l'anàlisi dels clorurs generats en el medi. En soques bacterianes que degraden TCE mitjançant monooxigenases, l'alliberament de clorurs és estequiomètric amb el TCE mineralitzat a CO<sub>2</sub> (Nelson *et al.*, 1986 i 1987; Winter *et al.*, 1989). A la Figura 5.13 s'ha graficat els μmols de TCE degradats amb els μmols de clorurs alliberats en el medi per a totes les concentracions testades en MD. Aquest anàlisi no s'ha pogut realitzar en MEM donat que és un medi que conté unes concentracions molt elevades de clorurs en forma de nutrients i emmascara les baixes concentracions de clorurs generades a partir del trencament de la molècula de TCE. A partir del pendent de la recta de regressió realitzada a la Figura 5.13, es calcula que per cada mol de TCE degradat es generaria aproximadament 1,59 mols de clorur en el medi. Així, considerant que la relació estequiomètrica entre els μmols de TCE completament degradats i els μmols de clorurs alliberats és 1:3, el percentatge de TCE completament declarat és del 52,9%.



**Figura 5.13.** Ajust entre els micromols de clorurs alliberats en el medi líquid i micromols de TCE degradats per cultius de *T. versicolor* en medi definit amb diferents concentracions de TCE. El valor de la recta de regressió obtinguda és  $y=1,588x$ ,  $r^2=0,896$ . Les concentracions de TCE en el líquid són de 2 (●), 5 (○), 10 (▼), 15 (▽) i 20 (■) ppm.

Donat que el MD ha estat el medi amb el que s'han assolit percentatges de degradació més elevats, a més de permetre la quantificació dels clorurs alliberats, serà el medi d'elecció pels posteriors experiments.

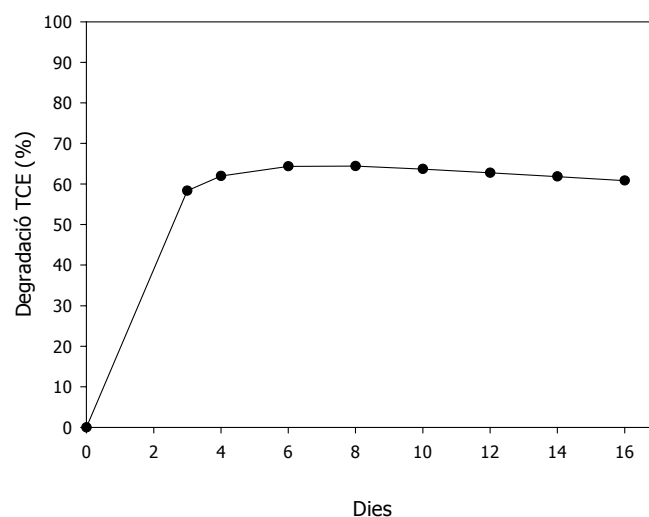
### 5.3.2.2. Estudi amb *T. versicolor* en forma de pèl·let

En els següents experiments *T. versicolor* s'ha inoculat en forma de pèl·let. Aquesta és la morfologia habitual utilitzada en el nostre grup de recerca en estudis amb cultius submergits de *T. versicolor* (Blánquez *et al.*, 2004 i 2006; Font *et al.*, 2003). El creixement de la biomassa en forma de micel·li dispers pot ser desitjable per alguns processos, com per exemple quan la producció d'un metabòlit està lligat a la morfologia del microorganisme, però en la seva aplicació en bioreactors generalment augmenta la densitat del medi generant problemes de transferència de massa (oxigen, nutrients, etc.), pot causar l'obstrucció d'alguns conductes en el seu interior i pot adherir-se a les sondes inutilitzant-les. En canvi, en fer créixer l'organisme en forma de pèl·let, aquests problemes desapareixen (Prosser i Tough, 1991). Altres avantatges en l'ús dels pèl·lets són que permet una millor quantificació en l'addició als bioreactors i una millor homogeneïtzació del fong en el bioreactor respecte al del micel·li dispers. En els experiments amb pèl·lets, tal i com s'especifica a Materials i Mètodes, les ampelles s'incuben en un agitador orbital a 135 rpm.

### Degradació de TCE

S'ha realitzat un experiment inicial afegint 2 grams de pèl·lets (pes humit) de *T. versicolor* en 10 ml de MD i amb una concentració de 10 ppm de TCE en el líquid durant 16 dies. Per a cada punt s'han inclòs una ampolla experimental, una altra amb fong autoclavat i una abiòtica.

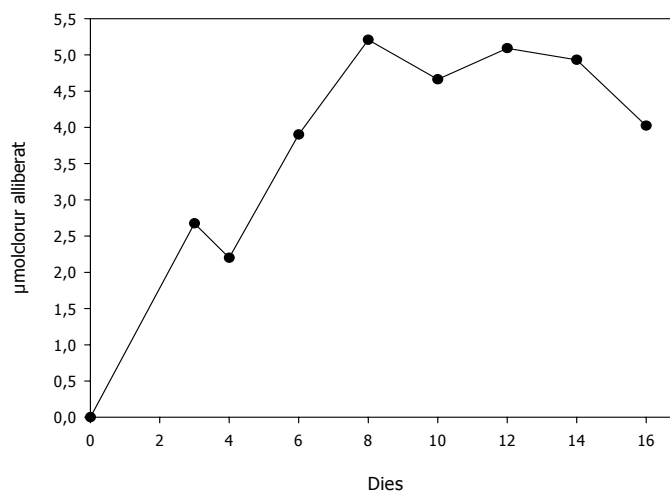
A la Figura 5.14 es pot observar com el temps del tractament es redueix significativament respecte els experiments realitzats anteriorment en condicions estàtiques en els que el fong s'havia afegit en forma de suspensió triturada. S'han assolit uns índexs de degradació propers al 60% el tercer dia i s'han estabilitzat entre el quart i sisè dia en uns valors propers a aquest percentatge. En condicions estàtiques havíem vist com l'estancament en la degradació es produïa a partir de la segona setmana i en el cas de la concentració de 10 ppm de TCE s'assolien valors de degradació superiors al 70% a partir de la segona setmana d'incubació.



**Figura 5.14.** Evolució de la degradació de 10 ppm de TCE amb pèl·lets de *T. versicolor* i medi definit

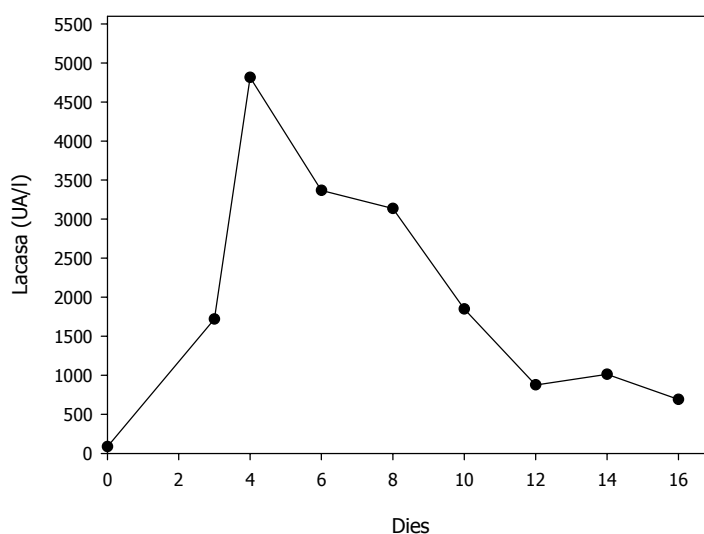
D'altra banda, a la Figura 5.15 s'observa que des del tercer dia d'incubació es produeix un alliberament de clorurs degut al trencament de la molècula, però no es fins el vuitè dia que s'assoleix el seu estancament. Així doncs, semblaria que es produeix un retard entre la degradació de TCE i la generació posterior de clorurs.





**Figura 5.15.** Evolució de la generació de clorurs en medi definit amb 10 ppm de TCE i pèl·lets de *T. versicolor*

La lacasa mostra uns valors d'activitat enzimàtica molt elevats durant el procés, superiors a les 1500 UA/l el tercer dia i assolint el seu pic el quart dia amb un màxim proper a les 5000 UA/l (Figura 5.16). De nou, la màxima activitat de lacasa coincideix amb l'assoliment del valor màxim de degradació suggerint la seva possible implicació en el procés de degradació.



**Figura 5.16.** Evolució de l'activitat de la lacasa en medi definit amb 10 ppm de TCE i pèl·lets de *T. versicolor*

El percentatge de degradació assolit amb pèl·lets és lleugerament inferior al de les condicions estàtiques, però el temps de tractament es redueix substancialment, la qual cosa és rellevant per a la seva aplicació en bioreactor. Tanmateix, s'evidencia en tots els casos un estancament en la degradació que indica l'existència de factors claus que impedeixen la completa degradació de TCE. Un d'aquests factors pot ser l'exhauriment de la glucosa. En aquest experiment la seva concentració inicial en el medi va ser de 7,7 g/l, però el tercer dia ja s'havia exhaurit completament del medi,

coincidint també amb l'inici de l'estancament de la degradació. L'esgotament de la font de carboni porta a l'aturament del creixement del fong i a la seva posterior lisis cel·lular provocant una disminució posterior de la seva biomassa (veure Figures 5.8 i 5.12). D'altra banda, un altre factor que s'ha assenyalat en altres estudis de degradació amb fongs és l'esgotament de l'oxigen (Yadav i Reddy, 1993). En el nostre cas, el tancament hermètic de les ampolles dels experiments és clau per tal de no tenir pèrdues de TCE, que és altament volàtil. A l'estudi de la influència d'aquest dos paràmetres es dedicaran els següents apartats.

### **Consum d'oxigen**

*T. versicolor* és un fong aerobi estricte i, com s'ha esmentat anteriorment, l'exhauriment de l'oxigen disponible a les ampolles pot ser una de les raons per les que la degradació s'estanqui als pocs dies de la incubació. Alhora, el consum d'oxigen és un component clau en el disseny d'un bioreactor per tal d'ajustar de manera adequada els requeriments del microorganisme i optimitzar el procés de degradació.

Per aquestes raons es va realitzar un experiment per determinar el consum d'oxigen de *T. versicolor*. Aquest es va dur a terme en un fermentador Braun Biostat B amb una cubeta de 2 l amb una unitat de control digital i equipat amb control de pH (sonda InPro 3030) i de temperatura, i una sonda de mesura de l'oxigen dissolt (Ingold). Els experiments es van realitzar en agitació (Turbina tipus Rushton) i aeració i les dades experimentals es van registrar on-line en un ordinador a partir d'un programa dissenyat amb Microsoft Visual Basic (Pinsach *et al.*, 2006). El fong es va afegir en forma de pèl·let en MD. Es va utilitzar la tècnica dinàmica, que consisteix en introduir una pertorbació (en aquest cas l'aturament del subministrament d'aire al reactor) quan el sistema es troba en equilibri i analitzar la resposta que es produeix. Els experiments i resultats que a continuació s'esmenten formen part del treball de Màster d'en Marcel Vilaplana, dirigit per la Dra. Montserrat Sarrà i la Dra. Glòria Caminal (Vilaplana, 2006).

A partir d'aquests experiments es va establir un valor mitjà de consum d'oxigen per *T. versicolor* de:

$$Q_{O_2} = -0,260 \pm 0,015 \frac{\%}{s}$$

On  $Q_{O_2}$  és el consum d'oxigen, en consum percentual respecte la saturació per segon.

A partir del valor de la solubilitat de l'oxigen en aigua a 25 °C, equivalent a 8,38 mg O<sub>2</sub>/l (Metcalf, 1985), el volum del medi líquid utilitzat en l'experiment i el pes sec dels pèl·lets en el fermentador, es pot calcular el consum d'oxigen per pes sec de biomassa. El valor resultant és:

$$Q_{O_2} = 29,0 \pm 1,2 \frac{\text{mg O}_2}{\text{h} \cdot \text{g}_{\text{ pes sec biomassa}}}$$

A partir d'aquest valor, podem calcular el temps en el que l'oxigen s'exhaureix en els nostres cultius. Tenint en compte que el volum total de les ampolles de sèrum utilitzades és de 161 ml, i el

medi líquid ocupa 10 ml, la fase gasosa restant és de 151 ml. Considerant que la fase líquida i gasosa es troben completament saturades d'oxigen, a partir de la solubilitat de l'oxigen en aigua a 25 °C es pot calcular la quantitat d'oxigen a la fase líquida:

$$10 \text{ ml líquid} \cdot \frac{11}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{8,38 \text{ mg O}_2}{1 \text{ líquid}} = 0,0838 \text{ mg O}_2 \text{ en el medi líquid}$$

Considerant que la densitat de l'oxigen a 1 atm i 25 °C és 1,3 g O<sub>2</sub>/l, es pot calcular la quantitat d'oxigen en la fase gas de les ampolles a l'inici dels experiments:

$$151 \text{ ml fase gas} \cdot \frac{11}{1000 \text{ ml}} \cdot \frac{1300 \text{ mg O}_2}{1} = 196,3 \text{ mg O}_2 \text{ en la fase gas}$$

I, per tant, la quantitat d'oxigen inicial als cultius és de:

$$\text{Total O}_2 \text{ a les ampolles} = 196,3 \text{ mg O}_2 \text{ (fase gas)} + 0,0838 \text{ mg O}_2 \text{ (fase líquida)} = 196,38 \text{ mg O}_2$$

El pes sec dels pèl·lets afegits inicialment en l'experiment anterior amb 10 ppm de TCE i MD era de 46,2 mg. A partir d'aquesta dada, podem calcular el temps d'exhauriment de l'oxigen a les ampolles:

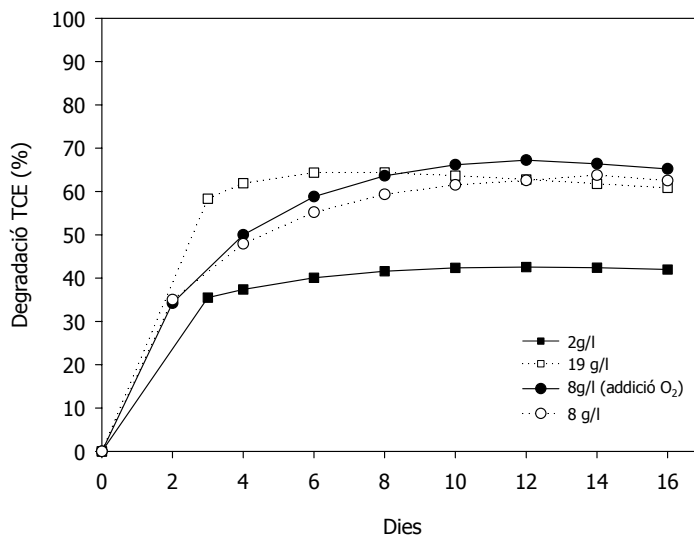
$$\frac{196,38 \text{ mg O}_2 \text{ totals}}{29 \frac{\text{mg O}_2 \text{ consumit}}{\text{h} \cdot \text{g}_{\text{biomassa}}} \cdot 0,0462 \text{ g}_{\text{biomassa}}} = 146,6 \text{ h} = 6,1 \text{ dies}$$

Aquest resultat és de l'ordre del calculat per Yadav i Reddy (1993) per cultius de *P. chryso sporium* inoculats per la degradació de BTEX, en ampolles de sèrum del mateix volum que les nostres i amb els medis també saturats d'oxigen inicialment. Segons els seus càlculs, el 95,4% de l'oxigen disponible era consumit als 5 dies, i aquesta era una de les explicacions amb les que justificava l'estancament de la degradació els primers set dies d'incubació. En el nostre cas observem que es produeix una tendència a l'estancament de la degradació de TCE entre el quart i sisè dia (veure Figura 5.14), suggerint que l'oxigen pot ser un dels factors limitants a l'hora d'obtenir uns índexs de degradació més elevats.

### **Efecte de la concentració inicial de glucosa i l'addició d'oxigen**

En aquest experiment s'afegiran diferents concentracions inicials de glucosa (2, 8 i 19 g/l) en el MD, mantenint la relació proporcional de nitrogen amoniacal establerta a l'apartat de Materials i mètodes generals per a aquest medi. D'aquesta manera es vol comprovar l'efecte de diferents concentracions de glucosa en la degradació de TCE, donat que el seu ràpid exhauriment s'ha proposat com a possible causa de la limitació de la degradació del TCE. Paral·lelament, en un medi amb 8 g/l de glucosa afegirem 10 ml d'oxigen pur als 4 dies d'incubació, per tal de comprovar l'efecte de la seva addició. Per a cada punt s'ha inclòs una ampolla experimental, una altra amb fong autoclavat i una abiòtica.

A la Figura 5.17 podem observar el percentatge de degradació de TCE per cada tractament al llarg del temps. No s'observa una fase de latència, produint-se la major desaparició de TCE entre el segon i tercer dia d'incubació. Entre el quart i sisè dia tots els cultius tendeixen a estabilitzar el percentatge de degradació, excepte el cultiu en el que s'ha afegit oxigen que té una lleugera tendència a l'augment. Els cultius amb 2 g/l assoleixen un màxim de degradació entorn el 40%, mentre que la resta de medis tendeixen a convergir a un valor comú lleugerament superior al 60%.



**Figura 5.17.** Percentatge de degradació de TCE amb pèl·lets de *T. versicolor* en medi definit a diferents concentracions de glucosa

Als medis amb 19 g/l de glucosa es varen afegir realment 19,3 g/l. El tercer dia restaven 6,7 g/l i el quart dia ja s'havia exhaurit. Per la resta de concentracions de glucosa (2 i 8 g/l), el segon dia ja s'havia esgotat del medi. Possiblement per aquest fet, els medis amb 19 g/l assolien uns percentatges de degradació el tercer i quart dia superiors a la resta, establint-se posteriorment.

A la Taula 5.3 comprovem que la quantitat de clorurs alliberats augmenta amb la concentració de glucosa i nitrogen tot i que els índexs de degradació són similars en els cultius amb 8 i 19 g/l de glucosa. Alhora, per a una mateixa concentració de glucosa (8 g/l) obtenim un alliberament superior de clorurs en els cultius oxigenats que en els no oxigenats. Aquestes dades suggereixen que augmentant la concentració inicial de glucosa inicial i oxigenant les mostres es poden incrementar els índexs de mineralització per cada  $\mu\text{mol}$  de TCE degradat. Aquesta dada és rellevant donat que, a manca de discernir els intermediaris de degradació i la seva perillositat, és preferible que la molècula de TCE es declori completament i/o es mineralitzi fins a  $\text{CO}_2$ .

A partir de la Taula 5.3 es pot calcular el percentatge de TCE completament declorat en el MD amb 8 g/l (52,9%), que és similar a l'obtingut anteriorment en aquest mateix medi però en condicions de cultiu estàtiques i afegint el fong en forma de suspensió triturada (53,2%, veure Fig. 5.13). Aquestes dades indiquen que possiblement les condicions d'agitació (agitat/estàtic) i la forma del fong (pèl·let/suspensió triturada) no tinguin un efecte important en la transformació del TCE als

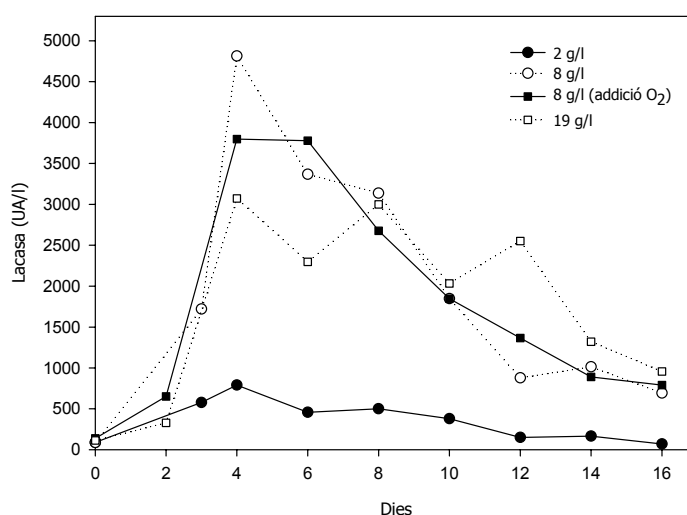
corresponents subproductes, al marge del temps de tractament que és molt rellevant de cara a l'aplicació en bioreactor.

**Taula 5.3.** Efecte de la concentració inicial de glucosa i l'addició d'oxigen en l'alliberament de clorurs provinents del TCE en cultius de *T. versicolor*<sup>1</sup>

Concentració de glucosa (g/l)	Clorurs generats ( $\mu\text{mol}$ )	TCE completament dechlorat <sup>2</sup> (%)
2	$2,7 \pm 0,4$	45,0
8	$4,7 \pm 0,5$	53,2
8 (amb addició d'oxigen)	$5,5 \pm 0,8$	78,7
19	$6,6 \pm 0,2$	78,6

<sup>1</sup>Aquestes dades s'han calculat a partir de les mitjanes de les quatre mostres incubades durant els dies 10-16, quan els valors de degradació s'han mantingut constants. <sup>2</sup>Aquest percentatge s'ha calculat dividint els clorurs generats entre els clorurs estequiomètrics generats a partir de la degradació de TCE (considerant que per cada  $\mu\text{mol}$  de TCE degradat s'alliberen 3  $\mu\text{mol}$  de clorurs).

Excepte en el medi amb 2 g/l de glucosa, on la glucosa s'esgota en les primeres hores després de la inoculació, la resta els valors màxims de lacasa superen amb escreix les 3000 UA/l que s'assolien en condicions estàtiques (Figura 5.18). Tanmateix, la relació entre activitat lacasa i pes sec de biomassa és molt més elevada en el cas dels cultius en condicions estàtiques i inoculats amb la suspensió triturada que no pas en aquests experiments amb pèl·lets i en agitació. El pic de màxima activitat es produeix al quart dia coincidint amb l'inici de l'estancament de la degradació de TCE.



**Figura 5.18.** Evolució de l'activitat de la lacasa en medi definit amb diferents concentracions de glucosa i pèl·lets de *T. versicolor*

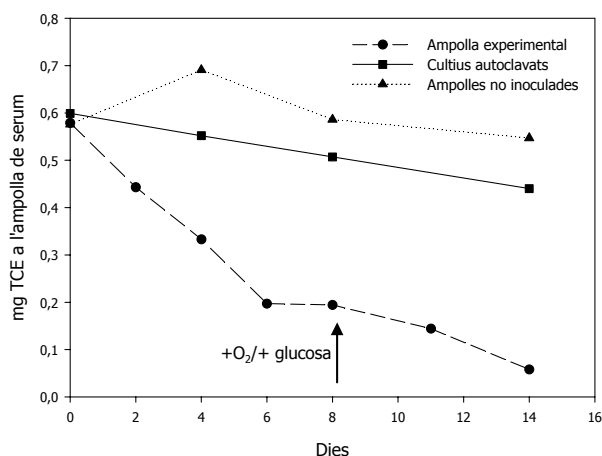
### 5.3.2.3. Estudi amb *T. versicolor* pre-crescut en forma de micel·li dispers

Tot i que la morfologia en forma de pèl·lets és la més comuna en l'aplicació de *T. versicolor* en bioreactors, s'ha volgut testar els resultats que s'assolirien si es fes créixer el fong en forma de micel·li

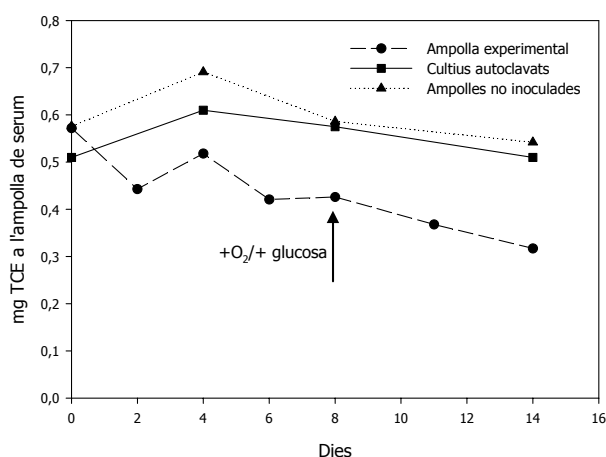
dispers. D'aquesta manera, després de l'addició de la suspensió triturada en les ampolles experimentals amb MD els cultius s'incubaven 7 dies en un agitador orbital (135 rpm) sense el contaminant. Després d'aquest període els cultius s'oxigenaven de nou durant 1 minut, s'afegia el TCE i es portaven novament a l'agitador orbital per millorar la homogeneïtat del TCE en el medi i el seu contacte amb el fong. Així, el dia zero a les gràfiques fa referència al moment en que s'ha afegit el TCE, i correspon en realitat al setè dia d'incubació del fong.

En els experiments amb pèl·lets hem comprovat que l'addició d'oxigen porta a un augment en la decloració del TCE. També s'ha assenyalat que l'esgotament dels nutrients pot ser una de les raons per les que s'atura la degradació de TCE en les ampolles. D'aquesta manera, en aquests experiments s'ha afegit conjuntament 5 g/l de glucosa i 5 ml d'oxigen als 8 dies d'incubació. Tot i que el medi d'elecció ha estat el MD, donat que és amb el que s'han assolit percentatges de degradació més elevats, aquest experiment s'ha realitzat també amb MEM per comprovar si l'addició de la glucosa i oxigen produïa el mateix efecte sobre els dos medis.

A les Figures 5.19 i 5.20 es troben els resultats de desaparició de TCE de les ampolles experimentals i els controls. Com ja s'havia comprovat, la degradació de TCE és més elevada en MD que en MEM. Es pot apreciar una disminució del contaminant a partir del segon dia d'incubació, que s'estabilitza ràpidament en MEM, però que disminueix progressivament en MD fins el sisè dia. En MD la mitjana del percentatge de degradació entre el dia 6 i 8 és de  $54,4 \pm 1,3$ , que és lleugerament inferior a l'assolida en pèl·lets en aquestes condicions (veure Figura 5.14). En pèl·lets, a més, s'assolia el màxim de degradació entre el quart i sisè dia, una mica abans que amb el micel·li dispers.



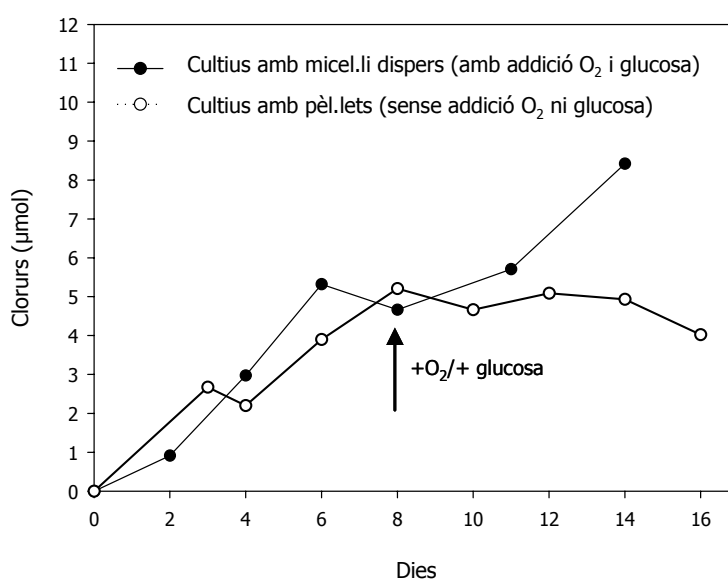
**Figura 5.19.** Evolució de la quantitat de TCE (10 ppm inicials) en cultius pre-crescuts amb micel·li dispers de *T. versicolor* en MD.



**Figura 5.20.** Evolució de la quantitat de TCE (10 ppm inicials) en cultius pre-crescuts amb micel·li dispers de *T. versicolor* en MEM.

L'addició d'oxigen pur i glucosa als 8 dies d'incubació provoca una desaparició addicional del contaminant, assolint el 57,0% (dia 11) i 69,8% (dia 14) en MD. En MEM també es produeix un estancament en el percentatge de degradació els dies 6 i 8 ( $23,6 \pm 2,5\%$ ), incrementant després de l'addició fins el 30,7% (dia 11) i 35,6% (dia 14).

En MD, l'addició de la glucosa i l'oxigen també es veu reflectida en un augment de la quantitat de clorurs alliberats en el medi. A la Figura 5.21 es comparen els resultats obtinguts en aquest experiment amb els assolits anteriorment amb pèl·lets en els que no s'afegia glucosa ni oxigen. Es pot observar com en els cultius amb micel·li dispers, la generació de clorurs augmenta progressivament fins el dia sisè, moment en el que s'estanca la degradació, i torna a incrementar-se després de l'addició d'oxigen i glucosa del vuitè dia. Aquest augment en els clorurs alliberats coincideix en el temps amb l'increment en la degradació que s'observa a la Figura 5.19. En el cas dels pèl·lets on no s'havia afegit glucosa ni oxigen, la producció de clorurs s'estabilitzava, de la mateixa manera que també ho feia el seu percentatge de degradació.



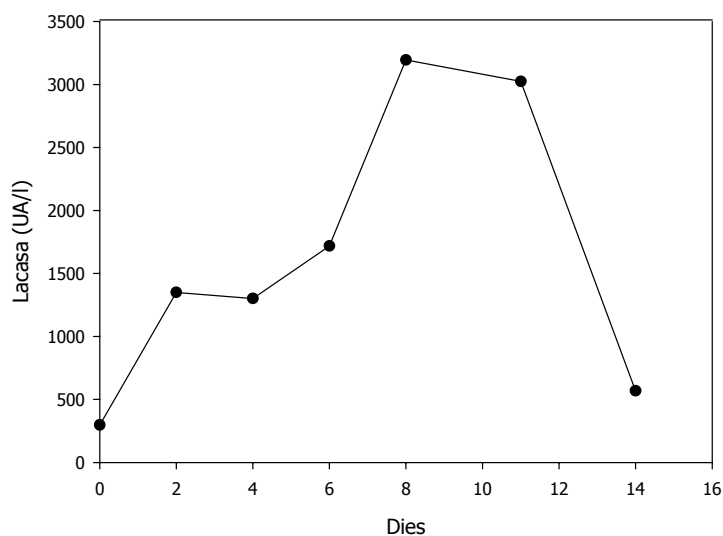
**Figura 5.21.** Evolució de la concentració de clorurs en el medi en cultius pre-crescuts de *T. versicolor* en micel·li dispers i amb pèl·lets en medi definit amb 10 ppm de TCE.

Aquestes dades indiquen que l'estancament en la degradació de TCE és possiblement deguda a l'exhauriment d'alguns dels factors limitants pel creixement del fong (nutrients i oxigen) i el control d'aquestes variables pot permetre introduir millores en el procés per augmentar la biodegradació. L'augment en la generació de clorurs s'havia observat anteriorment en pèl·lets quan s'afegia oxigen durant la incubació, però no es manifestava en un augment en el percentatge de degradació assolit.

A la Figura 5.19 es pot apreciar que en MD hi ha una adsorció considerable (diferència entre la quantitat de TCE en les ampolles abiòtiques i els cultius autoclavats) propera al 20%, mentre que en la Figura 5.20 podem comprovar que en MEM és molt menor, sent inferior al 10%. Si tenim en compte els diferents pesos secs de biomassa dels cultius autoclavats, veurem que pel MEM era de  $57,4 \pm 2,8$  mg i pel MD de  $36,1 \pm 3,6$  mg. Així, no és probable que l'adsorció estigui associada a una major quantitat de biomassa, donat que on s'aprecia més adsorció és on hi ha menys pes sec de fong. En canvi, una possible explicació és que l'adsorció estigui relacionada amb la morfologia del fong,

donat que en MEM *T. versicolor* creix en forma de pèl·lets mentre que en MD ho fa en forma d'una capa densa de micel·li.

D'altra banda, la lacasa es manté durant tot el període amb una activitat enzimàtica elevada en MD, superant les 1000 UA/l des del segon dia i assolint valors màxims lleugerament superiors a les 3000 UA/l (Figura 5.22), de manera anàloga a l'obtinguda anteriorment en condicions estàtiques (Figura 5.11).



**Figura 5.22.** Evolució de l'activitat extracel·lular de lacasa en cultius de *T. versicolor* en micel·li dispersos en medi definit amb 10 ppm de TCE.

A partir d'aquests resultats podem concloure, com era previsible, que l'addició del fong pre-crescut ja sigui en forma de micel·li dispersos o en pèl·let, minimitza la fase de latència que s'obtenia en els cultius que creixien en condicions estàtiques i que s'incubaven des de l'inici en forma de suspensió triturada amb el TCE. El fet que el fong ja es trobi crescut permet una major rapidesa en la degradació del contaminant. En tots els casos s'observa un increment important de la degradació als dos dies d'incubació, estabilitzant-se entre el quart i sisè dia, el que permet assolir uns nivells de degradació elevats en molt poc temps. En la majoria dels casos, l'aturament en el percentatge de degradació coincideix amb una disminució de la màxima activitat de la lacasa en els cultius.

Per a l'aplicació en bioreactor s'escull la morfologia en forma de pèl·lets. Els valors de degradació assolits en pèl·lets i micel·li dispersos són molt similars, sent propers al 60% entre el quart i sisè dia en les condicions testades. Tanmateix, la utilització de pèl·lets ofereix millors avantatges en la seva aplicació en bioreactors i garanteix un major control durant el procés.

L'addició simultània d'oxigen pur i glucosa durant la incubació té uns efectes positius en la degradació de TCE, augmentant tant el percentatge de degradació com l'alliberament de clorurs en els experiments amb micel·li dispersos. En el cas dels pèl·lets l'addició d'oxigen durant la incubació, per una banda, i la utilització de medis amb concentracions creixents de glucosa i nitrogen, per una altra,



augmenten la decloració de TCE però mantenen valors de degradació similars entre aquests tractaments.

### **5.3.3. Identificació dels subproductes de degradació de TCE per *T. versicolor***

En els dos estudis previs de degradació de TCE per *P. chrysosporium* s'havia demostrat la mineralització del contaminant fins a CO<sub>2</sub>. La constatació que el grau de mineralització era molt elevat respecte la degradació (38,5% mineralitzat i 46,2% degradat, segons Yadav *et al.*, 2000), fa que l'aplicació d'aquests fongs en estratègies de bioremediació pugui ser una estratègia més atractiva que la dels bacteris en condicions anaeròbies, que tendeixen a transformar el TCE a productes tòxics com el cis-DCE i CV. Tanmateix existeix la possibilitat de la generació de subproductes tòxics a partir de la degradació de TCE per fongs de podridura blanca i la seva identificació és un dels punts crítics que cal elucidar.

D'altra banda, com s'ha exposat anteriorment, el mecanisme de degradació de TCE emprat per *P. chrysosporium* no s'ha determinat clarament. Yadav *et al.* (2000) postula l'existència d'altres mecanismes alternatius al de les peroxidases, mentre que Khindaria *et al.* (1995) proposa la implicació de la LiP en la decloració reductiva del contaminant.

En aquest apartat es realitzen diferents experiments amb l'objectiu d'identificar els possibles subproductes de degradació de TCE i el mecanisme emprat per *T. versicolor*, per tal de suggerir una via de degradació de TCE per aquest fong.

Aquests experiments es realitzaren amb 10 ppm de [<sup>13</sup>C]-TCE en el líquid en condicions estàtiques i per triplicat. El fong es va inocular en forma de suspensió triturada. Per cada ampolla es va analitzar la fase gas per determinar si el TCE es mineralitzava a CO<sub>2</sub>, i posteriorment es va analitzar la fase líquida per ressonància magnètica nuclear (RMN) amb l'objectiu d'identificar altres possibles subproductes. En l'experiment per determinar la generació de CO<sub>2</sub> es varen introduir com a controls cultius del fong amb TCE no marcat isotòpicament. Per la identificació d'altres subproductes per RMN també es varen incloure ampolles abiòtiques amb [<sup>13</sup>C]-TCE.

El medi utilitzat va ser MD amb 16 g/l de glucosa per garantir que hi hagués suficient diòxid de carboni en la fase gas per realitzar l'anàlisi amb cromatografia de gasos i espectrometria de masses de relació isotòpica (CG-EMRI), tal i com s'explicarà més endavant. En condicions estàtiques havíem observat com la fase de latència s'allargava fins als 7 dies i s'assolia un estancament en la degradació a partir del dia 14 (Figura 5.10). Donat que ara teníem més concentració de glucosa, es va decidir allargar l'experiment i treure mostra els dies 21 i 30.

### 5.3.3.1. Mineralització de TCE

La producció de  $^{13}\text{CO}_2$  provinent del  $[^{13}\text{C}]$ -TCE es va analitzar mitjançant la tècnica de CG-EMRI. Aquesta tècnica mesura la relació isotòpica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  de la fase gas respecte a la d'un patró internacional V-PDB (Viena Pee Dee Belemnite). Aquesta relació isotòpica s'expressa en unitats de delta per mil ( $\delta^{13}\text{C}$ ), segons l'expressió:

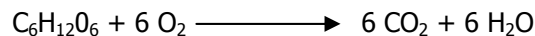
$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_s}{R_r} - 1 \right) \cdot 1000$$

On  $R_s$  i  $R_r$  són les relacions de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la mostra i la de l'estàndard V-PDB, respectivament.

Per tal d'utilitzar aquesta tècnica, era necessari que la mostra complís els següents requeriments:

- Una concentració mínima de  $\text{CO}_2$  total de 400 ppm a la fase gas.
- Una relació isotòpica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  inferior al 2%, donat que valors superiors saturen l'aparell.

Pel que respecta al primer requeriment, hi ha dues fonts de  $\text{CO}_2$  a la fase gas: la provinent del consum de glucosa i la present de forma natural en l'aire. Tot i que les mostres s'oxigenen durant 1 minut i es tanquen immediatament, possiblement resta una concentració de  $\text{CO}_2$  residual, però que no hem tingut en compte per ser restrictius. Quant a la glucosa, la reacció deguda al seu metabolisme pel fong seria:



i els mols de  $\text{CO}_2$  produïts, considerant que afegíem inicialment 16 g/l de glucosa en el medi:

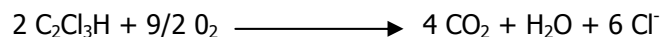
$$\frac{16 \text{ g glucosa}}{1} \cdot \frac{1 \text{ mol glucosa}}{180 \text{ g glucosa}} \cdot \frac{6 \text{ mol CO}_2}{1 \text{ mol glucosa}} \cdot 0,011 \text{ l medi} = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol CO}_2 \text{ generats}$$

Suposant que el rendiment en l'assimilació de la glucosa per part del fong és del 50%, els mols de  $\text{CO}_2$  alliberats serien de  $2,7 \cdot 10^{-3}$  mols  $\text{CO}_2$ . Considerant que el volum a la fase gas és de 151 ml, podem calcular la concentració de  $\text{CO}_2$  a la fase gas provinent del metabolisme de la glucosa:

$$\frac{2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol CO}_2}{0,151 \text{ l fase gas}} \cdot \frac{44 \text{ g CO}_2}{1 \text{ mol CO}_2} \cdot \frac{1000 \text{ mg CO}_2}{\text{g CO}_2} = 786,7 \text{ ppm CO}_2 \text{ a la fase gas}$$

Segons aquestes dades, amb 16 g/l superariem amb escreix els 400 ppm necessaris per realitzar l'anàlítica.

En quant a la relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , suposem que el TCE es mineralitza completament segons la reacció:



Sabent que la quantitat afegida de  $[^{13}\text{C}]$ -TCE a l'ampolla per assolir els 10 ppm al líquid és de 0,692 mg, que el  $[^{13}\text{C}]$ -TCE està marcat isotòpicament en els dos carbonis (99,9%) i suposant que el 100% del TCE es degrada i mineralitza (per sobredimensionar la quantitat de  $^{13}\text{C}$ ), tindríem:

$$0,692 \text{ mg } [^{13}\text{C}] - \text{TCE} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot \frac{1 \text{ mol } [^{13}\text{C}] - \text{TCE}}{133,4 \text{ g } [^{13}\text{C}] - \text{TCE}} \cdot \frac{4 \text{ mol } ^{13}\text{CO}_2}{2 \text{ mol } [^{13}\text{C}] - \text{TCE}} = 1,04 \cdot 10^{-5} \text{ mol } ^{13}\text{CO}_2$$

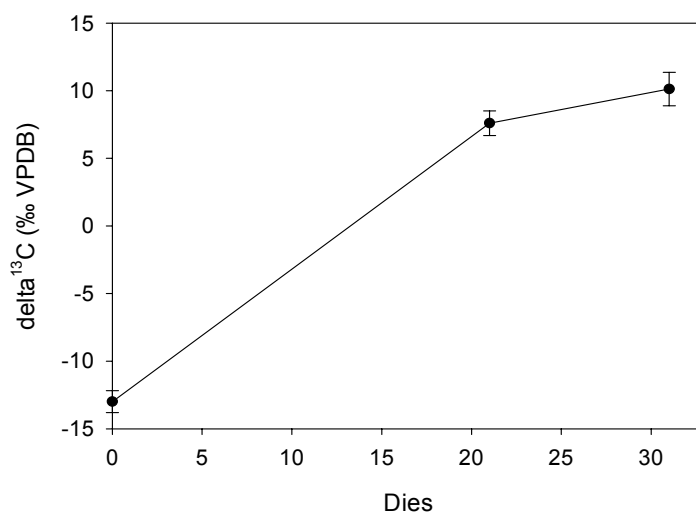
I la relació  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  es pot calcular segons:

$$\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} = \frac{1,04 \cdot 10^{-5} \text{ mol } ^{13}\text{CO}_2}{2,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol } ^{12}\text{CO}_2} \cdot 100 = 0,38\%$$

que és inferior al llinar del 2% que satura el sistema analític.

