

Treball Final de Màster

Enginyeria Ambiental

Utilització de piles microbianes com a
bioindicadors d'activitat biològica en
entorns de recàrrega gestionada d'aqüífers

- MEMÒRIA -

Autor:

Guillem de Lorenzo Martínez

Directors:

Paula Rodríguez i Escales

Xavier Sanchez-Vila

Barcelona, 27 de setembre de 2024



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
de Camins, Canals i Ports de Barcelona**

Abstract

The increase in water demand, the overexploitation of water resources and the climate change challenges makes water management improvement a priority, especially in sensitive areas, as is the case in the Mediterranean area and Catalonia.

Technologies such as desalination or waste water regeneration are becoming more and more important in obtaining and improving water resources to counteract the scarcity and seasonality of surface water and the overexploitation of aquifers.

Managed aquifers recharge (MAR), combined with soil-aquifer treatments (SAT) and the use of reactive barriers makes possible to counteract overexploitation and increase in the availability of underground water resources with treated wastewater, adding an energy passive tertiary treatment that takes advantage of the natural treatment capacities of the soil.

In this process, monitoring the operation of the system and evaluating the quality of the water is one of the great challenges and an indispensable condition for this technology to be viable.

Microbial fuel cells (MFCs), initially focused on obtaining energy from organic waste, are gaining more and more relevance and interest from the scientific community, among others, as a biosensing tool in environmental monitoring of microbiological activity. However, literature shows a lack of experimentation with this technology on field.

In the present work, MFCs are studied in an innovative way, as a biosensor capable of autonomously and continuously monitoring biological activity in the subsoil. This is relevant parameter in a MAR-SAT systems, difficult and costly to measure with current technologies.

The operation of microbial fuel cells installed for 40 days in the infiltration ponds and aquifer of the MAR-SAT pilot plant in Palamós has allowed to obtain evidence that MFCs are a potential tool for monitoring microbial activity in environments of difficult access and sampling. In the other hand, the complexity and number of factors that influence the operation of MFCs and the difficulty and challenges presented by applying this technology on field are found.

Resum

L'augment de la demanda d'aigua, la sobreexplotació dels recursos hídrics i els reptes plantejats pel canvi climàtic fan que la millora en la gestió de l'aigua sigui una prioritat, sobre tot en zones especialment sensibles, com és el cas de la conca mediterrània i de Catalunya.

Tecnologies com la dessalinització o la regeneració d'aigües residuals estan agafant cada cop més rellevància en l'obtenció i millora dels recursos hídrics per combatre la disminució i estacionalitat de les aigües superficials i la sobreexplotació dels aqüífers.

La recàrrega gestionada d'aqüífers (MAR, de l'anglès *Managed Aquifer Recharge*), combinada amb tractaments sòl-aqüífer (SAT, de l'anglès *Soil Aquifer Treatment*) i l'ús de barreres reactives permet contrarestar la sobreexplotació i augmentar la disponibilitat de recursos hídrics subterranis amb aigua residual depurada amb un tractament passiu a nivell energètic i aprofitant les capacitats autodepuradores del substrat.

En aquest procés, la monitorització del funcionament del sistema i l'avaluació de la qualitat de l'aigua és un dels grans reptes i condició indispensable per tal que la tecnologia sigui viable. Les piles microbianes (MFC), inicialment enfocades en l'obtenció d'energia a partir de residus orgànics, estan agafant cada cop més rellevància i interès per part de la comunitat científica, entre d'altres, com a eina de biosensorització en la monitorització ambiental de l'activitat microbiana. Tot i això, la literatura ens mostra una falta d'experimentació d'aquesta tecnologia fora de laboratori.

En el present treball s'estudia de manera innovadora el potencial de les MFC com a biosensor capaç de monitoritzar de manera autònoma i contínua un paràmetre molt rellevant en un sistema MAR-SAT però alhora molt difícil i costós de mesurar amb la tecnologia actual, l'activitat biològica al subsol.

El funcionament d'unes piles microbianes instal·lades durant 40 dies en les basses d'infiltració i aqüífer de la planta pilot MAR-SAT de Palamós ha permès obtenir indicis que les MFC són una eina amb potencial per monitoritzar l'activitat microbiana en ambients de difícil accés i mostreig, però també ha quedat palesa la complexitat i quantitat de factors que influeixen sobre el funcionament de les MFC i la dificultat i reptes que presenta aplicar aquesta tecnologia fora de laboratori.

Índex de continguts

Abstract	i
Resum.....	ii
Llistat de figures	v
Llistat de taules.....	vi
Taula d'acrònims.....	vii
1. Introducció	1
1.1. Les aigües subterrànies, un recurs estratègic.....	1
1.2. Reutilització d'aigua regenerada i recàrrega gestionada d'aqüífers	3
1.3. Sistemes de Tractament Sòl-Aqüífer	6
1.4. Piles microbianes, una eina per la monitorització de l'activitat biològica de l'aqüífer .	7
1.5. Objectiu general i objectius específics	8
2. Estudi de l'Art.....	10
2.1. Piles microbianes, funcionament i aplicacions.....	10
2.2. Les piles microbianes com a biosensor	16
3. Material i mètodes	23
3.1. Planta pilot de recàrrega artificial d'aqüífers de Palamós	23
3.2. Assaig amb piles microbianes.....	25
3.3. Variables monitoritzades durant l'assaig.....	26
3.4. Selecció del període d'estudi.....	28
3.5. Anàlisi de Components Principals (PCA)	30

3.6.	Anàlisi de correlació de variables semicontínues, discretes i components principals.	
		31
3.7.	Diferències entre barreres.....	31
4.	Resultats	32
4.1.	Selecció i tractament de dades per l'anàlisi multivariant.....	32
4.2.	PCA període curt	34
4.3.	PCA període llarg	38
4.4.	Relació de la intensitat de corrent amb la resta de variables de la barrera	41
4.5.	Efecte de la pluja	42
4.6.	Relació entre les característiques de l'afluent i el funcionament de la barrera	43
4.7.	Intensitat de corrent i activitat biològica	45
4.8.	Diferències entre barreres.....	46
5.	Discussió.....	48
6.	Conclusions	51
	Bibliografia	52
	Annexes (adjunt)	

Llistat de figures

Figura 1: evolució del consum d'aigua a nivell mundial.	1
Figura 2: evolució del cabal reutilitzat a Catalunya.	2
Figura 3: esquema d'un sistema de recàrrega d'aqüífers.	4
Figura 4: esquema de l'evolució de concentració de contaminants en un transsecte d'aqüífer. ...	4
Figura 5: diagrama de funcionament de la EDAR i la ERA del Baix Llobregat.	6
Figura 6: esquema bàsic d'una pila microbiana.	10
Figura 7: metabolisme d'una bacteria en presència d'oxigen.	11
Figura 8: esquema amb els tipus de transferència d'electrons en una pila microbiana.	13
Figura 9: esquema de funcionament i aplicació de diferents tipus de piles microbianes.	14
Figura 10: Esquema estructural d'un biosensor.	16
Figura 11: esquema de funcionament d'un pila microbiana com a biosensor.	18
Figura 12: principis del funcionament del HABS-2000.	19
Figura 13: vista aèria de la planta pilot de Palamós.	24
Figura 14: imatge d'una de les piles instal·lades.	25
Figura 15: esquema de la bassa de recàrrega i el primer tram de l'aqüífer i.	26
Figura 16: línia temporal sèries de dades de corrent elèctric.	29
Figura 17: distribució de la correlació de les variables amb les 2 components principals.	36
Figura 18: comportament de la component 1 (blau) i 2 (verd) al llarg del temps.	37
Figura 19: distribució de la correlació de les variables amb les 2 components.	39
Figura 20: comportament de la component 1 i 2 al llarg del temps.	40

Llistat de taules

Taula 1: recopilació de treballs on s’han estudiat diferents aplicacions de les MFC.....	15
Taula 2: dades físiques, químiques i biològiques de la planta pilot MAR-SAT de Palamós.	27
Taula 3: variables incloses en els 2 PCA fetes a curt termini	34
Taula 4: correlació entre les variables i les components obtingudes amb els dos anàlisis de components principals.	35
Taula 5: extracció de les variables per les dues primeres components obtingudes amb els 2 anàlisis de components principals.	38
Taula 6: valors de correlació de Pearson entre la intensitat de corrent generada per la pila i les variables contínues entrades a la PCA i les components extretes de la PCA.	42
Taula 7: coeficients de correlació de Pearson entre la intensitat de corrent generada per la pila i les variables contínues entrades a la PCA diferenciant períodes amb presència o no de pluja. .42	
Taula 8: coeficients de correlació de Pearson entre les dades discretes de l’afluent i les dades de la barrera 31 i 51.	44
Taula 9: correlacions de Pearson entre intensitat de corrent i components extretes a la PCA amb les diferents dades puntuals de la biologia i nivells de carboni orgànic a la barrera.	45
Taula 10: coeficients de correlació de Pearson entre les variables amb mesures contínues ambientals, de l’afluent l’afluent i la barrera.....	46
Taula 11: comparació de mitjanes per test T entre variables de les dues barreres.	47

Taula d'acrònims

ACA: agència Catalana de l'Aigua

AMB: Àrea Metropolitana de Barcelona

BES: Bioelectrochemical System

COD: Carboni Orgànic Dissolt

DBO: Demanda Biològica d'Oxigen

DQO: Demanda Química d'Oxigen

EDAR: Estació Depuradora d'Aigües Residuals

ERA: estació de regeneració d'aigües.

JRC: Joint Research Center, Centre Comunitari d'Investigació

MAR: Managed Aquifer Recharge, Sistema Artificial de Recàrrega.

MEC: Microbial Electrolysis Cells, Piles d'Electròlisi Microbiana

MFC: Microbial Fuel Cells, Piles Microbianes.

MO: Matèria Orgànica

OD: Oxigen Dissolt

PCA: Principal Component Analyse, Anàlisi de Components Principals.

PEM: Proton Exchange Membrane, Membrana d'Intercanvi de Protons.

SAT: Soil Aquifer Treatment, Tractament Sòl Aqüífer.

SW-MFC: Structured Wetland Microbial Fuel Cell

SMFC: Sediment Microbial Fuel Cell

1. Introducció

1.1. Les aigües subterrànies, un recurs estratègic

L'accés a l'aigua i la seva gestió sostenible és un dels 17 objectius de desenvolupament sostenible marcats per les Nacions Unides (A/RES/70/1 (2015)). Aquests objectius marquen un seguit de reptes i pautes en quan a gestió dels recursos hídrics, alguns d'ells relacionats amb els objectius d'aquest treball, entre els quals en destaquem:

- Objectiu 6.3. Pel 2030, millorar la qualitat de l'aigua reduint la contaminació, eliminant l'abocament i minimitzant l'emissió de productes químics i materials perillosos, reduint a la meitat el percentatge d'aigües residuals sense tractar i **augmentant considerablement el reciclat i reutilització sense riscos** a nivell mundial.
- Objectiu 6.4. Pel 2030, augmentar considerablement l'ús eficient dels recursos hídrics en tots els sectors i **assegurar la sostenibilitat de la extracció i l'abastiment de l'aigua dolça** per a fer front a l'escassetat d'aigua i reduir considerablement el número de persones que pateixen falta d'aigua.
- Objectiu 6.6. Pel 2030, **protegir i restablir els ecosistemes relacionats amb l'aigua**, inclosos els boscos, les muntanyes, els aiguamolls, els rius, **els aqüífers** i els llacs.

Actualment, però, estem en una situació d'augment del consum d'aigua a nivell mundial degut, especialment, a l'increment de població i millora de la qualitat de vida (Saladié i Oliveras, 2010) (Figura 1).

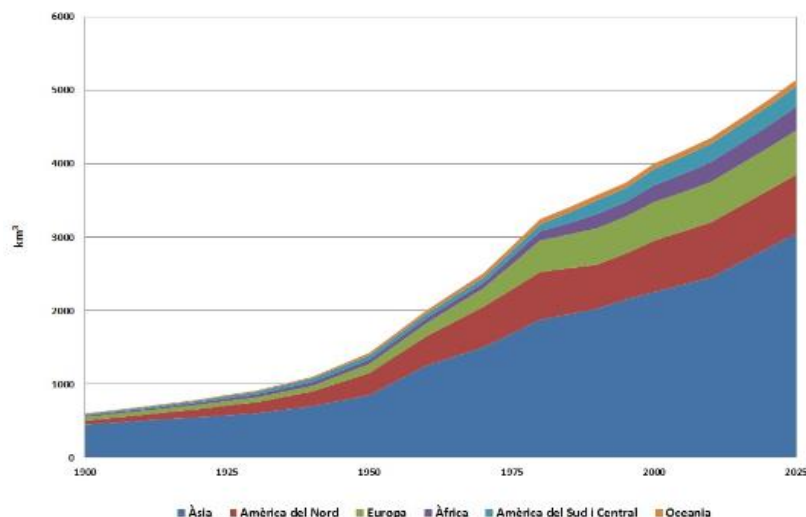


Figura 1: evolució del consum d'aigua a nivell mundial des de 1900 i previsió fins a 2025 per continents (Saladié i Oliveras, 2010).

Per altra banda, a nivell global, les aigües subterrànies suposen l'abastiment d'aigua de prop de dos mil milions de persones i un 40% de l'aigua de rec (Thomas i Famiglietti, 2019). Això ha

provocat la disminució de les masses d'aigües subterrànies degut a la creixent explotació per sobre de les capacitats de recàrrega natural (Wada et al. 2012; Richey et al. 2015) agreujat, a demés, pels efectes del canvi climàtic (Gurdak, 2017; Taylor et al., 2013) i per la contaminació difusa (Molins-Delgado et al. 2016).

A nivell local, la seguretat hídrica de Catalunya també depèn de les aigües subterrànies, representen un 40% del seu consum total al 2010, sobretot pel sector industrial, i una capacitat limitada d'abastiment d'aigües superficials per l'absència de grans rius a les conques internes (Saladié i Oliveras, 2010). Això ha provocat canvis en el paradigma actual sobre la gestió de l'aigua a Catalunya. Actualment, la implementació de dessalinitzadores n'ha disminuït aquesta dependència per a subministrament urbà (ACA, sense data), però també està agafant un paper primordial l'ús de les aigües regenerades per a ús que no sigui de boca com poden ser l'industrial, el recreatiu o l'agrícola així com per a recàrrega ambiental d'aqüífers i cabals superficials per promoure la recàrrega potable indirecta (ACA, 2023).

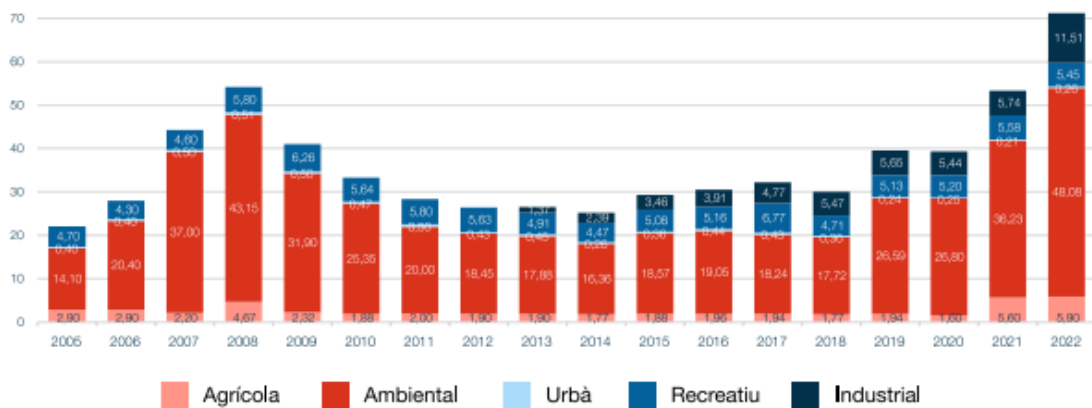


Figura 2: evolució del cabal reutilitzat a Catalunya en hm³/any per sectors (ACA, 2023).

Això ha provocat un augment del cabal reutilitzat a Catalunya de més del doble en els darrers 4 anys, arribant als 70 hm³/any (Figura 2) i amb l'objectiu d'arribar a uns cabals de regeneració de 245hm³/any de reutilització directa a l'any 2040 segons el pla estratègic de reutilització d'aigua regenerada de l'agència Catalana de l'Aigua (ACA, 2023). Per això, hi ha actualment en funcionament 23 estacions de regeneració d'aigua (ERA) a Catalunya i se'n preveu la construcció de 10 més en els pròxims 4 anys.

Com hem vist abans, els objectius de desenvolupament sostenible relacionats amb la gestió de l'aigua, no només estan centrats en la disponibilitat de recursos hídrics per a l'abastiment humà, si no també per al manteniment dels ecosistemes vinculats a l'aigua. De manera directa, la recàrrega gestionada d'aqüífers és una eina per mantenir els seus nivells, però també ho és de manera indirecta per a tots aquells altres ecosistemes que en depenen, com poden ser

aiguamolls o els estanys. A Catalunya s'han identificat un total de 10 masses d'aigua subterrània de les quals en depenen amb major o menor grau ecosistemes com l'Estany de Banyoles o els aiguamolls de l'Empordà (ACA, 2022).

1.2. Reutilització d'aigua regenerada i recàrrega gestionada d'aqüífers

La depuració d'aigües residuals permet gestionar un gran volum d'aigua amb elevats continguts en matèria orgànica i presència de residus i contaminants, minimitzant el seu efecte nociu sobre el medi ambient. Aquesta aigua tractada té les característiques necessàries per poder ser abocades a l'ambient, ja sigui al mar o a un curs fluvial. Aquest tipus de gestió té com a principal objectiu gestionar i desfer-se d'un residu, però aquest efluent d'aigua depurada pot ser revaloritzat de diferents maneres.

En primer lloc, l'efluent que s'aboca a un curs fluvial pot servir per mantenir els cabals ecològics així com fer-ne una reutilització indirecta. Això vol dir, que l'aigua abocada al riu pot ser reaprofitada més endavant per ser, per exemple, potabilitzada de nou. Aquest procés de reutilització indirecta té 2 motius de ser, primer un de legal, ja que l'aigua provinent d'una depuradora no pot ser reutilitzada directament per processos de regeneració per a consum humà. Un segon motiu, és que la reutilització indirecta permet aprofitar els processos d'autodepuració d'aigua que es duen a terme en un riu i que disminueixen la quantitat de matèria orgànica, patògens i altres contaminants de manera natural abans de tornar a ser captada per a l'aprofitament humà.

En segon lloc, l'aigua depurada pot ser regenerada a través de tot un seguit de processos més o menys intensos que fan que pugui ser reutilitzada per a la pràctica totalitat dels usos excepte el consum humà. Segons el grau de tractament de l'aigua regenerada, es pot fer servir en agricultura, indústria, rec de camps de golf, etc. Cal remarcar, però, que l'ús d'aigües residuals recuperades compta amb l'obstacle de l'acceptació pública, ja que el grau de confiança per part dels ciutadans respecte a aquest ús és baix (Simth et al., 2018).

Una altre aprofitament de l'aigua depurada és la recàrrega gestionada d'aqüífers (Managed Aquifer Recharge, MAR). Es pot definir com *"la recàrrega intencionada d'aigua en aqüífers per al seu reaprofitament o beneficis ambientals; la gestió de la recàrrega a d'assegurar la protecció per a la salut humana i el medi ambient de forma adequada. Els aqüífers poden ser recarregats enviant l'aigua a pous o per infiltració a través de basses de recàrrega, galeries o rius"* (NRMCC, EPHC i NHMRC, 2009) (Figura 3). Aquesta tècnica permet incrementar la disponibilitat de recursos hídrics subterranis, complementar la recàrrega natural, contrarestar l'extracció i mantenir els ecosistemes vinculats a les aigües subterrànies i l'intercanvi hiporreic amb els rius

(Asano i Cortuvo, 2004), així com l'emmagatzematge d'aigua per abastiment en cas d'emergència o com a barrera per evitar la intrusió salina (NRMMC, EPHC i NHMRC, 2009). Tots aquests potencials beneficis són de gran interès a la conca Mediterrània en general i especialment a Catalunya i relacionats amb els objectius de desenvolupament sostenible exposats al primer capítol del treball.

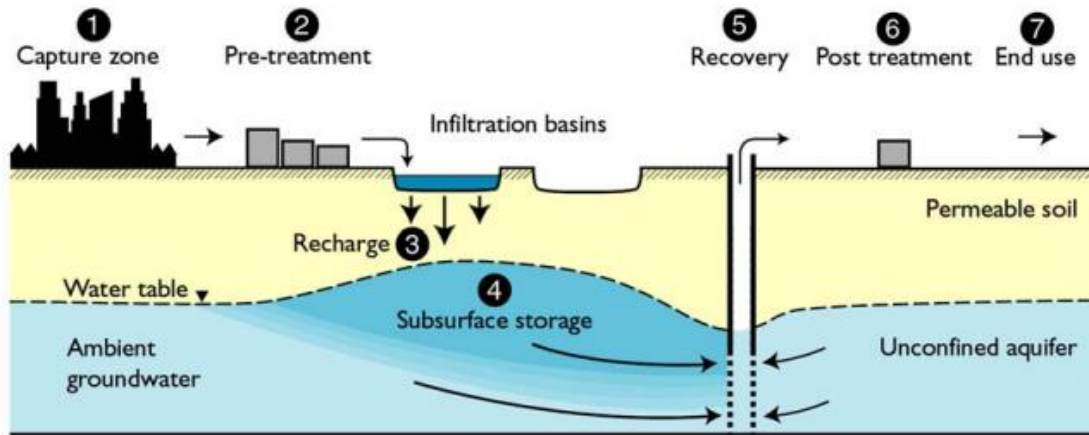


Figura 3: esquema d'un sistema de recàrrega d'aqüífers, en el qual, s'aprofiten les aigües residuals d'una zona urbana (1), es duu a terme un seguit de tractaments per adequar la qualitat de l'aigua al tipus de recàrrega (2), aquesta aigua depurada s'infiltra en basses de recàrrega través d'un sòl permeable fins arribar a l'aqüífer (3) on s'acumula (4) i pot ser reutilitzada més endavant, per exemple extraient-la de pous (5). Aquesta aigua és tractada (6) segons el seu ús final (7) (NRMMC, EPHC i NHMRC, 2009).

