



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE CIÈNCIES

LLICENCIATURA DE CIÈNCIES AMBIENTALS

***PRODUCCIÓ DE BIOPOLÍMERS AMB
CULTIUS BACTERIANS MIXTES.***

*Comparació de tres reactors discontinus seqüencials (SBR) amb
diferents condicions operacionals.*

Memòria del Projecte Fi de Carrera de Ciències Ambientals

Presentada per: **Jordi Pérez Forner**

i dirigida per: **M^a Eugenia Suárez Ojeda**

Bellaterra, 2 de setembre de 2013

Agraïments.

En primer lloc vull donar les gràcies a l'equip tècnic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona que m'han ofert la formació i col·laboració necessària per poder desenvolupar aquest projecte, especialment a la Lorena, Pili i Manuel.

M'agradaria agrair especialment els estudiants de doctorat del grup de recerca Bio-GLS la seva paciència per tots els dubtes que m'han sorgit durant el funcionament de la planta pilot i el desenvolupament del projecte, sobretot i especialment: Javi, Núria, Iolanda, Carlota, Edu, Carlos, gràcies per la vostra ajuda. Sobretot a tú Javi, pels milions de preguntes que he arribat a fer-te, espero que no fugis quan em vegis venir.

A la Cristina, sense ella aquest projecte no hagués estat el mateix, gràcies Cristina per la teva paciència i dedicació, moltes gràcies i perdona'm les esquitxades amb "aigua".

No tinc paraules per donar les gràcies a la meva tutora María Eugenia, gràcies per la oportunitat d'aprofundir més en el camp de l'Enginyeria Ambiental, gràcies per la motivació que m'has donat per "embarcar-me" en aquest projecte, gràcies per donar-me feina i més feina, gràcies per aquests últims dies d'estrès, moltes gràcies, sincerament he après molt al teu costat.

Com no, també vull donar les gràcies tots als meus amics, als Rojos, a la "xupipandi", a la gent de Vic, a tots ells que han aguantat les "xapes" interminables sobre "bitxets que netegen l'aigua" i molt especialment a la Gisela, gràcies per aquella "trampilla" des de Dubai d'última hora i a tú Jordà, per les birretes al teu balconet.

A la meva família, sobretot a les meves *sisters*, gràcies per confiar cegament en mi i el suport que em doneu sempre. Com no, a la meva mare que sense ella res d'això hagués estat possible, per la teva preocupació i l'amor incondicional que ens demostres cada dia.

I aquest últim agraïment, però el més important, el vull dedicar al meu pare, ja que la seva pèrdua a fet, d'alguna manera, que avui pugui escriure aquestes línies.

Gràcies "Papa", t'estimo.

Resum.

La producció de biopolímers (polihidroxialcanoats (PHA) i substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS)) a nivell industrial, resulta una nova àrea d'investigació que recull diverses disciplines, entre elles les Ciències Ambientals. Aquest projecte final de carrera amb el títol: “Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes”, s’ha desenvolupat sota la supervisió de la directora de projecte Dra. María Eugenia Suárez Ojeda del Departament d’Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i s’ha dut a terme per l’estudiant Jordi Pérez i Forner de la Llicenciatura de Ciències Ambientals, Facultat de Ciències de la UAB, en el Departament d’Enginyeria Química de la mateixa universitat.

L’objectiu d’aquest projecte ha estat produir biopolímers simultàniament amb l’eliminació de fòsfor i matèria orgànica en aigües residuals per obtenir un residu final amb un alt valor afegit.

Aquests biopolímers reuneixen les característiques necessàries per a poder competir amb els plàstics convencionals i així, reduir l’elevat consum del petroli i la generació de residus no biodegradables.

En aquest projecte s’ha dut a terme la posta en marxa d’un reactor discontinu seqüencial (SBR) per a l’acumulació de biopolímers amb cultius bacterians mixtes. Diferents investigadors han estudiat que aquests tipus de cultius bacterians arriben a nivells de fins el 53-97% [Pijuan *et al.*, 2009] de contingut de biopolímers a la biomassa, sometent als microorganismes a diferents situacions d’estrés ja sigui per dèficit de nutrients o per variacions en les fases de *feast-famine* (festí-fam).

Durant el projecte, s’ha realitzat el monitoratge del reactor alimentat amb una aigua sintètica, elaborada en el laboratori, amb les característiques d’un aigua residual provinent de la indústria làctica. S’ha sotmès als microorganismes a diferents condicions operacionals, una d’elles amb limitació de fòsfor com a nutrient i una tercera condició amb una variació a les fases *feast-famine*.

D’altra banda, com a segon objectiu, s’ha analitzat el contingut de biopolímers a la biomassa de dos SBRs més, del grup de recerca Bio-GLS del Departament d’Enginyeria Química de la UAB, alimentats amb diferents fonts de carboni, glicerol i àcids grassos de cadena llarga

(AGCLL), per observar les influències que té el tipus de substrat en l'acumulació de biopolímers.

Els resultats obtinguts en la primera part d'aquest projecte han estat similars als resultats d'altres investigadors [Pijuan *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2012].

S'ha determinat que sotmetre als microorganismes a situacions d'estrés té un efecte directe pel que fa a l'acumulació de biopolímers. També s'ha observat com al mateix temps que acumulaven aquests compostos, els microorganismes desenvolupaven la seva tasca de depurar l'aigua residual, obtenint al final del cicle una aigua amb un baix contingut en matèria orgànica i altres contaminants com amoni i fòsfor, en aquest cas.

En la segona part del projecte, s'ha observat com el tipus de substrat té un efecte directe pel que fa a l'acumulació de biopolímers i també a l'activitat metabòlica dels microorganismes.

Per tant, s'ha conclòs que la producció de biopolímers mitjançant la depuració d'aigües residuals es una via d'investigació molt prometedora pel que fa als resultats obtinguts. Alhora que es tracta un residu, s'obté una producte residual amb un alt valor afegit que pot ser utilitzat per la producció de bioplàstics 100% biodegradables.

Resumen.

La producción de biopolímeros (polihidroxialcanoatos (PHA) y sustancias poliméricas extracelulares (EPS)) a nivel industrial, resulta una nueva área de investigación que recoge diversas disciplinas, entre ellas las Ciencias Ambientales. Este proyecto final de carrera con el título: "*Producción de biopolímeros con cultivos bacterianos mixtos*", se ha desarrollado bajo la supervisión de la directora de proyecto Dra. María Eugenia Suárez Ojeda del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y ha sido llevado a cabo por el estudiante Jordi Pérez Forner de la Licenciatura de Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias de la UAB, en el Departamento de Ingeniería Química de la misma universidad.

El objetivo de este proyecto ha sido producir biopolímeros simultáneamente con la eliminación de fósforo y materia orgánica en aguas residuales para obtener un residuo final con un alto valor añadido.

Estos biopolímeros reúnen las características necesarias para poder competir con los plásticos convencionales y así, reducir el elevado consumo del petróleo y la generación de residuos no biodegradables.

En este proyecto se ha llevado a cabo la puesta en marcha de un reactor discontinuo secuencial (SBR) para la acumulación de biopolímeros con cultivos bacterianos mixtos. Diferentes investigadores han estudiado que estos tipos de cultivos bacterianos alcanzan niveles de hasta el 53-97% [Pijuan *et al.*, 2009] de contenido de biopolímeros en la biomasa, sometiendo a los microorganismos a diferentes situaciones de estrés, ya sea por déficit de nutrientes o por variaciones en las fases de *feast-famine* (festín-hambruna).

Durante el proyecto, se ha realizado el seguimiento del reactor alimentado con un agua sintética, elaborada en el laboratorio, con las características de un agua residual proveniente de la industria láctea. Se ha sometido a los microorganismos a diferentes condiciones operacionales, una de ellas con limitación de fósforo como nutriente y una tercera condición con una variación en las fases *feast-famine*.

Por otra parte, como segundo objetivo, se ha analizado el contenido de biopolímeros en la biomasa de dos SBRs más, del grupo de investigación Bio-GLS del Departamento de Ingeniería Química de la UAB, alimentados con diferentes fuentes de carbono, glicerol y

ácidos grasos de cadena larga (AGCLL), para observar las influencias que tiene el tipo de sustrato en la acumulación de biopolímeros.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este proyecto han sido similares a los resultados de otros investigadores [Pijuan *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2012].

Se ha determinado que someter a los microorganismos a situaciones de estrés tiene un efecto directo en cuanto a la acumulación de biopolímeros. También se ha observado cómo al mismo tiempo que acumulaban estos compuestos, los microorganismos desarrollaban su tarea de depurar el agua residual, obteniendo al final del ciclo un agua con un bajo contenido en materia orgánica y otros contaminantes como amonio y fósforo, en este caso.

En la segunda parte del proyecto, se ha observado como el tipo de sustrato tiene un efecto directo en la acumulación de biopolímeros y también en la actividad metabólica de los microorganismos.

Por tanto, se concluyó que la producción de biopolímeros mediante la depuración de aguas residuales es una vía de investigación muy prometedora en cuanto a los resultados obtenidos. A la vez que se trata un residuo, se obtiene un producto residual con alto valor añadido que puede ser utilizado para la producción de bioplásticos 100% biodegradables.

Summary

Biopolymer production (polihidroxiálkanoates (PHA) and extracellular polymeric substances (EPS)) in a mass production basis, are becoming a new investigation area that unites several disciplines among them Environmental Sciences. The following Final Project entitled: "Biopolymer Production with mixed bacterial cultures" has been developed under the guidance and supervision of the project manager Dra. María Eugenia Suarez Ojeda from Chemical Engineering department of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) and developed by Jordi Pérez Forner Bachelor's Degree in Environmental Science student from Science Faculty of UAB in the Chemical Engineering department of the same university

The objective of the Project is to produce biopolymers eliminating simultaneously phosphorus and organic materials in wastewater, to obtain a final remain containing high end value.

Those biopolymers meet the requested features to compete with conventional plastic in order to reduce the high consume of petrol and non-biodegradable waste generation.

During the project a sequencing batch reactor (SBR) was started up with the aim to accumulate biopolymers with mixed bacterial culture. Several researchers determinate that, that kind of bacterial cultures reach up to 53-97% [Pijuan *et al.*, 2009] content of biopolymers within the biomass submitting micro-organism to different stress situations either for nutrition deficiency or due to variations on feast-famines phases.

During the project the reactor was monitored and filled with artificial water previously prepared in the laboratory following the features of sewage water coming from dairy industry. Micro-organisms were submitted to different operational conditions one of them with phosphorus limitation as nutrient and the third one with variation on the phase feast-famine.

As a second objective, the content of biopolymers in the biomass of two more SBRs of the research group Bio-GLS from Chemical Engineering Department of UAB was analysed.

The same was feed by carbon sources (glycerol and long chain fatty acid LCFA) in order to observe the substrate influence on biopolymer accumulation.

Results coming from the first phase of the Project have been similar to the ones that other researchers [Pijuan *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2012].

The research determines that putting microorganisms down to stress situation has a direct result regarding to biopolymers accumulation. At the same time, same compound were accumulated micro-organisms were developing its task to purify wastewater obtaining at the end of water cycle other contaminating as ammonium and phosphorus in our case

In the second part of the Project was observed that the substrate type has a direct effect on biopolymers and also on the micro-organism's metabolic activity

Therefore and as a conclusion, biopolymers production through sewage water is very promising as per obtained results. At the same time the waste is treated, the obtained one has high added value and can be used for bioplastic production 100% biodegradable.

Índex.

1. Introducció.	1
1.1. Tipus de biopolímers.	2
1.2. Els polihidroxicanoats (PHA): Descripció.	2
1.2.1. Aplicacions industrials dels PHAs.	4
1.2.2. Aplicacions industrials dels PHAs: Alimentació i agricultura.	6
1.2.3. Aplicacions industrials dels PHAs: Producció de biodiesel.	7
1.2.4. Aplicacions industrials dels PHAs: Mèdiques i farmacèutiques.	7
1.2.5. Producció i acumulació de PHAs.	8
1.3. Substàncies Polimèriques Extracel·lulars (EPS): Descripció.	9
1.3.1. Aplicacions industrials dels EPS.	12
1.3.2. Aplicacions industrials dels EPS: Alimentàries.	12
1.3.3. Producció i acumulació dels EPSs.	13
1.4. Tipus de cultius bacterians per a l'acumulació de biopolímers.	14
1.4.1. Organismes Acumuladors de Fosfat (PAO).	15
1.4.2. Temps de residència cel·lular i cabal de purga.	16
1.4.3. Acumulació de PHA/EPS en un cultiu bacterià mixta.	17
1.5. Reactor discontinu seqüencial (SBR).	18
1.6. Justificació del projecte.	19
1.7. Estructura de la memòria.	19
2. Objectius.	21
3. Material mètodes.	22
3.1. Caracterització de la biomassa potencial.	22
3.2. Posada en marxa d'un SBR per a l'acumulació de PHA/EPS amb l'enriquiment d'un cultiu bactèria mixt.	23
3.3. Monitoratge del SBR.	25
3.4. Purga del sistema.	27
3.5. Condicions d'operació.	28
3.6. Presa de mostres per la determinació de PHA i EPS durant un cicle d'operació.	30
3.7. Quantificació de PHAs i EPSs.	30
3.7.1. Tractament de mostres per determinació de PHA amb el mètode de Werker (2008) i mètode de quantificació per GC.	31

3.7.2. Tractament i mètodes de quantificació d'EPSs.	32
3.7.2.1. Tractament mostres per EPS [adaptat de Adav and Lee, 2011].	32
3.7.2.2. Determinació de proteïnes.	32
3.7.2.3. Deteminació de polisacàrids.	33
3.8. Comparació de dos reactors discontinus seqüencials alimentats amb diferent font de carboni.	34
4. Resultats i discussió.	36
4.1. Posada en marxa d'un SBR per la producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes: Estat estacionari.	36
4.2. Resultats de la producció de PHA/EPS en un SBR amb cultius bacterians mixtes.	37
4.3. Resultats de la comparació de dos reactors discontinus seqüencials alimentats amb diferents fonts de carboni.	45
5. Conclusions.	49
6. Llistat d'Acrònims.	50
7. Bibliografia.	51
8. Pressupost.	56
9. Programació.	59
10. Annex 1.	61

Índex Taules.

Taula 1: Comparació de les propietats físiques entre alguns polímers naturals (PHA) i polímers sintètics.....	4
Taula 2: Diferents biopolímers produïts per varies empreses arreu del món. Àrees d'aplicació, volum de producció i costos de producció.	5
Taula 3: Polítiques i mesures que apliquen diferents països per reduir l'ús dels plàstics sintètics.....	6
Taula 4: Composició de macro nutrients a l'efluent d'entrada.	29
Taula 5: Composició de micro nutrients a l'efluent d'entrada.	29
Taula 6: Condicions operacionals dels dos SBR del grup de recerca Bio-GLS amb diferent font de carboni.....	35
Taula 7: Tasques programades per el desenvolupament del projecte	58

Índex Figures.

Figura 1: Classificació dels PHA segons el número de carbonis en la cadena del monòmer.....	3
Figura 2: Estructura general dels polihidroxicanoats.	3
Figura 3: Representació dels diferents tipus de EPS.	11
Figura 4: Diagrama on es representa la correlació entre els EPSs més utilitzats a nivell industrial i les seves àrees d'aplicació.	12
Figura 5: Esquema del metabolisme dels PAO en l'eliminació biològica del fòsfor i acumulació de PHA. Font: Tecnologies de tractament.....	15
Figura 6: Esquema del funcionament d'un reactor seqüencial discontinu (SBR).	18
Figura 7: Representació de l'estat estacionari assolit als 16 dies de la posta en marxa del sistema.....	37
Figura 8: Contingut de biopolímers a la biomassa sotmesa a diferents concentracions de fòsfor a l'efluent d'entrada.	38

Figura 9: Acumulació de PHB i PHV en el cicle control (10 mg/l P-PO ₄ ⁻³) i en la limitació de nutrients (4 mg/l P-PO ₄ ⁻³).	40
Figura 10: Acumulació de PN i PS en el cicle control (10 mg/l P-PO ₄ ⁻³) i en la limitació de nutrients (4 mg/l P-PO ₄ ⁻³).	41
Figura 11: Composició de PHA segons el contingut de PHB respecte PHV.	41
Figura 12: Composició d'EPS segons el contingut de PS respecte PN.	42
Figura 13: Contingut de PHA i EPS a la biomassa amb 10 mg/l de P-PO ₄ -3 i un augment del temps en la fase aeròbia.....	43
Figura 14: Representació de la concentració de fòsfor al llarg de l'últim cicle. Condicions operacional: 10 mg/l i augment de la fase AE.	44
Figura 15: Representació de la concentració de carboni orgànic total (TOC) al llarg de l'últim cicle. Condicions operacional: 10 mg/l i augment de la fase aeròbia.	45
Figura 16: Contingut de biopolímers a la biomassa (%) en un SBR alimentat amb àcids grassos de cadena llarga.	46
Figura 17: Contingut de biopolímers a la biomassa (%) en un SBR alimentat amb glicerol. Elaboració pròpia.....	46
Figura 18: Acumulació de PHB respecte PHV en els dos SBR del grup de recerca Bio-GLS. Elaboració pròpia.....	47
Figura 19: Acumulació de PS en els dos SBR del grup de recerca Bio-GLS.	48
Figura 20. Tasques programades per el desenvolupament del projecte.....	59

1. Introducció.

Durant el segle passat el gran augment i l'acceleració de l'activitat econòmica mundial ha generat problemàtiques que requereixen especial atenció. En aquest context, el major èmfasi s'ha posat en el concepte de sistemes econòmics sostenibles que es basen en tecnologies que donen suport a les fonts d'energia i materials renovables [Philip *et al.*, 2007].

L'ús dels plàstics ha tingut una gran importància en productes d'un sol ús com l'embalatge d'aliments i materials mèdics. Durant molt de temps, els polímers derivats del petroli han subministrat la major part dels envasos comuns a causa de les diverses característiques que presenten aquests materials com suavitat, lleugeresa i transparència. No obstant, l'augment de l'ús dels plàstics per l'embalatge han donat lloc a una greu problemàtica ambiental, augmentant l'extremada persistència i acumulació en el medi, degut a la seva no biodegradabilitat. El consum mundial de plàstics és de 245 milions de tones al 2008, mentre que al 1950 aquest valor era de 1,5 milions de tones, això equival a una taxa de creixement anual del 9% [Siracusaa *et al.*, 2008]. La gran dependència que la indústria del plàstic té en el petroli, fa que l'augment del preu del petroli tingui una gran influència en el mercat del plàstic [Suchada *et al.*, 2010].

L'ús extensiu dels plàstics genera residus que s'acumulen en l'ambient a una taxa de 25 milions de tones/any, el 40% s'envien a abocadors mentre que centenars de milers de tones de plàstic s'aboquen en entorns marins cada any acumulant-se en regions oceàniques [Reddy *et al.*, 2003]. L'incineració de plàstic ha estat una opció en el tractament d'aquest material no biodegradable, però a part de ser cara, també es perillosa degut als agents químics nocius, com el clorur d'hidrogen i el cianur d'hidrogen, que s'alliberen durant el procés d'incineració. El reciclatge també presenta alguns desavantatges degut a la difícil classificació per la gran varietat existent de plàstics, a part, també es produeixen canvis en el material fent que el seu rang d'aplicació sigui més limitat [Reddy *et al.*, 2003].

Per tant, la recerca centrada en el desenvolupament de polímers naturals biodegradables és un element important del nou desenvolupament econòmic.

1.1. Tipus de Biopolímers.

Existeixen dos grups de biopolímers d'especial interès, els polihidroxialcanoats (PHAs) i les substàncies polimèriques extracel·lulars (EPSs), produïts per una varietat d'espècies de microorganismes. Aquests polímers naturals són biodegradables, presenten propietats termoplàstiques i poden ser produïts a partir de fonts de carboni renovables amb una alt grau de polimerització. Són molt cristal·lins, òpticament actius i isotàctics (regularitat estereoquímica en unitats de repetició). Aquestes característiques els fan molt competitius front el polipropilè i polietilè, plàstics d'origen petroquímic [Philip *et al.*, 2007].

Seguidament, es detallen les característiques dels dos grups de biopolímers, així com les seves aplicacions industrials d'especial interès. S'expliquen les diferents condicions, estudiades fins ara, per la seva producció i acumulació amb cultius bacterians mixtes, el tipus de microorganismes amb mes potencial d'acumulació i l'equip utilitzat per posar en marxa la planta pilot.

1.2. Els polihidroxialcanoats (PHA): Descripció.

En la revisió feta per Philip *et al.*, 2007, entre el 1923 i el 1927 el bacteriòleg francès Lemoigne, de l'institut Pasteur, va ser el primer capaç de caracteritzar el poli-3-hidroxibutirat P (3HB) a partir de bacteris, i va posar de manifest que aquest extracte es va poder convertir en una pel·lícula (film) transparent. No obstant això, no va ser fins als anys 60 que la producció de poli-3-hidroxibutirat P (3HB) no es va portar a escala comercial mitjançant cultius bacterians purs. Amb el decurs dels anys, se'n van identificar prop de uns 125 i es va designar una família, els polihidroxialcanoats (PHAs), per a agrupar totes aquestes substàncies. Els PHAs són polièsters sintetitzats per una gran diversitat de microorganismes a través de la fermentació de sucres, lípids, alcans, alquens i àcids alcanoics. Aquests biopolímers s'acumulen intracel·lularment i poden arribar a nivells elevats com el 90% en pes sec de cèl·lules. La seva acumulació es pot donar sota condicions d'estrès de nutrients, amb limitació de fòsfor, nitrogen o oxigen i actuen també com a reserva de carboni i energia [Reddy *et al.*, 2003].

En general els PHAs es poden dividir en dos grups principals segons el número d'àtoms de carboni que hi ha als monòmers (Figura 1), per tant, es pot diferenciar entre els PHA de cadena curta (PHAs-scl) que solen tenir unitats del monòmer de 3-5 àtoms de carboni, i els de cadena mitja (PHAs-mcl) que contenen unitats del monòmer de 6-12 àtoms de carboni [Laycok *et al.*, 2012] (Figura 2).

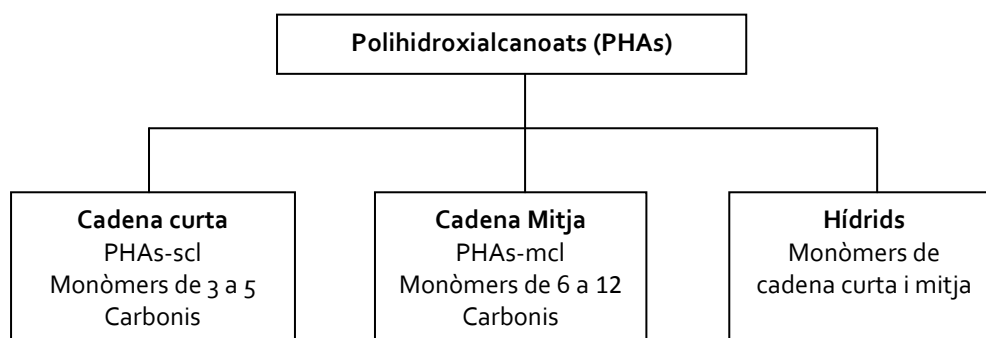


Figura 1: Classificació dels PHAs segons el número de carbonis en la cadena del monòmer. [adaptat de Y. González García *et al.* 2012].

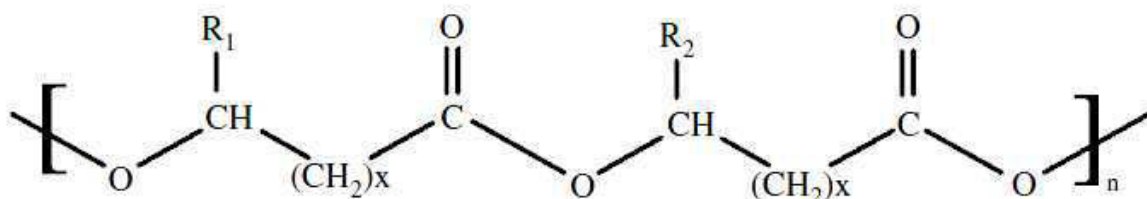


Figura 2: Estructura general dels polihidroxicanoats. R_1/R_2 = grups alquil C1-C13, $x = 1-4$, $n = 100-30000$ [adaptat de Philip *et al.*, 2007].

Existeixen dos polímers de PHAs que són els més comuns, el Poli-3-hidroxi-butirat P (3HB) i el poli-3-hidroxi-valerat P (3HV). La combinació de tots dos polímers forma el copolímer poli-3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerat P (3HB-co-3HV). Generalment, s'introdueixen monòmers de 3HV per tal de millorar les propietats mecàniques del polímer produït, fent que sigui menys trencadís, més resistent a l'impacte, més flexible, etc.

Dintre de la família dels PHAs, el més estudiat i del qual se'n té més informació és el P (3HB), que està format per unitats repetides de (R)-3HB. Els monòmers es polimeritzen donant lloc a polímers d'alt pes molecular, entre 200.000 i 3.000.000 Daltons, tot depenen del microorganisme emprat i de les condicions de creixement [Sudesh *et al.*, 2000].

Els PHAs tenen una gran varietat de propietats físiques i tèrmiques depenen de les variacions en les seves estructures moleculars i la composició final del polímer, és per això,

que la família dels PHAs proporciona un gran ventall de materials polimèrics amb diverses propietats, des de plàstics més rígids i cristal·lins, fins a plàstics com el cautxú els quals estan dotats de més elasticitat.

A continuació (Taula 1), s'ha fet un recull on es mostra una varietat de polímers, naturals i sintètics, amb les seves propietats físiques per comparar les semblances entre ells i, així, observar com els bioplàstics s'assemblen als plàstics sintètics derivats del petroli.

Taula 1: Comparació de les propietats físiques entre alguns polímers naturals (PHAs) i polímers sintètics. Adaptació de diferents fonts de referència [Sudesh et al., 2000; Y. González García et al., 2012; Philip et al., 2007]

Polímer	Temperatura de fusió °C	Temperatura de transició vítria °C	Trencament per estirament (%)	Força de tensió (Mpa)
P (3HB)	180	4	5	40
P (3HB-co-71% 3HV)	83	-13	-	-
P(3HB-co20% 3HV)	145	-1	50	20
P(3HB-co-16% 4HB)	150	-7	444	26
P (4HB)	53	-48	1000	104
PHA _{MCL}	45-54	-25 a -40	-	-
Polietilè	262	3400	7300	56
Polipropilè	176	-10	400	34.5
Poliestirè	240	100	-	50

1.2.1. Aplicacions industrials dels PHAs.

La versatilitat i el potencial dels PHAs els fa bons candidats en una varietat d'àrees com la biomedicina, alimentació, embalatge, tèxtil i materials per la llar.

En els últims anys, ha augmentat el nombre de publicacions degut a l'interès per investigar sobre la biosíntesi i la caracterització de les diferents famílies de biopolímers. El que va començar com un interès acadèmic ara es mou amb rapidesa en el camp comercial.

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

Un dels problemes principals en la producció i utilització a escala comercial són els costos de producció, que continuen sent un desavantatge. Aquesta problemàtica rau en la competència amb els polímers d'origen fòssil (<1 US\$/kg de polímer produït) [Jacquel *et al.*, 2008], degut al seu baix cost de producció. No obstant això, moltes empreses arreu del món produeixen diversos tipus de biopolímers d'origen natural. La tendència és centrar l'atenció en el desenvolupament i millora del procés de producció per tal d'augmentar l'eficiència i reduir els costos de producció [Keshavarz *et al.*, 2010].

En la següent taula es mostra un recull de diferents biopolímers produïts a escala industrial amb la seva producció anual i els costos de producció.

Taula 2: Diferents biopolímers produïts per varies empreses arreu del món. Àrees d'aplicació, volum de producció i costos de producció. Adaptat de Penalva (2013).

Nom comercial	Tipus PHA	Aplicacions	Empresa	Producció (tones/any)	Costos (€/kg)
Biogreen	P(3HB)	Tecnologia d'obtenció de bosses de plàstic, biocarbó i oli	Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. (Japan)	10.000	2.5-3.0
Biopol	P(3HB-co-3HV)	Alimentàries/agrícoles, mèdiques/farmacèutiques		1.100 (2003)	3-5
Enmat	P(3HB-co-3HV)	Tecnologia de termoformat	Tianan Biologic, Ningbo (China)	10.000	3.26
Nodax	P(3HB-co-3HHx)	Alimentàries, mèdiques/farmacèutiques	P&G (US)	20.000-50.000	2.50

*HHX: 3-hidroxihexanoat

Un dels factors essencials per potenciar la producció de polihidroxicanoats i desenvolupar estratègies per incentivar-la, són les polítiques i mesures que apliquen els diferents governs per donar solucions a la problemàtica que existeix arreu del món amb l'ús dels plàstics convencionals.

A la Taula 3 es mostren algunes de les mesures que porten aplicant alguns països, des de fa temps, per reduir l'ús dels plàstics sintètics i fomentar la utilització de plàstics naturals biodegradables.

Taula 3: Polítiques i mesures que apliquen diferents països per reduir l'ús dels plàstics sintètics. Font: [Suchada et al., 2010].

País	Polítiques i mesures nacionals
Alemanya	La Directiva d'envasos Alemanya està en vigor des de el 2005, la qual potencia l'ús de les bosses compostables.
França	Al 2006 entra en vigor una llei que indica el compliment d'un requisit de biodegradabilitat per les bosses de plàstic d'un sol ús.
Itàlia	Els mercats a Florència van començar a cobrar entre 0,10-0,20€ per bossa de plàstic.
Irlanda, Escòcia	Aquests països ja han imposat impostos sobre les bosses de plàstic no degradables.
UK	El 2003, el comtat de Durham ha estat cobrant una Eco-taxa per bossa de plàstic
US	San Francisco aprova per primera vegada en la legislació nacional la prohibició de l'ús de bosses no biodegradables.
Canadà	Al 2008 imposen un preu mínim per cada bossa de plàstic
Japó	Llei per la promoció de compres verdes i la Llei de Reciclatge, en vigor des de el 2001
India	Els plàstics estan prohibits oficialment a Ladakh

Com s'ha pogut veure en la Taula 2, existeix una varietat d'aplicacions a nivell industrial on els PHA poden tenir un futur prometedor. A continuació es fa una breu recopilació sobre els diferents camps d'aplicació, que poden tenir una especial rellevància degut a la seva influència en la millora de la qualitat ambiental.

1.2.2. Aplicacions industrials dels PHAs: Alimentació i agricultura.

Un dels camps on els biopolímers ha entrat amb força n'és el de l'alimentació. Aquest ús que hi ha en la indústria alimentaria dels biopolímers no es directe, és a dir, l'objectiu no és interferir en les propietats organolèptiques dels aliments, sinó que el destí dels PHAs en aquest camp d'aplicació és el de l'embalatge, transport i manipulació dels aliments [Siracusaa et al., 2008].

Sovint, tots aquest materials són només d'un sol ús, això encara fa més indispensable la necessitat d'obtenir materials 100% biodegradables i fàcils de produir. Aquest interès en facilitar la producció es centra en reduir al màxim possible tota la despesa energètica emprada en la producció per un únic ús.

Els PHA, també s'han utilitzat en el camp de l'agricultura com a pel·lícules de recobriment per l'humus. Una de les aplicacions especialitzades del copolímer P (3HB-3HV) en

l'agricultura és l'alliberament controlat d'insecticides. Aquest copolímer s'integra en pelets que són sembrats en els cultius. La funció del copolímer és alliberar l'insecticida amb una velocitat relacionada amb el nivell d'activitat de les plagues, és a dir, la substància s'allibera segons la velocitat de degradació del copolímer per part dels microorganismes [Philip *et al.*, 2007].

1.2.3. Aplicacions industrials dels PHAs: Producció de Biodiesel.

Els biocombustibles, sempre han tingut la controvèrsia sobre aliments vs combustibles i combustibles vs terra cultivable, però la producció de biocombustibles a partir de PHA provinents del tractament d'aigües residuals o llots activats, fa que gaudeixi dels avantatges que el mateix tractament d'aigües residuals té amb la generació d'energia.

En la revisió de Chen (2009), els polímers metil éster (R)-3-hidroxibutíric (3HBME) i metil éster hidroxialcanoat de cadena mitja (3HAME) van presentar valors en quan a calor de combustió de 20 kJ/g^{-1} i 30 kJ/g^{-1} respectivament. L'etanol té una calor de combustió de 27 kJ/g^{-1} , molt similar als polímers anteriors, però una addició del 10% de 3HBME o 3HAME milloraria la calor de combustió de l'etanol a 30 kJ/g^{-1} i 35 kJ/g^{-1} respectivament. Es va fer una estimació del cost de producció de PHA a partir de llots activats i aigües residuals, sent aproximadament de $0,12 \text{ US\$/kg}$ [Chen *et al.*, 2009]. Aquest resultat fa que s'obrin noves àrees d'aplicació del PHAs en el sector energètic.

1.2.4. Aplicacions industrials dels PHAs: mèdiques i farmacèutiques .

Els PHA, en l'àmbit de la medicina, tenen diverses aplicacions degut a la seva no toxicitat, biocompatibilitat i alta biodegradabilitat. Un dels usos que es fa d'aquests, és el recobriments de medicaments que requereixen una alliberació controlada un cop ingerits. Això s'aconsegueix gràcies a la degradació progressiva de la superfície que cobreix el medicament [Jacquel *et al.*, 2007].

També, són àmpliament utilitzats amb freqüència en l'enginyeria de teixits, com plaques òssies, materials d'osteosíntesi i sutures quirúrgiques [Philip *et al.*, 2007].

1.2.5. Producció i acumulació de PHAs.

La producció i acumulació de PHA's es pot donar a través de dues vies, mitjançant l'activitat microbiana o en plantes. En aquest cas, s'aprofundirà en l'activitat microbiana com a via de producció i acumulació de PHA's.

La síntesi de bioplàstics requereix de tècniques viables i factibles degut a la difícil producció. És cert, que una ampla gamma de PHAs amb característiques diferents tenen baixa productivitat i elevats costos en comparació amb els plàstics a base de minerals tradicionals, per aquesta raó segueixen sent un obstacle per l'aplicació industrial. No obstant això, s'ha aconseguit una productivitat relativament alta per el biopolímer P (3HB) i els copolímers P(3HB-co-3HV) i poli (3-hidroxihexanoat-co-3-hidroxi octanoat)P (3HHX-co-3HO) [Keshavarz *et al.*, 2010].

Hi ha varis factors que afecten al contingut del monòmer, com per exemple: el tipus de microorganisme (Gram - positius o Gram - negatiu), les condicions de fermentació, la composició del medi, les condicions de síntesi (aeròbia / anaeròbia) i el tipus de reactor on es dur a terme la producció i acumulació d'aquests (*batch, fed-batch, en continu, etc...*).

Pel que fa al tipus de microorganismes encarregats d'acumular PHA's, hi ha una gran varietat de bacteris (mes de 300 espècies [Keshavarz *et al.*, 2010]) com per exemple: *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, i *Methylobacterium sp*. que tenen la capacitat de sintetitzar PHA's i acumular-los en el seu citoplasma com a font de carboni i energia en forma de grànuls.

La biosíntesi de PHA's, dels els bacteris, és la seva resposta a sotmetre'ls a situacions d'estrés degut a la limitació de nutrients (nitrogen, fòsfor) , però amb excés de font de carboni. No obstant això, alguns bacteris coma ara *A. Vinelandii* UWD, *A. Eutrophus*, *A. Latus* i una mutació de *A. Vinelandii*, són capaços d'acumular PHA's sense limitació de nutrients [Keshavarz *et al.*, 2010].

Un dels punts a considerar és reduir el temps de generació d'aquests polímers amb l'ús de bacteris recombinants. En la revisió feta per Keshavarz *et al.*,(2010) s'explica com el disseny

de la recombinació de *E. Coli* per produir P (3HB), modificant la genètica per produir PHA's en un temps inferior, també van produir una gran varietat de copolímers.

Un punt clau per l'optima producció de PHAs és l'elecció del medi. Aquest influeix en totes les característiques de producció de biopolímers, pel que fa a la qualitat dels biopolímers i al volum de producció com a l'obtenció d'un producte prou econòmic per poder competir amb els plàstics derivats de combustibles fòssils. Això implica que s'hagi de posar èmfasi en la recerca de mitjans econòmics, per tal d'obtenir altes productivitats a baix cost.

Alguns d'aquests medis més econòmics per a l'acumulació de PHAs, inclouen l'ús de melasses, licor de blat de moro, sèrum de llet, midó, aigües residuals, abocaments de residus d'olis d'oliva i olis de palma, llots actius, residus de purins, etc. A més, l'elecció del medi també està relacionat amb el tipus de microorganisme emprat, diferenciant entre els d'origen natural i els d'origen recombinant [Keshavarz *et al.*, 2010].

Les fermentacions per l'obtenció de PHAs es solen dur a terme en dues etapes. La primera etapa es correspon amb l'etapa *feast* (festí), aquí els microorganismes són alimentats per augmentar el seu creixement amb l'objectiu de produir una alta densitat cel·lular. La segona etapa s'anomena *famine* (fam), en aquesta els microorganismes són sotmesos a condicions de falta de nutrients (nitrogen, fòsfor, oxigen) per tal d'acumular els PHAs en el seu interior.

El procés de fermentació pot tenir diferents configuracions, fermentació en *batch* (lots), en *fed-batch* (alimentació en lots) i per fermentació en continu. Per produir PHA es necessari sotmetre als microorganismes a condicions de *feast-famine*, però aquest tipus de configuració depèn del tipus de microorganismes que s'utilitzi. Les condicions d'operativitat, temperatura, oxigen dissolt, velocitat d'agitació i pH, dependran del tipus de substrat emprat [Keshavarz *et al.*, 2010].

1.3. Substàncies Polimèriques Extracel·lulars (EPS): Descripció .

Wingender *et al.*, (1999) va utilitzar les sigles "EPS" com a terme més general i ampli per representar diferents classes de macromolècules com ara polisacàrids, proteïnes, àcids nucleics, lípids i altres compostos polimèrics que es presenten a l'interior de diversos agregats microbians.

En els sistemes de tractament d'aigües residuals, la majoria dels microorganismes són presents en forma d'agregats microbians com ara, flòculs, grànuls i biofilms. