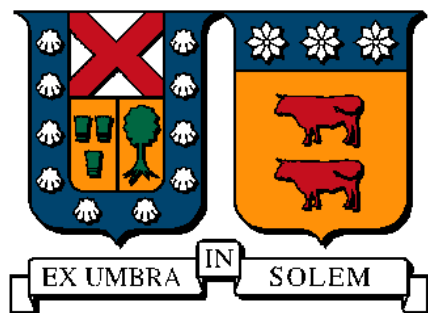


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**ESTUDIO DE ADSORCIÓN DE GLICEROL ACUOSO EN
SEDIMENTOS DEL RÍO OISE, FRANCIA Y ANÁLISIS DEL
EFECTO DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS A NIVEL
MICROBIOLÓGICO.**

Vanessa Karina Ayala Espinoza

**MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL AMBIENTAL**

Profesor Guía:

Dr. Knud Henrik Kirstein Hansen

Profesor Coreferente:

Dr. Olivier Schoefs

NOVIEMBRE 2016



Agradecimientos

Mis más sinceros y profundos agradecimientos a mi familia, sin el apoyo de mis padres y hermanos esto no habría sido posible. Cada una de las personas que he conocido en el paso por la universidad ha dejado una huella en mi vida y espero que el término de este proceso no signifique romper lazos importantes entre nosotros. Los amigos ambientales, de biblioteca, de custodia, de los cables, de federación y a todos los que conocí en el camino les agradezco por ser parte de mis días, apoyarme cuando lo necesitaba y celebrar junto a mí los pequeños triunfos de la vida universitaria.

Quisiera agradecer también a los profesores que me ayudaron en este proceso, en especial a Olivier Schoefs y Claude Sarde quienes depositaron su confianza en mí en este proyecto de investigación, y, de igual manera quiero agradecer a la Université de Technologie de Compiègne por su acogida durante el período en que realicé esta investigación.

Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujete, que la libertad sea nuestra propia sustancia, hay que vivir y ser libre. Porque alguien dijo y estoy de acuerdo, que el tiempo cura, el dolor pasa, que la decepción no mata y que la vida, la vida siempre continúa.
Simone de Beauvoir - Pour une morale de l'ambiguïté

Resumen

La investigación realizada forma parte de un proyecto multidisciplinario entre la UTC (Université de Technologie de Compiègne), la ESCOM (Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale) y el INERIS (Institut National Environnement Industriel et Risques), que busca encontrar herramientas de análisis para predecir el impacto de moléculas orgánicas provenientes de la industria de la bio-refinería en los sedimentos del río Oise, en la ciudad de Compiègne, Francia.

Para describir el comportamiento de los contaminantes en los sedimentos del río, se escogió un contaminante asociado a la industria del biodiesel, la molécula seleccionada fue el glicerol, principal co-producto de la producción de biodiesel. La medición de concentraciones de glicerol se realizó a través de un método rápido y fuera de línea, combinando dos reacciones que producen un colorante amarillo, 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidine (DDL), cuya absorbancia se puede medir utilizando un espectrofotómetro.

En la construcción de los experimentos de adsorción también se analizó la capacidad de esterilización de dos métodos, la esterilización por autoclave y la esterilización utilizando radiación UV, en donde, la esterilización por autoclave arrojó mejores resultados que la esterilización por radiación UV, siendo comprobado por el nulo crecimiento de bacterias a través del conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) y la baja reducción del agente de viabilidad celular PrestoBlue™.

Se realizaron tres experimentos para describir la adsorción del glicerol hacia los sedimentos del río Oise. El primer experimento, con concentración inicial de glicerol de 0,1 [mol/L], presentó errores significativos entre las muestras debido a la sensibilidad del DDL, pero sí mostró las primeras diferencias entre la adsorción con sedimentos de río esterilizados (abiótico) y aquellos no sometidos a esterilización (bióticos), donde la reducción de glicerol alcanza un 60% en condiciones bióticas. Para el desarrollo del segundo experimento se disminuyó en 90% la concentración inicial de glicerol acuoso (0,01 [mol/L]), considerando una recuperación apropiada desde las líneas productivas de biodiesel y, además, una

disminución de los errores de las muestras aumentando la sensibilidad de la medición de DDL. Los resultados de este experimento pudieron comprobar el impacto positivo que tiene la presencia de componentes bióticos en los sedimentos del río Oise.

El último experimento de adsorción se desarrolló con un set de matraces, con distintas concentraciones iniciales y con tres disposiciones de sedimentos de río, sedimentos esterilizados, sedimentos con componentes bióticos y un extracto de bacterias de los sedimentos, donde se verificó la idea de que la adsorción biótica es más rápida y de mayor proporción que en las otras disposiciones de los sedimentos del río. Los modelos de isothermas de adsorción desarrollados fueron el modelo de Langmuir y el modelo de Freundlich, en donde el primero presentó menores errores y mayor correlación con los datos obtenidos de forma experimental, esto quiere decir, que la energía de adsorción no depende del grado de ocupación de las partículas y que el glicerol es utilizado como fuente de carbono para el componente biótico de los sedimentos del río. Se analizaron además, dos modelos de biosorción, de primer y segundo orden. Ambos mostraron buenos resultados con respecto a las mediciones experimentales, pero el modelo más complejo, de segundo orden, refleja mejor las condiciones de adsorción de los sedimentos bióticos.

En el ámbito del estudio de secuencias del gen 16S rRNA, para análisis taxonómicos de las bacterias provenientes de los sedimentos del río Oise, se encontró un aumento de la presencia de *Cianobacterias* (21,4%) y una disminución del filo *Bacteroidetes* (11,3%). El crecimiento de *Cianobacterias* puede generar impactos negativos en el ecosistema del río, sin embargo, es necesario un estudio más exhaustivo para determinar qué tipo de impacto existe y la toxina relacionada a la bacteria. En el caso de la disminución de *Bacteroidetes*, se puede considerar como un beneficio, debido a que este filo de bacterias suelen actuar como patógenos.

Abstract

The present research was part of a multidisciplinary project between the UTC (Université de Technologie de Compiègne), the ESCOM (Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale) and INERIS (Institut National Environnement Industriel et Risques) that has as an objective to find analysis tools to predict the impact of organic molecules produce by the biorefinery industry in the sediments of the Oise river, in the city of Compiègne, France.

To describe the behavior of contaminants in the sediments of the river, a contaminant was chosen associated to the biodiesel industry, the molecule selected was glycerol, principal coproduct in the production of biodiesel. The measure of glycerol's concentrations was made using a fast and off-line method, combining two reactions that produces a yellow contaminant, which absorbance can be measure using a spectrophotometer.

In the development of the adsorption's experiments, two methods of sterilization of soil sediments were analyzed, sterilization by autoclave and using UV radiation, where the sterilization using autoclave showed better results, checked by the null growth of bacteria through the CFU counting (colony-forming units) and the low reduction of the agent of cellular viability PrestoBlue™.

Three experiments were developed to describe the adsorption of glycerol into the soil sediments of Oise River. The first experiment, with an initial concentration of 0,1 [mol/L] presented significantly errors between the samples due to the DDL's sensibility, but it did show the firsts differences between the adsorption with sterilized soil sediments (abiotic) and those not sterilized (biotic), where the glycerol's reduction reaches a 60% in biotic conditions. For the development of the second experiment the initial concentration of glycerol was reduced in 90%, considering an appropriated recuperation from the biodiesel production and besides a reduction of the sample's errors increasing the sensibility of DDL measure. The results of this experiment were able to check the positive impact that the biotic compound has on the adsorption.

The last experiment of adsorption was developed with a set of flasks with different initial concentrations and with three soil sediments disposition, soil with biotic compound, sterilized soil and an extract of bacteria, were the idea that biotic adsorption is faster and with a bigger proportion that in others soils disposition. The adsorption models developed were the Langmuir model and the Freundlich model, were the first presented minor errors and bigger correlation with experimental data, which means, that the adsorption energy does not depend on the occupation of the particles. Also, two models of bio-sorption were analyzed, first and second order. Both showed good results comparing with the experimental data, but the complex model, second order, shows better conditions of adsorption in the biotic sediments.

In the field of the study of sequences of the gen 16S rRNA for the taxonomic analysis of the bacteria coming from the Oise River was found an increase of the presence of *Cianobacteria* (21,4%) and a diminution of the phylum *Bacteroidetes* (11,3%). The growth of *Cianobacteria* can cause negative impacts in the river's ecosystems, however is necessary to have a deeper studies of the impact and the toxine related to the bacteria. In the case of the diminution of *Bacteroidetes*, it can be considered as a benefit due that the bacteria from this phylum acts like a pathogen in most cases.

Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen	3
Abstract.....	5
Índice	7
Índice de Figuras	11
Índice de Tablas.....	12
1. Introducción.....	14
2. Hipótesis	17
2.1. Objetivos	17
2.1.1. Objetivos Generales.....	17
2.1.2. Objetivos Específicos	17
3. Marco Teórico	18
3.1. Bio-refinería.....	18
3.1. Elección de glicerol.....	19
3.2. Adsorción.....	21
3.3. Parámetros de Operación	23
3.4. Isotermas de adsorción.....	25
3.5. Tipos de isotermas	26
3.6. Modelos teóricos de equilibrio de adsorción	29
3.6.1. Modelo de Langmuir	29
3.6.2. Modelo de Freundlich.....	30

3.6.3.	Adsorción biótica.....	31
3.7.	Disposición experimental Sistemas Batch	35
3.8.	Esterilización de suelos.....	37
3.8.1.	Esterilización con autoclave	37
3.8.2.	Esterilización UV	38
3.8.3.	Conteo bacteriano (UFC).....	38
3.8.4.	Prestoblue™ Agente de viabilidad celular	39
3.9.	Secuenciación de ADN	40
4.	Procedimientos Experimentales	44
4.1.	Esterilización de suelos.....	44
4.1.1.	Metodología.....	44
4.1.2.	Materiales	44
4.1.3.	Procedimiento.....	44
4.2.	Detección de glicerol acuoso	47
4.2.1.	Metodología.....	47
4.2.2.	Materiales	47
4.2.3.	Procedimiento.....	48
4.3.	Experimento N°1 (Concentración inicial 0,1 [mol/L])	49
4.3.1.	Metodología.....	49
4.3.2.	Materiales	49
4.3.3.	Procedimiento.....	49
4.4.	Experimento N°2 (Concentración inicial 0,01 [mol/L])	51
4.4.1.	Metodología.....	51

4.4.2.	Materiales	51
4.4.3.	Procedimiento	51
4.5.	Experimento N°3 (Set Batch)	53
4.5.1.	Metodología.....	53
4.5.2.	Materiales	54
4.5.3.	Procedimiento.....	54
4.6.	Extracción de ADN de sedimentos del río.....	56
4.6.1.	Materiales	56
4.6.2.	Procedimiento.....	56
5.	Resultados.....	59
5.1.	Resultados secuenciación de ADN	59
5.1.1.	Generación tabla OTU.....	59
5.1.2.	Diversidad Tipo Alpha	60
5.1.3.	Diversidad Tipo Beta.....	62
5.1.4.	Análisis Taxonómico.....	64
5.2.	Resultados esterilización de suelos.....	68
5.2.1.	Muestras de sedimentos de río.....	68
5.2.2.	Resultados UFC.....	68
5.2.3.	Resultados PrestoBlue™ Agente.....	70
5.3.	Resultados experimentación Batch.....	74
5.3.1.	Resultados Experimento N°1	74
5.3.2.	Resultados experimento N°2	77
5.3.3.	Resultados experimento N°3	80



6. Conclusión	90
7. Proyecciones	92
Bibliografía	93
Anexos	97
Anexo N°1: Análisis Taxonómico.....	97
Anexo N°2: Resultados Experimento N°1	101
Anexo N°3: Resultados Experimento N°2	103
Anexo N°4: Resultados Experimento N°3	105

Índice de Figuras

Ilustración 1: Muestras de sedimentos del río Oise.	15
Ilustración 2: Ubicación Oleon Francia. Mapas Google.	15
Ilustración 3: Disposición empresa Oleon y río Oise, Francia. Mapas Google.	16
Ilustración 4: Reacción de transesterificación base de la producción de biodiesel a partir de aceite.....	19
Ilustración 5: Estructura de glicerol.....	20
Ilustración 6: Diferentes procesos de sorción.....	21
Ilustración 7: Clasificación de las isotermas y representación de los diferentes subgrupos de isoterma de adsorción (adaptado de Giles et al., 1960).....	27
Ilustración 8: Proceso de esterilización UV.	45
Ilustración 9: Reacción Malaprade.	47
Ilustración 10: Reacción Hantzsch.	47
Ilustración 11: Reacción de DDL, coloración amarilla.	48
Ilustración 12: Disposición experimento N°3	53
Ilustración 13: Diagrama de disposición de matraces experimento N°3.....	55
Ilustración 14: Gráficos diversidad Alpha por grupo de muestras. DNA Vision	60
Ilustración 15: Gráficos diversidad Alpha por muestras. DNA Vision	61
Ilustración 16: Diversidad Beta. Unweighted_UNIFRAC.	62
Ilustración 17: Diversidad Tipo Beta. Weighted_UNIFRAC	63
Ilustración 18: Ejemplo de efectos de las Cianobacterias.	66
Ilustración 19: Porcentaje de reducción PrestoBlue™ Agente.....	73
Ilustración 20: Curva de calibración de glicerol.....	74
Ilustración 21: Gráfico Adsorción de glicerol acuoso en el tiempo. Experimento N°1.	75
Ilustración 22: Gráfico de porcentaje de remoción de glicerol acuoso. Experimento N°1 ..	76
Ilustración 23: Curva de calibración glicerol acuoso. Experimento N°2	77
Ilustración 24: Gráfico Adsorción de glicerol acuoso en el tiempo. Experimento N°2.	78
Ilustración 25: Gráfico de porcentaje de remoción de glicerol acuoso. Experimento N°2. .	79
Ilustración 26: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,0025 [mol/L]. Experimento N°3....	80



Ilustración 27: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,005 [mol/L]. Experimento N°3.....	81
Ilustración 28: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,0075 [mol/L]. Experimento N°3....	81
Ilustración 29: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,01 [mol/L]. Experimento N°3.....	82
Ilustración 30: Gráfico Modelo Langmuir - Abiótico. Experimento N°3	83
Ilustración 31: Gráfico Modelo Langmuir - Biótico. Experimento N°3	83
Ilustración 32: Gráfico Modelo Langmuir - Extracto de bacterias. Experimento N°3.....	84
Ilustración 33: Gráfico Modelo Freundlich - Abiótico. Experimento N°3.....	85
Ilustración 34: Gráfico Modelo Freundlich - Biótico. Experimento N°3.....	86
Ilustración 35: Gráfico Modelo Freundlich - Extracto de Bacterias. Experimento N°3	86
Ilustración 36: Modelo Biosorción -Primer orden. Experimento N°3.	88
Ilustración 37: Modelo Biosorción - Segundoorden. Experimento N°3.	88

Índice de Tablas

Tabla 1: Método de secuenciación de ADN. DNA Vision.....	40
Tabla 2: Contenido PowerMax® Soil DNA Isolation Kit.....	56
Tabla 3: Resumen lectura de muestras. DNA Vision.	59
Tabla 4: Número de lecturas por muestras. DNA Vision	59
Tabla 5: Variación porcentual de organismos	64
Tabla 6: Evolución peso de muestras de sedimentos de río.	68
Tabla 7: Cantidad de unidades formadora de colonia por placa.....	69
Tabla 8: Resultados UFC.....	69
Tabla 9: Medición de absorbancia a 570 [nm]	70
Tabla 10: Medición de absorbancia a 600 [nm]	70
Tabla 11: Normalización de datos de absorbancia	71
Tabla 12: Valores corregidos de absorbancia.....	71
Tabla 13: Coeficientes de extinción molar del agente PrestoBlue™	72
Tabla 14: Porcentaje de reducción de muestras.....	72
Tabla 15: Parámetros regresión lineal modelo Langmuir. Experimento N°3.	84



Tabla 16: Parámetros Modelo Langmuir. Experimento N°3.....	84
Tabla 17: Parámetros regresión lineal modelo Freundlich Experimento N°3.....	87
Tabla 18: Parámetros Modelo Freundlich Experimento N°3.	87
Tabla 19: Parámetros Modelo de Biosorción. Experimento N°3.	89
Tabla 20: Resultados taxonómicos extracción de ADN.	100
Tabla 21: Curva de calibración. Experimento N°1.....	101
Tabla 22: Absorbancia DDL de las muestras. Experimento N°1	101
Tabla 23: Concentración de glicerol de las muestras. Experimento N°1.	102
Tabla 24: Porcentaje de reducción de glicerol acuoso. Experimento N°1	102
Tabla 25: Absorbancia DDL de las muestras. Experimento N°2	103
Tabla 26: Concentración de glicerol de las muestras. Experimento N°2.	104
Tabla 27: Porcentaje de reducción de glicerol acuoso. Experimento N°2.	104
Tabla 28: Absorbancia DDL de las muestras. Experimento N°3	105
Tabla 29: Datos Modelo Langmuir. Experimento N°3.	106
Tabla 30: Datos Modelo Freundlich. Experimento N°3.....	107
Tabla 31: Datos Modelos Biosorción. Experimento N°3.	108

1. Introducción

El desarrollo de esta investigación se inscribe en el contexto de un proyecto multidisciplinario entre la UTC (Université de Technologie de Compiègne), la ESCOM (Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale) y el INERIS (Institut National Environnement Industriel et Risques) que busca combinar diferentes enfoques, para proponer nuevas herramientas de análisis fisicoquímicas, toxicológicas y eco-toxicológicas en la predicción del impacto de moléculas de origen orgánico en los sedimentos de un río (Proyecto OSIRIS : Herramientas innovadoras para acompañar el control de riesgos medioambientales ligados a la bio-refinería).

El desarrollo de los experimentos se realizó en el laboratorio TIMR (Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable) ubicado en el Centro de Investigaciones de la Université de Technologie de Compiègne, en la ciudad de Compiègne ubicada a 65 kilómetros al norte de París, Francia.

El trabajo se dividió en dos partes, el análisis de variación microbiológica de los sedimentos de río y por otro lado el análisis del impacto de moléculas originarias de la industria de la bio-refinería en los sedimentos del río Oise.

Para la primera parte se realizaron extracciones de ADN de todas las muestras y se analizaron las variaciones biológicas entre éstas. En el desarrollo de la segunda parte del proyecto se realizó un análisis de adsorción utilizando sistemas batch con muestras de sedimentos del río. Este tipo de experimento puede ser utilizado como base para futuros análisis de contaminantes orgánicos encontrados en el río, al ser un proyecto multidisciplinario el análisis de contaminantes típicos del agua del río producto de la industria del biodiesel fue analizado por otro grupo de trabajo por lo cual este proyecto se realizó utilizando como molécula el glicerol (principal co-producto de la bio-refinería).

Se utilizaron cuatro muestras de sedimentos del río Oise (Francia), dos tomadas río arriba y dos río abajo, muestreo realizado el 31 de noviembre del 2015, previo al inicio de esta investigación. Con el análisis de estas muestras se busca conocer el impacto de moléculas de

origen biológico provenientes de la bio-refinería y además estudiar la variación de la diversidad microbológica y el impacto que existe con el derrame de compuestos industriales.



Ilustración 1: Muestras de sedimentos del río Oise.

Como se mencionaba anteriormente, se utilizaron cuatro muestras obtenidas del río Oise. Las muestras río arriba presentaban una gran cantidad de rocas y la muestra era más bien arenosa, mientras que las muestras río abajo eran arcillosas. Todas las muestras fueron tamizadas utilizando un tamiz de 2 [mm] y homogeneizadas para luego ser almacenadas a 4 [°C]. El lugar de obtención de las muestras fueron río arriba y río abajo de la empresa Oleon (Novance ex Robbe en Compiègne).



Ilustración 2: Ubicación Oleon Francia. Mapas Google.



Ilustración 3: Disposición empresa Olean y río Oise, Francia. Mapas Google.

2. Hipótesis

Un estudio de adsorción de los sedimentos del río Oise permitirá modelar el comportamiento de los sedimentos en presencia de contaminantes orgánicos provenientes de la industria de la bio-refinería y comparar las capacidades de adsorción de los sedimentos sometidos a esterilización versus aquellos con presencia biótica.

Debido a la naturaleza de los contaminantes orgánicos provenientes de la industria de la bio-refinería se espera que los impactos negativos sobre la biota de los sedimentos del río sean de bajo impacto.

2.1.Objetivos

2.1.1. Objetivos Generales

Obtener parámetros de adsorción de contaminantes orgánicos provenientes de la industria de la bio-refinería en los sedimentos del río Oise.

Conocer el impacto que tienen los contaminantes orgánicos sobre el componente biótico de los sedimentos, a través de un estudio de ADN de las muestras.

2.1.2. Objetivos Específicos

Conocer los parámetros de adsorción de glicerol de los sedimentos del río Oise a través de isothermas de adsorción

Conocer parámetros cinéticos preliminares realizando experimentos del tipo Batch.

Encontrar el método más adecuado para la esterilización de sedimentos de río.

Encontrar las bacterias afectadas por la presencia de contaminantes orgánicos en los sedimentos del río y estudiar el efecto en ellas.

3. Marco Teórico

3.1. Bio-refinería

Una bio-refinería es una instalación que integra un proceso productivo de conversión de biomasa para producir combustible, energía y/o químicos con valor agregado desde la materia orgánica. El concepto de bio-refinería es análogo a las refinerías tradicionales que producen combustibles y diversos productos a partir del petróleo. El objetivo de la bio-refinería es obtener todo el valor agregado de los stocks de biomasa con poca pérdida energética y baja producción de residuos, esto le permite a la industria ser competitiva frente las refinerías tradicionales, debido a la disminución significativa de los impactos medioambientales. (Demirbas, 2010)

El biodiesel y el bioetanol son los biocombustibles que han alcanzado un mayor grado de desarrollo y de sustitución de combustibles fósiles, y se producen en las llamadas, biorefinerías. La producción industrial de biodiesel se realiza de forma principal a partir de aceites obtenidos de vegetales oleaginosos, mediante un proceso de transesterificación de los triglicéridos utilizando metanol y NaOH o KOH como catalizadores. El biodiesel es una mezcla de ésteres obtenidos por la transesterificación de triglicéridos con un alcohol de cadena corta, generalmente metanol o etanol. Existen varias alternativas en la producción del biocombustible, pero en forma general, las etapas son: acondicionamiento de materia primas, esterificación (eliminación de ácidos grasos libres), transesterificación (utilizando alcohol y catalizadores) y por último la separación de la glicerina y la depuración del biocombustible. (Botella, Bimbela, Ábrego, Gonzalo, & Sánchez, 2014).

Dentro del proceso de la producción de éste biocombustible es fundamental la separación de la glicerina o glicerol debido a que las normas internacionales permiten sólo bajas concentraciones de éste compuesto en el biodiesel. Tanto la norma ASTM D6751 y la EN (Norma Europea) 14214 establecen que el porcentaje máximo de glicerol asociado al biodiesel debe estar entre 0,24-0,25%. (Vera, y otros, 2011)

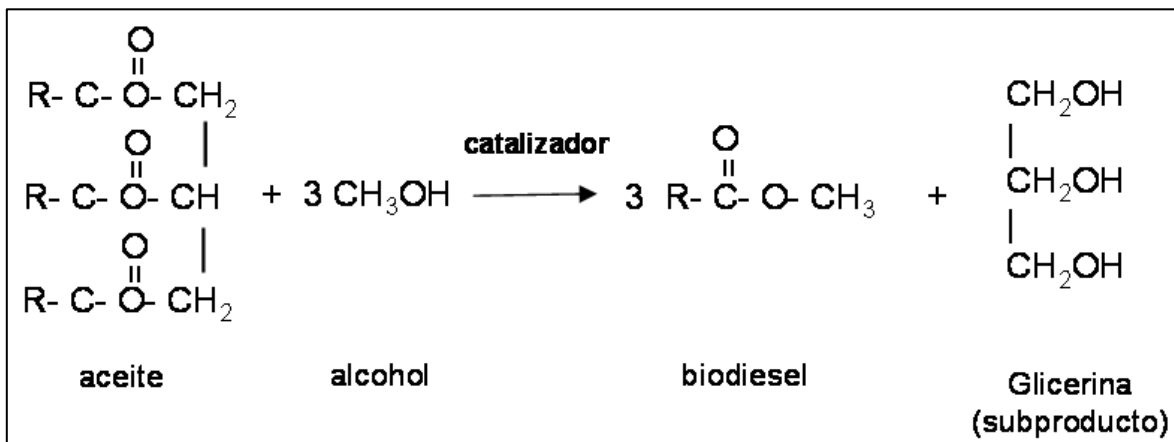


Ilustración 4: Reacción de transesterificación base de la producción de biodiesel a partir de aceite

La Unión Europea es el mayor productor de biodiesel del mundo. El biodiesel es el biocombustible más importante de esta región del mundo, y en términos energéticos, representa el 80% del mercado de los biocombustibles. El biodiesel fue el primer biocombustible desarrollado y utilizado en la Unión Europea, con énfasis en el sector del transporte a partir de la década del 90'. La gran expansión de este biocombustible se debe al aumento de los precios del petróleo, por acuerdos políticos e incentivos a través de impuestos principalmente de países como Alemania y Francia, los países con mayor producción del biocombustible en la zona. (Flach, Lieberz, Rondon, Williams, & Teiken, 2015)

3.1. Elección de glicerol

Para el estudio del comportamiento de los sedimentos del río Oise se escogió entre potenciales moléculas que podrían estar en las aguas del río, provenientes de la industria de la bio-refinería, entre las cuales se encuentra el glicerol, el ácido succínico, el ácido adípico y triglicéridos, entre otros. La molécula a elección fue el glicerol pues es uno de los principales co-producto del proceso de la formación de biodiesel, y una de las metas del proyecto es acerca de contaminantes provenientes de éste tipo de industria (bio-refinería). El método de medición de la molécula en medio acuoso también fue fundamental para la elección de ésta, que debía ser un método rápido y con resultados inmediatos.