Aquesta opció es podria postular com un equivalent en quan a capacitats autodepuradores a la d'un riu. És a dir, l'aigua residual es recarrega amb un tractament bàsic de depuració, aquesta flueix a través de l'aqüífer i va disminuint la seva càrrega contaminant a través de diferents processos com la degradació biològica, la dilució o la adsorció fins que arriba a uns nivells de risc acceptables per poder ser reutilitzada (Figura 4).

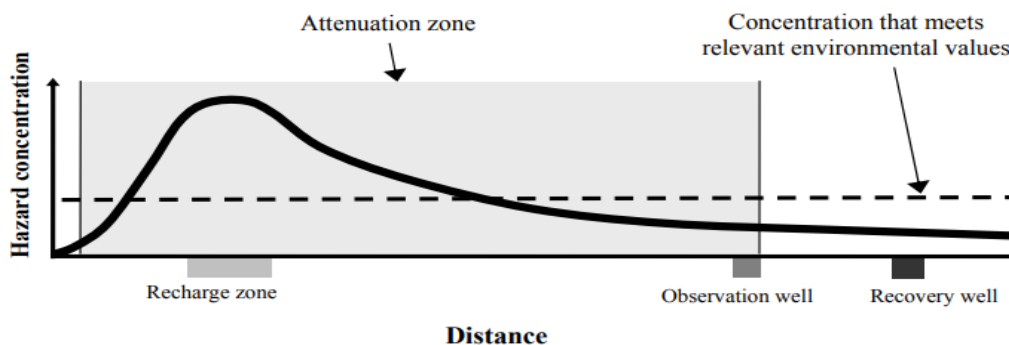


Figura 4: esquema de l'evolució de concentració de contaminants a l'aigua en un transecte d'aqüífer des del punt de recàrrega fins al punt d'extracció. A l'eix y, es representa la concentració de contaminants i elements perillosos, que és elevada en el moment i punt de la recàrrega. A mesura que augmenta la distància al punt de recàrrega (eix x) disminueix la concentració de contaminants al llarg de la zona d'atenuació. El seguiment de la qualitat de l'aigua en punts de mostreig al perímetre de la zona d'atenuació permeten verificar que el nivell d'atenuació és adequat per a l'extracció i reaprofitament final de l'aigua (NRMMC, EPHC i NHMRC, 2009).

Diferents estudis han avaluat els processos de millora de l'aigua de recàrrega en el seu pas per l'aqüífer. Per exemple, la disminució dels nivells de patògens de les aigües depurades que es recarreguen en aquífers ubicats a Austràlia (Dillon et al., 2006), la degradació de certs components orgànics com el bisfenol A (Patterson et al., 2011) o components orgànics emergents (Valhondo et al., 2018) o la reducció de nutrients com el fòsfor i la matèria orgànica (Bekele et al., 2011). Tot i aquestes evidències de millora de l'aigua en els sistemes de recàrrega gestionada d'aqüífers, aquesta tecnologia està encara sota debat. Les aigües depurades contenen encara gran quantitat de contaminants emergents com fàrmacs, micro i nano plàstics, patògens, bacteries resistents a antibiòtics, etc. que suposen un risc de contaminació de l'aqüífer si es fa una recàrrega directa. A més, a nivell legislatiu, queda expressament prohibida la descàrrega directa de contaminants en aigües subterrànies, cosa que s'ha de tenir en compte en el disseny dels esquemes de reutilització d'aigua residual.

A nivell europeu, el centre comunitari d'investigació (Joint Research Center, JRC) ha redactat un seguit de recomanacions sobre els requeriments mínims de qualitat de l'aigua reciclada per irrigació i per recàrrega d'aqüífers (Alcalde Sanz i Gawlik., 2017). Aquest informe té en compte l'avaluació de riscos ambientals i per la salut que s'han de tenir en compte alhora de gestionar una recàrrega artificial d'aqüífers amb aigua reciclada. A més, constata que els criteris de qualitat que ha de seguir l'aigua de recàrrega han de definir-se cas per cas, degut a la variabilitat en les dinàmiques dels diferents aquífers.

Tot això fa que actualment la recàrrega d'aqüífers requereixi de processos avançats de tractament d'aigua costosos i energèticament intensius, ja que cal garantir que l'aigua utilitzada no suposi cap risc ni per l'ambient ni per la salut humana en el cas que aquesta sigui recuperada. Un exemple seria a Catalunya, on la recàrrega de l'aqüífer del delta del Llobregat per tal d'impedir la intrusió marina es fa amb aigua tractada a la ERA del Prat del Llobregat. Les aigües residuals tan domèstiques com industrials assimilables es depuren en una EDAR, després passen a la ERA, no es fa un tractament terciari per eliminar la matèria orgànica restant i un tractament d'ultrafiltració i osmosi per assegurar la qualitat de l'aigua abans de recarregar-la al subsol (Figura 5) (AMB, sense data).

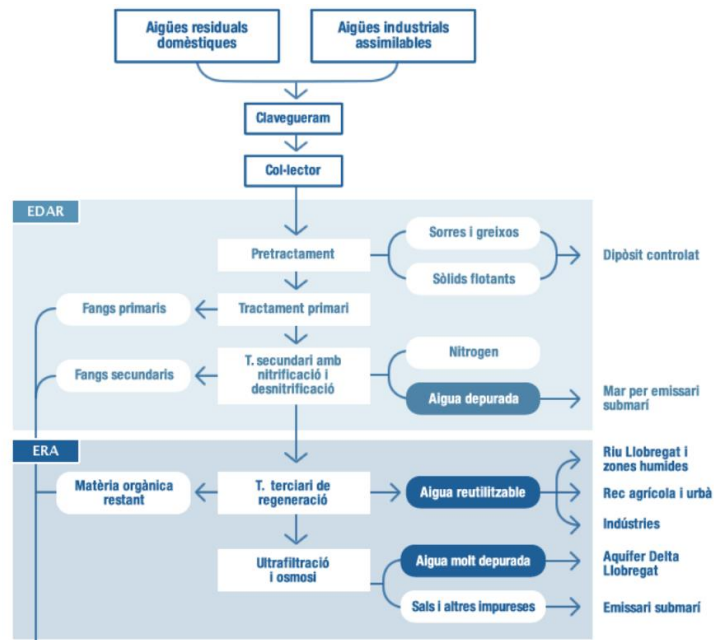


Figura 5: diagrama de funcionament de la EDAR i la ERA del Baix Llobregat, on es poden veure els diferents tractament i usos de l'aigua regenerada, entre els quals hi ha la recàrrega de l'aqüífer del delta del Llobregat amb aigua molt depurada (AMB, sense data).

1.3. Sistemes de Tractament Sòl-Aqüífer

Una alternativa menys costosa, amb menys requeriment tecnològic i passiva a nivell energètic per adequar l'aigua de recàrrega en aqüífers, és amb els anomenats tractaments sòl-aqüífer (Soil Aquifers Treatment, SAT). Aquesta tècnica fa servir les característiques poroses del substrat com a filtre natural ubicant l'aigua de recàrrega en basses d'infiltració per sobre de la zona de recàrrega de l'aqüífer. Durant el procés d'infiltració d'aigua depurada, s'aprofiten els processos de degradació microbiana i adsorció per disminuir els nivells de patògens, contaminants químics, nutrients i matèria orgànica (Bouwer, 2002; Maliva, 2020).

Per tal de millorar el funcionament d'aquest sistema, es poden afegir barreres reactives amb diferents substrats com argiles, zeolites, biochar, compost, encenalls de fusta, etc. que millorin les característiques de retenció, afegeixen carboni orgànic per diversificar els estats REDOX i augmentar la degradació de contaminants emergents (Valhondo et al., 2018; 2023; Grau-Martínez et al., 2018; Huerta et al., 2013).

Per tal d'estudiar aquests processos físics, geoquímics, biològics i d'operació dels sistemes MAR, destaquem 2 llocs experimentals amb un enfocament multidisciplinari i ubicats actualment a Catalunya, on en un dels qual es situa l'actual treball.

En primer lloc, el sistema MAR d'infiltració superficial al Llobregat, on s'han dut a terme gran quantitat d'experiments en basses d'infiltració amb barreres reactives (Valhondo et al., 2014). Alguns d'aquests estudis han demostrat la capacitat de millora de la qualitat de l'aigua, per part

del sistema MAR juntament amb barreres reactives orgàniques, en termes de concentració de components contaminants (Huerta et al., 2013), atenuació de nitrats (Grau-Martínez., 2018) o bé la caracterització de les dinàmiques microbianes des d'un punt de vista ecològic (Barba et al., 2019).

En segon lloc, una planta pilot ubicada a la EDAR de Palamós amb sis sistemes de recàrrega d'aqüífers artificials amb diferents condicions experimentals vinculades a diferents composicions de barreres reactives. L'objectiu principal d'aquesta planta és el d'avaluar i millorar les capacitats d'atenuació de contaminants recalcitrants de l'efluent d'aigües residuals depurades de la EDAR (Valhondo et al., 2020). Degut a les dimensions relativament reduïdes de les instal·lacions, així com la gran quantitat d'experiments que s'hi duen a terme, aquest sistema té un alt nivell de monitorització i control de les condicions experimentals tan a la barrera com a l'aqüífer artificial, cosa que la fa molt adient per a la introducció de les piles microbianes com a eina alternativa per monitoritzar les dinàmiques de sistemes MAR-SAT i sistemes d'aigües subterrànies.

1.4. Piles microbianes, una eina per la monitorització de l'activitat biològica de l'aqüífer

Una de les principals dificultats en l'estudi dels sistemes de recàrrega artificial d'aqüífers és la monitorització de la qualitat de l'aigua, així com les dinàmiques que es duen a terme en tot el sistema i que afecten a la taxa d'atenuació de contaminants. Poder avaluar de manera directa la efectivitat i velocitat d'atenuació dels contaminants així com la qualitat de l'aigua és molt important per dos motius principals: en primer lloc per mesura la efectivitat de diferents condicions experimentals en el camp de la investigació i, en segon lloc, per poder monitoritzar, controlar i adequar les condicions operacionals del sistema de recàrrega en funcionament i verificar-ne la qualitat de l'aigua. Així doncs, el desenvolupament de sistemes efectius de tractament d'aigües residuals està estretament vinculat al desenvolupament de mètodes d'avaluació de la qualitat de l'aigua i funcionament del sistema.

Alcalde Sanz i Gawlik (2017) inclouen la importància dels sistemes de monitorització continu d'aigua en forma d'annex en el seu informe sobre les recomanacions de qualitat d'aigua reciclada per recàrrega. Tot i que existeixen tecnologies al mercat per mesurar la majoria de paràmetres físico-químics de qualitat de l'aigua de manera contínua, quantificar l'activitat microbiana online segueix sent un limitant que provoca un salt entre les necessitats operacionals del sistema i la monitorització de verificació. Substituir els sistemes de mostreig i anàlisi actuals, que comporten un mínim de temps per saber resultats, per sistemes continus de quantificació de l'activitat biològica pot ser una eina molt útil per demostrar ràpidament la efectivitat dels tractaments i

estat del sistema i modificar les condicions operacionals d'un sistema MAR-SAT en funcionament de manera més efectiva.

Les piles microbianes (*microbial fuel cells*, MFC) són una tecnologia innovadora enfocada en els seus inicis en l'obtenció d'energia a partir de residus orgànics. Tot i això, actualment altres aplicacions s'han explorat, com per exemple l'ús de les piles microbianes com a biosensor, que es considera com a una nova generació de tecnologia de biosensorització per la monitorització ambiental (Sun et al., 2015). Aquesta tecnologia incipient es pot fer servir com a eina de monitorització contínua de diferents paràmetres físics, químics i biològics de sistemes hídrics. Les MFC poden permetre quantificar de manera eficient l'activitat biològica de sistemes MAR-SAT, així com altres paràmetres ambientals i operacionals que puguin afectar al seu funcionament. Tot i el potencial que té aquesta tecnologia, la literatura és escassa i la planta pilot de Palamós és una bona base d'experimentació per les piles microbianes per tal de veure si les mesures donades per aquest biosensor es poden relacionar amb els paràmetres d'interès per l'estudi d'aquest sistema.

En aquest primer experiment, s'aprofitaran les bases de dades generades a la planta pilot i es creuran amb les generades per les piles instal·lades per avaluar la possible relació entre elles fent especial èmfasi en les dades d'activitat microbiana.

1.5. Objectiu general i objectius específics

Donada la importància i la necessitat de millorar de la monitorització dels sistemes de recàrrega gestionada d'aqüífers i el tractament sòl-aqüífer, aquest treball té **l'objectiu general de valorar la viabilitat de l'ús de piles microbianes com a biosensor de l'activitat microbiana en un aqüífer**. Per assolir aquest objectiu, el treball s'ha centrat en demostrar si la intensitat del corrent elèctric produïda per una pila microbiana està relacionada amb l'activitat biològica monitoritzada en una planta pilot de recàrrega gestionada d'aqüífer. El treball s'ha centrat en l'anàlisi de dades a través de mètodes estadístics d'un assaig desenvolupat a la planta pilot de Palamós al 2021 on es van monitoritzar un gran nombre de paràmetres físics, químics i biològics de manera contínua i puntual.

Els objectius específics d'aquest treball són els següents:

Objectiu específic 1. Avaluar l'estat de l'art de les piles microbianes com a biosensors, especialment en sistemes d'aigües subterrànies.

Objectiu específic 2. Analitzar estadísticament les dades existents de la planta pilot de Palamós, juntament amb les dades generades per les piles microbianes i buscar correlacions entre les diferents variables a través, entre d'altres eines, de l'anàlisi de components principals.

Objectiu específic 3. Buscar evidències que les MFC poden ser una eina útil i amb potencial per la monitorització de sistemes MAR-SAT, fent especial èmfasi en la monitorització de l'activitat biològica tan de la barrera com de l'aqüífer.

Per assolir aquests objectius, la memòria d'aquest Treball de Final de Màster s'ha estructurat en dues parts principals. La primera part bibliogràfica, centrada en explicar la tecnologia de piles microbianes i els seus usos, així com els sistemes de recàrrega gestionada d'aqüífers, i aprofundint en avaluar l'estat actual de l'ús de les MFC com a biosensors d'activitat biològica en aigües subterrànies. La segona part del treball, està centrada en el tractament estadístic de les dades obtingudes en l'experiment amb piles microbianes instal·lades a la planta pilot de recàrrega gestionada d'aqüífers de Palamós, per tal de confirmar la hipòtesi que aquesta tecnologia pot fer-se servir com a biosensor de l'activitat biològica de l'aqüífer, així com d'altres paràmetres en un sistema MAR-SAT. La segona part del treball comença amb l'anàlisi del període d'estudi i distribució de les dades al llarg del temps. Seguidament, es duu a terme una avaluació prèvia i preparació de les dades disponibles, classificades per tipologia, i es fan diversos anàlisis de components principals, que permeten treballar amb el gran número de variables amb les que es disposa. El bloc estadístic s'acaba amb l'anàlisi de correlacions entre totes les variables i components extreïdes en la PCA.

Finalment, es discutiran els resultats obtinguts i es valorarà la hipòtesi plantejada en aquest treball.

2. Estudi de l'Art

2.1. Piles microbianes, funcionament i aplicacions

Les piles microbianes es van començar a estudiar a principis del segle XX (Potter M.C., 1911), però l'interès i desenvolupament de les piles no va arribar fins a finals dels noranta i principis dels 2000, quan aquesta tecnologia es va postular com una alternativa per aconseguir energia elèctrica de la matèria orgànica, augmentant la seva eficiència (Rabey et al., 2003; Liu i Logan, 2004) i fent especial èmfasi en l'obtenció d'energia de residus orgànics i amb alta concentració de matèria orgànica, com son les aigües residuals (Liu, H. et al., 2004, Rabaey i Verstraete, 2005). Aquest sistema bioelectroquímic, juntament amb les cèl·lules d'electròlisis microbianes (MEC), es van postular com una de les millors alternatives pel tractament d'aigües residuals i contaminades (Coma i Puig, 2013).

El motiu d'aquest interès per part de la comunitat científica és que les piles microbianes són sistemes que fan servir bacteries com a catalitzador per oxidar matèria orgànica i inorgànica i generar una corrent d'electrons. Les bacteries transfereixen els electrons, produïts durant la descomposició en un ambient anòxic, a l'ànode i produeixen una corrent d'electrons cap al càtode amb presència d'oxigen o altres receptors d'electrons a través d'un material conductor (Figura 6).

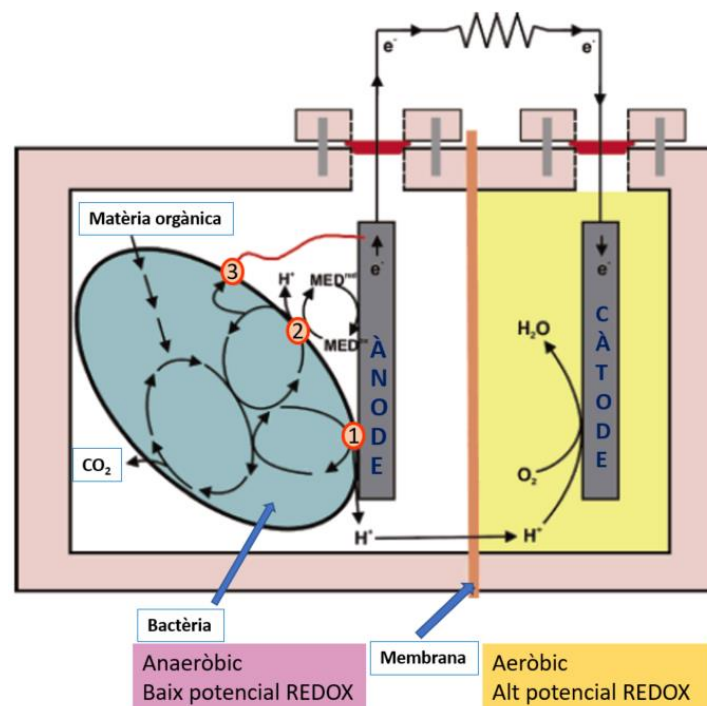
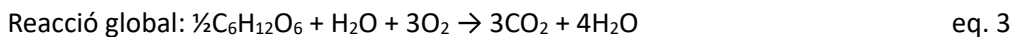
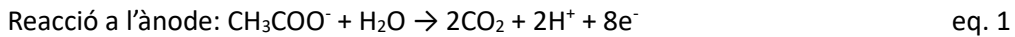


Figura 6: esquema bàsic d'una pila microbiana. Al compartiment de la esquerra hi ha l'ànode submergit en medi anòxic i en presència de matèria orgànica, com pot ser la glucosa. Les bacteries, adherides o pròximes a l'ànode metabolitzen la glucosa alliberant CO_2 al medi, protons que travessen la membrana d'intercanvi catiónic (CEM) per gradient i electrons que es transfereixen a l'ànode per contacte directe (1), per transportadors mòbils d'electrons (2) o per microfilaments. Els electrons passen per una resistència externa i arriben al càtode, on reacciona amb l'oxigen i els protons per reduir l' O_2 en H_2O (Adaptat de Rabaey i Verstraete, 2005).

El rerefons teòric sobre aquest procés és que en condicions normals i aeròbiques, la bactèria degrada la matèria orgànica per obtenir energia. Aquest metabolisme produeix CO_2 , protons i electrons amb la oxidació de la matèria orgànica, com per exemple l'acetat (eq. 1). El diòxid de carboni s'allibera a l'ambient i els protons i electrons son cedits per reduir l'oxigen a molècules d'aigua (eq. 2). La reacció global la podem trobar a la eq. 3 i es produeix tota dins de la mateixa cèl·lula (Figura 7, esquerra).



El procés de cedir electrons a un receptor depèn dels potencials REDOX i el que fa la bactèria és buscar la via amb més guany energètic, la que té més diferència de potencial REDOX. En aquest cas l'oxigen és un bon acceptor d'electrons i fàcil de reduir, degut al seu estat altament oxidat. En absència d'oxigen, altres vies amb menor potencial s'activen per tal de buscar un acceptor d'electrons alternatiu a l'oxigen com pot ser el nitrat, el sulfat o un element inorgànic com un elèctrode amb potencial REDOX que li permeti ser, també, un acceptor d'electrons.

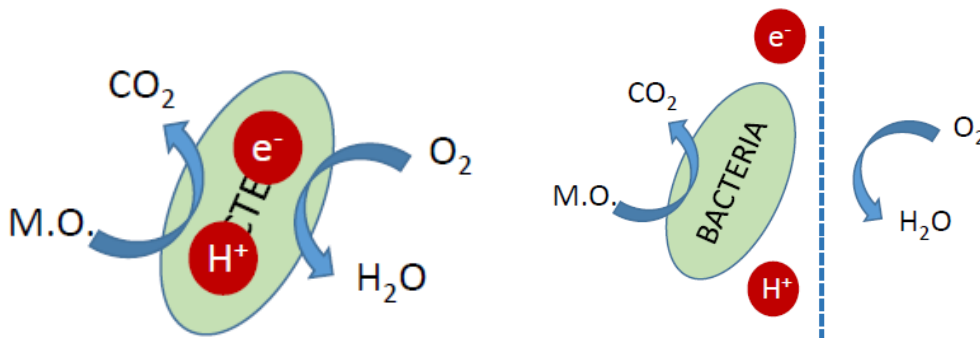


Figura 7: a la esquerra, metabolisme d'una bactèria en presència d'oxigen. La oxidació de la matèria orgànica a CO_2 , electrons i protons i la reducció de l'oxigen molecular a aigua es duen a terme en la mateixa cèl·lula. A la dreta, el mateix metabolisme però separant les dues reaccions d'oxidació i reducció per una membrana d'intercanvi protònic.

En una pila microbiana de doble cambra es separen les reaccions d'oxidació a la zona de l'ànode (eq. 1) i la de reducció a la zona del càtode (eq. 2) per una membrana d'intercanvi protònic (PEM) que permet el flux de protons però és impermeable als electrons (Figura 7, dreta). A la primera cambra el substrat i les bactèries es troben submergides en una solució aquosa en absència d'oxigen i un elèctrode submergit que fa d'ànode, oxidació de la matèria orgànica i alliberament d'electrons. En la segona cambra adjacent hi ha un altre elèctrode (càtode) submergit amb presència d'oxigen o altres acceptors d'electrons com poden ser el nitrat, sulfat, ferro, manganés,

etc., que fa d'embornal d'electrons (Lefebvre et al., 2008; Logan et al., 2006)(Figura 6). Aquesta separació dels 2 processos necessita d'un potencial REDOX entre les dues cambres i la cèl·lula canvia l'acceptor natural d'electrons present al medi, per un acceptor insoluble, el càtode de la pila. Això provoca que circulin els electrons a través de la resistència des de l'ànode al càtode, generant un corrent elèctric.

Els microorganismes que poden funcionar en una MFC han de tenir la capacitat de transferir electrons de manera exoelectrogènica, respiració a través d'un elèctrode. En una pila de laboratori tancada, l'ànode i el càtode poden ser inoculats amb una o varies espècies de bacteries, mentre que en piles obertes o instal·lades al camp, les piles s'inoculen de manera natural amb els microorganismes presents al medi. Els gèneres i espècies amb propietats exoelectrogèniques emprats o aïllats en piles microbianes són nombroses. Destaquem *Geobacter*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodoferrax*, *Shewanella*, *Cupriavidus basilensis*, *Lactococcus lactis* i *Propionibacterium freudenreichii*, així com arqueas metanogèniques, llevats, etc. (Kumar et al., 2019).

El transport d'electrons entre la bactèria i l'elèctrode pot ser per contacte directe o mitjançant mediadors (Figura 8). El contacte directe entre la bactèria i l'elèctrode pot estar facilitat per citocroms presents a la membrana cel·lular o per nanofilaments o pili produïts per la mateixa bactèria. Els mediadors, components electroactius, poden ser secretats per la mateixa bactèria exoelectrogènica i fer de transport d'electrons entre la cèl·lula i l'elèctrode. També es poden afegir de manera artificial al medi per facilitar la transferència d'electrons per part de microorganismes que no son exoelectrogènics (Kumar et al., 2019; Osman et al., 2010).

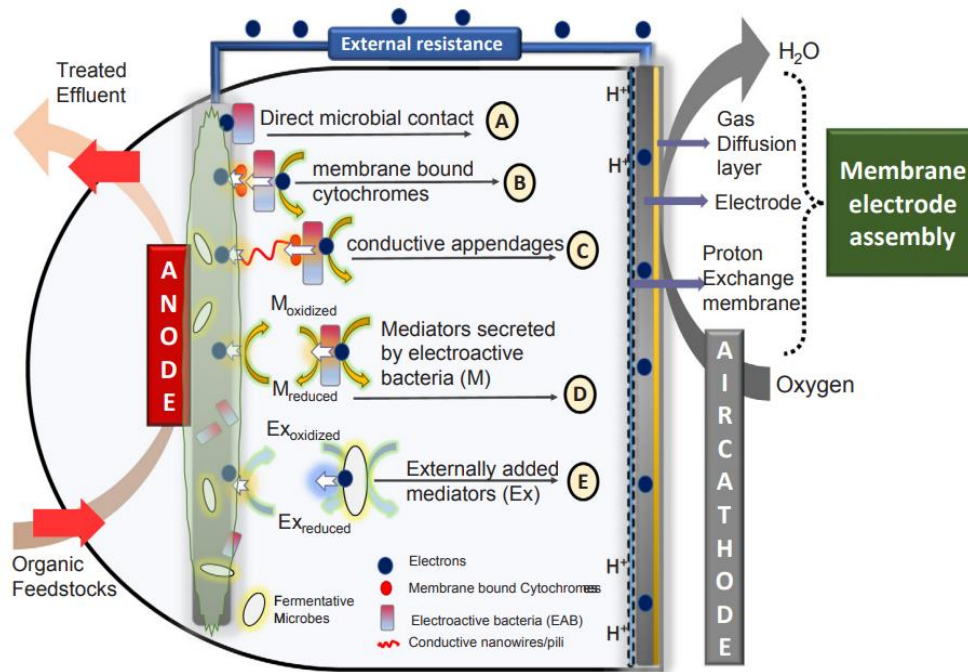


Figura 8: esquema amb els diferents tipus de transferència d'electrons en una pila microbiana. Contacte directe entre la cèl·lula i l'ànode (A), citocroms cel·lulars (B), apèndix o pili conductor que connecten la cèl·lula amb l'elèctrode (C), mediadors secretats per les bacteries electroactives (D) i mediadors afegits externament (E) (Kumar et al., 2019).

Les piles microbianes es poden classificar de diferents maneres, però en destaquem la classificació segons la seva configuració bàsica:

- **Pila microbiana de doble cambra:** l'ànode i el càtode estan en cambres separades per una membrana d'intercanvi protònic (PEM). A la cambra de l'ànode estan ubicats els microbis, el medi amb matèria orgànica i l'elèctrode. Per tal de mantenir aquesta cambra anòxica es bombolleja nitrogen. A la cambra del càtode hi ha el segon elèctrode i l'aigua neta en presència d'oxigen o altres receptors d'electrons. El disseny més bàsic és la MFC de tipus H (Figura 9, a) i permet l'estudi sota condicions controlades del funcionament de la pila, ja sigui en l'estudi de diferents substrats, material biològic, material dels elèctrodes, condicions ambientals, etc.
- **Pila microbiana de cambra simple:** en aquest cas, només l'ànode està en una cambra tancada, mentre que el càtode està en contacte directe amb l'aire, exposat a l'oxigen de manera natural i sense aireació forçada. Aquest sistema és més bàsic, menys costós i fàcilment escalable. La principal característica és que pot funcionar sense membrana d'intercanvi protònic, la qual cosa simplifica la seva construcció i manteniment i aplicabilitat pràctica.
- **Pila microbiana amb elèctrodes lliures:** per últim, en aquest tipus de pila els dos elèctrodes estan en contacte directe amb el medi, sense la presència de cambres ni

membranes. L'ànode ha d'estar submergit en un medi líquid o saturat d'aigua, mentre que el càtode, units per un conductor, pot estar també en contacte amb l'aire. Per tal que hi hagi flux d'electrons des de l'ànode, és necessari un gradient de potencial REDOX respecte el càtode, amb presència d'espècies més oxidants (Figura 9, b).

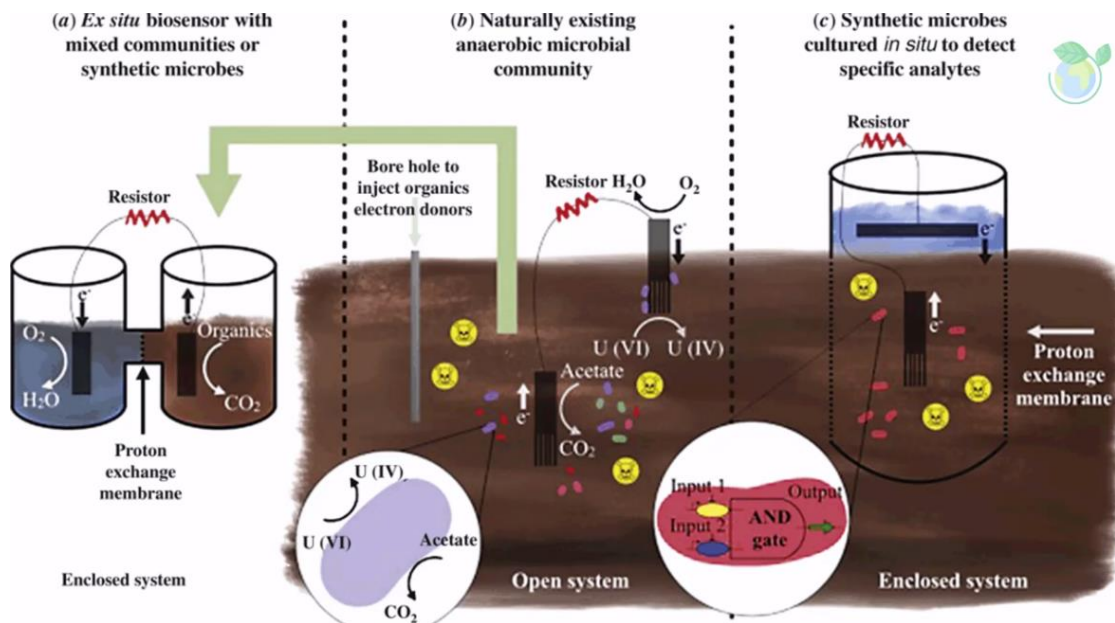


Figura 9: esquema de funcionament i aplicació de diferents tipus de piles microbianes. (a) Pila microbiana de doble cambra en forma d'H, amb PEM que separa la cambra anòdica de la catòdica, sistema tancat i de funcionament ex situ. (b) Sistema obert, amb els dos elèctrodes en contacte directe amb el medi, l'ànode inoculat de manera natural amb els microorganismes naturalment presents al sòl i, en aquest cas, aplicabilitat en bioremediació. (c) Sistema tancat aplicat a camp, amb l'ànode inoculat amb microorganismes seleccionats sensibles a molècules específiques, aquesta pila serveix com a biosensor (Bio Tech Wishper, 2023).

Com hem comentat al principi del capítol l'interès original per les piles microbianes requeria en la obtenció d'energia i tractament d'aigües residuals. Tot i això, les aplicacions que s'han estudiat són nombroses (Taula 1) i l'interès actual per les MFC ha derivat cap a l'aplicació en altres camps, com la biosensorització. La dificultat d'escalar la tecnologia fora de laboratori, la baixa generació d'energia, l'elevat cost dels materials, la curta vida, els biofilms al voltant dels elèctrodes que necessiten ser netejats periòdicament o l'estabilitat de la membrana són, entre d'altres, exemples de dificultats que cal superar (Pant et al., 2012; Al Lawati et al., 2019) i motius pels quals encara no es poden trobar piles microbianes per a l'obtenció d'energia o la descontaminació al mercat.

En canvi, la investigació en el camp de la biosensorització centra actualment gran part de l'interès de la comunitat científica per les piles microbianes pel seu elevat potencial.

Taula 1: recopilació de treballs on s'han estudiat diferents aplicacions de les MFC.

Aplicació	Procés estudiat	Bibliografia
Tractament d'aigües residuals	Descontaminació, obtenció d'energia i recuperació d'elements interessants d'aigües residuals domèstiques i/o industrials i fangs	Pant et al., 2012; Kumar et al., 2019
Tractament d'efluents amb tints	Decoloració i eliminació de tints de l'efluent.	Kumar et al., 2019
Tractament d'aigües amb metalls pesants	Reducció dels ions metàl·lics amb alt potencial REDOX com Cu(II), Cr(II) o Ag a l'ànode.	Kumar et al., 2019
Descontaminació d'aigües subterrànies	Descontaminació i/o degradació de substàncies xenobiòtiques (hidrocarburs, benzè ...), desalogenització TCE, obtenció d'energia, recuperació d'elements	Com i Puig, 2014; Kumar et al., 2019
Dessalinització	Pila microbiana de dessalinització: tractament aigües residuals i dessalinització simultània.	Kumar et al., 2019
Biosensorització	Monitorització de processos F/Q/B.	Varshney et al., 2023
Tractament residus ramaders	Reducció COD, recuperació de nutrients.	Cerrillo et al., 2016
Sediments	Obtenció d'energia.	Bond et al., 2002; Reimers et al., 2001; Zabihallahpoor et al., 2015
Detecció de vida extraterrestre	Proposta de sistema de detecció de vida extremòfila in situ en sistemes extraterrestres.	Abrevaya et al., 2010
Producció d'hidrogen	Producció d'H ₂ a partir de diferents substrats en MFC modificada.	Cheng i Logan, 2007
Bioremediació	Descontaminació de medis contaminats.	Pant et al., 2012; Wang et al., 2012

2.2. Les piles microbianes com a biosensor

Segons la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) “un biosensor electroquímic és un sistema integrat capaç de generar informació analítica de manera específica quantitativa o semi-quantitativa fent servir un element de reconeixement biològic (receptor bioquímic) retingut en contacte amb un element de transducció electroquímic” (Thevenot et al., 2001). Els biosensors, per tant, son sensors amb una component biològica que té la capacitat de reconèixer en element i transformar la concentració d’aquest element en una senyal química o física.

Els diferents elements i funcionament bàsic d’un biosensor son els següents (Figura 10):

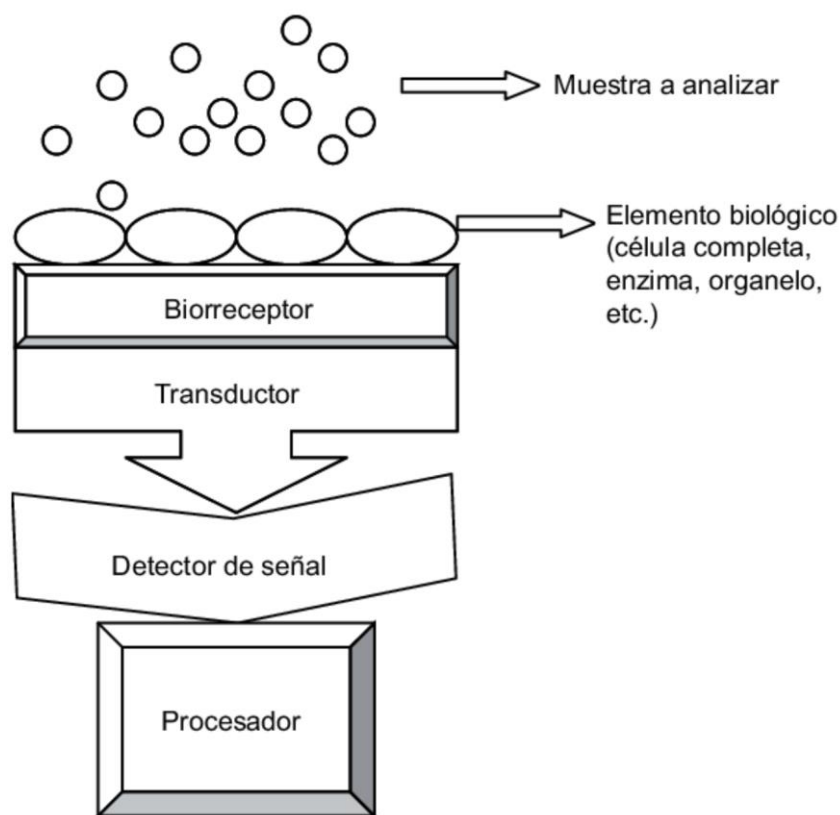


Figura 10: esquema estructural d'un biosensor (Castro Ortiz, et al., 2007).

Primer de tot, un substrat amb la presència de l'element que volem quantificar. Aquests elements poden ser ions, gasos dissolts, antígens, proteïnes o substrats. En segon lloc, la part biològica encarregada de catalitzar la reacció en presència de l'element, i produir una senyal química o física que serà detectada pel transductor, que convertirà la senyal en una forma mesurable com pot ser la intensitat elèctrica. L'element biològic que fa de receptor o sistema de reconeixement químic pot ser des d'un enzim fins a cèl·lules senceres. Per altra banda, el transductor, que rep la senyal emesa per la part biològica pot ser potenciomètric, amperomètric, conductimètric o de càrrega iònica.

Finalment, la senyal emesa pel transductor serà detectada i processada. En el present cas d'estudi, i com entrarem en detall més endavant, les piles microbianes es poden considerar com un biosensor que fa servir cèl·lules senceres amb la peculiaritat, i avantatge, de tenir l'element detector i emissor de senyal elèctric integrats en la part biològica. Les mateixes cèl·lules són les que interaccionen amb el medi i produeixen un corrent elèctric mesurable en forma de potència o intensitat de corrent i proporcional a la seva activitat catalítica, sense que calgui un transductor (Sun et al., 2015).

La importància en el desenvolupament de biosensors, com les piles microbianes, recau en presentar-se com una alternativa amb clars avantatges respecte a altres sistemes de detecció. Al tractar-se d'un sistema online, sense transductor amb necessitat d'entrada d'energia, permet obtenir dades de manera contínua i instantània, les quals poden ser mesurades i enviades de manera autònoma i remota. Això presenta una gran avantatge respecte a les mesures puntuals i analítiques per quantificar la presència d'un element o procés en un medi, les quals requereixen mostreig, transport i tractament de mostres i anàlisi més o menys complexos en laboratori.

A nivell d'exemple, i relacionat amb aquest treball, l'anàlisi de DQO o DBO_5 en una barrera de recàrrega, requereix de mostreig puntual, enviament a laboratori i obtenció de les dades en un període d'hores o dies. El mateix passaria si volguéssim analitzar l'activitat microbiològica en els diferents estrats de la barrera o d'un aquífer amb tècniques com l'anàlisi d'ADN, EPS, etc.

A escala de laboratori i sota condicions controlades s'ha demostrat que les MFC són una eina que permet tenir informació quasi instantània sobre l'activitat microbiològica en un medi i sobre la concentració de substrat disponible per als microorganismes. El corrent elèctric generat per la pila sota condicions controlades és una mesura de la respiració bacteriana i, indirectament, de la quantitat de substrat disponible. D'aquesta manera autors com Kang et al., 2003; Chang et al., 2004 o Kim et al. 2003, fan servir inòculs a base de sediments de riu o els mateixos presents en el substrat i aigües residuals per mesurar nivells de demanda química o biològica d'oxigen (DBO i DQO) en el substrat. En tots els casos, es treballa amb piles de doble cambra, amb els dos elèctrodes sota condicions controlades.

En aquests experiments es treuen diferents conclusions:

En primer lloc, els estudis demostren una correlació molt estreta entre la quantitat de matèria orgànica en el medi i la senyal elèctrica emesa per la pila degut a l'increment d'activitat microbiològica, que permet tenir a temps real una mesura relativa de la quantitat de MO al medi (Figura 11 a i b). A més, aquesta correlació és lineal quan la DBO és baixa però no quan és alta. Això és degut a que la taxa de metabolisme i respiració dels microorganismes augmenta a mesura

que s'incrementa el substrat, però fins a cert punt, quan la taxa d'oxidació es satura i el metabolisme no augmenta per més que incrementi la quantitat de substrat. Aquestes dinàmiques explicades per la cinètica de Michaelis-Menten s'han de tenir en compte alhora de mesurar la DBO.

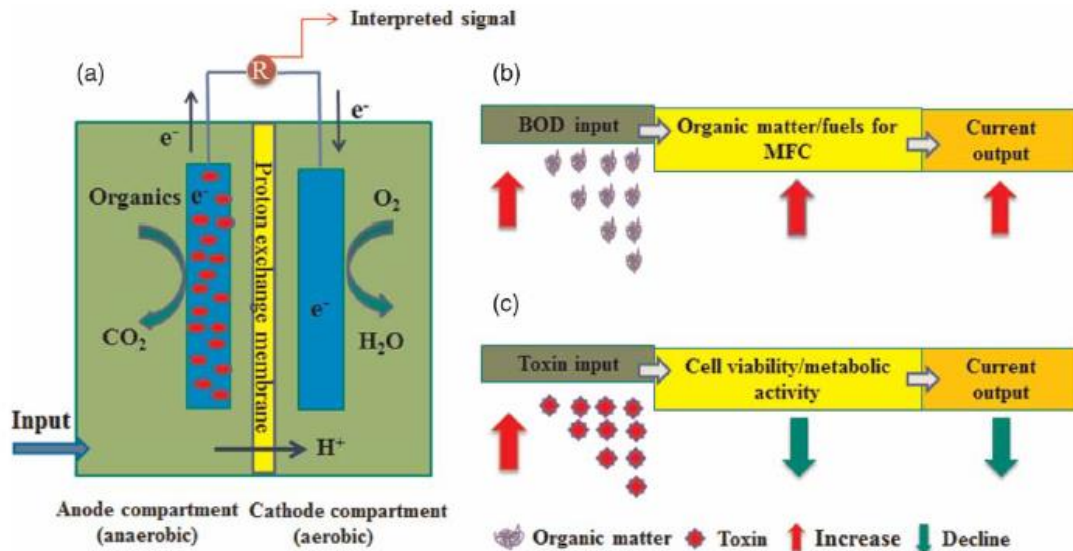


Figura 11: esquema de funcionament d'una pila microbiana com a biosensor (a) i el mecanisme pel qual monitoritza les fluctuacions en la quantitat de matèria orgànica al medi (b). Un increment de la DBO suposa un augment en la quantitat de MO disponible per la part biològica de la pila, que augmenta el seu metabolisme i la senyal d'intensitat de corrent de sortida. El mateix sistema també pot detectar la presència de toxines (c) que inhibeixen l'activitat biològica i provoca una davallada en la quantitat de senyal elèctric de sortida (Sun et al., 2015).

Per evitar aquest problema, es distingeixen dos tipus de mesura de DBO en una pila.

Mentre el substrat no satura la taxa metabòlica dels microorganismes, podem mesurar la intensitat de corrent instantània. Aquesta mesura amperomètrica, serà proporcional a la activitat biològica i quantitat de MO present al medi. Aquest tipus de mesura té un rang de concentració de DBO detectable, entre 100 i 200mg/L de DBO, amb l'avantatge que les mesures poden ser contínues. A més, en aquest sistema, és molt important controlar qualsevol altre factor que pugui saturar la oxidació i funcionament de la pila, com pot ser la saturació de les reaccions de reducció del càtode o la presència d'acceptors d'electrons a l'ànode.

Per altra banda, les mesures coulomètriques ens permeten enregistrar la quantitat total de càrrega produïda per la pila funcionant en mode tanda o batch quan la quantitat de substrat és molt elevada i la taxa d'oxidació, i d'intensitat de corrent elèctric, està saturada. Aquesta mesura ens dona un valor acumulatiu de la quantitat de MO que ha estat metabolitzada al llarg del temps. El rang de DBO detectable pot ser molt elevat, per sobre d' 1g/L de DBO, però les mesures necessiten un llarg temps d'oxidació, de diverses hores, i les mesures són discretes (Prévotau i Rabaey, 2017).

En segon lloc, es demostra la repetibilitat d'aquest sistema, així com la longevitat que pot tenir una MFC en funcionament continu i estable. Kim et al., 2003, va fer funcionar la pila durant 5 anys, produint corrent de manera estable amb oscil·lacions proporcionals a un ampli espectre de la DBO al substrat i de nivells d'activitat microbiològica.

En tercer lloc, el temps per colonitzar i generar els biofilms necessaris per considerar la pila estable son relativament llargs, entre 3 i 8 setmanes. Per contra, el temps de resposta als canvis de concentració de la MO al medi de la pila un cop estable, son molt ràpids, d'entre 5 minuts a 10 hores segons la font (Sun et al., 2015).

Per altra banda, diferents estudis han treballat la influència d'altres factors a DBO constant com la temperatura, que correlaciona lineal i positivament amb la intensitat de corrent, el pH, amb valors òptims per la intensitat a pH neutre i amb la conductivitat, que també correlaciona positivament amb la intensitat de corrent produïda.

Altres millores que sorgeixen son l'aplicació d'un voltatge extern per amplificar la generació de corrent per part de la pila. Això permet als microorganismes treballar al potencial màxim de generació d'intensitat elèctrica (Modin i Wilén, 2012).

Totes les millores que s'han anat desenvolupant al voltant de les MFC com a biosensors per monitoritzar la DBO en aigües residuals han permès comercialitzar el primer analitzador de DBO online basat en la tecnologia de les MFC amb mesures amperomètriques (Figura 12, esquema funcionament), el HABS-2000, a Corea (KORBI, sense data). Aquest aparell permet analitzar mostres d'aigua tant residuals com d'entorns naturals per mesurar la DBO entre 0 i 2000mg/L. Tot i això, aquesta tecnologia no pot competir encara amb altres models analítics degut a la falta d'estabilitat, sensibilitat i temps de resposta (Sun et al., 2015), així com la necessitat de mostreig i obtenció de mesures discretes.

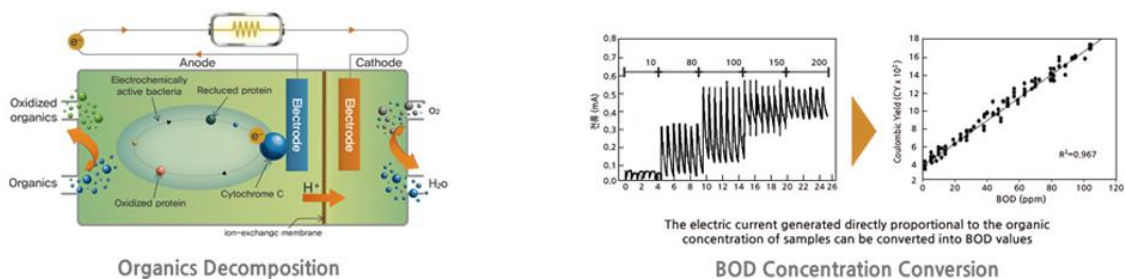


Figura 12: principis del funcionament del HABS-2000, explicats a la mateixa web on es comercialitza el producte. La oxidació de la matèria orgànica a la MFC (esquerra) genera una intensitat de corrent proporcional a la quantitat de DBO al medi (dreta) (Korbi, sense data).

En tots els casos, totes aquestes piles experimentals o comercialitzades son tancades, amb necessitat de bombejar la mostra a través de l'ànode, control d'oxigen a l'ànode i càtode i amb presència de membrana. A més, estan molt focalitzades en la monitorització de DBO en aigües residuals.

Tot i aquests avanços, el salt de les piles de laboratori al camp, comporta grans reptes pel que fa a tots aquells factors hidrogeològics que poden afectar al funcionament de la pila (pH, temperatura, nutrients, diversitat microbiana, condicions REDOX, conductivitat, etc).

Les primeres piles submergibles (SMFC) aplicades en l'àmbit de les aigües residuals per mesurar la DBO tenien l'ànode directament submergit i en contacte directe amb l'efluent anaeròbic d'aigües residuals i el càtode tancat en condicions controlades i oxigenat. Les dues cambres, una oberta al medi i l'altre tancada, estaven separades per una membrana d'intercanvi protònic (PEM) (Peixoto et al., 2011).

En aquest cas, es torna a trobar una correlació lineal entre la concentració de carboni orgànic i la intensitat de corrent produïda per la pila amb DBO_5 per sota de $78 \pm 8 \text{ mg O}_2/\text{L}$.

Un dels punts febles d'aquesta tecnologia és la difusió d'oxigen a través de la PEM a la zona anòxica on s'ubica l'ànode. Més enllà de la millora de la eficiència de les PEM (Ayyaru i Dharmalingam, 2014; Kim et al., 2009) les MFC amb elèctrodes lliures, sense membrana, son una bona solució en la instal·lació a camp, sempre i quan es pugui mantenir el diferencial REDOX necessari entre els dos elèctrodes gràcies a la distància entre ambdós elèctrodes i les característiques del medi, anòxic a l'ànode i condicions oxidants al càtode.

Si ens centrem en l'ús de les piles per analitzar l'activitat microbiana i DBO d'aigües subterrànies Zhang i Angelidaki, 2011, troben un bon potencial d'aplicabilitat d'aquesta tecnologia al camp, tot i que l'experiment segueixi duent-se a terme en una pila de laboratori amb mostres d'aigües subterrànies contaminades.

En aquest cas, es troba bona correlació entre la intensitat de corrent de la pila i la concentració de DBO un cop està format el biofilm de l'ànode. En canvi, aquest sistema no ha servit per mesurar l'activitat microbiana. Per altra banda, la intensitat de corrent generada per una pila fresca, sense l'ànode colonitzat, sí que mostra correlació amb l'activitat microbiana de la mostra, però no amb la DBO.

Amb això, el salt cap a piles obertes com a sensors, en contacte directe amb el medi i instal·lades directament en masses d'aigua que volen ser analitzades son molt actuals i escassos (Varshney et al., 2023).

Velasquez-Orta et al., 2017, analitza la possibilitat de fer servir les piles microbianes per monitoritzar episodis de contaminació fecal en aigües subterrànies poc profundes ubicant les piles en pous com a alternativa als actuals anàlisis d'OD, DBO, DQO, coliforms, terbolesa, conductivitat, etc.

D'aquest treball es destaca la importància de la temperatura en la resposta de la pila, però no pas de la salinitat ni la resistència externa.

La intensitat de corrent obtinguda en la pila al laboratori (episodi de contaminació artificial) i al de camp (episodi de contaminació natural) són diferents, amb nivells més baixos en el segon cas.

Tot i això, la resposta de les 2 piles ubicades al pou, una amb els dos elèctrodes a la zona amb aigua i l'altra amb l'ànode al sediment i el càtode a l'aigua (SMFC), mostren una resposta en forma d'increment d'intensitat de corrent quan es dona un episodi de contaminació significant, sobre tot en el primer cas. Aquesta observació és molt important, ja que demostra que la pila té una resposta qualitativa similar en camp respecte als múltiples experiments de laboratori amb canvis en la concentració de MO.

Corbella et al., 2019, estudia el potencial d'una MFC com a bioindicador per mesurar la DQO en sistemes naturals de tractament d'aigües residuals (Structured Wetland Microbial Fuel Cell, SW-MFC). En aquest experiment, a més dels treballs de laboratori, s'ubiquen un seguit de piles en una sistema a escala pilot, on la mostra (aigües residuals) flueixen de manera contínua pel sistema amb oscil·lacions en la COD. L'objectiu és fer servir la pila com a sistema d'alarma online quan la COD augmenta per sobre de certs valors.

En aquest cas, es troba una bona resposta entre l'augment puntual de DQO i la intensitat de corrent produïda per la pila amb cert decaïent curt de temps. Altres observacions importants són que la pila no funciona de manera estable fins la tercera setmana degut a l'establiment de la biomembrana i funciona amb un bon rang de senyal entre 3 i 4 setmanes. A partir d'aquí, el rang de senyal disminueix considerablement degut possiblement a l'acumulació de matèria orgànica i taxa de respiració endògena.

Fernàndez-Gatell et al., 2022 estudia la implementació d'una pila microbiana alimentada amb electricitat per monitoritzar l'activitat microbiana i quantitat de biomassa en sistemes saturats amb aigües residuals. En aquest treball, es troba molt bona correlació entre la intensitat de corrent generada per la pila i els diferents paràmetres estudiats: activitat enzimàtica, ATP (adenosine triphosphate) i biomassa (sòlids volàtils) al medi.

Amb aquests anàlisis de l'estat de l'art de les piles microbianes com a biosensor aplicats en aigües subterrànies podem concloure que, tot i el potencial esmentat en gran part dels articles (Tront et al. 2008; Velasquez-Orta et al., 2017), sobre tot en aigües subterrànies sota tractaments de bioremediació, atenuació natural o recàrrega d'aqüífers, la recerca en camp encara no s'ha dut a terme o està en estadis molt incipient i no s'ha trobat cap experiment d'aplicació de MFC com a biosensor d'activitat microbiològica ni DBO en sistemes edàfics aplicat al camp o plantes pilot.

3. Material i mètodes

3.1. Planta pilot de recàrrega artificial d'aqüífers de Palamós

El present estudi s'ha dut a terme en una planta pilot de recàrrega d'aqüífers artificials en funcionament des de 2018 i ubicada a la Estació Depuradora d'Aigües Residuals (EDAR) de Palamós (Catalunya, Espanya).

En aquesta planta de tractament, les aigües residuals provenen de Palamós i altres municipis del voltant, amb un cabal de disseny de 33.000 m³/dia i 165.450 habitants equivalent. El procés consta de pretractament, tractament primari per sedimentació, tractament secundari biològic per fangs activats en un sistema de fluxe-pistó i l'efluent s'aboca al mar Mediterrani via emissaris. Cal destacar que una particularitat d'aquesta EDAR és la d'una gran fluctuació de volum d'aigua residual tractada, que es triplica a l'estiu durant la temporada turística (ACA, 2024; CACBGI, 2024). El clima de la zona és típicament Mediterrani, amb temperatures mínimes de desembre a febrer, amb mínimes de 3°C i màximes al juliol i agost, amb màximes de 36°C. Les precipitacions es concentren als mesos d'octubre, novembre, abril i maig.

La planta pilot consta de 6 sistemes de recàrrega independents els quals s'alimenten amb l'efluent de la mateixa EDAR (Valhondo et al., 2020) (Figura 13, A). El present estudi us duu a terme en 2 d'aquests sistemes. L'objectiu general de la planta pilot és imitar a menor escala un sistema de recàrrega artificial d'aqüífers amb un tractament sòl-aqüífer (MAR-SAT). El principal interès de la planta pilot recau en estudiar diferents composicions de barreres reactives de recàrrega per avaluar la seva eficiència en la millora de l'aigua de recàrrega i com afecta a les dinàmiques en el sistema de l'aqüífer centrats en la reducció i atenuació de contaminants recalcitrants. Per aquest motiu, la planta pilot s'opera amb períodes de recàrrega d'aproximadament 2 mesos de manera contínua i sota certes condicions, compaginats amb períodes de repòs.

Cada un dels 6 sistemes consta d'un tanc de recàrrega que imita una bassa d'infiltració de 2,38x1,5x1,15 m³ a la part superior de l'aqüífer (Figura 13, b). Aquí s'ubiquen les diferents barreres, en el nostre cas la barrera 31 consta de 49% de compost vegetal, 49% de sorra i 2% d'argiles mentre que la barrera 51 està composta per un 50% de sorra, 30% de MO (Compost + encenalls de fusta), 10% de biochar, 8% de zeolites i 2% d'argiles. En tots els casos hi ha vegetació natural a la part superior de la barrera reactiva i una capa de 15cm de grava a la part inferior.

L'aqüífer artificial té una longitud de 15m de llarg, 2,38m d'ample i 1,5m d'alçada. S'estudien 2 tipus d'aqüífer, un amb substrat homogeni, corresponent a la barrera 3, i l'altre a amb substrat heterogeni, barrera 5.

A la sortida de l'aqüífer, l'efluent es recull i quantifica. Al llarg de l'aqüífer s'ubiquen un total de 9 piezòmetres, 3 unitats en 3 seccions A, B i C a una distància de 1,5m, 5,5m i 12,5m de la barrera, respectivament. Addicionalment, hi ha un piezòmetre ubicat a la part inferior de la barrera, travessant la zona de grava i en posició diagonal (Figura 13, b).

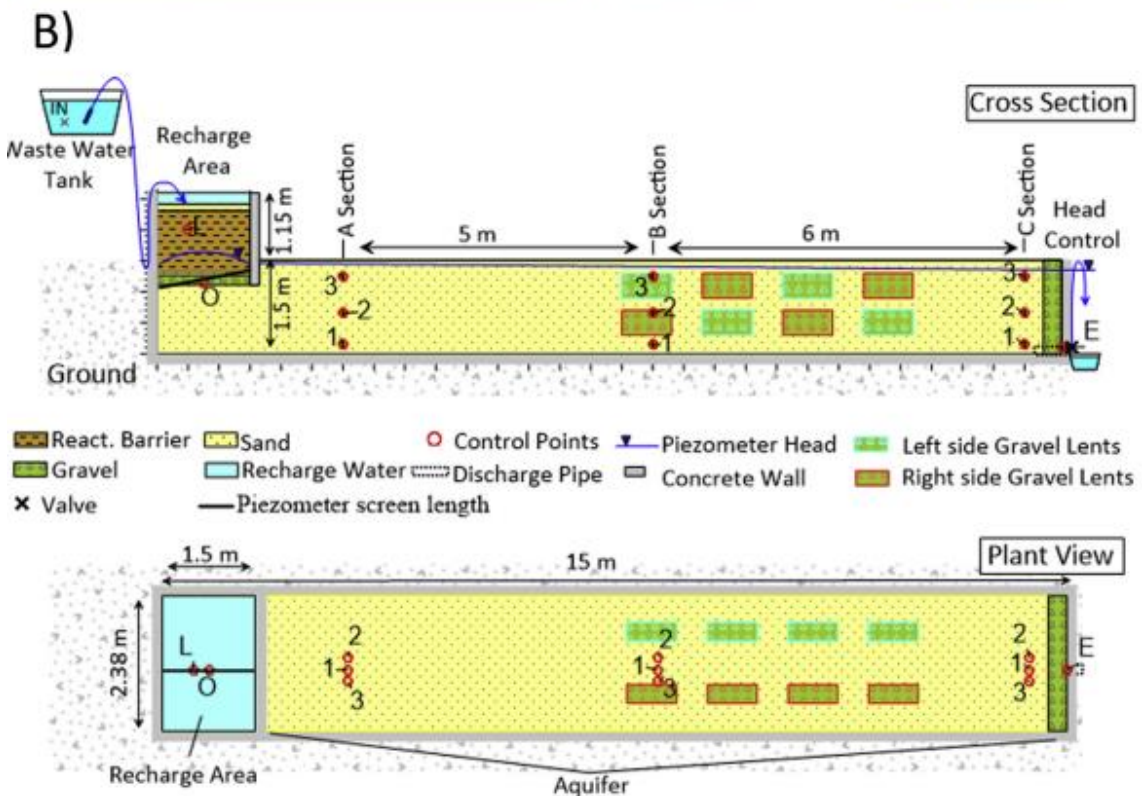
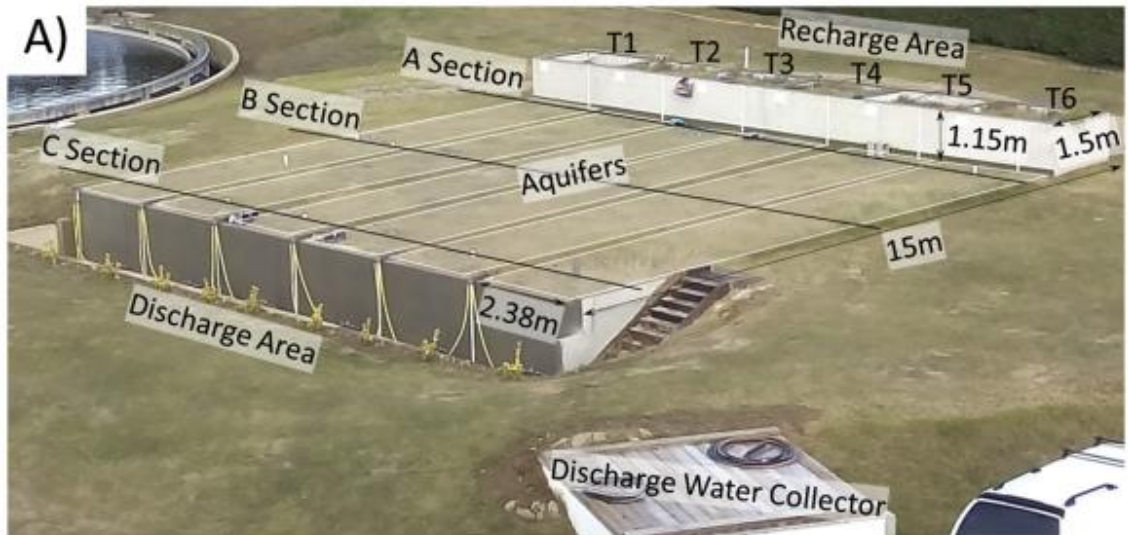


Figura 13: vista aèria de la planta pilot de Palamós (A), on es poden distingir els 6 sistemes MAR-SAT independents amb les basses de recàrrega a la part superior (T1 a T6). (B) Esquema de la secció (superior) i planta (inferior), d'un dels sistemes MAR-SAT. A la part esquerra, la bassa de recàrrega amb les barreres i el piezòmetre oblic. A llarg de l'aqüífer els piezòmetres ubicats a les seccions A, B i C. Finalment, la zona de descàrrega, amb control de l'efluent (Valhondo, et al., 2020).

3.2. Assaig amb piles microbianes

Per tal d'avaluar la viabilitat de l'ús de piles microbianes com a biosensor en instal·lacions de recàrrega gestionada d'aquífer, durant 5 mesos (del 9 de març al 9 de novembre del 2021) es van instal·lar un total de sis piles a les instal·lacions de Palamós. Les piles estaven formades per un ànode i un càtode de 10cm de llarg separats entre ells 8 cm (Figura 14). Les piles consistien en una malla d'acer inoxidable de grau marí (grau A316L, fil de malla 4,6mm, Ø fil 1mm, S/ISO 9044:1999) que envoltava granit granular procedent d'escòria d'elèctrode de fosa (grafit granular reciclat (>98%C, <0,05% S, <0,05% N, <1% cendres, <0,5% volàtils, tamizat a >4,6 mm)). A la meitat de l'alçada de l'ànode hi ha l'elèctrode de referència, d'Ag/AgCl (3M NaCl), model RE-6 de la marca Prosense. Els tres elèctrodes estan connectats a un potenciostat, NEV4 de la marca Nanoelectra, que manté el potencial entre l'ànode i l'elèctrode de referència a 0,3V.

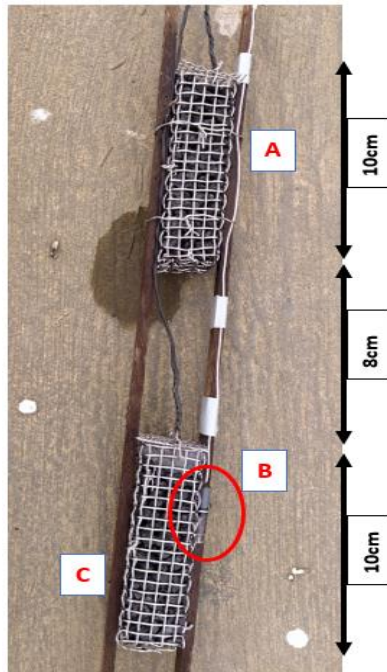


Figura 14: imatge d'una de les piles instal·lades. A, elèctrode superior que fa de càtode; B, elèctrode de referència i C, elèctrode inferior que fa d'ànode.

Les sis piles es van distribuir en dos tancs (tres al Tanc 3 i tres al Tanc 5) disposades de la següent manera (Figura 15): una pila ubicada a la bassa d'infiltració del tanc (Pila 31 i Pila 51) amb el càtode submergit a la làmina d'aigua de recàrrega i la part inferior de l'ànode a 25 cm de profunditat de la barrera; una segona pila ubicada al piezòmetre oblic (Pila 32 i Pila 52) ubicat per sota de la barrera, a la zona de grava; i una última pila al piezòmetre de l'aquífer de la secció A (Pila 33 i Pila 53) ubicat a una distància d'1,5 metres de la barrera. Les piles ubicades als piezòmetres estan a una profunditat a la qual l'ànode està submergit i el càtode està per sobre del nivell de l'aigua, càtode aeri.

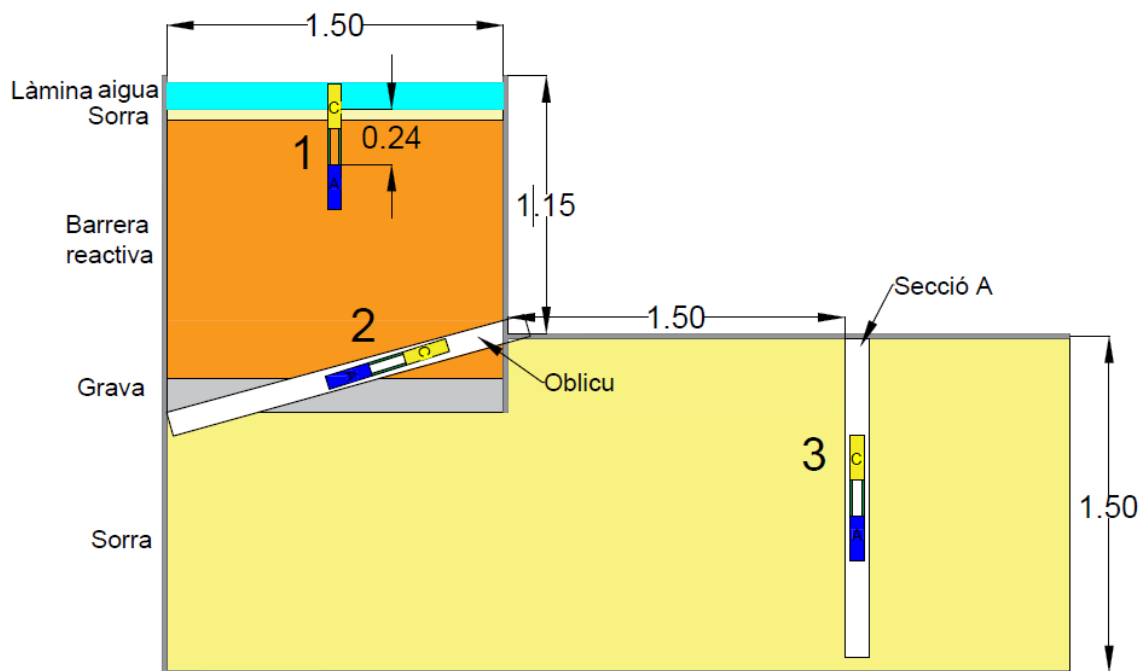


Figura 15: esquema de la bassa de recàrrega i el primer tram de l'aqüífer amb la ubicació de les piles (tanc 3 i tanc 5). Dibuix a escala excepte la mida de les piles, sobredimensionades. Pila 1, ubicada a la barrera amb l'ànode (A) a la barrera reactiva i el càtode (C) submergit a la làmina d'aigua de recàrrega. Pila 2, ubicada al piezòmetre oblic amb ànode submergit i càtode aeri. Pila 3, ubicada al piezòmetre de la secció A, amb l'ànode submergit i el càtode aeri.

A nivell d'operació, al sistema MAR-SAT es distingeixen 3 períodes de recàrrega, alternats amb períodes de repòs. El primer període de recàrrega està comprès entre el 9 de març i el 18 de maig; el segon entre el 4 de juny i el 27 de juliol; i el tercer entre el 26 d'agost i el 9 de novembre.

Durant l'experiment, les fluctuacions en els nivells de l'aqüífer han fet que les piles ubicades als piezòmetres alternessin períodes amb i sense làmina d'aigua, fins i tot durant els períodes de recàrrega. El fet que l'ànode alternés mesures amb i sense aigua de manera no controlada ha provocat que les lectures siguin erràtiques i no interpretables en algunes piles, concretament es descarten 4 piles al piezòmetre oblic i secció A i es treballa només amb dades generades per les MFC 31 i 51 ubicades a les barreres. En aquestes piles ubicades a la barrera s'ha monitoritzat la presència de làmina d'aigua i s'han pogut descartar els períodes amb absència de làmina, tal i com es descriu més endavant.

Les dades obtingudes per les piles són contínues, cada 30 segons, i expressades en forma d'intensitat de corrent (ampers).

3.3. Variables monitoritzades durant l'assaig

A més de les dades obtingudes amb les piles microbianes a la planta Pilot de Palamós, es disposa d'altres mesures discretes, semicontínues i contínues sobre diferents paràmetres físics, químics i biològics del sistema per dur a terme l'anàlisi multivariant i altres estadístics (Taula 2).

Taula 2: dades físiques, químiques i biològiques de la planta pilot MAR-SAT a la EDAR de Palamós preses entre el 9 de març al 9 de novembre del 2021. S'inclouen dades de l'estació meteorològica de la EDAR (Meteo), de la barrera a diferents profunditats (barrera, profunditat en cm), dels piezòmetres (oblic, A o C) i de l'aigua de recàrrega a la sortida del secundari (afluent). Les variables estan distribuïdes en contínues, semi-continues o discretes segons la freqüència de mesura. S'han descartat variables repetides puntuals quan se'n tenen de discretes i variables a mes de 30 cm de profunditat de la barrera.

CONTÍNUES

Dada	Unitats	Lloc de mostreig	Freqüència
Intensitat de corrent de la MFC	A	Barrera	Cada 30 segons
Temperatura afluent	°C	Afluent	Cada 30 minuts
Conductivitat afluent	mS/cm	Afluent	Cada 30 minuts
Temperatura ambiental	°C	Meteo	Cada 15 minuts
Pluviometria	mm	Meteo	Precipitació acumulada cada 15 minuts
Nivell aqüífer	Metres	Oblic	30 minuts
Oxigen dissolt	mg/L	Barrera, 5 cm	3 segons
		Barrera, 10 cm	
		Barrera, 20 cm	
		Barrera, 30 cm	
Temperatura barrera (sonda OD)	°C	Barrera, 5 cm	3 segons
		Barrera, 10 cm	
		Barrera, 20 cm	
		Barrera, 30 cm	
Humitat relativa	%	Barrera, 10 cm	30 minuts
		Barrera, 20 cm	
		Barrera, 30 cm	
Temperatura barrera (sonda HR)	°C	Barrera, 10 cm	30 minuts
		Barrera, 20 cm	
		Barrera, 30 cm	
Làmina d'aigua	cm	Barrera	Cada 2-6 dies

SEMICONTÍNUES

Dada	Unitats	Lloc de mostreig	Freqüència
DQO	mg O ₂ /l	Afluent	Setmanal
DBO ₅	mg O ₂ /l	Afluent	Setmanal
Ph	Ph	Afluent	Setmanal
MES	mg/l	Afluent	Setmanal
Clorurs	mg Cl/l	Afluent	Cada 2 setmanes
Amoni	mg N-NH ₄ /L	Afluent	Setmanal
Nitrats	ppm	Afluent	Setmanal
Nitrits	mg N-NO ₂ /L	Afluent	Setmanal
N total	mg N/L	Afluent	Setmanal
P total	mg P/L	Afluent	Setmanal

DISCRETES

*Totes les dades discretes mostrejades els dies: 09/03/21; 06/04/21; 20/04/21 i 18/05/21

Dada	Unitats	Lloc de mostreig
E. Coli	log UFC/100ml	Afluent, A i C
MES	mg/L	Afluent, A i C
Bacteriòfags	log UFP/100ml	Afluent, A i C
Activitat biològica. EPS (Exopolysaccharides)	µgBSA/g µg glucosa/g	Mostra de sol de la barrera a 15, 28, 41 i 54 cm
Viabilitat cel·lular	UFC/g	Mostra de sol de la barrera a 15, 28, 41 i 54 cm
ADN	16s còpies/g	Mostra de sol de la barrera a 15, 28, 41 i 54 cm
Carboni oxidable total	% Cox	Mostra de sol de la barrera a 15, 28, 41 i 54 cm
Matèria orgànica	%MO	Mostra de sol de la barrera a 15, 28, 41 i 54 cm

Aquestes dades han estat analitzades, filtrades i s'ha treballat amb mitjanes horàries amb totes les dades contínues abans de procedir amb els anàlisis estadístics.

3.4. Selecció del període d'estudi

Donat el llarg període d'instal·lació de les piles i el seguit de condicions que afecten al seu funcionament, es fa un estudi previ per tal d'acotar el període per fer la PCA i la resta d'anàlisis estadístics. Per dur aquest anàlisi previ, es descarten els períodes sense recàrrega o sense làmina d'aigua a la barrera i es tenen en compte tots aquells factors que puguin condicionar el funcionament de les piles. Tot i que les piles s'instal·len al març, no és fins al dia 2 d'abril que es comencen a prendre dades de manera contínua a les dues barreres. Es decideix fer 2 anàlisi:

- 1- Anàlisi en un període curt de temps (9 dies) amb condicions òptimes i estables de funcionament per les piles, amb l'objectiu de veure quines components afecten més a les mesures d'intensitat de corrent. Aquestes condicions són amb làmina d'aigua permanent a la barrera per assegurar el càtode submergit en aigua de recàrrega en contacte amb l'atmosfera i l'ànode al substrat saturat d'aigua. Les lectures d'intensitat de corrent en aquest període segueixen un patró lògic de corrent positiva, sense valors extrems i mesures contínues tan per la intensitat de corrent com per les altres variables estudiades. S'eviten episodis de pluja, ja que suposen canvis bruscos en les condicions de funcionament de la barrera. Tot i voler evitar altres episodis de canvis bruscos, s'inclou una perforació de les basses de recàrrega el dia 6 d'abril. L'anàlisi es duu a terme entre els dies 02.04.2021 (12:00) i 10.04.2021 (13:00) (Figura 16).
- 2- Anàlisi període llarg (47 dies) en condicions òptimes de funcionament per les piles però que incloguin períodes de pluja i altres esdeveniments puntuals. L'objectiu d'aquest anàlisi més complex és veure si es mantenen les correlacions de la primera PCA i avaluar l'efecte de canvis bruscos en les condicions experimentals. Aquest segon període permet la integració a l'anàlisi estadístic de dades semicontínues i discretes i buscar correlacions entre elles. En aquest cas, les dades contínues de corrent i altres variables poden contenir salts i valors perduts i caldran sistemes d'extrapolació per completar les dades. L'anàlisi es duu a terme entre els dies 02.04.2021 (12:00) i 18.05.2021 (12:00), descartant els períodes amb absència de dades i no extrapolables (Figura 16).

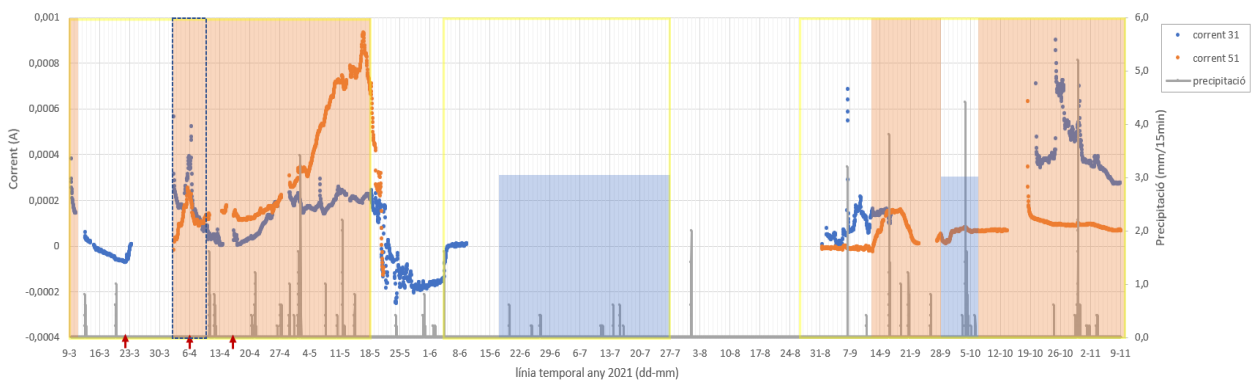


Figura 16: línia temporal amb la representació gràfica de les sèries de dades de corrent elèctric a les barreres del tanc 5 (51) i tanc 3 (31). Ombrejat amb taronja els períodes amb làmina d'aigua en les 2 basses de recàrrega (tanc 3 i 5) i ombrejat amb blau només làmina d'aigua a la barrera del tanc 3. En gris, eix secundari, precipitació expressada en mm acumulats en 15 minuts. Requadres gros marquen els 3 períodes amb la recàrrega activa. Fletxes vermelles marquen dies on es perfora la barrera de les basses d'infiltració. El requadre blau puntejat, marca el període curt on es fa el primer anàlisi de components principals.

La resta de període temporal es descarta en aquest treball per diferents motius, el sistema de recàrrega està parat, no hi ha dades d'intensitat de corrent o altres dades rellevants o bé no hi ha l'amina d'aigua que garanteixi el correcte funcionament de la pila.

3.5. Anàlisi de Components Principals (PCA)

Els anàlisi estadístics multivariants permeten tractar gran quantitat de dades i analitzar simultàniament diferents variables i la resposta que tenen entre elles. Un dels mètodes d'interdependència que estudia la estadística multivariant és l'anàlisi de components principals (PCA), que permet generar un sistema de variables més petit que sintetitza el grup de variables original. En altres paraules, aquesta eina permet reduir les dimensions d'un conjunt de variables d' "n" dimensions a tan sols 2 o 3 i, per tant, el resultat es pot representar gràficament en aquestes components principals (PCs) generades. Aquestes components expliquen el màxim possible de la variabilitat del conjunt de dades analitzat i busquen, a més, la màxima ortogonalitat respecte a l'anterior. Per fer això, les solucions estan sotmeses al mètode de rotació *varimax*, el qual busca que cada variable estigui representada només per una component, minimitzant així el número de variables dintre de cada component.

Aquesta metodologia facilita, doncs, la representació gràfica d'un sistema multi-dimensional, però cal tenir en compte que alhora en dificulta la interpretació dels resultats.

Un dels objectius de la PCA en aquest treball és ponderar la importància de les diferents variables respecte al funcionament de les piles microbianes i veure si les dades obtingudes amb aquesta tecnologia es poden correlacionar amb altres variables, principalment amb les dades biològiques.

Aquest anàlisi s'ha dut a terme només amb les dades contínues i no permet analitzar aquells punts on falten dades en alguna de les sèries. Per aquest motiu, es fa un treball d'extrapolació per tal d'evitar en la mesura del possible la pèrdua de dades que no entren a l'anàlisi (capítol 4.1, extrapolació de dades).

En els resultats d'aquest treball es presenten un total de 4 blocs de PCAs a curt termini, a llarg termini incloent intensitat de corrent, a llarg termini sense incloure la variable intensitat de corrent i a llarg termini diferenciant absència i presència de pluja.

La exclusió de la intensitat de corrent generada per les piles de la PCA permetrà comparar la correlació que té la intensitat de corrent amb la resta de variables i amb les components extretes.

En el cas de les PCAs fetes amb i sense pluja, permetran avaluar si hi ha un canvi del comportament de les piles respecte a la resta de variables durant els episodis de pluja. Per tant, es fan 2 PCAs paral·leles segregant el període estudiat amb la variable categòrica pluviometria.

En tots els casos, les components extretes presentades als resultats estan limitades a 2, tot i que s'han fet també les mateixes PCAs amb 3 dimensions per avaluar la importància de la tercera component extrreta.

Els diferents anàlisis estadístics, inclosa la PCA, estan fets amb el programari SPSS (IBM SPSS Statistics 28).

3.6. Anàlisis de correlació de variables semicontínues, discretes i components principals.

A més de les PCAs, es fan un seguit d'anàlisis de correlació lineal entre la intensitat de corrent generada per la pila i les diferents variables, incloent les components generades en la PCA.

Per a les variables contínues, incloses també en la PCA, l'anàlisi es fa amb les mitjanes horàries.

En canvi, per comparar les dades semicontínues de l'afluent d'entrada al sistema MAR-SAT, les quals no s'han integrat a la PCA, amb la resta de dades contínues, es treballa amb la mitjana diària d'aquells dies on hi ha dades de l'afluent. En aquest anàlisi, que permet comparar les variables de l'afluent amb les variables ambientals, de la barrera i les components de les PCAs, s'han descartat algunes variables repetitives com les diferents mesures de concentració de nitrogen o dades poc rellevants i puntuals com els clorurs.

Per últim, les mesures de l'activitat biològica i concentració de carboni orgànic a la barrera es comparen amb el funcionament de la pila. Es tracta, concretament, de 4 mesures puntuals distribuïdes en el temps de les quals només 3 coincideixen amb el període de funcionament de la pila. Per estudiar la correlació es fan servir les 3 dades puntuals a 28 cm de profunditat i es creuen amb la mitjana diària de la intensitat de corrent i les components extretes a la PCA pels dies 06/04/21, 20/04/21 i 18/05/21.

3.7. Diferències entre barreres

Per últim, es comparen les mitjanes de les variables més rellevants entre les dues barreres a través d'una comparació per T-test. Amb aquest anàlisi es busca si hi ha valors d'activitat biològica, carboni orgànic i intensitat de corrent a la pila més elevats en una barrera que en l'altra.

4. Resultats

4.1. Selecció i tractament de dades per l'anàlisi multivariant

Abans d'introduir les dades a la PCA s'ha dut a terme la selecció i tractament de les diferents variables de les quals es disposa i s'han fet un seguit de PCAs prèvies per avaluar les millors condicions de l'anàlisi. En primer lloc, es treballa amb les variables contínues les quals es filtren, s'eliminen valors extrems o erràtics i es treballa amb la mitjana horària. Per la PCA a curt termini, entre els dies 02.04.2021 (12:00) i 10.04.2021 (13:00), hi ha un total de 193 franges horàries. Al període llarg d'estudi, que inclou al curt, es treballa amb 47 dies entre el 02.04.2021 (12:00) i 18.05.2021 (12:00) i que suposen un total de 1105 franges horàries. La versió utilitzada d'SPSS (v28) permet (a diferència de versions anteriors) fer la PCA sense haver de normalitzar les sèries de dades per tal que tinguin un rang semblant entre elles.

Reducció de variables d'entrada

En primer lloc, es selecciona una de les dues mesures de temperatura de la barrera disponibles, una vinculada a la sonda d'humitat relativa i l'altre a la sonda d'oxigen dissolt. Ambdues sondes tenen mesures molt semblants però amb nivells basals 1,5°C diferents. S'escullen les dades generades amb la sonda d'oxigen dissolt ja que estan més completes.

Les variables d'oxigen dissolt, temperatura i humitat relativa de la barrera estan disponibles a diferents profunditats. Degut a la correlació generalitzada de la mateixa variable a diferents profunditats, la PCA es veu molt condicionada si entrem totes les dades, ja que genera components a mida per a una sola variable, per exemple, la primera component respon a la temperatura a 6 profunditats diferents i discrimina altres variables amb un sol punt de mostreig.

Per aquest motiu es selecciona la profunditat a 20 cm per les variables OD, HR i temperatura de la barrera, tenint en compte que l'ànode de la pila està a 25 cm de profunditat.

La variable làmina d'aigua a la bassa de recàrrega, es passa a categòrica, amb o sense presència, i marca el correcte funcionament del sistema i de la pila microbiana a la barrera. Per tant, aquesta variable ens marca els períodes on es pot fer la PCA i es descarten tots el període sense làmina d'aigua.

La pluviometria es passa també a variable categòrica. D'aquesta manera, es poden separar els períodes d'estudi segons si hi ha absència o presència de pluja.

En l'estudi a llarg termini s'inclouen només una de les 3 mesures de temperatura de les quals es disposa, ambient, efluent i barrera a 20cm. Això és degut a que les 3 temperatures tenen un patró molt semblant al llarg de l'estudi i condicionen molt la generació de la primera component

en la PCA. Si es té en compte només una de les temperatures, en aquest cas la de la barrera, es considera que es pondera millor la rellevància de la resta de variables. D'aquesta manera s'augmenta la extracció de totes les variables en detriment de la temperatura, que disminueix lleugerament.

Decalatge temporal

Un altre factor que pot influenciar el resultat de la PCA i la correlació entre variables és el decalatge temporal que poden tenir les dades preses en diferents punts de mostreig. L'exemple més clar és la temperatura a diferents profunditats respecte a la temperatura ambiental. Tot i estar correlacionades entre elles, la velocitat de difusió fa que els canvis de temperatura ambiental arribin de manera retardada a les capes més profundes de la barrera. Això pot provocar una pèrdua de correlació entre dades que si que ho estan, degut a la dinàmica del sistema, sobre tot en les oscil·lacions diàries.

Tot i això, no s'ha considerat necessari corregir cap decalatge amb les variables estudiades (Annex 1).

Extrapolació de dades

L'execució de la PCA té el condicionant que quan hi ha una dada que falta en una de les sèries, s'exclou de l'anàlisi aquella franja horària per a totes les sèries. Això vol dir que, per tal que cada una de les 1105 franges horàries de l'estudi entrin a l'anàlisi, s'han de tenir dades per a totes les variables estudiades per a aquella hora.

Donat que hi ha gran quantitat de valors perduts en diferents variables, s'estudia extrapolar i interpolat les dades que falten per ampliar l'abast de l'estudi.

La interpolació de valors perduts puntuals es duu a terme com a mitjana del valor immediatament posterior i anterior.

Del total de 1105 franges horàries incloses a l'estudi a llarg termini, només n'hi ha 700 amb les dades completes a la barrera 31 i 730 a la barrera 51, incloent 8 dades puntuals interpolades.

Si s'extrapolen dades amb un criteri conservador per a les variables temperatura de la barrera i humitat relativa, s'aconsegueixen entrar a la PCA 871 franges horàries a la barrera 31 i 809 a la barrera 51 (detalls a l'Annex 1).

Aplicació de logaritmes

L'aplicació de logaritmes pot millorar la correlació i covariància entre les diferents variables i, per tant, millorar la resolució de la PCA així com potenciar variables d'interès com la intensitat de

corrent. En aquest cas, s’han aplicat logaritmes decimals només a la variable intensitat de corrent tan per les PCAs com pels estudis de correlació entre variables (Annex 1).

4.2. PCA període curt

El primer anàlisi de components principals es duu a terme amb les dades disponibles entre els dies 02.04.2021 (12:00) i 10.04.2021 (13:00) i incloent les variables resumides a la Taula 3. Com hem comentat anteriorment, les condicions durant aquest període són relativament estables, amb oscil·lacions de temperatura ambiental diàries però en absència de pluja, amb l’únic fet puntual de la perforació de les barreres per evitar l’acumulació d’aigua a la bassa de recàrrega el dia 6 (Figura 16).

Taula 3: variables incloses en els 2 PCA fetes a curt termini

	Variables ambientals - Temperatura	Variables affluent - Temperatura - Conductivitat	Variables barrera 31 - Corrent_Log - Nivell aqüífer - Oxigen dissolt a 20cm - Temperatura a 20cm - Humitat relativa a 20cm	Variables barrera 51 - Corrent_Log - Nivell aqüífer - Oxigen dissolt a 20cm - Temperatura a 20cm - Humitat relativa a 20cm
PCA 31	X	X	X	
PCA 51	X	X		X

Els resultats obtinguts a les 2 PCAs es mostren a la Taula 4, on hi ha la proporció de variància explicada per cada una de les dos components. Aquelles variables que no tenen una clara correlació amb una sola component, valors d’extracció superior a 0,5 per a més d’una component, s’han ressaltat. Per últim, es fa servir el valor del test KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) que indica la adequació del mostreig, el qual és màxim amb valors de 1 i ha de tenir un valor mínim de 0,5 per tal que l’anàlisi sigui consistent.

Taula 4: correlació entre les variables i les components obtingudes amb els dos anàlisis de components principals. Entre parèntesis, grau d'extracció de la variable per a cada component en espai rotat (mètode Varimax amb normalització Keiser). Les variables en negreta indiquen valors d'extracció superiors a 0,5 en més d'una component. Percentatge de variabilitat explicada per cada component expressat en percentatge no acumulat.

	Número de component	Variables		% de variància	Valor test KMO
		Correlació positiva	Correlació negativa		
PCA 31	1	nivell aq. 31 (0,85) temp, barrera 31 (0,84) temp. ambiental (0,69) intensitat corrent 31-Log (0,687)	HR barrera 31 (0,94) OD 31 (0,54)	64,2	0,80
	2	temp. afluent (0,91)	cond. afluent (0,84)	11,8	
PCA 51	1	temp. ambiental (0,89) nivell aq. 51 (0,89) HR barrera 51 (0,88) temp. barrera 51 (0,77) temp. afluent (0,65)	cond. afluent (0,78)	54,4	0,68
	2	intensitat corrent 51-Log (0,95) OD 51 (0,88) temp. afluent (0,62)	cond. afluent (0,53)	23,0	

A la PCA 31, amb les variables ambientals, de l'afluent i de la barrera 31, es generen 2 components que expliquen el 76% de la variabilitat i amb un valor KMO de 0,80 (Taula 4). A la distribució de les variables dins de l'espai bidimensional format per les dues components (Figura 17), destaquem l'agrupació de les variables a la part positiva de la component 1 de temperatura de la barrera, temperatura ambiental, intensitat de corrent i nivell de l'aquífer. A la part negativa la humitat relativa i l'oxigen dissolt. A la component 2 trobem les dues variables de l'afluent, la temperatura correlaciona positivament i la conductivitat negativament.

D'aquesta manera trobem la intensitat de corrent agrupada amb la resta de variables de la barrera i la temperatura ambiental. Per altra banda, un comportament diferent per les variables de l'afluent. La principal diferència en el comportament de les dues components son que les oscil·lacions diàries son inverses (Figura 18).

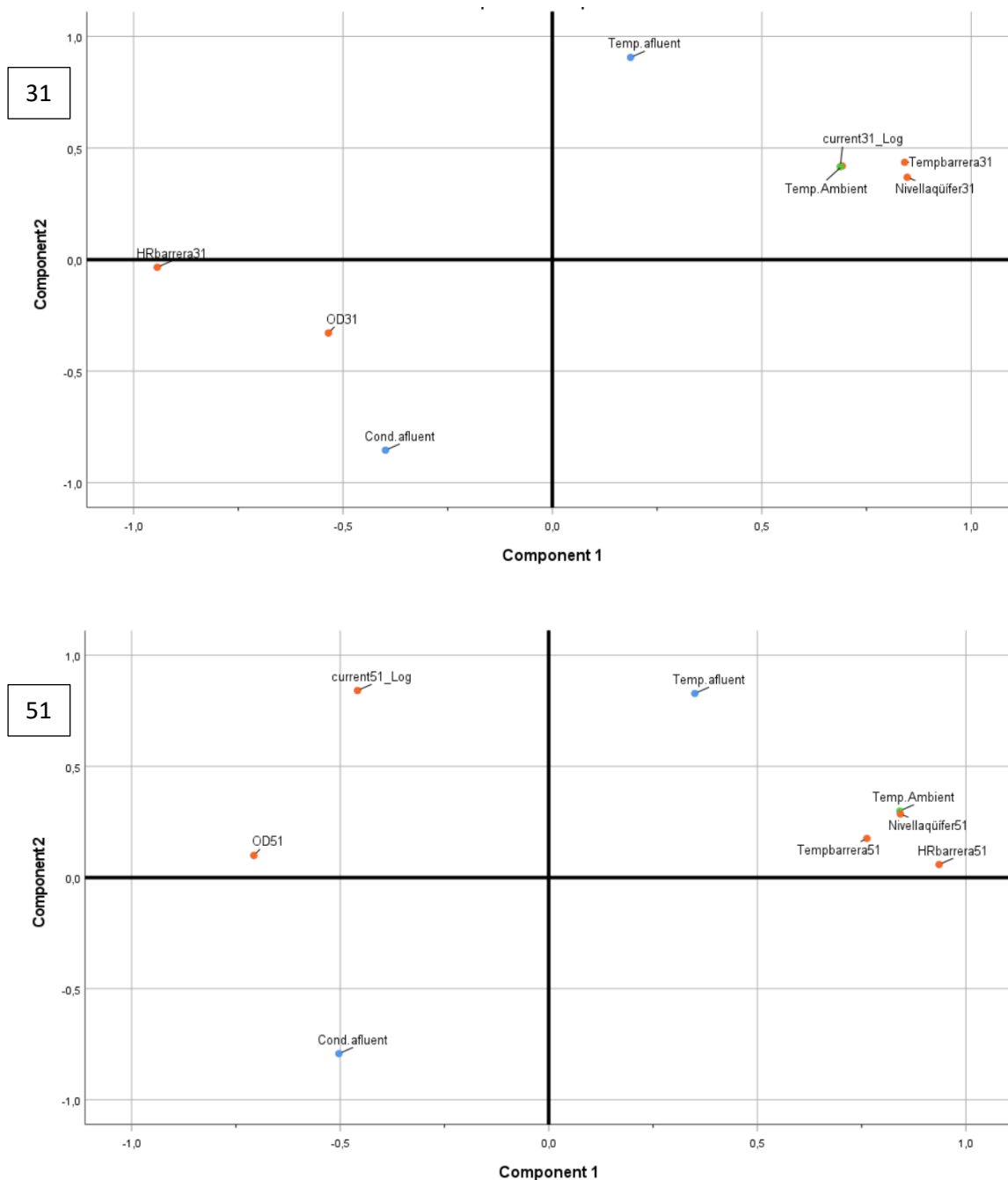


Figura 17: distribució de la correlació de les variables amb les 2 components principals dels anàlisis PCA 31 (superior) i 51 (inferior). S'inclouen dades ambientals (punt verd), de l'afluent (punts blaus) i de la barrera (punts taronges).

La segona PCA, centrada a la barrera 51, té una variabilitat explicada del 77,4% amb les 2 primeres components i una KMO de 0,68. La temperatura ambient correlaciona positivament amb la component 1, cosa que significa que la component generada en aquest cas és semblant a la PCA 31. També la temperatura de la barrera i el nivell de l'aquífer a la part positiva i l'oxigen dissolt a la part negativa de la primera component és semblant a la PCA anterior. Per contra, les variables que mostren un comportament diferent amb la barrera 31 son la humitat relativa, en

aquest cas a la part positiva de la component 1 i la intensitat de corrent, a la part positiva de la segona component, en comptes de la primera. Les dues variables de l'afluent, tot i que inversament, estan agrupades a la component 2. En aquesta barrera, doncs, la intensitat de corrent de corrent de la pila s'agrupa amb les dades de l'afluent, i no amb les de la barrera.

La correlació de la mateixa component a les dues barreres té una R^2 de 0,70 a la primera component i 0,88 a la segona component, cosa que ens indica patrons similars en les components generades en les dues barreres, tot i que es poden veure pics i valls més atenuats a la barrera 51 (Figura 18).

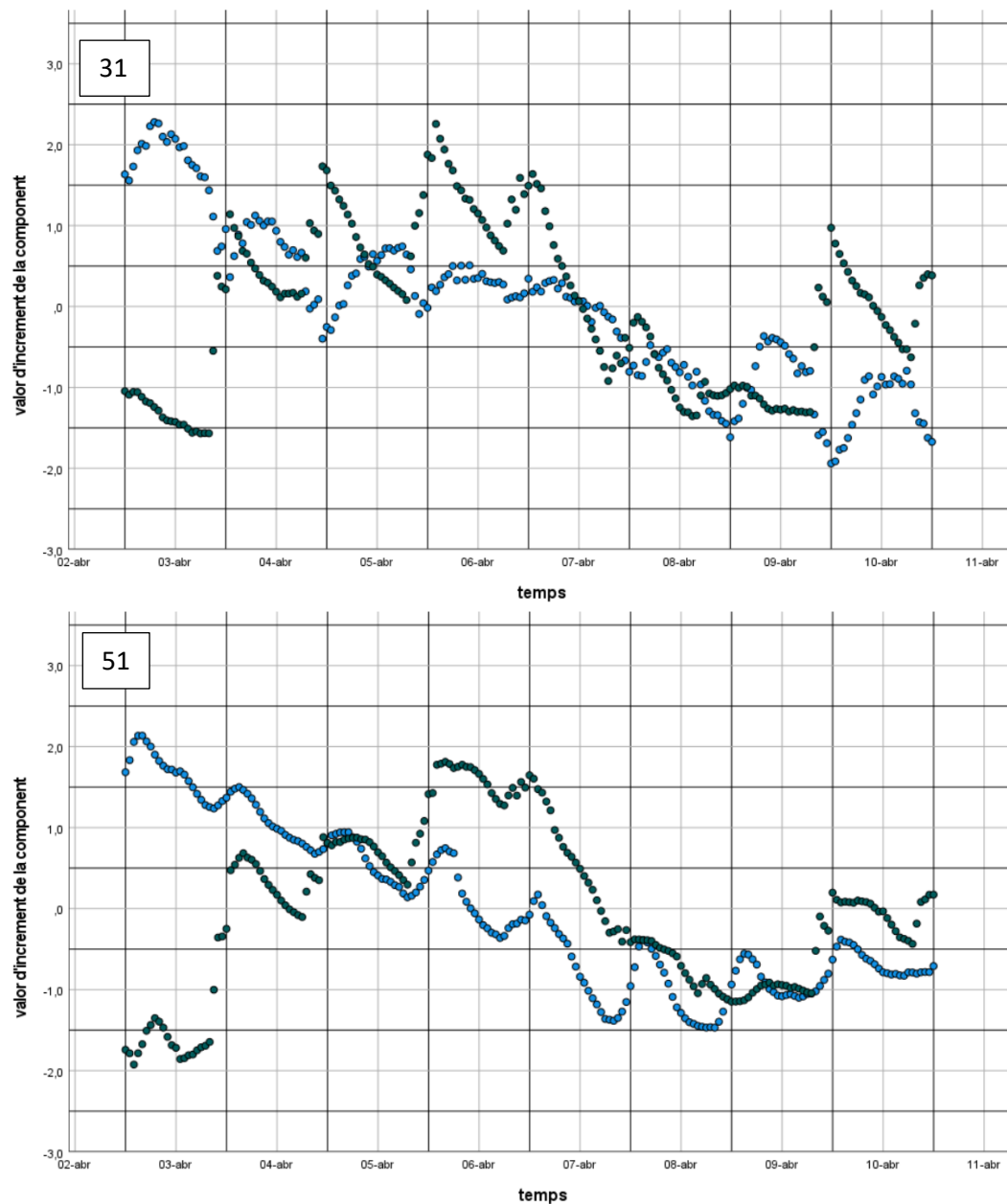


Figura 18: comportament de la component 1 (blau) i 2 (verd) al llarg del temps per a les PCA 31 (superior) i 51 (inferior). Valors d'increment de la variable expressats com a puntuació factorial extreptes pel mètode de regressió. Cada punt correspon a un període d'una hora.

4.3. PCA període llarg

Els resultats de la PCA a llarg termini, inclouen les variables intensitat de corrent, temperatura de la barrera, humitat i oxigen dissolt a la barrera, nivell de l'aquífer i conductivitat de l'afluent.

A la barrera 31 (Taula 5), es generen 2 components que expliquen el 56,5% de la variabilitat i amb un valor KMO del 0,531. En el cas de la barrera 51, la variabilitat explicada per les dues primeres components és del 69,3% i una KMO de 0,545.

Taula 5: extracció de les variables per les dues primeres components obtingudes amb els 2 anàlisis de components principals, barrera 31 i barrera 51. Entre parèntesis, grau d'extracció de la variable per a cada component en espai rotat (mètode Varimax amb normalització Keiser). Les variables en negreta indiquen valors d'extracció superiors a 0,5 en més d'una component. Percentatge de variabilitat explicada per cada component expressat en percentatge no acumulat.

	Components extretes	Variables		% de variància	Valor test KMO
		Correlació positiva	Correlació negativa		
PCA 31	1	temp, barrera 31 (0,888) intensitat corrent 31-Log (0,838)	OD 31 (0,684)	36,9	0,531
	2	HR barrera 31 (0,727) nivell aq. 31 (0,677) cond. afluent (0,476)		19,6	
PCA 51	1	intensitat corrent 51-Log (0,906) temp. barrera 51 (0,785) HR barrera 51 (0,530)	nivell aq. 51 (0,684) cond. afluent (0,450)	38,6	0,545
	2	nivell aq. 51 (0,607) HR barrera 51 (0,711)	OD 51 (0,895)	30,7	

En la representació gràfica de les variables en l'espai bidimensional generat per les 2 components (Figura 19), podem observar com a la barrera 31 es generen 2 grups de variables, les vinculades a la primera component, OD (relació negativa), intensitat de corrent i temperatura i un segon grup ben definit vinculades a la part positiva de la component 2, humitat relativa, conductivitat de l'afluent i nivell de l'aquífer. En canvi, aquest patró és diferent a la barrera 51, que presenta una distribució més dispersa. Les úniques coincidències entre les dues barreres són l'agrupació de la temperatura amb la intensitat de corrent a la part positiva de la component 1. En canvi, a la barrera 51 la conductivitat està vinculada a la component 1 en comptes de la 2 i l'oxigen dissolt ho està a la 2 en compte de la 1. Les variables nivell aquífer i humitat relativa no s'han integrat

clarament en cap de les 2 component generades en aquest anàlisi de la barrera 51, i necessitem d'una tercera component per integrar-les (dades no mostrades).

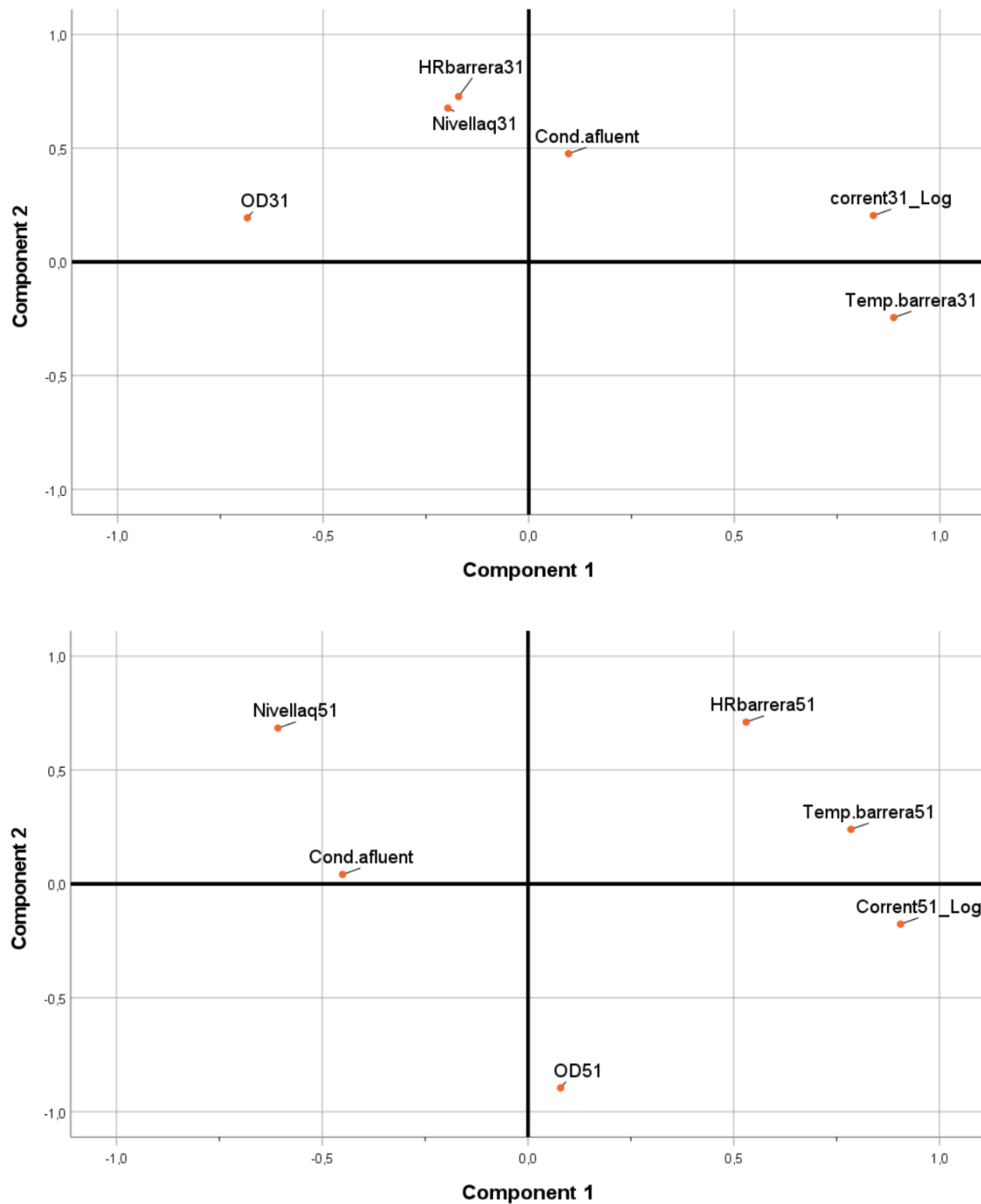


Figura 19: distribució de la correlació de les variables amb les 2 components principals dels anàlisis PCA 31 (superior) i 51 (inferior) per al període llarg d'estudi.

La regressió de les dues components extrems mostra com totes les components tenen oscil·lació diària (Figura 20), però a diferència de l'anàlisi fet a curt termini, la correlació lineal entre les components extrems en les dues barreres és baixa, amb una R^2 de 0,29 i 0,39 per les components 1 i 2 respectivament, cosa que ens indica que les components extrems a cada barrera són

notablement diferents. A la barrera 31 els valors de les dues components mostren una davallada al voltant del dia 7 i 16 d'abril, coincidint amb la perforació de les barreres. Alguns episodis de pluja com els dels dies 22 d'abril o 2 de maig també estan relacionats en canvis, sobretot en una davallada dels valors a la segona component.

Per altra banda, la barrera 5 té una oscil·lació diària més marcada les dues primeres setmanes d'experiment, però un patró menys sensible als episodis puntuals de pluja i perforació de la barrera que no pas a la barrera 31. Tot això ens indica que les 2 barreres tenen certes diferències en el comportament de les variables, sobre tot per que fa a la resposta als canvis ambientals.

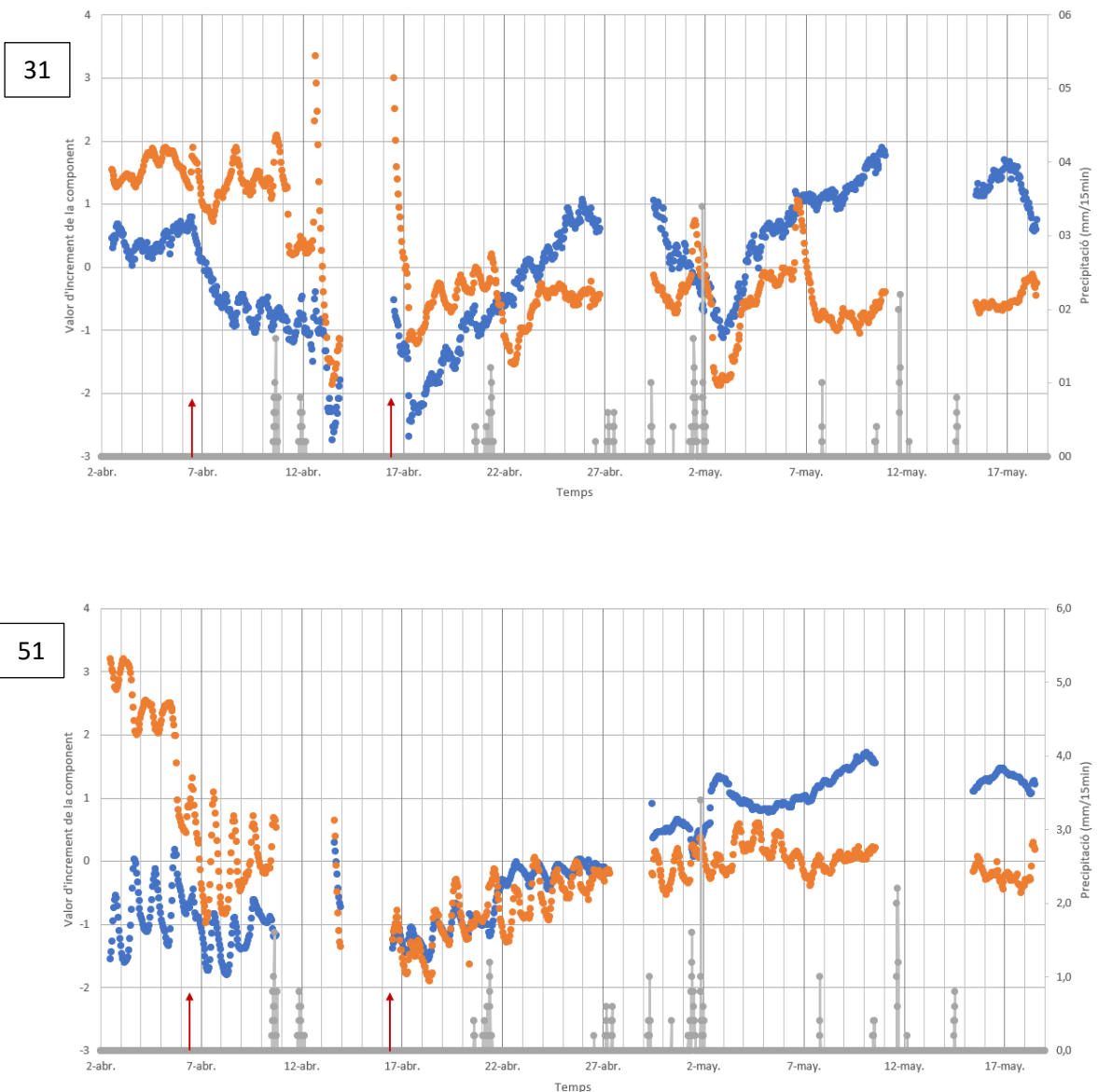


Figura 20: comportament de la component 1 (blau) i 2 (taronja) al llarg del temps per a les PCA 31 (superior) i 51 (inferior). Valors d'increment de la variable expressats com a puntuació factorial extreptes pel mètode de regressió. Cada punt correspon a un període d'una hora. Les fletxes vermelles indiquen moments en els que s'ha perforat artificialment la barrera quan hi ha hagut excés de làmina d'aigua. En gris, referenciat a l'eix de la dreta, precipitació acumulada en 15 minuts.

Al comparar l'anàlisi fet a curt i llarg termini podem observar com els resultats de la PCA canvien substancialment tot i que, recordem, el primer període està inclòs en el segon. En primer lloc, les diferents mesures de temperatura es van incloure a l'anàlisi curt, donat que l'anàlisi separava la temperatura de l'afluent de les temperatures de la barrera i l'ambiental en components diferents. En canvi, a llarg termini totes les temperatures s'agrupaven fortament en el mateix espai (dades no mostrades), per la qual cosa es decideix treballar amb una sola temperatura, la de la barrera.

Si ens centrem en com la variable intensitat s'integra a la PCA respecte a les altres variables, veiem com la única relació que es manté a la barrera 31 és la de l'agrupació de la intensitat amb la temperatura, així com la separació de la intensitat respecte a la conductivitat. La resta de variables canvien la seva correlació amb les components extrems i la seva relació amb la intensitat.

A la barrera 51, veiem com la relació entre la intensitat i la conductivitat (inversament relacionats amb la mateixa component) i la distribució en una component diferent a l'oxigen dissolt, es manté tan a curt com a llarg termini. En canvi, la intensitat de corrent s'agrupa amb la temperatura de la barrera a llarg termini, mentre no ho feia a curt.

Amb aquests resultats podem concloure que la PCA obté resultats diferents segons el període estudiat. Aquesta observació és interessant si es té en compte que en el període curt les condicions meteorològiques són relativament estables i els canvis ambientals que afecten al sistema són principalment les oscil·lacions diàries. En canvi, a llarg termini, les oscil·lacions diàries perden rellevància i integra altres canvis ambientals com poden ser episodis de pluja o un increment gradual de la temperatura, corresponent a l'època de l'any en la que fa l'estudi.

4.4. Relació de la intensitat de corrent amb la resta de variables de la barrera

De les variables contínues estudiades, les que millor correlacionen de manera lineal amb la intensitat de corrent a la barrera 31 són la temperatura i, en menor mesura i de manera inversa, l'oxigen dissolt (Taula 6). En canvi, a la barrera 51 la intensitat té correlació lineal significativa amb totes les variables, destacant la correlació amb la temperatura i el nivell de l'aquífer de manera inversa.

Per veure si la intensitat de corrent pot millorar la seva correlació si tenim en compte la combinació de diferents variables, es fan un seguit de PCAs amb les variables de l'anàlisi anterior però exclouent la intensitat de corrent i s'analitza la correlació entre la intensitat i les diferents components generades (Taula 6). En aquest cas, a la barrera 31 les components extrems no tenen millor correlació amb la intensitat de corrent que amb la temperatura, sobre tot amb la

de la barrera. A la barrera 51 també es dona una bona correlació entre la intensitat generada per la pila i la temperatura, sobre tot amb la de l'afluent, i es genera, també, una bona correlació entre la intensitat de corrent i la component 2, que té integrades tan la temperatura de la barrera com la conductivitat de l'afluent i, en menor mesura, la humitat relativa i el nivell de l'aquífer (Annex 2).

Taula 6: valors de correlació de Pearson (Negatiu: 0,25-0,5 groc; 0,5-0,75 taronja clar. Positiu: 0,25-0,5 blau clar; 0,5-0,75 blau; >0,75 blau fosc) entre la intensitat de corrent generada per la pila i les variables contínues entrades a la PCA i les components extretes de la PCA feta sense incloure la intensitat de corrent. Correlacions bilaterals significatives amb valors inferiors a 0,01 (**) o inferiors a 0,05 (*).

	Cond. afluent	Temp. afluent	Temp. ambient	Temp. Barrera	Nivell aq	OD	HR barrera	C1	C2
Corrent 31_Log	-0,06	0,476**	0,555**	0,679**	-0,03	-0,277**	0,02	-0,395**	0,084*
Corrent 51_Log	-0,247**	0,832**	0,766**	0,593**	-0,637**	0,244**	0,393**	-0,236**	0,740**

4.5. Efecte de la pluja

Les PCAs fetes segregant les franges horàries segons si hi ha presència o no de pluja tenen una n de 53 en el primer cas i 830 en el segon.

Tant en la barrera 31 com en la 51, han resultat unes components extretes i agrupacions de variables lleugerament diferents en els períodes sense presència de pluja i marcadament diferents amb presència de pluja respecte a la PCA anterior (Annex 3).

Taula 7: coeficients de correlació de Pearson (Negatiu: 0,25-0,5 groc; 0,5-0,75 taronja clar. Positiu: 0,25-0,5 blau clar; 0,5-0,75 blau; 0,75-1 blau fosc) entre la intensitat de corrent generada per la pila i les variables contínues entrades a la PCA diferenciant períodes amb presència o no de pluja. Correlacions bilaterals significatives amb valors inferiors a 0,01 (**) o inferiors a 0,05 (*).

	Cond. afluent	Temp. Barrera	Nivell aq	OD	HR barrera	C1	C2
Corrent 31_Log nopluj	-0,056	0,681**	-0,094**	-0,339**	0,038	-0,414**	0,082*
Corrent 31_Log pluja	-0,225	0,817**	-0,015	0,493**	-0,458**	0,057	0,649**
Corrent 51_Log nopluj	-0,215**	0,608**	-0,662**	0,257**	0,433**	0,304**	-0,725**
Corrent 51_Log pluja	-0,609**	0,912**	-0,179	0,115	0,901**	0,975**	-0,255

Si entrem en detall (Taula 7), a la barrera 31 les correlacions amb absència de pluja són molt semblants a les trobades a l'anàlisi anterior. En canvi, amb presència de pluja, tot i que la variable que més correlaciona amb la intensitat de corrent segueix sent la temperatura, la humitat

relativa, l'oxigen dissolt i les components presenten correlacions diferents respecte l'absència de pluja.

A la barrera 51, el patró en absència de pluja és també semblant a l'anàlisi anterior. En canvi, en presència de pluja augmenta la correlació entre la intensitat de corrent i la temperatura, la humitat relativa i la primera component. Aquesta component, de fet, integra les dues variables esmentades abans i és per això que presenta la millor puntuació de correlació, fins i tot per davant de la temperatura.

4.6. Relació entre les característiques de l'afluent i el funcionament de la barrera

A la Taula 7 podem veure com hi ha poques correlacions significatives entre les variables de l'afluent i les de la barrera, incloent les components extrems a les PCAs. Destaquem la correlació positiva entre la MES i el nivell de l'aqüífer de les dues barreres, així com amb la humitat relativa a la barrera 31 i l'oxigen dissolt a la barrera 51. L'augment conjunt d'aquestes variables ens pot indicar una entrada més ràpida d'aigua a l'aqüífer degut a la presència de pluja, arrossegant més sòlids en suspensió, augmentant el nivell de l'aqüífer, la humitat relativa de la barrera i l'oxigen dissolt, tot i que el patró no és clar i mostra diferències en ambdues barreres.

Una altra dada que mostra correlacions són la concentració de nitrats i nitrits a l'afluent. Tot i que ambdues variables estan correlacionades entre elles (dades no mostrades), tenen comportaments lleugerament diferents respecte a la resta de variables. En el cas dels nitrits, només hi ha correlació negativa amb la component 1 de la barrera 5. Recordem que aquesta component integra la temperatura a la barrera i la intensitat de corrent de la pila de manera positiva i la conductivitat de l'afluent de manera negativa.

Els nitrats, per altra banda, correlacionen negativament amb la primera component de cada barrera i amb l'oxigen dissolt i la temperatura de la barrera 51.

El fòsfor total a l'efluent és la única variable que mostra correlació negativa amb la intensitat de corrent generada per la pila de la barrera 31. També ho fa, i de manera més significativa, amb la humitat relativa i la segona component de la barrera 51.

Taula 8: coeficients de correlació de Pearson (Negatiu: 0,25-0,5 groc; 0,5-0,75 taronja clar; 0,75-1 taronja fosc Positiu: 0,25-0,5 blau clar; 0,5-0,75 blau; 0,75-1 blau fosc) entre les dades discretes de l'afluent i les dades (mitjana diària) de la barrera 31 (taula superior) i 51 (taula inferior), incloent les components extretes a la PCA feta a cada barrera (PCA incloent la intensitat de corrent). Correlacions bilaterals significatives amb valors inferiors a 0,01 (**) o inferiors a 0,05 (*).

		corrent 31_Log	Cond. afluent	Nivell aquífer 31	OD 31 20cm	Temp. barrera 31	HR barrera 31	C1	C2
DBO ₅	Corr	-0,373	0,169	0,260	0,409	-0,186	0,301	-0,337	0,178
	N	10	11	11	9	9	11	9	9
DQO	Corr	-0,296	-0,314	0,499	0,268	-0,127	0,525	-0,237	0,700
	N	7	8	8	7	7	8	7	7
MES	Corr	-0,403	-0,389	0,694*	0,134	-0,321	0,802**	-0,357	0,600
	N	9	9	9	8	8	9	8	8
pH	Corr	-0,151	0,457	0,115	0,644	-0,220	0,121	-0,302	0,292
	N	9	9	9	8	8	9	8	8
Amoni	Corr	0,405	0,670*	-0,174	0,248	0,344	-0,127	0,321	0,052
	N	9	9	9	8	8	9	8	8
Nitrit	Corr	0,029	-0,259	-0,413	0,455	-0,696	-0,191	-0,541	-0,025
	N	9	9	9	8	8	9	8	8
Nitrat	Corr	-0,296	-0,489	0,052	0,517	-0,706	0,292	-0,749*	0,556
	N	9	9	9	8	8	9	8	8
N. total	Corr	0,046	0,784*	0,103	0,350	0,122	-0,084	0,064	0,158
	N	9	9	9	8	8	9	8	8
P. total	Corr	-0,778*	0,047	0,245	-0,114	-0,445	-0,101	-0,536	-0,351
	N	9	9	9	8	8	9	8	8

		current 51_Log	Nivell aquífer 51	OD 51 20cm	Temp barrera 51	HR barrera 51	C1	C2
DBO ₅	Corr	0,007	0,149	0,073	-0,173	-0,192	0,064	0,157
	N	9	11	9	9	11	8	8
DQO	Corr	0,237	0,213	0,311	-0,279	0,116	0,154	0,258
	N	6	8	7	7	8	6	6
MES	Corr	-0,467	0,718*	0,800*	-0,568	-0,535	-0,516	0,149
	N	8	9	8	8	9	7	7
pH	Corr	-0,145	0,279	-0,130	-0,182	-0,195	-0,281	0,003
	N	8	9	8	8	9	7	7
Amoni	Corr	0,077	0,088	-0,690	0,326	0,267	0,177	0,436
	N	8	9	8	8	9	7	7
Nitrit	Corr	0,070	-0,091	0,148	-0,512	0,037	-0,932**	-0,580
	N	8	9	8	8	9	7	7
Nitrat	Corr	0,007	0,178	0,842**	-0,799*	-0,279	-0,874*	-0,414
	N	8	9	8	8	9	7	7
N. total	Corr	-0,133	0,188	-0,389	0,221	-0,137	-0,101	0,007
	N	8	9	8	8	9	7	7
P. total	Corr	-0,418	-0,120	0,538	-0,217	-0,865**	-0,240	-0,959**
	N	8	9	8	8	9	7	7

La intensitat de corrent, per altra banda, no mostra bones correlacions amb les dades de l'afluent en general. Més enllà de la correlació negativa amb el fòsfor, més clara a la barrera 31 que a la 51, podem observar certa correlació negativa, tot i que no és significativa, amb la MES en ambdues barreres.

Les variables de l'afluent que més correlacionen amb les diferents variables de la barrera és la MES i, en menor mesura, els nitrats. La MES té la mateixa correlació positiva i significativa amb el nivell de l'aquífer en ambdues barreres, però per la resta de variables, la resposta és diferent. La MES correlaciona positivament amb l'oxigen dissolt només a la barrera 51 i amb la humitat relativa només a la barrera 31.

Amb aquestes dades podem resumir que no hi ha indicis que les característiques de l'afluent afectin de manera significativa a les mesures d'intensitat de corrent de la pila. Remarcar en aquest sentit que les variables de l'afluent, tot i que s'han pres de manera setmanal, mostren una variabilitat important al llarg del temps i tenen desviacions estàndard relativament elevades.

4.7. Intensitat de corrent i activitat biològica

En un estudi previ per veure la correlació de les diferents variables biològiques i de matèria orgànica entre elles (Annex 4) es troben molt poques correlacions significatives. La mateixa variable mostra correlació a diferents profunditats en la majoria dels casos. En canvi, no hi ha correlació entre les diferents mesures biològiques (EPS, UFC, ADN) preses al mateix punt de mostreig ni tampoc correlacionen la resta de les dades entre barreres, excepte l'EPS, que té correlació lineal entre la barrera 31 i 51.

Tot això ens estaria indicant una heterogeneïtat i dificultat d'interpretació marcada possiblement per l'escassetat de mostres i l'espai de temps entre ells, només 4 dies de mostreig en dos mesos i mig.

*Taula 9: correlacions de Pearson entre les mitjanes diàries d'intensitat de corrent i components extretes a la PCA, que inclouen la intensitat, amb les diferents dades puntuals de la biologia i nivells de carboni orgànic a la barrera. Totes les correlacions bilaterals tenen una N=3. Correlacions bilaterals significatives amb valors inferiors a 0,01 (**) o inferiors a 0,05 (*)*

	EPSbsa_B3	EPSglu_B3	UFC_B3	ADN_B3	Cox_B3	MO_B3
Intensitat 31	-0,947	-0,859	-0,784	-0,750	-0,993	-0,992
C1_31	-0,958	-0,997*	-0,999*	-0,230	-0,879	-0,881
C2_31	-0,502	-0,308	-0,180	-1,000**	-0,668	-0,666
Intensitat 51	-0,669	-0,708	-0,176	1,000*	-0,810	1,000**
C1_51	-0,674	-0,713	-0,182	1,000**	-0,806	1,000*
C2_51	-0,798	-0,765	-0,996	0,104	0,514	0,074

A la Taula 9, es pot veure com les dues barreres tenen un comportament diferent pel que fa la correlació entre intensitat de corrent de la pila i les dades biològiques de la barrera. A la barrera 31 es poden observar correlacions entre dades biològiques i diferents components, però no amb la intensitat de corrent.

En canvi, a la barrera 51 sí que hi ha correlació entre l'ADN i la MO amb la intensitat de corrent, així com amb la component 1, que integra diferents variables entre elles la intensitat i la temperatura.

4.8. Diferències entre barreres

La mateixa variable mesurada en les dues barreres no està sempre correlacionada. Així com la temperatura mesurada a la barrera i el nivell de l'aquífer si que estan correlacionades en ambdues barreres (Taula 10), l'oxigen dissolt i la humitat relativa tenen poca correlació entre barreres i és, a més, una correlació negativa.

A la Taula 10, podem veure també com les diferents temperatures mesurades a l'afluent, ambiental i a la barrera estan correlacionades entre elles si bé la barrera 51 presenta un comportament relativament menys influenciat per la temperatura externa. A això se li suma que la barrera 51 té de mitjana una temperatura entre 0,5 i 1 grau més elevada que la 31 (Taula 11). La humitat relativa també té valors clarament diferents entre barreres, amb valors a la barrera 31 que doblen als mesurats a la barrera 51.

*Taula 10: coeficients de correlació de Pearson (Negatiu: 0,25-0,5 groc; 0,5-0,75 taronja clar; 0,75-1 taronja fosc. Positiu: 0,25-0,5 blau clar; 0,5-0,75 blau; 0,75-1 blau fosc) entre les variables amb mesures contínues ambientals, de l'afluent l'afluent i la barrera. En negreta, es destaquen les correlacions entre la mateixa variable mesurada a cada barrera. Correlacions bilaterals significatives amb valors inferiors a 0,01 (**) o inferiors a 0,05 (*).*

	Temp. afluent	Cond. afluent	Temp. ambient	Nivell aq 31	OD 31	Temp. barrera 31	HR barrera 31
Temp. afluent		-0,055	0,878**	-0,373**	-0,518**	0,809**	-0,405**
Cond. afluent	-0,055		-0,167**	0,102**	-0,144**	-0,109**	0,103**
Temp. ambient	0,878**	-0,167**		-0,327**	-0,507**	0,830**	-0,403**
Nivell aq 51	-0,439**	0,252**	-0,373**	0,590**	0,164**	-0,193**	0,407**
OD 51	0,127**	-0,195**	0,020	-0,296**	-0,131**	-0,038	-0,162**
Temp. barrera 51	0,603**	-0,024	0,698**	-0,259**	-0,398**	0,581**	-0,540**
HR barrera 51	0,465**	-0,179**	0,584**	0,030	-0,066	0,710**	-0,096**

A la Taula 11, podem observar com la intensitat de corrent elèctric a la pila és més elevat a la barrera 51 que a la 31. No podem confirmar, però, que la activitat biològica mesurada com a EPS, viabilitat cel·lular o ADN sigui diferent entre les dues barreres. La única variable que mostra diferències entre barreres al llarg del temps és la matèria orgànica, més elevada a la barrera 51 respecte a la 31. L'EPS mesurat com a glucosa en sòl, tot i ser més elevat a la barrera 51 que en la 31 en els 4 punts de mostreig, les diferències són mínimes i no hi ha significació estadística. El carboni oxidable, l'ADN i les UFC no mostren nivells diferents entre les dues barreres.

*Taula 11: comparació de mitjanes per test T entre variables de les dues barreres. La variable temperatura inclou les mesures preses amb la sonda d'oxigen dissolt (OD) i les preses amb la sonda d'humitat relativa (HR). ** significació inferior a 0,05, * significació inferior a 0,1.*

	31			51		
	mitjana	desvest	N	mitjana	desvest	N
Intensitat	0,145**	0,082	114316	0,339**	0,257	111633
Temp. barrera (OD)	16,15**	1,95	913	16,66**	1,75	894
Temp. barrera (HR)	17,30**	1,77	8366	18,30**	1,51	1029
Humitat relativa	32,96**	0,99	836	16,33**	0,41	1029
MO	3,65*	0,60	4	6,20*	2,17	4
Cox	2,59	0,65	4	2,83	0,81	4
EPS glu	305	378	4	346	369	4
EPS bsa	98,96	65,78	4	114,53	107,24	4
ADN	4,10E+9	1,18E+9	4	5,75E+9	2,99E+9	4
UFC	8,06E+7	5,64E+7	4	6,52E+7	7,19E+7	4

5. Discussió

En primer lloc, amb els anàlisis fets, s'han observat diferències en el comportament de les dues barreres.

Per una banda, la temperatura té un comportament lleugerament diferent en els dos sistemes. La temperatura a la barrera 51 té la correlació lineal més baixa amb la temperatura ambiental i la de l'afluent, així com uns valors superiors respecte a la barrera 31. L'enriquiment de la barrera 51 amb substrats amb alta superfície i capacitat d'adsorció (encenalls de fusta, zeolites i biochar) augmenten el temps de retenció a la barrera (Valhondo, 2020; Pensky et al. 2023) i disminueixen les oscil·lacions de temperatura respecte l'afluent i l'ambient.

En aquest sentit, la correlació positiva de la MES, el nivell de l'aquífer, la humitat relativa i l'oxigen dissolt a la barrera 31 ens indicaria una velocitat d'infiltració més elevada en episodis com la pluja i cert efecte d'arrossegament. Tot i això, el patró no es tan clar a la barrera 51, on la estructura i la riquesa en MO de la barrera pot atenuar aquests canvis en la velocitat d'infiltració.

El substrat de la barrera 51 enriquit amb aportacions de carboni i valors de MO més elevats que a 31, també facilita l'activitat i diversitat biològica, cosa que podria explicar la temperatura lleugerament més elevada a 51.

Per altra banda, els nivells d'intensitat de corrent han estat més elevats a la barrera 51 que a la 31, cosa que també podria indicar una activitat biològica més elevada, tal i com confirmen altres estudis fets a laboratori (Tront et al., 2018; Zhang et Angelidaki, 2011). Tot i això, i tal i com hem comentat en capítols anteriors, no s'han trobat estudis que hagin pogut relacionar i quantificar l'activitat biològica en un substrat amb la intensitat de corrent generada per una pila instal·lada fora de laboratori.

En canvi, tot i els indicis de major activitat biològica a la barrera 51, les escasses dades sobre activitat biològica de les quals es disposa, no han permès confirmar que hi hagi més activitat biològica en una barrera que en l'altra ni correlacionar les mesures de biològiques amb la intensitat de corrent produïda per la MFC. Recordem que la única correlació significativa que s'ha trobat és la senyal produïda per la pila 51 amb els nivells d'ADN a la barrera, però amb una recta de tan sols 3 punts.

En aquest punt, s'obren dues hipòtesis respecte a les diferències en els nivells d'intensitat de corrent en les dues piles. La primera opció, és que tot i que la intensitat de corrent estigui relacionada amb una activitat biològica més elevada a la barrera 51, aquesta no s'ha pogut detectar degut a la escassetat de mostres i anàlisis biològics fets durant l'estudi.

La segona opció és que el funcionament d'una pila instal·lada en un sistema no tan controlat com a laboratori, en un substrat en una planta pilot a l'aire lliure, hi ha altres variables (ambientals, substrats, heterogeneïtat de la barrera, etc.) que interfereixin en el funcionament de la pila, molt sensible als canvis en les condicions REDOX a l'ànode i al càtode. Per exemple, el biochar, present a la barrera 51, té propietats electromagnètiques que depenen de la temperatura de piròlisi (Weber and Quicker, 2008) i els substrats enriquits amb carboni i elevada superfície, modifiquen les condicions REDOX degut a la disminució de la velocitat d'infiltració i limiten la desoxigenació per part dels microbis en el subsol (Pensky et al 2023) i augmenten la diversitat d'estats redox (Valhondo, 2020).

L'oxigen dissolt al medi també és un paràmetre que afecta al funcionament de la pila i, de fet, s'ha fet servir com a biosensor per mesurar les diferències d'OD en experiments a camp (Song et al., 2019). En el present treball, tot i que l'ànode s'ha mantingut sempre en ambient subòxic, les dues barreres han mostrat uns valors mitjans semblants però una oscil·lació diària més marcada a la barrera 51. Tot i això, en aquest treball, no s'ha trobat correlació clara entre la intensitat de corrent i l'oxigen dissolt, amb valors de correlació lineal relativament baixos i amb signe oposat segons la barrera i la presència o absència de pluja. Cal remarcar, però, que no només l'oxigen pot competir amb l'elèctrode com a embornal d'electrons de l'activitat microbiana, i altres elements presents en el medi ànode com el nitrat o sulfat poden inhibir el funcionament de la pila. Per altra banda, el càtode ha estat sempre en contacte amb la làmina d'aigua superficial, el qual ha d'estar amb uns nivells d'oxigen en equilibri amb l'atmosfera, tot i que no s'ha comprovat.

Els canvis ambientals bruscos que s'han donat en el sistema, principalment per episodis de pluja, han suposat un canvi important en la majoria de variables d'estudi a la barrera. Els canvis més importants han estat una baixada de la temperatura i la disminució de la conductivitat de l'afluent per l'efecte de dilució amb l'aigua de pluja. El fet que hi hagi variables més sensibles que d'altres a aquests canvis s'ha vist reflectit en els diferents valors de correlació de les variables respecte a la intensitat de corrent amb o sense pluja.

Una de les correlacions més elevades que s'han trobat en aquest experiment han estat les d'intensitat de corrent elèctric i la temperatura i humitat relativa en condicions de pluja a la barrera 51. Quan s'integren les dues variables en una component, aquesta correlació és encara més elevada. Això ens indica la importància de l'oxigen i la humitat relativa en el funcionament de la MFC degut segurament a un augment de l'activitat biològica promoguda per la temperatura i la humitat relativa i una millora en les condicions del medi per transferir electrons.

Per últim, s'ha pogut demostrar la importància del temps d'estudi en els resultats generats per la PCA. La rellevància de les oscil·lacions diàries en els anàlisis fets a curt termini han fet que els resultats siguin diferents a la PCA a llarg termini, on la tendència estacional i els canvis ambientals puntuals ponderen de manera més elevada que les dinàmiques provocades pel canvi dia-nit.

6. Conclusions

Si bé en aquest treball no s'ha pogut demostrar l'efectivitat de la pila com a biosensor de l'activitat microbiana en una barrera d'un sistema MAR-SAT, sí que han sorgit indicis que ho pot ser i del potencial que suposa l'ús de les MFC com a biosensor de l'activitat microbiana en sistemes de recàrrega gestionada d'aqüífers. El fet que la intensitat de corrent produïda estigui relacionada amb altres variables com la temperatura obre la porta a demostrar la causalitat entre activitat biològica (la qual augmenta amb la temperatura) i la intensitat de corrent a la pila. Un factor clau per poder establir aquesta relació i quantificar la resposta de la MFC a l'activitat microbiana és entendre i controlar la resta de variables que afecten al funcionament de la MFC instal·lada en camp, com ho és la humitat relativa o l'oxigen dissolt. En aquest sentit, degut al gran nombre de variables que poden afectar la MFC, l'anàlisi de components principals s'ha postulat com una eina estadística útil per aquest tipus d'estudis, tal i com s'ha pogut veure en aquest treball.

Per a futurs estudis, es valoren dos punts a tenir en compte per tal de millorar els resultats. En primer lloc, augmentar la presa i anàlisi de mostres biològiques de la barrera per tal de poder avaluar la relació entre activitat biològica i la corrent produïda per la pila i intentar quantificar la resposta. Tenir en compte que els diferents paràmetres biològics estudiats en aquest treball (ADN, EPS, UFC) han donat mesures molt diferents i que l'augment del nombre de mostrejos també permetrà veure quines variables de l'activitat biològica estan més relacionats amb el funcionament de la MFC.

Per altra banda, a més de comprovar els nivells d'oxigen de la barrera es podrien obtenir mesures de les condicions REDOX al medi on està l'ànode i el càtode per ajudar a avaluar si els canvis en la intensitat de corrent de la pila són deguts o estan modulats pels canvis de potencial al medi.

El que ha quedat palès amb aquest estudi és que el pas de les piles de laboratori a experiments a camp com a biosensors presenten un gran salt en quan a potencials d'aplicació però alhora un gran repte per la quantitat de factors que influeixen sobre el funcionament d'aquest biosensor i la falta d'estudis en aquest àmbit.

Bibliografia

A/RES/70/1 (2015). *Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development*.

Disponible a: <https://documents.un.org/doc/undoc/gen/n15/291/89/pdf/n1529189.pdf?token=K3d3P8guCg1wuCmcxB&fe=true> [Consultat: 04.02.2024]

Abrevaya, X. C., Mauas, P. J., & Cortón, E. (2010). Microbial fuel cells applied to the metabolically based detection of extraterrestrial life. *Astrobiology*, 10(10), 965-971.

ACA (sense data). *Dessalinitzadores*. Disponible a: <https://aca.gencat.cat/ca/laigua/infraestructures/dessalinitzadores> [Consultat: 08.02.2024]

ACA (2022). *Pla de gestió del districte de conca fluvial de Catalunya 2022-2027. Annex I. Llistat i tipologia de masses d'aigua*. Disponible a: https://info.aca.gencat.cat/ca/aca/informacio/geco/plans-programes/PDG/CA/01-01_Annex01_Llistat_tipologia_MA.pdf [Consultat: 02.02.2024]

ACA (2023). *Pla de reutilització de l'aigua regenerada a Catalunya. Estratègia 2040*. Disponible a: https://aca.gencat.cat/web/.content/10_ACA/J_Publicacions/02-publicacions/10-pla-reutilitzacio-aigua-flyer.pdf [Consultat: 01.03.2024]

ACA (2024). *PALAMÒS (DPAM)*. Disponible a: https://aca.gencat.cat/web/.content/20_Aigua/02_infraestructures/05_estacions_depuradores_daigues_residuals/Fitxes_EDAR/DPAM_Fitxa_Web_EDAR.pdf [Consultat: 24.01.2024]

Al-Mamun, A., Lefebvre, O., Baawain, M. S., & Ng, H. Y. (2016). A sandwiched denitrifying biocathode in a microbial fuel cell for electricity generation and waste minimization. *International journal of environmental science and technology*, 13, 1055-1064.

Alcalde-Sanz, L., & Gawlik, B. M. (2017). Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge. *Towards a legal instrument on water reuse at EU level. Technical Report European Commission*.

AMB, sense data. *ERA del Prat de Llobregat*. Disponible a: <https://www.amb.cat/web/medi-ambient/aigua/instalacions-i-equipaments/detall/-/equipament/era-del-prat-de-lobregat/360457/11818> [Conslutat: 10.03.2024]

Asano, T., & Cotruvo, J. A. (2004). Groundwater recharge with reclaimed municipal wastewater: health and regulatory considerations. *Water research*, 38(8), 1941-1951.

Ayyaru, S., & Dharmalingam, S. (2014). Enhanced response of microbial fuel cell using sulfonated poly ether ether ketone membrane as a biochemical oxygen demand sensor. *Analytica chimica acta*, 818, 15-22.

Bekele, E., Toze, S., Patterson, B., & Higginson, S. (2011). Managed aquifer recharge of treated wastewater: Water quality changes resulting from infiltration through the vadose zone. *Water Research*, 45(17), 5764-5772.

Bio Tech Wishper (2023). *Microbial Fuel Cells in 5 Minutes*. Disponible a: <https://www.youtube.com/watch?v=HKvtOXsQrA4> [Consultat: 02.02.2024]

Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., & Lovley, D. R. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, 295(5554), 483-485.

Bouwer, H. (2002). Artificial recharge of groundwater: hydrogeology and engineering. *Hydrogeology journal*, 10, 121-142.

CACBGI (sense data). *EDAR Palamós*. Disponible a: <https://www.cacbgi.cat/edar/palamos/> [Consultat: 24.01.2024]

Castro-Ortíz, L. P., Luna Pabello, V. M., & Villalobos Pietrini, R. (2007). Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(1), 35-45.

Cerrillo, M., Oliveras, J., Viñas, M., & Bonmatí, A. (2016). Comparative assessment of raw and digested pig slurry treatment in bioelectrochemical systems. *Bioelectrochemistry*, 110, 69-78.

Cheng, S., & Logan, B. E. (2007). Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18871-18873.

Cohen, B. (1931). The bacterial culture as an electrical half-cell. *J. Bacteriol*, 21(1), 18-19.

Coma Bech, M., & Puig Broch, S. (2013). Bioelectrochemical Treatment of Contaminated Groundwater. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 2013, vol. 4, núm. 5, p. e135.

Corbella, C., Hartl, M., Fernandez-gatell, M., & Puigagut, J. (2019). MFC-based biosensor for domestic wastewater COD assessment in constructed wetlands. *Science of the total environment*, *660*, 218-226.

Davis, J. B., & Yarbrough Jr, H. F. (1962). Preliminary experiments on a microbial fuel cell. *Science*, *137*(3530), 615-616.

Dillon, P., Pavelic, P., Toze, S., Rinck-Pfeiffer, S., Martin, R., Knapton, A., & Pidsley, D. (2006). Role of aquifer storage in water reuse. *Desalination*, *188*(1-3), 123-134.

Grau-Martínez, A., Folch, A., Torrentó, C., Valhondo, C., Barba, C., Domènech, C., Soler, A., & Otero, N. (2018). Monitoring induced denitrification during managed aquifer recharge in an infiltration pond. *Journal of hydrology*, *561*, 123-135.

Hegazy, G. E., Taha, T. H., & Abdel-Fattah, Y. R. (2022). Investigation of the optimum conditions for electricity generation by haloalkaliphilic archaeon *Natrialba* sp. GHMN55 using the Plackett–Burman design: single and stacked MFCs. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 1-14.

Huerta, M., Solé, J., Aceves, M., Valhondo González, C., Hernández, M., & Gullón Santos, M. (2013). Soil aquifer treatment to remove priority organic pollutants in the Llobregat river area. In *Proceedings AquaConSoils Barcelona 2013* (pp. 1-7).

iBATHWATER (sense data). *Objetivos*. Disponible a: <https://www.ibathwater.eu/proyecto/objetivos/?lang=es> [Consultat: 01.02.2024].

Kang, K. H., Jang, J. K., Pham, T. H., Moon, H., Chang, I. S., & Kim, B. H. (2003). A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biochemical oxygen demand sensor. *Biotechnology letters*, *25*, 1357-1361.

Kim, B. H., Chang, I. S., Cheol Gil, G., Park, H. S., & Kim, H. J. (2003). Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnology letters*, *25*, 541-545.

Kim, M., Hyun, M. S., Gadd, G. M., Kim, G. T., Lee, S. J., & Kim, H. J. (2009). Membrane-electrode assembly enhances performance of a microbial fuel cell type biological oxygen demand sensor. *Environmental technology*, *30*(4), 329-336.

Korbi, sense data. *HABS-2000, Online BOD Analyser*. Disponible a: http://www.korbi.com/eng/products_type/habs-2000/?k&ckattempt=1. [Consultat: 10.02.2024].

Kumar, S. S., Kumar, V., Malyan, S. K., Sharma, J., Mathimani, T., Maskarenj, M. S., Ghosh, P.C., & Pugazhendhi, A. (2019). Microbial fuel cells (MFCs) for bioelectrochemical treatment of different wastewater streams. *Fuel*, 254, 115526.

Lefebvre, O., Al-Mamun, A., & Ng, H. Y. (2008). A microbial fuel cell equipped with a biocathode for organic removal and denitrification. *Water Science and Technology*, 58(4), 881-885.

Liu, H., & Logan, B. E. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environmental science & technology*, 38(14), 4040-4046.

Liu, H., Ramnarayanan, R., & Logan, B. E. (2004). Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environmental science & technology*, 38(7), 2281-2285.

Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., ... & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environmental science & technology*, 40(17), 5181-5192.

Maliva, R. G. (2020). Soil-Aquifer Treatment. *Anthropogenic Aquifer Recharge: WSP Methods in Water Resources Evaluation Series*. No. 5, 623-645.

Modin, O. & Wilen, B. M. (2012). A novel bioelectrochemical BOD sensor operating with voltage input. *Water Research*, 46, 6113-6120.

NRMCC, EPHC and NHMRC (2009) Australian Guidelines for water recycling, managing health and environmental risks, vol 2C: managed aquifer recharge. *Natural Resource Management Ministerial Council, Environment Protection and Heritage Council National Health and Medical Research Council*, July 2009, 237 pp.

Osman, M. H., Shah, A. A., & Walsh, F. C. (2010). Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: Microbial. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(3), 953-963.

Pant, D., Singh, A., Van Bogaert, G., Olsen, S. I., Nigam, P. S., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2012). Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *Rsc Advances*, 2(4), 1248-1263.

Patterson, B. M., Shackleton, M., Furness, A. J., Bekele, E., Pearce, J., Linge, K. L., Buseti, F., Spadek, T., & Toze, S. (2011). Behaviour and fate of nine recycled water trace organics during managed aquifer recharge in an aerobic aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, 122(1-4), 53-62.

Peixoto, L., Min, B., Martins, G., Brito, A. G., Kroff, P., Parpot, P., Angelidaki, I. & Nogueira, R. (2011). In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon. *Bioelectrochemistry*, 81(2), 99-103.

Pensky, J., Fisher, A. T., Gorski, G., Schrad, N., Bautista, V., & Saltikov, C. (2023). Linking nitrate removal, carbon cycling, and mobilization of geogenic trace metals during infiltration for managed recharge. *Water research*, 239, 120045

Potter, M. C. (1911). Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the royal society of London. Series b, containing papers of a biological character*, 84(571), 260-276.

Rabaey, K., Lissens, G., Siciliano, S. D., & Verstraete, W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology letters*, 25, 1531-1535.

Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.

Reimers, C. E., Tender, L. M., Fertig, S., & Wang, W. (2001). Harvesting energy from the marine sediment– water interface. *Environmental science & technology*, 35(1), 192-195.

Saladié, Ò i Oliveras, J. (2010). Desenvolupament sostenible. *Desenvolupament sostenible*, 1-300.

Smith, H. M., Brouwer, S., Jeffrey, P., & Frijns, J. (2018). Public responses to water reuse– Understanding the evidence. *Journal of Environmental Management*, 207, 43-50.

Song, N., Yan, Z., Xu, H., Yao, Z., Wang, C., Chen, M., Zhao, Z., Peng, Z., Wang, C., & Jiang, H. L. (2019). Development of a sediment microbial fuel cell-based biosensor for simultaneous online

monitoring of dissolved oxygen concentrations along various depths in lake water. *Science of the total environment*, 673, 272-280.

Taylor, R. G., Scanlon, B., Döll, P., Rodell, M., Van Beek, R., Wada, Y., Longuevergne, L., Leblanc, M., Famiglietti, J.S., Edmunds, M., Konikow, L., Green, T.R., Chen, J., Taniguchi, M., Bierkens, M.F.P., MacDonald, A., Fan, Y., Maxwell, R.M., Yechieli, Y., Gurdak, J.J., Allen, D.M., Shamsudduha, M., Hiscock, K., Yeh, P.J.-F., Holman, I., & Treidel, H. (2013). Ground water and climate change. *Nature climate change*, 3(4), 322-329.

Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and bioelectronics*, 16(1-2), 121-131.

Tront, J. M., Fortner, J. D., Plötze, M., Hughes, J. B., & Puzrin, A. M. (2008). Microbial fuel cell biosensor for in situ assessment of microbial activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 586-590.

Valhondo, C., Carrera, J., Ayora, C., Barbieri, M., Nödler, K., Licha, T., & Huerta, M. (2014). Behavior of nine selected emerging trace organic contaminants in an artificial recharge system supplemented with a reactive barrier. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 11832-11843.

Valhondo, C., Martinez-Landa, L., Carrera, J., Ayora, C., Nödler, K., & Licha, T. (2018). Evaluation of EOC removal processes during artificial recharge through a reactive barrier. *Science of the total environment*, 612, 985-994.

Valhondo, C., Duporté, G., Cabaret, G., Rosain, D., Gomez, E., & Luquot, L. (2023). Assessing the Feasibility of Sustainable Materials to Boost the Sorption of Pharmaceutical Active Compounds When Included in Reactive Barriers in Soil Aquifer Treatment for Water Reuse. *Water*, 15(7), 1393.

Varshney, A., Sharma, L., Pandit, C., Gupta, P. K., Mathuriya, A. S., Pandit, S., Lahiri, D Nag, M., & Upadhye, V. J. (2023). Microbial Fuel Cell–Based Biosensors and Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(5), 3508-3531.

Velasquez-Orta, S. B., Werner, D., Varia, J. C., & Mgana, S. (2017). Microbial fuel cells for inexpensive continuous in-situ monitoring of groundwater quality. *Water research*, 117, 9-17.

Wang, X., Cai, Z., Zhou, Q., Zhang, Z., & Chen, C. (2012). Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using U-tube microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 426-433.

Weber, K., & Quicker, P. (2018). Properties of biochar. *Fuel*, 217, 240-261.

Zabihallahpoor, A., Rahimnejad, M., & Talebnia, F. (2015). Sediment microbial fuel cells as a new source of renewable and sustainable energy: present status and future prospects. *RSC advances*, 5(114), 94171-94183.

Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2011). Submersible microbial fuel cell sensor for monitoring microbial activity and BOD in groundwater: focusing on impact of anodic biofilm on sensor applicability. *Biotechnology and bioengineering*, 108(10), 2339-2347.