Per tant, sembla factible l'anàlisi de la quantitat de  $\text{CO}_2$  generada mitjançant aquesta metodologia.

A la Figura 5.23 es mostra l'increment en el valor de la  $\delta^{13}\text{C}$  en els cultius on s'ha afegit  $[^{13}\text{C}]$ -TCE. La mitjana per a tots els valors de  $\delta^{13}\text{C}$  dels cultius amb TCE sense marcar isotòpicament va ser de  $-13,8 \pm 0,8\%$  (VPDB). Això demostra que l'augment de la  $\delta^{13}\text{C}$  en els cultius amb  $[^{13}\text{C}]$ -TCE és deguda a la generació de  $^{13}\text{CO}_2$  provinent de la mineralització del producte. Els valors de  $\delta^{13}\text{C}$  als 21 i 30 dies són similars i molt probablement els valor màxims de generació de  $^{13}\text{CO}_2$  s'hagin produït entre la primera i segona setmana d'incubació, paral·lelament a la degradació obtinguda anteriorment en aquest període pels cultius amb 8 g/l de glucosa (veure Figura 5.10a).



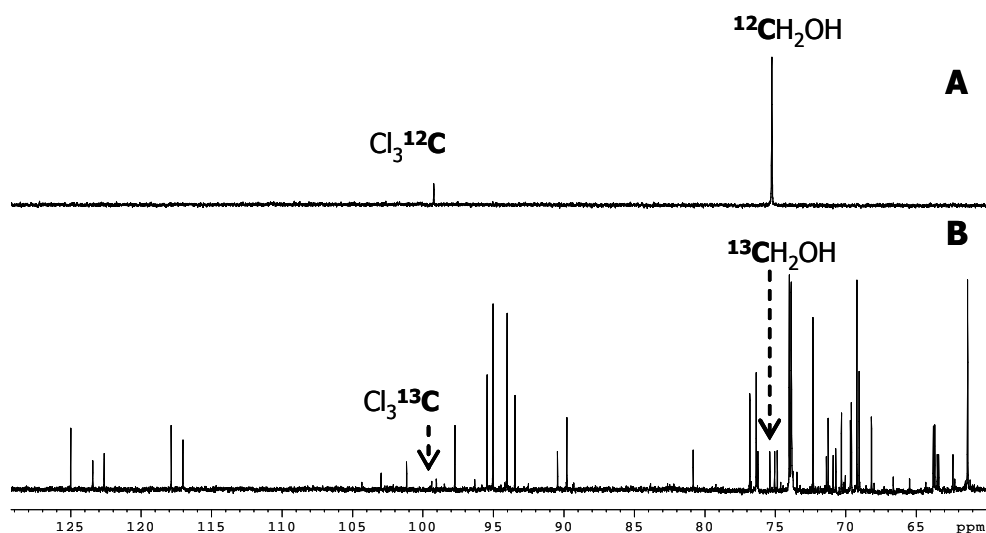
**Figura 5.23.** Evolució de la  $\delta^{13}\text{C}$  de  $\text{CO}_2$  en cultius de *T. versicolor* amb 10 ppm de  $[^{13}\text{C}]$ -TCE

Malauradament, no es va poder determinar el percentatge de mineralització sobre la degradació donat que no es va calcular la concentració real de diòxid de carboni a les ampolles. Per tant, aquest resultat només ens indica la capacitat de *T. versicolor* per mineralitzar el TCE. Les dades que havíem obtingut anteriorment de la producció de clorurs en el medi estableixen un valor de 52,9% declarat sobre la quantitat degradada, el que podria prendre's com a valor orientatiu del percentatge de mineralització assolit pel fong en el cas que no es generessin més subproductes que impliquessin la declaració de TCE.

### 5.3.3.2. Subproductes a la fase líquida mitjançant RMN

Un estudi detallat dels pics obtinguts en l'anàlisi per cromatografia de gasos per a la quantificació de TCE en les ampolles (veure apartat 3.5.2.1) va evidenciar que es visualitzava un pic incipient en les ampolles experimentals a un temps de retenció de 8,000 minuts que augmentava a mesura que ho feia la degradació de TCE. Aquest pic no apareixia ni en les ampolles amb fong autoclavat ni en les abiòtiques.

Es va procedir a la identificació de possibles subproductes de degradació mitjançant l'anàlisi per RMN de la fase líquida dels experiments realitzats amb  $[^{13}\text{C}]$ -TCE. L'avantatge d'aquesta anàlisi realitzada amb productes amb els carbonis marcats isotòpicament és que la sensibilitat és molt més elevada i permet identificar concentracions molt baixes de subproducte. En el nostre cas, a més, al tenir els dos carbonis del TCE marcats es produeixen dos senyals degudes a l'acoblament carboni-carboni, el que permet confirmar que el subproducte identificat prové del producte original. Els espectres obtinguts amb la mostra líquida dels cultius de *T. versicolor* amb  $[^{13}\text{C}]$ -TCE als 30 dies es van comparar amb els dels possibles subproductes purs no marcats isotòpicament. Aquests possibles subproductes van ser escollits a partir dels descrits en les vies de degradació per bacteris (veure Figura 5.4), i els estàndards analitzats varen ser àcid fòrmic, cloroform, àcid tricloroacètic, 2,2,2-tricloroetanol, cloral i àcid dicloroacètic. A la Figura 5.24B es pot observar l'espectre obtingut per RMN de la fase líquida dels cultius de *T. versicolor* amb  $[^{13}\text{C}]$ -TCE, mentre que a la Figura 5.24A es troba l'espectre del 2,2,2-tricloroetanol pur sense marcar isotòpicament.

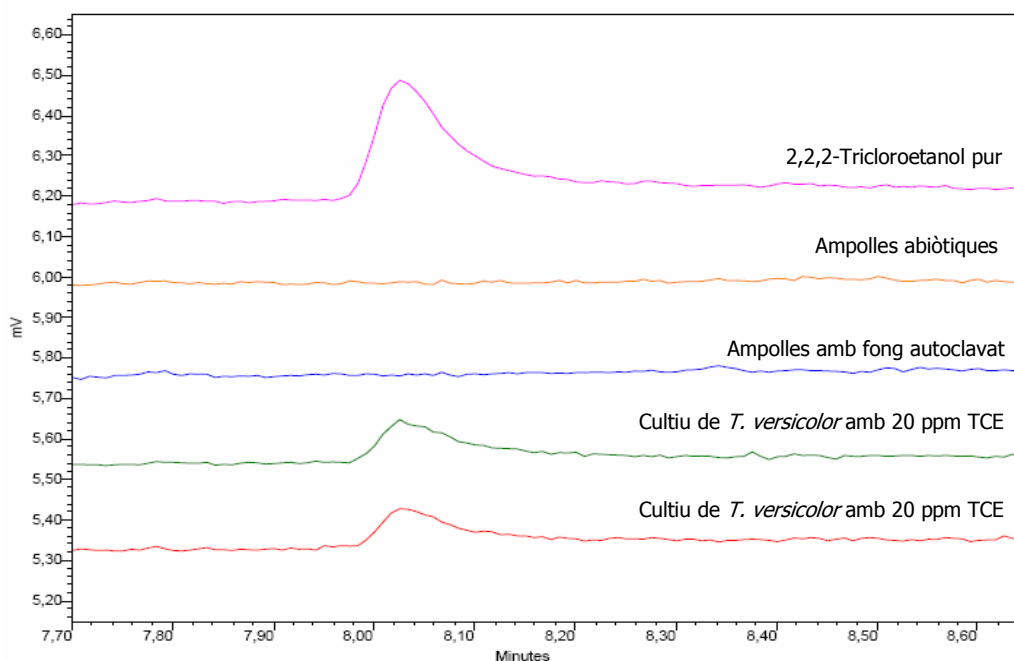


**Figura 5.24.** Espectre obtingut per RMN per a la identificació dels subproductes de la degradació de TCE per *T. versicolor*. Espectre de 2,2,2-tricloroetanol pur (A) i de la mostra incubada amb 10 ppm de  $[^{13}\text{C}]$ -TCE amb el fong.

La presència de 2,2,2-tricloroetanol ( $\text{Cl}_3\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) en els cultius de *T. versicolor* es va confirmar per la presència d'un sistema d'espins del tipus AX a uns desplaçaments químics de 99,3 i 75,2 ppm, que concorden amb els del 2,2,2-tricloroetanol. A la Figura 5.24 s'assenyala a quins carbonis de la

molècula del 2,2,2-tricloroetanol pertanyen els espins dels espectres. Cadascun d'aquestes senyals apareix com un doblet separat a una distància de 43 Hz degut a l'acoblament C-C, donat que els dos carbonis del 2,2,2-tricloroetanol identificat estan marcats amb carboni-13, el que confirma que prové del  $[^{13}\text{C}]$ -TCE. A les ampolles abiòtiques amb  $[^{13}\text{C}]$ -TCE no va aparèixer el pic del 2,2,2-tricloroetanol, el que confirma l'origen biòtic del subproducte.

Per tal de confirmar si el pic obtingut en el cromatograma provenia realment del 2,2,2-tricloroetanol, es va injectar aquest producte pur en el cromatògraf, sota les mateixes condicions amb les que s'analitzen les mostres experimentals de TCE. Es va preparar una solució mare de 27 ppm de 2,2,2-tricloroetanol i es va fer una dilució 1:5 amb azida sòdica en el vial de 10 ml en el que s'analitzen habitualment les mostres. A la Figura 5.25 es troba el cromatograma assolit amb 2,2,2-tricloroetanol pur, comparat amb el de mostres experimentals de 20 ppm de TCE amb MD als 7 dies d'incubació amb *T. versicolor* i un cultiu autoclavat i un altre abiòtic. S'observa que el temps de retenció pel 2,2,2-tricloroetanol coincideix amb el pic no identificat de les ampolles experimentals, i que aquest no apareix ni en els cultius autoclavats ni en els no inoculats, confirmant que el subproducte identificat prèviament en el cromatograma correspon a 2,2,2-tricloroetanol i que, novament, l'origen d'aquest subproducte és biòtic.



**Figura 5.25** Comparació del pic assolit amb 2,2,2-tricloroetanol pur amb el dels cromatogrames d'ampolles experimentals que contenen 20 ppm de TCE amb *T. versicolor* als 7 dies d'incubació, cultiu amb fong autoclavat i ampolla abiòtica.

No s'ha pogut quantificar el 2,2,2-tricloroetanol a les ampolles donat que les concentracions obtingudes en aquests experiements estan molt per sota del rang de quantificació mínima que permet aquesta tècnica (>100 ppm).

La generació de 2,2,2-tricloroetanol a partir de TCE ha estat descrita principalment per bacteris metanòtrofs durant el seu co-metabolisme aerobi (veure Figura 5.4). Aquests microorganismes degraden el TCE mitjançant la metà monooxigenasa soluble (sMMO), produint d'una banda el TCE-epòxid i d'una altra el 2,2,2-tricloroacetaldehid (o cloral). La formació d'aquests productes per bacteris metanòtrofs va ser descrita primerament per la soca *M. trichosporium* OB3b (Oldenhuis *et al.*, 1991), i posteriorment es va estendre a altres soques productores de sMMO. El TCE-epòxid és el producte majoritari i es transforma ràpidament de forma abiòtica en el medi generant diferents subproductes, que poden convertir-se posteriorment a diòxid de carboni (Hashimoto *et al.*, 2002). El cloral, més estable que el TCE-epòxid, només suposa aproximadament un 6% del total del TCE degradat. Degut a la preponderància de la forma hidratada d'aquest aldehid en el medi, habitualment es fa referència a l'hidrat de cloral en comptes del cloral. Aquests cultius metanotròfics poden catalitzar la reducció de l'hidrat de cloral fins a 2,2,2-tricloroetanol, o bé oxidar-lo fins a àcid tricloroacètic. El mecanisme enzimàtic implicat en la transformació de l'hidrat de cloral fins a 2,2,2-tricloroetanol i àcid tricloroacètic encara no ha estat establert, tot i que se sap que la metanol dehidrogenasa pot oxidar l'hidrat de cloral i que els metanòtrofs poden expressar aquest enzim (Newman i Wackett, 1991). Només un bacteri oxidant de propà, *Mycobacterium vaccae* JOB-5, s'ha demostrat capaç de degradar el TCE fins a cloral i 2,2,2-tricloroetanol, sent aquests productes el 25% del TCE degradat (Vanderberg *et al.*, 1995).

D'altra banda, també s'ha descrit la formació de 2,2,2-tricloroetanol en mamífers mitjançant el sistema oxidatiu del citocrom P450. En aquest cas, el TCE es transformaria a la forma TCE-O-P450 o TCE-epòxid i posteriorment es formaria l'hidrat de cloral, el qual seria reduït fins a 2,2,2-tricloroetanol (veure Figura 5.6). A diferència de la via bacteriana, l'hidrat de cloral és el producte majoritari de degradació. S'ha proposat que la reducció de l'hidrat de cloral a 2,2,2-tricloroetanol per mamífers pot estar catalitzada per l'alcohol deshidrogenasa (Larson i Bull, 1989; Müller *et al.*, 1975) o bé per la isoforma del citocrom P450 CYP2E1 (Schultz i Weiner, 1979). Malgrat tot, encara no s'ha determinat el paper precís de cada un d'aquests enzims en la reducció d'hidrat de cloral a 2,2,2-tricloroetanol (Lash *et al.*, 2000).

Dels subproductes identificats durant la degradació de TCE per *T. versicolor* en aquest treball amb [<sup>13</sup>C]-TCE, 2,2,2-tricloroetanol i diòxid de carboni, només aquest darrer provocaria un alliberament de clorurs en el medi ja que el 2,2,2-tricloroetanol mantindria en la seva molècula els tres clors inicials. D'aquesta manera, i considerant que no es formessin subproductes addicionals que no hagin estat detectats, els clorurs calculats anteriorment en el medi es poden considerar una mesura indirecta de la mineralització del TCE fins a CO<sub>2</sub>. A partir d'aquest supòsit, i considerant els balanços de clorurs realitzats al llarg del capítol, podem considerar que el 52,9% del TCE degradat es mineralitzaria a CO<sub>2</sub> i el 47,1% restant es transformaria a 2,2,2-tricloroetanol.

El 2,2,2-tricloroetanol és considerat un producte nociu que pot ser tòxic en contacte amb la pell o òrgans sensibles en estat pur (≥99%) (Sigma Aldrich, 2006). No s'han trobat dades addicionals sobre la perillositat d'aquest producte. De totes maneres, i amb la informació disponible, tot i no ser

un producte innoeu en el medi no és tant perillós com el CV i els dicloroetilens produïts durant la decoloració reductiva anaeròbia del TCE per bacteris.

#### 5.3.4. Estudi de la via de degradació de TCE per *T. versicolor*

Com hem vist a l'apartat anterior, els dos subproductes identificats en la degradació de TCE per *T. versicolor* han estat el diòxid de carboni i el 2,2,2-tricloroetanol, als que cal sumar els clorurs que s'han quantificat al llarg del capítol. En les vies descrites tant per bacteris com mamífers, la producció de 2,2,2-tricloroetanol s'assoleix en dues etapes: la formació d'hidrat de cloral a partir del TCE i posteriorment la seva reducció fins a 2,2,2-tricloroetanol. El diòxid de carboni, en canvi, es pot formar a partir del metabolisme bacterià dels subproductes formats a partir de la descomposició del TCE-epòxid.

La hipòtesis de la possible implicació de la lacasa en la degradació de TCE està basada en el fet que la davallada de la màxima activitat d'aquest enzim coincideix amb l'estancament en la degradació del contaminant. Alhora, s'havia observat que el TCE era un inductor d'aquest enzim i les activitats de lacasa han estat molt elevades durant tot el procés de degradació.

L'oxidació per lacasa està generalment limitada als compostos aromàtics que contenen un grup fenòlic, però en presència de compostos de baix pes molecular anomenats mediadors, pot oxidar diverses estructures no fenòliques. La principal font d'aplicació d'aquests mediadors es troba a la indústria paperera en els processos de blanqueig, donat que permeten l'oxidació d'alcohols benzílics o fenols o-eterificats (substrats no fenòlics) i inhibeixen alhora la repolimerització dels radicals oxidats. Tanmateix, entre els inconvenients per l'aplicació a escala industrial d'aquests mediadors es troba el seu cost elevat i la seva toxicitat. L'anomenat sistema lacasa-mediador va ser descrit per primera vegada per Bourbonnais i Paice (1990), els quals van utilitzar la sal de diamoni de l'àcid 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfònic (ABTS) per assolir l'oxidació de substrats no fenòlics, però des de llavors s'han desenvolupat d'altres com l'àcid volúric (AV), 3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenol (DMHAF) i l'hidrat 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT). El sistema lacasa-mediador també s'ha emprat per la decoloració d'efluents provinents de la indústria tèxtil (Knutson i Ragauskas, 2004; Wong i Yu, 1999) i per la degradació d'altres compostos xenobiòtics com alquens o hidrocarburs policíclics aromàtics (Niku-Paavola i Viikari, 2000; Han *et al.*, 2004; Majcherczyk *et al.*, 1998).

Tot i que generalment s'ha associat la capacitat degradadora dels fongs de podridura blanca a les peroxidases i lacases, hi ha estudis en els que es demostra que aquests sistemes enzimàtics no es troben implicats (Jackson *et al.*, 1999; Kullman i Matsumura, 1996; Yadav i Reddy, 1993; Yadav *et al.*, 2000). Entre els possibles mecanismes enzimàtics alternatius usats pels fongs es troben les monooxigenases pertanyents al sistema citocrom P450 (van den Brink *et al.*, 1998). Recentment s'han identificat i caracteritzat per primer cop els gens del citocrom P450 per *T. versicolor* (Ichinose *et al.*, 2002). En *P. chrysosporium*, que habitualment és usat com a model en els estudis fisiològics, bioquímics i genètics per la degradació de contaminants en els fongs de podridura blanca, es va trobar

que contenia almenys 97 gens del sistema P450. Aquesta observació va mostrar la riquesa dels fongs en aquest sistema enzimàtic i ha portat a nous estudis sobre el seu paper i la seva regulació en els fongs (Yadav *et al.*, 2003; Doddapaneni i Yadav, 2004). A partir d'estudis d'inhibició, s'ha suggerit la implicació del citocrom P450 en la degradació de compostos organosulfurats (Van Hamme *et al.*, 2003; Ichinose *et al.*, 1999) i de difenils èters halogenats (Hundt *et al.*, 1999) per *T. versicolor*. També s'ha suggerit la implicació del citocrom P450 en la degradació de pesticides organofosforats i hidrocarburs policíclics aromàtics en els fongs de podridura blanca *P. chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* i *Pleurotus ostreatus* (Jauregui *et al.*, 2003; Kanaly i Hur, 2006; Bezalel *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 2003).

Un indicatiu que feia plausible la implicació del citocrom P450 en la degradació de TCE per *T. versicolor* era el fet que tant en bacteris com en mamífers la transformació de TCE es produïa a partir d'oxigenases. Aquests experiments amb *T. versicolor* es van realitzar amb l'inhibidor 1-aminobenzotriazol (ABT), que inactiva el citocrom P450 a partir de l'alquilació del seu grup hemo prostètic (Ortiz de Montellano *et al.*, 1984).

En aquest apartat s'estudia el paper que pot tenir la lacasa (mitjançant el sistema lacasa-mediador) i el citocrom P450 en la degradació de TCE per *T. versicolor*. D'altra banda, per tal de comprovar si el cloral pot ser un possible intermediari de degradació, s'han realitzat diferents experiments *in vitro* i *in vivo* per observar si podia ser degradat per *T. versicolor* i si els subproductes de degradació coincidien amb els assolits amb el TCE. Per últim, s'ha estudiat si era plausible la degradació de 2,2,2-tricloroetanol en cultius *in vivo* de *T. versicolor*.

#### 5.3.4.1. Estudis *in vitro* amb lacasa comercial i mediadors

En aquests experiments es van testar diferents mediadors (DMHAF, ABTS, HOBT i AV) amb aproximadament 5000 UA/l de lacasa per comprovar si era possible degradar 10 ppm en el líquid de TCE. Es van fer triplicats per a cada tractament i es varen incubar durant 24 hores en agitació. A la Taula 5.4 es pot observar que no es va obtenir desaparició de TCE en les ampolles experimentals en relació als controls. Per a cada tractament es va realitzar també una analítica dels clorurs presents en el medi.

**Taula 5.4.** TCE i clorurs en experiments amb diferents sistemes lacasa-mediador amb 10 ppm de TCE en el líquid a temps final

	TCE ( $\mu\text{mol}$ )	Clorurs ( $\mu\text{mol}$ )
<b>Control</b>	5,49 $\pm$ 0,45	0,031
<b>Lacasa (sense mediador)</b>	5,39 $\pm$ 0,16	0,032
<b>DMHAF</b>	5,56 $\pm$ 0,23	0,024
<b>ABTS</b>	5,21 $\pm$ 0,28	0,073
<b>HOBT</b>	5,79 $\pm$ 0,16	0,086
<b>AV</b>	5,72 $\pm$ 0,23	0,105



Es pot comprovar com la quantitat de clorurs, tot i ser lleugerament superiors en alguns mediadors com l'AV, HOBT i ABTS respecte el control, es troba molt per sota de l'esperada en el cas que hi hagués una dechloració de TCE i es considera que no són significatives.

Aquests resultats no permeten demostrar que la lacasa estigui implicada en la primera fase de la degradació de TCE.

#### 5.3.4.2. Estudis *in vivo* amb inhibidor del citocrom P450

La possible implicació del citocrom P450 es va comprovar a partir d'experiments d'inhibició afegint 1 mM ABT a cultius de pèl·lets de *T. versicolor* inoculats en MD amb 10 ppm de TCE en el líquid. Aquests experiments es van fer per triplicat i el temps d'incubació de les mostres va ser de 7 dies.

Els resultats obtinguts suggereixen que el citocrom P450 es troba implicat en el procés de degradació de TCE. Podem assenyalar tres evidències principals. En primer lloc, i tal com s'observa a la Taula 5.5, hi ha una desaparició substancial de TCE en els cultius sense ABT comparada amb la dels cultius autoclavats i els que contenen l'inhibidor.

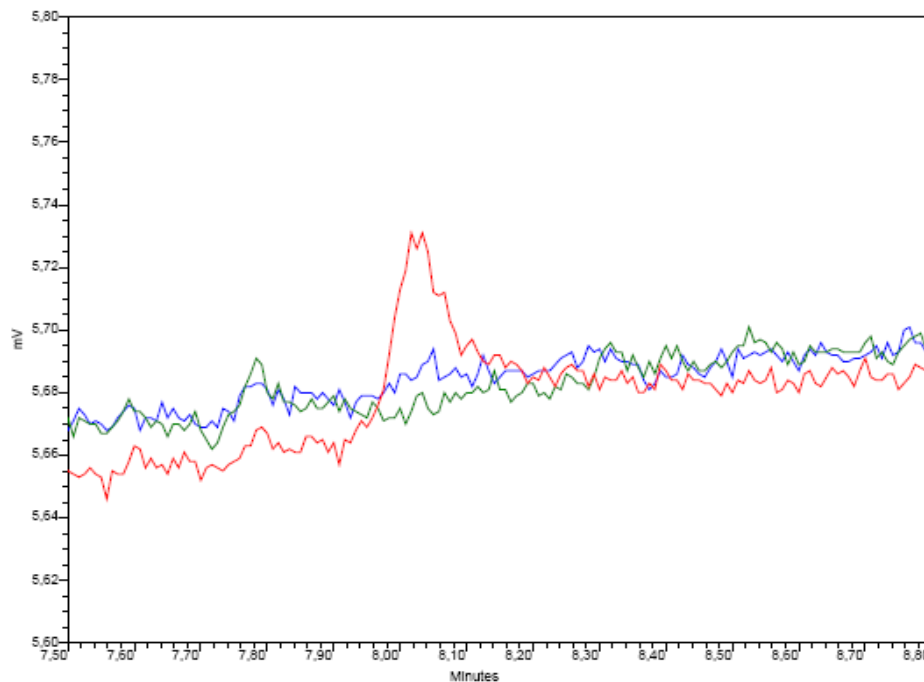
En segon lloc als cultius sense inhibidor, a diferència del que succeeix amb les ampolles amb fong autoclavat i amb inhibidor, hi ha generació de clorurs. En els cultius on s'afegeixen pèl·lets sempre hi ha una petita quantitat de clorurs provinents, amb tota probabilitat, de la seva fase de creixement prèvia en MEM. Durant el treball d'aquesta Tesi, la quantitat de clorurs en els cultius autoclavats s'ha emprat com a blanc i s'ha restat aquests valors als de les ampolles experimentals per quantificar el clorur provinent realment de la dechloració de la molècula de TCE. En aquest cas, el contingut de clorurs en les ampolles autoclavades i en les que contenen l'inhibidor han estat molt similars, de  $3,2 \pm 0,6$  i  $3,3 \pm 0,5$   $\mu\text{mol}$ , respectivament. En les ampolles sense inhibidor, la quantitat de clorurs total obtinguda ha estat de  $7,6 \pm 0,2$ .

**Taula 5.5.** Efecte de l'inhibidor del citocrom P450 1-aminobenzotriazol (ABT) en la degradació de TCE després de 7 dies d'incubació

	TCE ( $\mu\text{mol}$ )	Clorurs ( $\mu\text{mol}$ ) <sup>1</sup>	Lacasa (UA/l)	Biomassa (mg)
<b>Controls amb fong sense ABT</b>	$1,95 \pm 0,11$	$4,4 \pm 0,8$	$3320 \pm 304$	$38,3 \pm 0,8$
<b>Cultius amb fong amb 1 mM ABT</b>	$4,68 \pm 0,11$	0	$12689 \pm 560$	$40,7 \pm 3,1$
<b>Controls amb fong autoclavat</b>	$5,08 \pm 0,42$	0		$37,0 \pm 0,8$

<sup>1</sup> Els  $\mu\text{mol}$ s de clorurs que es presenten són els alliberats pel trencament de la molècula de TCE, de manera que s'ha restat el valor total de clorurs presents en cada tractament dels cultius autoclavats.

Per últim, en els cromatogrames obtinguts per cromatografia de gasos de les ampolles sense inhibidor s'observa l'aparició d'un pic incipient de 2,2,2-tricloroetanol, el subproducte identificat en la degradació de TCE per *T. versicolor*, mentre que en els cultius autoclavats i amb inhibidor aquest pic no apareix (Figura 5.26).



**Figura 5.26.** Cromatogrames on apareix un pic incipient de 2,2,2-tricloroetanol en cultius de *T. versicolor* amb 10 ppm de TCE en MD sense inhibidor (—), i no apareix en els cultius amb inhibidor (—) i fong autoclavat (—).

Si considerem els clorurs alliberats i el TCE degradat i calculem el percentatge del TCE degradat que es decloraria completament, obtenim un valor del 47,3%. Aquest valor és de l'ordre de l'obtingut en els experiments anteriors i que es situava al voltant del 50%. Semblaria, doncs, que es ratificaria la hipòtesis que aproximadament la meitat del TCE degradat es mineralitzaria completament a  $\text{CO}_2$  i la resta passaria a 2,2,2-tricloroetanol.

Els valors d'activitat de la lacasa en els cultius amb ABT són anormalment elevats. Això és degut a que aquest inhibidor és un substrat de la lacasa i per tant durant l'anàlisi interfereix donant valors superiors als reals. Per tal de comprovar-ho, es va fer el test d'anàlisi de la lacasa amb una solució a partir de lacasa liofilitzada de *T. versicolor*. Paral·lelament, a aquesta solució se li va afegir 1 mM d'ABT. Aquest assaig es va fer per duplicat, donant en els medis que contenien només lacasa un valor de  $5793 \pm 184$  UA/l, i els que contenien ABT  $9204 \pm 835$  UA/l.

Els valors de biomassa obtinguts en els cultius amb i sense inhibidor són similars i per tant no semblaria que l'ABT interferís negativament en el metabolisme del fong.

Aquests resultats indiquen que l'inhibidor ABT inhibeix la degradació de TCE, suggerint que el citocrom P450 juga un paper clau en la degradació d'aquest contaminant. Aquesta dada és rellevant donat que *T. versicolor* utilitzaria el mateix sistema enzimàtic que el descrit pels mamífers per a la degradació de TCE.

### 5.3.4.3. Estudis de degradació *in vivo* i *in vitro* dels possibles intermediaris

En els mamífers, on la via de degradació de TCE és la del citocrom P450, el producte resultant és l'hidrat de cloral, que posteriorment es redueix a 2,2,2-tricloroetanol. En aquest apartat es realitzen diferents experiments per comprovar si el cloral pot ser un possible intermediari en la degradació de TCE per *T. versicolor*. Si aquesta hipòtesis fos certa, els productes resultants de la seva degradació haurien de ser 2,2,2-tricloroetanol (que identificaríem com a pic en el cromatograma) i/o diòxid de carboni (que identificaríem pels clorurs alliberats en el medi). Així, s'estudiarà si el cloral pot ser degradat pel sistema lacasa-mediador o pel citocrom P450 del fong. Per últim, també es vol comprovar si és possible una degradació addicional del 2,2,2-tricloroetanol per *T. versicolor*.

#### ***Estudi de degradació de cloral in vitro amb lacasa comercial i mediadors***

L'hidrat de cloral es transforma a cloroform abiòticament a pH bàsics i temperatura elevada (Newman i Wackett, 1991). Utilitzant el mateix procediment analític que amb el TCE per l'anàlisi de cloral (cromatografia de gasos) en el cromatograma s'identifica clarament el pic de cloroform amb un temps de retenció de 3,150 min. Això és degut a què el vial que conté la mostra s'escalfa durant 50 min a 85 °C en el carrusel del *headspace* abans d'injectar-se al cromatògraf, tot i que el pH del medi és àcid (4,5).

De manera anàloga a com s'ha realitzat amb el TCE anteriorment, s'han testat els diferents mediadors de lacasa en medis que contenen 5 ppm en el líquid de cloral i s'ha realitzat un duplicat per cada tractament. S'ha utilitzat una constant de Henry de  $1,202 \cdot 10^{-7}$  per al cloral (Betterton i Hoffmann, 1988), que evidencia la baixa volatilitat d'aquest producte.

A la Taula 5.6 es troben els resultats obtinguts per cada tractament, calculant la concentració de cloral en els vials indirectament a partir del cloroform generat.

**Taula 5.6.** Cloroform i clorurs en experiments amb diferents sistemes lacasa-mediador amb 5 ppm de cloral en el medi líquid a temps final

	Cloroform ( $\mu\text{mol}$ )	Clorurs ( $\mu\text{mol}$ )
<b>Control</b>	0,285 $\pm$ 0,009	0,514
<b>Lacasa (sense mediador)</b>	0,296 $\pm$ 0,012	0,454
<b>DMHAF</b>	0,263 $\pm$ 0,007	0,520
<b>ABTS</b>	0,292 $\pm$ 0,010	0,487
<b>HOBT</b>	0,287 $\pm$ 0,012	0,573
<b>AV</b>	0,263 $\pm$ 0,008	0,490

Els 5 ppm de cloral en els 10 ml de medi corresponen a 0,33  $\mu\text{mol}$ s de cloral (considerant que tot el producte està en el medi líquid donada la baixa volatilitat del producte tal i com es desprèn de la seva constant de Henry). Com es pot observar a la Taula 5.6, aquest valor és molt similar als  $\mu\text{mol}$ s de cloroform obtinguts a partir del medi líquid de les ampolles experimentals. Aquestes dades

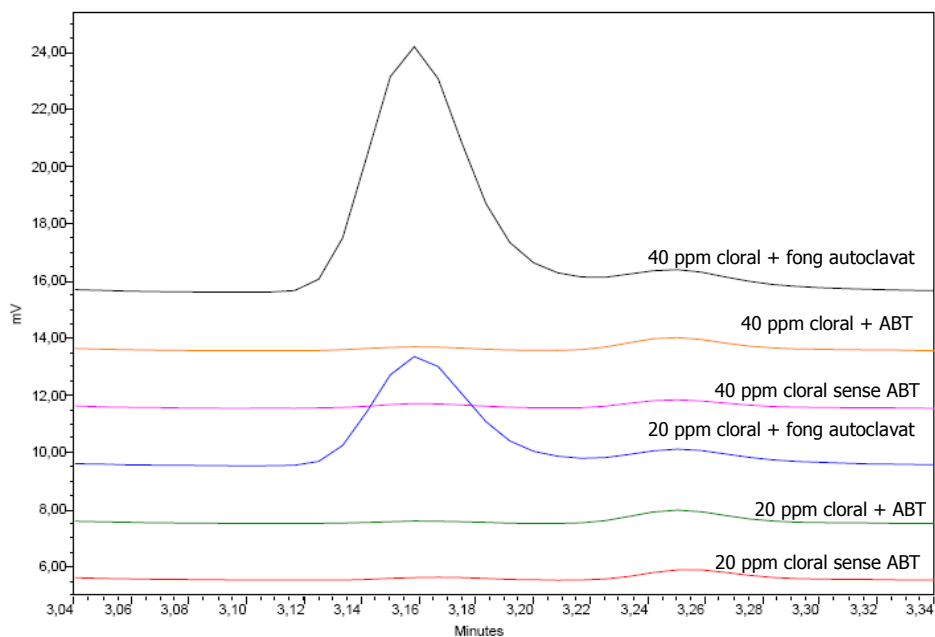
corroboren que el cloral passa completament a cloroform després de l'escalfament al *headspace*, i que no hi ha una desaparició de cloral en les ampolles degudes al sistema lacasa-mediadors.

D'altra banda, es van analitzar els clorurs d'una mostra per cada tractament. Es pot observar que la quantitat present a cada tractament és molt similar. Tot i que l'evidència de que no ha desaparegut cloral és clara, aquesta mesura corrobora que no hi ha hagut un trencament de la molècula que provoqui alliberament de clorurs. Els  $\mu\text{mols}$  de clorurs analitzats són superiors als assolits en l'experiment pel TCE amb el sistema lacasa-mediador. Aquest augment en els clorurs és possiblement degut a la presència d'una baixa concentració d'impropis clorats al cloral.

### **Estudis de degradació de cloral in vivo amb inhibidor del citocrom P450**

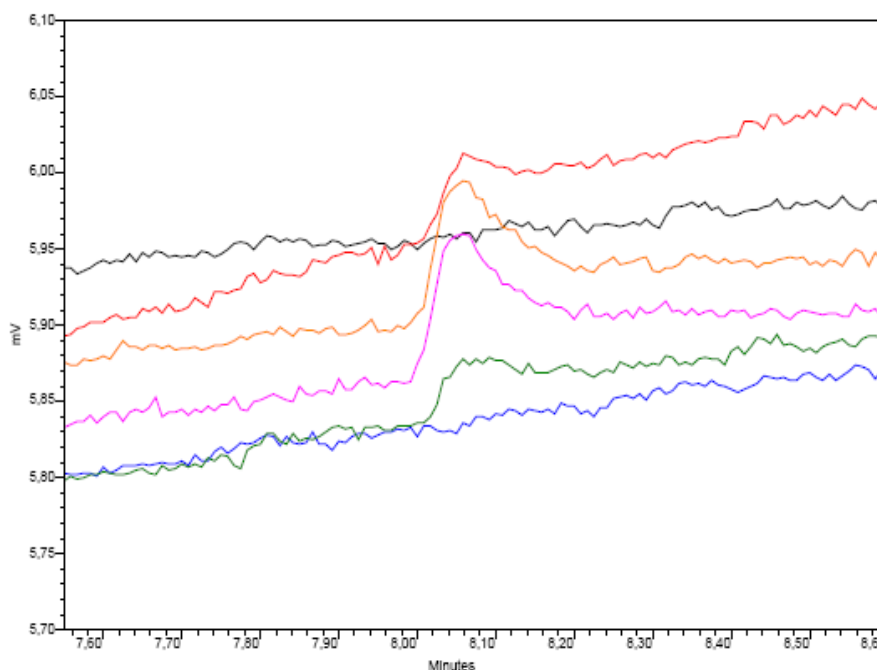
Com s'ha esmentat anteriorment, en mamífers la transformació d'hidrat de cloral a 2,2,2-tricloroetanol pot estar catalitzada per la isoforma del citocrom P450 CYP2E1 (Schultz i Weiner, 1979). Per tal de comprovar si *T. versicolor* era capaç de degradar el cloral, d'una banda, i si el citocrom P450 es trobava implicat, d'una altra, es va realitzar un experiment amb l'inhibidor ABT. De manera anàloga a com s'ha realitzat anteriorment pel TCE, es va afegir 1 mM d'ABT a cultius de *T. versicolor* i es van incloure ampolles sense inhibidor i amb el fong autoclavat, per triplicat. Es varen afegir tres concentracions diferents de cloral, de 5, 20 i 40 ppm en el líquid.

Després de 7 dies d'incubació, el cloral (identificat indirectament a partir del cloroform) desapareixia completament en els cultius amb i sense inhibidor per a totes les concentracions testades, tal i com s'observa a la Figura 5.27 per a les concentracions de 20 i 40 ppm de cloral.



**Figura 5.27.** Cromatogrames obtinguts després de 7 dies d'incubació on apareixen els pics de cloroform provinents del cloral en cultius amb fong autoclavat amb 20 i 40 ppm de cloral. No apareixen pics provinents del cloral en les ampolles amb fong sense i amb inhibidor amb 20 i 40 ppm de cloral.

Alhora, també s'observaren pics incipients de 2,2,2-tricloroetanol a un temps de retenció de 8,000 minuts en les ampolles amb 20 i 40 ppm de cloral amb i sense inhibidor, mentre que a les ampolles amb fong autoclavat no apareixien. Tal i com es pot observar a la Figura 5.28, el pic de 2,2,2-tricloroetanol és més evident a concentracions de 40 ppm de cloral que en 20 ppm. En els cultius amb 5 ppm de cloral, tot i que el producte desapareixia, no s'observava la producció de 2,2,2-tricloroetanol.



**Figura 5.28.** Cromatogrames on apareixen pics incipients de 2,2,2-tricloroetanol provinents de la degradació del cloral en cultius de *T. versicolor* sense inhibidor amb 20 ppm (—) i 40 ppm (—) i amb inhibidor a 20 ppm (—) i 40 ppm (—) de cloral. El pic no apareix en les ampolles amb fong autoclavat amb 20 ppm (—) i 40 ppm (—) de cloral.

Paral·lelament, també s'observa la generació de clorurs en els medis de cultiu. A la Taula 5.7 es calcula el percentatge de cloral completament dechlorat. Donat que dels dos subproductes possibles, 2,2,2-tricloroetanol i diòxid de carboni, aquest darrer és l'únic que porta associat la producció de clorurs, els resultats d'aquesta Taula es poden entendre com percentatge de cloral mineralitzat sobre el degradat. Els resultats obtinguts a la Taula 5.7 indiquen que la transformació de cloral a 2,2,2-tricloroetanol i a diòxid de carboni és una reacció competitiva, en la que la producció de 2,2,2-tricloroetanol es veuria afavorida a concentracions elevades de cloral i la seva mineralització a concentracions baixes.

**Taula 5.7.** Percentatge de cloral completament dechlorat per a diferents concentracions del producte<sup>1</sup>

	Cloral (ppm)		
	5	20	40
<b>Cultius amb fong amb 1mM ABT</b>	41,7%	9,8%	3,0%
<b>Controls amb fong sense ABT</b>	36,7%	9,3%	1,2%

<sup>1</sup> Aquest percentatge s'ha calculat dividint els clorurs generats entre els clorurs estequiomètrics generats a partir de la degradació de cloral (considerant que per cada  $\mu\text{mol}$  de cloral degradat s'alliberen 3  $\mu\text{mols}$  de clorurs).

El fet que a concentracions de cloral de 5 ppm no es detectés cap pic de 2,2,2-tricloroetanol és possiblement degut a que en aquest cas la reacció es troba més desplaçada a la mineralització que a concentracions més elevades de cloral, i es produiria una concentració massa baixa de 2,2,2-tricloroetanol com per ser detectada pel cromatògraf de gasos. Així, segons els càlculs que es poden realitzar a partir de la Taula 5.7, es generarien aproximadament un total de 0,16  $\mu\text{mols}$  de 2,2,2-tricloroetanol pels 5 ppm de cloral, mentre que pels 20 i 40 ppm de cloral es produirien 1,4 i 3,1  $\mu\text{mols}$  de 2,2,2-tricloroetanol, respectivament.

Els resultats obtinguts en aquest apartat indiquen que el cloral és possiblement un intermediari en la degradació de TCE, donat que els productes finals de la seva degradació (2,2,2-tricloroetanol i diòxid de carboni) coincideixen amb els assolits en la degradació de TCE. La degradació d'aquest intermediari es du a terme mitjançant una reacció competitiva, en la que la generació de diòxid de carboni i 2,2,2-tricloroetanol depenen de la concentració inicial de cloral. Per últim, sembla que en la transformació del cloral intervé un mecanisme enzimàtic alternatiu al del citocrom P450, donat que tant en els cultius amb i sense inhibidor es degrada el producte i s'assoleixen valors de clorurs similars.

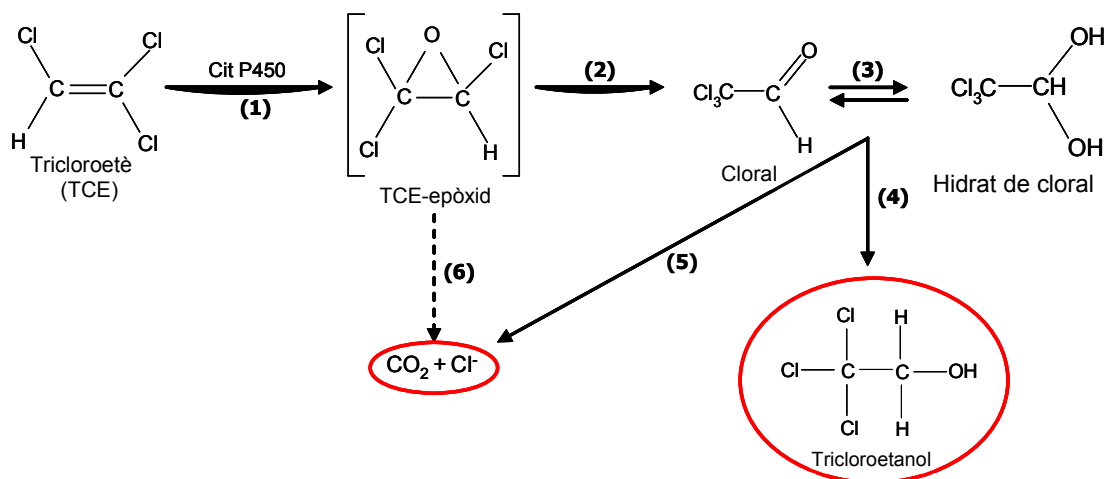
### ***Estudi de degradació de 2,2,2-tricloroetanol in vivo per T. versicolor***

En aquest experiment es varen afegir 40 ppm de 2,2,2-tricloroetanol en cultius de *T. versicolor* en forma de pèl·lets amb MD. Es varen incloure ampolles experimentals i controls amb fong autoclavats, cadascun d'aquests tractaments per triplicat. Aquests cultius es varen incubar durant 7 dies i posteriorment es varen analitzar els clorurs alliberats en el medi i l'activitat de lacasa.

Es va observar que l'activitat de la lacasa era molt elevada després del període d'incubació, assolint uns valors màxims de  $3200,2 \pm 73,3$  UA/l. Es va obtenir una quantitat de clorurs en els cultius autoclavats de  $0,895 \pm 0,014$   $\mu\text{mols}$  i en les ampolles experimentals de  $0,968 \pm 0,199$   $\mu\text{mols}$ . L'error associat a cada valor no permet afirmar que es produeixi una dechloració en les ampolles experimentals. A més, els 40 ppm de 2,2,2-tricloroetanol, que equivalen a 3,2  $\mu\text{mols}$  de producte, en el cas que es mineralitzessin completament hauria de produir estequiomètricament 9,6  $\mu\text{mols}$  de clorurs respecte els cultius autoclavats. Per tant, en les condicions testades, aquests resultats indiquen que *T. versicolor* no podria degradar/mineralitzar 2,2,2-tricloroetanol.

### 5.3.5. Via proposada de degradació de TCE per *T. versicolor*

A partir dels subproductes identificats i dels experiments amb l'inhibidor del citocrom P450 i del sistema lacasa-mediador, es suggereix una possible via de degradació de TCE per *T. versicolor* (veure Figura 5.29). La discussió realitzada en aquest apartat s'ha realitzat majoritàriament en base a la informació que es troba a la introducció d'aquest capítol, de manera que no s'han incorporat les referències que s'han citat anteriorment.



**Figura 5.29.** Via de degradació de TCE proposada per *T. versicolor*. S'han encerclat els subproductes identificats.

Reacció (1): El 2,2,2-tricloroetanol és un subproducte de degradació del TCE que també s'ha obtingut a partir dels sistemes enzimàtics dels mamífers i dels bacteris. En ambdós casos, el 2,2,2-tricloroetanol es genera a partir de la reducció del cloral, que en medi líquid es troba en equilibri amb la seva forma hidratada. La principal diferència entre aquestes rutes és que en el cas dels bacteris el cloral no s'obté a partir del TCE-epòxid, mentre que en el cas dels mamífers prové del TCE-epòxid o un altre producte amb un estat de transició similar. Els resultats obtinguts a partir dels experiments amb l'inhibidor ABT i el TCE suggereixen que el citocrom P450 es trobaria implicat en la primera fase de la degradació de TCE per *T. versicolor*. Donat que el sistema citocrom P450 és el mateix que l'utilitzat pels mamífers, considerem que l'epòxid de TCE pot ser el subproducte amb més probabilitats de generar-se en la primera fase de degradació. Donada la seva inestabilitat no és possible identificar-lo en els medis de cultiu. Aquesta reacció seria la limitant donat que no observem acumulació de cloral en el procés de degradació.

Reacció (2): Els resultats obtinguts indiquen que possiblement es produeix cloral com a intermediari de la degradació a partir del TCE-epòxid, donat que la degradació de cloral per *T. versicolor* ha donat lloc a 2,2,2-tricloroetanol i clorurs, els mateixos subproductes que els assolits en la degradació de TCE pel fong. Aquesta hipòtesis es veu reforçada pel fet que aquest pas també ha estat

descriu en la literatura en el cas dels mamífers, en el que la degradació de TCE es produeix mitjançant el citocrom P450.

Reacció (3): Com s'ha esmentat amb anterioritat, el cloral en medi aquós es troba en equilibri amb la seva forma hidratada, l'hidrat de cloral.

Reacció (4) i (5): Els subproductes de degradació del cloral s'han estudiat *in vitro* amb el sistema lacasa-mediadors i amb cultius *in vivo* amb el fong amb i sense inhibidor del citocrom P450. Tot i que en la mineralització de cloral (reacció 5) podria intervenir el sistema oxidatiu vinculat al citocrom P450 i la lacasa, la transformació a 2,2,2-tricloroetanol (reacció 4) implica una reducció. Els resultats obtinguts amb lacasa i mediadors no han generat clorurs ni desaparició de cloral. En canvi, en els cultius amb i sense inhibidor del citocrom P450 el cloral ha desaparegut i s'ha generat 2,2,2-tricloroetanol i clorurs. Els resultats obtinguts amb diferents concentracions de cloral (Taula 5.7) indiquen que es produeixen dues reaccions competitives en la que la generació de 2,2,2-tricloroetanol (reacció 4) es trobaria afavorida a altes concentracions de cloral. Tanmateix, el fet que la reacció 1 sigui el pas limitant fa que no s'acumuli cloral durant la reacció, independentment de la concentració inicial de TCE, la qual cosa afavoreix la mineralització del producte. Per aquest motiu s'ha observat, a partir dels balanços de clorurs, que el percentatge de TCE que es mineralitza es manté sempre constant al voltant del 50% per a diferents concentracions inicials de TCE.

Els resultats obtinguts indiquen que la reacció 4 possiblement es produeix mitjançant un sistema enzimàtic alternatiu al de la lacasa i el citocrom P450. S'ha descrit que els fongs de podridura blanca també incorporen en el seu sistema enzimàtic mecanismes de reducció que permeten reduir nombrosos aldehids aromàtics fins a alcohols i que podrien ser usats en la reducció del cloral, que és un aldehyd alifàtic. Entre aquests sistemes es troba un enzim intracel·lular anomenat aril-alcohol deshidrogenasa (o aldehyd reductasa), però només s'ha aïllat i caracteritzat en fongs de podridura blanca pel fong *P. chrysosporium* (Muheim *et al.*, 1991). Aquest enzim té una ampla especificitat per l'acceptor electrònic, incloent benzaldehids sense substituir i substituïts amb un o diversos grups metoxil i hidroxil, i aldehids aromàtics dimèrics. La capacitat de reduir aldehids aromàtics fins a alcohols també s'ha comprovat per *T. versicolor* (Farmer *et al.*, 1959) i altres fongs de podridura blanca com *P. radiata* (Lundell *et al.*, 1990), *Bjerkandera* sp (Hage *et al.*, 1999) i *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1994; Guillén i Evans, 1994), de manera que és probable que tinguin un enzim similar al descrit per *P. chrysosporium*. També s'ha detectat un sistema redox transmembrana en alguns fongs de podridura blanca, que inclouen *T. versicolor* i *P. chrysosporium*, i que ha demostrat la seva capacitat de reduir també aldehids aromàtics, concretament veratraldehyd (Hirai *et al.*, 1995). Per tant, una possible hipòtesis és que *T. versicolor* pugui emprar alguns d'aquests sistemes enzimàtics per reduir cloral a 2,2,2-tricloroetanol.

D'altra banda, la reacció 5 implica la mineralització de cloral. Tot i que la seva oxidació no hagi estat observada en els diferents experiments amb el sistema lacasa-mediador, no es pot afirmar que aquest enzim no estigui implicat en la reacció. Així, una possibilitat seria que la lacasa oxidés indirectament el cloral a partir de la producció d'espècies reactives d'oxigen amb un elevat poder oxidatiu, generades durant l'oxidació de les hidroquinones per aquest enzim (Guillén *et al.*, 2000). Un



altre mecanisme que podria estar implicat seria la glioxal oxidasa, que ha estat identificada pel gènere *Trametes* i que pot catalitzar l'oxidació d'aldehids alifàtics de cadena curta fins al seu àcid corresponent i generar peròxid d'hidrogen (Orth *et al.*, 1993). Tanmateix, aquesta via només explicaria el primer pas de la seva transformació però no la generació de CO<sub>2</sub> i clorurs. En tot cas, són necessaris més estudis per elucidar quin és el sistema enzimàtic implicat en aquesta etapa del procés de degradació.

Els resultats obtinguts amb cultius de *T. versicolor* on s'ha afegit 2,2,2-tricloroetanol assenyalen que no és possible la decloració d'aquest producte. Per tant, aquest subproducte s'acumularia i no podria mineralitzar-se pel fong en aquestes condicions de treball.

Reacció (6): S'ha descrit que la descomposició no enzimàtica de l'epòxid de TCE dóna lloc a un ampli ventall de productes com àcid fòrmic, monòxid de carboni, àcid dicloroacètic i àcid glioxílic. En el cas dels bacteris, aquests productes són ràpidament degradats fins a diòxid de carboni (Hashimoto *et al.*, 2002). En el cas de *T. versicolor* no ha estat possible demostrar empíricament aquesta via, però seria possible que, de manera anàloga als bacteris, el sistema enzimàtic del fong mineralitzés directament l'epòxid de TCE o bé que ho fes a partir dels seus subproductes de transformació.

### 5.3.6. Conclusions

En aquest capítol s'ha demostrat la potencialitat dels fongs de podridura blanca per degradar TCE. Tots els fongs testats, *T. versicolor*, *I. lacteus* i *G. lucidum* han estat capaços de degradar aquest contaminant, assolint en els dos primers casos percentatges de degradació iguals o superiors als assolits per *P. chrysosporium*, que s'ha inclòs en els experiments com a control positiu. Per a *G. lucidum* ha estat la primera evidència de la que tenim constància en la que es demostrï la seva capacitat per degradar compostos xenobiòtics. *T. versicolor* ha estat el fong amb el que s'han assolit valors de degradació més elevats i, per tant, ha estat el fong d'elecció per a la continuació d'aquest treball. Entre els dos medis de creixement emprats, el MD ha estat amb el que s'han assolit millors índexs de degradació. Per al rang de concentracions de 2-20 ppm de TCE s'han assolit percentatges de degradació propers o superiors al 80% per a l'interval de 2-10 ppm en MD. Pel rang de concentracions testats s'ha observat que el TCE indueix la producció de lacasa, assolint índexs d'activitat molt elevats durant tot el procés respecte els controls sense TCE, i augmentant a mesura que ho fa la concentració de TCE.

Amb l'objectiu d'estudiar l'efecte de la morfologia en la degradació del compost per a la seva aplicació en un bioreactor, s'ha addicionat el fong en forma de pèl·lets i en forma de micel·li dispers en agitació. Òbviament en ambdós casos s'assoleix una major rapidesa en la degradació de TCE respecte l'addició en forma de suspensió triturada i estàtiques, donat que el fong es troba pre-crescut, assolint-se un important increment en la degradació en els dos primers dies d'incubació. En ambdós casos s'han assolit percentatges de degradació molt similars, propers al 60% entre el quart i sisè dia. S'ha escollit la morfologia en forma de pèl·let donat que presenta menys inconvenients en la seva

aplicació en bioreactor i és amb la que el nostre grup de recerca té més experiència. S'ha demostrat que l'addició d'oxigen durant la incubació i l'increment de la concentració inicial de glucosa augmenten la decloració de TCE mantenint el percentatge de degradació en el cas dels pèl·lets. D'altra banda, l'addició conjunta de glucosa i oxigen durant la incubació ha portat a un augment tant del percentatge de degradació com de l'alliberament de clorurs.

S'han identificat dos subproductes de degradació de TCE per *T. versicolor*, el 2,2,2-tricloroetanol i el diòxid de carboni. D'aquests subproductes, només la generació de CO<sub>2</sub> implica un alliberament de clorurs. Al llarg del capítol en els experiments amb diferents concentracions de TCE i morfologies del fong amb MD s'ha calculat, a partir dels balanços de clorurs alliberats en el medi, que aproximadament el 50% del TCE degradat es decloraria completament i, per tant, es mineralitzaria. Aquests resultats assenyalen que tant el diòxid de carboni com el 2,2,2-tricloroetanol es generarien equitativament a partir del TCE degradat.

A partir dels subproductes obtinguts i dels experiments amb l'inhibidor del citocrom P450 (1-aminobenzotriazol) i del sistema lacasa-mediador es proposa una possible via de degradació de TCE per *T. versicolor*. Els resultats obtinguts suggereixen que el citocrom P450 estaria implicat en la primera fase de la degradació de TCE. La degradació de cloral per cultius de *T. versicolor* dona lloc a dues reaccions competitives per donar 2,2,2-tricloroetanol i clorurs, el que indica que el cloral és possiblement un dels intermediaris de la reacció, de manera anàloga a com succeeix en el cas dels mamífers.

# Capítol 6

## Degradació de PCE per *Trametes versicolor*

Part dels resultats d'aquest capítol s'han publicat a:

- Marco-Urrea, E., X. Gabarrell, M. Sarrà, G. Caminal, T. Vicent i C.A. Reddy. Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Environ. Sci. Technol. In press. DOI 10.1021/es0622958.

### Resum

En aquest capítol s'ha demostrat per primera vegada la degradació aeròbia de PCE per fongs mitjançant el fong de podridura blanca *T. versicolor*. Anteriorment només una soca bacteriana (*Pseudomonas stutzeri* OX1) havia estat capaç d'assolir la degradació d'aquest hidrocarbur alifàtic clorat en presència d'oxigen. El fong *T. versicolor*, incubat en agitació i en forma de pèllet, pot assolir un percentatge de degradació proper al 40% en cultius amb 5 ppm de PCE en el líquid. La velocitat de degradació de PCE en els tres primers dies a estat de  $2,04$  i  $2,75 \times 10^{-3} \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg de proteïna}^{-1}$ . A partir d'experiments d'inhibició s'ha suggerit que *T. versicolor* degrada el PCE mitjançant el sistema citocrom P450. Alhora, s'ha identificat a l'àcid tricloroacètic com a subproducte de degradació. Aquestes dues darreres evidències fan que la via de degradació emprada pel fong sigui la mateixa que la descrita pels mamífers. El balanç estequiomètric entre els  $\mu\text{mols}$  de PCE degradats, l'àcid tricloroacètic generat i els clorurs alliberats en el medi donen consistència a la transformació de PCE a àcid tricloroacètic. D'altra banda, també s'ha observat que *T. versicolor* pot mineralitzar petites quantitats de PCE, tot i que el temps d'incubació i les condicions de cultiu han estat diferents a les emprades en els experiments anteriors. L'addició d'oxigen durant la incubació no aporta índexs de degradació significatius, suggerint l'existència d'altres factors que limitin la degradació de PCE. A diferència del TCE, s'ha trobat que el PCE no indueix l'activitat enzimàtica de la lacasa, fins i tot la inhibeix.

## 6.1. Introducció

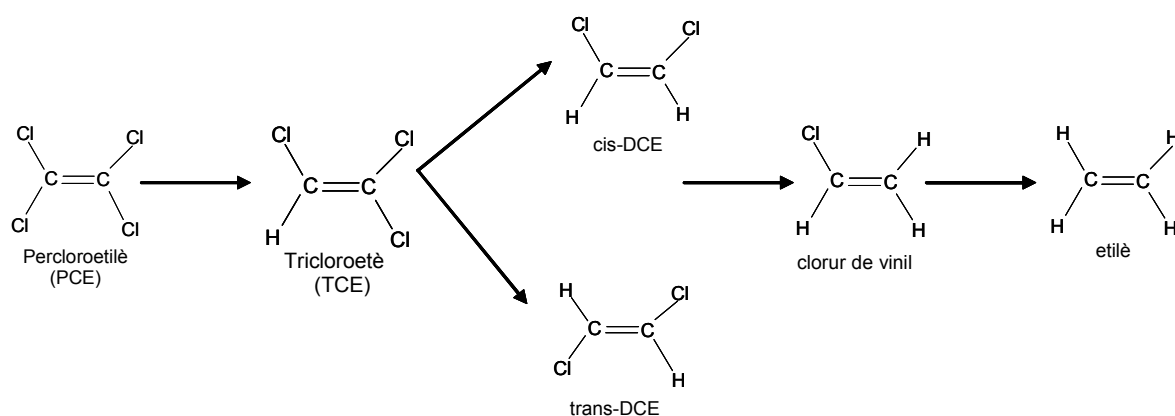
La biodegradació de PCE ha estat objecte d'un intens estudi des de fa més de dues dècades. A diferència del TCE, el PCE és difícilment degradable en condicions aeròbiques degut al seu estat elevat d'oxidació, que el fan termodinàmicament més favorable a ser reduït en condicions anaeròbiques. D'aquesta manera, només s'ha descrit una soca bacteriana capaç de degradar PCE aeròbiament, la *Pseudomonas stutzeri* OX1 (Ryoo *et al.*, 2000). D'altra banda, Enzien *et al.* (1994) també va descriure la transformació de PCE a cis-DCE en una columna que contenia sediments i era mantinguda en condicions aeròbiques. Tanmateix, l'existència de petits llocs anaeròbics a l'interior del reactor on es produïa la reducció anaeròbia va ser proposada pels autors com a possible explicació.

El primer estudi que va demostrar la degradació de PCE per bacteris va ser el de Bower i McCarty (1983), en el que observaren la conversió de PCE a TCE en unes columnes anaeròbiques de flux continu en el que afegien acetat com a donador d'electrons. Des de llavors, s'han publicat nombrosos estudis amb bioreactors utilitzant consorcis bacterians, alguns dels quals han estat capaços de transformar el PCE fins a etè i età (Debruin *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 1995; DiStefano *et al.*, 1991; Freedman i Gossett, 1989), clorur de vinil (Carter i Jewell, 1993), cis-DCE (Fathpure i Tiedje, 1994; Guiot *et al.*, 1995) o obtenint una barreja de diferents subproductes (Maymo-Gatell *et al.*, 1995; Vogel i McCarty, 1985). Tanmateix, la degradació de compostos xenobiòtics per consorcis pot implicar l'existència d'una associació de sintròfia entre diferents comunitats bacterianes que no permeti elucidar clarament ni els mecanismes enzimàtics ni els requeriments fisiològics implicats en el procés de degradació. Per aquest motiu, un nombre creixent d'estudis s'han centrat en la identificació de soques axèniques, tot i la dificultat de l'aïllament d'aquests bacteris al laboratori en condicions anaeròbiques (El Fantroussi *et al.*, 1998). En els estudis de degradació de PCE per bacteris s'observen dos tipus d'estratègies, una dirigida a testar la capacitat de cloradora de cultius purs prèviament aïllats i una altra que es centra en l'aïllament de noves soques anaeròbiques a partir de consorcis de cloradors.

En aquest apartat es detallen les vies de biodegradació descrites per al PCE, amb l'objectiu de contextualitzar els resultats obtinguts posteriorment amb *T. versicolor*. S'ha inclòs un apartat sobre el metabolisme de PCE per mamífers, no per la seva aplicació potencial en bioremediació sinó pels paral·lelismes amb la via de degradació que es descriurà per *T. versicolor*. Pels motius que s'han explicat a l'anterior paràgraf, en el cas dels bacteris només es farà referència a aquells estudis realitzats amb cultius axènics. Donat que les soques que degraden PCE també poden fer-ho amb el TCE, en el cas del co-metabolisme anaeròbic com en la dehalorespiració s'ha inclòs la discussió sobre la cloració reductiva anaeròbia de TCE, per tal que l'explicació d'aquestes vies de degradació estigüés descrita en un mateix capítol.

### 6.1.1. Decloració reductiva anaeròbia de PCE i TCE per bacteris

Com s'ha explicat anteriorment per al cas del TCE, la decloració reductiva anaeròbia pot produir-se tant directa (halorespiració) com co-metabòlicament. En ambdós casos, el metabolisme anaerobi del PCE (i també del TCE) es produeix a través d'una decloració seqüencial de la molècula en la que l'hidrogen substitueix a un àtom de clor, donant lloc a intermediaris cada vegada menys clorats. Aquests inclouen el TCE, els diferents isòmers del dicloroetilè, clorur de vinil i eventualment etilè (Figura 6.1). De manera anàloga a la via descrita pel TCE, l'isòmer del DCE majoritari és el cis-DCE, seguit ocasionalment pel trans-DCE.



**Figura 6.1.** Decloració reductiva anaeròbia del PCE

Classificarem aquests bacteris segons la via utilitzada per la degradació de PCE.

#### 6.1.1.1. Bacteris halorespiradors

Hi ha dos grans grups de compostos clorats que són habitualment emprats com a acceptors d'electrons durant el procés de dehalorespiració per bacteris: els aromàtics i els alifàtics clorats. Mentre el primer grup inclou una ampla varietat de compostos tals com fenols, benzoats, benzens, fenoxiacetats, el segon grup inclou cloroetens (entre els que es troba el TCE i PCE) i alguns cloroetans (Holliger *et al.*, 1999).

Els bacteris aïllats que presenten activitat decloradora reductiva pel PCE i TCE pertanyen a quatre grups filogenètics diferents: Firmicutes, Protobacteris dels subgrups  $\delta$  i  $\epsilon$ , i els bacteris verds no del sofre (veure Taula 6.1). El grup dominant és Firmicutes i està format per varies espècies dels gènere *Desulfitobacterium* i *Dehalobacter*, i la soca *Clostridium biffermentans* DPH-1. El gènere *Desulfitobacterium*, el nom del qual prové de la seva capacitat per créixer utilitzant sulfid com a acceptor d'electrons, és el més versàtil respecte als acceptors i donadors d'electrons.

El grup Firmicutes, juntament amb les Protobacteris dels subgrups  $\delta$  i  $\epsilon$ , transformen el PCE fins a cis-DCE amb la única excepció de *Desulfitobacterium sp.* PCE-1, que converteix majoritàriament

el PCE a TCE amb unes quantitats traça (<0,5%) de trans-DCE i c-DCE. *Dehalococcoides ethenogenes* 195, en canvi, és l'únic bacteri capaç de declorar completament el PCE fins a etè.

El fet que aquests bacteris dehalorespiradors puguin produir com a subproductes de decloració cis-DCE, TCE o etè és possiblement degut a la presència de diferents dehalogenases en les diferents soques (van de Pas *et al.*, 2001; Magnuson *et al.*, 1998).

D'aquests bacteris, *D. ethenogenes* 195 és el que presenta unes capacitats d'aplicació més prometedores, degut principalment a la transformació de PCE i TCE fins a etè, un producte considerat inofensiu en el medi. En estudis de camp, s'ha observat que sovint la transformació de PCE o TCE s'atura en cis-DCE i clorur de vinil i s'ha relacionat aquest fet precisament a l'absència de bacteris del gènere *Dehalococcoides* (Major *et al.*, 2002). Un estudi recent demostrava que en 24 indrets contaminats per etilens clorats els bacteris del gènere *Dehalococcoides* no es detectaven en aquells llocs on es produïa una decloració incompleta del contaminant (Hendrickson *et al.*, 2002). També, Fennell *et al.* (2001) va examinar la presència de *D. ethenogenes* en pous contaminats per TCE, trobant la seva presència en aquells pous en els que el TCE es transformava a clorur de vinil i etè. És evident, doncs, que s'hagi assenyalat que la bioaugmentació amb aquest tipus de bacteris sigui una estratègia apropiada per declorar completament el PCE i TCE en els medis contaminats (Ellis *et al.*, 2000; Harkness *et al.*, 1999).

Dintre dels bacteris presentats a la Taula 6.1, trobem una varietat important en quant als requeriments d'acceptors i donadors d'electrons. S'ha demostrat que els donadors d'electrons juguen un paper important en relació a l'eficiència i grau de reducció dels compostos clorats tant en cultius purs (Gerritse *et al.*, 1999; Löffler *et al.*, 1999) com en consorcis bacterians (DiStefano *et al.*, 1992; He *et al.*, 2002). L'hidrogen i el format són usats com a font d'electrons per a la majoria dels bacteris dehalorespiradors. Les espècies *Desulfitobacterium* i *Sulfurospirillum* també usen addicionalment lactat i piruvat, mentre que el gènere *Dehalobacter* i *Dehalococcoides* només poden usar H<sub>2</sub>. El gènere *Desulfuromonas* és l'únic que pot usar acetat com a donador d'electrons en la decloració de PCE i TCE.

D'altra banda, els bacteris dehalorespiradors també mostren un espectre variable de compostos clorats que poden usar com a acceptors d'electrons. Per exemple, les soques *Sulfurospirillum* només poden declorar PCE i TCE, mentre que *Desulfitobacterium* sp. PCE-1 pot usar PCE, 3-cloro-4-hidroxifenil acetat i varis fenols clorats. També poden usar diferents acceptors d'electrons no clorats, sent els més comuns el nitrat, fumarat i sulfit. Com en el cas dels donadors d'electrons, el gènere *Desulfitobacterium* és el que presenta un major versatilitat en el seu ús, mentre que pels gèneres *Dehalococcoides* i *Dehalobacter* no s'han trobat acceptor d'electrons alternatius als clorats. Aquesta darrera evidència ha donat lloc al debat sobre l'origen i evolució d'uns bacteris tant especialitzats, donat que els etens clorats no es produeixen de forma natural i no es té constància de la seva presència en el medi des de la seva aplicació industrial fa més de 50 anys.

**Taula 6.1.** Bacteris halorespiradors que poden utilitzar PCE i/o TCE com a acceptors d'electrons

Bacteri	Acceptors d'electrons clorats <sup>1</sup>	Donadors d'electrons	Acceptors d'electrons no clorats	Productes de dechloració del PCE/TCE	Referència
<b>Firmicutes</b>					
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> TCE-1	PCE, TCE	H <sub>2</sub> , format, lactat, piruvat, etanol, butirat, etanol, serina	Nitrat, fumarat, sulfat, tiosulfat	cis-DCE	Gerritse <i>et al.</i> , 1999
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> PCE-S	PCE, TCE	H <sub>2</sub> , format, piruvat, extracte de llevat	Fumarat, sulfat	cis-DCE	Miller <i>et al.</i> , 1997
<i>Desulfotobacterium sp.</i> PCE-1	PCE, Cl-OH-FA, 2,4,6-TCF, 2,4-DCF, 2-CF.	H <sub>2</sub> , format, lactat, piruvat, etanol, butirat, succinat, serina	Fumarat, sulfat, tiosulfat, cisteat, isetionat	TCE	Gerritse <i>et al.</i> , 1996
<i>Desulfotobacterium sp.</i> Y51	PCE, TCE, HCA, PCA, TCA, hepta-CPA	Format, lactat, piruvat	Fumarat, nitrat, sulfat	cis-DCE	Suayama <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium bifermentans</i> DPH-1	PCE	Extracte de llevat, glucosa	n.d.	cis-DCE	Chang <i>et al.</i> , 2000
<i>Dehalobacter restrictus</i> TEA	PCE, TCE	H <sub>2</sub>	Cap	cis-DCE	Wild <i>et al.</i> , 1996
<i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	PCE, TCE	H <sub>2</sub>	Cap	cis-DCE	Holliger <i>et al.</i> , 1998
<b>Proteobacteri δ</b>					
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> TT4B	PCE, TCE	Acetat, piruvat	Fumarat, Fe(III), sulfur	cis-DCE	Krumholz, 1997
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> BB1 i BRS1	PCE, TCE	Acetat, lactat, piruvat, succinat, malat, fumarat	Fumarat, malat, Fe(III), sulfur	cis-DCE	Sung <i>et al.</i> , 2003
<b>Proteobacteri ε</b>					
<i>Sulfurospirillum multivorans</i>	PCE, TCE	Piruvat, lactat, etanol, format, glicerol, H <sub>2</sub>	Nitrat, fumarat, arsenat, selenat	cis-DCE	Scholz-Muramatsu <i>et al.</i> , 1995
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i>	PCE, TCE	H <sub>2</sub> , format, lactat, piruvat	Fumarat	cis-DCE	Luijten <i>et al.</i> , 2003
<b>Verds no del sofre</b>					
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	PCE, TCE, cis-DCE, 1,1-DCE, 1,2-DCA	H <sub>2</sub>	Cap	Etè (CV) <sup>2</sup>	Maymó-Gatell <i>et al.</i> , 1997
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> FL2	TCE, cis-DCE, trans-DCE	H <sub>2</sub>	Cap	Etè (CV) <sup>2</sup>	He <i>et al.</i> , 2005

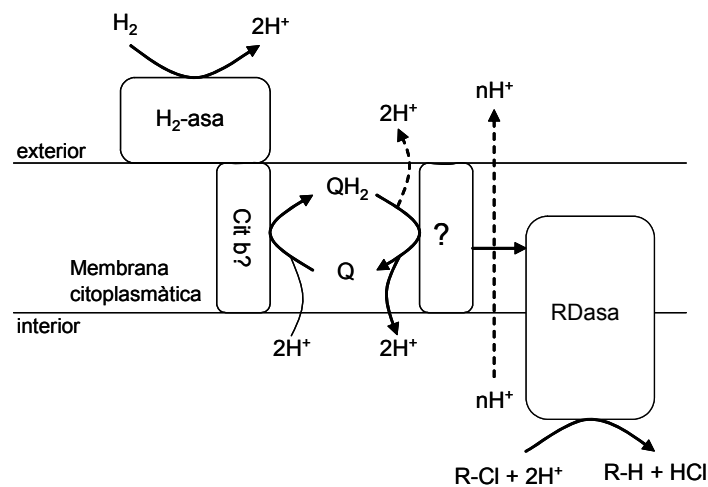
<sup>1</sup> Cl-OH-FA: 3-cloro-4-hidroxifenil acetat, TCF: triclorofenol, DCF: diclorofenol, DCE: dicloroetè, DCA: dicloroetà, CV: clorur de vinil, HCA: hexacloroetà, PCA: pentacloroetà, TCA: tricloroetà, CPA: cloropropà

<sup>2</sup> El subproducte de degradació per halorespiració és el CV, i la posterior reducció de CV fins a etè és produïda co-metabòlicament i a una velocitat més lenta.

En els darrers anys, la purificació de dehalogenases i la identificació dels gens que les expressen han permès una major comprensió del mecanisme enzimàtic que utilitzen aquests bacteris per dechlorar els etens clorats. S'han purificat dehalogenases específiques per al PCE a partir de *D. ethenogenes* 195 (Magnuson *et al.*, 1998) i de *Desulfitobacterium* sp. PCE-1 (van de Pas *et al.*, 2001). També s'han purificat dehalogenases que utilitzen tant PCE com TCE a partir de *S. multivorans* (Neumann *et al.*, 1996 i 2002), *D. restrictus* (Schumacher *et al.*, 1997), *Desulfitobacterium* PCE-S (Miller *et al.*, 1998), *Desulfitobacterium* Y51 (Suayama *et al.*, 2002) i *D. hafniense* TCE-1 (Holliger *et al.*, 2003). I també s'han purificat dehalogenases específiques per al TCE a partir de *D. ethenogenes* (Magnuson *et al.*, 1998).

En els bacteris dehalorespiradors, tant els enzims donadors d'electrons (hidrogenasa o format deshidrogenasa) com els acceptors terminals d'electrons (dehalogenasa reductiva, RDasa) es troben a la membrana citoplasmàtica, amb l'excepció de la RDasa de *S. multivorans* i *Desulfitobacterium* sp. Y51 que es troben en el citoplasma. S'han trobat diferents compostos que catalitzen la transferència d'electrons a través de la membrana citoplasmàtica entre la hidrogenasa i la RDasa, tals com les menaquinones a *D. restrictus* (Schumacher i Holliger, 1996), citocroms de tipus *b* a *S. multivorans* (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995) i *D. restrictus* (Holliger *et al.*, 1998), citocroms de tipus *c* a *Desulfitobacterium hafniense* TCE-1 (Gerritse *et al.*, 1999), *Desulfitobacterium* sp. PCE-1 (Fetzner, 1998) i *Desulfuromonas chloroethenica* (Krumholz, 1997).

A la Figura 6.2. es mostra a tall d'exemple el mecanisme de dehalorespiració proposat per *D. restrictus*. En aquest exemple, els electrons són transferits de l'hidrogen al compost clorat mitjançant la hidrogenasa, un citocrom *b*, quinones, un component desconegut i la dehalogenasa reductiva. En aquest procés es produeix un gradient de protons que pot donar-se via les quinones o per altres mecanismes (indicats amb fletxes puntejades). L'establiment d'aquest gradient de protons és el darrer pas en el procés de respiració, donat que desencadena la síntesis d'ATP. Tanmateix, no s'ha establert clarament com el gradient de protons travessa la membrana.



**Figura 6.2.** Proposta de mecanisme de dehalorespiració per *D. restrictus* (Holliger *et al.*, 2003). Cit: citocrom, RDasa: dehalogenasa reductiva, H<sub>2</sub>-asa: hidrogenasa, Q: quinona.



### 6.1.1.2. Co-metabolisme anaerobi per bacteris

A diferència dels bacteris haloinspiradors, les velocitats de degradació per co-metabolisme són molt més lentes (veure Taula 6.2) i el subproducte majoritari obtingut en tots els casos (amb una única excepció) és el TCE. Per aquests motius aquests bacteris no han estat objecte de molt estudi en relació a la seva aplicació en medis contaminats.

**Taula 6.2.** Velocitats de declaració de PCE d'alguns bacteris haloinspiradors i co-metabòlics

<b>Bacteris haloinspiradors</b>	<b><math>\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg proteïna}^{-1}</math></b>	<b>Referència</b>
<i>S. multivorans</i>	3,00	Scholz-Muramatsu <i>et al.</i> , 1995
<i>D. ethenogenes 195</i>	4,14	Maymó-Gatell <i>et al.</i> , 1997
<i>D. michiganensis</i>	8,34	Sung <i>et al.</i> , 2003
<b>Bacteris co-metabòlics</b>		
<i>Methanosarcina</i> DCM	$3,5 \times 10^{-5}$	Fathepure i Boyd, 1988
<i>Acetobacterium wodii</i>	$3,6 \times 10^{-3}$	Egli <i>et al.</i> , 1988
<i>P. stutzeri</i> OX1	0,15	Ryoo <i>et al.</i> , 2000

Hi ha dos grans grups de bacteris que poden degradar el PCE i TCE per co-metabolisme. D'una banda, els bacteris metanogènics entre els que es troben *Methanosarcina* DCM, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* i *Methanosarcina* FR. D'una altra, els bacteris acetogènics, que formen un grup més reduït, entre els que es troben *Sporomusa ovata* i *Acetobacterium wodii* WB1.

Fathepure *et al.* (1987) va ser el primer en aïllar diferents soques de bacteris metanogènics del gènere *Methanosarcina*, capaces de degradar PCE usant acetat o metanol com a úniques fonts de carboni i energia. Aquestes soques es van aïllar en plantes de tractament anaerobi d'aigües residuals i es van testar amb el PCE, donat que prèviament havien degradat altres productes clorats. D'aquestes, les soques *Methanosarcina* DCM i *Methanosarcina mazei* varen mostrar una declaració significativa de PCE. Per a *Methanosarcina* DCM es va trobar una forta interdependència entre la declaració de PCE i el consum del substrat metanogènic. Alhora, la incubació d'aquesta soca amb varies concentracions de metanol indicaven clarament una correlació positiva entre la concentració del substrat de carboni primari i l'acumulació de TCE i metà. A més, la incapacitat del bacteri de declarar PCE en absència d'una font de carboni indicava que aquest procés era co-metabòlic (Fathepure i Boyd, 1988). En l'estudi de Fathepure *et al.* (1987) també es va incloure el bacteri *Desulfomonile tiedjei*, que no era metanogènic ni acetogènic, i que com s'ha esmentat en el capítol anterior va ser el primer en observar-se el procés de dehaloespiració durant la declaració reductiva de 3-clorobenzoat. En aquest cas, *D. tiedjei* declarava PCE fins a TCE i cis-DCE i els experiments realitzats amb posterioritat indicaven que el procés era co-metabòlic (Townsend i Sulfità, 1996).

Els bacteris *M. thermophila* (Baeseman i Novak, 2001) i *M. thermoautotrophicum* (Egli *et al.*, 1988) també s'han demostrat capaços de transformar PCE a TCE. *M. thermophila* és l'únic bacteri que

pot degradar TCE co-metabòlicament en condicions anaeròbies, transformant-lo fins a cis-DCE, quantitats traça de trans-DCE, clorur de vinil i etè (Jablonski, 1992).

Per últim, la soca *Methanosarcina* FR ha estat la única capaç de declorar completament PCE per co-metabolisme, tot i que els possibles subproductes no han estat identificats (Cabirol, 1998).

Com s'ha esmentat anteriorment, només dues soques acetogèniques s'han descrit capaces de degradar PCE a TCE: *S. ovata* (Terzenbach i Blaut, 1994) i *A. wodii* WB1 (Egli *et al.*, 1988). La primera es va testar juntament amb altres soques homoacetogèniques del gènere *Acetobacterium*, *Clostridium* i *Sporomosa* i el metanògen *Methanobolus tindarius*, donat que contenien una monòxid de carboni deshidrogenasa i altes concentracions de components cel·lulars amb corrinoïdes que s'havien relacionat prèviament en reaccions de dehalogenació reductiva (Krone *et al.*, 1989a; Stupperich, 1993). De la mateixa manera que amb els cultius metanogènics anteriors, per *S. ovata* la producció d'acetat era paral·lela a la decloració de PCE, la seva velocitat de decloració era dependent de la concentració del substrat i la decloració de PCE no es produïa quan el metanol o CO<sub>2</sub> s'eliminaven del medi, indicant que el mecanisme era co-metabòlic. Per últim, el bacteri acetogènic *A. wodii* WB1 també declorava PCE a TCE, però només quan la fructosa es trobava present en el medi. Aquesta soca també declora altres compostos clorats com 1,1-DCE, diclorometà, clorometà, tetraclorometà, 1,1,1-tricloroetà i triclorometà.

En relació als mecanismes de degradació emprats en la decloració reductiva per aquests bacteris, hi ha hagut evidències que la relacionen amb sistemes enzimàtics que contenen corrinoïdes en la seva molècula però els resultats no han estat concloents i encara no s'ha establert una via de degradació consistent. En reaccions *in vitro* utilitzant les formes lliures dels corrinoïdes s'ha demostrat que la decloració reductiva dels cloroetens és possible (Krone, 1989 a i b; Glod *et al.*, 1997). En cultius vius es va usar un inhibidor específic de cobaltamina, que conté anells de corrina, per cultius de *S. ovata* que va demostrar la seva implicació en la reacció (Terzenbach i Blaut, 1994). D'altra banda, una monooxigenasa deshidrogenasa purificada de *M. thermophila*, que contenia cobaltamina com a cofactor, reduïa TCE a cis-DCE, trans-DCE, 1-DCE, clorur de vinil i etè (Jablonski i Ferry, 1992) i els exsudats extracel·lulars del bacteri també reduïen lentament PCE fins a TCE (Baeseman i Novak, 2001). Pel bacteri *Methanosarcina* FR es va trobar la presència de cobaltamines i factors F<sub>420</sub>, F<sub>430</sub> en els extractes cel·lulars purificats del bacteri, suggerint la seva participació en la degradació de PCE (Cabirol *et al.*, 1998). En canvi, la decloració de 1,2-dicloroetà per *M. thermoautotrophicum* no s'inhibia en presència de l'inhibidor de corrinoïde 1-iodopropà (Holliger *et al.*, 1992).

### **6.1.2. Degradació aeròbia de PCE per *Pseudomonas stutzeri* OX1**

Durant molt de temps el PCE s'ha considerat no degradable aeròbiament per microorganismes. Tanmateix, la degradació d'etilens completament halogenats com el triclorofluoretilè s'havien demostrat mitjançant una metà monooxigenasa soluble purificada de *Methylosinus trichosporium* OB3b (Fox *et al.*, 1990). En el cas del triclorofluoretilè, el fluor és més electronegatiu que el clor i es troba més fortament lligat al carboni, de manera que aquest producte hauria de ser teòricament més difícil d'oxidar que el

PCE. Aquest estudi, per tant, donava indicis que la degradació de PCE per monooxigenases podia ser factible, tot i que es va suggerir que la impossibilitat de degradar PCE amb aquesta monooxigenasa era deguda a un impediment estèric.

Ryoo *et al.* (2000) va mostrar que el bacteri *Pseudomonas stutzeri* OX1 podia degradar PCE en condicions aeròbies mitjançant la toluè-o-xilè monooxigenasa (ToMo). Aquest bacteri s'havia aïllat dels fangs actius d'una planta de tractament d'aigües residuals i creix en o-xilè, toluè, cresols, 2,3-dimetilfenol i 3,4-dimetilfenol com a úniques fonts de carboni i energia (Baggi *et al.*, 1987). La ToMo de *P. stutzeri* OX1 pot oxidar un ampli ventall de substrats com o-xilè, p-xilè, m-xilè, toluè, benzè, etilbenzè, estirè i naftalè. Els hidrocarburs alifàtics PCE, TCE, cis-DCE, trans-DCE, clorur de vinil i 1,1-DCE i cloroform també poden ser degradats per aquest enzim.

Les evidències de la implicació d'aquesta monooxigenasa eren la desaparició de toluè del medi quan degradava PCE i es va confirmar expressant la ToMo en *E. coli* JM109 i comprovant que efectivament degradava el contaminant. Addicionalment, es va trobar que el PCE induïa la formació de ToMo per aquest bacteri.

Els subproductes de degradació no s'han identificat, però la degradació de PCE s'ha recolzat en la quantificació de l'alliberament de clorurs en el medi. D'aquesta manera, en experiments amb diferents medis i inductors per trobar les millors condicions de degradació de PCE es va assolir entre un 33-71% del clorur estequiomètricament esperat de la completa degradació de PCE. Tanmateix, varen observar que els intermediaris de degradació eren tòxics pel bacteri i que reduïen la seva velocitat de creixement en un 27%. Entre aquets possibles intermediaris tòxics assenyalaven a l'epòxid de PCE.

Posteriorment, es va demostrar la capacitat de *P. stutzeri* OX1 de degradar simultàniament sis cloroetilens amb ToMo (incloent PCE, TCE, cis-DCE, trans-DCE, clorur de vinil i 1,1-DCE), assolint percentatges d'entre el 51-85% dels clorurs estequiomètricament esperats (Shim *et al.*, 2001).

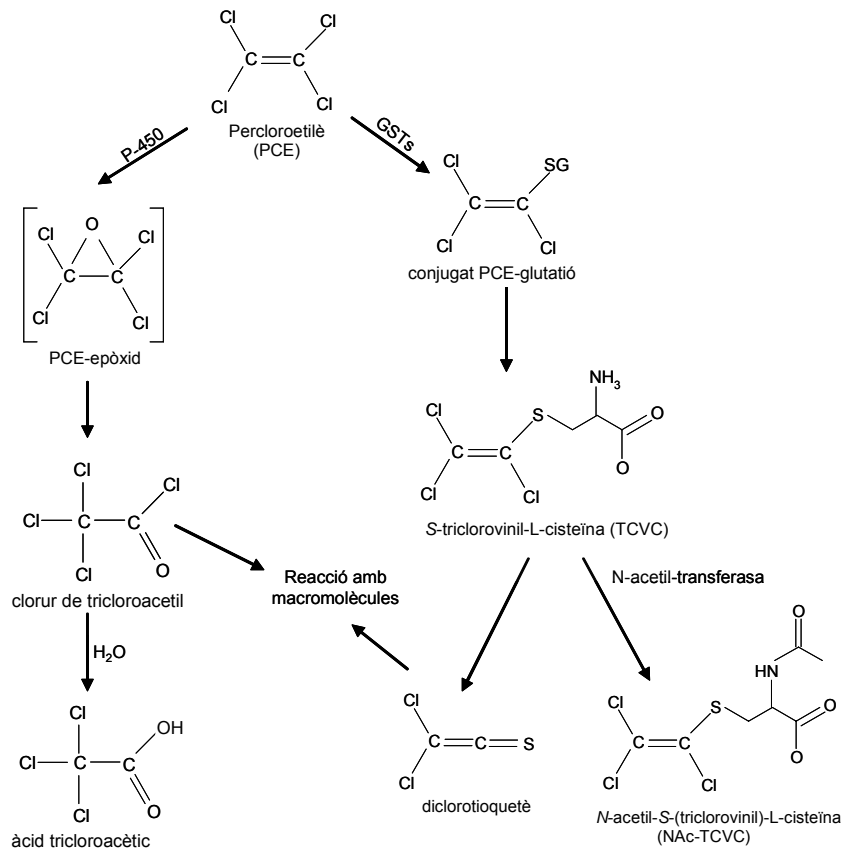
### 6.1.3. Metabolisme de PCE en mamífers

De manera anàloga al TCE, hi ha dues vies principals per metabolitzar el PCE en els mamífers: per la via del citocrom P450 i per la dependent del glutatió (Figura 6.3).

L'oxidació per citocrom P450 és la via majoritària de degradació de PCE en els mamífers (Völkel *et al.*, 1998). L'oxidació de PCE dóna lloc a la formació de l'epòxid de PCE, que és molt inestable i es transforma ràpidament a clorur de tricloroacetil (CTCA). El CTCA pot reaccionar amb grups amino en les macromolècules dels mamífers o amb aigua produint àcid tricloroacètic, que és excretat per via urinària (Birner *et al.*, 1994). Els subproductes obtinguts amb el PCE per aquesta via són, doncs, molt més reduïts que els que es produïen amb el TCE.

D'altra banda, la conjugació de PCE pel glutatió fa que com a primer intermediari es formi un conjugat PCE-glutatió mitjançant les glutatió-S-transferases (GSTs) i posteriorment la S-triclorovinil-L-cisteïna (TCVC). La formació d'aquest compost és el punt crític del metabolisme per aquesta via donat que pot experimentar dues reaccions paral·leles. Per una banda, la TCVC pot passar a la seva forma

acetilada donant *N*-acetil-*S*-(triclorovinil)-*L*-cisteïna (Nac-TCVC), la qual és excretada per la orina. D'una altra, pot reaccionar amb una  $\beta$ -liasa als ronyons o fetge donant diclorotioquetè (Dekant *et al.*, 1989), que pot reaccionar amb aigua donant àcid dicloroacètic o amb les macromolècules cel·lulars, formant productes que s'han assenyalat com a causants de la nefrotoxicitat i generadors de tumors renals del PCE.



**Figura 6.3.** Vies metabòliques de PCE per mamífers

## 6.2. Materials i mètodes

La metodologia experimental emprada i els mètodes analítics utilitzats per determinar la concentració dels hidrocarburs alifàtics clorats, el contingut de glucosa, clorurs, l'activitat de la lacasa, el pes sec de la biomassa, els anàlisis per ressonància magnètica nuclear, els anàlisis per cromatografia de gasos i espectrometria de masses de relació isotòpica i pH estan descrits al capítol 3 de Materials i mètodes generals.

L'addició d'oxigen durant la incubació en aquells experiments on s'especifiqui es realitza mitjançant una xeringa de plàstic esterilitzada a través dels taps de butil, a partir de l'oxigen pur contingut en una bossa Tedlar a través del seu port d'injecció.

### 6.2.1. Anàlisi per cromatografia de gasos i espectrometria de masses

Aquests anàlisis es van realitzar al Servei d'Anàlisi Química de la Universitat Autònoma de Barcelona. Les mostres es van injectar per *headspace* de manera anàloga a la descrita en l'apartat 3.5.2.1 en un carrusel auto-mostrejador Agilent 7964 Headspace Sampler i en un cromatògraf de gasos Agilent 6890N connectat a un espectròmetre de masses Agilent 5973. Es va utilitzar una columna capil·lar HP-5MS (30x0,32x0,25). Les condicions d'operació del cromatògraf són les mateixes que les descrites a l'apartat 3.5.2.1, però amb una temperatura final del forn de 200 °C.

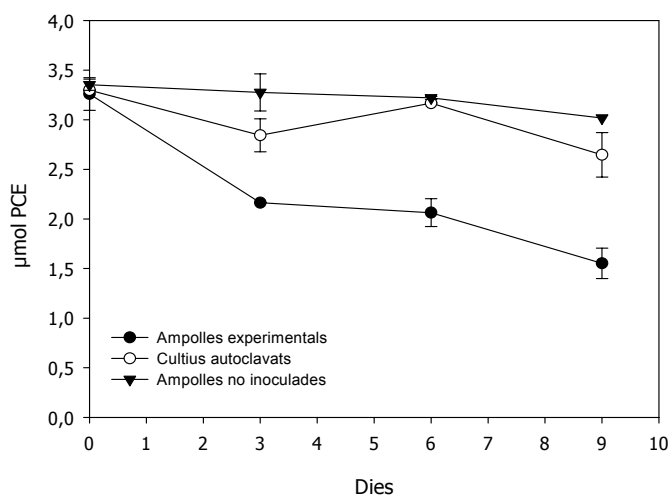
## 6.3. Resultats i discussió

### 6.3.1. Evidència de la degradació de PCE per *T. versicolor*

Després d'assolir amb *T. versicolor* els resultats més òptims de degradació pel TCE, es va testar si era possible assolir la degradació de PCE donat que és la molècula més oxidada i recalitrant dels cloroetens.

Aquest experiment es va realitzar amb ampolles experimentals per triplicat i amb ampolles abiòtiques i amb el fong autoclavat per duplicat. La concentració de PCE en el líquid va ser de 5 ppm, es va utilitzar medi definit (MD) i el fong es va inocular en forma de pèl·let. La concentració de glucosa en el MD inicialment va ser de  $7,00 \pm 0,86$  g/l, i al tercer dia ja s'havia exhaurit.

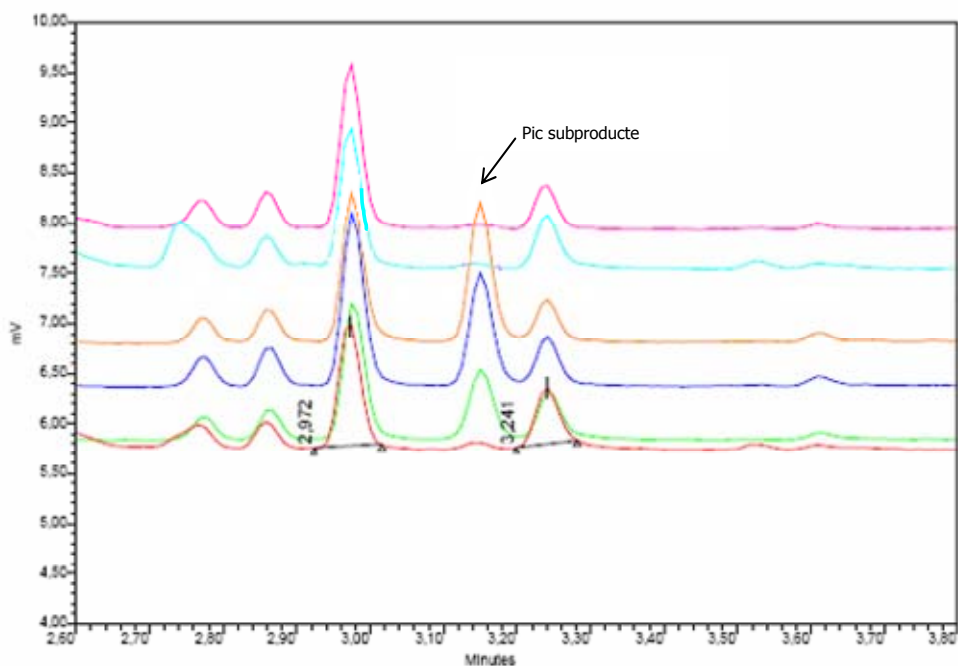
Com s'observa a la Figura 6.4 en les ampolles experimentals s'apreciava una desaparició del PCE al llarg del temps mentre que en els controls la seva concentració es mantenia en uns valors constants. Aquesta desaparició no podia ser deguda a l'adsorció doncs s'havien inclòs els cultius autoclavats.



**Figura 6.4.** Evolució de la degradació de 5 ppm de PCE en els diferents tractaments de *T. versicolor*.

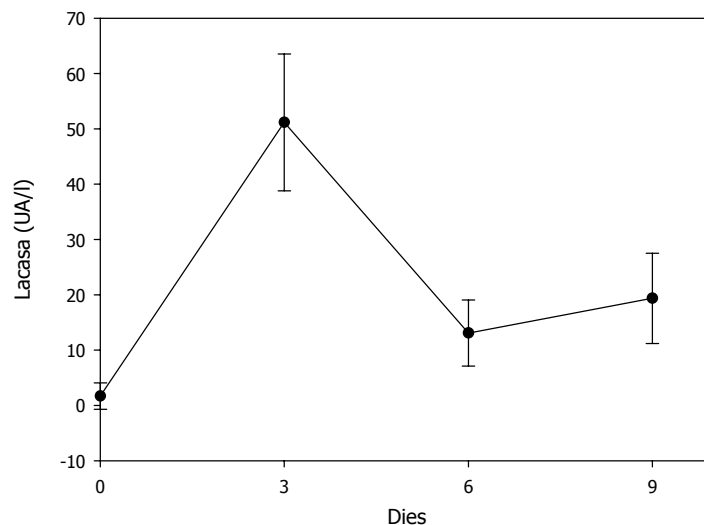
La velocitat de degradació de PCE oscil·lava entre  $2,04$  i  $2,75 \times 10^{-4} \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg pes sec de biomassa}^{-1}$  durant els primers tres dies d'incubació, i el percentatge de PCE degradat al final de l'experiment vas ser de  $36,2 \pm 2,8\%$ . Considerant que el  $10\%$  del pes sec dels fongs filamentosos és proteïna (Aiba *et al.*, 1971), la velocitat de degradació de PCE es trobaria entre  $2,04$  i  $2,75 \times 10^{-3} \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg de proteïna}^{-1}$ . Aquesta velocitat seria propera a les assolides pels bacteris que degraden cometabòlicament el PCE, però és molt més lenta que les descrites pels halorespiradors (veure Taula 6.2).

En els cromatogrames obtinguts per quantificar la concentració de PCE, es va observar l'aparició d'un pic en les ampolles experimentals amb un temps de retenció de  $3,150$  min a partir del tercer dia d'incubació (veure Figura 6.5). Aquest pic augmentava amb el temps i no apareixia en cap ampolla dels controls. Aquest fet indicava l'existència d'un possible subproducte de degradació de PCE.



**Figura 6.5.** Cromatogrames de cultius de *T. versicolor* amb  $5 \text{ ppm}$  PCE al líquid on apareix un subproducte no identificat. Ampolles experimentals als 0 dies (—), 3 dies (—), 6 dies (—), 9 dies (—), ampolles autoclavades als 9 dies (—) i ampolles no inoculades als 9 dies (—).

L'activitat de lacasa es trobava fortament inhibida per l'addició de PCE, obtenint una activitat màxima d'enzim de  $45,5 \pm 4,3 \text{ UA/l}$  el tercer dia d'incubació i disminuint la resta del període (Figura 6.6). En cultius paral·lels que es van fer créixer en les mateixes condicions però sense PCE, la màxima activitat de lacasa era de  $226,2 \pm 13,5 \text{ UA/l}$ . Aquestes dades contrastaven amb l'efecte inductor que tenia el TCE sobre l'activitat de la lacasa, amb la que s'assolien valors propers a les  $4000 \text{ UA/l}$  amb  $10 \text{ ppm}$  de TCE i incubant el fong en les mateixes condicions que les emprades en aquest experiment (veure Figura 5.16).



**Figura 6.6.** Activitat enzimàtica de lacasa en cultius de *T. versicolor* amb 5 ppm de PCE (líquid)

En aquest experiment no es van poder mesurar els clorurs en el medi donat que els pèl·lets emprats s'havien resuspès en una solució de NaCl al 0,8% en pes, i encara que s'havien rentat amb aigua MilliQ abans d'inocular-los la quantitat de clorur que encara contenien interferia en l'anàlisi.

### 6.3.1.1. Efecte de l'addició d'oxigen en la degradació de PCE

Com hem vist en el capítol 5, l'oxigen a l'interior de les ampolles s'exhaureix aproximadament el cinquè dia en aquestes condicions, sent possiblement un dels factors clau que limita el procés de degradació. Així, es va voler analitzar l'efecte de l'addició d'oxigen en els cultius. Es va realitzar un nou experiment, mantenint les mateixes condicions que l'anterior, en el que cada dos dies s'analitzava una ampolla per a cada tractament (fong viu, autoclavat i abiòtica) durant dotze dies. El quart dia es varen afegir a unes ampolles 10 ml d'oxigen pur, mentre que en paral·lel es mantenien altres cultius de *T. versicolor* sense re-oxigenar. El MD emprat tenia una concentració inicial de glucosa de  $10,2 \pm 0,8$  g/l, el segon dia només restava 1,3 g/l i el quart dia ja s'havia exhaurit.

En els cultius re-oxigenats s'observa una desaparició addicional de PCE respecte els cultius sense re-oxigenar a partir del sisè dia d'incubació, i a partir del dia vuitè es mantenen estables els percentatges de degradació fins el final del període. A la Taula 6.3 es troben les mitjanes de PCE degradat i clorurs alliberats per a les tres ampolles analitzades després del vuitè dia, per als cultius re-oxigenats i sense re-oxigenar.

**Taula 6.3.** Efecte de la re-oxigenació en la degradació de PCE i en els clorurs alliberats en cultius de *T. versicolor*<sup>1</sup>

Tractament	PCE degradat ( $\mu\text{mol}$ )	Clorurs generats ( $\mu\text{mol}$ )
Cultius re-oxigenats	1.4 $\pm$ 0.08	1.4 $\pm$ 0.6
Cultius sense re-oxigenar	1.2 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.2

<sup>1</sup> Els valors presentats en aquesta Taula s'han calculat a partir de la mitjana de les tres mostres analitzades a partir del vuitè dia d'incubació quan el percentatge de degradació ja s'ha estancat

A partir de la Taula anterior, s'observa que en els cultius re-oxigenats hi ha un lleuger augment tant en la degradació de PCE com en la generació de clorurs en el medi. Tanmateix, no és un augment gaire significatiu, suggerint que possiblement hi hagin altres factors que puguin contribuir a limitar la degradació de PCE. Entre aquests factors limitants es poden trobar l'exhauriment de la glucosa i/o la presència de productes intermediaris de la degradació que puguin afectar al fong o inhibir el seu sistema enzimàtic. Com a exemple d'això darrer, s'ha descrit que els intermediaris de degradació de PCE redueixen la velocitat de creixement de *P. stutzeri* OX1 aproximadament un 27% (Ryoo *et al.*, 2000). També s'ha observat que durant la degradació de TCE i cloroform per un consorci bacterià metanogènic els subproductes generats eren tòxics pels microorganismes, fent que la degradació d'aquests productes disminuís dràsticament a les poques hores de la incubació (Alvarez-Cohen i McCarty, 1991).

Com es veurà més endavant, l'aparició del pic del producte no identificat apareix a partir del quart dia coincidint amb l'aparició dels clorurs en el medi, el que reforçarà la hipòtesis de que la degradació de PCE portaria a l'acumulació d'un subproducte.

Les mitjanes de PCE degradat per als cultius després del vuitè dia d'incubació són de 39,2 $\pm$ 2,2% en els re-oxigenats i de 33,4 $\pm$ 1,0% en els no re-oxigenats, mantenint-se en l'ordre del percentatge de degradació obtingut anteriorment.

L'activitat màxima de lacasa s'assoleix el segon dia (138,2 UA/l) i disminueix dràsticament la resta del període, assolint uns valors mitjans, tant pels cultius re-oxigenats com aquells que no ho han estat, de 67,2 $\pm$ 10,1 UA/l. De nou, es manifesta l'efecte inhibitor que té el PCE en la producció de lacasa.

### 6.3.2. Identificació dels subproductes de degradació de PCE

A partir dels indicis anteriors de l'existència d'un subproducte de degradació de PCE per l'aparició d'un pic al cromatograma de gasos, es va procedir a la seva identificació. En una primera fase es van realitzar anàlisis per cromatografia de gasos-espectrometria de masses (CG-EM) i posteriorment per ressonància magnètica nuclear (RMN). Per últim es va voler comprovar si el PCE podia mineralitzar-se fins a CO<sub>2</sub>, mitjançant l'anàlisi de la fase gas per espectrometria de masses de relació isotòpica (CG-EMRI).



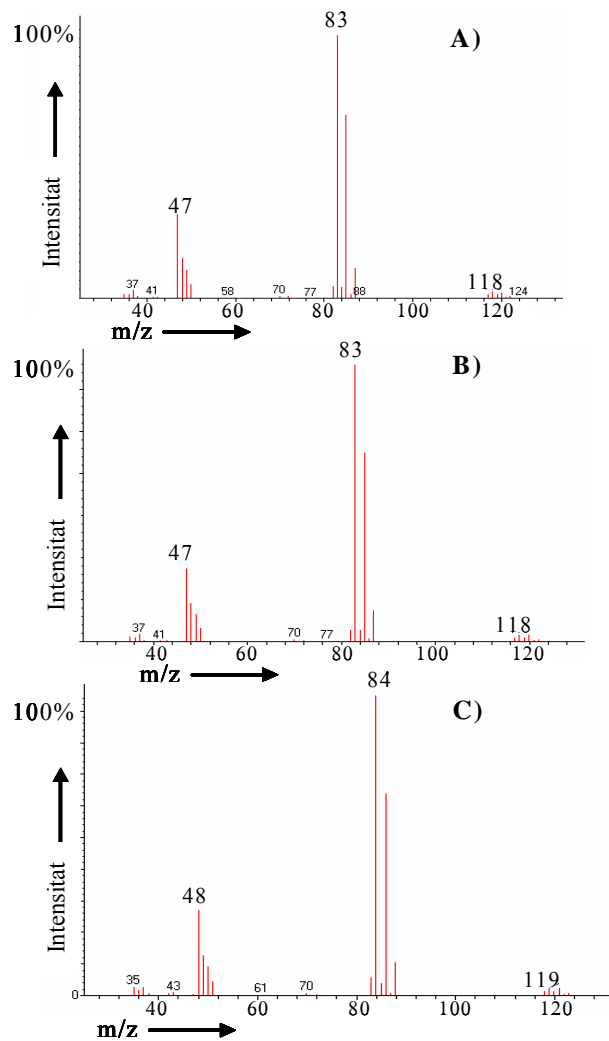
### 6.3.2.1. Subproductes a la fase líquida mitjançant CG-EM

En primer lloc es va adaptar el procediment cromatogràfic que s'havia utilitzat per analitzar els cloroetens a la detecció per espectrometria de masses. Posteriorment es varen injectar les mostres problema: una ampolla experimental i una altra amb fong autoclavat provinents de cultius amb pèl·lets de *T. versicolor* amb MD i 5 ppm de PCE al líquid, de manera anàloga als experiments anteriors. Aquestes mostres es varen analitzar després de 9 dies d'incubació.

El pic del subproducte només va aparèixer a l'ampolla experimental a un temps de retenció de 3,38 minuts. Aquest temps era lleugerament diferent a l'assolit en el nostre cromatograma, donat que en aquest cas la temperatura final del forn va ser de 200 °C en comptes de 160 °C, que és a la que operàvem normalment. De totes maneres, injeccions posteriors d'ampolles experimentals corroboraren la presència del subproducte en aquest temps de retenció en aquestes condicions, mentre que en les ampolles amb fong autoclavat aquest pic no apareixia.

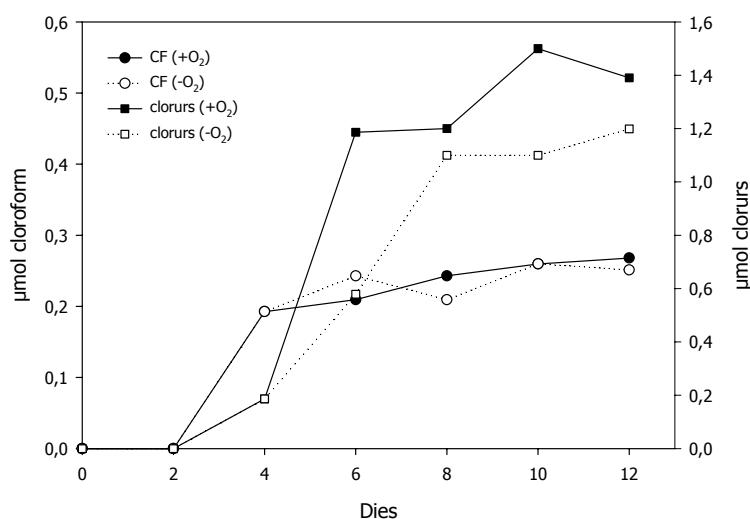
L'espectre de masses d'aquest subproducte, que es caracteritzava per uns pics a  $m/z$  de 47, 83 i 118, coincidia plenament amb el del cloroform, segons la llibreria d'espectres de massa Willey 275 (John Willey & Sons). Per tal d'establir unívocament la identificació del subproducte es va injectar una dissolució aquosa de cloroform al CG-EM. El temps de retenció i l'espectre de masses del pic de cloroform coincidien plenament amb els obtinguts pel subproducte (Figures 6.7 A i B).

Adicionalment, es va inocular *T. versicolor* amb 5 ppm de [ $^{13}\text{C}$ ]-PCE en les mateixes condicions que els experiments anteriors durant 9 dies. Es va injectar la mostra al CG-EM, identificant el pic del subproducte als 3,40 minuts. L'espectre de masses d'aquest pic coincidia plenament amb el del cloroform però amb el desplaçament de 1 unitat atòmica de massa deguda al  $^{13}\text{C}$  del cloroform de la mostra amb [ $^{13}\text{C}$ ]-PCE en relació a la no marcada isotòpicament (47→48, 83→84, 118→119), tal i com es pot observar a la Figura 6.7 C. Aquest desplaçament degut al marcatge isotòpic del cloroform demostrava que aquest subproducte provenia originàriament de la degradació de la molècula de PCE.



**Figura 6.7.** Espectre de masses del cloroform. (A) Espectre de masses de cloroform sintètic comercial. (B-C) Espectre de masses de cloroform produït en experiments de degradació amb 5 ppm de PCE en líquid no marcat (B) i marcat isotòpicament (C).

Després de la identificació del subproducte com a cloroform, es va procedir a realitzar la seva recta de calibratge al cromatògraf de gasos i a la seva quantificació. A la Figura 6.8 es troba l'evolució de la generació de cloroform i dels clorurs alliberats en el medi en l'experiment on s'han re-oxygenat les mostres (apartat 6.3.1.1). Com es pot observar, l'aparició dels clorurs coincideix amb el del cloroform el quart dia, i es produeix una certa estabilització entre ambdós paràmetres a partir del vuitè dia. Aquest estancament en la generació de clorurs i cloroform coincideix en el temps amb l'estancament de la degradació de PCE.



**Figura 6.8.** Evolució de la generació de cloroform i clorurs en cultius de *T. versicolor* amb 5 ppm de PCE en el líquid amb i sense oxigen afegit el quart dia.

D'altra banda, també es pot comprovar que no hi ha una correlació estequiomètrica de 1:1 entre els μmols de PCE degradats i els μmols de cloroform generats. A la Figura 6.8 es pot observar com es generen aproximadament 0,2 μmols de cloroform, mentre que es degradaven aproximadament entre 1,2 i 1,4 μmols de PCE (Taula 6.2). Aquest aspecte s'estudia en el següent apartat.

### 6.3.2.2. Subproductes a la fase líquida mitjançant RMN

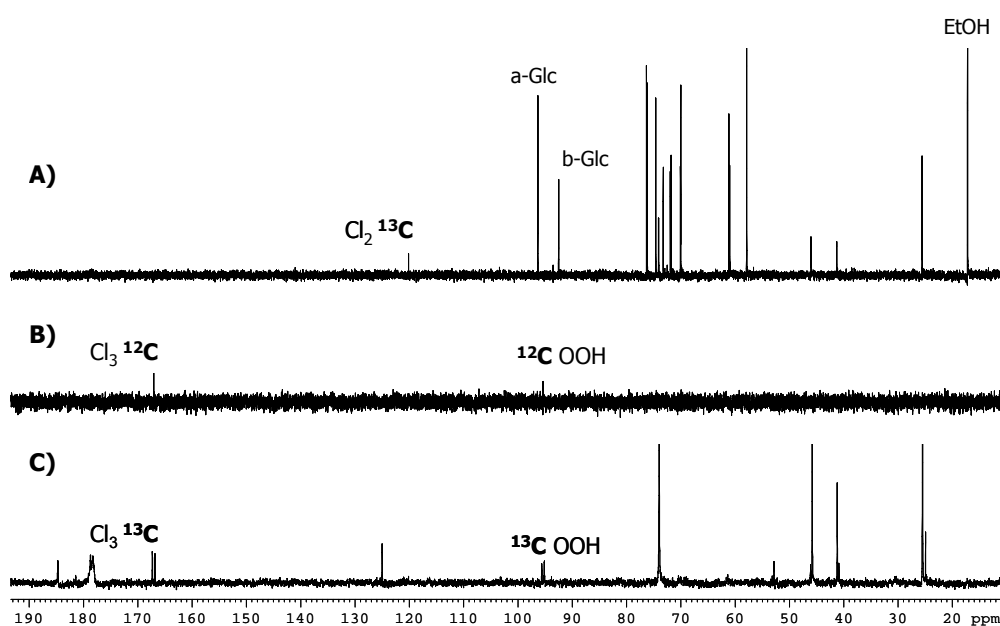
A partir dels resultats obtinguts amb CG-EM, la hipòtesis amb la que treballàvem era la possible formació abiòtica de cloroform a partir d'un altre subproducte de degradació, de manera similar a com succeïa amb l'hidrat de cloral (veure Figura 5.4). Aquesta suposició estava basada en el fet que la generació de cloroform a partir de la biodegradació de PCE no havia estat descrita anteriorment.

Per tant, es va procedir com en l'experiment anterior a la inoculació de 5 ppm de [<sup>13</sup>C]-PCE en cultius de *T. versicolor* viu i autoclavat durant 9 dies en MD. Aquestes ampolles es varen analitzar posteriorment per RMN i els espectres obtinguts es varen comparar amb els dels següents estàndards:

- Àcid fòrmic, cloroform, àcid tricloroacètic, 2,2,2-tricloroetanol, hidrat de cloral i àcid dicloroacètic: eren els principals subproductes de degradació de TCE per oxigenases (veure Figura 5.4).
- Cloroform: era el subproducte de degradació de PCE identificat prèviament per CG-EM.
- Àcid tricloroacètic i el clorur de tricloroacetil: eren els subproductes habituals en l'oxidació de PCE per citocrom P450 en mamífers (veure Figura 6.3).

Els subproductes de degradació típics obtinguts en la dechloració reductiva anaeròbia de PCE (TCE, cis-DCE, trans-DCE, clorur de vinil i etè) no es van analitzar per RMN donat que els seus pics es podien identificar amb el procediment habitual de cromatografia de gasos i no apareixia cap pic en les ampolles experimentals en aquests temps de retenció.

A partir d'aquests espectres es va confirmar la presència d'àcid tricloroacètic marcat isotòpicament ( $[^{13}\text{C}]\text{-TCA}$ ) en el medi líquid dels cultius amb *T. versicolor*. L'anàlisi de la mostra amb 5 ppm de  $[^{13}\text{C}]\text{-PCE}$  amb *T. versicolor* viu donava lloc a l'aparició d'un sistema d'espins del tipus AX a uns desplaçaments químics de 167,1 i 95,4 ppm (Figura 6.9C). Cadascun d'aquests senyals apareixia com un doblet separat a una distància de 61 Hz degut a l'acoblament C-C, que confirmava que l'àcid tricloroacètic es trobava marcat isotòpicament i per tant provenia originàriament del  $[^{13}\text{C}]\text{-PCE}$ . Aquestes resonàncies coincidien plenament amb l'espectre obtingut amb una mostra d'àcid tricloroacètic comercial no marcada isotòpicament (Figura 6.9B). D'altra banda, en els cultius amb el fong autoclavat no es va detectar  $[^{13}\text{C}]\text{-TCA}$ , mentre que sí eren visibles els senyals de  $[^{13}\text{C}]\text{-PCE}$ , etanol i d'alfa i beta-glucosa (Figura 6.9A).

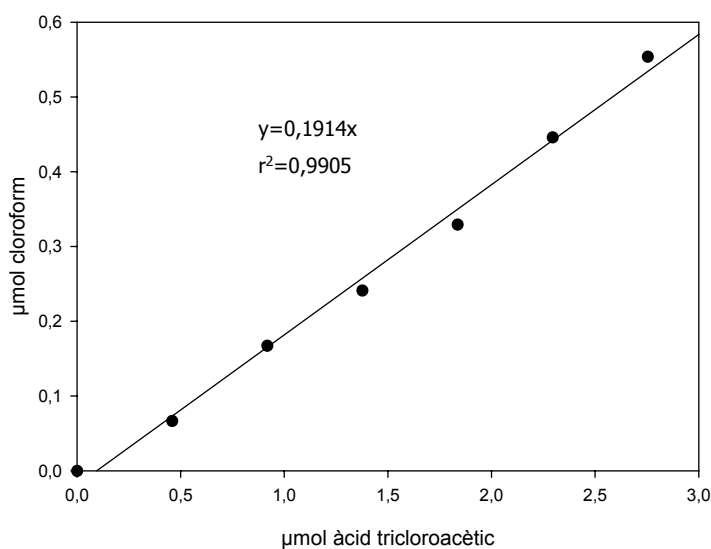


**Figura 6.9.** Espectre per RMN per a la identificació dels subproductes de la degradació de PCE per *T. versicolor*. Espectre dels cultius amb 5 ppm de  $[^{13}\text{C}]\text{-PCE}$  amb *T. versicolor* autoclavat (A) i viu (C). Espectre d'una dissolució d'àcid tricloroacètic comercial (B). En els espectres s'assenyalen els pics assolits pels carbonis de l'àcid tricloroacètic ( $\text{Cl}_3\text{C-COOH}$ ), per al PCE ( $\text{Cl}_2\text{C-CCl}_2$ ), etanol (EtOH) i per l'alfa i beta glucosa (a-Glc i b-Glc).

Per tal de comprovar que el subproducte identificat prèviament com a cloroform era realment àcid tricloroacètic, es va injectar una solució d'aquest àcid a pH 4,5 amb el mateix procediment cromatogràfic que utilitzem per l'anàlisi de cloroetens. Efectivament, després d'escalfar-se el vial a 85 °C durant 50 minuts apareixia el pic de cloroform a un temps de retenció de 3,150 min. Tot i que l'àcid tricloroacètic és normalment estable, està descrit que en solucions diluïdes en aigua es pot descompondre lentament depenent de la temperatura, donant lloc a cloroform i diòxid de carboni (web CCOHS).

D'altra banda, es va realitzar una recta de calibrat entre l'àcid tricloroacètic i el cloroform format, tal i com s'observa a la Figura 6.10. Es pot apreciar com per cada  $\mu\text{mol}$  d'àcid tricloroacètic es genera

aproximadament cinc vegades menys de cloroform. Si apliquem la recta de regressió a l'experiment on s'han reoxigenat les mostres, comprovem que en les ampolles re-oxigenades es generaven 1,34  $\mu\text{mol}$  d'àcid tricloroacètic i en les no re-oxigenades 1,31  $\mu\text{mol}$ . Aquests resultats es troben en concordança amb el balanç estequiomètric realitzat entre els  $\mu\text{mol}$  de PCE degradat i els  $\mu\text{mol}$  de clorur alliberat presentats a la Taula 6.3. D'aquesta manera, per cada  $\mu\text{mol}$  de PCE degradat es generaria un  $\mu\text{mol}$  d'àcid tricloroacètic i s'alliberaria un  $\mu\text{mol}$  de clorur en el medi.



**Figura 6.10.** Recta de calibratge entre l'àcid tricloroacètic i el cloroform analitzat abiòticament per cromatografia de gasos

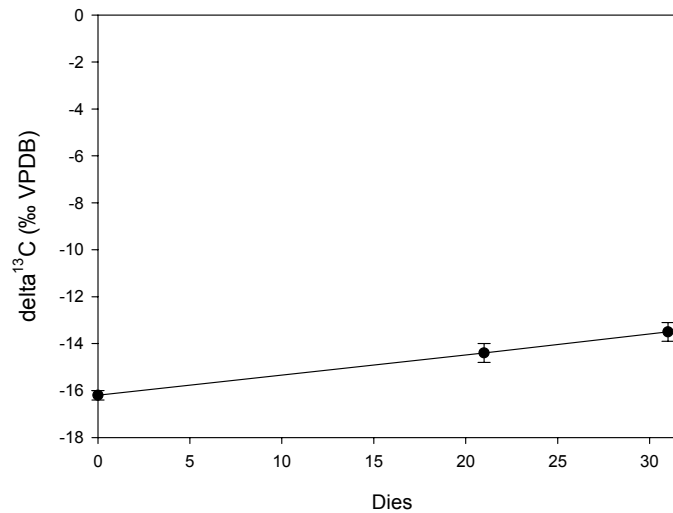
A diferència del clorur de vinil i del cis-DCE, productes majoritaris en la degradació de PCE per bacteris, l'àcid tricloroacètic no està considerat com a possible carcinogen, és molt menys tòxic i és fàcilment degradable pels microorganismes en el medi (De Wever *et al.*, 2000; Weightman *et al.*, 1992; Kearney *et al.*, 1969; McRae *et al.*, 2004; Yu i Welander, 1995). Aquestes característiques suposen una avantatge en l'aplicació del fong de podridura blanca *T. versicolor* per la degradació de PCE en relació a la dechloració reductiva anaeròbia per bacteris.

### 6.3.2.3. Mineralització de PCE

Per determinar si el fong era capaç de mineralitzar el PCE, es va analitzar la fase gas de cultius de *T. versicolor* amb 5 ppm de  $^{13}\text{C}$ -PCE per CG-EMRI. Donat que aquest experiment es va realitzar en paral·lel amb el del TCE (veure apartat 5.3.3.1), el MD contenia també 16 g/l de glucosa i l'experiment es va allargar analitzant les mostres el dia 21 i 31. Paral·lelament a les mostres amb  $^{13}\text{C}$ -PCE es varen utilitzar com a controls cultius de *T. versicolor* amb PCE sense marcar isotòpicament. Les condicions de cultiu varen ser estàtiques i per cada tractament es varen fer triplicats.

A la Figura 6.11 s'observa com en els cultius amb 5 ppm de  $^{13}\text{C}$ -PCE hi ha un lleuger augment en la  $\delta^{13}\text{C}$  que indica la presència d'una quantitat reduïda de  $^{13}\text{CO}_2$ . La mitjana de les  $\delta^{13}\text{C}$  pels controls ha estat de  $-16,2 \pm 0,2$  ‰ VPDB, mentre que en les ampolles marcades han estat de  $-14,4 \pm 0,4$  ‰

VPDB (dia 21) i  $-13,5 \pm 0,4$  ‰ VPDB (dia 31), tal i com es pot observar a la Figura 6.11. L'error associat a l'aparell és de 0,5 ‰ VPDB, així que una diferència d'aproximadament 3‰ VPDB entre les mostres marcades i els controls es pot considerar degudes a la presència de  $^{13}\text{CO}_2$ . Tanmateix, si es comparen aquests valors de  $\delta^{13}\text{C}$  amb les assolides amb el TCE (veure Figura 5.23) es pot comprovar que els valors assolits aquí són molt reduïts.



**Figura 6.11.** Evolució de la  $\delta^{13}\text{C}$  en cultius de *T. versicolor* amb 5 ppm de  $[^{13}\text{C}]$ -PCE

Donat que no s'ha pogut calcular el percentatge de mineralització perquè no es disposen de dades de la concentració de diòxid de carboni total per aquests cultius, aquestes dades només indiquen la capacitat de *T. versicolor* de mineralitzar una part reduïda de PCE.

Tanmateix, cal matissar que les condicions en les que es va realitzar aquest experiment difereixen de les emprades en la resta del capítol. Així, s'apunten tres possibles hipòtesis per interpretar aquest resultat. D'una banda, si es produeix mineralització en els primers 9-12 dies d'incubació (període en el que s'han realitzat els experiments de degradació d'aquest capítol), aquesta ha de ser molt reduïda perquè el balanç de PCE, clorurs i àcid tricloroacètic és molt consistent, i s'hauria d'haver manifestat en un increment substancial dels clorurs en el medi. D'una altra banda, pot ser que aquesta mineralització es produeixi a partir de períodes d'incubació més llargs, donat que la  $\delta^{13}\text{C}$  es varen calcular pels dies 21 i 31. Per últim, un altre factor pot ser que les condicions estàtiques i amb l'addició del fong en forma de suspensió triturada s'afavoreixi la mineralització del PCE respecte l'addició en forma de pèl·lets i en condicions d'agitació.

### 6.3.3. Estudi de la via de degradació de PCE

En aquest apartat es descriuen una sèrie d'experiments realitzats amb l'objectiu de trobar el mecanisme de degradació de PCE emprat per *T. versicolor*. S'han realitzat experiments de degradació amb PCE *in vitro* amb el sistema lacasa-mediadors i *in vivo* amb l'inhibidor del citocrom P450. D'altra

banda, també s'ha volgut comprovar si era possible una degradació addicional d'àcid tricloroacètic amb el fong, mitjançant experiments *in vitro* amb el sistema lacasa-mediadors i *in vivo* amb *T. versicolor*.

### 6.3.3.1. Estudis *in vitro* amb lacasa comercial i mediadors

Malgrat s'ha comprovat que l'activitat de la lacasa es troba inhibida en presència de PCE, s'ha realitzat un experiment *in vitro* amb el sistema lacasa-mediadors per tal de descartar que aquest enzim estigui implicat en el mecanisme de degradació. Es va procedir de manera anàloga a l'experiment amb TCE amb lacasa i mediadors (apartat 5.3.4.1), però afegint una concentració de 5 ppm de PCE en el líquid i per duplicat. Després de 24h en agitació, a la Taula 6.4 es troba la concentració de PCE en les ampolles per cada tractament. Es pot observar que no hi ha una disminució de PCE en les ampolles amb la lacasa i els diferents mediadors testats respecte el control. Aquestes dades no permeten demostrar que la lacasa estigui implicada en el primer estadi de degradació de PCE.

**Taula 6.4.** Concentració de PCE en les ampolles experimentals després de 24 h d'incubació amb lacasa i diferents mediadors

	PCE ( $\mu\text{mol}$ )
<b>Control</b>	4,15 $\pm$ 0,48
<b>Lacasa (sense mediador)</b>	4,29 $\pm$ 0,15
<b>DMHAF</b>	4,22 $\pm$ 0,14
<b>ABTS</b>	4,54 $\pm$ 0,01
<b>HOBT</b>	4,44 $\pm$ 0,09
<b>AV</b>	4,06 $\pm$ 0,21

Anteriorment havíem assolit també uns resultats negatius amb el sistema lacasa-mediadors amb TCE. Donat que la molècula de PCE es troba més oxidada que el TCE, era raonable que l'oxidació de PCE no es produís amb la lacasa i els mediadors utilitzats.

### 6.3.3.2. Estudis *in vivo* amb inhibidor del citocrom P450

De les vies de biodegradació de PCE descrites anteriorment a la introducció d'aquest capítol, es pot comprovar que només s'ha descrit la generació d'àcid tricloroacètic en mamífers per oxidació mitjançant el citocrom P450. Donat que aquest mecanisme ja era utilitzat pel fong en el cas del TCE, s'ha realitzat un experiment d'inhibició del citocrom P450 per *T. versicolor* afegint 1 mM ABT en MD amb 5 ppm de PCE i per triplicat. També s'han inclòs cultius amb fong autoclavats i cultius amb *T. versicolor* sense ABT.

Els resultats presentats a la Taula 6.5 suggereixen la implicació del citocrom P450 en la degradació de PCE. En els cultius de *T. versicolor* sense ABT, a diferència dels que contenen l'inhibidor, s'observa una concentració de PCE substancialment més reduïda que en els cultius autoclavats, es produeix un alliberament de clorurs i apareix el pic de cloroform que indica la formació d'àcid tricloroacètic.

**Taula 6.5.** Efecte de l'inhibidor del citocrom P450 1-aminobenzotriazol (ABT) en la degradació de PCE després de 7 dies d'incubació

	<b>PCE (<math>\mu\text{mol}</math>)</b>	<b>Clorurs (<math>\mu\text{mol}</math>)<sup>1</sup></b>	<b>Lacasa (UA/l)</b>	<b>Biomassa (mg)</b>	<b>Àcid tricloroacètic (<math>\mu\text{mol}</math>)</b>
<b>Controls amb fong sense ABT</b>	1,95 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,8	56,1 $\pm$ 0,5	0,90 $\pm$ 0,05
<b>Cultius amb fong amb 1 mM ABT</b>	3,01 $\pm$ 0,21	0	5153,9 $\pm$ 597,6	42,1 $\pm$ 1,1	-
<b>Controls amb fong autoclavats</b>	2,62 $\pm$ 0,23	0		39,0 $\pm$ 1,0	-

<sup>1</sup> Els  $\mu\text{mol}$ s de clorurs que es presenten són els alliberats pel trencament de la molècula de TCE, de manera que s'ha restat el valor total de clorurs presents en cada tractament dels obtinguts en els cultius autoclavats.

Els  $\mu\text{mol}$ s de clorurs obtinguts en els medis autoclavats i amb ABT han estat de 2,7 $\pm$ 0,1 i 2,9 $\pm$ 0,2, respectivament. Els clorurs provinents de la biodegradació de PCE es calculen restant els obtinguts en els medis respecte els obtinguts en els cultius autoclavats. En aquest cas la quantitat de clorurs generats en els cultius amb ABT seria superior al seu error associat (0,2 $\pm$ 0,3  $\mu\text{mol}$  clorurs), de manera que s'ha considerat que no es generen amb aquest tractament. En canvi, en els cultius sense inhibidor els  $\mu\text{mol}$  de clorurs totals han estat de 3,5 $\pm$ 0,2, indicant que provenen de la degradació de PCE.

La relació teòrica entre  $\mu\text{mol}$ s de PCE degradats,  $\mu\text{mol}$ s d'àcid tricloroacètic generat i  $\mu\text{mol}$ s de clorurs alliberats era de 1:1:1. En els cultius sense ABT, es pot comprovar a partir de la Taula 6.5 com aquesta relació es manté molt propera obtenint 1,1 $\pm$ 0,3  $\mu\text{mol}$ s de PCE degradats, 0,8 $\pm$ 0,3  $\mu\text{mol}$ s de clorurs i 0,90 $\pm$ 0,05  $\mu\text{mol}$ s d'àcid tricloroacètic.

De nou, es pot observar com el PCE té un efecte inhibidor en l'activitat de la lacasa, mentre que l'assaig de lacasa amb els cultius amb ABT dóna uns valors desproporcionadament elevats degut a què és un substrat d'aquest enzim.

Aquests resultats són remarcables donat que la degradació aeròbia de PCE per la via del citocrom P450 i la posterior generació d'àcid tricloroacètic només havia estat demostrada anteriorment en mamífers però no en fongs ni bacteris.

### 6.3.3.3. Estudis de degradació *in vivo* dels possibles intermediaris

Com s'ha esmentat anteriorment, hi ha diferents microorganismes capaços de degradar àcid tricloroacètic. Una possible explicació de per què no es produeix una degradació addicional d'aquest compost en els cultius de *T. versicolor* podria ser el fet que el PCE inhibeix l'activitat enzimàtica de la lacasa. D'aquesta manera, es va voler comprovar si era possible degradar àcid tricloroacètic *in vitro* amb lacasa i diferents mediadors. Per últim, es va voler comprovar si *T. versicolor* podia degradar directament àcid tricloroacètic *in vivo*, donat que l'existència d'altres mecanismes enzimàtics alternatius a la lacasa podrien fer que *T. versicolor* degradés aquest compost.



### ***Estudi de degradació d' àcid tricloroacètic in vitro amb lacasa i mediadors***

La concentració de lacasa afegida va ser aproximadament de 5000 UA/l. Aquest experiment es va fer per duplicat i per cada tractament es varen analitzar els clorurs d'una ampolla. La concentració inicial d'àcid tricloroacètic era de 7 ppm en el líquid (concentració lleugerament inferior a l'obtinguda en els experiments de degradació anteriors) i considerant una constant de Henry de  $5,524 \times 10^{-7}$  (Bowden *et al.*, 1998). La concentració d'àcid tricloroacètic es va quantificar indirectament a partir del pic de cloroform que apareixia en el cromatograma i la recta de calibratge de la Figura 6.10. A la Taula 6.6 es troben els resultats obtinguts en aquest experiment.

**Taula 6.6.** Àcid tricloroacètic i clorurs en experiments amb diferents sistemes lacasa-mediador amb 7 ppm d'àcid tricloroacètic en el medi líquid

	<b>Àcid tricloroacètic (<math>\mu\text{mol}</math>)</b>	<b>Clorurs (<math>\mu\text{mol}</math>)</b>
<b>Control</b>	0,430 $\pm$ 0,039	0,671
<b>Lacasa (sense mediador)</b>	0,409 $\pm$ 0,012	0,707
<b>DMHAF</b>	0,408 $\pm$ 0,029	0,643
<b>ABTS</b>	0,463 $\pm$ 0,020	0,502
<b>HOBT</b>	0,423 $\pm$ 0,026	0,564
<b>AV</b>	0,452 $\pm$ 0,039	0,600

Es pot comprovar que els  $\mu\text{mol}$ s d'àcid tricloroacètic per a tots els tractaments no disminueixen significativament respecte el control, de la mateixa manera que succeeix amb els clorurs en el medi. Per tant, aquests resultats suggereixen que encara que la lacasa no es trobés inhibida pel PCE tampoc es produiria una degradació addicional de l'àcid tricloroacètic.

### ***Estudi de degradació d'àcid tricloroacètic in vivo per T. versicolor***

Es va incubar el fong en MD amb 5 ppm en el líquid d'àcid tricloroacètic. Es van incloure dos tractaments, un amb fong viu i un altre amb fong autoclavat, ambdós per duplicat. Després d'un període d'incubació de 5 dies es va mesurar el cloroform dels cultius, els clorurs en el medi i l'activitat de la lacasa.

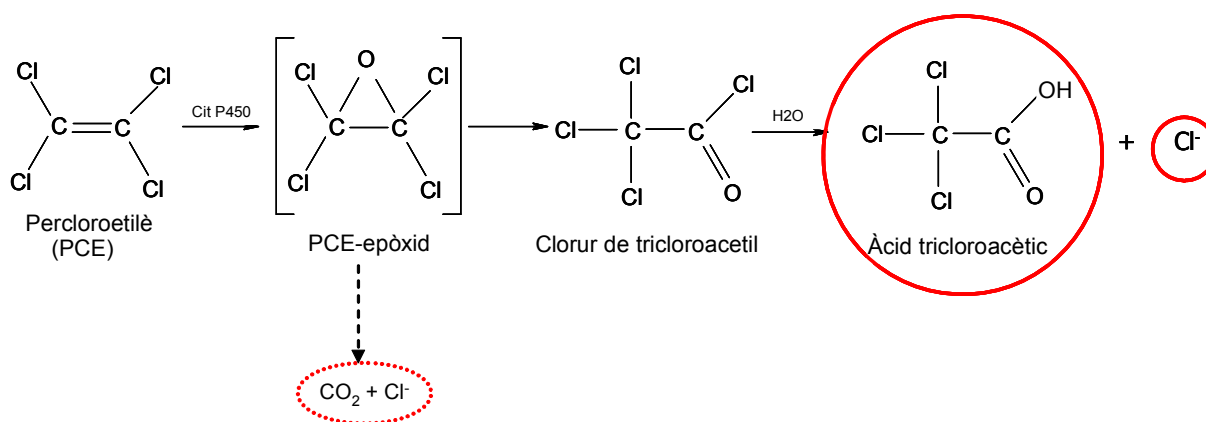
Segons els resultats obtinguts a la Taula 6.7, no s'aprecia ni desaparició d'àcid tricloroacètic (calculat indirectament a partir dels cloroform generat) ni una diferència substancial de clorurs alliberats en el medi. Aquestes dades indiquen que *T. versicolor* atura la degradació de PCE en àcid tricloroacètic perquè no és capaç de degradar-lo en les condicions testades.

**Taula 6.7.** Àcid tricloroacètic, clorurs i activitat de lacasa en cultius de *T. versicolor* amb 5 ppm d'àcid tricloroacètic

	Àcid tricloroacètic ( $\mu\text{mol}$ )	Clorurs ( $\mu\text{mol}$ )	Lacasa (UA/l)
<b>Ampolles experimentals</b>	$0,381 \pm 0,005$	$0,503 \pm 0,070$	$237,5 \pm 21,9$
<b>Cultius autoclavats</b>	$0,371 \pm 0,005$	$0,481 \pm 0,040$	-

### 6.3.4. Via proposada de degradació de PCE per *T. versicolor*

Dels resultats obtinguts anteriorment, hi ha dues dades bàsiques que permeten proposar la via emprada per *T. versicolor* en la degradació de PCE. D'una banda, la identificació de l'àcid tricloroacètic per RMN com a principal subproducte de degradació, i d'altra banda la possible implicació del sistema citocrom P450 a partir dels experiments d'inhibició. Sengles resultats indiquen un paral·lelisme amb la via majoritària de degradació de PCE en els mamífers mitjançant el citocrom P450. Segons aquesta via, l'oxidació de PCE per citocrom P450 donaria lloc a un intermediari inestable, l'epòxid de PCE, el qual seria transformat ràpidament a clorur de tricloroacetil. Aquest compost és molt inestable en aigua i s'hidrolitza ràpidament de manera abiòtica formant l'àcid tricloroacètic. La relació estequiomètrica entre els  $\mu\text{mol}$ s de PCE degradats, els d'àcid tricloroacètic generats i els clorurs alliberats coincideix plenament amb aquesta hipòtesis. Tanmateix, en els experiments amb CG-EMRI també s'ha observat una  $\delta^{13}\text{C}$  lleugerament superior en els cultius de *T. versicolor* amb  $[^{13}\text{C}]$ -PCE, el que indica la possible mineralització d'una petita part del PCE. Donat que en els experiments de degradació d'àcid tricloroacètic *in vitro* amb lacasa i mediadors i *in vivo* amb *T. versicolor* no s'ha observat la degradació del producte, possiblement la part mineralitzada provingui de la reacció de l'epòxid de PCE amb algun dels mecanismes enzimàtics del fong. A la Figura 6.12 es troba la via de degradació de PCE proposada per *T. versicolor*.



**Figura 6.12.** Via de degradació de PCE proposada per *T. versicolor*. S'han encerclat els subproductes identificats.

### 6.3.5. Conclusions

Els resultats presentats en aquest capítol constitueixen la primera evidència de degradació de PCE en condicions aeròbies per fongs. Anteriorment, només el bacteri *Pseudomonas stutzeri* OX1 havia demostrat la capacitat de degradar aeròbiament el PCE (Ryoo *et al.*, 2000). Donat que *T. versicolor* és un fong caracteritzat per la seva ubiqüitat en els medis naturals i que es troba estès arreu del món, pot constituir un organisme interessant en la bioremediació d'espais contaminats per PCE. Alhora és el primer organisme descrit capaç de degradar el PCE utilitzant la mateixa via oxidativa que la dels mamífers, el citocrom P450. Una avantatge addicional fa referència al subproducte de degradació obtingut per aquesta via en relació als obtinguts habitualment en la decloració reductiva per bacteris (cis-DCE i clorur de vinil), donat que l'àcid tricloroacètic és menys tòxic, no és carcinogen i és més fàcilment biodegradable en el medi.

Els percentatges de degradació de PCE assolits per *T. versicolor* en aquestes condicions són propers al 40% durant els primers tres dies i la seva velocitat de degradació oscil·laria entre  $2,04$  i  $2,75 \times 10^{-3} \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg de proteïna}^{-1}$ .

Els resultats d'inhibició suggereixen que el citocrom P450 està implicat en la degradació de PCE per *T. versicolor*. El subproducte generat seria clorur de tricloroacetil, el qual s'hidrolitzaria ràpidament en aigua de manera abiòtica generant àcid tricloroacètic. Aquest producte es transforma abiòticament en cloroform durant l'escalfament de la mostra al *headspace* a  $85^\circ\text{C}$  durant 50 minuts. Per aquest motiu, els anàlisi per CG-EM indicaven inicialment que aquest era el subproducte de degradació de PCE.

El balanç realitzat a partir dels  $\mu\text{mols}$  de PCE degradats, àcid tricloroacètic generat i clorurs alliberats en els diferents experiments són consistents amb la transformació de PCE a àcid tricloroacètic, donant una correlació experimental propera a la teòrica 1:1:1. Tanmateix, s'han detectat baixes concentracions de diòxid de carboni procedents de PCE, però les condicions de cultiu han estat diferents a les emprades en la resta del capítol.

S'ha suggerit que la impossibilitat d'una degradació addicional d'àcid tricloroacètic podria ser deguda a la baixa activitat de lacasa en el medi degut a l'efecte inhibidor del PCE. Tanmateix, experiments *in vitro* amb lacasa i mediadors i posteriorment amb cultius de *T. versicolor* indiquen que aquest compost no és degradable pel fong en les condicions de treball. Per tant, es suggereix que la mineralització de PCE, en el cas que es produeixi, es pugui generar a partir de l'epòxid de PCE.

La re-oxigenació dels cultius durant la incubació, tot i que provoquen un lleuger augment tant en la degradació com en la generació de clorurs, no sembla ser un dels factors claus que limiti el procés de degradació. Altres factors implicats podrien ser l'exhauriment de la font de carboni (glucosa) o la presència d'un intermediari tòxic pel fong, com s'ha descrit en el cas dels bacteris.



# Capítol 7

## Estudi de variables que poden influir en el tractament d'efluents reals contaminats per TCE i/o PCE

Part dels resultats d'aquest capítol han estat enviats per a la seva publicació a la següent revista:

- Vilaplana, M., E. Marco-Urrea, X. Gabarrell, M. Sarrà, G. Caminal. Three-phase bioreactor to degrade trichloroethylene and perchloroethylene by *Trametes versicolor*: Equilibrium studies. Chem. Eng. J. Submitted.

### Resum

En aquest capítol es duen a terme alguns experiments per realitzar una primera aproximació al comportament de *T. versicolor* en el tractament d'efluents reals contaminats per PCE i/o TCE. Aquests experiments s'han realitzat amb pèl·lets, medi definit i en agitació. Hem comprovat que el fong no podia degradar cis-DCE, que és un producte tòxic que es troba habitualment en medis contaminats per PCE i TCE. Tanmateix, no s'han observat indicis de toxicitat que puguin afectar al creixement del fong per a una concentració de 5 ppm de cis-DCE. S'ha demostrat que *T. versicolor* pot degradar eficientment barreges binàries de PCE (5 ppm) i TCE (10 ppm), assolint índexs de degradació i de generació de subproductes similars als assolits quan el fong degrada el PCE i TCE per separat. S'han realitzat experiments amb pèl·lets de *T. versicolor* i en agitació a diferents concentracions de PCE (3, 5 i 10 ppm) i TCE (5, 10, 15 i 20 ppm) per separat. Els percentatges màxims de degradació s'assoleixen a concentracions reduïdes dels contaminants, assolint un màxim de 74,8% pel TCE (5 ppm) i 44,5% pel PCE (3 ppm). Per al rang de concentracions testats es manté el balanç de subproductes i clorurs proposats durant els experiments realitzats en els capítols anteriors. A partir d'aquestes dades, s'ha determinat que l'equació de Michaelis-Menten ens permet calcular de manera aproximada el temps necessari de tractament per assolir un determinat percentatge de degradació pel TCE. Finalment, s'ha establert que la isoterma de Freundlich és la que millor descriu l'adsorció de TCE i PCE en pèl·lets de *T. versicolor* i s'ha validat amb els resultats obtinguts en els experiments de degradació a diferents concentracions anteriors.

## 7.1. Introducció

En els capítols anteriors s'ha escollit l'addició de *T. versicolor* en forma de pèl·lets per a la seva utilització en reactor per a la biodegradació de medis contaminats amb PCE i/o TCE. Aquesta morfologia presentava certs avantatges com una disminució del temps de latència en relació a l'addició del fong en suspensió triturada en condicions estàtiques i una millor transferència de massa i homogeneïtzació a l'interior del bioreactor en relació al fong en forma de micel·li dispers. Alhora, amb el medi definit (MD) s'assolien uns percentatges de degradació més elevats i permetia realitzar el seguiment dels clorurs alliberats en el medi durant el procés de degradació. En aquest capítol es realitzaran alguns experiments amb aquestes condicions en els que s'incorporen alguns paràmetres que poden intervenir durant la degradació d'efluents reals contaminats per PCE i/o TCE.

En primer lloc, s'ha volgut comprovar la capacitat de *T. versicolor* per degradar cis-1,2-dicloroetilè (cis-DCE). Aquest experiment es justifica perquè, juntament amb el clorur de vinil, el cis-DCE es pot acumular en indrets contaminats per PCE i TCE degut a la decloració incompleta dels productes en condicions anaeròbies. D'aquesta manera, segurament trobarem la presència d'aquest producte en efluents contaminats per PCE i TCE. Alhora, no s'ha demostrat que cap fong ligninolític pugui degradar-lo i és un producte amb una toxicitat elevada.

En segon lloc, en medis contaminats per PCE és habitual trobar també concentracions importants de TCE provinents de la decloració reductiva anaeròbia incompleta del PCE o bé degut a la seva aplicació simultània en els processos industrials. D'aquesta manera, era interessant comprovar si la presència simultània de PCE i TCE en el medi afectava a la seva degradació.

Posteriorment, s'ha volgut comprovar la influència de diferents concentracions de PCE i TCE en la seva degradabilitat, donat que anteriorment s'havia realitzat un experiment similar amb el TCE però en condicions estàtiques i amb el fong en forma de suspensió triturada. En condicions reals, l'existència de bassals en els aqüífers i la volatilitat dels productes fan que els efluents presentin una variabilitat important en la seva concentració. A partir d'aquests resultats, s'ha volgut determinar dos paràmetres clau en el disseny d'un bioreactor pel tractament d'efluents contaminats per TCE i PCE. D'una banda, s'ha comprovat l'ajust d'una isoterma d'adsorció dels contaminants amb els pèl·lets del fong, i d'una altra, s'ha calculat la cinètica de desaparició de TCE en el temps.

### 7.1.1. Biodegradació de cis-DCE

En sòls o aigües subterrànies contaminades per PCE i TCE on les condicions anaeròbies predominen en el medi, la seva reducció habitualment porta a l'acumulació de cis-DCE i/o clorur de vinil. Aquest fenomen es produeix perquè el PCE i TCE es troben en un estat molt oxidat i estan termodinàmicament més afavorits a ser reduïts que no pas el clorur de vinil o el cis-DCE, que es troben en un estat d'oxidació més baix. D'aquesta manera, la velocitat de decloració reductiva dels productes

representats a la Figura 6.1 disminueix a mesura que ho fa el grau de cloració dels productes (Bouwer, 1994). Això suposa un perill per a la salut humana donat que el cis-DCE és un possible carcinogen i és un producte tòxic, mentre que el clorur de vinil es considera més perillós que el TCE i PCE per la seva toxicitat i carcinogenicitat. Aquest fet suposa una limitació important a la bioremediació anaeròbia de PCE i TCE (He *et al.*, 2003; Kielhorn *et al.*, 2000).

Per a la seva completa degradació s'ha proposat la combinació de sistemes anaerobis, amb els que s'assoleix la reducció del PCE i TCE fins a cis-DCE i clorur de vinil, amb sistemes aerobis on la degradació d'aquests compostos és més fàcilment assolible (Vogel, 1994). Tanmateix, s'ha demostrat que la decloració reductiva del cis-DCE fins a etè i/o età és possible amb alguns consorcis bacterians en condicions anaeròbies (Komatsu *et al.*, 1994; Bloom *et al.*, 2000; Tandoi *et al.*, 1994). En aquests casos, s'han realitzat estudis filogenètics dirigits a identificar els organismes responsables de la degradació anaeròbia del cis-DCE i els mecanismes de degradació implicats (Hata *et al.*, 2004; Flynn *et al.*, 2000; Duhamel *et al.*, 2002). Aquests estudis han demostrat que es produeixen uns canvis en la composició bacteriana durant la degradació de PCE quan apareix el cis-DCE, suggerint que intervenen diferents organismes durant la decloració successiva de PCE fins a etè.

Respecte als cultius purs, Coleman *et al.* (2002) ha aïllat l'únic bacteri haloinspirador capaç d'usar cis-DCE com a única font de carboni i energia. Aquest bacteri va ser aïllat d'un filtre de carbó actiu que tractava aigua contaminada amb PCE i cis-DCE i es va identificar com a un  $\beta$ -proteobacteri. En aquest cas, el balanç de clorurs assenyalava que es produïa una decloració completa del producte i es va suggerir la formació d'un epòxid com a primer pas en la degradació del contaminant. El bacteri *Dehalococcoides ethenogens* 195, que va ser el primer en declorar completament PCE fins a etè (Maymó-Gatell *et al.*, 1997), també utilitza durant el procés de degradació cis-DCE com a acceptor electrònic. Tanmateix, en aquest cas s'acumulaven concentracions elevades de clorur de vinil donat que el bacteri no podia utilitzar-lo com a substrat de creixement, requerint PCE o TCE per a la degradació co-metabòlica del clorur de vinil.

Alguns estudis han demostrat la degradació co-metabòlica de cis-DCE en condicions aeròbies en presència de substrats primaris com el metà, propà, etè o toluè (Schäfer i Bouwer, 2000; Malachowsky *et al.*, 1994; Henson *et al.* 1988; Arcangeli *et al.*, 1996; Koziollek *et al.*, 1999). Freedman *et al.* (2001) també va observar biodegradació de cis-DCE en presència de clorur de vinil com a substrat primari en un consorci bacterià provinent d'un aquífer contaminat per dissolvents clorats.

A diferència de la decloració reductiva, alguns estudis han proposat la degradació oxidativa del cis-DCE en condicions anaeròbies. Concretament, s'ha observat la mineralització del cis-DCE en diferents sediments anaerobis sota condicions reductores de Fe(III), sulfat i metanogèniques (Bradley, 1997 i 1998a) i en condicions reductores a partir d'àcids húmics (Bradley *et al.*, 1998b). Durant la degradació oxidativa anaeròbia en aquestes condicions no s'ha detectat la producció d'etens clorats. Tanmateix, els organismes i els mecanismes de degradació implicats encara no han estat demostrats (Hata *et al.*, 2004).

### 7.1.2. Barreges de PCE/TCE i efecte de les concentracions

Hi ha relativament pocs estudis publicats sobre degradació de barreges de productes clorats i la majoria s'han realitzat utilitzant consorcis bacterians en comptes de cultius purs, que permeten estudiar la implicació singular dels enzims de cada bacteri i eviten els efectes d'una possible associació de sintròfia (Chang i Alvarez-Cohen, 1996; Aulenta *et al.*, 2006; Frascari *et al.*, 2006).

Tanmateix, s'ha demostrat la capacitat d'alguns cultius purs per degradar barreges de cloroetens, com la soca *Methylosinus trichosporium* OB3b que expressa de manera constitutiva una metà monooxigenasa soluble capaç de degradar barreges binàries de TCE/cis-DCE, TCE/trans-DCE i cis-DCE/trans-DCE (Aziz *et al.*, 1999). Malachowsky *et al.* (1994) va demostrar la capacitat de dos bacteris del gènere *Rhodococcus* per degradar en dues setmanes barreges de cloroform, clorur de vinil, 1,1-dicloroetilè, cis-DCE i 1,1,2-tricloroetà, però quantitats negligibles de PCE, TCE, trans-DCE i 1,1,1-tricloroetà. El primer estudi en demostrar la degradació aeròbia de PCE amb altres productes clorats va ser utilitzant la soca *Pseudomonas stutzeri* OX1 (Shim *et al.*, 2001). Aquesta soca, com s'ha esmentat en el capítol 6, és l'únic microorganisme descrit capaç de degradar aeròbiament el PCE mitjançant una toluè-o-xilè monooxigenasa, i també és capaç de degradar diferents combinacions de PCE, TCE, 1,1-DCE, cis-DCE, trans-DCE i clorur de vinil.

Un altre aspecte interessant de cara a l'aplicació dels fongs en medis contaminats és l'efecte que poden tenir les diferents concentracions de contaminant sobre la seva degradació. La concentració amb la que es poden trobar aquests productes en el medi és molt variable donada la seva elevada volatilitat i mobilitat. D'aquesta manera en punts propers al punt de vessament la concentració en les aigües subterrànies pot ser propera a la de saturació (1100 mg/l pel TCE i 149 mg/l pel PCE) o inclús superior si els productes es troben en forma de micel'la.

Respecte a la tolerància dels bacteris a les concentracions dels cloroetilens, els primers estudis de degradació amb consorcis de bacteris metanogènics utilitzaven concentracions de TCE molt reduïdes, d'entre 0,5 i 1 ppm (Wilson i Wilson, 1985; Henson *et al.*, 1988 i 1989; Little *et al.*, 1988). Un estudi posterior realitzat amb un consorci metanogènic per determinar la influència de les diferents concentracions de TCE, determinava que la producció de metà en aquests cultius estava totalment inhibida a partir de 13 ppm de TCE (Broholm *et al.*, 1990). Tanmateix, aquest efecte inhibitori s'explicava per l'efecte competidor entre l'inductor o substrat de creixement (en aquest cas el metà) i el TCE pel mateix enzim. Així doncs, en la degradació co-metabòlica caldrà assolir un equilibri entre la concentració del contaminant i la del substrat de creixement per tal que la competència pel llocs actius de l'enzim permeti unes velocitats de degradació d'ambdòs compostos acceptable. Optimitzant el rati TCE:inductor, s'han arribat a assolir velocitats de degradació d'entre 20-50  $\mu\text{g TCE l}^{-1} \text{h}^{-1}$  amb concentracions d'entre 228-1186 ppm de TCE per a un consorci format per cinc bacteris i utilitzant toluè com a inductor (Meza *et al.*, 2003). En el cas dels bacteris haloinspiradors, el fet que utilitzin els productes clorats com a font d'energia fa que tinguin una elevada tolerància a altes concentracions de producte, tolerant concentracions de PCE fins a la saturació. En alguns casos, la inhibició pel PCE es



produeix no tant per la seva concentració sinó per la presència de cis-DCE com a subproducte de dechloració, que té uns efectes tòxics sobre el microorganisme.

### 7.1.3. Aproximació a l'aplicació en bioreactor

Com s'ha posat de manifest anteriorment, les reaccions de degradació s'aturen a un determinat temps. Els experiments realitzats en els capítols anteriors indicaven que aquesta aturada fos possiblement deguda a l'exhauriment dels nutrients. Tanmateix, les característiques del procés dificulten un estudi més exhaustiu d'aquests factors, ja que els experiments es realitzen amb ampolles de sèrum hermèticament tancades i s'han de realitzar mostres unitàries amb els pertinents replicats. Per tal de treballar a una escala més gran que ens faciliti treballar amb aquests paràmetres, es vol dissenyar un bioreactor per al tractament d'aquests compostos, i especialment pel TCE. Pel disseny d'aquest prototip s'han definit una sèrie de requeriments bàsics:

- Operarà en discontinu i haurà de ser necessàriament hermètic.
- Haurà de contenir vàlvules especials que permetin extreure mostra i si convé afegir nutrients.
- Contindrà des de l'inici el suficient oxigen com per assolir els percentatges de degradació desitjats.
- Tindrà una agitació adequada per afavorir la transferència de matèria i establir els equilibris entre fases.
- El volum del reactor es trobarà entre els 2-4 l.

Per tal d'abordar el disseny d'aquest bioreactor serà necessari disposar d'una d'informació preliminar. En primer lloc, el consum d'oxigen dels pèl·lets del fong, que ja s'ha determinat a l'apartat 5.3.2.2. En segon lloc, les cinètiques de degradació que ens permetin calcular el temps de tractament necessari per tal d'assolir uns percentatges de degradació acceptables. I per últim, l'equilibri entre fases, sent d'especial interès l'adsorció del contaminant en els pèl·lets del fong (fase sòlida), ja que en el bioreactor no es pot treballar amb blancs. Així, en aquest capítol s'abordaran aquestes dues darreres qüestions, d'una banda el càlcul d'una equació cinètica que descriu amb fiabilitat la desaparició de TCE amb el temps, i d'una altra l'ajust de l'adsorció per diferents isoterms que permetin obtenir una equació que descriu l'equilibri d'adsorció per a aquests productes.

## 7.2. Materials i mètodes

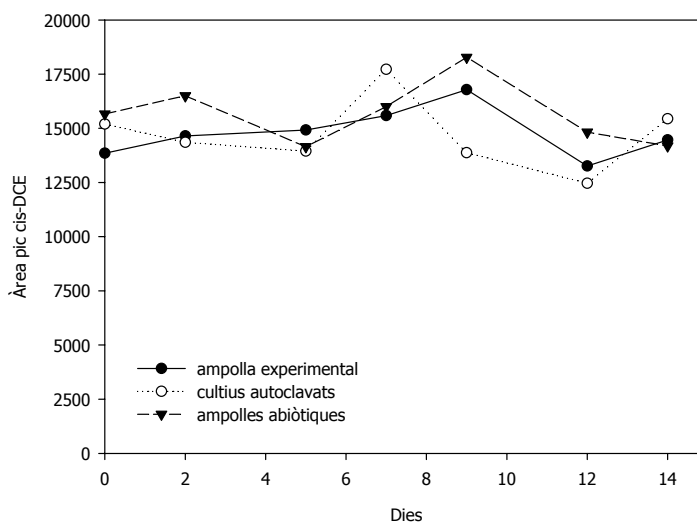
La metodologia experimental dels experiments i els mètodes analítics utilitzats per determinar la concentració dels hidrocarburs alifàtics clorats, el contingut de glucosa, clorurs, l'activitat de la lacasa, el pes sec de la biomassa i pH estan descrits al capítol 3 de Materials i mètodes generals.

En el cas de les barreges de TCE i PCE, s'han preparat dues solucions mare diferents per cada producte, tal i com s'especifica al capítol 3, i s'ha afegit a cada ampolla dels experiments 10 µl de cada una, afegint un volum total de 20 µl de dissolució d'etanol.

## 7.3. Resultats i discussió

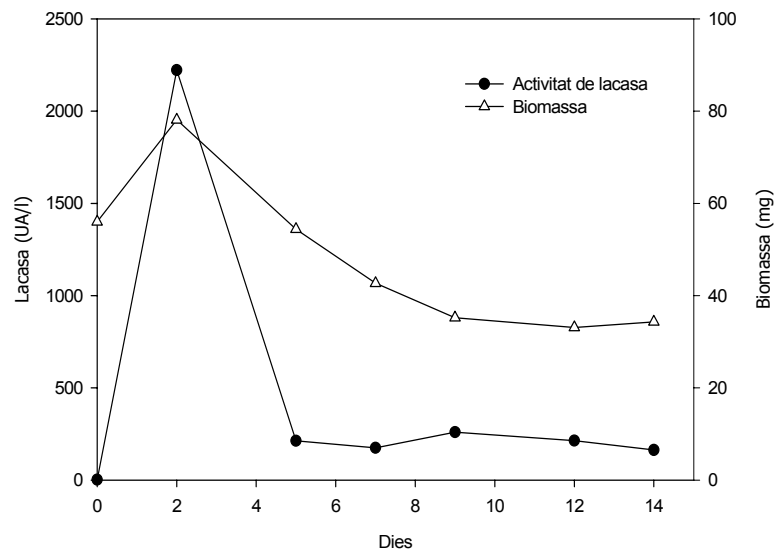
### 7.3.1. Degradació de cis-DCE per *T. versicolor*

Es va realitzar un experiment durant 14 dies amb pèl·lets de *T. versicolor* amb MD i 5 ppm de cis-DCE en el líquid. Aproximadament cada dos dies es va extreure mostra d'una ampolla experimental, abiòtica i amb fong autoclavat. La concentració inicial de glucosa va ser de 8,17 g/l i el segon dia ja s'havia exhaurit en les ampolles experimentals. Els resultats obtinguts a partir del cromatograma mostren com a les ampolles experimentals no es produeix una desaparició del producte durant aquest temps en relació als controls (Figura 7.1).



**Figura 7.1.** Evolució de la concentració de cis-DCE en cultius de *T. versicolor* i en els controls. Els valors de concentració s'indiquen com a àrea del pic del producte en el cromatograma corresponent donat que no s'ha realitzat el calibrat per aquest producte.

L'activitat enzimàtica de la lacasa és elevada, assolint el seu màxim el segon dia amb un valor de 2222,2 UA/l. Aquest valor suggereix que de manera anàloga a com succeïa amb el TCE, el cis-DCE pugui tenir un efecte inductor sobre l'enzim (Figura 7.2). En aquesta mateixa Figura també es pot observar l'evolució del creixement de la biomassa, que obté un màxim de 78,1 mg el segon dia i disminueix la resta del període degut a la manca de glucosa i oxigen. Aquest valor màxim de biomassa és similar o inclús superior als assolits en anteriors experiments amb TCE i PCE.



**Figura 7.2.** Evolució de l'activitat lacasa i de la biomassa del fong en cultius de *T. versicolor* amb 5 ppm de cis-DCE

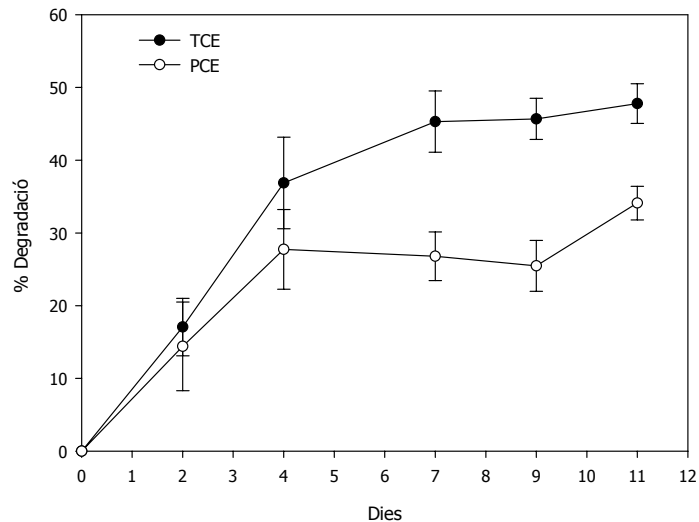
Tot i que el fong no degrada el producte, els resultats obtinguts d'activitat lacasa i de biomassa indiquen que el cis-DCE, a aquesta concentració, no té un efecte negatiu sobre el creixement del fong. En alguns bacteris s'ha observat que la presència de cis-DCE a concentracions més reduïdes provoca una inhibició en el microorganisme degut a la seva toxicitat (Sharma i McCarty, 1996).

### 7.3.2. Degradació de barreges de TCE i PCE per *T. versicolor*

En aquest experiment es va afegir 10 ppm de TCE i 5 ppm de PCE en el líquid a cultius de *T. versicolor* en forma de pèl·lets i MD. Per a tots els experiments (ampolla experimental, fong autoclavat i abiòtica) es varen fer triplicats a cada punt. Es varen incubar les mostres en agitació durant 11 dies i les mostres es van extreure els dies 0, 2, 4, 7, 9 i 11. La concentració inicial de glucosa va ser de 6,9 g/l, i el segon dia ja s'havia esgotat.

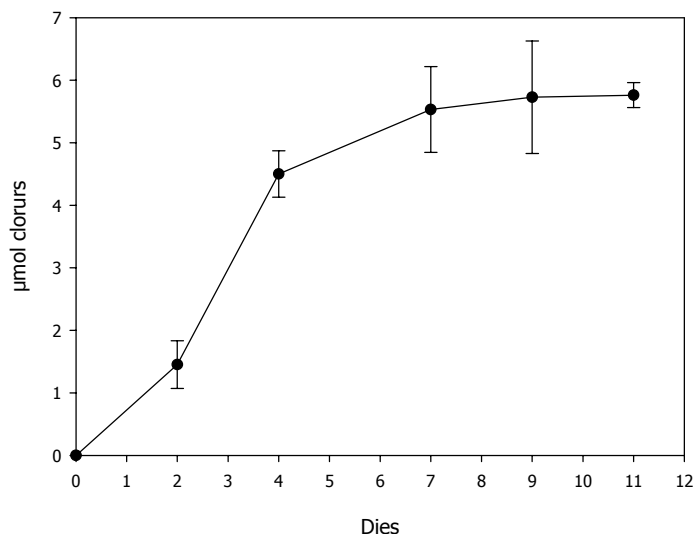
A la Figura 7.3 es pot observar l'evolució del percentatge de degradació del PCE i TCE. Els valors obtinguts són molt similars als obtinguts quan el fong degrada aquests productes per separat. El dia 11 el percentatge de PCE degradat és de  $34,1 \pm 2,3\%$ , quan en diferents experiments anteriors solament amb PCE havíem assolit valors de  $33,4\%$  (als vuit dies) i de  $36,2\%$  (novè dia). En el cas del TCE, el percentatge de degradació ha estat de  $47,8 \pm 2,7\%$ , i en experiments anteriors amb només TCE es situava entre el 50-60%. Per tant, sembla que el fong manté gairebé el mateix nivell d'eficiència en la degradació d'aquests compostos ja sigui en barreges d'aquests productes o per separat. En barreges de diferents cloretoilens amb bacteris, en canvi, s'ha observat com la presència d'alguns productes poden inhibir la degradació simultània d'altres. En barreges terciàries, el trans-DCE inhibia la degradació de TCE i cis-DCE en cultius de *Methylosinus trichosporium* OB3b (Aziz *et al.*, 1999); i la presència de clorur de vinil inhibia la degradació de PCE en barreges binàries per a *P. stutzeri* OX1 (Shim *et al.*,

2001). En el cas de la barreja binària de cloroform i TCE per consorcis bacterians metanotròfics, s'ha observat que la inhibició és deguda a la toxicitat dels subproductes de degradació (Alvarez-Cohen i McCarty, 1991).



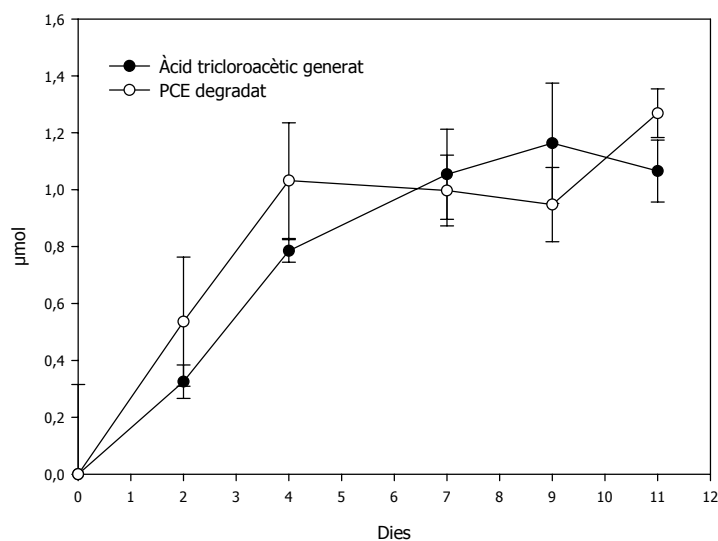
**Figura 7.3.** Evolució del percentatge de degradació de PCE i TCE

A la Figura 7.4 es troba l'evolució de l'alliberament de clorurs en el medi degut a la degradació simultània del TCE i PCE. Si fem un balanç global, obtenim que el percentatge de TCE i PCE completament dechlorat és del 43,6%, considerant una relació estequiomètrica entre els  $\mu\text{mols}$  de contaminant completament dechlorats i els  $\mu\text{mols}$  de clorurs alliberats de 1:3 per al TCE i de 1:4 per al PCE. L'únic article publicat que inclou una barreja binària de PCE i TCE és el de Shim *et al.* (2001), en el que afegeix 3 ppm de PCE i 5 ppm de TCE a cultius de *P. stutzeri* OX1 durant aproximadament 20 hores. Després d'aquest període, els percentatges de degradació assolits per aquesta soca són del 17,9% (PCE) i 19,4% (TCE) i una quantitat de clorurs totals alliberats de 39  $\mu\text{M}$ , que corresponen al 49% de l'esperat si es produís la dechloració completa dels productes. Tot i ser un procés co-metabòlic, és evident que la velocitat de degradació del bacteri és superior a la de *T. versicolor*. Tanmateix, és interessant observar com el percentatge de clorurs esperats és similar als obtinguts per *T. versicolor*, el que podria suggerir que els productes de transformació tinguin el mateix grau de cloració que els obtinguts pel nostre fong.



**Figura 7.4.** Evolució dels clorurs alliberats durant la degradació de PCE i TCE

A diferència de Shim *et al.* (2001), que no han identificat els subproductes de degradació de PCE i TCE per *P. stutzeri* OX1, nosaltres podem fer un balanç de clorurs i de subproductes més acurat donat que coneixem els subproductes obtinguts per *T. versicolor*. D'aquesta manera, podem calcular en primer lloc l'àcid tricloroacètic generat durant la degradació de PCE a partir del cloroform que es genera abiòticament i amb la recta de calibratge de la Figura 6.10. Amb aquests valors, a la Figura 7.5 es representa l'evolució de la formació d'àcid tricloroacètic i la quantitat de PCE degradat. D'una banda, es pot observar com la formació d'àcid tricloroacètic va en paral·lel a la degradació de PCE i ambdós paràmetres s'estabilitzen a partir del setè dia. D'una altra, es pot apreciar que la relació entre els mols de PCE degradat i àcid tricloroacètic generat es manté molt propera a la teòricament establerta de 1:1. Si fem la mitjana dels tres darrers punts, obtenim  $1,07 \pm 0,17$  µmols de PCE degradats i  $1,09 \pm 0,06$  µmols d'àcid tricloroacètic generat.



**Figura 7.5.** Evolució dels micromols d'àcid tricloroacètic generat i PCE degradat

Aquests valors estan en concordança amb els obtinguts al capítol 6 i suggereixen que tot el PCE degradat passaria a àcid tricloroacètic i, per tant, alliberaria un mol de clorur per cada mol de PCE degradat. Pel cas del TCE, havíem calculat en el capítol 5 que el 52,9% del TCE degradat es declarava completament. Amb aquestes dades, podem calcular el mols de clorurs esperats durant la degradació simultània de TCE i PCE, segons la Taula 7.1.

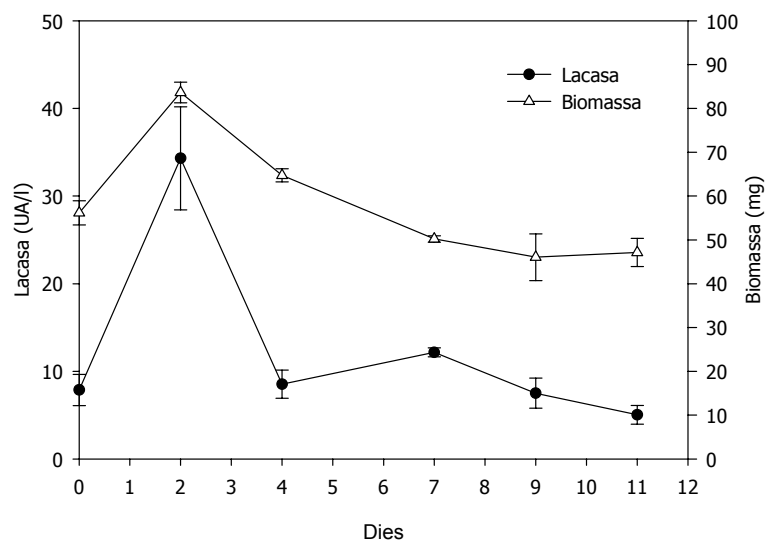
**Taula 7.1.** Càlcul dels  $\mu\text{mols}$  de clorurs teòricament alliberats

	$\mu\text{mols}$ de producte degradat	$\mu\text{mols}$ de clorurs teòricament alliberats <sup>1</sup>
TCE	$2,88 \pm 0,20$	$4,57 \pm 0,32$
PCE	$1,07 \pm 0,17$	$1,07 \pm 0,17$
Total	$3,95 \pm 0,37$	<b><math>5,64 \pm 0,49</math></b>

<sup>1</sup>S'ha calculat a partir dels  $\mu\text{mols}$  de producte degradat, mantenint una relació estequiomètrica de 3 i 4  $\mu\text{mols}$  de clorurs alliberats per cada  $\mu\text{mol}$  de TCE i PCE degradat, respectivament.

El valor de clorurs teòrics alliberats és gairebé idèntic a l'obtingut quan es realitza la mitjana dels clorurs totals alliberats en els dies 7, 9 i 11, i que és de  $5,67 \pm 0,12$   $\mu\text{mols}$  (veure Figura 7.4). A partir d'aquests resultats, sembla que el fong mantindria els mateixos factors de conversió del TCE i PCE quan es troben en barreges que quan es troben aïlladament en el medi.

Un paràmetre que ens interessava observar era l'evolució de la lacasa. En cultius amb TCE havíem observat que la seva activitat era induïda, mentre que en presència de PCE disminuïa dràsticament a uns valors molt baixos. A la Figura 7.6 es pot comprovar com, de manera anàloga a com succeïa en cultius amb PCE, l'activitat de l'enzim es troba en uns valors molt reduïts, assolint el seu màxim el segon dia amb un valor lleugerament superior a les 30 UA/l. En aquesta mateixa Figura podem observar l'evolució del creixement de la biomassa del fong, que assoleix una quantitat màxima de biomassa propera als 90 mg, que és l'habitualment assolida en cultius on el TCE o PCE es troben per separat.



**Figura 7.6.** Evolució de l'activitat de la lacasa i biomassa durant la degradació de PCE i TCE

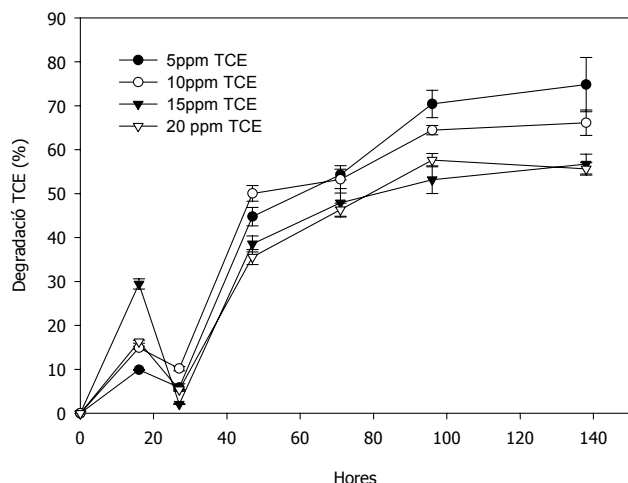
Els resultats obtinguts en aquest experiment indiquen que *T. versicolor* no es troba inhibit en la barreja binària PCE/TCE, mantenint uns percentatges de degradació similars als obtinguts quan la degradació es produeix amb els productes per separat. Alhora, el balanç de clorurs i de subproductes realitzat indiquen que el fong manté el mateix patró de producció de subproductes que quan es produeix la degradació dels productes per separat.

### **7.3.3. Degradació de diferents concentracions de TCE i PCE amb pèl·lets de *T. versicolor***

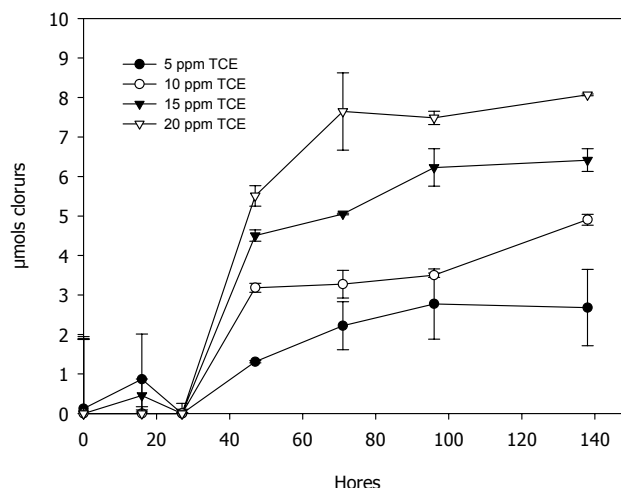
En aquest experiment s'han afegit diferents concentracions de TCE i PCE als cultius de *T. versicolor* en forma de pèl·let. Per a cada punt de mostra s'han analitzat ampolles experimentals (per duplicat) i una ampolla amb cultius autoclavats i abiòtica.

#### **7.3.3.1. Degradació de TCE**

En aquest experiment es van inocular els cultius amb pèl·lets de *T. versicolor* amb concentracions de TCE de 5, 10, 15 i 20 ppm. La concentració inicial de glucosa va ser de 7,8 g/l i a les 16 h ja s'havia esgotat. A la Figura 7.7 es troben els diferents percentatges de degradació durant el període d'incubació. Les mostres extretes a les 27h disminueixen dràsticament la degradació de TCE respecte les mostres a les 16h. Donat que el mateix comportament s'ha observat en el cromatògraf iònic en la generació de clorurs, possiblement sigui degut a un error en la presa de les mostres. En relació als resultats obtinguts en estàtic i amb el fong en forma de suspensió triturada (Figura 5.10a), els percentatges de degradació amb pèl·let obtinguts en aquest experiment són entre un 5 i 10% més baixes. Com havíem observat en altres experiments amb TCE i pèl·lets, aproximadament a les 96h (4 dies) es produeix una estabilització de la degradació del contaminant, que coincideix amb l'assolit en la generació de clorurs (Figura 7.8).



**Figura 7.7.** Evolució del percentatge de degradació en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de TCE



**Figura 7.8.** Evolució dels clorurs alliberats durant la degradació de diferents concentracions de TCE en cultius de *T. versicolor*

A la Taula 7.2 es troben els càlculs realitzats per determinar el percentatge de TCE completament dechlorat. Donat que dels dos subproductes identificats en la degradació de TCE ( $\text{CO}_2$  i 2,2,2-tricloroetanol) només el  $\text{CO}_2$  porta associat un alliberament de clorurs, el percentatge de TCE completament dechlorat es pot considerar una mesura indirecta del percentatge de TCE que es mineralitza sobre el degradat.

**Taula 7.2.** Càlcul del percentatge de clorurs generats<sup>1</sup>

Concentració de TCE en el líquid	Clorurs generats (µmol)	Clorurs esperats <sup>2</sup> (µmol)	TCE completament dechlorat <sup>3</sup> (%)
5	2,73 ± 0,55	5,4 ± 0,15	50,6 ± 11,6
10	4,91 ± 0,13	10,8 ± 0,24	45,5 ± 2,2
15	6,32 ± 0,21	13,7 ± 0,42	46,1 ± 2,9
20	7,73 ± 0,30	17,7 ± 0,42	43,6 ± 2,7

<sup>1</sup> Les mitjanes s'han realitzat a partir de les mostres extretes a les 96 i 138 h quan s'ha assolit l'estancament en la degradació,

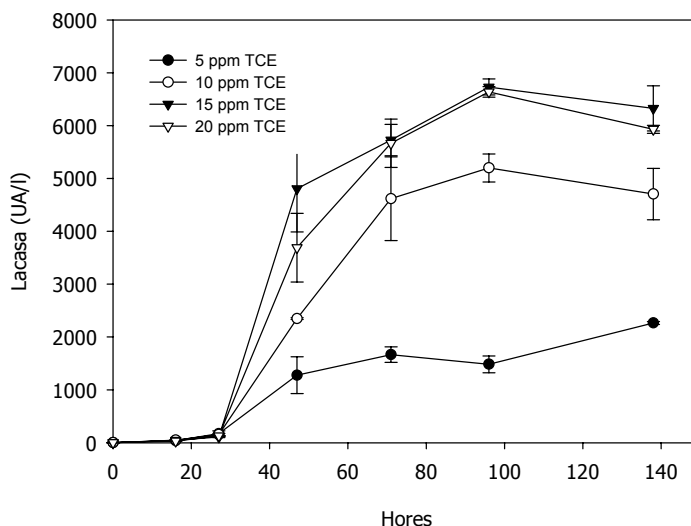
<sup>2</sup> Els clorurs esperats estan calculats a partir dels µmols de TCE degradats i considerant que per cada µmol de TCE degradat es generen tres µmols de clorurs, <sup>3</sup> Aquest percentatge s'ha calculat a partir dels clorurs generats i els esperats calculats a les columnes anteriors.

A la Taula 5.3 havíem observat que l'addició d'oxigen i concentracions elevades de glucosa augmentaven la dechloració de TCE, mentre que per a una concentració de glucosa igual a la d'aquest experiment i per 10 ppm de TCE assolíem un 53,2% dels clorurs esperats. Aquest valor era molt similar a l'obtingut en cultius estàtics i amb el fong addicionat en forma de suspensió triturada, que es situava



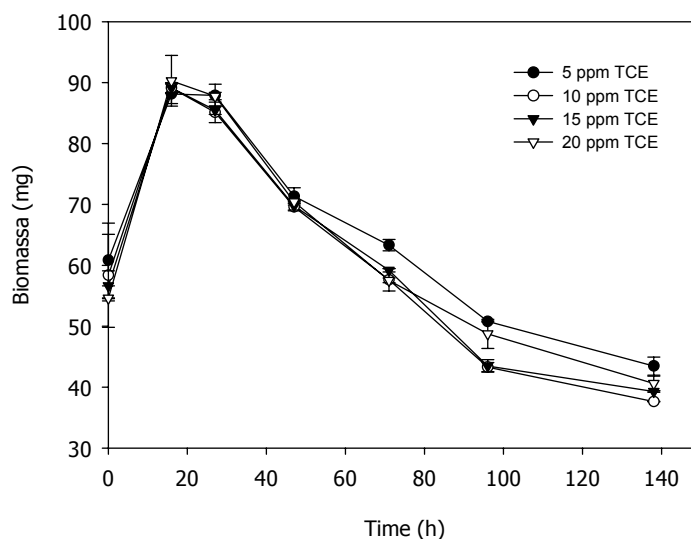
en el 52,9% (Figura 5.13). El percentatge de TCE completament clorurat obtingut en aquest experiment es troba entre el 44-51%, valors molt propers als obtinguts anteriorment.

Les activitats enzimàtiques de lacasa obtingudes amb pèl·let són notablement superiors a les assolides en condicions estàtiques i amb el fong addicionat en forma de suspensió triturada (veure Figura 7.9 i 5.11). En ambdós casos s'observa que la màxima activitat assolida pel fong en 15 i 20 ppm és gairebé la mateixa, i disminueix a concentracions més baixes.



**Figura 7.9.** Evolució de l'activitat de la lacasa en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de TCE

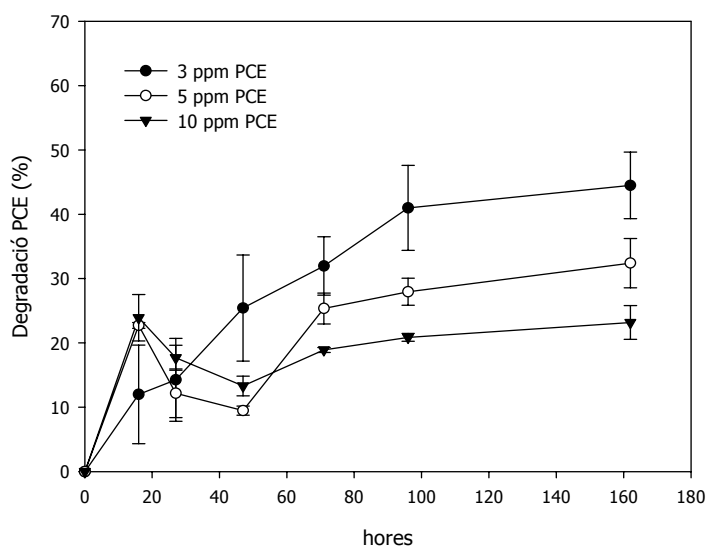
Per últim, i de manera similar a l'observada en els cultius estàtics, per al rang de concentracions de TCE testats no es produeix una inhibició en el creixement del fong, obtenint uns valors de biomassa similars per a cada tractament (Figura 7.10).



**Figura 7.10.** Evolució de la biomassa en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de TCE

### 7.3.3.2. Degradació de PCE

Les concentracions testades han estat 3, 5 i 10 ppm de PCE, inferiors a les utilitzades pel TCE perquè els percentatges de degradació assolits amb PCE són més reduïts. Com s'observa a la Figura 7.11 el percentatge de degradació en els cultius de 5 ppm de PCE és similar als obtinguts en el capítol 6, situant-se en el  $32,4 \pm 3,8\%$ . A una concentració de 10 ppm de PCE, el percentatge de degradació disminueix lleugerament, de manera inversa a com ho fa a concentracions més reduïdes de 3 ppm, on s'assoleix un percentatge de degradació del  $44,5 \pm 5,2\%$ . En tots els casos, com s'havia observat anteriorment, el percentatge de degradació s'estabilitza a partir del quart dia.



**Figura 7.11.** Evolució del percentatge de degradació en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de PCE

A la Taula 7.3 es troben els resultats obtinguts pel balanç de clorurs alliberats, el PCE degradat i l'àcid tricloroacètic generat.

**Taula 7.3.** Balanç de PCE degradat, clorurs alliberats i àcid tricloroacètic generat en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de PCE<sup>1</sup>

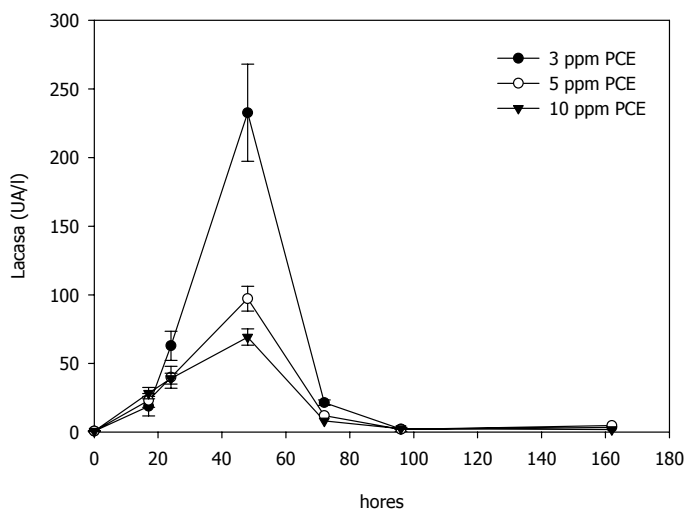
Concentració de PCE en el líquid (ppm)	PCE degradat ( $\mu\text{mol}$ )	Clorurs generats ( $\mu\text{mol}$ )	Àcid tricloroacètic generat ( $\mu\text{mol}$ )	Proporció <sup>2</sup>
3	$0,73 \pm 0,05$	$0,56 \pm 0,15$	$0,57 \pm 0,03$	1,0 : 0,8 : 0,8
5	$0,93 \pm 0,03$	$1,36 \pm 0,41$	$0,90 \pm 0,12$	1,0 : 1,5 : 1,0
10	$1,3 \pm 0,06$	$1,50 \pm 0,32$	$1,06 \pm 0,24$	1,0 : 1,2 : 0,8

<sup>1</sup> Les mitjanes s'han calculat a partir dels valors obtinguts a les 96 i 162 h

<sup>2</sup> Aquest paràmetre estableix la proporció entre els mols de PCE degradat, clorurs i àcid tricloroacètic, calculats en base als mols de PCE degradat

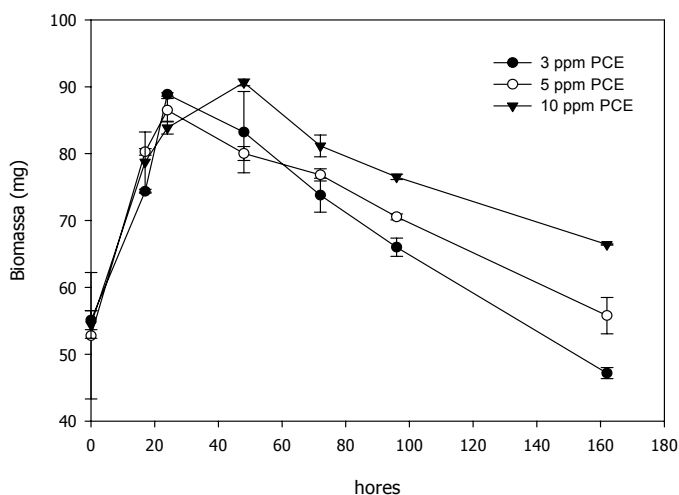
Segons els balanços realitzats anteriorment, la proporció esperada entre els paràmetres per a cada concentració és 1:1:1. S'observa que aquesta relació es manté, tot i que hi ha valors com el del PCE degradat als 3 ppm de PCE que es troben per sota de l'esperat o els clorurs generats als 5 ppm que són lleugerament superiors.

A la Figura 7.12 es corroboren les observacions realitzades al capítol 6 on s'assenyalava que el PCE inhibia l'activitat enzimàtica de lacasa. Es pot observar que l'activitat enzimàtica disminueix a mesura que augmenta la concentració de PCE en el líquid, de manera inversa al que succeeix amb el TCE.



**Figura 7.12.** Evolució de l'activitat de la lacasa en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de PCE

Tanmateix, per al rang de concentracions de PCE estudiat no sembla que el producte tingui un efecte negatiu sobre el creixement del fong, assolint valors de biomassa similars per a totes les concentracions testades i sent de l'ordre dels obtinguts habitualment en estudis anteriors realitzats amb pèl·lets (Figura 7.13).



**Figura 7.13.** Evolució de la biomassa en cultius de *T. versicolor* amb diferents concentracions de PCE

### 7.3.4. Determinació de la isoterma d'adsorció de TCE i PCE amb pèl·lets de *T. versicolor*

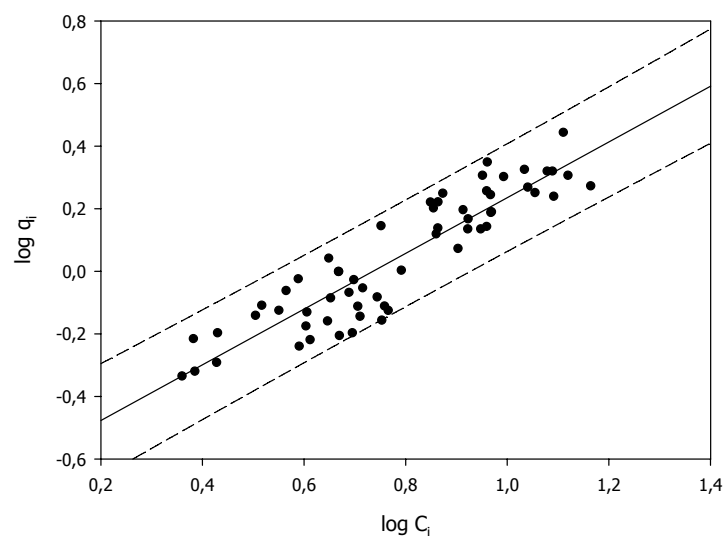
En els experiments de degradació de TCE i PCE realitzats amb pèl·lets de *T. versicolor* en agitació es va observar una certa adsorció d'aquests compostos en el fong. Aquesta fet es posava de manifest a partir de les ampolles amb el fong inactivat tèrmicament en relació a les ampolles abiòtiques. En el disseny d'un reactor per al tractament d'efluents amb TCE i PCE, donat que no es contempla la possibilitat de mantenir en paral·lel reactors amb el fong autoclavat i abiòtic, era necessari establir quina isoterma descrivia d'una manera més òptima l'adsorció d'aquests dos compostos en el fong.

D'aquesta manera, es varen realitzar experiments d'adsorció per a 11 concentracions inicials en fase líquida diferents entre 5 i 20 ppm per al TCE i PCE, respectivament, i per a cada concentració inicial es varen afegir sis concentracions diferents de pèl·lets (20, 40, 50, 60, 70 i 80 g/l). Els pèl·lets afegits a les ampolles s'havien autoclavat prèviament per tal d'eliminar la seva activitat metabòlica i es va comprovar que a partir de les 3 hores d'agitació ja s'havia assolit un equilibri entre les fases. La massa adsorbida es va determinar a partir de la diferència entre les concentracions dels compostos en la fase líquida en les ampolles abiòtiques i amb fong autoclavat. Les dades obtingudes es varen ajustar a les isoterms de Langmuir, Freundlich i a la lineal. Aquesta modelització va ser realitzada per Marcel Vilaplana i formen part del seu treball de Màster (Vilaplana, 2006).

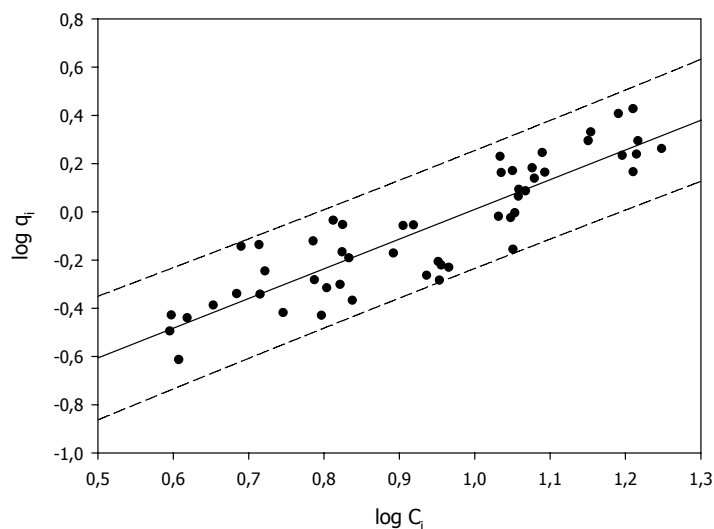
La isoterma de Freundlich és la que millor descrivia l'equilibri d'adsorció dels dos compostos en *T. versicolor* en forma de pèl·let. A més, tal i com es pot observar a les Figures 7.14 i 7.15, la majoria dels punts experimentals d'adsorció es troben dintre d'un interval de confiança del 95% per a aquestes isoterms. Els termes als que es fa referència en aquestes gràfiques són:

$q_i$ : la concentració d'adsorbat sobre el sòlid (mg TCE/g pes sec biomassa)

$C_i$ : la concentració de l'adsorbat en el líquid (mg TCE/l)



**Figura 7.14.** Linealització de la isoterma de Freundlich d'adsorció de PCE en *T. versicolor*



**Figura 7.15.** Linealització de la isoterma de Freundlich d'adsorció de TCE en *T. versicolor*

A partir d'aquestes isoterms, es varen obtenir les equacions que descriuen l'equilibri d'adsorció per al TCE i PCE:

$$q_{TCE} = 0,060 \cdot C_{liq,TCE}^{1,232}$$

$$q_{PCE} = 0,221 \cdot C_{liq,PCE}^{0,890}$$

Es varen aplicar aquestes equacions als valors experimentals obtinguts en els apartats 7.3.3.1 i 7.3.3.2, i es va comprovar si el percentatge de degradació coincidia amb l'assolit amb el calculat experimentalment a partir dels controls de les ampolles abiòtiques i cultius autoclavats. Com es pot observar a la Taula 7.4 i 7.5, exceptuant els valors obtinguts als 20 ppm pel TCE i als 5 ppm pel PCE, la majoria s'ajusten amb prou fidelitat als obtinguts a partir de les equacions de les isoterms de Freundlich. El percentatge de degradació calculat en aquestes Taules correspon a les 138 h, quan va finalitzar l'experiment.

**Taula 7.4.** Càlcul del percentatge de degradació de TCE per diferents concentracions segons les dades experimentals obtingudes al laboratori i les assolides aplicant la isoterma de Freundlich.

Concentració de TCE en el líquid (ppm)	% Degradat experimentalment	% Degradat a partir isoterma Freundlich	% Error
5	74,8	75,4	0,85
10	66,1	62,5	5,42
15	56,7	53,5	5,57
20	55,6	40,4	27,30

**Taula 7.5.** Càlcul del percentatge de degradació de PCE per diferents concentracions segons les dades experimentals obtingudes al laboratori i les assolides aplicant la isoterma de Freundlich.

<b>Concentració de PCE en el líquid</b>	<b>% Degradat experimentalment</b>	<b>% Degradat a partir isoterma Freundlich</b>	<b>% Error</b>
3	36,9	35,6	3,48
5	26,4	19,3	26,92
10	15,2	14,2	6,84

Els errors més elevats obtinguts a les 20 ppm pel TCE i als 5 ppm pel PCE són deguts a que els valors d'adsorció experimentals varen ser molt reduïts en aquest punt. En ambdós casos, les ampolles amb fong autoclavats varen donar concentracions de PCE i TCE molt similars als de les ampolles abiòtiques, de manera que el percentatge de degradació calculat va ser lleugerament superior. Donat que les equacions d'adsorció a partir de la isoterma de Freundlich s'han determinat a partir d'un gran nombre de mostres, i que en la majoria dels casos la seva aplicació s'ha ajustat als valors calculats experimentalment, pot considerar-se que aquests errors poden provindre de les mostres experimentals i no pas d'un mal ajust de l'equació.

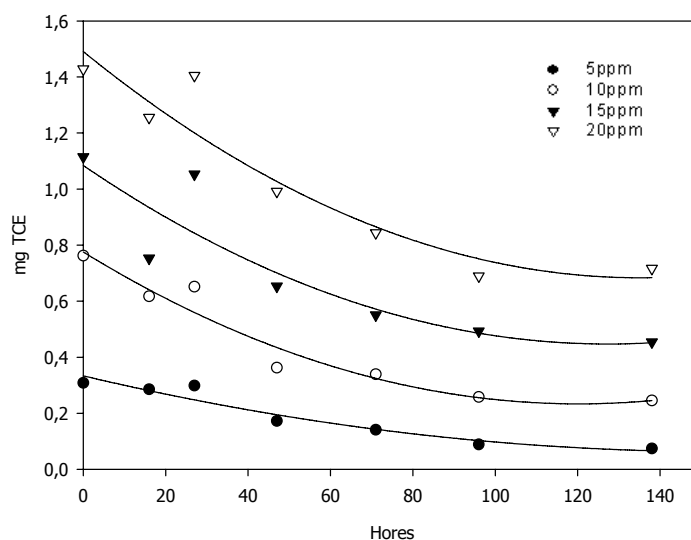
### **7.3.5. Determinació de la cinètica de desaparició de TCE amb pèl·lets de *T. versicolor***

En els experiments dels capítols anteriors s'ha comprovat que els percentatges de degradació de TCE són més elevats que els del PCE amb cultius de *T. versicolor* en forma de pèl·lets. Com s'ha esmentat, això implica que no s'han determinat unes condicions òptimes de degradació pel PCE que permetin assolir rendiments de degradació més elevats. Per aquest motiu es va decidir, en un primer estadi, iniciar els estudis pel disseny del reactor per tractar TCE. Els resultats que es mostren en aquest apartat van ser realitzats per Marcel Vilaplana i formen part del seu treball de màster (Vilaplana, 2006).

Per tal d'establir el temps necessari per degradar TCE amb el percentatge de degradació desitjat cal disposar d'una equació que descriu la desaparició de massa de TCE amb el temps. En aquest cas, l'equació cinètica que s'ajusti als valors experimentals serà en realitat una pseudo-cinètica de degradació de TCE, donat que les dades experimentals estan referides a la massa de TCE total present a totes les fases del sistema i no només a la fase líquida on es troba el fong. Així, l'evolució de la massa de compost estarà influenciada per altres factors tals com els equilibris entre fases, que la cinètica de degradació emprada no té en compte. Tanmateix, aquesta equació ja ens proporcionarà suficient informació i serà útil pel disseny del bioreactor.

Aquesta pseudo-cinètica s'ha calculat a partir dels resultats presentats a l'apartat 7.3.3.1, per a les concentracions de 5, 10, 15 i 20 ppm de TCE. Donat que es disposen de pocs punts, ja que les

mostres eren unitàries i es realitzaven per duplicat, els punts experimentals es varen ajustar a un polinomi de segon grau (Figura 7.16), a partir del qual es va realitzar l'ajust de l'equació cinètica. Un altre aspecte a considerar és el fet que les reaccions s'aturen, però no per causes cinètiques sino possiblement per les limitacions de nutrients del fong. Per tant, en aquesta primera aproximació s'ha treballat amb la part de la corba en la que hi ha degradació (primeres 96 h) que són en les que el fong degrada sense aquestes restriccions.



**Figura 7.16.** Evolució de la massa de TCE per a diferents concentracions inicials de contaminant i ajusts dels polinomis de segon grau als valors experimentals

Es va procedir a l'ajust de l'equació de Michaelis-Menten:

$$-\frac{dm}{dt} = \frac{V_{MAX} \cdot m}{K_M + m}$$

On  $m$ : massa de TCE (mg) per a un temps  $t$

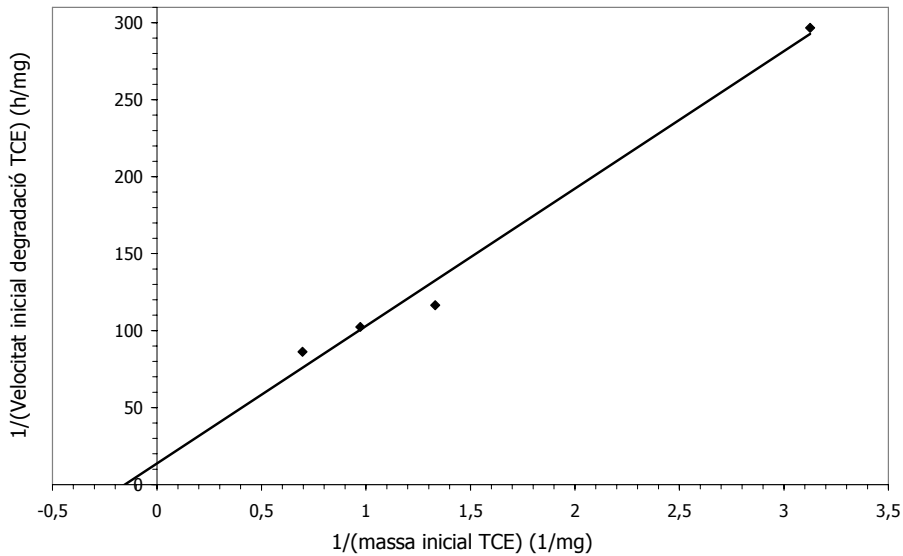
$V_{MAX}$ : velocitat màxima de degradació (mg TCE/h)

$K_M$ : constant de Michaelis (mg TCE)

Donat que les hipòtesis que explicarien l'estancament de la degradació a partir de les 96 hores han estat l'esgotament dels nutrients o la manca d'oxigen a les ampolles, no s'ha inclòs cap terme d'inhibició en l'equació. En el cas que aquest estancament fos degut a la presència de productes d'inhibició, aquesta es manifestaria amb major magnitud a concentracions més elevades de TCE i l'aturada en la degradació no es produiria en el mateix moment per a totes les concentracions.

Per l'ajust d'aquesta equació a partir de les dades experimentals i per trobar els seus paràmetres ( $K_M$  i  $V_{MAX}$ ) es va utilitzar el programa GPROMS (Process System Enterprise Ltd). Els valors inicials dels paràmetres  $K_M$  i  $V_{MAX}$  per començar les iteracions de càlcul es varen calcular a partir de la linealització de Lineweaver-Burk (Casas *et al.*, 1998) amb la velocitat inicial de degradació, que correspon al pendent de la tangent als primers valors de la corba experimental, per cada massa inicial

de TCE. A la Figura 7.17 es troba la linealització de Lineweaver-Burk, a partir de la qual s'obté l'equació de regressió i els valors inicials dels paràmetres.



**Figura 7.17.** Linealització de Lineweaver-Burke

$$\frac{1}{V_0} = 89,229 \cdot \frac{1}{m_0} + 13,827 \text{ amb } R^2=0,9868$$

$$V_{MAX_0} = \frac{1}{13,827} = 0,072 \frac{mg \text{ TCE}}{h}$$

$$K_{M_0} = 0,072 \cdot 89,229 = 6,452 \text{ mg TCE}$$

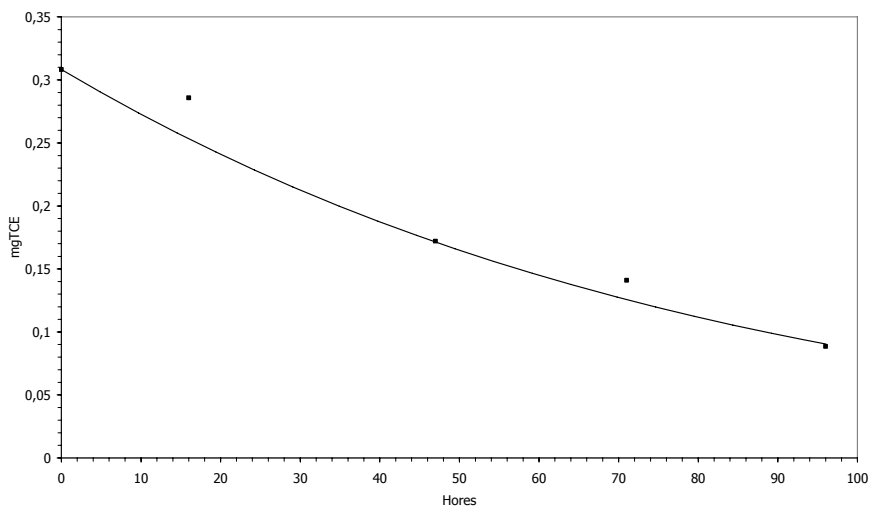
A partir d'aquests valors inicials, s'obtenen a partir del programa GPROMS els paràmetres que optimitzen l'ajust d'aquesta equació per a les diferents concentracions:

$$V_{MAX} = 0,033 \pm 0,006 \frac{mg \text{ TCE}}{h}$$

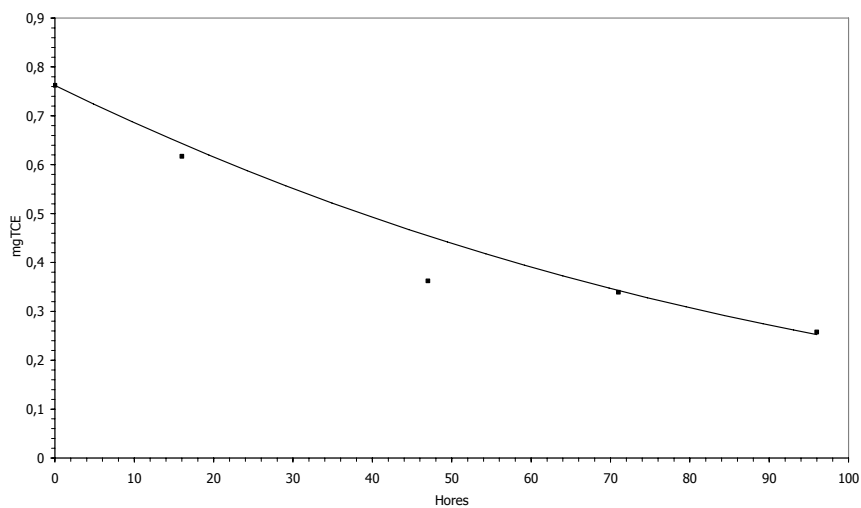
$$K_M = 2,424 \pm 0,53 \text{ mg TCE}$$

A les Figures 7.18, 7.19, 7.20 i 7.21 es representen l'evolució de la massa de TCE al llarg del temps amb l'equació de Michaelis-Menten per comparar-la amb els valors experimentals, a partir dels paràmetres  $V_{MAX}$  i  $K_M$  calculats.

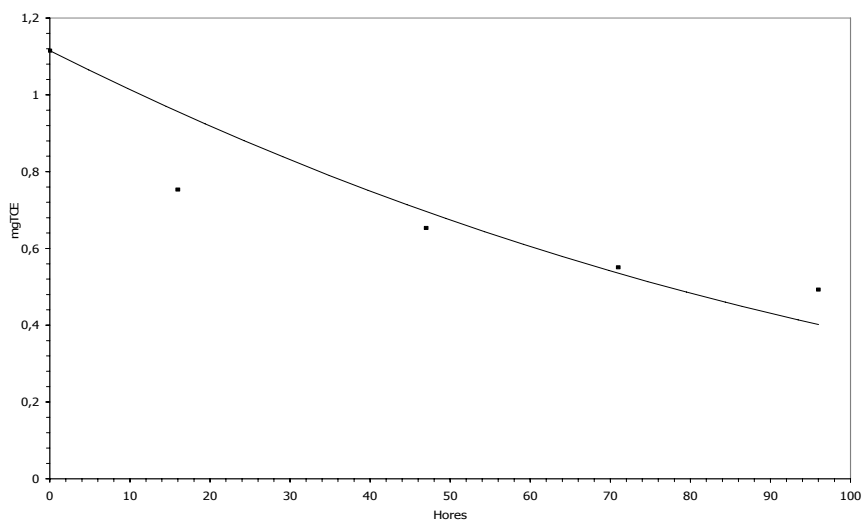




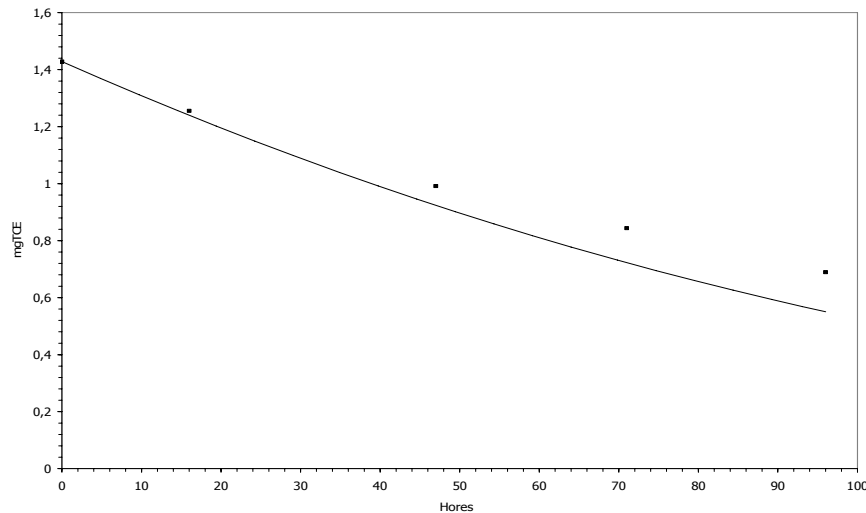
**Figura 7.18.** Evolució de la massa de TCE experimental i ajust de l'equació de Michaelis-Menten (5 ppm).



**Figura 7.19.** Evolució de la massa de TCE experimental i ajust de l'equació de Michaelis-Menten (10 ppm).



**Figura 7.20.** Evolució de la massa de TCE experimental i ajust de l'equació de Michaelis-Menten (15 ppm).



**Figura 7.21.** Evolució de la massa de TCE experimental i ajust de l'equació de Michaelis-Menten (20 ppm)

A partir de les Figures anteriors es pot afirmar que la cinètica de Michaelis-Menten s'ajusta prou bé a les dades experimentals i descriu amb força fiabilitat la degradació de TCE a diferents concentracions per *T. versicolor*. Addicionalment, la desviació estàndard pels paràmetres  $V_{MAX}$  i  $K_M$  es va trobar més reduïda que l'assolida pels ajustos en les cinètiques d'ordre zero i de primer i segon ordre.

L'equació de Michaelis-Menten inclou en el paràmetre  $V_{MAX}$  la concentració d'enzim inicial. En el nostre cas, per poder utilitzar aquest valor en altres condicions s'ha expressat aquest paràmetre respecte la biomassa, que podem considerar proporcional a la concentració d'enzim. Així, hem calculat la mitjana del pes sec de la biomassa emprada en aquests experiments, que correspon a 0,089 g de biomassa.

$$V'_{MAX} = \frac{0,033}{0,089} = 0,372 \frac{mg \text{ TCE}}{h \cdot g \text{ biomassa}}$$

Introduint aquest valor de  $V'_{MAX}$  i integrant l'equació de Michaelis-Menten, obtenim l'equació que s'utilitzarà pel disseny del reactor:

$$m = m_0 + 2,424 \cdot \ln\left(\frac{m_0}{m}\right) - 0,372 \cdot X \cdot t$$

## 7.4. Conclusions

*T. versicolor* no ha estat capaç de degradar 5 ppm de cis-DCE en les mateixes condicions que ho feia amb el PCE i TCE. Aquest producte es troba habitualment en medis contaminats per TCE i PCE i pot produir-se durant la dechloració reductiva anaeròbia per bacteris, presentant un risc per la salut humana degut a la seva toxicitat. Tanmateix, a aquesta concentració no s'observa un efecte tòxic pel fong, mantenint un creixement de biomassa habitual a l'assolit en els experiments amb TCE i PCE.

Addicionalment s'ha observat que l'activitat lacasa és superior a les 2000 UA/l, indicant que té un possible efecte inductor sobre aquest enzim.

*T. versicolor* degrada barreges binàries de PCE (5 ppm) i TCE (10 ppm) assolint percentatges de degradació similars als assolits quan els contaminants es troben per separat. El balanç de subproductes, realitzat a partir de l'àcid tricloroacètic i clorurs generats durant la degradació del PCE, coincideix exactament amb el proposat en els experiments en els que el PCE i TCE es degraden per separat.

S'ha realitzat experiments de degradació amb diferents concentracions de PCE (3, 5 i 10 ppm) i TCE (5, 10, 15 i 20 ppm). Com en els cultius estàtics, a mesura que augmenta la concentració del contaminant disminueix el percentatge de degradació. Pel TCE s'assoleix un màxim de degradació del  $74,8 \pm 6,1\%$  per a 5 ppm, i pel PCE de  $44,5 \pm 5,2\%$  per a 3 ppm. Els percentatges de degradació amb TCE són entre un 5-10% inferiors als assolits en cultius estàtics i amb el fong afegit en forma de suspensió triturada, però la seva addició amb pèl·lets té altres avantatges associades a la seva aplicació en bioreactors. En el cas del TCE, per al rang de concentracions testats s'observa que el percentatge de TCE completament degradat es situa a prop del 50%, que és el valor assolit en cultius estàtics. Per al PCE també es manté la proporcionalitat molar establerta entre PCE degradat, àcid tricloroacètic generat i clorurs alliberats. L'activitat de la lacasa és superior en pèl·lets en relació a l'assolida amb els cultius estàtics. En el cas del PCE, queda reflectit el seu efecte inhibidor sobre la lacasa, disminuint la seva activitat amb l'increment de la concentració de PCE. No hi ha un efecte inhibitori en el creixement del fong per als dos contaminants i pel rang de concentracions testat.

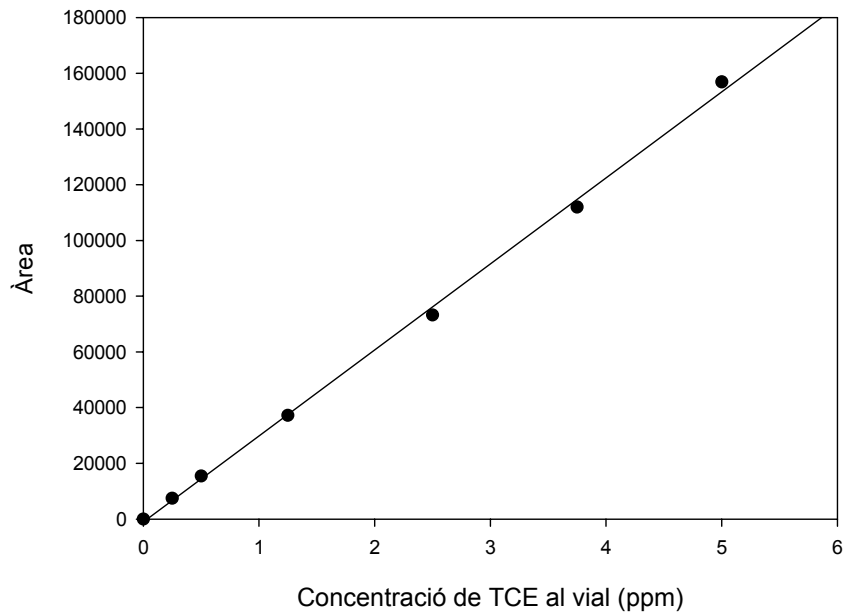
S'ha determinat que la isoterma de Freundlich és la que millor explica el fenomen de l'adsorció del TCE i PCE en els pèl·lets de *T. versicolor*. Les equacions resultants que descriuen l'equilibri d'adsorció pel TCE i PCE s'han aplicat a les dades obtingudes en els experiments anteriors per les diferents concentracions dels productes, obtenint valors molt similars de degradació als obtinguts experimentalment. Amb aquests mateixos resultats, s'ha ajustat l'evolució de la degradació de TCE a una corba del tipus Michael-Menten, que permet calcular el temps de degradació necessari per assolir la degradació de TCE desitjada en el disseny del bioreactor. Aquestes equacions permetran calcular en el bioreactor la quantitat de PCE i TCE efectivament degradada i la quantitat adsorbida en el fong.



# Annexes

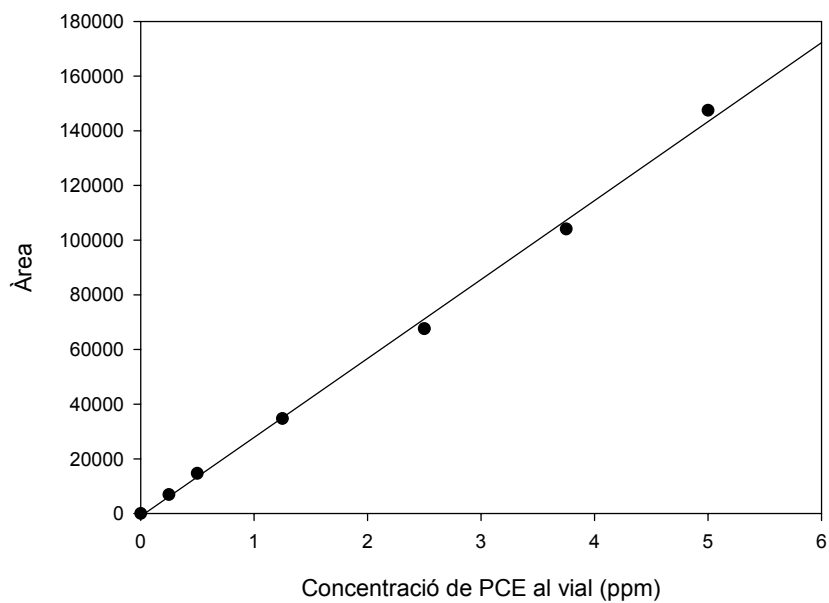
## Rectes de calibratge

### Recta de calibratge pel TCE

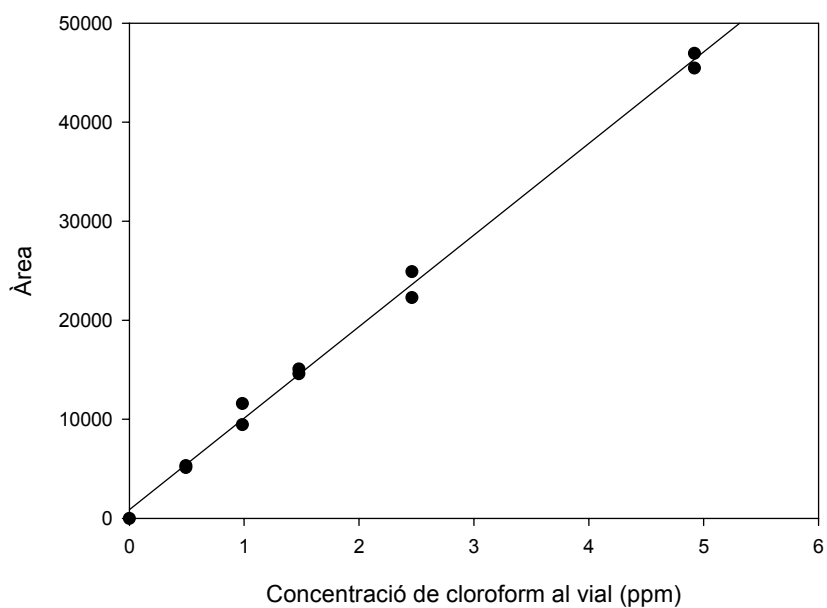


Equació de calibratge: Àrea = 30582 · Conc<sub>TCE</sub> amb  $r^2=0,998$

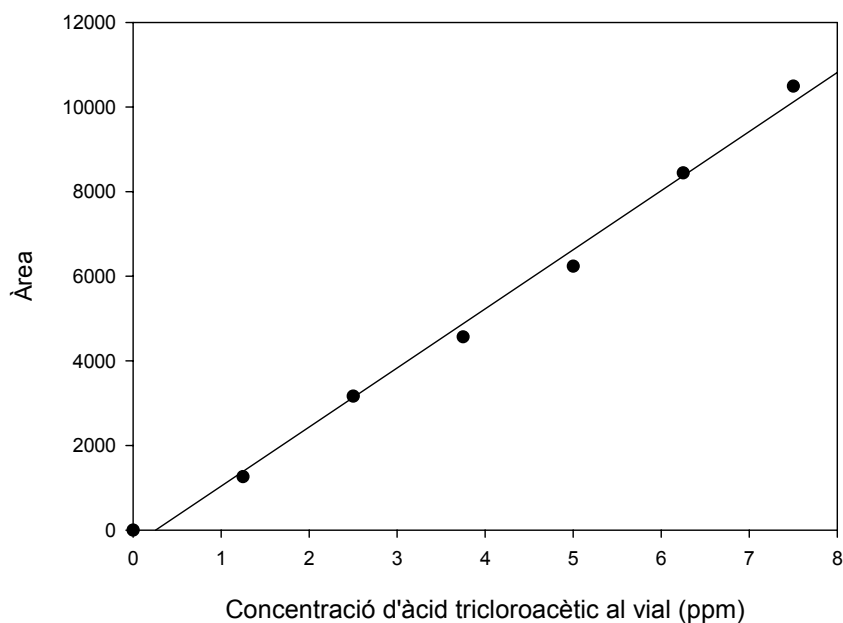
### Recta de calibratge pel PCE



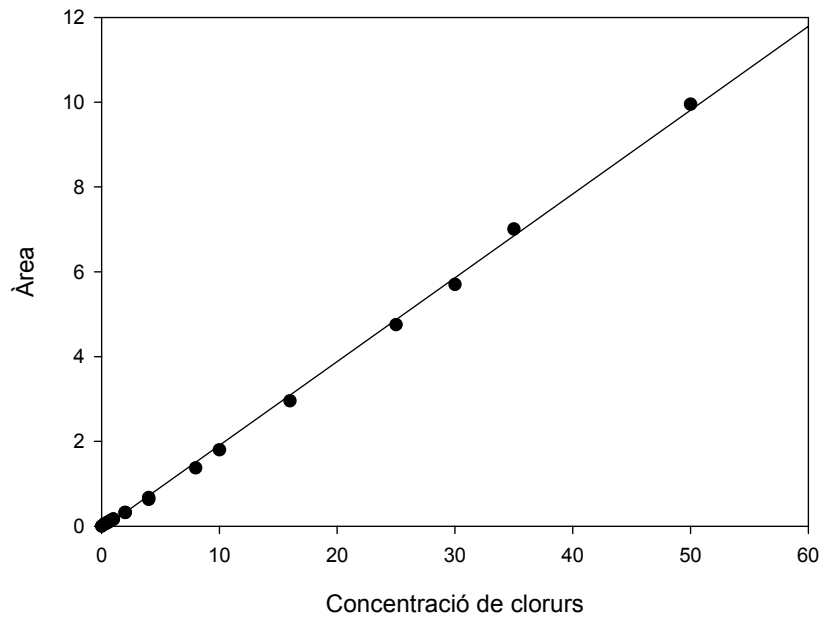
Equació de calibratge: Àrea = 28592 · Conc<sub>PCE</sub> amb  $r^2=0,997$

**Recta de calibratge pel cloroform**

Equació de calibratge:  $\text{Àrea} = 9516 \cdot \text{Conc}_{\text{cloroform}}$  amb  $r^2=0,994$

**Recta de calibratge per l'àcid tricloroacètic**

Equació de calibratge:  $\text{Àrea} = 1330,7 \cdot \text{Conc}_{\text{àcid tricloroacètic}}$  amb  $r^2=0,990$

**Recta de calibratge pels clorurs**

Equació de calibratge:  $\text{Àrea} = 0,1798 \cdot \text{Conc}_{\text{clorurs}}$  amb  $r^2=0,997$



# Bibliografia

- Aggelis, G, C. Ehaliotis, F. Nerud, I. Stoychev, G. Lyberatos i G.I. Zervakis. 2002. Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59:353–360.
- Aiba, S., A.E. Humphrey i N.F. Millis. 1971. *Biochemical engineering*. Academic Press. New York, Estats Units.
- Alleman, B.C., B.E. Logan i R.L. Gilbertson. 1992. Toxicity of pentachlorophenol to six species of white rot fungi as a function of chemical dose. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:4048-4050.
- Alvarez-Cohen, L. i P.L. McCarty. 1991. Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modelling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1031-1037.
- Arcangeli, J.P., E. Arvin, M. Mejlhede i F.R. Lauritsen. 1996. Biodegradation of cis-1,2-dichloroethylene at low concentrations with methane-oxidizing bacteria in a biofilm reactor. *Water Res.* 30:1885–1893.
- Arp, D.J. i C.M. Yeager i M.R. Hymaan. 2001. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation.* 12:81-103.
- Aulenta, F., M. Potalivo, M. Majone, M. Petrangeli i V. Tandoi. 2006. Anaerobic bioremediation of groundwater containing a mixture of 1,1,2,2-tetrachloroethane and chloroethenes. *Biodegradation.* 17:193–206.
- Aziz, C.E., G. Georgiou i G.E.Jr Speitel. 1999. Cometabolism of chlorinated solvents and binary chlorinated solvent mixtures using *M. trichosporium* OB3b PP358. *Biotechnol. Bioeng.* 65:100-107.
- Baborová, P., M. Möder, P. Baldrian, K. Cajthamlová i T. Cajthaml. 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157:248–253.
- Baeseman, J.L. i P.J. Novak. 2001. Effects of various environmental conditions on the transformation of chlorinated solvents by *Methanosarcina thermophila* cell exudates. *Biotechnol. Bioeng.* 75:634-641.
- Baggi, G., P. Barbieri, E. Galli i S. Tollari. 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2129–2132.
- Barr, D.P. i S.D. Aust. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol. Crit. Rev.* 28:78A-87A.
- Bedard, C. i R. Knowles. 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53:68–84.
- Betterton, E.A. i M.R. Hoffmann. 1988. Henry's law constant of some environmentally important aldehydes. *Environ. Sci. Technol.* 22:1415-1418.
- Beyke, G. i T. Powell. 2005. Heat enhanced bioremediation of chlorinated solvents using electrical resistance heating. Presentat a: Eighth International In-Situ and On-Site Bioremediation Symposium. 9 de Juny de 2005. Baltimore, Maryland, Estats Units.

- Bezalel, L., Y. Hadar i C.E. Cerniglia. 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2495-2501.
- Birner, G., C. Richling, D. Henschler, M.W. Anders i W. Dekant. 1994. Metabolism of tetrachloroethene in rats: Identification of Ne-(dichloroacetyl)-L-lysine and N-(trichloroacetyl)-L-lysine as protein adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 7:724-732.
- Blánquez, P. 2001. Possibilitats de tractament d'efluents colorats amb *Phanerochaete flavidoalba*. Treball de Màster. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Blánquez, P., N. Casas, X. Font, X. Gabarrell, M. Sarra, G. Caminal i T. Vicent. 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Res.* 38:2166-2172.
- Blánquez, P. 2005. Desenvolupament d'un procés a escala pilot per al tractament del colorant gris lanaset G amb *Trametes versicolor*. Tesi Doctoral. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Blánquez, P., M. Sarrà i M.T. Vicent. 2006. Study of the cellular retention time and the partial biomass renovation in a fungal decolourisation continuous process. *Water Res.* 40:1650-1656.
- Bloemen, L.J., A.C. Monster, S. Kezic, J.N. Commandeur, H. Veulemans, N.P. Vermeulen i J.W. Wilmer. 2001. Study on the cytochrome P-450- and glutathione-dependent biotransformation of trichloroethylene in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 74:102-108.
- Bloom, Y., R. Aravena, D. Hunkeler, E. Edwards, i S.K. Frapce. 2000. Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.* 34:2768-2772.
- Bogan, B.W. i R.T. Lamar. 1995. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2631-2635.
- Bogan, B.W., R.T. Lamar, W.D. Burgos i M. Tien. 1999. Extent of humification of anthracene, flouranthene and benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:250-254
- Boominathan, K. i C.A. Reddy. 1992. cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 15:5586-5590.
- Bourbonnais, R. i M.G. Paice. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
- Bower, E.J. 1994. Bioremediation of chlorinated solvents using alternate electron acceptors. A: R.D. Norris i R.S. Kerr (ed.). *Handbook of bioremediation*. Lewis Publishers, p. 149-175. Boca Raton, Florida, Estats Units.
- Bower, E.J. i P.L. McCarty. 1983. Transformation of 1- and 2-carbon halogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1286-1294.

- Bowden, D.J., S.L. Clegg i P. Brimblecombe. 1998. The Henry's law constant of trichloroacetic acid. *Water Air Soil Pollut.* 101:197–215.
- Boyle, C.D. 1995. Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. *Can. J. Microbiol.* 41:345-353
- Bradley, P.M. i F.H. Chapelle. 1997. Kinetics of DCE and VC mineralization under methanogenic and Fe(III)-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* 31:2692–2696.
- Bradley, P.M. i F.H. Chapelle. 1998a. Microbial mineralization of VC and DCE under different terminal electron accepting conditions. *Anaerobe.* 4:81–87.
- Bradley, P.M., F.H. Chapelle i D.R. Lovley. 1998b. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3102–3105.
- Braus-Stromeyer, S.A., R. Hermann, A.M. Cook AM i T. Leisinger. 1993. Dichloromethane as the sole carbon source for an acetogenic mixed culture and isolation of a fermentative, dichloromethane degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3790–3797.
- Breedveld, G.D. i D.A. Karlsen. 2000. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote-contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:255-261
- Broholm, K., B.K. Jensen, T.H. Christensen i L. Olsen. 1990. Toxicity of 1,1,1-trichloroethane and trichloroethene on a mixed culture of methane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2488-2493.
- Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright i S.D. Aust. 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science.* 228:1434-1436.
- Cabirol, N., R. Villemur, J. Perrier, F. Jacob, B. Fouillet i P. Chambon. 1998. Isolation of a methanogenic bacterium, *Methanosarcina sp.* strain FR, for its ability to degrade high concentrations of perchloroethylene. *Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol.* 44:1142-1147.
- Cajthaml, T., P. Erbanová, V. Šašek i M. Moeder. 2006. Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere.* 64: 560-564.
- Camarero, S., S. Sarkar, F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez i A.T. Martínez. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* 274:10324-10330.
- Cameron, M.D. i S.D. Aust. 2001. Cellobiose dehydrogenase- an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme Microb. Technol.* 28:129-138.
- Carter, S.R. i W.J. Jewell. 1993. Biotransformation of tetrachloroethylene by anaerobic attached-films at low temperatures. *Water Res.* 27:607–615.
- Casas, C., G. González, J. Lafuente, J.M.Lema, J.L. Montesinos, E. Roca, C. Solà i F. Valero. 1998. *Ingeniería Bioquímica. Primera Edición.* Editorial Síntesis.

- CCE, 2002. Comissió de las Comunitats Europees. Comunicació de la comissió al consell, el parlament europeu, el comitè econòmic i social i el comitè de les regions. Cap a una estratègia temàtica per a la protecció dels sòls. Brussel·les.
- CCE, 2003. Comissió de las Comunitats Europees. Propuesta de Directiva del Parlament Europeu i del Consell sobre la protecció de les aigües subterrànies de la contaminació. Brussel·les.
- CE, 2004. Comissió Europea. European Union Risk Assessment Report. Trichloroethylene (Vol. 31). B.G. Hansen, S.J. Munn, F. Berthault, C. Musset, S. Pakalin, M. Luotamo, J. de Bruijn, S. Vegro, G. Pellegrini, R. Allanou, S. Scheer (ed.). Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg.
- CE, 2005. Comissió Europea. European Union Risk Assessment Report. Tetrachloroethylene (Vol. 57). S.J. Munn, R. Allanou, K. Aschberger, F. Berthault, O. Cosgrove, M. Luotamo, S. O'Connor, S. Pakalin, A. Paya-Perez, G. Pellegrini, S. Scheer, B. Schwarz-Schulz, S. Vegro (ed.). Office for Official Publications of the European Communities. Luxemburg.
- Chang, H.L. i L. Alvarez-Cohen. 1996. Biodegradation of individual and multiple chlorinated aliphatic hydrocarbons by methane-oxidizing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3371-3377.
- Chang, Y.C., M. Hatsu, K. Jung, Y.S. Yoo i K. Takamizawa. 2000. Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH- 1. *J. Biosci. Bioeng.* 89:489-491.
- Chen, G., G.E. Hoag, P. Chedda, F. Nadim, B.A. Woody i G.M. Dobbs. 2001. The mechanism and applicability of in situ oxidation of trichloroethylene with Fenton's reagent. *J Hazard Mater.* 87:171-186.
- Coleman, N.V., T.E. Matts, J.M. Gossett i J.C. Spain. 2002. Biodegradation of cis-dichloroethene as a sole carbon sources by a  $\beta$ -proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2726-2730.
- Constam, D., A. Muheim, W. Zimmermann i A. Fiechter. 1991. Purification and partial characterization of an intracellular NADH:quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2209-2214.
- Cope, N. i J.B. Hughes. 2001. Biologically-enhanced removal of PCE from NAPL source zones. *Environ. Sci. Technol.* 35:2014-2021.
- Cox, C.D., H.J. Woo i K.G. Robinson. 1998. Cometabolic biodegradation of trichloroethylene (TCE) in the gas phase. *Water. Sci. Technol.* 37:97-104.
- Crawford, R.L. i D.L. Crawford. 1988.  $^{14}\text{C}$ -Lignin-labeled lignocelluloses and  $^{14}\text{C}$ -labeled milled wood lignins: Preparation, characterization, and uses. *Methods Enzymol.* 161:18-30.
- D'Souza, T.M., C.S. Merritt i C.A. Reddy. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5307-5313.
- De Wever, H., J.R. Cole, M.R. Fettig, D.A. Hogan i J.M. Tiedje. 2000. Reductive dehalogenation of trichloroacetic acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2297-2301.

- deBruin, W.P., M.J.J. Kotterman, J.A. Posthumus, G. Schraa i A.J.B. Zehnder. 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1996–2000.
- Decisió 2455/2001/CE del Parlament Europeu i del Consell, de 20 de novembre de 2000, per la que s'aprova la llista de substàncies prioritàries en l'àmbit de la política d'aigües, i per la que es modifica la Directiva 2000/60/CE.
- Decret 130/2003 de la Generalitat de Catalunya, de 13 de maig, pel qual s'aprova el Reglament dels serveis públics de sanejament.
- Dekant, W., S. Vamvakas i M.W. Anders. 1989. Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: Formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate b-lyase. *Drug Metab. Rev.* 20:43–83.
- DeLeve, L.D. i N. Kaplowitz. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 52:287-305.
- Dilling, W.L., N.B. Tefertiller i G.J. Kallos. 1975. Evaporation rates and reactivities of methylene chloride, chloroform, 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene, tetrachloroethylene and other chlorinated compounds in dilute aqueous solutions. *Environ. Sci. Technol.* 9:833-838.
- Directiva 1998/83/CE del Consell de 3 de novembre de 1998, relativa a la qualitat de les aigües destinades al consum humà.
- Directiva 2000/60/CE del Parlament Europeu i del Consell de 23 d'octubre de 2000, per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües
- Directiva 2001/59/CE de la Comissió de 6 d'agost de 2001, per la que s'adapta per vigésimo vuitena vegada al progrés tècnic la Directiva 67/548/CEE del Consell relativa a l'aproximació de les disposicions legals, reglamentàries i administratives en matèria de classificació, embalatge i etiquetat de les substàncies perilloses.
- DiSpirito, A.A., J. Gullede, A.K. Shiemke, J.C. Murrel, M.E. Lidstrom i C.L. Krema. 1992. Trichloroethylene oxidation by the membrane associated methane monooxygenase in Type I, Type II and Type X methanotrophs. *Biodegradation.* 2:151–164.
- Di Stefano, T.D., J.M. Gossett i S.H. Zinder. 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2287-2292.
- DiStefano, T.D., J.M. Gossett i S.H. Zinder. 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3622-3629.
- Doddapaneni, H. i J.S. Yadav. 2004. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:559-65.
- Duhamel, M., S. D. Wehr, L. Yu, H. Rizvi, D. Seepersad, S. Dworatzek, E. Cox, i E.A. Edwards. 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on

- tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. *Water Res.* 36:4193–4202.
- Egli, C., T. Tschan, R. Scholtz, A.M. Cook i T. Leisinger. 1988. Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2819-2824.
  - El Fantroussi, S., H. Naveau i S.N. Agathos. 1998. Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol. Prog.* 14:167-88.
  - Ellis, D.E., E.J. Lutz, J.M. Odom, R.J. Buchanan, M.D. Lee, C.L. Bartlett, M.R. Harkness i K.A. Deweerd. 2000. Bioaugmentation for accelerated *in situ* anaerobic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 34:2254– 2260.
  - Ely, R.L., K.J. Williamson, R.B. Guenther, M.R. Hyman i D.J. Arp. 1995. A cometabolic kinetics model incorporating enzyme inhibition, inactivation and recovery: I Model development, analysis and testing. *Biotechnol. Bioeng.* 46:218–231.
  - Ensign, S.A., M.R. Hyman i D.J. Arp. 1992. Cometabolic degradation of chlorinated alkenes by alkene monooxygenase in a propylenegrown *Xanthobacter* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3038–3046.
  - Enzien, M.V., F. Picardal, T.C. Hazen, R.G. Arnold i C.B. Fliermans. 1994. Reductive dechlorination of trichloroethylene and tetrachloroethylene under aerobic conditions in a sediment column. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2200-2204.
  - EPA. 1998. Technical Protocol for Evaluating Natural Attenuation of Chlorinated Solvents in Ground Water. EPA/600/R-98/128. Office of Research and Development. Accessible a: <http://www.epa.gov/ada/download/reports/protocol.pdf> .
  - EPA. 2000. Engineered approaches to *in situ* bioremediation of chlorinated solvents: fundamentals and field applications. EPA 542-R-00-008. Office of Solid Waste and Emergency Response. Accessible a: <http://www.clu-in.org/download/remed/engappinsitbio.pdf>
  - EPA. 2002. List of Drinking Water Contaminants & MCLs. EPA 816-F-02-013. Accessible a: <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html#mcls>
  - EPA. 2004a. In situ thermal treatment of chlorinated solvents. Fundamentals and field applications. Office of Solid Waste and Emergency Response, Office of Superfund Remediation and Technology Innovation. EPA 542-R-04-010. Accesible a: [http://costperformance.org/remediation/pdf/in\\_situ\\_thermal\\_trtmnt.pdf](http://costperformance.org/remediation/pdf/in_situ_thermal_trtmnt.pdf).
  - EPA. 2004b. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report (Eleventh Edition). EPA-542-R-03-009. Accessible a: <http://clu-in.org/asr/>.
  - EPA. 2004c. Cleaning up the nation's waste sites: markets and technology trends. Office of Solid Waste and Emergency Response. EPA 542-R-04-015. Accesible a: <http://www.cluin.org/download/market/2004market.pdf>.

- Eriksson, K-E. i T.K Kirk. 1985. Biopulping, biobleaching and treatment of kraft bleaching effluents with white-rot fungi. A: C.L.Cooney i A.E. Humphrey (ed.). Comprehensive biotechnology. Pergamon Press, p. 271-290. Toronto, Canada.
- Farmer, V.C., M.E.K. Henderson i J.D. Russell. 1959. Reduction of certain aromatic acids to aldehydes and alcohols by *Polystictus versicolor*. Biochem. Biophys. Acta. 35:202-211.
- Fathepure, B.Z., J.P. Nengu i S.A. Boyd. 1987. Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. Appl Environ Microbiol. 53:2671-2674.
- Fathepure, B.Z. i S.A. Boyd. 1988. Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. Appl. Environ. Microbiol. 54:2976-2980.
- Fathepure, B.Z. i J.M. Tiedje. 1994. Reductive dechlorination of tetrachloroethylene by a chlorobenzoate-enriched biofilm reactor. Environ. Sci. Technol. 28:746-752.
- Fennell, D. i J.M. Gossett. 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. Environ. Sci. Technol. 31:918-926.
- Fennell, D.E., A.B. Carroll, J.M. Gossett JM i S.H. Zinder. 2001. Assessment of indigenous reductive dechlorinating potential at a TCE-contaminated site using microcosms, polymerase chain reaction analysis, and site data. Environ. Sci. Technol. 35:1830-1839.
- Fetzner, S. 1998. Bacterial dehalogenation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:633-657.
- Flynn, S.J., F. E. Löffler i J.M. Tiedje. 2000. Microbial community changes association with a shift from reductive degradation of PCE to reductive degradation of cis-DCE and VC. Environ. Sci. Technol. 34:1056-1061.
- Folsom, B.R., P.J. Chapman i P.H. Pritchard. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1279-1285.
- Font, X., G. Caminal, X. Gabarrell, S. Romero i M.T. Vicent. 2003. Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. J. Chem. Technol. Biotechnol. 78:548-554.
- Fournier, D, F. Monteil-Rivera, A. Halasz, M. Bhatt i J. Hawari. 2006. Degradation of CL-20 by white-rot fungi. Chemosphere. 63:175-181.
- Fox, B.G., J.G. Borneman, L.P. Wackett i J.D. Lipscomb. 1990. Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: mechanistic and environmental implications. Biochem. 29:6419-6427.
- Franklin, J. 1994. The atmospheric degradation and impact of perchloroethylene. Toxicol. Environ. Chem. 46:169-182.
- Frascari, D., D. Pinelli, M. Nocentini, A. Zannoni, S. Fedi, E. Baleani, D. Zannoni, A. Farneti i A. Battistelli. 2006. Long-term aerobic cometabolism of a chlorinated solvent mixture by vinyl chloride-, methane- and propane-utilizing biomasses. J. Hazard. Mater. *In press*.



- Freeberg, K.M., P.B. Bedient i J.A. Connor. 1987. Modeling of TCE Contamination and Recovery in a Shallow Sand Aquifer. *Ground Water*. 25:70-80.
- Freedman, D.L. i J.M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2144-2151.
- Freedman, D.L., A.S. Danko i M.F. Verce. 2001. Substrate interactions during aerobic biodegradation of methane, ethene, vinyl chloride and 1,2-dichloroethene. *Water Sci. Technol.* 43:333-340.
- Gabarrell, X. 1995. Tractament biològic de lleixius negres de paperera amb el fong *Phanerochaete chrysosporium*. Tesi doctoral. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser i D. Haltrich. 2002. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30:529-536.
- Gerhardt, E., J. Vila i X. Llimona. 2000. Bolets dels Països Catalans. Manual d'identificació. Ed. Omega. Barcelona.
- Gerritse, J., O. Drzyzga, G. Kloetstra, M. Keijmel, L.P. Wiersum, R. Hutson, M.D. Collins i J.C. Gottschal. 1999. Influence of different electron donors and accepters on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5212-5221.
- Gerritse, J., V. Renard, T.M.P. Gomes, P.A. Lawson, M.D. Collins i J.C. Gottschal. 1996. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.* 165:132-140.
- Glod, G., W. Angst, C. Holliger i R.P. Schwarzenbach. 1997. Corrinoid-mediated reduction of tetrachloroethene, trichloroethene, and trichlorofluoroethene in homogeneous aqueous solution: Reaction kinetics and reaction mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 31:253-260.
- Goepfert, A.R., J.N.M. Commandeur, B. Ommen, P.J. Bladeren i N.P.E. Vermeulen. 1995. Metabolism and kinetics of trichloroethylene in relation to toxicity and carcinogenicity. Relevance of the mercapturic acid pathway. *Chem. Res. Toxicol.* 8:3-21.
- Gómez-Toribio, V. 2006. Mecanismos de producción extracelular de especies reactivas de oxígeno por el hongo ligninolítico *Pleurotus eryngii*. Tesi doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Gómez-Toribio, V., A.T. Martínez, M.J. Martínez i F. Guillen. 2001. Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of Mn<sup>2+</sup>. *Eur. J. Biochem.* 268:4787-4793.
- Gossett, J.M. 1987. Measurements of Henry's law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 21:202-208.
- Gossett, J.M. 2002. Fishing for microbes. *Science*. 298:974-5.

- Gramss, G., K.D. Voigt i B. Kirsche. 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation* 10:51-62
- Grathwohl, P. i M. Reinhard. 1993. Desorption of trichloroethylene in aquifer material: rate limitation at the grain scale. *Environ. Sci. Technol.* 27:2360-2366.
- Guillén, F i C.S. Evans. 1994. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2811-2817.
- Guillén, F., A.T. Martínez, M.J. Martínez i C.S. Evans. 1994. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:465-470.
- Guillén, F., C. Muñoz, V. Gómez-Toribio, A.T. Martínez i M.J. Martínez. 2000. Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:170-175.
- Guiot, S., X. Kuang, C. Beaulieu, A. Corriveau i J. Hawari. 1995. Anaerobic and aerobic/anaerobic treatment for tetrachloroethylene (PCE). *Bioremediation of chlorinated solvents*. Battelle Press. Columbus, Ohio, Estats Units.
- Hage, A., H.E. Schoemaker i J.A. Field. 1999. Reduction of aryl acids by white-rot fungi for the biocatalytic production of aryl aldehydes and alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:834-838.
- Hamamura, N., C. Page, T. Long, L. Semprini i D.J. Arp. 1997. Chloroform cometabolism by butane-grown CF8, *Pseudomonas butanovora*, and *Mycobacterium vaccae* JOB5 and methane-grown *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3607-3613.
- Han, M-J, H-T Choi i H-G Song. 2004. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Microbiol.* 42:94-98.
- Harker, A.R. i Y. Kim. 1990. Trichloroethylene degradation by two independent aromatic degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1179-1181.
- Harkness, M.R., A.A. Bracco, M.J. Jr Brennan, K.A. Deweerdt i J.L. Spivack. 1999. Use of bioaugmentation to stimulate complete reductive dechlorination of trichloroethene in Dover soil columns. *Environ. Sci. Technol.* 33:1100-1109.
- Hartmans, S. i J.A.M. de Bont. 1992. Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1220-1226.
- Hashimoto, A., K. Iwasaki, N. Nakasugi, M. Nakajima i O. Yagi. 2002. Degradation pathways of trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane by *Mycobacterium* sp. TA27. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:385-390.
- Hata, J., N. Miyata, E-S. Kim, K. Takamizawa i K. Iwahori. 2004. Anaerobic degradation of cis-1,2-dichloroethylene and vinyl chloride by *Clostridium* sp. strain DC1 isolated from landfill leachate sediment. *J. Biosci. Bioeng.* 97:196-201.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:125-133.

- He, J., Y. Sung, M.E. Dollhopf, B.Z. Fathepure, J.M. Tiedje i F.E. Löffler. 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. *Environ. Sci. Technol.* 36:3945-3952.
- He, J., K.M. Ritalahti, K-L. Yang, S.S. Koenigsberg i F.E. Löffler. 2003. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature.* 424:62-65.
- He, J., S. Youlboong, R. Krajmalnik-Brown, K.M. Ritalahti i F.E. Löffler. 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* 7:1442–1450.
- Heald, S. i R.O. Jenkins. 1994. Trichloroethylene removal and oxidation toxicity mediated by toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4634–4637.
- Hendrickson, E.R., J.A. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis i R.C. Ebersole. 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites through North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:485–495.
- Henson, J.M., M.V. Yates i J.W. Cochran. 1989. Metabolism of chlorinated methanes, ethanes, and ethylenes by a mixed bacterial culture growing on methane. *J. Ind. Microbiol.* 4:29-36.
- Henson, J.M., M.V. Yates, J.W. Cochran i D.L. Shachleford. 1988. Microbial removal of halogenated methanes, ethanes, and ethylenes in an aerobic soil exposed to methane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53:193-201.
- Hirai, H., R. Kondo i K. Sakai. 1995. Characterization of reducing abilities of white-rot fungi using tetrazolium salts. *Mokuzai Gakkaishi.* 41:917-924.
- Holliger, C., C. Regeard i G. Diekert. 2003. Dehalogenation by anaerobic bacteria. A: M. Häggblom i I. D. Bossert (ed.). *Dehalogenation: microbial processes and environmental applications.* Kluwer Academic, p. 115-157. Boston, Dordrecht, London.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss i A.J.B. Zehnder. 1998. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* 169:313–321.
- Holliger, C., G. Wohlfarth i G. Diekert. 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:383-398.
- Holliger, C., S.W.M. Kengen, G. Schraa, A.J.M. Stams i A.J.B. Zehnder. 1992. Methyl-coenzyme M reductase of *Methanobacterium thermoautotrophicum* H catalyzes the reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane to ethylene and chloroethane. *J. Bacteriol.* 174:4435-4443.
- Huling, S.G. i J.W. Weaver. 1991. Dense nonaqueous phase liquids. *Ground Water Issue.* EPA/540/4-91-002.
- Hundt, K., U. Jonas, E. Hammer i F. Schauer. 1999. Transformation of diphenyl ethers by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. *Biodegradation.* 10:279-286.

- Ichinose, H., H. Wariishi i H. Tanaka. 1999. Bioconversion of recalcitrant 4-methyldibenzothiophene to water-extractable products using lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Biotechnol. Prog.* 15:706-714.
- Ichinose, H., H. Wariishi i H. Tanaka. 2002. Identification and characterization of novel cytochrome P450 genes from the white-rot basidiomycete, *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:97–105.
- In-Gyung J. i P. Ok-Hyun. 2005. Enhancement of cometabolic biodegradation of trichloroethylene (TCE) gas in biofiltration. *J. Biosci. Bioeng.* 100:657-661.
- Itoh, N., S. Kutsuna i T.I. Ibusuki. 1994. A product study of the OH radical initiated oxidation of perchloroethylene and trichloroethylene. *Chemosphere.* 28:2029-2040.
- Jablonski, P.E. i J.G. Ferry. 1992. Reductive dechlorination of trichloroethylene by the co-reduced Codehydrogenase enzyme complex from *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 96:55-59.
- Jackson, M.M., L-H. Hou, H.N. Banerjee, R. Sridhar i S.K. Dutta. 1999. Disappearance of 2,4-dinitrotoluene and 2-amino,4,6-dinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* under non-ligninolytic conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:390-396.
- Janda, V., P. Vasek, J. Bizova i Z. Belohlav. 2004. Kinetic models for volatile chlorinated hydrocarbons removal by zero-valent iron. *Chemosphere.* 54:917-25.
- Jarosz-Wilkolazka, A., E. Malarczyk, J. Pirszel, T. Skowronski i A. Leonowicz. 2002. Uptake of cadmium ions in white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of Cd (II) ions on the activity of laccase. *Cell. Biol. Intern.* 26:605-613.
- Jauregui, J, B. Valderrama, B. Albores i R. Vazquez-Duhalt. 2003. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation.* 14:397-406.
- Jeffers, P.M., L.M. Ward, L.M. Woytowitch i N.L. Wolfe. 1989. Homogeneous hydrolysis rate constants for selected chlorinated methanes, ethanes, ethenes and propanes. *Environ. Sci. Technol.* 23:965-969.
- Joergensen, L. 1985. Methane oxidation by *Methylosinus trichosporium* measured membrane-inlet mass spectrometry. *Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol.* 14:287-294.
- Jong, S. C. i J. M. Birmingham. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. A: S.L. Needleman i A.I. Laskin (ed.). *Advances in applied microbiology* (Vol. 37). Academic Press, Inc, p. 101-134. New York, Estats Units.
- Johnson, R.L. i J.F. Pankow. 1992. Dissolution of dense chlorinated solvents into groundwater. 2. Source functions for pools of solvent. *Environ. Sci. Technol.* 26:896-901.
- Kaal, E.E.J., E. de Jong i J.A. Field. 1993. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4031-4036.
- Kan, E. i M.A. Dehusses. 2006. Cometabolic degradation of TCE vapors in foamed emulsion bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* 40:1022-1028.

- 
- Kanaly, R.A i H-G Hur. 2006. Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH. *Chemosphere*. 63:202-211.
  - Kasinath, A, Č. Novotný, K. Svobodová, K.C. Patel i V. Šašek. 2003. Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enz. Microb. Technol.* 32:167–173.
  - Kearney, P.C., D.D. Kaufman, D.W. Von Endt i F.S. Guardia. 1969. TCA metabolism by soil microorganisms. *J. Agr. Food Chem.* 17:581–584.
  - Khindaria, A., T.A. Grover i S.D. Aust. 1995. Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Technol.* 29:719-725.
  - Kielhorn, J., C. Melber, U. Wahnschaffe, A. Aitio i I. Mangelsdorf. 2000. Vinyl chloride: still a cause for concern. *Environ. Health Perspect.* 108:579–588.
  - Kim H-Y i H-G. Song. 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by white rot fungus *Irpex lacteus*. *Biotechnol Lett* 22:969–975.
  - Kim H-Y. i H-G. Song. 2003. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:150–156
  - Kim, Y.H. i E.R. Carraway. 2003. Reductive dechlorination of TCE by zero valent bimetals. *Environ. Technol.* 24:69-75.
  - Kirk, T.K., M. Tien, P.J. Kersten, M.D. Mozuch i B. Kalyanaraman. 1986. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol b-aryl ether substructure of lignin. *Biochem. J.* 236:279-287.
  - Kirk, T.K. i R.L. Farrell. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
  - Knutson, K. i A. Ragauskas. 2004. Laccase-mediated biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol. Prog.* 20:1893-1896.
  - Koh, S.C., J.P. Bowman i G.S. Sayler. 1993. Soluble Methane monooxygenase production and trichloroethylene degradation by a Type I methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:960-967.
  - Komatsu, T., K. Mononoi, T. Matsuno i K. Hanaki. 1994. Biotransformation of cis-1,2-dichloroethylene to ethylene and ethane under anaerobic conditions. *Water Sci. Technol.* 7:75–84.
  - Koziollek, P., D. Bryniok i H-J. Knackmuss. 1999. Ethene as an auxiliary substrate for the cooxidation of cis-1,2-dichloroethene and vinyl chloride. *Archiv. Microbiol.* 172:240–246.
  - Krone U.E., R.K. Thauer i H.P.C. Hogenkamp. 1989a. Reductive dehalogenation of chlorinated C1-hydrocarbons mediated by corrinoids. *Biochemistry.* 28:4908-4914.
  - Krone, U.E., K. Laufer, R.K. Thauer i H.P.C. Hogenkamp. 1989b. Coenzyme F430 as a possible catalyst for the reductive dehalogenation of chlorinated hydrocarbons in methanogenic bacteria. *Biochemistry.* 28:10061-10065.

- Krumholz, L.R. 1997. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47:1262-1263.
- Kullman, S. i F. Matsumura. 1996. Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:593-600.
- Kuwahara, M., J.K. Glenn, M.A. Morgan i M.H. Gold. 1984. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169:247-250.
- Larson, L.J. i R.J. Bull. 1989. Effect of ethanol on the metabolism of trichloroethylene. *J. Toxicol. Environ. Health* 28:395-406.
- Lash, L.H., J.W. Fisher, J.C. Lipscomb i J.C. Parker. 2000. Metabolism of trichloroethylene. *Environ. Health Perspect.* 2:177-200.
- Leahy, J.G., A.M. Byrne i R.H. Olsen. 1996. Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 825–833.
- Leatham, G.F. i T.K. Kirk. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16:65-67.
- Leonowicz, A., A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen, M. Wojta-Wasilewska, N-S. Cho i M. Hofrichter. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal genet. Biol.* 27:175-185.
- Lêstan, D. i R.T. Lamar. 1996. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2045-2052.
- Li, D. i F.W. Schwartz. 2004. DNAPL remediation with in situ chemical oxidation using potassium permanganate. Part I. Mineralogy of Mn oxide and its dissolution in organic acids. *J. Contam. Hydrol.* 68:39-53.
- Li, S.Y. i L.P. Wackett. 1992. Trichloroethylene oxidation by toluene dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185:443–451.
- Lipscomb, J.C., C.M. Garrett i J.E. Snawder. 1997. Cytochrome P450 dependent metabolism of trichloroethylene: interindividual differences in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142:311-319.
- Little, C.D., A.V. Palumbo, S.E. Herbes, M.E. Lidstrom, R.L. Tyndall i P.J. Gilmer. 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:951-956.
- Llei 10/1998, de 21 d'abril, de Residus.
- Llimona, X. 1991. Fongs i líquens. A: Història Natural dels Països Catalans (Vol. 5). Enciclopèdia Catalana. Barcelona.
- Löffler, F.E., J.M. Tiedje i R.A. Sanford. 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halo-respiratory physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4049-4056.
- Lorenzo, M., D. Moldes i M.A. Sanroman. 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourize dyes. *Chemosphere.* 63:912-7.

- Luijten, M.L., J. de Weert, H. Smidt, H.T. Boschker, W.M. de Vos, G. Schraa i A.J. Stams. 2003. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53:787-93.
- Lundell, T., A. Leonowicz, J. Rogalski i A. Hatakka. 1990. Formation and action of lignin modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2623-2629.
- Luque, F. 1998. La contaminación de las aguas subterráneas por actividades urbanas e industriales: La visión de los usuarios. A: J. Samper (ed.). *La contaminación de las aguas subterráneas: un problema pendiente.* Madrid.
- Magnuson, J.K., R.V. Stern, J.M. Gossett, S.H. Zinder i D.R. Burris. 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1270-1275.
- Majcherczyk, A., C. Johannes i A. Hüttermann. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Biotechnol.* 22:335-341.
- Major, D.W., M.L. McMaster, E.E. Cox, E.A. Edwards, S.M. Dworatzek, E.R. Hendrickson, M.G. Starr, J.A. Payne i L.W. Buonamici. 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* 36:5106-16.
- Malachowsky, K.J., T.J. Phelps, A.B. Teboli, D.E. Minnikin i D.C. White. 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:542-548.
- Martínez, A.T, M. Speranza, F. Ruiz-Dueñas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillén, M.J. Martínez, A. Gutiérrez i J.C. del Río. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* 8:195-204.
- Maymó-Gatell, X., V. Tandoi, J.M. Gossett i S.H. Zinder. 1995. Characterization of an H<sub>2</sub>-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3928–3933.
- Maymó-Gatell, X., Y. Chien, J.M. Gossett, S.H. Zinder. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science.* 276:1568–1571.
- McCarty, P.L. i L. Semprini. 1994. Ground-water treatment for chlorinated solvents. A: R.D. Norris i R.S. Kerr (ed.). *Handbook of bioremediation.* Lewis Publishers, p. 87-116. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- McRae, B.M., T.M. LaPara i R.M. Hozalski. 2004. Biodegradation of haloacetic acids by bacterial enrichment cultures. *Chemosphere.* 55:915–925.
- Metcalf, E. 1985. *Ingeniería Sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales.* Editorial Labor. Barcelona.

- Meulenberg, R., H.H.M. Rijnaarts, H.J. Doddema i J.A. Field. 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiol. Lett.* 152:45-49
- Meza, L., T.J. Cutright, B. El-Zahab i P. Wang. 2003. Aerobic biodegradation of trichloroethylene using a consortium of five bacterial strains. *Biotechnol. Lett.* 25:1925-1932.
- Miller, E., G. Wohlfarth i G. Diekert. 1997. Comparative studies on tetrachloroethylene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* 168:513-519.
- Miller, E., G. Wohlfarth i G. Diekert. 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Arch Microbiol.* 169:497-502.
- Miller, R.E. i F.P. Guengerich. 1982. Oxidation of trichloroethylene by liver microsomal cytochrome P-450: evidence for chlorine migration in a transition state not involving trichloroethylene oxide. *Biochemistry.* 21:1090-1097.
- Moretti, V. 2005. *In situ* bioremediation of DNAPL source zones. Office of Solid Waste and Emergency Response. EPA. Accessible a:  
[http://clu-in.org/download/studentpapers/moretti\\_dnaplbioremediation.pdf](http://clu-in.org/download/studentpapers/moretti_dnaplbioremediation.pdf).
- Mori, T., S. Gitano i R. Kondo. 2003. Biodegradation of chloronaphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:380-383.
- Mougin, C., A. Kollmann i C. Jolival. 2002. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol. Lett.* 24:139-142.
- Muheim, A., R. Waldner, D. Sanglard, J. Reiser, H.E. Schoemaker i M.S.A. Leisola. 1991. Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 195:369-375.
- Müller, G., M. Spassovski i D. Henschler. 1975. Metabolism of trichloroethylene in man. III: Interaction of trichloroethylene and ethanol. *Arch. Toxicol.* 33:173-189.
- Mvarik, S.C., R.K. Sillan, A.L. Wood i G.W. Sewell. 2003. Field evaluation of the solvent extraction residual biotreatment technology. *Environ. Sci. Technol.* 37:5040-5049.
- Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, E.J. O'Neill i P.H. Pritchard. 1986. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:383-384.
- Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, W.R. Mahaffey i P.H. Pritchard. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:949-954.
- Neumann, A., A. Siebert, T. Trescher, S. Reinhardt, G. Wohlfarth i G. Diekert. 2002. Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. *Arch Microbiol.* 177:420-426.
- Neumann, A., G. Wohlfarth i G. Diekert. 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J. Biol. Chem.* 271:16515-16519.



- Newman, L.M. i L.P. Wackett. 1991. Fate of 2,2,2-trichloroacetaldehyde (chloral hydrate) produced during trichloroethylene oxidation by methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2399-2402.
- Newman, L.M. i L.P. Wackett. 1997. Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, and turnover-dependent inactivation. *J. Bacteriol.* 179:90–96.
- Niku-Paavola, M. L. i L. Viikari. 2000. Enzymatic oxidation of alkenes. *J. Molec. Catal. B: Enzym.* 10:435–444.
- Novotný, Č., P. Erbanová, T. Cajthaml, N. Rothschild, C. Dosoretz i V. Šašek. 2000. *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:850-853.
- Novotný, Č., B. Rawal, M. Bhatt, M. Patel, V. Šašek i H.P. Molitoris. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* 89:113–122.
- Novotný, Č., K. Svobodová, A. Kasinath i P. Erbanová. 2004. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *Int. Biodet. Biodeg.* 54:215–223.
- Oldenhuis, R., J.Y. Oedzes, J.J. van der Waarde i D.B. Janssen. 1991. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2819–2826.
- Olsen, R. H., J. J. Kukor i B. Kaphammer. 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* 176:3749-3756.
- Orth, A.B., D.J. Royse i M. Tien. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4017-4023.
- Orth, A.B. i M. Tien. 1995. Biotechnology of lignin degradation. A: Kück (ed.). *The Mycota II. Genetics and Biotechnology.* Springer-Verlag, p. 287-302. Berlin, Alemany.
- Ortiz de Montellano, P.R., J.M. Mathews i K.C. Langry. 1984. Autocatalytic inactivation of cytochrome P-450 and chloroperoxidase by 1-aminobenzotriazole and other aryne precursors. *Tetrahedron.* 40:511-519.
- Paszczynski, A., R.L. Crawford i V.B. Huynh. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Method. Enzymol.* 161:264-270.
- Payne, F., S. Suthersan, F. Lenzo i J. Burdick. 2001. Mobilization of sorbed-phase chlorinated alkenes in enhanced reductive dechlorination. A: V. Magar, D. Fennell, B. Alleman, A. Leeson (ed.). *Anaerobic degradation of chlorinated solvents.* Battelle Press, p. 53-60. Columbus, Ohio, Estats Units.
- Pinsach, J., C. de Mas i J. López. 2006. A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochem. Eng. J.* 29:235-242.
- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:20–33.

- Pressman, J.G., G. Georgio i G.E. Speitel Jr. 2000. A hollow-fiber membrane bioreactor for the removal of trichloroethylene from the vapor phase. *Biotechnol. Bioeng.* 5:548-56.
- Prosser, J.I. i A.J. Tough. 1991. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10:253-74.
- Quinn, J., C. Geiger, C. Clausen, K. Brooks, C. Coon, S. O'Hara, T. Krug, D. Major, W.S. Yoon, A. Gavaskar i T. Holdsworth. 2005. Field demonstration of DNAPL dehalogenation using emulsified zero-valent iron. *Environ Sci Technol.* 39:1309-18.
- Ramsburg, C.A., L.M. Abriola, K.D. Pennell, F.E. Löffler, M. Gamache, B.K. Amos i E.A. Petrovskis. 2004. Stimulated microbial reductive dechlorination following surfactant treatment at the Bachman Road Site. *Environ. Sci. Technol.* 38: 5902-5914.
- Real Decret 117/2003, de 31 de gener, sobre limitació d'emissions de compostos orgànics volàtils degudes a l'ús de dissolvents en determinades activitats.
- Real Decret 140/2003, de 7 de febrero, pel qual s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà.
- Real Decret 9/2005, de 14 de gener, per la que s'estableix la relació d'activitats potencialment contaminants del sòl i els criteris i estàndards per a la declaració de sòls contaminats.
- Reddy, C.A. 1993. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 30: 91-107.
- Reddy, C.A. 1995. The potential of white rot fungi for the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:320-328.
- Reddy, C.A. i Z. Mathew. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. A: G.M. Gadd (ed.). *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, p. 52-78, Cambridge, U.K.
- Reij, M.W., J. Kieboom, J.A. de Bont i S. Hartmans. 1995. Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2936-2942.
- Rosenthal, H., L. Adrian i M. Steiof. 2004. Dechlorination of PCE in the presence of Fe<sup>0</sup> enhanced by a mixed culture containing two *Dehalococcoides* strains. *Chemosphere.* 55:661-9.
- Russell, H.H., J.E. Matthews i G.W. Sewell. 1992. TCE removal from contaminated soil and ground water. EPA Ground Water Issue. EPA/540/S-92/002.
- Ryoo, D., H. Shim, K. Canada, P. Barbieri i T.K. Wood. 2000. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nat. Biotechnol.* 18:775-778.
- Saeki, H., M. Akira, K. Furuhashi, B. Averhoff i G. Gottschalk. 1999. Degradation of trichloroethylene by a linear plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiol.* 145:1721-1730.
- Sariaslani, F.S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Crit. Rev. Biotechnol.* 9:171-257.

- Schäfer, A. i E.J. Bouwer. 2000. Toluene induced cometabolism of cis-1,2-dichloroethylene and vinyl chloride under conditions expected downgradient of a permeable Fe(0) barrier. *Water Res.* 34:3391–3399.
- Schnarr, M., C. Truax, G. Farquhar, E. Hood, T. Gonullu i B. Stickney. 1998. Laboratory and controlled field experiments using potassium permanganate to remediate trichloroethylene and perchloroethylene DNAPLs in porous media. *J. Contam. Hydrol.* 29:205-224.
- Scholz-Muramatsu, H., A. Neumann, M. Messmer, E. Moore i G. Diekert. 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. No, sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 163:48-56.
- Schultz, J. i H. Weiner. 1979. Alteration of the enzymology of chloral hydrate reduction in the presence of ethanol. *Biochem. Pharmacol.* 28:3379-3384.
- Schumacher, W. i C. Holliger. 1996. The proton electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in *Dehalobacter restrictus*. *J. Bacteriol.* 178:2328-2333.
- Schumacher, W., C. Holliger, A.J. Zehnder i W.R. Hagen. 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Lett.* 409:421-425.
- Schuth, C., M. Bill, J.A. Barth, G.F. Slater i R.M. Kalin. 2003. Carbon isotope fractionation during reductive dechlorination of TCE in batch experiments with iron samples from reactive barriers. *J. Contam. Hydrol.* 66:25-37.
- Semprini, L. 1997. Strategies for the aerobic co-metabolism of chlorinated solvents. *Current Opinion in Biotechnol.* 83:296-308.
- Sharma, P.K. i P.L. McCarty. 1996. Isolation and characterization of a facultative bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:761-765.
- Shelton, D.R. i J.M. Tiedje. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoate acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:840-848.
- Shields, M.S. i M.J. Reagin. 1992. Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3977-3983.
- Shim, H., D. Ryoo, P. Barbieri i T.K. Wood. 2001. Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes and vinyl chloride by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomona stutzeri* 0X1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:265-269.
- Shin, K-S, Y.H. Kim i J-S Lim. 2005. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. *J. Microbiol.* 43:503-509.
- Sigma Aldrich. 2006. Fitxa de seguretat del 2,2,2-tricloroetanol.

- Soares, A., K. Jonasson, E. Terrazas, B. Guieysse i B. Mattiasson. 2005. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:719 – 725.
- Song, H-G. 1999. Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15:669-672.
- Speitel, G.E.Jr., R.C. Thompson i D. Weissman. 1993. Biodegradation kinetics of *Methylosinus trichosporium* OB3b at low concentrations of chloroform in the presence and absence of enzyme competition by methane. *Water Res.* 27:15-24.
- Squillace, P.J., M.J. Moran, W.W. Lapham, C.V. Price, R.M. Clawges i J.S. Zogorski. 1999. Volatile organic compounds in untreated ambient groundwater of the United States, 1985-1995. *Environ. Sci. Technol.* 33: 4176-4187.
- Srinivasan, C., T.M. D'Souza, K. Boominathan i C.A. Reddy. 1995. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4274-4277.
- Stahl, J.D. i S.D. Aust. 1993a. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:477-482.
- Stahl, JD i S.D. Aust. 1993b. Plasma membrane dependent reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192:471-476.
- Stupperich, E. 1993. Recent advances in elucidation of biological corrinoid functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:349-366.
- Suayama, A., M. Yamashita, S. Yoshino i K. Furukawa. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp strain Y51. *J. Bacteriol.* 184:3419-3425.
- Sun, A.K. i T.K. Wood. 1996. Trichloroethylene degradation and mineralization by pseudomonads and *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:248-56.
- Sung, Y., K.M. Ritalahti, R.A. Sanford, J.W. Urbance, S.J. Flynn, J.M. Tiedje i F.E. Löffler. 2003. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2964-2974.
- Suty, H., C. De Traversay i M. Cost. 2004. Applications of advanced oxidation processes: present and future. *Water Sci. Technol.* 49:227-233.
- Sutherson, S.S. i F.C. Payne. 2005. *In situ* bioremediation. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estats Units.
- Tandoi, V., T. D. DiStefano, P. A. Bowser, J.M. Gossett i S.H. Zinder. 1994. Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and halogenated ethanes by a high-rate anaerobic enrichment culture. *Environ. Sci. Technol.*, 28:973–979.
- Teel, A.L., C.R. Warberg, D.A. Atkinson i R.J. Watts. 2001. Comparison of mineral and soluble iron Fenton's catalysts for the treatment of trichloroethylene. *Water Res.* 35:977-984.

- Tekere, M., A.Y. Mswaka, R. Zvauya i J.S. Read. 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzym. Microbiol. Technol.* 28:420-426.
- Terzenbach, D.P. i M. Blaut. 1994. Transformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene by homoacetogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 15:213-8.
- Thüner, L.P., I. Barnes, K.H. Becker, T.J. Wallington, L.K. Christensen, J.J. Orlando i B. Ramacher. 1999. Atmospheric chemistry of tetrachloroethene ( $\text{Cl}_2=\text{Cl}_2$ ): products of chlorine atom initiated oxidation. *J. Phys. Chem. A.* 103:8657-8663.
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140:19-26.
- Tien, M. i T.K. Kirk. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science.* 221:661-663.
- Townsend, G.T. i J.M. Suflita. 1996. Characterization of chloroethylene dehalogenation by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei* and its relationship to chlorobenzoate dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2850-2853.
- Tuazon, E.C., R. Atkinson, S.M. Aschmann, M.A. Goodman i A.M. Winer. 1988. Atmospheric reactions of chloroethenes with the OH radical. *Int. J. Chem. Kinetics* 20:241-165.
- Van de Brink, H., R.F.M. van Gorcom, C.A.M.J.J. van den Hondel i P.J. Punt. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fung. Gen. Biol.* 23:1-17.
- Van de Pas, B.A., J. Gerritse, W.M. de Vos, G. Schraa i A.J.M. Stams. 2001. Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and chlorophenol reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1. *Arch. Microbiol.* 176:165-169.
- Van Hamme, J.D., E.T. Wong, H. Dettman, M.R. Gray i M.A. Pickard. 2003. Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1320–1324.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., W. De Koning i D.B. Janssen. 1997. Effect of chlorinated ethene conversion on viability and activity of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4961–4964
- Vandewijngaard, A.J., K.W.H.J. Vanderkamp, J. Vanderploeg, F. Pries, B. Kazemier i D.B. Janssen. 1992. Degradation of 1,2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:976–983.
- Vanderberg, L.A., B.L. Burbach i J.J. Perry. 1995. Biodegradation of trichloroethylene by *Mycobacterium vaccae*. *Can. J. Microbiol.* 41:298-301.
- Vannelli, T., A. Studer, M. Kertesz i T. Leisinger. 1998. Chloromethane metabolism by *Methylobacterium sp.* Strain CM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1933–1936.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73:1163-1172.
- Vilaplana, M. 2006. Disseny d'un bioreactor per degradar hidrocarburs alifàtics clorats amb *Trametes versicolor*. Treball de Màster. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Vogel, T.M. i P.L. McCarty. 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride, and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1080-1083.

- Vogel, T.M. 1994. Natural bioremediation of chlorinated solvents. A: R.D. Norris i R.S. Kerr (ed.). Handbook of bioremediation. Lewis Publishers, p. 149-174. Boca Raton, Florida, Estats Units.
- Völkel, W., M. Friedewald, E. Lederer, A. Pähler, J. Parker i W. Dekant. 1998. Biotransformation of perchloroethene: dose-dependent excretion of trichloroacetic acid, dichloroacetic acid, and N-acetyl-S-(trichlorovinyl)-L-cysteine in rats and humans after inhalation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 153:20–27.
- Wackett, L.P. i S.R. Householder. 1989. Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 55:2723–2725.
- Weightman, A.L., A.J. Weightman i J.H. Slater. 1992. Microbial dehalogenation of trichloroacetic acid. W. J. Microbiol. Biotechnol. 8:512–518.
- Wild, A., R. Hermann i T. Leisinger. 1996. Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. Biodegradation. 7:507-511.
- Wild, A.P., W. Winkelbauer i T. Leisinger. 1995. Anaerobic dechlorination of trichloroethene, tetrachloroethene and 1,2-dichloroethane by an acetogenic mixed culture in a fixed-bed reactor. Biodegradation.6:309-18.
- Wilson, J.T. i B.H. Wilson. 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. Appl. Environ. Microbiol. 49:242-243.
- Wilson, J.T., C.G. Enfield, W.J. Dunlap, R.L. Cosby, D.A. Foster i L.B. Boskin. 1981. Transport and Fate of Selected Organic Pollutants in a Sandy Soil. J. Environ. Qual. 10:501-506.
- Winter, R.B., K-M. Yen i B.D. Ensley. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology. 7:282-285.
- Wong, Y. i J. Yu. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. Water Res. 33:3512-3520.
- Yadav, J.S. i C.A. Reddy. 1993. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 59:756-762.
- Yadav, J.S., F.F. Quensen, J.M. Tiedje i C.A. Reddy. 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254 and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. Appl. Environ. Microbiol. 61:2560-2565.
- Yadav, J.S., C. Bethea i C.A. Reddy. 2000. Mineralization of trichloroethylene (TCE) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65:28-34.
- Yadav, J.S., M.B. Soellner, J.C. Loper i P.K. Mishra. 2003. Tandem cytochrome P450 monooxygenase genes and splice variants in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: cloning, sequence analysis, and regulation of differential expression. Fungal Genet. Biol. 38:10-21.

- Yang Y. i P.L. McCarty. 2000. Biologically Enhanced Dissolution of Tetrachloroethene DNAPL. Environ. Sci. Technol. 34:2979-2984.
- Yang, Y. i P.L. McCarty. 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. Environ. Sci. Technol. 32:3591-3597
- Yang, Y.E. i F.W. Schwartz. 1999. Oxidative degradation and kinetics of chlorinated ethylenes by potassium permanganate. J. Contam. Hydrol. 37:343-365.
- Yang, Y. i P.L. McCarty. 2002. Comparison between donor substrates for biologically enhanced tetrachloroethene DNAPL dissolution. Environ. Sci. Technol. 36:3400-3404.
- Yaroplov, A.I., O.V. Skorobogatko, S.S. Vartanov i S.D. Varfolomeyev. 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. Appl. Biochem. Biotechnol. 49:257-280.
- Yeager, C.M., P.J. Bottomley i D.J. Arp. 2001. Requirement of DNA repair mechanisms for survival of *Burkholderia cepacia* G4 upon degradation of trichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol. 67:5384-91.
- Yu, P. i T. Welander. 1995. Growth of an aerobic bacterium with trichloroacetic acid as the sole source of energy and carbon. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:769-774.
- Zimmermann, W. 1990. Degradation of lignin by bacteria. J. Biotechnol. 13:119-130.

#### **RECURSOS WEB:**

- ATSDR. Pàgina web: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/>.
- CAR/PL. 2002. Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia. Plan de Acción para el Mediterráneo. Alternativas de prevención de la contaminación en el sector de tratamiento de superficies. Pàgina web: [www.cema-sa.org](http://www.cema-sa.org).
- CCOHS. Canadian Centre for Occupational Health and Safety. CHEMINFO Database. [www.intox.org/databank/documents/chemical/trichacd/cie766.htm](http://www.intox.org/databank/documents/chemical/trichacd/cie766.htm).
- CDCP. Centers for Disease Control and Prevention. United States Department of Health and Human Services. Pàgina web: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).
- Greenpeace. La calidad de las aguas en Espanya (2005). Un estudio por cuencas. Pàgina web: [www.greenpeace.org](http://www.greenpeace.org).
- IGME. Procesos y tecnologías emergentes de remediación de aguas subterráneas contaminadas con disolventes clorados (Ordoñez, J.L.). Disponible a: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/022.pdf>.





# **Fitxes internacionals de seguretat química**

# TRICLOROETILENO



TRICLOROETILENO  
1,1,2-Tricloroetileno  
Tricloroeteno  
Tricloruro de etileno  
 $C_2HCl_3/CICH=CCl_2$   
Masa molecular: 131.4

Nº CAS 79-01-6  
Nº RTECS KX4550000  
Nº ICSC 0081  
Nº NU 1710  
Nº CE 602-027-00-9

TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
<b>INCENDIO</b>	Combustible en condiciones específicas (véanse Notas).		En caso de incendio en el entorno: están permitidos todos los agentes extintores.
<b>EXPLOSION</b>	Riesgo de incendio y explosión (véanse Riesgos Químicos).		En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
<b>EXPOSICION</b>			
<input type="checkbox"/> <b>INHALACION</b>	Vértigo, somnolencia, dolor de cabeza, debilidad, pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo, respiración artificial si estuviera indicada y proporcionar asistencia médica.
<input type="checkbox"/> <b>PIEL</b>	Piel seca, enrojecimiento.	Guantes protectores.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
<input type="checkbox"/> <b>OJOS</b>	Enrojecimiento, dolor.	Gafas de protección de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y después proporcionar asistencia médica.
<input type="checkbox"/> <b>INGESTION</b>	Dolor abdominal (para mayor información véase Inhalación).	No comer, ni beber ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca, NO provocar el vómito, dar a beber agua abundante, reposo.
<b>DERRAMAS Y FUGAS</b>	<b>ALMACENAMIENTO</b>	<b>ENVASADO Y ETIQUETADO</b>	
Ventilar. Recoger, en la medida de lo posible, el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes herméticos, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. (Protección personal adicional: equipo autónomo de respiración).	Separado de metales (véanse Riesgos Químicos), bases fuertes, alimentos y piensos. Mantener en lugar seco y oscuro. Ventilación a ras del suelo.	<p>No transportar con alimentos y piensos. IMO: Contaminante Marino símbolo Xn R: 40-52/53 S: (2-)23-36/37-61 Clasificación de Peligros NU: 6.1 Grupo de Envasado NU: III</p>	
<b>VEASE AL DORSO INFORMACION IMPORTANTE</b>			
<b>ICSC: 0081</b>		Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión de las Comunidades Europeas © CCE, IPCS, 1994	

**TRICLOROETILENO****ICSC: 0081**

<b>D A T O S  I M P O R T A N T E S</b>	<p><b>ESTADO FISICO; ASPECTO</b> Líquido incoloro, de olor característico.</p> <p><b>RIESGOS FISICOS</b> El vapor es más denso que el aire . Como resultado del flujo, agitación, etc., se pueden generar cargas electrostáticas.</p> <p><b>RIESGOS QUIMICOS</b> En contacto con superficies calientes o con llamas esta sustancia se descompone formando humos tóxicos y corrosivos de fosgeno, cloruro de hidrógeno y cloro. La sustancia se descompone en contacto con bases fuertes, produciendo dicloroacetileno, que aumenta el peligro de incendio. Reacciona violentamente con metales tales como litio, magnesio, aluminio, titanio, bario y sodio. Se descompone lentamente por acción de la luz en presencia de humedad, originándose cloruro de hidrógeno.</p> <p><b>LIMITES DE EXPOSICION</b> TLV (como TWA): 50 ppm A5; 269 mg/m<sup>3</sup> A5 (ACGIH 1993-1994). TLV (como STEL): 100 ppm A5; 537 mg/m<sup>3</sup> A5 (ACGIH 1993-1994).</p>	<p><b>VIAS DE EXPOSICION</b> La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión.</p> <p><b>RIESGO DE INHALACION</b> Por evaporación de esta sustancia a 20°C se puede alcanzar bastante rápidamente una concentración nociva en el aire.</p> <p><b>EFECTOS DE EXPOSICION CORTA</b> La sustancia irrita los ojos y la piel. La ingestión del líquido puede originar aspiración dentro de los pulmones con riesgo de neumonitis química. La sustancia puede causar efectos en el sistema nervioso central. La exposición podría causar disminución de la consciencia.</p> <p><b>EFECTOS DE EXPOSICION PROLONGADA</b> El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis. La sustancia puede afectar al hígado y al riñón (véanse Notas).</p>
<b>PROPIEDADES FISICAS</b>	<p>Punto de ebullición: 87°C Punto de fusión: -73°C Densidad relativa (agua = 1): 1.5 Solubilidad en agua, g/100 ml a 20°C: 0.1 Presión de vapor, kPa a 20°C: 7.8</p>	<p>Densidad relativa de vapor (aire = 1): 4.5 Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.3 Temperatura de autoignición: 410°C Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 8-10.5 Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 2.42</p>
<b>DATOS AMBIENTALES</b>	 <p>Esta sustancia puede ser peligrosa para el ambiente; debería prestarse atención especial a los organismos acuáticos.</p>	
<b>NOTAS</b>		
<p>Bajo ciertas condiciones pueden desarrollarse mezclas combustibles vapor/aire difíciles de inflamar. El consumo de bebidas alcohólicas aumenta el efecto nocivo. Está indicado examen médico periódico dependiendo del grado de exposición. La alerta por el olor es insuficiente. NO utilizar cerca de un fuego, una superficie caliente o mientras se trabaja en soldadura. El producto en grado técnico puede contener estabilizadores carcinogénicos.</p> <p style="text-align: right;">Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-723 Código NFPA: H 2; F 1; R 0;</p>		

**NOTA LEGAL IMPORTANTE:**

Ni la CCE ni la IPCS ni sus representantes son responsables del posible uso de esta información. Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. La versión española incluye el etiquetado asignado por la clasificación europea, actualizado a la vigésima adaptación de la Directiva 67/548/CEE traspuesta a la legislación española por el Real Decreto 363/95 (BOE 5.6.95).

# TETRACLOROETILENO









**TETRACLOROETILENO**  
 Percloroetileno  
 Tetracloroetano  
 1,1,2,2-tetracloroetileno  
 $C_2Cl_4/Cl_2C=CCl_2$   
 Masa molecular: 165.8


Nº CAS 127-18-4  
 Nº RTECS KX3850000  
 Nº ICSC 0076  
 Nº NU 1897  
 Nº CE 602-028-00-4

TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
<b>INCENDIO</b>	No combustible. En caso de incendio desprende humos tóxicos y corrosivos.		En caso de incendio en el entorno: están permitidos todos los agentes extintores.
<b>EXPLOSION</b>			

EXPOSICION		¡HIGIENE ESTRICTA!	
<input type="checkbox"/> <b>INHALACION</b>	Incoordinación, euforia, vértigo, somnolencia, dolor de cabeza, náuseas, debilidad, pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo, respiración artificial si estuviera indicada y proporcionar asistencia médica.
<input type="checkbox"/> <b>PIEL</b>	Piel seca, enrojecimiento, quemaduras cutáneas, ampollas.	Guantes protectores y traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
<input type="checkbox"/> <b>OJOS</b>	Enrojecimiento, dolor.	Gafas ajustadas de seguridad o pantalla facial.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
<input type="checkbox"/> <b>INGESTION</b>	Dolor abdominal, (para mayor información véase Inhalación).	No comer, ni beber ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca, NO provocar el vómito, dar a beber agua abundante y reposo.

DERRAMAS Y FUGAS	ALMACENAMIENTO	ENVASADO Y ETIQUETADO
Ventilar. Recoger, en la medida de lo posible, el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes herméticos, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro.	Separado de metales (véanse Peligros Químicos). Separado de alimentos y piensos. Mantener en la oscuridad. Ventilación a ras del suelo.	 <p>No transportar con alimentos y piensos.                      IMO:                      Contaminante marino                      símbolo Xn                      símbolo N                      R: 40-51/53                      S: (2-)23-36/37-61                      Clasificación de Peligros NU: 6.1                      Grupo de Envasado NU: III</p>

**TETRACLOROETILENO****ICSC: 0076**

<b>D A T O S I M P O R T A N T E S</b>	<p><b>ESTADO FISICO; ASPECTO</b> Líquido incoloro, de olor característico.</p> <p><b>RIESGOS FISICOS</b> El vapor es más denso que el aire.</p> <p><b>RIESGOS QUIMICOS</b> En contacto con superficies calientes o con llamas esta sustancia se descompone formando humos tóxicos y corrosivos de cloruro de hidrógeno, fosgeno y cloro. La sustancia se descompone lentamente en contacto con la humedad, produciendo ácido tricloroacético y cloruro de hidrógeno. Reacciona con metales tales como aluminio, litio, bario, y berilio.</p> <p><b>LIMITES DE EXPOSICION</b> TLV (como TWA): 50 ppm; 339 mg/m<sup>3</sup>(ACGIH 1992-1993). TLV (como STEL): 200 ppm; 1357 mg/m<sup>3</sup> (ACGIH 1992-1993).</p>	<p><b>VIAS DE EXPOSICION</b> La sustancia se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión.</p> <p><b>RIESGO DE INHALACION</b> Por evaporación de esta sustancia a 20°C se puede alcanzar bastante lentamente una concentración nociva en el aire.</p> <p><b>EFECTOS DE EXPOSICION CORTA</b> La sustancia irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio. La ingestión del líquido puede originar aspiración dentro de los pulmones con riesgo de neumonitis química. La sustancia puede causar efectos en el sistema nervioso central.</p> <p><b>EFECTOS DE EXPOSICION PROLONGADA</b> El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis. La sustancia puede afectar al hígado y al riñón. Se han detectado tumores en animales de laboratorio pero puede que no afecte a los seres humanos.</p>
	<p><b>PROPIEDADES FISICAS</b></p> <p>Punto de ebullición: 121°C Punto de fusión: -22°C Densidad relativa (agua = 1): 1.6 Solubilidad en agua, g/100 ml a 20°C: 0.015</p>	<p>Presión de vapor, kPa a 20°C: 1.9 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 5.8 Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20°C (aire = 1): 1.09 Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 2.6</p>
<p><b>DATOS AMBIENTALES</b></p>	 <p>Esta sustancia puede ser peligrosa para el ambiente; debería prestarse atención especial al agua y al aire de interiores.</p>	
<b>NOTAS</b>		
<p>El consumo de bebidas alcohólicas aumenta el efecto nocivo. Está indicado examen médico periódico dependiendo del grado de exposición. La alerta por el olor es insuficiente. NO utilizar cerca de un fuego, una superficie caliente o mientras se trabaja en soldadura. El producto técnico puede contener pequeñas cantidades de estabilizadores carcinogénicos.</p> <p>Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-722 Código NFPA: H 2; F 0; R 0;</p>		
<b>INFORMACION ADICIONAL</b>		
FISQ: 3-186 TETRACLOROETILENO		
<p><b>NOTA LEGAL IMPORTANTE:</b></p> <p>Ni la CCE ni la IPCS ni sus representantes son responsables del posible uso de esta información. Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. La versión española incluye el etiquetado asignado por la clasificación europea, actualizado a la vigésima adaptación de la Directiva 67/548/CEE traspuesta a la legislación española por el Real Decreto 363/95 (BOE 5.6.95).</p>		