Dentro de este contexto es que se elige al glicerol como la molécula de estudio para los estudios de adsorción. En la Unión Europea debido al aumento de producción de biodiesel los productores tienen severos problemas en disponer del exceso de glicerol y su disposición también tiene un gran impacto económico (Da Silva, Mack, & Contiero, 2009)

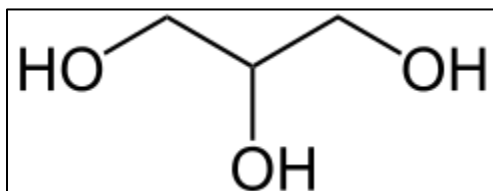


Ilustración 5: Estructura de glicerol.

El glicerol o glicerina ($C_3H_8O_3$) es un alcohol con tres grupos hidroxilos, es un compuesto líquido a temperatura ambiental, y es uno de los componentes esenciales de los lípidos, es higroscópico e inodoro, posee un gran coeficiente de viscosidad y tiene un sabor dulce. El glicerol es parte de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo al ciclo de Krebs y también es un producto intermedio de la fermentación alcohólica.

Esta molécula puede cruzar la membrana citoplasmática por difusión pasiva. Varios microorganismos son capaces de crecer anaeróbicamente con glicerol como la única fuente de carbono y de energía. Si bien no tiene gran toxicidad en el medio ambiente, su disposición en grandes volúmenes debe ser controlada.

Los métodos estándares de determinación de glicerol acuoso es a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), este método no tan solo involucra altos costos financieros sino que también ocupa mucho tiempo (Liu, Musuku, Adhikari, & Fernando, 2009). En el desarrollo de este proyecto se utilizó una forma más simple de análisis de concentración de glicerol acuoso, descrito en los procedimientos experimentales.

3.2. Adsorción

La adsorción es un fenómeno de origen físico y química de gran importancia debido a las aplicaciones existentes en la industria química, es un proceso de separación de uno o más componentes de un sistema sobre una superficie sólida o líquida.

La adsorción es la transferencia de un soluto en un gas o un líquido (adsorbato) hacia la superficie de un sólido (adsorbente) en donde el soluto es retenido como resultado de las atracciones intermoleculares con las moléculas sólidas. Entre las aplicaciones comunes de este fenómeno se encuentran: purificación de aguas, eliminación de olores, sabores o colores no deseados de soluciones como aceites o jarabes de azúcar, se utiliza también en la deshumidificación de gasolinas y en la purificación de aire. La mayor parte de los adsorbentes son materiales altamente porosos y la adsorción tiene lugar fundamentalmente en el interior de las partículas, sobre las paredes de los poros en puntos específicos. La separación se produce a que diferencias de peso molecular o de polaridad dan lugar a que partículas se adhieran más fuertemente a la superficie que otras. En diversas ocasiones, el componente adsorbido se fija de tal forma que permite una separación completa de éste desde un fluido. (McCabe, Smith, & Harriot, 1991)

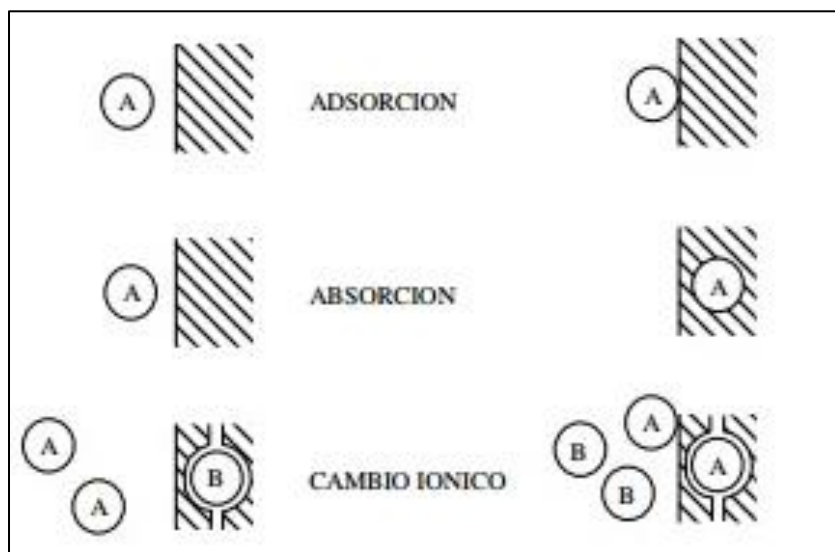


Ilustración 6: Diferentes procesos de sorción.

La adsorción de una especie depende no sólo de la composición del adsorbente, en este caso los sedimentos de río, sino que también depende del especie química se adsorbe, su naturaleza y la concentración en la solución.

Mediante un análisis de lo que sucede en el medio ambiente se puede inferir que cuando los componentes solubles se encuentran en ambientes acuosos toman contacto e interaccionan con materiales biológicos de 2 formas: se unen a la pared celular en un proceso llamado bioadsorción o biosorción y también pueden acumularse en el interior de las células en un proceso llamado bioacumulación. La bioadsorción es definida como un proceso de concentración de adsorbato y el prefijo “bio” hace referencia a que el adsorbente es de origen biológico o bien, tiene asociado a su superficie, materiales biológicos. Por lo tanto, la superficie de adsorción tiene una composición química-biológica determinada que depende de la naturaleza del adsorbente. El proceso de bioacumulación implica una primera etapa de biosorción y luego le siguen otras etapas que se relacionan con el transporte activo del contaminante a través del metabolismo celular que implica un consumo energético asociado para las células, además este proceso puede conllevar a un aumento de la concentración de células si el componente sirve como fuente de energía para las células. (Plaza Cazón, 2012)

Mecanismo de la cinética:

- Desplazamiento de los iones metálicos desde la solución hasta la capa exterior alrededor de la partícula
- Difusión externa, desplazamiento desde la capa exterior hasta la superficie del adsorbente
- Difusión intraparticular, donde el soluto se desplaza desde la superficie externa hacia el sitio de adsorción al interior de la partícula
- Adsorción sobre los sitios activos por acomplejamiento, interacción iónica o precipitación. Se considera instantánea, la adsorción es controlada por mecanismos de difusión a partir de una velocidad mínima de agitación de las partículas. (Meztanza Mateos, 2012)

3.3. Parámetros de Operación

Para estudiar los procesos de adsorción de compuestos químicos en suelo se pueden utilizar dos técnicas de laboratorio: experiencias en Batch y en columnas (proceso continuo)

Las experiencias Batch consisten en la agitación de una cantidad determinada de suelo con concentraciones de solución determinadas y las experimentaciones en columna consisten en empacar columnas con sedimentos e inyectar una solución con concentración fija de adsorbato.

- **Tiempo de contacto y tiempo de equilibrio:** El tiempo que debe permanecer en contacto el adsorbente con el adsorbato dependerá del equilibrio del sistema. El tiempo de equilibrio es una variable experimental que debe ser determinado para cualquier sistema antes de construir una isoterma de operación.

Los procesos de adsorción en interfaces sólido-líquido usualmente tienen una rápida iniciación, más reducción de soluto que decae con un ritmo constante aproximándose a una concentración constante. En algunos casos, el equilibrio es incierto.

La ambigüedad en la definición y medición de tiempos de equilibrio ha sido reconocida como un gran problema en estudios de adsorción

Es importante saber la variabilidad experimental del tiempo de equilibrio antes de que la isoterma de adsorción se construya. Los procesos de adsorción en interfaces líquido-sólido suelen iniciar de forma rápida y la reducción futura reduce con un ritmo continuo, acercándose a una concentración constante. En algunos casos el equilibrio no es claramente alcanzado (Anderson, C, Hansmann, Loux, & Stanforth, 1981)

La ambigüedad de la definición y la medición del tiempo de equilibrio han sido reconocidas como la mayor problemática en los estudios de adsorción. Para la mayoría de los sistemas que involucran adsorbentes complicados (por ejemplo: sedimentos de río) es de gran dificultad determinar cuándo el proceso de adsorción predomina y otros procesos no son de importancia (por ejemplo: penetración iónica, precipitación)

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) sugiere que el tiempo de equilibrio debe ser la cantidad mínima de tiempo necesaria para establecer una razón de cambio de concentración de soluto en la solución es igual o menor a 5% en un intervalo de 24 horas (o menos). (U. S. Environmental Protection Agency (EPA), 1985)

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} \ll 0.05$$

- **Temperatura:** La mantención de una temperatura constante es fundamental para el proceso de adsorción, ya que la temperatura controla la competencia entre el equilibrio termodinámico y la absorción limitada cinéticamente. La velocidad y el grado de sorción varía en función de la temperatura, la modificación de la temperatura puede favorecer o no el proceso para operaciones a gran escala. (Anderson, C, Hansmann, Loux, & Stanforth, 1981). Debido a que los experimentos deben emular las condiciones de temperatura del río Oise, los ensayos realizados se realizaron con una temperatura de 13 [°C], temperatura promedio del caudal del río (Pressdee, 2006).
- **Agitación:** Un sistema con agitación continua favorece el contacto del sorbente con el sorbato que incrementa el proceso de sorción.
- **Método de contacto:** Existen dos métodos de contacto: con sistema continuo y discontinuo, en lechos fijos hay mayor interacción del sólido y el líquido, mayor concentración del sorbente y el bombeo de la solución promueve la renovación continua del soluto existiendo mayor gradiente de concentración. En sistemas discontinuos el método de contacto se ve limitado a la capacidad de adsorción inicial del adsorbente.
- **Equilibrio de adsorción:** El estudio del equilibrio de adsorción permite conocer la capacidad máxima de adsorción, la cantidad definida de sorbato entre las fases.

3.4. Isotermas de adsorción

La relación de equilibrio se describe por isotermas de adsorción, curvas que relacionan la cantidad de adsorbato en la superficie del suelo y la concentración en la solución. Las isotermas también pueden ser descritas como una ecuación que relacionan la cantidad de soluto, en este caso glicerol, adsorbido hacia el suelo y la concentración de equilibrio en la solución, las isotermas pueden tomar múltiples formas. Se construyen relacionando la capacidad de adsorbente versus la concentración o presión de equilibrio de su precursor en el fluido, manteniendo constantes otras variables involucradas, como el pH, la masa de adsorbente, el tiempo de contacto de adsorción; esta relación depende fuertemente de la temperatura. (Paredes Doig, 2011)

El comportamiento de adsorción de esta investigación será modelado utilizando isotermas ampliamente reportadas en la modelación de adsorción, tanto en experimentos con método de contacto adsorbato-adsorbente constante y discontinuo. El coeficiente de correlación experimental (R^2) será esencial analizar cuál de los modelos de isotermas se acerca más a los datos experimentales. (Liu & Liu, 2008)

Las isotermas de adsorción en el sistema líquido-sólido se obtienen relacionando la cantidad de soluto adsorbido por gramo de adsorbente (q_e) versus la concentración del soluto en el equilibrio (C_e). La cantidad de glicerol adsorbido se obtiene por la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{V \cdot (C_0 - C_e)}{m}$$

Donde:

q_e es la cantidad de soluto adsorbido por masa de adsorbente en equilibrio

V es el volumen de solución

m es la masa de sedimentos

C_0 es la concentración inicial de glicerol en la solución

C_e es la concentración de equilibrio

En este caso la superficie de adsorción puede ser descrita como una superficie heterogénea con distintas energías de adsorción debido a la naturaleza del suelo, por esto, se predecir que la adsorción será del tipo no-lineal.

3.5. Tipos de isothermas

En 1960, Giles propuso una clasificación de las isothermas de adsorción en disolución, en una clasificación a partir de los mecanismos en los cuales ocurre la adsorción, esta clasificación consta de 4 tipos de isothermas, denominadas S, L, H y C, de acuerdo con la forma del comienzo de la adsorción y luego cada grupo se divide en 5 subgrupos que representa el grado de recubrimiento superficial y la forma del tramo final de las isothermas.

La clasificación realizada por Giles se dota de una base teórica sólida que justifica los tipos de comportamiento identificados y además consta de una verificación experimental amplia, lo que le ha entregado a la clasificación un respaldo por parte de la comunidad científica. (Tascón, 2013)

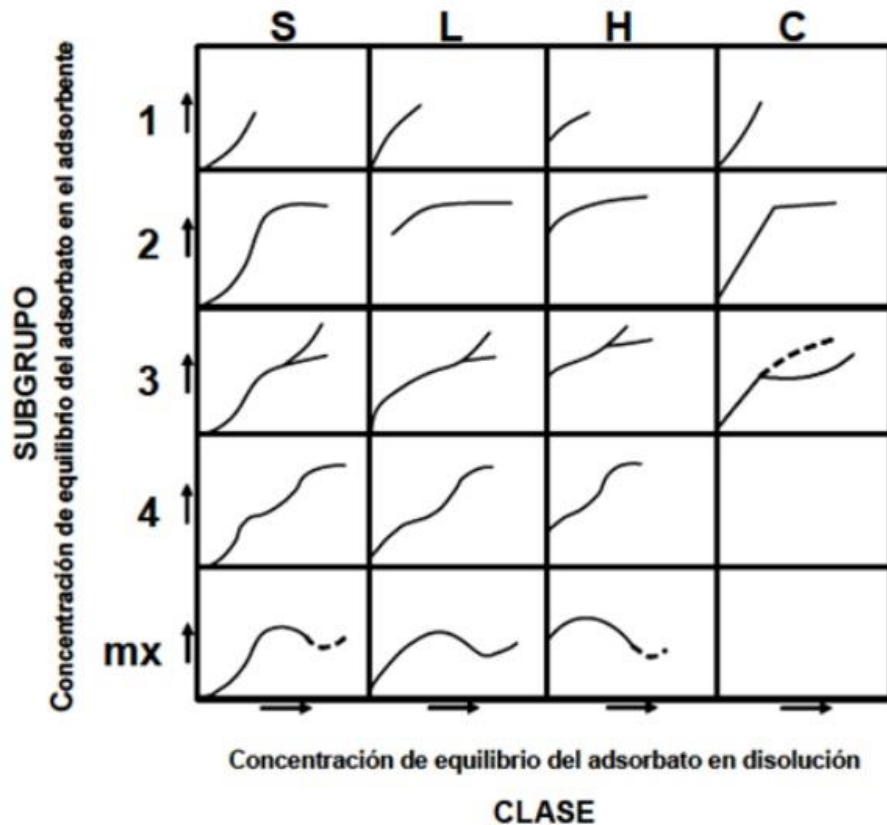


Ilustración 7: Clasificación de las isothermas y representación de los diferentes subgrupos de isoterma de adsorción (adaptado de Giles et al., 1960)

Isoterma Clase S (“S” shape): En esta clase de isothermas se presenta una adsorción cooperativa, es decir, a medida que aumenta la concentración de equilibrio, aumenta la capacidad del sólido para retener adsorbato (un aumento progresivo del a pendiente a medida que aumenta la concentración). Esto ocurre cuando se presentan tres condiciones: la molécula de adsorbato es monofuncional, con atracción intermolecular intermedia y encuentra una competencia importante por los sitios activos del sólido por parte de las moléculas del disolvente o por otras especies presentes en la disolución.

Isoterma Clase L (“Langmuir”): Son las isothermas más comunes, en donde en la medida que aumenta la concentración en equilibrio en la fase fluida, el número de sitios activos disminuye hasta llegar a una meseta que representa que el sólido ya no puede retener más adsorbato; esto implica que las moléculas de adsorbato no se adsorben orientadas

verticalmente (orientación espacial de las moléculas) o bien no hay competencia con el solvente por los sitios activos

Isoterma Clase H (“High affinity”): En este tipo de isothermas el adsorbente tiene una gran afinidad por el adsorbato lo que ocasiona que en bajas concentraciones exista una gran adsorción. Se consideran un caso especial de curvas de tipo L.

Isoterma Clase C (“Constant partition”): Las curvas tipo C se caracterizan por una proporción de sitios activos constantes, es decir, estas curvas muestran un comportamiento intermedio entre las curva tipo S y L. Este tipo de curvas se encuentran en sistemas donde el soluto penetra en el sólido más fácilmente que el solvente. Este tipo de curvas aparece en sistemas con sólidos porosos con moléculas flexibles y regiones con diferentes grados de cristalinidad, y con un soluto con más afinidad por el sólido que la penetra en regiones del sólido que todavía no haya sido alcanzado por el disolvente.

- Subgrupos

Tipo 1: El adsorbato no satura la superficie del adsorbente

Tipo 2: La superficie del adsorbente se encuentra saturada por el adsorbato. Las mesetas amplias reflejan una barrera energética que se debe vencer para producir una adsorción en nuevos sitios activos; el soluto además tiene mucha afinidad con el disolvente pero poca con las moléculas del adsorbato ya retenidas en la superficie del sólido

Tipo 3 y 4: La segunda subida y la segunda meseta se atribuyen al desarrollo de una nueva superficie susceptible de causar adsorción; puede ser debido a la capa de moléculas ya adsorbidas o bien a regiones cristalinas del sustrato en los que el soluto empieza a penetrar.

Tipo mx (mixtures): Se alcanza un punto en el cual las interacciones del tipo Van der Waals adsorbato-adsorbato sobrepasan las interacciones del tipo adsorbato-adsorbente de manera que parte del adsorbato retenido se desliga de la superficie. (Giles, MacEwan, N, & Smith, 1960)

3.6. Modelos teóricos de equilibrio de adsorción

Las isothermas más populares que ilustran este comportamiento son las isothermas de Freundlich y Langmuir que serán analizadas con los datos experimentales obtenidos de las experimentaciones de tipo batch.

Si bien las experiencias en batch no son totalmente representativas de las condiciones naturales, debido a que presentan mayor superficie específica y por ello mayor capacidad de adsorción, esta experimentación permite conocer de forma preliminar el comportamiento del adsorbato en procesos de adsorción y predecir tiempo relativo para alcanzar concentraciones de equilibrio.

Conocer la cinética de adsorción permite determinar la velocidad necesaria para alcanzar el equilibrio de adsorción y proporcionar el tiempo requerido para éste. Los modelos cinéticos describen el proceso desde el primer contacto del soluto-adsorbente hasta el tiempo en que se alcanza el equilibrio. Además se estudia la influencia de las características fisicoquímicas del adsorbente, soluto y el medio (Muñoz Carpio, 2007)

3.6.1. Modelo de Langmuir

Este modelo originalmente se utiliza para describir fase de adsorción de gas-sólido en carbón activado, pero también ha sido utilizado en adsorción agua-sólido. Se basa en los siguientes supuestos: las fuerzas de interacción entre las moléculas adsorbidas son insignificantes y una vez que una molécula ocupa un sitio de adsorción, este sitio no puede ser ocupado por otra molécula y por lo tanto, la adsorción se detiene. El modelo de Langmuir se refiere a adsorción homogénea sin migración del adsorbato, pero permite un primer acercamiento al comportamiento de adsorción de los sistemas. Sus hipótesis son:

- Adsorción en mono-capa
- La adsorción sucede en sitios específicos homogéneos
- La adsorción se detiene una vez ocupado un sitio específico
- La energía de adsorción es constante y no depende del grado de ocupación

- La capacidad de adsorción es finita
- Todos los sitios de adsorción tienen igual energía
- La superficie es homogénea
- No existe interacción entre moléculas adsorbidas y sitios vecinos.

El modelo es el siguiente:

$$q_e = \frac{Q_0 \cdot b \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e}$$

Donde

q_e es la cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso de adsorbente en estado de equilibrio [mg g^{-1}]

C_e es la concentración de equilibrio de soluto [mg L^{-1}]

Q_0 es la capacidad máxima de adsorción [mg g^{-1}]

b es la constante relacionada con la energía libre de adsorción [$\text{mg}^{-1} \text{L}$]

Para realizar un análisis de datos para este modelo se utilizará la forma lineal de la ecuación anterior.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b \cdot Q_0} + \frac{C_e}{Q_0}$$

Desde esta ecuación se puede obtener un gráfico C_e/q_e versus C_e . El valor de Q_0 y b puede ser obtenido por la pendiente e intercepto de la ecuación-

3.6.2. Modelo de Freundlich

Este modelo describe una adsorción no ideal y reversible, sin restricciones de mono-capa. Este modelo puede ser aplicado en sistemas con adsorción de multicapa y distribución de energías de adsorción no uniformes en una superficie heterogénea. Este modelo tiene algunas críticas por falta de bases fundamentales de la termodinámica, debido a que se no acerca a la

ley de Henry cuando hay concentraciones pequeñas de soluto. Sin embargo este modelo puede describir un amplio rango de experimentos y es descrito como:

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n}$$

Donde:

q_e es la cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso de adsorbente en equilibrio
[mg g⁻¹]

C_e es la concentración de equilibrio del soluto [mg L⁻¹]

K_f es una constante que indica la capacidad de adsorción del adsorbente. (Constante de isoterma de Freundlich) [mg g⁻¹]

n es una constante de intensidad de adsorción.

Este modelo ha sido aplicado en sistemas heterogéneos especialmente para compuestos orgánicos. Su forma lineal para este modelo es:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$$

Desde donde se puede obtener la constante de isoterma de Freundlich (K_F) y la constante n graficando $\log q_e$ versus $\log C_e$ (pendiente e intercepto). La pendiente varía entre cero y uno, y es una medida de la intensidad de adsorción, volviéndose más heterogéneo cuando se aproxima a cero.

3.6.3. Adsorción biótica.

Para el análisis de adsorción biótica se asuma que la cantidad de soluto adsorbido hacia el suelo es constante obtenido en la parte del experimento abiótico. En este caso la adsorción hacia la parte biótica del suelo es expresa como la diferencia entre la concentración inicial y la concentración de equilibrio de glicerol obtenida de los datos de los experimentos en condiciones abióticas, es decir, la adsorción del suelo abiótico no cambia.

$$C_{b,t} = C_0 - C_{e,t}$$

Donde:

$C_{b,t}$ concentración biótica [mg L^{-1}] (cantidad de glicerol bio-adsorbido por la parte biótica del suelo en tiempo t)

C_0 concentración inicial de glicerol [mg L^{-1}]

$C_{e,t}$ concentración de equilibrio [mg L^{-1}] de glicerol en la parte abiótica del suelo en tiempo t .

La cantidad adsorbida por la parte biótica del suelo en un tiempo t puede ser encontrada asumiendo que la cantidad adsorbida por la parte abiótica no cambia en la solución con suelo biótico:

$$q_c = \frac{V \cdot (C_0 - C_e)}{m}$$

Donde:

q_c es la cantidad de soluto adsorbido por todo el suelo (biótico y abiótico) [mg g^{-1}]

V es el volumen de solución [L]

m es la masa del suelo [g]

C_0 es la concentración inicial de glicerol [mg L^{-1}]

C_e es la concentración de glicerol en equilibrio en tiempo t [mg L^{-1}].

De la ecuación anterior se puede encontrar la adsorción de glicerol de la parte abiótica y biótica, desde los datos experimentales del experimento con sedimentos abióticos se puede encontrar fácilmente la relación para encontrar solo los datos de la parte biótica del suelo.

$$q_{b,t} = q_c - q_e$$

Donde:

q_b es la cantidad de soluto adsorbido por la parte biótica de la solución en el tiempo t [mg g^{-1}]

q_c es la cantidad de soluto adsorbido por todo el suelo (biótico y abiótico) [mg g^{-1}]

q_e es la cantidad de soluto adsorbido por la parte abiótica del suelo en la solución (se obtiene a partir de datos experimentales de adsorción abiótica) [mg g^{-1}]

Dos tipos de modelos cinéticos han sido ampliamente utilizados para describir el equilibrio de la bio-adsorción.

El primer modelo expresa una cinética de primer orden, también llamada Lagergren ecuación, es apropiada para mecanismos de primer orden y tiene la siguiente formulación (Ru-Ling, Feng-Chin, & Ruey-Shin, 2010):

$$\frac{dq_{b,t}}{dt} = k'_1(q_{b,e} - q_{b,t})$$

Donde:

$q_{b,t}$ es la cantidad de soluto adsorbido por la parte biótica en el tiempo t [mg g^{-1}]

$q_{b,e}$ es la cantidad de soluto adsorbido por la parte biótica en equilibrio [mg g^{-1}]

k'_1 es la constante cinética [min^{-1}]

La ecuación anterior, luego de integrarla se obtiene una expresión logarítmica, y la constante cinética se puede obtener graficando la diferencia de cantidades adsorbidas versus el tiempo.

$$\ln(q_{b,e} - q_{b,t}) = \ln q_{b,e} - k'_1 t$$

Un modelo de cinética de segundo orden también puede describir modelos de bio-adsorción y ha sido utilizado para analizar datos de esta naturaleza en varios experimentos. El orden de reacción de este modelo y su descripción se obtiene a partir de datos experimentales.

$$\frac{dq_{b,t}}{dt} = k'_2(q_{b,e} - q_{b,t})^2$$

Donde:

$q_{b,t}$ es la cantidad de soluto adsorbido por la parte biótica de la solución en tiempo t [mg g^{-1}]

$q_{b,e}$ es la cantidad de soluto adsorbido por la parte biótica en equilibrio [mg g^{-1}]

k'_2 es la constante cinética [min^{-1}]

La forma integrada de la ecuación anterior es:

$$\frac{1}{(q_{b,e} - q_{b,t})} = \frac{1}{q_{b,e}} + k'_2 t$$

A partir de esta ecuación se puede obtener la constante de cinética que es representada por la pendiente del gráfico $1/(q_{b,e} - q_{b,t})$ versus el tiempo t .

El análisis final es dado por el comportamiento cinética del glicerol en un ambiente abiótico y biótico de sedimentos de suelo, los gráficos pueden describir qué tipo de adsorción tiene esta molécula en el suelo analizado.

3.7. Disposición experimental Sistemas Batch

Para el desarrollo de esta investigación se realizaron tres disposiciones de sistemas por lotes o Batch con las siguientes disposiciones:

- Concentración inicial 0,1 [mol/L]: Se realizaron dos disposiciones: abiótico (con sedimentos de río esterilizados) y con sedimentos bióticos (en duplicado). Se hicieron mediciones por 24 horas.
- Concentración inicial 0,01 [mol/L]: Se utilizó una concentración de la décima parte de la utilizada anteriormente bajo la suposición que la recuperación previa a la disposición de residuos es de mínimo 90%, por lo cual lo dispuesto en el río es de menor concentración. Se hicieron mediciones por 24 horas, no lo suficientes para alcanzar un equilibrio de concentración, pero sí para disminuir los errores de las curvas de medición.
- Set de experimentos: Para tener mejores resultados sobre los modelos de adsorción y la cinética de adsorción se realizó una muestra con cuatro concentraciones iniciales desde 0,0025 hasta 0,01 [mol/L], la disposición de los matraces fue de: suelo abiótico (estéril), biótico (en duplicado) y una muestra conteniendo una extracción de bacterias del suelo. Con estos resultados se puede construir los modelos cinéticos y de adsorción por completo. Las mediciones se realizaron durante 10 días.

El procedimiento Batch se debe hacer con una agitación constante permitiendo la adsorción de equilibrio en el tiempo suficiente. La aplicación de velocidad de agitación permite una mayor área de contacto del glicerol con el sedimento del río. Los contenedores deben estar cerrados apropiadamente para evitar fluctuaciones. Para emular las condiciones climáticas del río Oise es que este experimento se realizó con una temperatura de 13 [°C], temperatura promedio del caudal del río (Pressdee, 2006).

Este experimento permite predecir el tiempo de concentración de equilibrio para la adsorción de glicerol y muestra el comportamiento del glicerol acuoso.

$$\% \text{ GR} = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \cdot 100$$

Donde:

%GR: Porcentaje de remoción de glicerol

C_i : Concentración inicial de concentración de glicerol acuoso

C_e : Concentración de equilibrio de glicerol acuoso.

El tiempo de evaluación de este experimento depende del tiempo de equilibrio de cada set de experimentos. Dada las características del glicerol: un gran número de microorganismos son capaces de crecer anaeróbicamente con el glicerol como única fuente de carbón y de energía, se infiere que los tiempos de adsorción del compuesto no serán mayores. Todos los experimentos se realizaron considerando una velocidad de agitación de 120 [rpm], utilizada en experimentos de adsorción de glicerol desde aguas de lavado de biodiesel (Liu, Musuku, Adhikari, & Fernando, 2009)

3.8.Esterilización de suelos

La esterilización de suelos es un procedimiento común para obtener controles abióticos que permiten comparar y evaluar los procesos biológicos que afectan al suelo. El control abiótico permite mostrar la descontaminación del suelo por otros mecanismos aparte de la descontaminación biológica, como descontaminación química o física.

Existe un sinnúmero de dificultades asociadas a los procedimientos de esterilización de suelo, especialmente si las cantidades de masa son grandes; con muestras pequeñas es más fácil alcanzar una esterilización completa (Trevors, 1996). Una de las mayores complicaciones de los procedimientos de esterilización es la posible alteración de los componentes estructurales del suelo, cambios en la estructura química de componentes orgánicos del suelo o la estructura física de éste que puede tener repercusiones en los experimentos (Berns, y otros, 2008). La cantidad de agua en el suelo y las características químicas también definen el rango biológico del suelo (Acosta Peñaloza, Palacios Rincón, & Carvajal Restrepo, 2003).

Los sedimentos para los experimentos de tipo abióticos deben ser esterilizados, es importante no cambiar las propiedades del suelo y solo eliminar la parte biótica de éste, actualmente la utilización de autoclave y radiación del tipo gamma son los procedimientos comunes para la esterilización. La esterilización con radiación gamma tiene un impacto mínimo en las propiedades del suelo utilizando ^{60}Co , usualmente existen instalaciones especialistas que realizan este procedimiento.

Debido a la dificultad de obtener muestras de suelo esterilizadas es que se realizaron experimentos para determinar la mejor forma de esterilización para utilizar en los casos abióticos. Se barajaron dos formas de esterilización, por autoclave y con radiación UV (ambas disponibles en el laboratorio), y para la determinación del mejor método se realizaron tres formas de comprobación de esterilización (conteo UFC y kit de viabilidad PrestobluTM)

3.8.1. Esterilización con autoclave

Este procedimiento es ampliamente utilizado como método de esterilización. El procedimiento común es autoclavar el suelo a 121 [°C] con una presión de 1.1 [atm] por un

mínimo entre 20 y 30 minutos. El período de tiempo debe aumentar para mayores muestras de suelo, se recomienda que para cantidades mayores de 500 [g] de muestra el proceso debe ser de al menos 1 hora (Alef & Nannipieri, 1995)

El suelo puede ser autoclavado en contenedores de vidrio, placas Petri o bandejas de acero inoxidable con tapa. Los contenedores pueden ser cubiertos con papel aluminio, el suelo se debe extender en una capa delgada (menor a 2 [cm]) para permitir la entrada de vapor durante el proceso de esterilización. La muestra no debe estar saturada con agua, suelo secado al aire o suelo con un contenido bajo de agua permitirá una mejor esterilización. (Trevors, 1996)

3.8.2. Esterilización UV

La luz ultravioleta (UV) consiste en luz con longitud de onda entre 40 y 390 [nm], longitud de onda en el rango entre 220-280 [nm] son conocidas por tener un efecto óptimo en la inhibición de bacterias (Laroussi & Leipold, 2004). El principal mecanismo letal del efecto letal de la radiación UV en bacterias es por la capacidad de absorción de radiación hacia el ADN, causando distorsiones e interferencias de éste. El resultado final del impacto de esta radiación es la inhibición de la síntesis de ADN, inhibición del crecimiento y la respiración celular. Este método es igualmente efectivo en bacterias Gram (+) y bacterias Gram (-). Una de las grandes desventajas de este tipo de esterilización es que la radiación no tiene grandes rangos de penetración, por lo que las muestras y organismos deben estar directamente expuesto a la radiación.

3.8.3. Conteo bacteriano (UFC)

Hay muchas formas de determinar el número de microorganismos presentes en una muestra de suelo, de forma directa o indirecta. Para determinar el número total de microorganismos heterótrofos el método de placa diluida es el más común, es una técnica indirecta de cuantificación, pero entrega una medida de la densidad biológica. Este método es simple y rápido, pero los resultados en diversas ocasiones muestran entre 10 y 100 veces menos densidad biológica que el conteo por microscopía, sin embargo, este método puede permitir la determinación de niveles de esterilización y entre este caso comparar los tipos de esterilización planteadas. Para el conteo de UFC se utilizará la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{NC \cdot \frac{1}{DF} \cdot \frac{1}{V}}{W}$$

Donde:

UFC: Unidad formadora de colonias por gramo de suelo (entre 30 y 300)

NC: Número de colonias

DF: Factor de dilución

V: Volumen en placa

W: Peso de la muestra de suelo [g]

3.8.4. Prestoblue™ Agente de viabilidad celular

Este agente ha sido desarrollada para para detectar células mediante citotoxicidad in vitro, es un agente listo para usar para evaluaciones rápidas de viabilidad y proliferación de un gran rango de tipo celular. Se basa en un compuesto llamado Resazurin (colorante azul) que se convierte a su forma reducida por la acción de enzimas mitocondriales de células viables en sistemas testeados, como consecuencia de la reducción del colorante éste cambia de color y muestra fluorescencia.

De acuerdo con el productor del kit, el agente es un ensayo no tóxico y rápido, con un corto período de incubación (10 minutos), y es también un ensayo muy sensible y puede detectar hasta al menos 12 células por muestra (Molecular Probes- Invitrogen).

3.9. Secuenciación de ADN

El uso de secuencias del gen 16S rRNA para los estudios filogenéticos y taxonómicos ha sido ampliamente utilizado por varias razones; entre las cuales se incluyen: (i) Su presencia en casi todas las bacterias, usualmente presentándose como una familia de multigenes u operones. (ii) La función del gen 16S rRNA no ha cambiado en el tiempo, sugiriendo que cambios en este gen son una forma más adecuada para la medición de especies en el tiempo, y por ende, la evolución de los genes y organismos, y (iii) el gen 16S rRNA es lo suficientemente largo para todos los propósitos informáticos que se planteen. (Janda & Abbott, 2007)

El análisis de la extracción de ADN de los sedimentos del río fue desarrollado por una compañía externa llamada DNA Vision. Seis muestras fueron analizadas en esta compañía, clasificadas en dos grupos: río arriba y río abajo (US upstream y DS downstream)

El método utilizado fue el siguiente:

Método	Descripción
Preparación librería 16S metagenómica	Amplificación de las regiones V3-V4 del rRNA 16S.
Secuenciación	Illumina MiSeq secuenciación
QIIME análisis	Análisis bio-informático

Tabla 1: Método de secuenciación de ADN. DNA Vision.

Previo al análisis por amplificación de genes se realizó un control de calidad y cantidad sobre las muestras de ADN enviadas al laboratorio, de dos formas, control de calidad con Nanogota (Nanodrop, medición de absorbancia desde 200 [nm] hasta 350 [nm], zona de relevancia para determinar la concentración y pureza de las muestras) y cantidad mediante el ensayo de cuantificación de ADNbc PicoGreen® que puede detectar de forma selectiva una cantidad tan pequeña como 25 [pg/mL] de ADNbc (bicatenario) en presencia de ADNmc (monocatenario), ARN y nucleótidos libres.

El reporte final de DNA Vision incluye los siguientes análisis y bioinformación:

- Generación de tabla OTU (unidad taxonómica operativa, para clasificación)
- Cálculo de diversidad del tipo Alpha (diversidad dentro de la misma muestra)
- Comparación de la diversidad tipo Alpha entre muestras
- Curvas de rarefacción
- Cálculo de diversidad tipo Beta (diversidad entre muestras y/o grupos)

Para minimizar errores de profundidad de secuenciación entre las muestras, se llevaron a cabo análisis estadísticos con el mismo número de lecturas por muestra: 23.197 [lecturas/muestra]

Para el análisis de muestras se utilizó el software abierto QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) que lleva a cabo análisis microbiológico de comunidades a partir de datos brutos de secuencias de ADN y ha sido ampliamente utilizado para analizar e interpretar secuencias de ácidos nucleicos provenientes de comunidades de hongos, virus, bacteria y archaea. (Kuczynski, y otros, 2011)

Illumina MiSeq es un instrumento que utiliza una celda de flujo de un carril y un reactivo en forma de kit, es un instrumento integrado que realiza la amplificación, secuenciación y análisis de datos en una sola ejecución (bases, alineación, variaciones y resultados)

El análisis taxonómico realizado por DNA Vision contempla los niveles taxonómicos de: Filo, Clase, Orden, Familia y Género. (Phylum, Class, Order, Family y Genus). Y además fueron realizadas evaluaciones sobre la diversidad de las muestras.

Diversidad Alpha: La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad determinada y que se considera homogénea, por lo tanto es a un nivel “local”. Se refiere a la diversidad del número de especies dentro de la misma muestra. (Villareal, y otros, 2004). En el análisis de DNA Vision de las muestras se entregaron referencias utilizando distintas formas de medición de diversidad.

Existen diversas formas de medición de diversidad que pueden ser realizadas a través de: la contabilización de OTUs, referido a la riqueza de las muestras, es decir, el número de especies

presentes, y a través de la medición de la distribución de especies, es decir, la medición de la abundancia relativa de especies.

Los resultados se muestran a través del método Chao (Medición estimada de riqueza de especies y de distribución relativa), OTUs observado, PD-whole tree (diversidad filogenética, mide el total del árbol filogenético que lleva a cada uno de los miembros de la comunidad) y Shannon (medición por abundancia relativa); desde donde se obtuvieron curvas de rarefacción. Las curvas de rarefacción se utilizan para determinar si la muestra tiene la suficiente profundidad genética para caracterizar de forma adecuada la comunidad bacteriológica sometida a estudio.

Para construir curvas de rarefacción, cada muestra es dividida de forma aleatoria y se busca el número promedio de OTUs a cada intervalo. En algún punto de las mediciones el número de OTUs no aumenta con más muestras. Las curvas de rarefacción grafica el número de individuos muestreados (sub-muestra) versus el número de especies. Si se grafican las sub-muestras versus el número de especies observado se encuentran curvas planas cuando se presenta una profundidad adecuada de las mediciones de las muestras, es decir, si la curva llega a ser asíntota se tuvo un buen muestreo de acuerdo al número de especies identificadas.

Diversidad Beta: La diversidad beta es la medida del grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre las comunidades que se encuentran en un área mayor. Se refiere a la diversidad del número de especies entre muestras y/o grupos. Alguno de los parámetros de diversidad beta utilizados son: Bray-Curtis: Medición de abundancia sin considerar la filogenética; Unweighted UniFrac, que cuenta la presencia y ausencia de OTUs y considera la filogenética y Weighted UniFrac que mide la abundancia de OTUs y considera la filogenética de las especies. (Villareal, y otros, 2004)

DNA Vision compara la diversidad entre cada muestra a través de Unweighted UniFrac y Weighted UniFrac, calculan la distancia entre cada par de muestras, y realiza una matriz de distancia para mostrar la diversidad beta de las muestras. La visualización de los resultados se puede realizar a través de un software llamado PCoA (Principal Coordinates Analysis) que



muestra la diversidad beta con una matriz de distancia en dos y tres dimensiones, gráficos llamados PCoA. El software transforma la matriz de distancia en un set de ejes ortogonales donde el primer eje, usualmente llamado PC1, puede ser utilizado para explicar la máxima variación presente en los datos, seguido por el segundo eje (PC2) y así sucesivamente.

4. Procedimientos Experimentales

4.1. Esterilización de suelos

4.1.1. Metodología

Cuatro muestras de sedimentos de ríos fueron esterilizadas usando dos métodos, autoclave y esterilización por radiación UV. Los resultados fueron comparados con la densidad biológica del suelo, con un conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), también se utilizaron kits de viabilidad celular.

4.1.2. Materiales

- 200 [g] de muestra de sedimentos de suelo de río (aguas arriba)
- 4 matraces de 600 [mL] Kimax®
- Papel aluminio
- 12 tubos con tapa con 9 [mL] de solución salina esterilizada (0,9%)
- 12 tubos con tapa con 10 [mL] de solución salina esterilizada (0,9%)
- Pipetas (1 [mL])
- Medio de cultivo (TSA)

4.1.3. Procedimiento

- **Preparación de muestras:**
 - Preparación de 4 muestras de 50 [g] cada una.
 - Para eliminar el exceso de agua de las muestras los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente durante un período de una semana controlando la cantidad de agua del suelo, eliminando con una micro-pipeta el exceso de agua.
 - El suelo se mantuvo en un contenedor de vidrio, matraces de 600 [mL] Kimax®
 - Se cubrieron las muestras con papel aluminio para evitar mayores contaminaciones.
- **Esterilización UV**

- Dos muestras fueron esterilizadas usando este método
- El espesor de la muestra de suelo no superó los 2 [cm] para mayor permitir mejor penetración de la radiación UV.
- La esterilización se realizó con una intensidad en el rango de 253-260 [nm] en un puesto de seguridad microbiológica con opción de esterilización con UV, de marca Jouan MSC 12, tipo II, categoría 2.
- La esterilización se realizó en un tiempo de 30 minutos, luego se revolvió el suelo y se repitió la operación por otros 30 minutos.
- El procedimiento se repitió luego de 24 horas.



Ilustración 8: Proceso de esterilización UV.

- Esterilización en autoclave

- Dos muestras de 50 [g] cada una fueron esterilizadas por este método
- Las muestras se extendieron en una capa fina (no mayor a 2 [cm]) para permitir una mejor penetración del vapor durante del ciclo
- Los contenedores se cubrieron con papel aluminio para evitar mayores contaminaciones.
- El ciclo de esterilización se realizó en un autoclave con una temperatura de 121 [°C] y una presión de 1,1 [atm] por 30 minutos.
- Luego de la esterilización las muestras permanecieron refrigeradas

- Se repitió todo el proceso 24 horas después.
- **Comprobación de esterilización vía UFC.**
 - De cada muestra se extrajeron 5 [g] de suelo y se suspendieron en 10 [mL] de solución salina (0,9%), este proceso se debe hacer en triplicado (6 muestras por cada proceso de esterilización, 12 en total).
 - Aplicación de vórtice por 5 segundos.
 - Muestras de 1 [mL] y transferirlas a 9 [mL] de solución salina
 - Extender 0,1 [mL] de la disolución en TSA
 - Incubación a temperatura ambiente por 3 días
 - Conteo de UFC de cada placa.
- **PrestoBlue™ Agente.**
 - En cubetas para medir absorbancia se agregaron 900 [μL] del medio de cultivo (en este caso solución salina) y 100 [μL] de PrestoBlue™ Agente.
 - Se realizaron 12 mediciones, 6 por cada forma de esterilización.
 - Como este ensayo es para comprobar esterilizaciones, se esperan bajas concentraciones de células en las muestras por lo que se incubó a 37 [°C] por 24 horas antes de medir la absorbancia.
 - Para medir la absorbancia se debe normalizar los valores de 570 [nm] a 600 [nm].
 - Se midió la absorbancia de cada cubeta en 570 [nm] y 600 [nm]

4.2.Detección de glicerol acuoso

4.2.1. Metodología

Un método simple y rápido sin necesidad de pretratamiento de las muestras se puede lograr combinando dos reacciones, Malaprade y Hantzsch reacciones, ambas proveen un método rápido de medición de glicerol acuoso con un espectrofotómetro (Kuhn, Müller, Salziga, & Czermak, 2015), este método fue desarrollado para la determinación fuera de línea de glicerol durante la fermentación microbiológica.

Reacción Malaprade: Se utiliza peryodato de sodio para convertir glicerol en formaldehído.

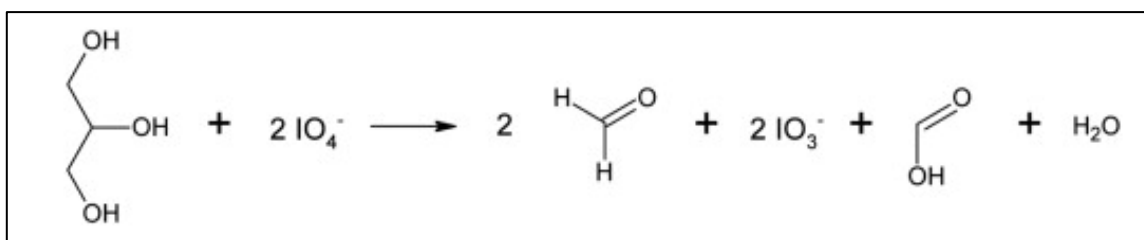


Ilustración 9: Reacción Malaprade.

Reacción Hantzsch: Formaldehído es convertido a 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidine (DDL) con amoníaco y acetil-acetona. Este colorante, de color amarillo, puede ser medido a 410 [nm] con un espectrofotómetro (Salthammer, 1993).

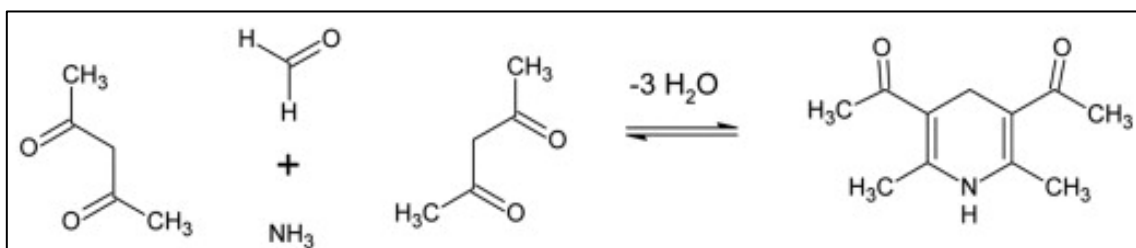


Ilustración 10: Reacción Hantzsch.

4.2.2. Materiales

- Agua destilada
- Peryodato de sodio
- Ácido acético

- Acetato de amonio
- Acetil-acetona
- Alcohol isopropílico
- Glicerol

4.2.3. Procedimiento

Se prepararon dos agentes para la detección de glicerol acuoso:

Agente I: Disolver peryodato de sodio con una concentración de $18 \text{ [mg mL}^{-1}\text{]}$ en agua destilada con 10% (v/v) de ácido acético. Agregar acetato de amonio con una concentración de $77 \text{ [mg mL}^{-1}\text{]}$.

Agente II: Acetil-acetona al 1% (v/v) en alcohol isopropílico (resguardar de la luz).

Preparación de curva de calibración: Para concentraciones conocidas de glicerol, se midió la absorción de DDL y se construyó la curva de calibración. En una cubeta de espectrofotómetro se agregó 200 $[\mu\text{L}]$ de muestra (dilución de 1/100 de las muestras de glicerol), 200 $[\mu\text{L}]$ de Agente I y 625 $[\mu\text{L}]$ de Agente II, esta mezcla se debe dejar reposar por 30 minutos mínimo y luego se midió la absorbancia, con una absorbancia máxima para DDL entre 410 y 412 $[\text{nm}]$.

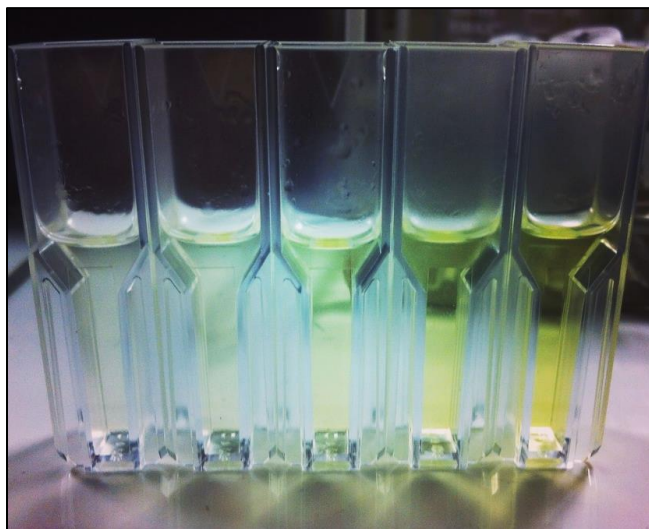


Ilustración 11: Reacción de DDL, coloración amarilla.

4.3.Experimento N°1 (Concentración inicial 0,1 [mol/L])

4.3.1. Metodología

Para obtener parámetros preliminares de cinética del glicerol se realizó un procedimiento Batch para conocer el desarrollo de la adsorción del glicerol hacia los sedimentos del río, los resultados de este experimento dan un rango de tiempo para desarrollar la experimentación de adsorción de glicerol en un set de sistemas batch a distintas concentraciones.

4.3.2. Materiales

- 15 [g] de muestra de sedimentos de río
- 3 Matraces
- Solución de glicerol (0,1 [mol/L])
- Agitador mecánico con control de temperatura
- Agente I y agente II (Reacciones Malaprade y Hantzsch)

4.3.3. Procedimiento

➤ Preparación del suelo

El exceso de agua debe ser eliminada secando la muestra de sedimentos de río a temperatura ambiente. Se preparan 3 muestras de 5 [g], una de éstas debe ser esterilizada.

➤ Solución de glicerol

La solución utilizada en el experimentos es combinación de glicerol con solución salina (0,9%), con una concentración de 0.1 [mol/L]. La misma concentración es utilizada en experimentos de adsorción de glicerol desde aguas de lavado de biodiesel.

➤ Preparación de experimento tipo Batch.

Tres matraces Erlenmeyer fueron esterilizados para el experimento y ser sellados para evitar contacto con el medio ambiente. Se llenó los tres matraces con 5 [g] de sedimentos de suelo, uno con suelo esterilizado y dos sin esterilizar y se agregó 100 [mL] de solución de glicerol. Se utilizó un agitador mecánico con agitación constante de 120 [rpm] y una temperatura de



13 [°C]. La proporción de sedimentos de suelo y de solución es el mismo señalado en la bibliografía sobre la adsorción de glicerol de aguas de lavado de biodiesel (Liu, Musuku, Adhikari, & Fernando, 2009).

➤ **Muestras**

Dos muestras deben ser tomadas cada 15 minutos (con un tiempo total de 24 horas), con reposo de 5 minutos (para permitir decantación de los sedimentos), con alícuotas de 500 [μL], éstas deben ser refrigeradas. Para obtener la cantidad de glicerol se realizaron diluciones 1/100 de las muestras y se utilizó la curva de calibración de glicerol para medir la absorbancia de DDL a 410 [nm] (método descrito anteriormente).

4.4.Experimento N°2 (Concentración inicial 0,01 [mol/L])

4.4.1. Metodología

Debido a la poca claridad sobre el tiempo de equilibrio obtenido en el experimento N°1 (explicado en profundidad en la sección resultados) se decidió realizar un experimento de similares condiciones que el experimento N°1 pero con menor concentración inicial de glicerol, para disminuir los errores de medición y alcanzar de forma más rápida el equilibrio de adsorción. Se utilizó una concentración de 0,01 [mol/L], la décima parte utilizada en el experimento N°1, bajo la suposición de que la recuperación de glicerol es de mínimo un 90%. Se realizaron mediciones durante 24 horas.

4.4.2. Materiales

- 15 [g] de muestra de sedimentos de río
- 3 Matraces
- Solución de glicerol (0,01 [mol/L])
- Agitador mecánico con control de temperatura
- Agente I y agente II (Reacciones Malaprade y Hantzsch)

4.4.3. Procedimiento

➤ Preparación del suelo

El exceso de agua debe ser eliminada secando la muestra de sedimentos de río a temperatura ambiente. Se preparan 3 muestras de 5 [g], una de éstas debe ser esterilizada.

➤ Solución de glicerol

La solución utilizada en el experimento es combinación de glicerol con solución salina (0,9%), con una concentración de 0,01 [mol/L]. La misma concentración es utilizada en experimentos de adsorción de glicerol desde aguas de lavado de biodiesel.

➤ **Preparación de experimento tipo Batch.**

Tres matraces Erlenmeyer fueron esterilizados para el experimento y ser sellados para evitar contacto con el medio ambiente. Se llenó los tres matraces con 5 [g] de sedimentos de suelo, uno con suelo esterilizado y dos sin esterilizar y se agregó 100 [mL] de solución de glicerol. Se utilizó un agitador mecánico con agitación constante de 120 [rpm] y una temperatura de 13 [°C]. La proporción de sedimentos de suelo y de solución es el mismo señalado en la bibliografía sobre la adsorción de glicerol de aguas de lavado de biodiesel (Liu, Musuku, Adhikari, & Fernando, 2009).

➤ **Muestras**

Dos muestras deben ser tomadas cada 15 minutos (durante las primeras dos horas), y luego cada dos horas, hasta alcanzar las 6 horas de experimentación, finalmente, se realizaron muestras cada 12 horas. Las muestras tuvieron un reposo de 5 minutos (para permitir decantación de los sedimentos), con alícuotas de 500 [μL], siendo refrigeradas para evitar mayor adsorción de glicerol. Para obtener la cantidad de glicerol se realizaron diluciones 1/100 de las muestras y se utilizó la curva de calibración de glicerol para medir la absorbancia de DDL a 410 [nm] (método descrito anteriormente).

4.5. Experimento N°3 (Set Batch)

4.5.1. Metodología

Para la construcción de modelos de adsorción, se realizó un set de experimentos del tipo Batch con 4 concentraciones iniciales 0,0025, 0,005, 0,0075 y 0,01 [mol/L], con una disposición de 4 matraces por cada una de las concentraciones, con: suelo abiótico (estéril), biótico (en duplicado) y un matraz con una extracción de bacterias provenientes de los sedimentos del río Oise. Las mediciones se realizaron durante 10 días.



Ilustración 12: Disposición experimento N°3

4.5.2. Materiales

- 60 [g] de muestra de sedimentos de río
- 16 Matraces
- Solución de glicerol (0,01 [mol/L])
- Agitador mecánico con control de temperatura
- Agente I y agente II (Reacciones Malaprade y Hantzsch)

4.5.3. Procedimiento

➤ Preparación del suelo

El exceso de agua debe ser eliminada secando la muestra de sedimentos de río a temperatura ambiente. Se preparan 12 muestras de 5 [g], cuatro de éstas fueron esterilizadas.

➤ Solución de glicerol

La solución utilizada en el experimento es combinación de glicerol con solución salina (0,9%), con una concentración de 0,01 [mol/L]. La misma concentración es utilizada en experimentos de adsorción de glicerol desde aguas de lavado de biodiesel.

➤ Extracción de bacterias

Se realizó una extracción de bacterias de los sedimentos del río utilizando una solución salina al 0,9%. Cinco gramos de sedimentos de río fueron agitados y centrifugados en 5 [mL] de solución salina y luego aislado en los matraces del experimento. Este procedimiento es similar al realizado para el conteo UFC de las muestras de sedimentos realizado en la esterilización de los sedimentos del suelo.

➤ Preparación de experimento tipo Batch.

Tres matraces Erlenmeyer fueron esterilizados para el experimento y ser sellados para evitar contacto con el medio ambiente. Se llenó los tres matraces con 5 [g] de sedimentos de suelo, uno con suelo esterilizado y dos sin esterilizar y se agregó 100 [mL] de solución de glicerol. Se utilizó un agitador mecánico con agitación constante de 120 [rpm] y una temperatura de

13 [°C]. La proporción de sedimentos de suelo y de solución es el mismo señalado en la bibliografía sobre la adsorción de glicerol de aguas de lavado de biodiesel (Liu, Musuku, Adhikari, & Fernando, 2009).

➤ Muestras

Dos muestras deben ser tomadas cada 15 minutos (durante las primeras dos horas), y luego cada dos horas, hasta alcanzar las 6 horas de experimentación, finalmente, se realizaron muestras cada 12 horas. Las muestras tuvieron un reposo de 5 minutos (para permitir decantación de los sedimentos), con alícuotas de 500 [μL], siendo refrigeradas para evitar mayor adsorción de glicerol. Para obtener la cantidad de glicerol se realizaron diluciones 1/100 de las muestras y se utilizó la curva de calibración de glicerol para medir la absorbancia de DDL a 410 [nm] (método descrito anteriormente).

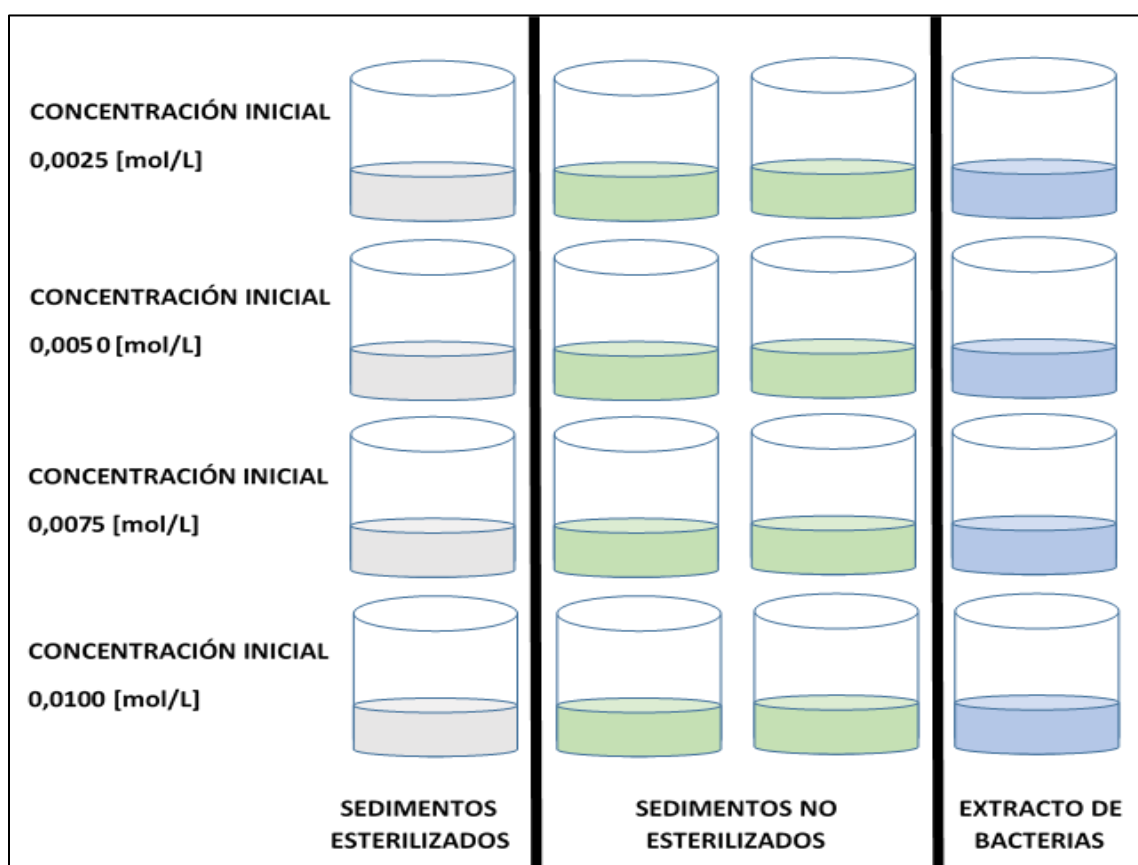


Ilustración 13: Diagrama de disposición de matraces experimento N°3.

4.6.Extracción de ADN de sedimentos del río

Para realizar la secuenciación de ADN de los sedimentos del río se utilizó un kit de aislamiento, llamado PowerMax® Soil DNA Isolation desarrollado por Mo Bio Laboratories. Con este kit fue posible procesar muestras con altos niveles de humedad, como es el caso de los sedimentos del río analizados. El ADN aislado tiene altos niveles de pureza permitiendo una amplificación de ADN por PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) exitosa. Con este kit se ha aislado ADN de distintos tipos de suelo con primers específicos para bacterias (*bacillus subtilis*, *bacillus anthracis*), fungi (hongos, levaduras) y actinomicetos (*streptomyces*) (Mo Bio Laboratories, Inc.).

4.6.1. Materiales

Componente	Cantidad
PowerMax® Soil PowerBead Tubes	10
PowerMax® Soil PowerBead Solution	165 [mL]
PowerMax® Soil Solution C1	14 [mL]
PowerMax® Soil Solution C2	55 [mL]
PowerMax® Soil Solution C3	44 [mL]
PowerMax® Soil Solution C4	330 [mL]
PowerMax® Soil Solution C5	4 x 30 [mL]
PowerMax® Soil Solution C6	55 [mL]
PowerMax® Soil Spin Filters	10
PowerMax® Soil Collection Tubes (50 [mL])	40

Tabla 2: Contenido PowerMax® Soil DNA Isolation Kit.

4.6.2. Procedimiento

- Agregar 15 [mL] de solución PowerBead a los tubos Bead. (referidos como tubos Solution Bead)

- Agregar 10 [g] de muestra de sedimentos de río en los tubos Solution Bead y aplicar 1 minuto de vórtice para mezclar. En este paso se produce la homogeneización y lisis de las células provenientes de la muestra. En la solución se encuentra un buffer que ayuda a dispersar las moléculas de sedimentos de suelo y comienza a disolver los ácidos húmicos y proteger los ácidos nucleicos de la degradación.
- Agregar 1.2 [mL] de la solución llamada C1 y aplicar vórtice por 30 segundos. La solución C1 contiene SDS y agentes de disrupción para completar la lisis celular. SDS es un detergente aniónico que rompe los ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de los microorganismos.
- Aplicar vórtice por 10 minutos con la velocidad máxima. Este paso es fundamental para completar la homogeneización y lisis de las células.
- Centrifugar los tubos con 2500 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio (Collection tube).
- Agregar 5 [mL] de solución C2 e invertir dos veces para mezclar. Incubar a 4 [°C] por 10 minutos. La solución C2 contiene un agente para la precipitación de material orgánico (no ADN) e inorgánico, es una solución patentada como: Inhibitor Removal Technology® (IRT). Es importante remover la contaminación que puede reducir la pureza del ADN.
- Centrifugar los tubos a 2500 x g por 4 minutos a temperatura ambiente
- Evitando el precipitado, que contiene material orgánico e inorgánico incluyendo ácido húmico, restos de células y proteínas, transferir el sobrenadante a un tubo limpio (Collection tube). El ácido húmico es parte de las sustancias húmicas. Compuesto orgánico natural, sustancias complejas y heterogéneas de mezclas de material disperso formado por reacciones bioquímicas y químicas durante el decaimiento y transformación de las plantas y restos microbianos.
- Agregar 4 [mL] de la solución C3 al sobrenadante e invertir dos veces para mezclar. Incubar a 4 [°C] por 10 minutos. La solución C3 es un segundo agente que permite la precipitación de material orgánico (no ADN) y material inorgánico.
- Centrifugar los tubos con 2500 x g por 4 minutos a temperatura ambiente.

- Evitando el precipitado, transferir el sobrenadante a un tubo limpio (Collection tube).
- Agregar 30 [mL] de solución C4 al sobrenadante e invertir dos veces. Esta solución contiene altas concentraciones de sal para permitir la unión del ADN
- Este paso requiere tres centrifugaciones: Primero se debe llenar el Spin Filter con la solución del paso anterior, centrifugar a 2500 x g por dos minutos a temperatura ambiente. Descartar el flujo y agregar un segundo volumen de sobrenadante al tubo, repetir este proceso hasta que todo el sobrenadante haya pasado por el filtro.
- Agregar 10 [mL] de la solución C5 al Spin Filter y centrifugar a 2500 x g por 3 minutos. Descartar el flujo resultante. La solución C5 es una solución de lavado basada en etanol utilizada para limpiar el ADN unido a la membrana de sílice en el Spin Filter. Esta solución remueve sal residual y otros contaminantes mientras permite que el ADN se adhiera a la membrana.
- Centrifugar el Spin Filter a 2500 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. (Este paso remueve los residuos de la solución C5)
- Traspasar el Spin Filter en un tubo limpio (Collection tube). Evitar el contacto con el flujo de C5.
- Agregar 5 [mL] de solución C6 al centro del Spin Filter. Centrifugar a 2500 x g por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el Spin Filter. El flujo restante en el tubo es el ADN extraído.
- Almacenar a -20 [°C] para futura secuenciación.

5. Resultados

5.1. Resultados secuenciación de ADN

5.1.1. Generación tabla OTU

Todas las secuencias leídas de todas las muestras son agrupadas en OTUs (Operational Taxonomic Units) basado en la similitud de secuencias (97% de similitud). La base de datos del gen 16S es utilizado para generar grupos con similitudes. Este proceso se llevó a cabo por el software QIIME y su archivo de salida es una tabla OTU.

Resumen de muestras	
Mínimo número de lecturas por muestra	23.197
Máximo número de lecturas por muestra	44.088
Mediana de lectura por muestra	41.851
Promedio de lectura por muestra	39.193

Tabla 3: Resumen lectura de muestras. DNA Vision.

DNA Vision Muestra ID	Cliente Muestra ID	# lecturas
DNA16015-001	US 1	23.197
DNA16015-002	US 2	43.575
DNA16015-003	US 3	41.562
DNA16015-004	DS 1	44.088
DNA16015-005	DS 2	40.600
DNA16015-006	DS 3	42.141

Tabla 4: Número de lecturas por muestras. DNA Vision

5.1.2. Diversidad Tipo Alpha

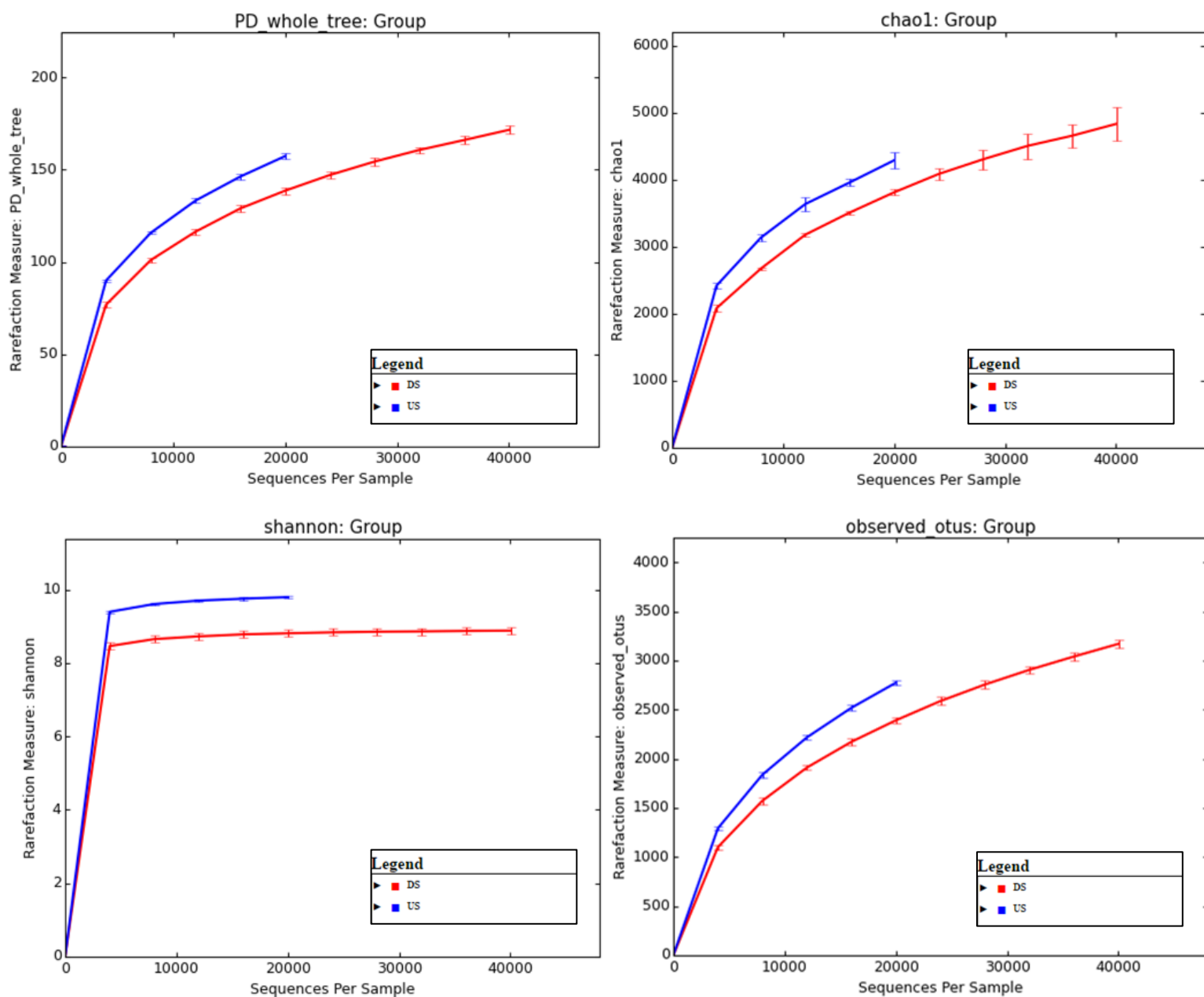


Ilustración 14: Gráficos diversidad Alpha por grupo de muestras. DNA Vision

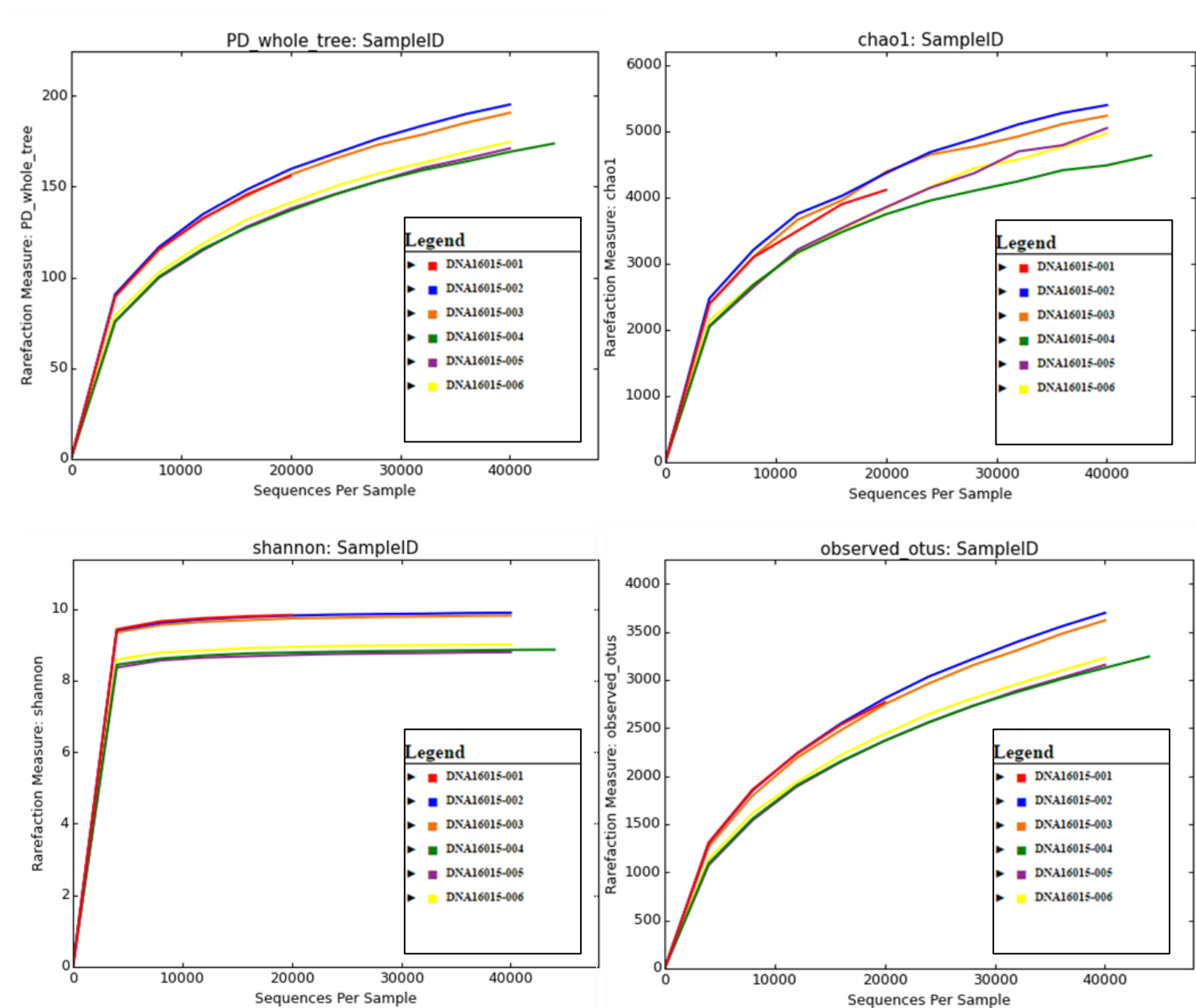


Ilustración 15: Gráficos diversidad Alpha por muestras. DNA Vision

Los distintos gráficos entregados por DNA Vision sobre la diversidad del tipo Alpha muestran que en mediciones de contabilización de OTUs, las curvas de rarefacción no alcanzan una asíntota clara, sin embargo en el caso de la medición a través del método Shanon si se alcanza una asíntota por lo que se puede decir que las muestras presentaban una profundidad genética suficiente para obtener buenos resultados.

5.1.3. Diversidad Tipo Beta

A continuación se muestran los gráficos de diversidad tipo Beta entregados por DNA Vision. Donde se muestra la diversidad utilizando los índices unweighted_UNIFRAC y weighted_UNIFRAC. La matriz de distancia para ambos casos presenta baja diversidad dentro de las mismas muestras, pero una diferencia más significativa entre las muestras aguas arriba y aguas abajo, en el caso de Unweighted UniFrac la variación es de alrededor de 13%, mientras que en Weighted UniFrac se presenta una diversidad mayor de alrededor de 88%.

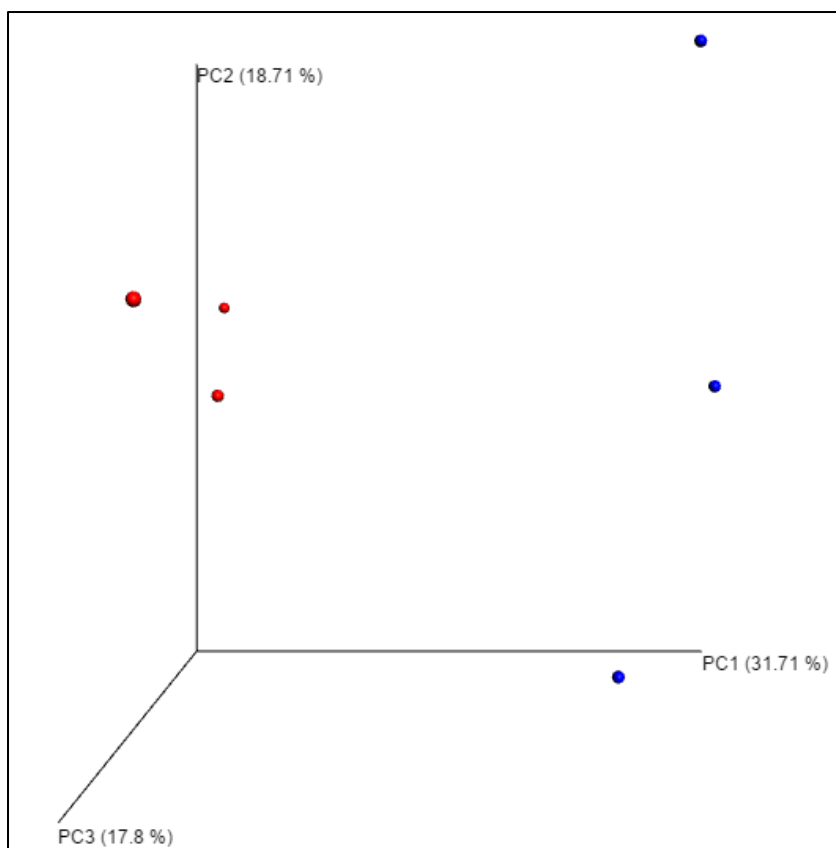


Ilustración 16: Diversidad Beta. Unweighted_UNIFRAC.

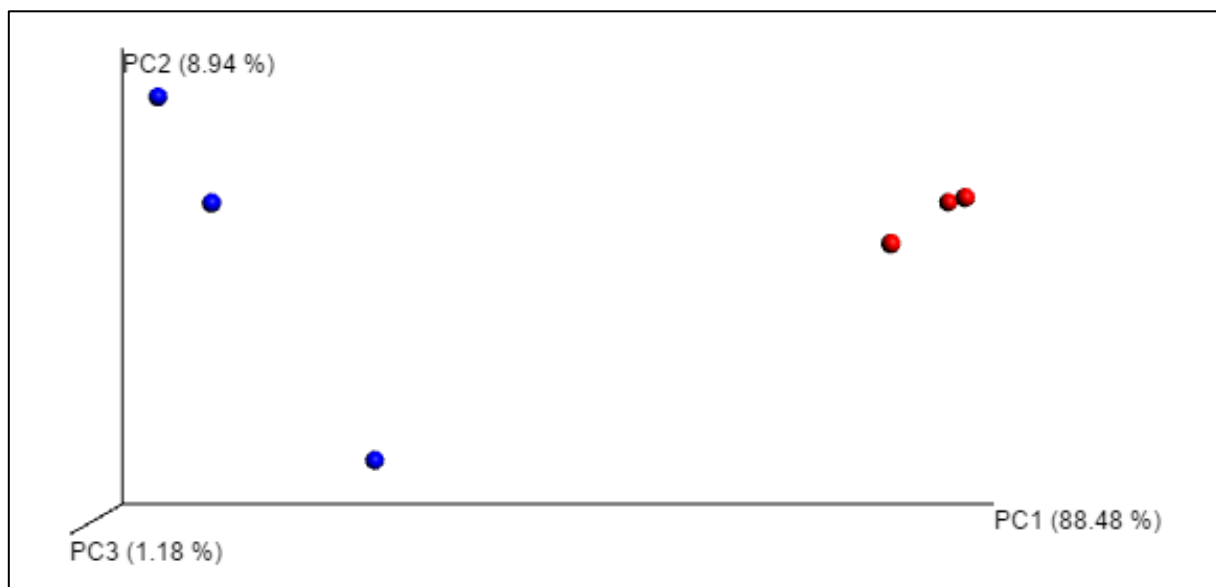


Ilustración 17: Diversidad Tipo Beta. Weighted_UNIFRAC

5.1.4. Análisis Taxonómico

Las comunidades fueron clasificadas por composición taxonómica. Se realizó un análisis taxonómico por grupo y por muestra. La composición se muestra a través de gráficos interactivos (a través de gráficos de barra y área). Una tabla de resultados se encuentra en el Anexo N°1.

Del análisis de los datos brutos entregados se llegó a la siguiente tabla resumen, donde se muestra el filo (phylum) con cambios significativos entre las muestras río arriba y río abajo:

Crecimiento	%	Muerte	%
<i>Cyanobacteria</i>	21,4	<i>Bacteroidetes</i>	-11,3
<i>Proteobacteria</i>	3,6	<i>Proteobacteria</i>	-9
<i>Acidobacteria</i>	1	<i>Verrucomicrobia</i>	-3,3
<i>Chloroflexi</i>	0,9	<i>Nitrospirae</i>	-0,8

Tabla 5: Variación porcentual de organismos

➤ Crecimiento de *Cianobacterias*.

El término *Cianobacterias* se designa a microorganismos procariontes Gram negativo (-) donde la pigmentación puede variar desde azul verdoso a rojo. Las *Cianobacterias* son procariontes fotosintéticos, producen oxígeno utilizando el agua como donador de electrones. Algunas de las características más importantes de las *Cianobacterias* son:

- La estructura celular es similar a las bacterias, en particular, por la ausencia de núcleo y organelos intracelulares.
- Como las algas, la mayoría de las *Cianobacterias* de aguas continentales tienen clorofila y no clorofila bacteriana como ciertas bacterias.
- Las *Cianobacterias* pueden encontrarse en: disposición unicelular (solitarias o en colonias), organizadas en tricomas u organizadas en filamentos. Algunas presentan vacuolas con gas que les permiten posicionarse a distintos niveles en las columnas de agua.

- Sus características ecológicas son variadas, pueden encontrarse en un sinnúmero de hábitats, acuáticos o terrestres. Pueden estar libres o generar simbiosis con otros organismos. También se pueden adaptar a condiciones extremas, temperaturas elevadas o niveles de pH ácidos. En medios acuáticos, las *Cianobacterias* se encuentran en suspensión o se desarrollan de forma fija en los sedimentos.
- Su reproducción es asexual por división binaria o gemación. El tipo de reproducción depende de las condiciones ambientales expuestas.
- Si bien están referenciadas en la clasificación de bacterias, ellas también están integradas dentro la nomenclatura botánica y su identificación a nivel de especie es muy difícil.
- Algunos géneros producen toxinas intracelulares y/o metabolitos con olores desagradables. Las toxinas son intracelulares y sintetizadas por células en crecimiento y liberadas cuando la célula envejece o se produce lisis celular.
- La proliferación es un fenómeno dinámico característico de las *Cianobacterias*, la producción de biomasa y la dominancia en la comunidad fito-planctónica es propia de este tipo de organismos.
- La proliferación de *Cianobacterias* pueden perturbar el funcionamiento de ecosistemas acuáticos y el uso del agua. Una proliferación masiva y rápida de estos organismos, en ciertos casos, es fácilmente observable por un cambio de color en el agua y la formación de espuma. Independiente de la formación de espuma, su ausencia no constituye un buen criterio para descartar la presencia eventual de *Cianobacterias* o de cianotoxinas (toxinas provenientes de las *Cianobacterias*).

Efectos indeseados de la proliferación de *Cianobacterias*:

- Modificación del aspecto de los recursos acuáticos, con cambios de coloración (azul verdoso, rojo o verde) y con presencia de espuma.
- Perturbación de la biodiversidad del ecosistema acuático

- Perturbación de las cadenas tróficas acuáticas cuando las *Cianobacterias* son consumidas por el zooplancton y su proliferación impacta en el desarrollo de otros organismos fotosintéticos por la competencia de nutrientes y luz.
- Mortalidad de peces, por intoxicación o disminución de oxígeno en el agua
- Mortalidad de aves, por intoxicación directa o por su alimentación
- Intoxicación de animales domésticos o salvajes que consumen agua contaminada
- Coloración y mal olor en lugares de baño (lagunas, ríos, lagos)
- Problemas cutáneos o de mucosas
- Inducción de riesgos sanitarios por ingestión, inhalación o exposición si el tratamiento de aguas contaminadas no es adecuado (ej.: aguas de riego)
- Perturbación del funcionamiento de plantas de tratamiento. (Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) & Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET), 2006)



Ilustración 18: Ejemplo de efectos de las *Cianobacterias*.

Para obtener una información más específica del tipo de *Cianobacterias* que está presente en los sedimentos del río es necesario hacer un análisis más exhaustivo del ADN.

➤ Disminución de *Bacteroidetes*

Las *Bacteroidetes* son un grupo de bacterias Gram negativas (-) y anaerobias con gran distribución en el medio ambiente, incluyendo suelos, agua de mar entre otros.

Son los más grandes miembros de la microbiota de los animales, especialmente en el tracto gastrointestinal, pueden actuar como patógenos y son usualmente encontrados en suelos, océanos y aguas frescas.

Son parte de la comunidad bacteriológica normal de diversos hábitats donde juegan un rol benéfico en la degradación de la materia orgánica.

Algunos miembros de este filo (phylum) pueden actuar con fuerte comportamiento patógeno para otras especies. Las infecciones por *Bacteroidetes* pueden tener efectos devastadores en peces. (Thomas, Hehemann, Rebuffet, Czjzek, & Michel, 2011)

5.2. Resultados esterilización de suelos

5.2.1. Muestras de sedimentos de río

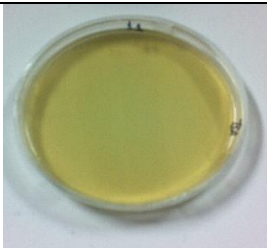
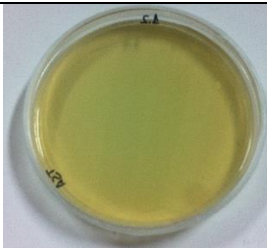
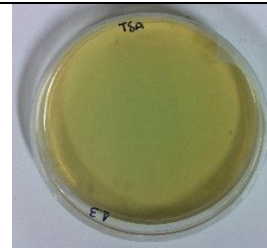
Debido a la cantidad de agua que existía en las muestras de sedimentos de río es que cuatro muestras de éstos fueron secadas a temperatura ambiente durante 1 semana. El control del peso de la muestra fue necesario para obtener 50 [g] de sedimentos de río secos.

Evolución peso de muestras	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4
Peso matraz [g]	182,91	183,27	180,27	186,53
Peso sedimentos [g]	55,6	56,7	54,3	56,8
Peso sedimentos [g] (7 días después)	50,05	50,08	50,09	50,11

Tabla 6: Evolución peso de muestras de sedimentos de río.

5.2.2. Resultados UFC

Luego de 48 horas de incubación a temperatura ambiente, los resultados de las 4 muestras de sedimentos de suelo. Se observó que las muestras esterilizadas por autoclave (muestra 1 y 3) no presentan ningún tipo de crecimiento, mientras que las muestras esterilizadas por UV presentan una gran cantidad de crecimiento, especialmente de filamentos fúngicos.

Muestra N°1 Autoclave			
Muestra N°2 Esterilización UV			

Muestra N°3 Autoclave			
Muestra N°4 Esterilización UV			
Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4
0	Incontable	0	Incontable
0	Incontable	0	Incontable
0	Incontable	0	Incontable

Tabla 7: Cantidad de unidades formadora de colonia por placa

UFC	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4
	0	Fuera de rango	0	Fuera de rango

Tabla 8: Resultados UFC

Estos resultados preliminares de la calidad de esterilización muestran que la esterilización húmeda con autoclave es más eficiente en el proceso que la esterilización por UV.

5.2.3. Resultados PrestoBlue™ Agente

Luego de 24 horas de incubación a 37 [°C], recomendado por el proveedor, se midió la absorbancia de cada muestra obtenida de los procedimientos de esterilización. Para realizar el análisis de datos se utilizó una guía de utilización a través de mediciones de absorbancia (Molecular Probes - Life Technologies Corporation, 2011).

Medición a 570 [nm]					
	Blanco	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4
1	1,651	1,697	1,789	1,642	1,813
2	1,645	1,687	1,808	1,638	1,798
3	1,656	1,691	1,814	1,644	1,811

Tabla 9: Medición de absorbancia a 570 [nm]

Medición a 600 [nm]					
	Blanco	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4
1	2,255	2,309	1,507	2,278	1,603
2	2,321	2,323	1,605	2,282	1,708
3	2,324	2,333	1,567	2,283	1,689

Tabla 10: Medición de absorbancia a 600 [nm]

Debido a que el espectrofotómetro utilizado no tenía la opción de normalización a 600 [nm] es que se midieron las absorbancias a 570 y 600 [nm] y luego se realizó la normalización. Para cada cubeta medida a 570 [nm] se sustrajo la absorbancia medida a 600 [nm] y además se encontró el promedio del blanco (control). En esta etapa es común obtener valores negativos debido a la baja conversión del agente de PrestoBlue™.

Diferencia 570 - 600 [nm]					
	Blanco	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4

1	-0,604	-0,612	0,282	-0,636	0,21
2	-0,676	-0,636	0,203	-0,644	0,09
3	-0,668	-0,642	0,247	-0,639	0,122
Promedio blanco		-0,6493			

Tabla 11: Normalización de datos de absorbancia

A partir de la normalización se encontraron los valores corregidos de absorbancia para cada medición de absorbancia.

Valores corregidos					
	Blanco	Muestra N°1	Muestra N°2	Muestra N°3	Muestra N°4
1	0,0453	0,0373	0,9313	0,0133	0,8593
2	-0,0267	0,0133	0,8523	0,0053	0,7393
3	-0,0187	0,0073	0,8963	0,0103	0,7713
Promedios corregidos					
	0,0000	0,0193	0,8933	0,0097	0,7900

Tabla 12: Valores corregidos de absorbancia.

A partir de los valores corregidos de la absorbancia se puede observar que las muestras N°1 y N°3 presentan valores bajos en comparación a los valores que se presentan para la muestra N°2 y N°4, lo que confirma que la esterilización con autoclave es mucho más efectiva.

De forma alternativa los datos pueden ser expresados como porcentaje de reducción del agente PrestoBlue™ utilizando los mismos datos y convirtiéndolos en expresión porcentual de reducción del agente usando el coeficiente molar de extinción de la oxidación y reducción de componente de PrestoBlue™, un alto valor del porcentaje de reducción significa más presencia de células en los medios. El cálculo del porcentaje de reducción se realiza a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción PrestoBlue}^{\text{TM}} : \frac{(O2 * A1) - (O1 * A2)}{(R1 * N2) - (R2 * N1)} * 100$$

Donde:

- O1: Coeficiente de extinción molar de oxidación del agente PrestoBlue™ a 570 [nm]
- O2: Coeficiente de extinción molar de oxidación del agente PrestoBlue™ a 600 [nm]
- R1: Coeficiente de extinción molar de reducción del agente PrestoBlue™ a 570 [nm]
- R2: Coeficiente de extinción molar de reducción del agente PrestoBlue™ a 600 [nm]
- A1: Absorbancia de muestra a 570 [nm]
- A2: Absorbancia de muestra a 600 [nm]
- N1: Absorbancia de blanco a 570 [nm]
- N2: Absorbancia de blanco a 600 [nm]

Longitud de onda	Reducción (R)	Oxidación (O)
570 [nm]	155.677	80.586
600 [nm]	14.652	117.216

Tabla 13: Coeficientes de extinción molar del agente PrestoBlue™

Porcentaje de reducción %					
	Blanco	Muestra Nº1	Muestra Nº2	Muestra Nº3	Muestra Nº4
1	3,5	3,9	27,0	2,7	25,5
2	1,7	3,2	25,3	2,5	22,4
3	2,0	3,1	26,4	2,7	23,3
Reducción promedio %					
	2,4	3,4	26,2	2,6	23,7

Tabla 14: Porcentaje de reducción de muestras.

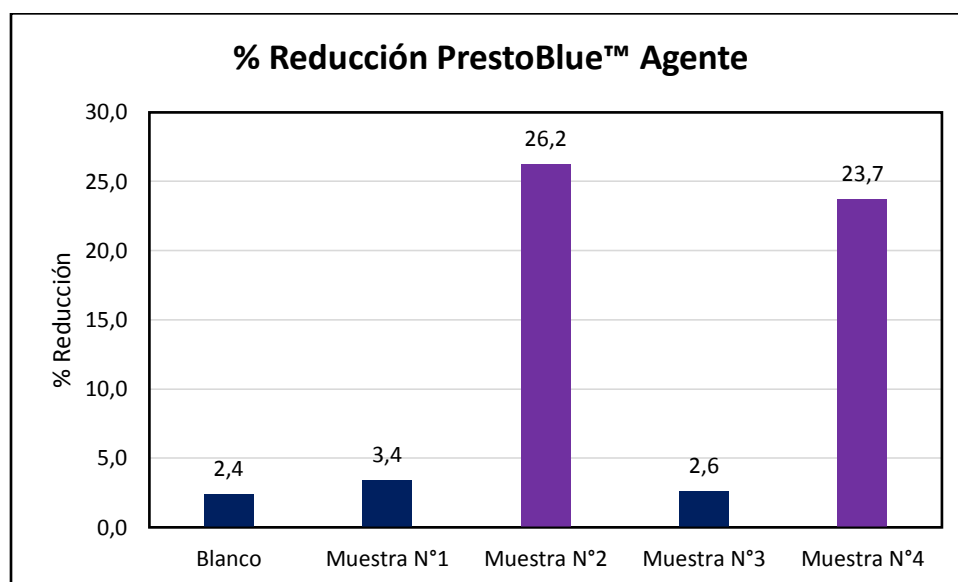


Ilustración 19: Porcentaje de reducción PrestoBlue™ Agente

Un mayor porcentaje de reducción del agente significa una mayor presencia de células capaces de reducir el compuesto resazurin presente en el agente. Debido a los resultados presentados en el ensayo se puede observar que las muestras N°2 y N°4, esterilizadas con radiación UV presentan una gran cantidad de células, por lo que la esterilización no es completamente apropiada.

5.3.Resultados experimentación Batch

5.3.1. Resultados Experimento N°1

- Curva de calibración de glicerol acuoso: Para obtener las concentraciones de glicerol acuoso en el sistema batch primero se obtuvo una curva de calibración del compuesto, midiendo la absorbancia de DDL en muestras con concentración conocida de glicerol, que varía entre 0,01 y 0,1 [mol/L] con muestras en triplicado.

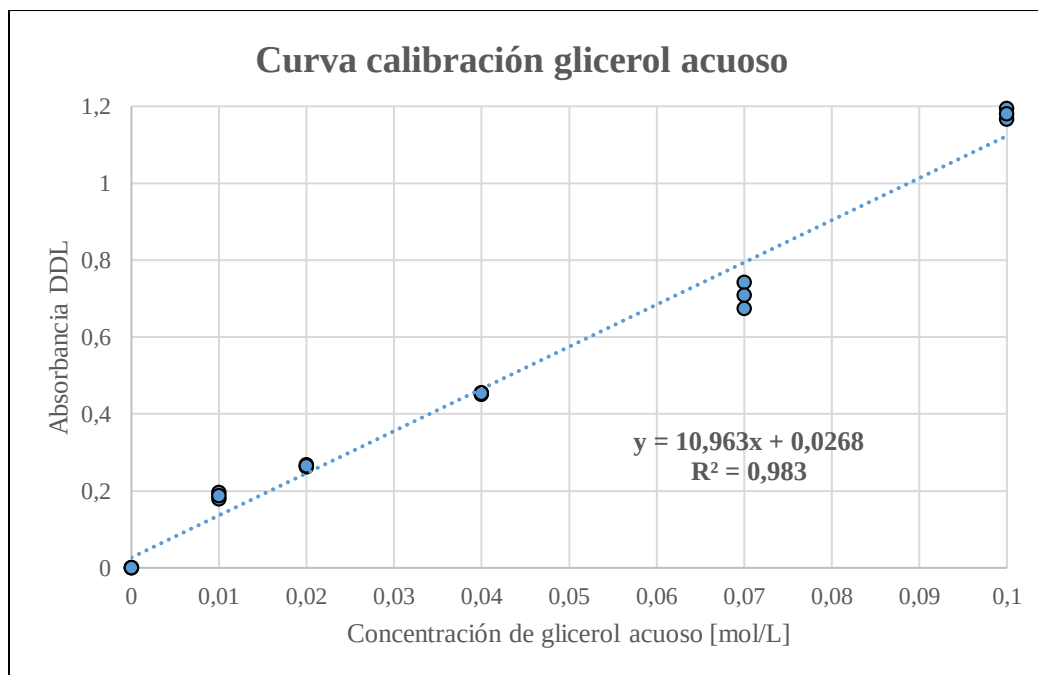


Ilustración 20: Curva de calibración de glicerol.

Se obtiene la recta de tendencia de los datos, con la cual se puede obtener la concentración de glicerol acuoso con la absorbancia de DDL.

$$y = 10,963 x + 0,0268$$

Donde y es la absorbancia de DDL y x es la concentración de glicerol acuoso en la solución. El coeficiente de determinación en la regresión múltiple realizada, R-cuadrado, es de 0,983, por lo cual se considera que la recta de tendencia es una buena aproximación.

- Con los datos obtenidos de las muestras y la absorbancia de DDL se obtuvo las concentraciones de glicerol acuoso para las muestras abióticas y bióticas de los sedimentos del río. Se midieron hasta las 24 horas, el gráfico se muestra hasta las 12 horas para tener mejor entendimiento de lo que sucede en las primeras horas de adsorción de glicerol hacia los sedimentos del río.

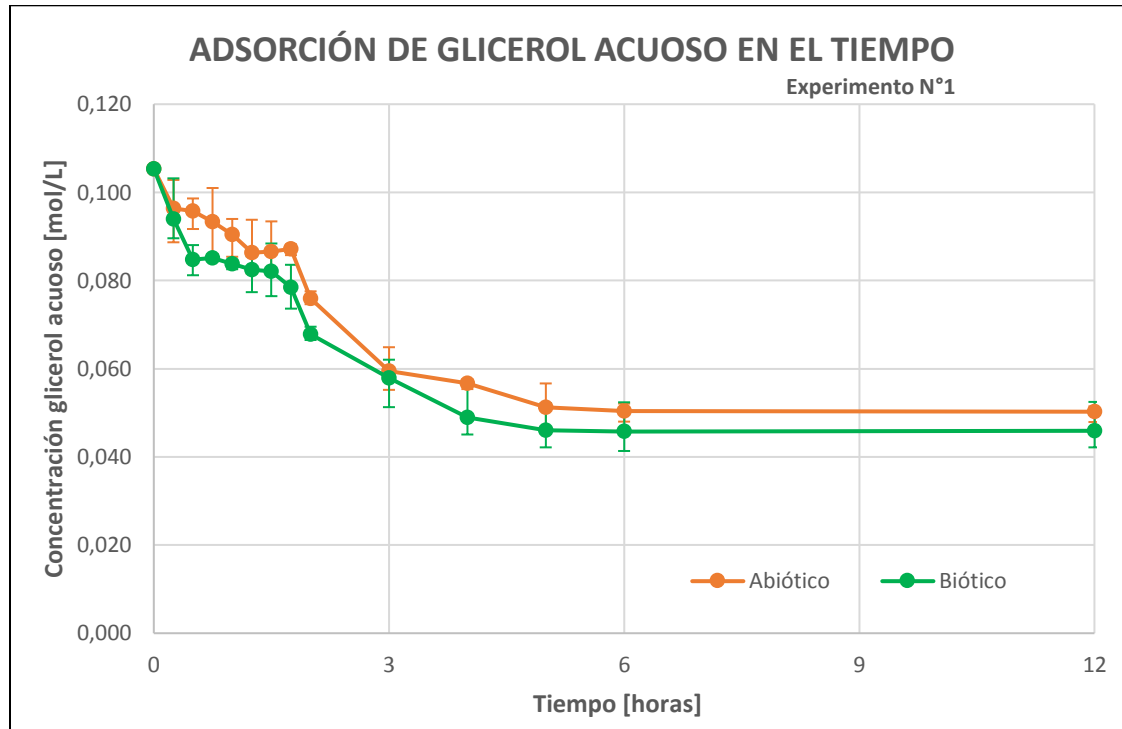


Ilustración 21: Gráfico Adsorción de glicerol acuoso en el tiempo. Experimento N°1.

Se puede observar que las líneas de error sobre las mediciones de la concentración de glicerol, son altas y no existe una diferencia clara entre la rapidez de adsorción entre el caso abiótico y biótico. Pero si se puede observar que el componente biótico si tiene un impacto sobre la adsorción de glicerol desde la solución hacia los sedimentos del río.

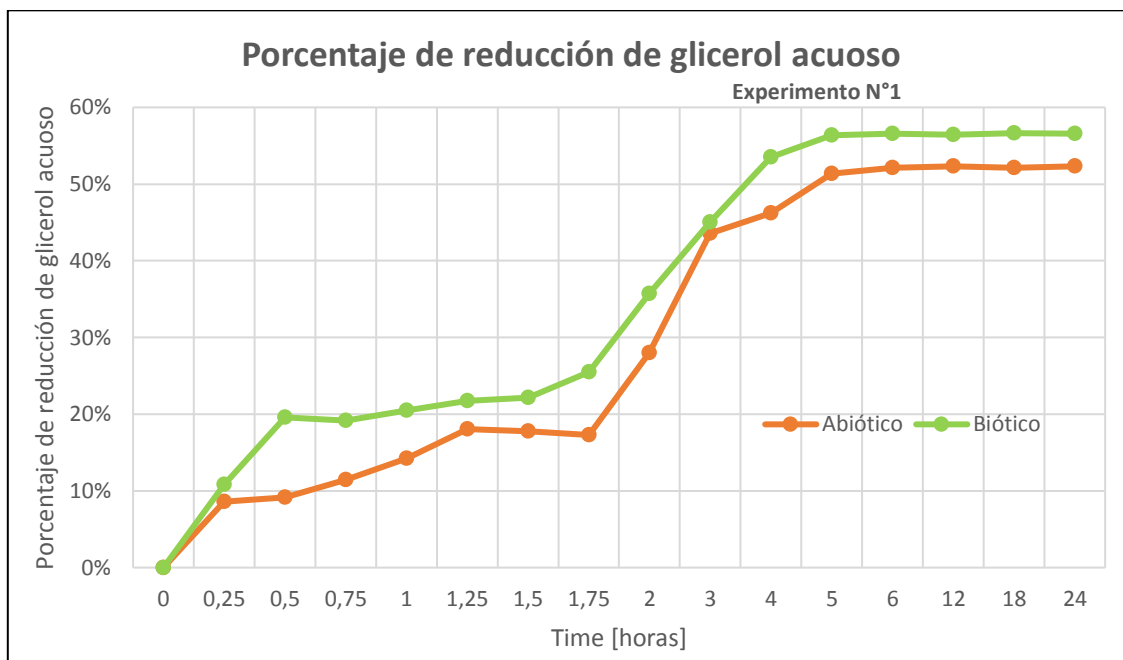


Ilustración 22: Gráfico de porcentaje de remoción de glicerol acuoso. Experimento N°1

En el gráfico anterior se puede observar que el porcentaje de adsorción de glicerol acuoso desde la solución es mayor para el caso de los sedimentos no esterilizados, alcanzando casi un 60% de reducción en 24 horas. Sin embargo, los errores obtenidos durante la medición de las muestras resultan muy grandes para justificar de forma apropiada la diferencia de reducción entre los sedimentos esterilizados y aquellos que tienen presencia biótica.

5.3.2. Resultados experimento N°2

- Para obtener mejores resultados de las mediciones de glicerol acuoso y su adsorción se redujo la concentración inicial de glicerol a 0,01 [mol/L]

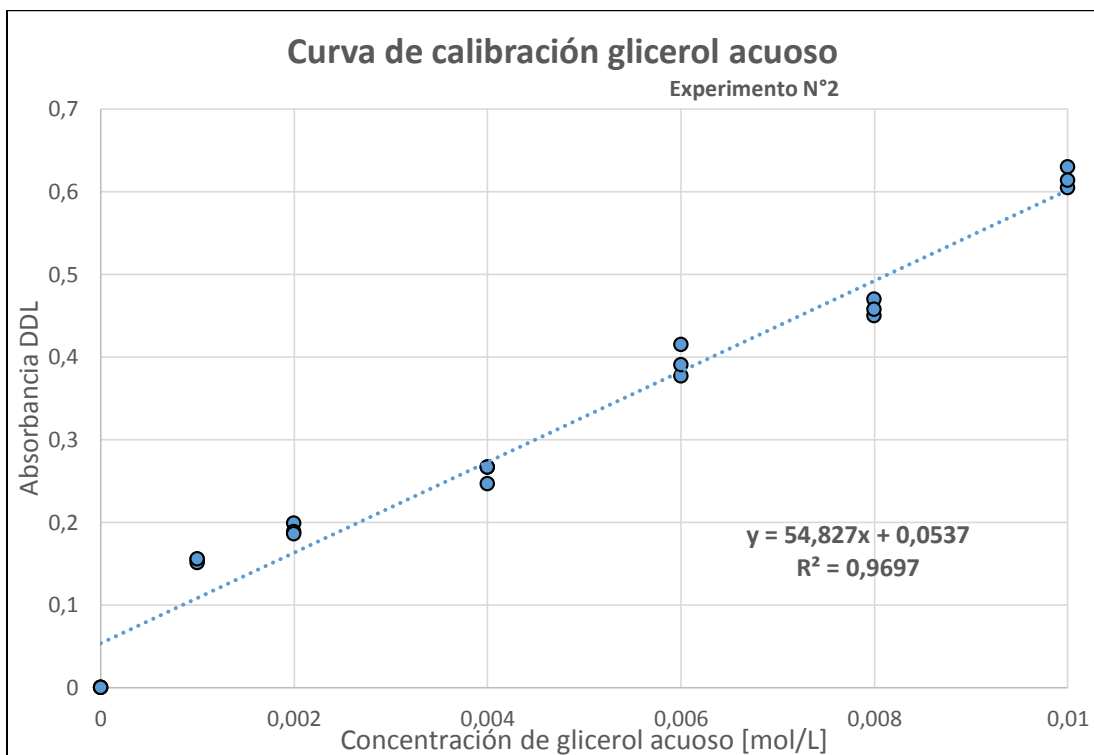


Ilustración 23: Curva de calibración glicerol acuoso. Experimento N°2

- Se obtuvo una nueva curva de calibración para la concentración de glicerol acuoso, tomando en cuenta las concentraciones menores de glicerol acuoso. Se obtuvo la recta de tendencia de los datos, de igual forma que lo realizado en el Experimento N°1, esta fórmula también fue utilizada para el Experimento N°3.

$$y = 54,827 x + 0,0537$$

Donde y es la absorbancia de DDL y x es la concentración de glicerol acuoso en la solución. El coeficiente de determinación en la regresión múltiple realizada, R-cuadrado, es de 0,9697, por lo cual se considera que la recta de tendencia es una buena aproximación.

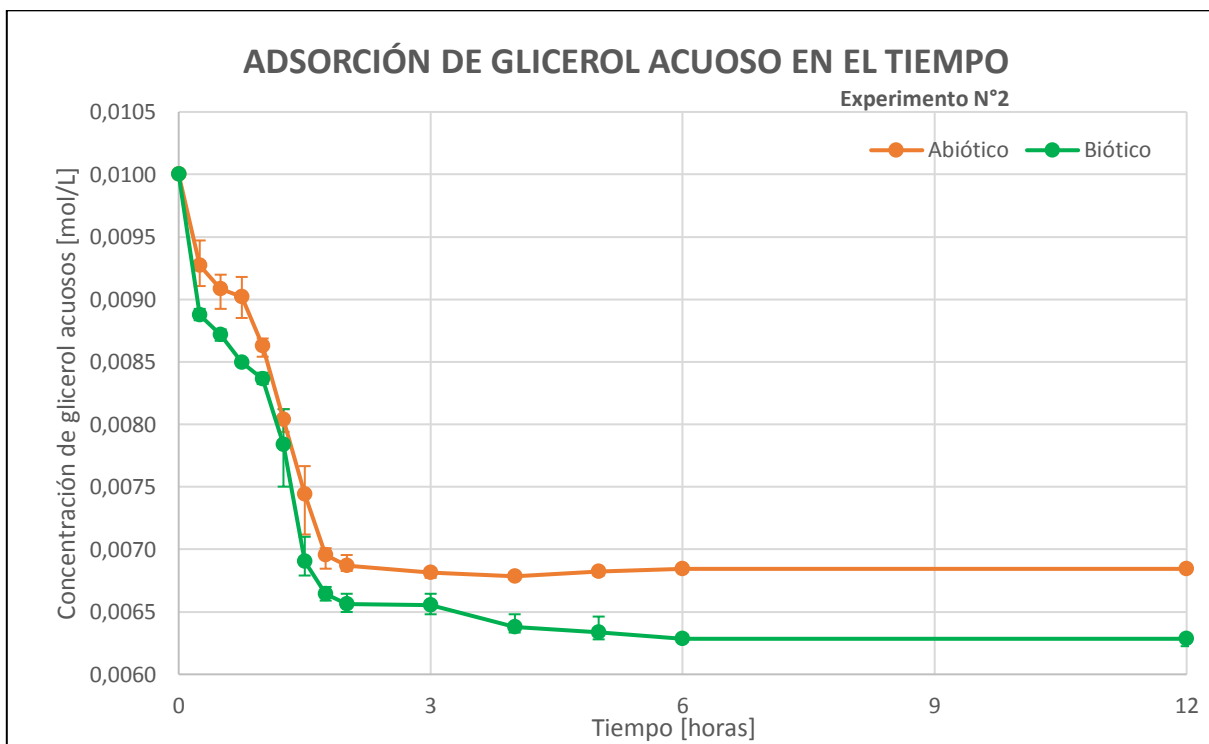


Ilustración 24: Gráfico Adsorción de glicerol acuoso en el tiempo. Experimento N°2.

En el gráfico de adsorción de glicerol acuoso en el transcurso del experimento se puede observar que las barras de error son menores, y que existe una diferencia entre la adsorción de sedimentos abióticos y bióticos, se observa que la adsorción en presencia de sedimentos no esterilizados es mayor que en otras condiciones, y por lo tanto la presencia de bacterias en los sedimentos tienen un impacto positivo sobre la adsorción del glicerol acuoso en el tiempo.

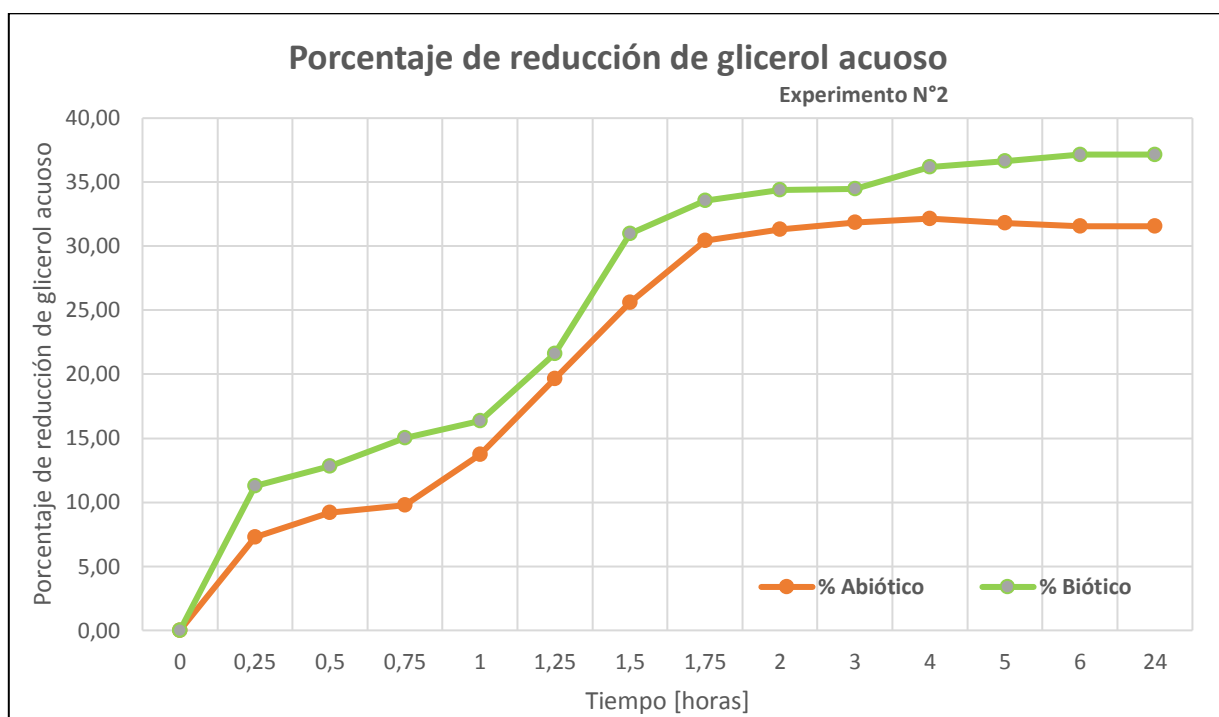


Ilustración 25: Gráfico de porcentaje de remoción de glicerol acuoso. Experimento N°2.

Debido a la disminución de glicerol disponible en la solución, es que disminuye el porcentaje de reducción del glicerol en la solución, existe una diferencia de alrededor 10% entre la adsorción abiótica con la adsorción biótica del glicerol acuoso. Para la construcción de isothermas de adsorción se utilizó la concentración de 0,01 [mol/L] como la concentración mayor del set de experimentos debido a los buenos resultados obtenidos del experimento N°2.

5.3.3. Resultados experimento N°3

- Se utilizó la curva de calibración obtenida en el experimento N°2 para obtener las concentraciones de glicerol acuoso en el set de experimentos realizado en esta parte de la investigación.

Se obtuvieron los gráficos del comportamiento del glicerol acuoso para cada una de las concentraciones iniciales de glicerol acuoso disponible en la solución.

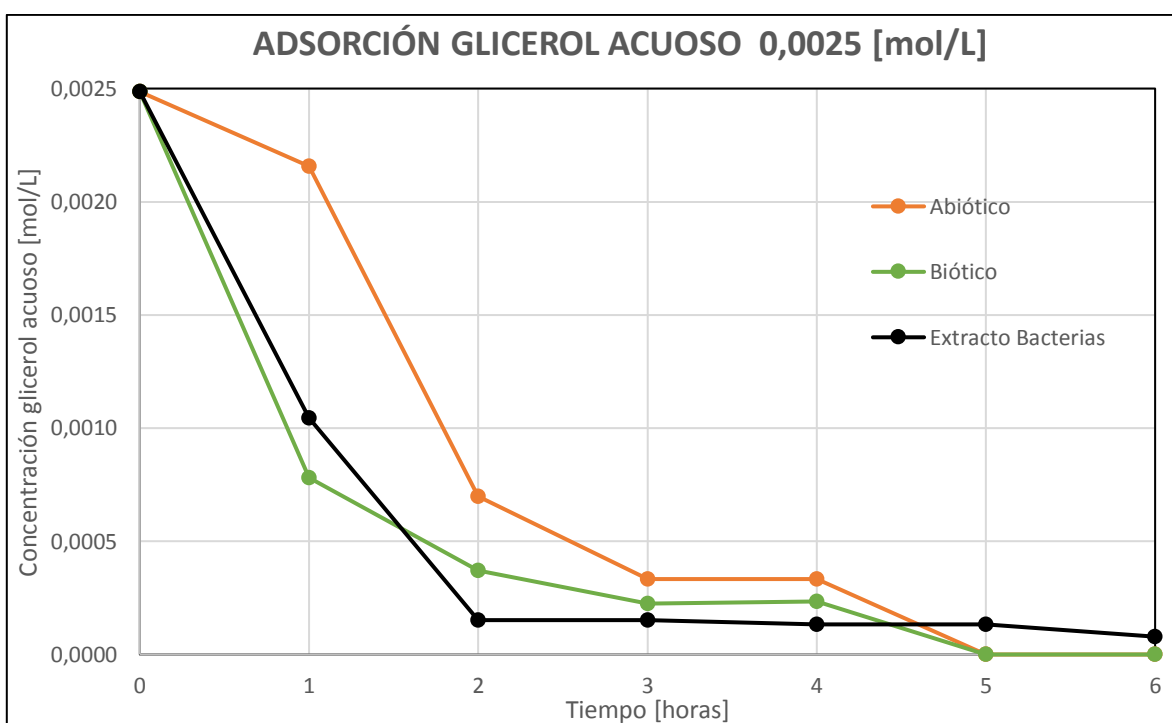


Ilustración 26: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,0025 [mol/L]. Experimento N°3

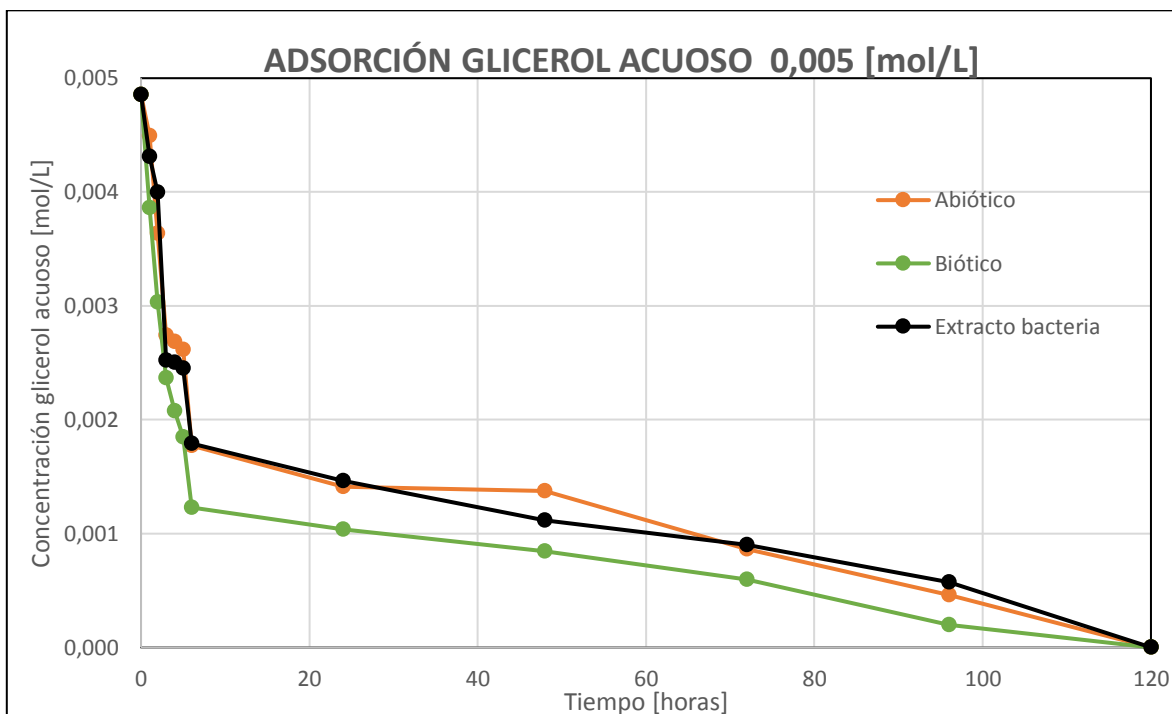


Ilustración 27: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,005 [mol/L]. Experimento N°3

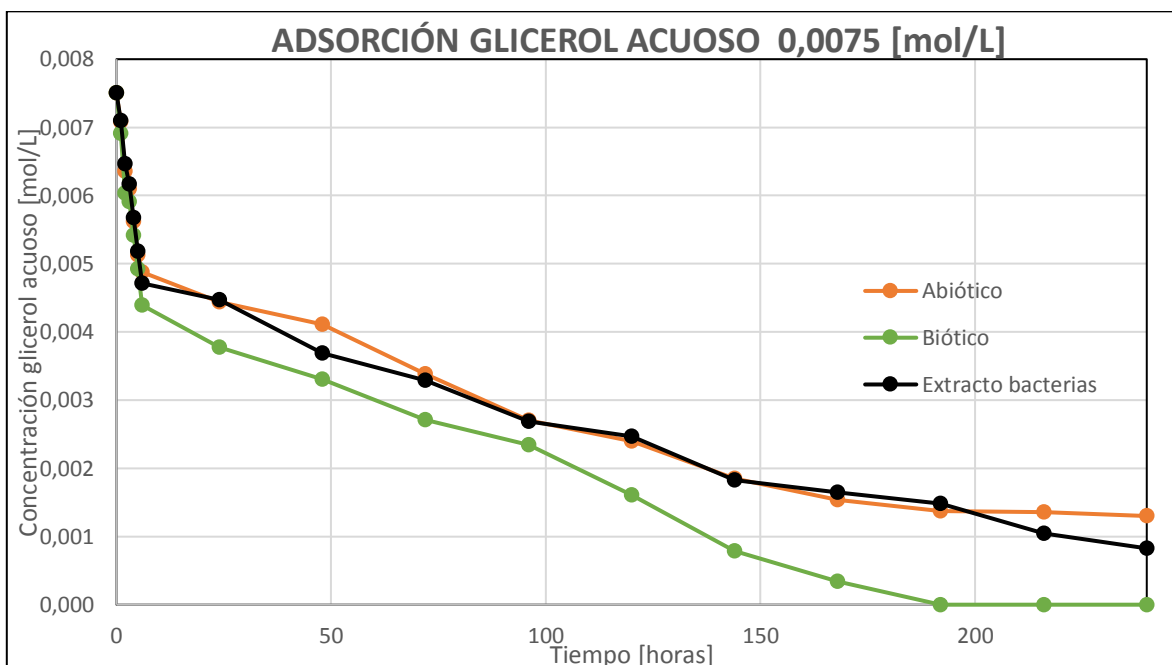


Ilustración 28: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,0075 [mol/L]. Experimento N°3

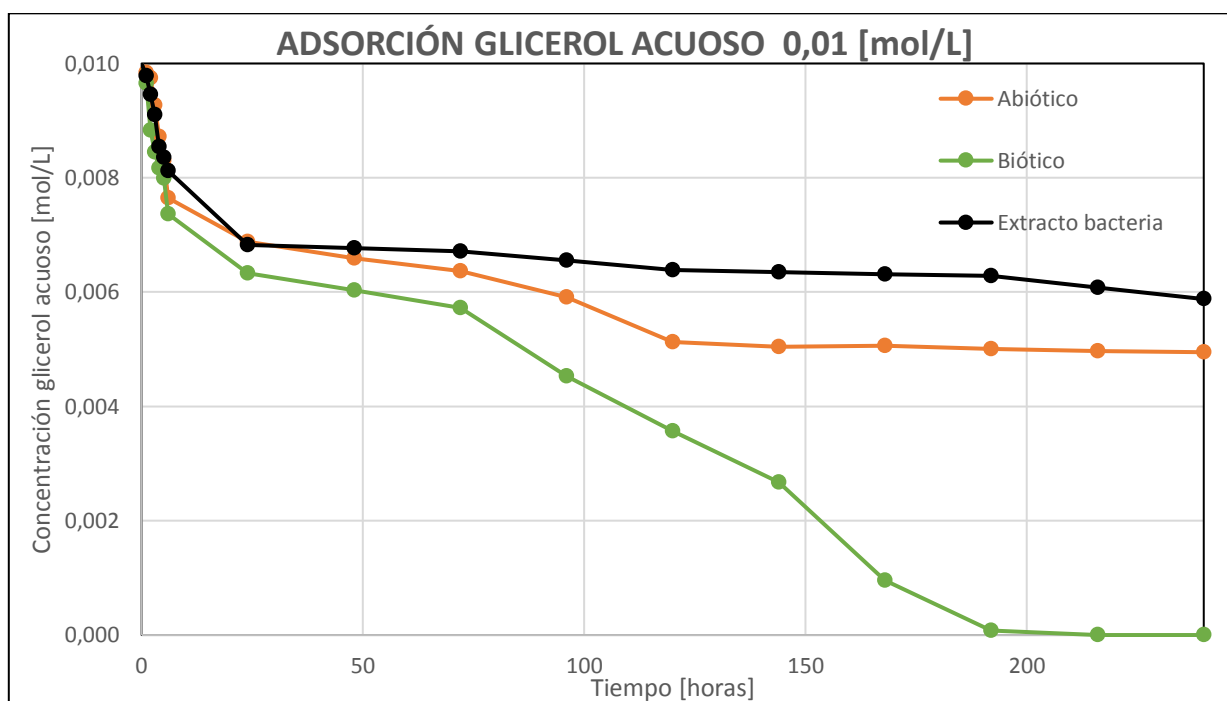


Ilustración 29: Gráfico de adsorción glicerol acuoso 0,01 [mol/L]. Experimento N°3

Se puede observar que en todos los gráficos de adsorción a distintas concentraciones iniciales, la adsorción con sedimentos del tipo bióticos, es decir, sin esterilizar, supera a la adsorción presentada con sedimentos abióticos y aquellos llevados con la solución de extracción de bacterias. Esto confirma que la presencia de bacterias en los sedimentos del río, contribuye de forma positiva en la adsorción de glicerol acuoso presente en la solución. Además se presenta un 100% de adsorción en los casos de sedimentos bióticos en todos los casos, para las dos primeras concentraciones, los tres tipos de muestras muestran un 100% de remoción de glicerol acuoso, mientras que en los dos últimos casos (concentración inicial de 0,0075 y 0,01 [mol/L]) las muestras abióticas y de extracto de bacterias no alcanza una remoción total del glicerol disponible en la solución.

Con los datos obtenidos en el set batch se modelaron las isothermas de adsorción descritas en la teoría.

➤ Modelo de Langmuir

Se graficó la forma lineal de la cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso del adsorbente en el equilibrio, donde la pendiente y el intercepto entregan los coeficientes necesarios para modelar las isotermas.

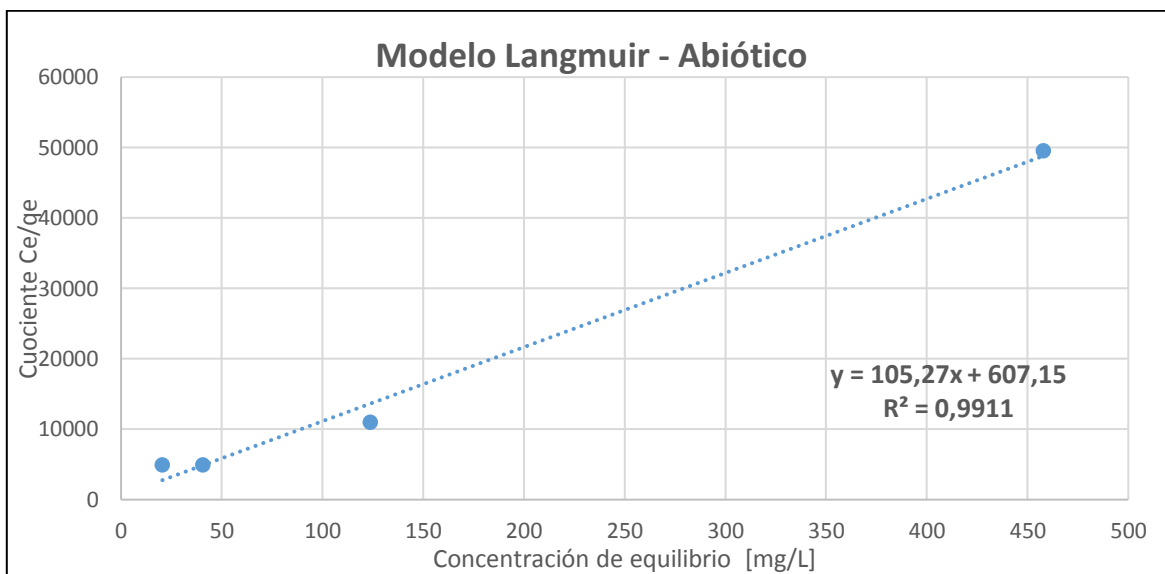


Ilustración 30: Gráfico Modelo Langmuir - Abiótico. Experimento N°3

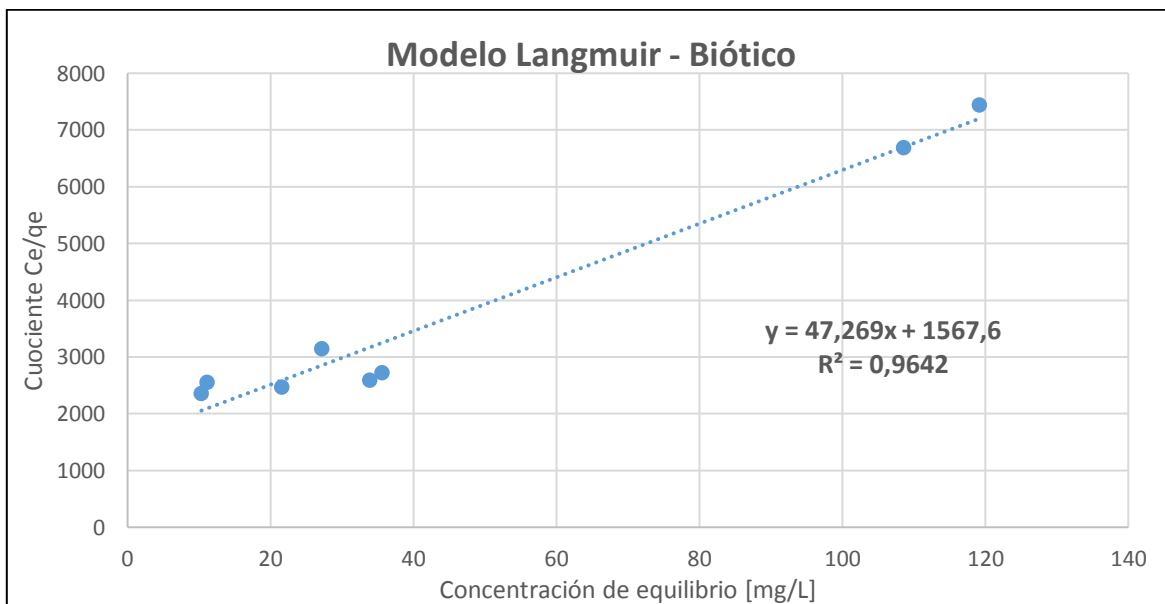


Ilustración 31: Gráfico Modelo Langmuir - Biótico. Experimento N°3

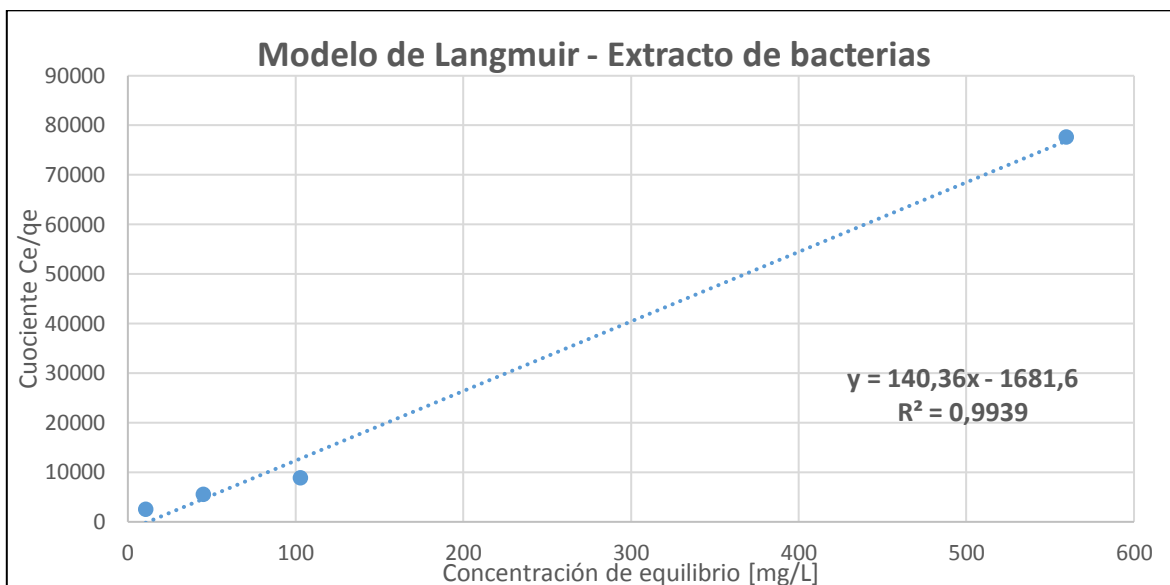


Ilustración 32: Gráfico Modelo Langmuir - Extracto de bacterias. Experimento N°3

De las regresiones lineales de los distintos tipos de experimento realizados se pudo obtener los parámetros que son parte del modelo de Langmuir de adsorción.

Parámetros	Abiótico	Biótico	Extracto
$\frac{1}{Q_0}$	105,27	47,269	140,36
$\frac{1}{b Q_0}$	607,15	1567,6	1681,6
R^2	0,9911	0,9642	0,9939

Tabla 15: Parámetros regresión lineal modelo Langmuir. Experimento N°3.

Parámetros Modelo Langmuir $q_e = \frac{Q_0 \cdot b \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e}$	Abiótico	Biótico	Extracto
Q_0	0,0095	0,0212	0,0071
b	0,1734	0,0302	0,0835

Tabla 16: Parámetros Modelo Langmuir. Experimento N°3.

Se puede observar que el parámetro Q_0 , que representa la capacidad máxima de adsorción, es mayor en los experimentos del tipo biótico, por lo que la suposición de que la adsorción mejora con la presencia de componentes bióticos de los sedimentos del río. Además se puede ver que el modelo se acerca a los datos experimentales debido a los valores de R^2 obtenidos, sin embargo, el parámetro es menor en la experimentación biótica.

➤ Modelo Freundlich

La representación lineal de los datos obtenidos también permitió obtener parámetros del modelo de isothermas de Freundlich.

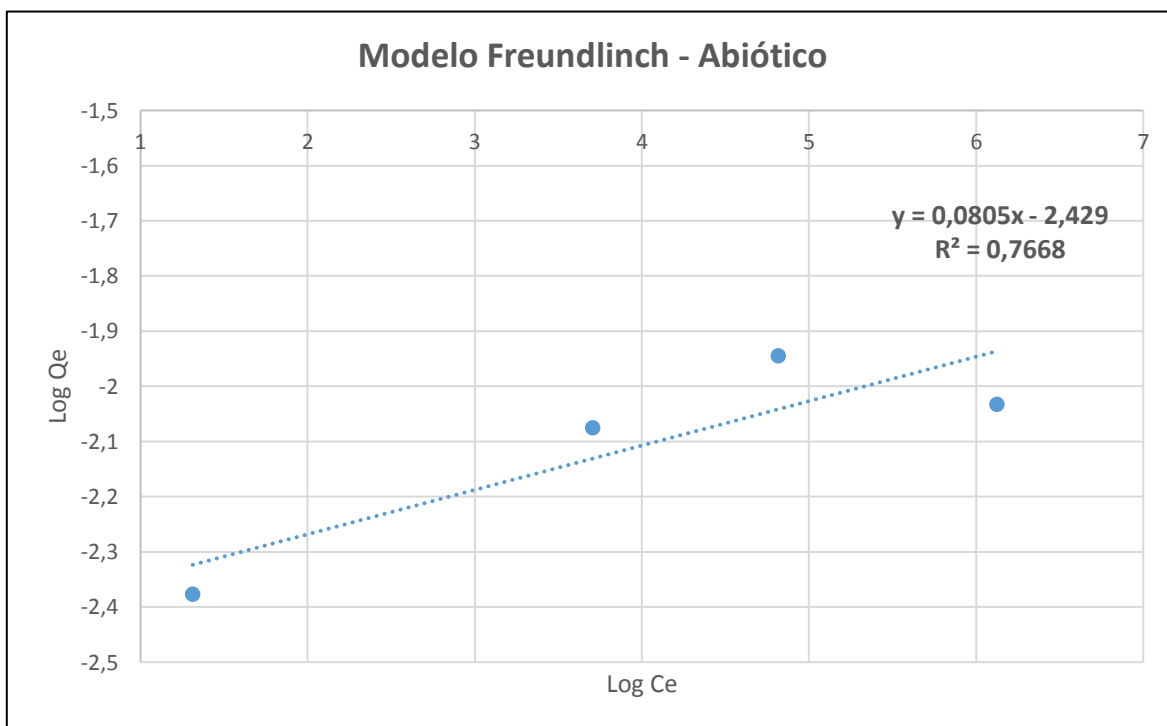


Ilustración 33: Gráfico Modelo Freundlich - Abiótico. Experimento N°3

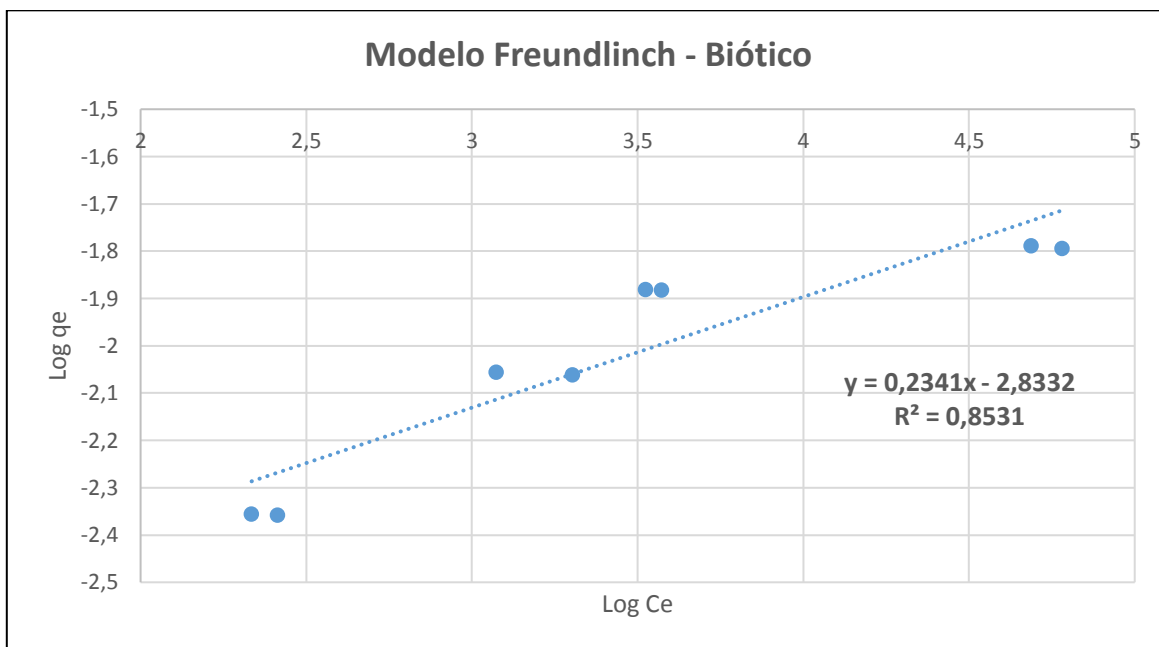


Ilustración 34: Gráfico Modelo Freundlich - Biótico. Experimento N°3

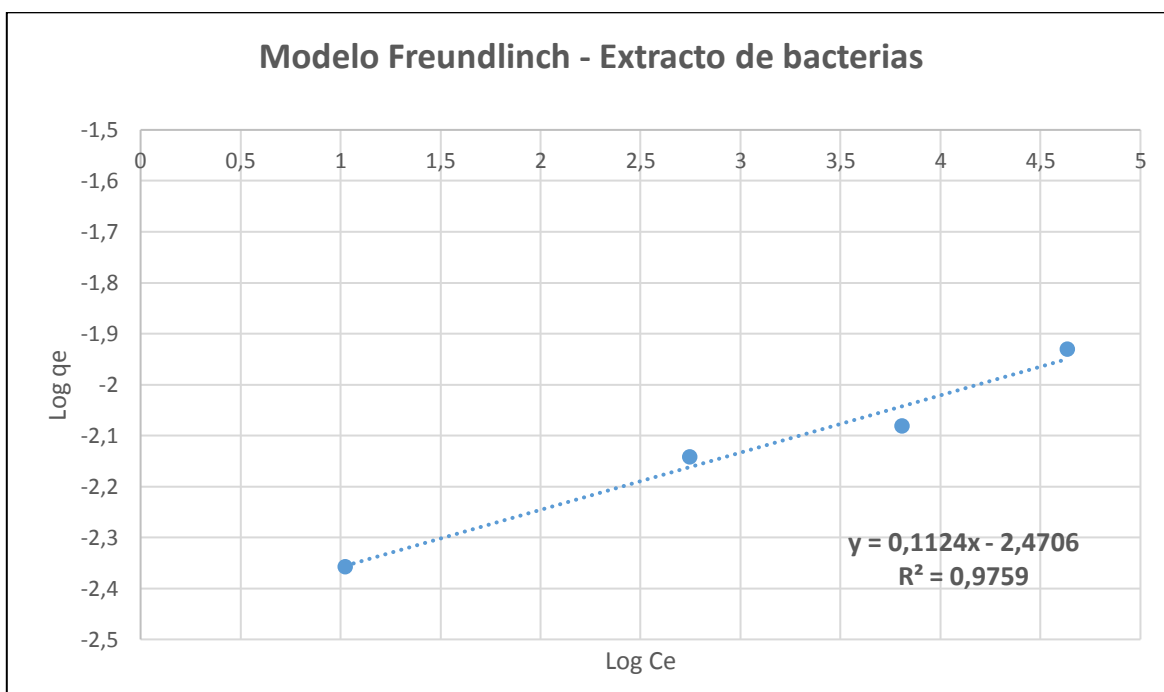


Ilustración 35: Gráfico Modelo Freundlich - Extracto de Bacterias. Experimento N°3

Con las regresiones lineales del modelo de Freundlich se puede obtener la constante relativa de la capacidad de adsorción del adsorbente, también llamada constante de Freundlich y la constante de intensidad de adsorción.

Parámetros	Abiótico	Biótico	Extracto
$\frac{1}{n}$	0,0805	0,2341	0,1124
$\log K_F$	-2,429	-2,8332	-2,4706
R^2	0,7668	0,8531	0,9759

Tabla 17: Parámetros regresión lineal modelo Freundlich Experimento N°3.

Parámetros Modelo Freundlich $q_e = K_F \cdot C_e^{1/n}$	Abiótico	Biótico	Extracto
n	12,422	4,272	8,897
K_F	0,004	0,001	0,003

Tabla 18: Parámetros Modelo Freundlich Experimento N°3.

La constante n permite diferenciar si el proceso de adsorción es llevada a través de un proceso químico, físico o la adsorción es del tipo lineal, los resultados obtenidos en este caso reflejan la dominancia del proceso físico en el caso abiótico y no así en los casos de sedimentos con componente biótico y los extracto de bacteria. De igual forma el parámetro $1/n$ refleja una adsorción cooperativa en el caso de la adsorción biótica.

➤ Modelos de biosorción

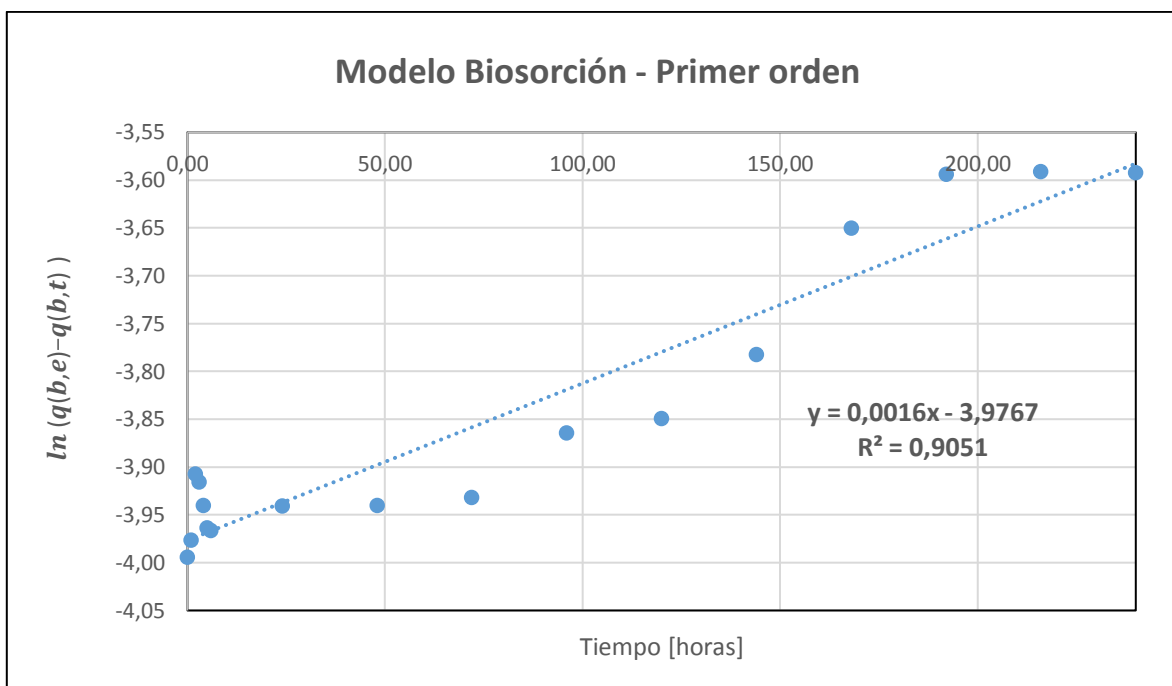


Ilustración 36: Modelo Biosorción -Primer orden. Experimento N°3.

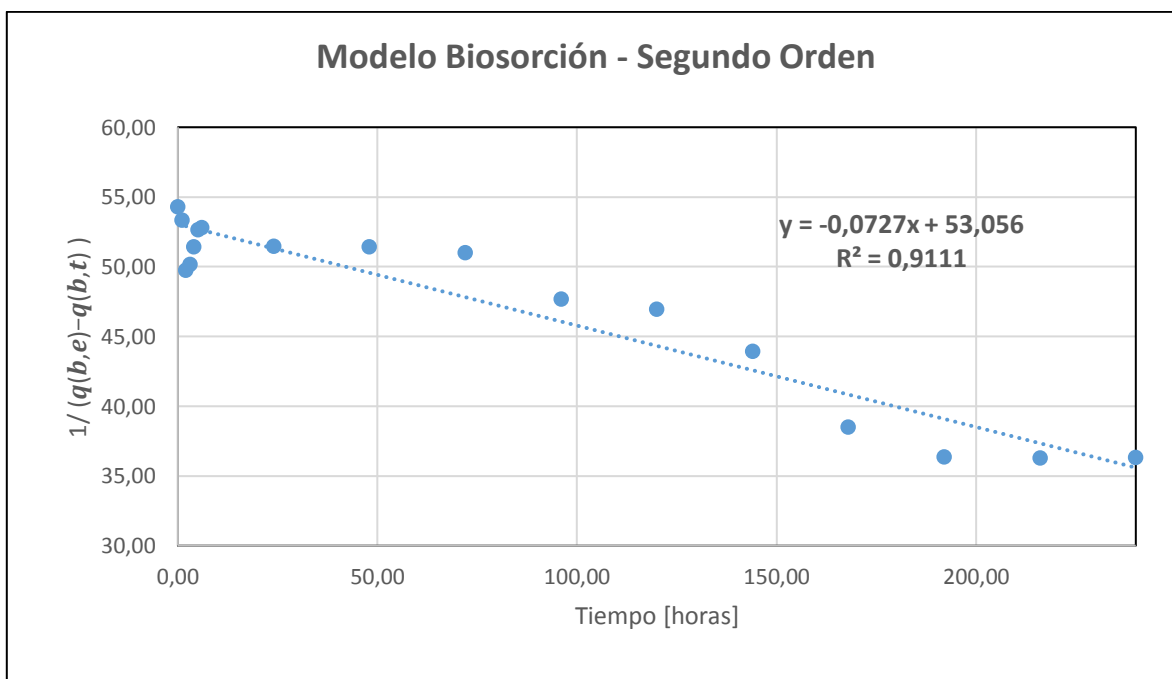


Ilustración 37: Modelo Biosorción - Segundoorden. Experimento N°3.

	Primer orden	Segundo orden
Pendiente	0,0016	-0,0727
Intercepto	-3,9767	53,056
R²	0,9051	0,9111
Q_{e,b}	0,018	0,018
k₁	-0,0016	-
k₂	-	-0,0727

Tabla 19: Parámetros Modelo de Biosorción. Experimento N°3.

Los modelos de biosorción son capaces de describir la adsorción del glicerol desde la solución hacia los sedimentos del río, se verifica la concordancia de los datos debido a que el valor de $Q_{e,b}$ es igual para ambos casos. El modelo de biosorción de segundo orden presenta mejores resultados con respecto a R^2 , aunque no se puede descartar un modelamiento a través de los parámetros de biosorción de primer orden pues los valores son aceptables.

6. Conclusión

El estudio de las secuencias del gen 16S rRNA fue una buena herramienta para el estudio taxonómico que mostró un aumento en la presencia de *Cyanobacterias* en los sedimentos del río y una disminución del filo *Bacteroidetes*. El aumento de *Cyanobacterias* (crecimiento de un 21,4% entre aguas arriba y aguas abajo) puede ser perjudicial en distintos ámbitos del ecosistema, con efectos negativos para animales y la especie humana, es necesario un estudio más exhaustivo del tipo de *Cyanobacteria* que aumenta el crecimiento en el caudal del río para conocer qué tipo de toxina produce y sus efectos en el medio ambiente. Por otra parte, la disminución de *Bacteroidetes* (disminución de 11,3%) puede presentarse como un beneficio debido a las condiciones patológicas que presentan este tipo de bacterias en los animales. Los estudios de diversidad alfa y beta además revelaron que las muestras obtenidas río arriba y río abajo tenían una profundidad genética suficiente para generar buenos resultados, es decir, la calidad de las muestras y los resultados del estudio de secuencias del gen 16s rRNA fue una buena opción para el estudio taxonómico realizado.

Para el mejor desarrollo de los experimentos de adsorción se barajaron dos opciones de esterilización de suelos, el uso de autoclave y de esterilización por radiación UV. Mediante dos técnicas de verificación de esterilización se fue capaz de encontrar que el mejor método de esterilización de los sedimentos del río para obtener muestras abióticas, es a través del uso del autoclave. Los métodos utilizados fueron: el conteo de UFC (unidades formadoras de colonias), donde las placas sembradas con muestras provenientes de sedimentos esterilizados con autoclave no presentaron crecimiento, mientras que las muestras esterilizadas con radiación UV presentaron un gran crecimiento bacteriano y hasta presencia de hongos. El otro método de verificación de esterilización se hizo a través del uso de un agente de viabilidad celular llamado PrestoBlue™ que corroboró los resultados encontrados a través del conteo de UFC, mostrando poca reducción del agente Resazurin (colorante azul) en las muestras esterilizadas por autoclave, en comparación con la reducción de la muestra en blanco y las esterilizadas con radiación UV.

En el desarrollo de los experimentos de adsorción de glicerol acuoso, se realizaron tres tipos de experimentación del tipo Batch. El primero, con concentración inicial de glicerol de 0,1 [mol/L] mostró resultados con grandes errores. Si bien refleja una adsorción rápida de glicerol acuoso (se alcanza un 60% de reducción), los errores no permiten diferenciar de forma concreta la adsorción con componente bióticos en los sedimentos, de la adsorción con los sedimentos del río esterilizados, la diferencia porcentual entre estos dos casos alcanza alrededor de un 5%. Por esto se decide hacer un experimento con menor concentración de glicerol acuoso disponible, para aumentar la sensibilidad de la medición del colorante DDL en las muestras; este segundo experimento del tipo Batch presentó mejores resultados (concentración inicial de 0,01 [mol/L]). Los errores disminuyeron y pudieron mostrar que los componentes bióticos presentes en los sedimentos del río generan un impacto positivo aumentando la adsorción del glicerol acuoso.

El último experimento del tipo Batch fue un set de matraces con distintas concentraciones iniciales para obtener modelos de adsorción encontrados en la teoría. La adsorción del glicerol acuoso es siempre más rápido y de mayor disminución que en los otros casos, corroborando la idea de una adsorción rápida de este tipo de contaminante. Los modelos de Langmuir presentaron mejores resultados que el modelo de Freundlich, se infiere que es por la base termodinámica presente en la teoría del primer modelo, además indica que la energía de adsorción no depende del grado de ocupación de las partículas de los sedimentos del río, debido a que el contaminante es utilizado como fuente de carbono para las células.

Los modelos de biosorción estudiados sobre la adsorción del tipo biótica mostraron buenos resultados para ambos casos (primer y segundo orden), pero el caso con mejores resultados de R^2 fue el modelo de segundo orden.

7. Proyecciones

Para obtener mejores resultados taxonómicos de las bacterias presentes en los sedimentos del río Oise se puede mejorar el sistema de toma de muestras, aumentar y especificar los puntos de muestra podrían generar más datos sobre el efecto de contaminantes sobre la biota de los sedimentos. Además podría generar una idea de cómo se mueve el contaminante sobre los sedimentos del río.

Para mejorar los modelos de adsorción, y acercarlos más a la realidad, se pueden realizar experimentos con más puntos de temperatura, considerando que se realizaron los experimentos con la temperatura media del río 13 [°C], debido a la gran variación de temperatura que tiene el río entre la época de verano y de invierno (0 – 26 [°C]).

Otra forma de mejorar los modelos de adsorción es la incorporación de un estudio de adsorción de glicerol acuoso utilizando un sistema de adsorción continuo a través de columnas de adsorción.

Como se mencionaba en un principio, esta es una investigación multidisciplinaria por lo que los resultados pueden ser complementados con otros obtenidos por otros grupos de trabajo que pueden aportar de forma positiva en los resultados de esta investigación, como es, encontrar el contaminante predominante en las aguas del río Oise y repetir los experimentos de adsorción con éste.

Bibliografía

- Acosta Peñaloza, G. S., Palacios Rincón, D. J., & Carvajal Restrepo, L. G. (2003). Evaluation of heat sterilization and microwaves sterilization of two types of soil . *Revista Científica de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas* 17, 87-93.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) & Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET). (2006). *Rapport sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et des autres activités récréative* .
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). Soil sampling, handling, storage and analysis. En *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego. USA.: Academic Press.
- Anderson, M. A., C. B., Hansmann, D., Loux, N., & Stanforth, R. (1981). Expectations and limitations for aqueous adsorption. Adsorption of inorganics at solid-liquid interfaces. *Ann Arbor Science Publishers Inc., Chap 9*, 327-347.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H., & Egli, T. (2007). Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3283–3290.
- Berns, A. E., Philipp, H., Narres, D., Burauel, P., Vereecken, H., & Tappe, W. (2008). Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science* 59, 540–550.
- Botella, L., Bimbela, F., Ábrego, J., Gonzalo, A., & Sánchez, J. L. (2014). El biodiésel dentro de la biorrefinería. Nuevas estrategias. *Boletín Grupo Español Carbón*(33), 7-10.
- Da Silva, P. G., Mack, M., & Contiero, J. (2009). A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30-39.

- Demirbas, A. (2010). *Biorefineries For Biomass Upgrading Facilities*. London: Springer.
doi:10.1007/978-1-84882-721-9
- Flach, B., Lieberz, S., Rondon, M., Williams, B., & Teiken, C. (2015). *EU Biofuels Annual 2015 - GAIN*. GAIN Report Number: NL5028.
- Giles, C. H., MacEwan, T. H., N, N. S., & Smith, D. (1960). Studies in Adsorption. Part XI. A system of classification of solution isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface of solids. *Journal of the Chemical Society*, 3973-3993.
- Janda, M. J., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761 - 2764.
- Kimble Chase Chromatography Products. (p. 2-17). Chromaflex®, Flex-Column® and Disposaflex® .
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2011). *Curr Protoc Bioinformatics*. (A. D. Baxevanis, Ed.) Editorial Board.
- Kuhn, J., Müller, H., Salziga, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method of an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 252-255.
- Laroussi, M., & Leipold, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry* 233, 81–86.
- Liu, S., Musuku, R., Adhikari, S., & Fernando, S. (2009). Adsorption of glycerol from biodiesel washwaters. *Environmental Technology*, 30(5), 505-510.



- Liu, Y., & Liu, Y.-J. (2008). Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. *Separation and Purification Technology*. Volumen 61, 229-242. doi:10.1016/j.seppur.2007.10.002
- McCabe, W., Smith, J., & Harriot, P. (1991). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química* (4° Ed. ed.). Madrid: McGraw-Hill.
- Meztanza Mateos, M. (2012). *Estudio de materiales adsorbentes para el tratamiento de aguas contaminadas con colorantes. Memoria para optar al grado de doctor*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Ingeniería Química, Madrid.
- Mo Bio Laboratories, Inc. (2013). PowerMax® Soil DNA Isolation Kit. Instrucion Manual.
- Molecular Probes - Life Technologies Corporation. (2011). *Processing Absorbance Data Obtained Using PrestoBlue™ Viability Reagent*.
- Molecular Probes. (2004). *Product Information: LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits*.
- Molecular Probes- Invitrogen. (Revision date: 10 Aug 2011). Product Information Sheet: Prestoblue™ Cell Viability Reagent Protocol.
- Muñoz Carpio, J. (2007). *Biosorción de plomo (II) por cáscara de naranja "citrus cinensis" pretratada. Trabajo de grado Ingeniero Químico*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química, Lima.
- Paredes Doig, A. L. (2011). Estudio de adsorción de compuestos aromáticos mediante carbón activo preparado a partir de la cáscara de castaña. 17. Lima: Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Perú. Facultad de Ciencias e Ingeniería.
- Plaza Cazón, J. (2012). Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Trabajo de tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Química. 8-9. Buenos Aires.



- Pressdee, J. R. (2006). Case studies of NF/RO Integration. En *Integration of Membrane Filtration into Water Treatment Systems* (pág. 73).
- Ru-Ling, T., Feng-Chin, W., & Ruey-Shin, J. (2010). Characteristics and applications of the Lagergren's first-order equation for adsorption kinetics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 41, 661–669.
- Salthammer, T. (1993). Photophysical properties of 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine in solution: application to the analysis of formaldehyde. *Photochem. Photobiol. A: Chem*, 74, 195-201.
- Tascón, J. M. (2013). La teoría de Ostwald-de Izaguirre sobre adsorción en disolución. Instituto Nacional del Carbón. INCAR-CSIC. *Anales Real Sociedad Española de Química*, 109(3), 201-208.
- Thomas, F., Hehemann, J., Rebuffet, E., Czjzek, M., & Michel, G. (2011). Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Frontiers in Microbiology*, 2(93).
- Trevors, J. T. (1996). Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26, 53-59.
- U. S. Environmental Protection Agency (EPA). (1985). *Land disposal of hazardous waste Hazardous waste engineering research laboratory office of research and development*. Cincinnati, Ohio.
- Vera, C., Busto, M., Yori, J., Torres, G., Manuale, D., Canavese, S., & Sepúlveda, J. (2011). *Adsorption in biodiesel refining - A Review*. (D. M. Stoytcheva, Ed.) InTech.
- Villareal, H., Álvarez, M., Córdova, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., . . . Umaña, A. M. (2004). *Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad*. IAVH.

Anexos

Anexo N°1: Análisis Taxonómico

Taxonomía	US	DS
	%	%
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__g__	0,9	3,9
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__Flavobacterium	0,5	3,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfuromonadales;f__Geobacteraceae;g__Geobacter	0,3	2,5
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Chitinophagaceae;g__	1,9	3,4
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae;o__Verrucomicrobiales;f__Verrucomicrobiaceae;g__Luteolibacter	0,6	2,1
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Xanthomonadaceae;g__	0,7	2,1
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia;o__Flavobacteriales;f__Flavobacteriaceae;g__	0,2	1,4
k__Bacteria;p__Nitrospirae;c__Nitrospira;o__Nitrospirales;f__Nitrospiraceae;g__Nitrospira	2,8	3,6
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Xanthomonadales;f__Sinobacteraceae;g__	3,2	4
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Thiotrichales;f__Piscirickettsiaceae;g__	1,5	2,2
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia;o__Sphingobacteriales;f__g__	0,6	1,3
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Rikenellaceae;g__Blvii28	0,1	0,7
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__SB-1;g__	0,1	0,7

k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfuromonadales;f__Geobacteraceae;g__	0,1	0,7
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprospirae];o__[Saprospirales];f__Saprospiraceae;g__	1,4	1,9
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfuromonadales;f__Desulfuromonadaceae;g__	0,1	0,6
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__[Pedosphaerae];o__[Pedosphaerales];f__auto67_4W;g__	1,8	2,2
k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__[Chloracidobacteria];o__RB41;f__Ellin6075;g__	0,6	1
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Opitutae;o__Opitutales;f__Opitutaceae;g__	0,1	0,5
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Sulfuritalea	0,2	0,6
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Alteromonadales;f__OM60;g__	0,2	0,6
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__[Pedosphaerae];o__[Pedosphaerales];f__Ellin515;g__	0,3	0,7
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Oscillatoriohyphycideae;o__Chroococcales;f__Xenococcaceae;g__	0,1	0,4
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__Pseudomonas	0,1	0,4
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__[Pedosphaerae];o__[Pedosphaerales];f__;g__	0,8	1,1
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodobacterales;f__Hyphomonadaceae;g__	0,3	0,6
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Pseudomonadaceae;g__	0	0,3
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Opitutae;o__Opitutales;f__Opitutaceae;g__Opitutus	0,4	0,7
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia;o__Cytophagales;f__Cytophagaceae;g__	2,6	2,9

k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Rhodospirillales;f__Rhodospirillaceae;g__	0,7	0,9
k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia;o__Bacteroidales;f__Porphyromonadaceae;g__Paludibacter	0	0,2
k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia;o__Clostridiales;f__[Acidaminobacteraceae];g__Fusibacter	0	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__f__g__	0,3	0,5
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;g__Comamonas	0	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfobacterales;f__Desulfobulbaceae;g__Desulfobulbus	0	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Oceanospirillales;f__Halomonadaceae;g__	0	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__Pseudomonadales;f__Moraxellaceae;g__Perluclidibaca	0	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria;o__[Marinicellales];f__[Marinicellaceae];g__	0,3	0,5
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Rhodocyclales;f__Rhodocyclaceae;g__Dechloromonas	0,1	0,3
k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Acidobacteria-6;o__iii1-15;f__g__	1,4	1,2
k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Anaerolineae;o__envOPS12;f__g__	1	0,8
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__SBla14;f__g__	0,7	0,5
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Syntrophobacterales;f__Syntrophobacteraceae;g__	0,7	0,5

k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfarculales;f__Desulfarculaceae;g__	0,3	0,1
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Acidimicrobiia;o__Acidimicrobiales;f__;g__	0,4	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__MBNT15;f__;g__	0,5	0,3
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__NB1-j;f__MND4;g__	0,5	0,3
k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__RB25;o__;f__;g__	0,7	0,4
k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__Planctomycetia;o__Pirellulales;f__Pirellulaceae;g__	0,7	0,4
k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__Planctomycetia;o__Planctomycetales;f__Planctomycetaceae;g__Planctomyces	0,7	0,4
k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophilia;o__Gaiellales;f__Gaiellaceae;g__	0,6	0,3
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Hydrogenophilales;f__Hydrogenophila ceae;g__Thiobacillus	0,6	0,3
k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Anaerolineae;o__GCA004;f__;g__	0,4	0,1
k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Ellin6529;o__;f__;g__	0,6	0,2
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria;o__Desulfobacterales;f__Desulfobacterac eae;g__Desulfococcus	0,7	0,3
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Ellin6067;f__;g__	1,3	0,9
k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Acidobacteria-6;o__CCU21;f__;g__	1,4	0,9
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__;f__;g__	2,1	1,4
k__Bacteria;p__Nitrospirae;c__Nitrospira;o__Nitrospirales;f__FW;g__4-29	1,2	0,4
k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__;o__;f__;g__	1,3	0,5
k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast;o__Stramenopiles;f__;g__	25,9	4,5

Tabla 20: Resultados taxonómicos extracción de ADN.

Anexo N°2: Resultados Experimento N°1

Concentración glicerol [mol/L]	Absorbancia		
0	0	0	0
0,01	0,195	0,179	0,187
0,02	0,267	0,262	0,264
0,04	0,454	0,451	0,453
0,07	0,674	0,742	0,708
0,1	1,166	1,193	1,18

Tabla 21: Curva de calibración. Experimento N°1

Time [h]	Abiótico			Biótico			
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A4
0	1,182	1,182	1,182	1,182	1,182	1,182	1,182
0,25	1,154	0,999	1,095	1,025	1,009	1,158	1,036
0,5	1,108	1,032	1,089	0,917	0,992	0,926	0,987
0,75	0,97	1,045	1,134	0,962	0,956	0,957	0,966
1	0,963	1,033	1,057	0,956	0,932	0,953	0,939
1,25	0,921	0,944	1,055	0,943	0,875	0,964	0,942
1,5	0,92	0,958	1,051	0,898	0,865	0,996	0,946
1,75	0,994	0,987	0,967	0,834	0,839	0,934	0,943
2	0,854	0,877	0,845	0,764	0,756	0,789	0,770
3	0,738	0,632	0,666	0,589	0,68	0,707	0,672
4	0,653	0,634	0,658	0,521	0,65	0,558	0,525
5	0,527	0,59	0,648	0,505	0,532	0,599	0,489
6	0,553	0,588	0,598	0,501	0,531	0,601	0,480
12	0,552	0,59	0,591	0,501	0,529	0,602	0,489
18	0,586	0,591	0,563	0,502	0,53	0,599	0,480
24	0,582	0,567	0,584	0,503	0,529	0,601	0,480

Tabla 22: Absorbancia DDL de las muestras. Experimento N°1

Tiempo [horas]	Abiótico				Biótico				
	A1	A2	A3	Promedio	A1	A2	A3	A4	Promedio
0	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105
0,25	0,103	0,089	0,097	0,096	0,091	0,090	0,103	0,092	0,094
0,5	0,099	0,092	0,097	0,096	0,081	0,088	0,082	0,088	0,085
0,75	0,086	0,093	0,101	0,093	0,085	0,085	0,085	0,086	0,085

1	0,085	0,092	0,094	0,090	0,085	0,083	0,084	0,083	0,084
1,25	0,082	0,084	0,094	0,086	0,084	0,077	0,085	0,083	0,082
1,5	0,081	0,085	0,093	0,087	0,079	0,076	0,088	0,084	0,082
1,75	0,088	0,088	0,086	0,087	0,074	0,074	0,083	0,084	0,079
2	0,075	0,078	0,075	0,076	0,067	0,067	0,070	0,068	0,068
3	0,065	0,055	0,058	0,059	0,051	0,060	0,062	0,059	0,058
4	0,057	0,055	0,058	0,057	0,045	0,057	0,048	0,045	0,049
5	0,046	0,051	0,057	0,051	0,044	0,046	0,052	0,042	0,046
6	0,048	0,051	0,052	0,050	0,043	0,046	0,052	0,041	0,046
12	0,048	0,051	0,051	0,050	0,043	0,046	0,052	0,042	0,046
18	0,051	0,051	0,049	0,050	0,043	0,046	0,052	0,041	0,046
24	0,051	0,049	0,051	0,050	0,043	0,046	0,052	0,041	0,046

Tabla 23: Concentración de glicerol de las muestras. Experimento N°1.

Tiempo [horas]	Abiótico	Biótico
0	0%	0%
0,25	9%	11%
0,5	9%	20%
0,75	11%	19%
1	14%	21%
1,25	18%	22%
1,5	18%	22%
1,75	17%	25%
2	28%	36%
3	44%	45%
4	46%	54%
5	51%	56%
6	52%	57%
12	52%	56%
18	52%	57%
24	52%	57%

Tabla 24: Porcentaje de reducción de glicerol acuoso. Experimento N°1

Anexo N°3: Resultados Experimento N°2

Tiempo [h]	Abiótico				Biótico				
	A1	A2	A3	Promedio	A1	A2	A3	A4	Promedio
0	0,602	0,602	0,602	0,602	0,602	0,602	0,602	0,602	0,602
0,25	0,553	0,573	0,56	0,562	0,538	0,54	0,543	0,540	0,540
0,5	0,543	0,558	0,554	0,552	0,531	0,533	0,534	0,529	0,532
0,75	0,539	0,557	0,549	0,548	0,519	0,521	0,519	0,519	0,520
1	0,522	0,53	0,528	0,527	0,51	0,515	0,511	0,513	0,512
1,25	0,499	0,495	0,489	0,494	0,472	0,465	0,498	0,499	0,484
1,5	0,474	0,467	0,444	0,462	0,426	0,429	0,431	0,443	0,432
1,75	0,429	0,438	0,438	0,435	0,415	0,417	0,419	0,421	0,418
2	0,428	0,428	0,435	0,430	0,41	0,415	0,411	0,418	0,414
3	0,429	0,428	0,425	0,427	0,412	0,413	0,418	0,409	0,413
4	0,427	0,425	0,425	0,426	0,409	0,402	0,401	0,402	0,404
5	0,428	0,426	0,429	0,428	0,408	0,399	0,398	0,399	0,401
6	0,429	0,429	0,429	0,429	0,398	0,398	0,397	0,400	0,398
24	0,429	0,428	0,43	0,429	0,399	0,4	0,395	0,399	0,398

Tabla 25: Absorbancia DDL de las muestras. Experimento N°2

Tiempo [horas]	Abiótico				Biótico				
	A1	A2	A3	Promedio	A1	A2	A3	A4	Promedio
0	0,010001	0,010001	0,010001	0,010001	0,010001	0,010001	0,010001	0,010001	0,010001
0,25	0,009107	0,009472	0,009235	0,009271	0,008833	0,008870	0,008924	0,008870	0,008874
0,5	0,008924	0,009198	0,009125	0,009083	0,008706	0,008742	0,008760	0,008669	0,008719
0,75	0,008851	0,009180	0,009034	0,009022	0,008487	0,008523	0,008487	0,008487	0,008496
1	0,008541	0,008687	0,008651	0,008627	0,008323	0,008414	0,008341	0,008377	0,008364
1,25	0,008122	0,008049	0,007940	0,008037	0,007629	0,007502	0,008104	0,008122	0,007839
1,5	0,007666	0,007538	0,007119	0,007441	0,006790	0,006845	0,006882	0,007101	0,006904
1,75	0,006845	0,007009	0,007009	0,006955	0,006590	0,006626	0,006663	0,006699	0,006645
2	0,006827	0,006827	0,006955	0,006869	0,006499	0,006590	0,006517	0,006645	0,006562
3	0,006845	0,006827	0,006772	0,006815	0,006535	0,006553	0,006645	0,006480	0,006553

4	0,006809	0,006772	0,006772	0,006784	0,006480	0,006353	0,006334	0,006353	0,006380
5	0,006827	0,006790	0,006845	0,006821	0,006462	0,006298	0,006280	0,006298	0,006334
6	0,006845	0,006845	0,006845	0,006845	0,006280	0,006280	0,006262	0,006316	0,006284
12	0,006845	0,006827	0,006863	0,006845	0,006298	0,006316	0,006225	0,006298	0,006284
18	0,007	0,007	0,007	0,007	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
24	0,007	0,007	0,007	0,007	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006

Tabla 26: Concentración de glicerol de las muestras. Experimento N°2.

Tiempo [horas]	% Abiótico	% Biótico
0	0,00	0
0,25	7,29	11,26
0,5	9,17	12,81
0,75	9,78	15,04
1	13,73	16,36
1,25	19,63	21,61
1,5	25,59	30,96
1,75	30,45	33,55
2	31,31	34,38
3	31,85	34,47
4	32,16	36,20
5	31,79	36,66
6	31,55	37,16
24	31,55	37,16

Tabla 27: Porcentaje de reducción de glicerol acuoso. Experimento N°2.

Anexo N°4: Resultados Experimento N°3

Inicial	Muestra	Tiempo																
		0	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas	1 días	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días	8 días	9 días	10 días
0,0025	1A	0,19	0,172	0,092	0,072	0,072	0,053	0,05	0,049	0,023	0,013	0,012	0,011	0,009	0,009	0,009	0,006	0,003
	1B	0,19	0,104	0,079	0,071	0,066	0,05	0,048	0,031	0,022	0,011	0,006	0,005	0,005	0,005	0,003	0	0
	1B	0,19	0,089	0,069	0,061	0,067	0,047	0,045	0,029	0,018	0,010	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0	0
	1S	0,19	0,111	0,062	0,062	0,061	0,061	0,058	0,05	0,03	0,015	0,008	0,007	0,007	0,006	0,004	0,003	0,003
0,005	1A	0,32	0,3	0,253	0,204	0,201	0,197	0,151	0,131	0,129	0,101	0,079	0,045	0,03	0,011	0,009	0,005	0,003
	1B	0,32	0,269	0,221	0,175	0,164	0,158	0,119	0,108	0,099	0,084	0,062	0,031	0,012	0,005	0,003	0	0
	1B	0,32	0,262	0,219	0,192	0,171	0,152	0,123	0,113	0,101	0,089	0,067	0,036	0,015	0,005	0,004	0	0
	1S	0,32	0,29	0,273	0,192	0,191	0,188	0,152	0,134	0,115	0,103	0,085	0,049	0,023	0,008	0,007	0,007	0,005
0,0075	1A	0,465	0,442	0,402	0,388	0,362	0,335	0,321	0,297	0,279	0,239	0,202	0,185	0,155	0,138	0,129	0,128	0,125
	1B	0,465	0,433	0,383	0,378	0,349	0,322	0,291	0,265	0,233	0,201	0,189	0,145	0,099	0,072	0,045	0,023	0
	1B	0,465	0,432	0,386	0,377	0,352	0,325	0,298	0,256	0,237	0,204	0,175	0,139	0,095	0,073	0,043	0,022	0
	1S	0,465	0,443	0,408	0,392	0,365	0,338	0,312	0,299	0,256	0,234	0,201	0,189	0,154	0,144	0,135	0,111	0,099
0,01	1A	0,602	0,593	0,588	0,562	0,532	0,509	0,473	0,431	0,415	0,403	0,378	0,335	0,33	0,331	0,328	0,326	0,325
	1B	0,602	0,585	0,544	0,512	0,501	0,485	0,452	0,403	0,380	0,356	0,298	0,243	0,198	0,101	0,056	0,023	0
	1B	0,602	0,581	0,532	0,522	0,502	0,499	0,463	0,399	0,389	0,379	0,306	0,256	0,203	0,111	0,06	0,025	0
	1S	0,602	0,59	0,572	0,553	0,522	0,512	0,499	0,428	0,425	0,422	0,413	0,404	0,402	0,4	0,398	0,387	0,376

Tabla 28: Absorbancia DDL de las muestras. Experimento N°3

Modelo Langmuir		
Abiótico		
Ce	Q	Ce/Q
20,491692	0,00419467	4885,17829
40,6474547	0,00839605	4841,25873
123,677999	0,01133994	10906,4068
457,92773	0,00925945	49455,2007
Biótico		
Ce	Q	Ce/Q
10,3298284	0,0043979	2348,80746
11,1696518	0,00438111	2549,50448
21,6114566	0,00877677	2462,34714
27,2102796	0,00866479	3140,32605
35,6085141	0,01310133	2717,9313
33,9288672	0,01313492	2583,10369
108,561177	0,01624678	6682,01336
119,198941	0,01603402	7434,12645
Extracto de bacterias		
Ce	Q	Ce/Q
10,5817754	0,00439286	2408,85541
45,1265131	0,00830647	5432,69458
102,962354	0,01175425	8759,58303
559,826308	0,00722147	77522,445

Tabla 29: Datos Modelo Langmuir. Experimento N°3.

Modelo Freundlich	
Abiótico	
Ln qe	Ln ce
-2,3773026	1,31157782
-2,07592494	3,70493622
-1,94538924	4,81768141
-2,03341503	6,12671138
Biótico	
Ln qe	Ln ce
-2,35675431	2,33503567
-2,35841614	2,41320044
-2,05666524	3,07322357
-2,06224174	3,30359483
-1,88268462	3,57258477
-1,88157248	3,52426619
-1,7892328	4,68731386
-1,79495755	4,78079387
Extracto de bacterias	
Ln qe	Ln ce
-2,35725219	1,02455854
-2,08058351	3,80946995
-1,92980497	4,63436343
-2,14137416	2,7480533

Tabla 30: Datos Modelo Freundlich. Experimento N°3.

Diferencia Qe	Tiempo [horas]																
Inicial	0	1	2	3	4	5	6	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
230,23	0,00	-126,	-30,23	-10,08	-9,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
460,45	0,00	-57,95	-55,43	-34,43	-56,27	-70,55	-50,39	-34,43	-48,71	-24,35	-24,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
690,68	0,00	-15,96	-29,39	-17,64	-19,32	-19,32	-44,51	-61,31	-73,90	-61,31	-33,59	-72,22	-97,42	-110,0	-126,5	-124,8	-119,8
920,90	0,00	-16,80	-83,98	-75,58	-51,23	-28,55	-26,03	-50,39	-51,23	-59,63	-127,6	-143,6	-217,5	-377,9	-453,5	-457,4	-455,7
Qe	Tiempo																
Inicial	0	1	2	3	4	5	6	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
230,23	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
460,45	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
690,68	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
920,90	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
Modelo Biosorción Primer Orden																	
In	Tiempo																
Inicial	0	1	2	3	4	5	6	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
230,23	-5,38	-4,94	-5,26	-5,34	-5,34	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38	-5,38
460,45	-4,69	-4,57	-4,57	-4,62	-4,57	-4,55	-4,58	-4,62	-4,59	-4,64	-4,64	-4,69	-4,69	-4,69	-4,69	-4,69	-4,69
690,68	-4,28	-4,26	-4,24	-4,26	-4,25	-4,25	-4,22	-4,20	-4,18	-4,20	-4,23	-4,18	-4,15	-4,13	-4,11	-4,12	-4,12
920,90	-3,99	-3,98	-3,91	-3,92	-3,94	-3,96	-3,97	-3,94	-3,94	-3,93	-3,86	-3,85	-3,78	-3,65	-3,59	-3,59	-3,59
Modelo Biosorción Segundo Orden																	
1/qe	Tiempo [horas]																
Inicial	0	1	2	3	4	5	6	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
230,23	217,2	140,04	191,97	208,07	208,80	217,18	217,18	217,2	217,2	217,2	217,2	217,2	217,2	217,2	217,2	217,2	217,2
460,45	108,6	96,45	96,92	101,03	96,76	94,16	97,88	101,0	98,20	103,1	103,1	108,6	108,6	108,6	108,6	108,6	108,6
690,68	72,39	70,76	69,44	70,59	70,42	70,42	68,01	66,49	65,40	66,49	69,04	65,54	63,44	62,45	61,19	61,31	61,70
920,90	54,29	53,32	49,76	50,18	51,43	52,66	52,80	51,48	51,43	50,99	47,68	46,97	43,92	38,50	36,38	36,28	36,32

Tabla 31: Datos Modelos Biosorción. Experimento N°3.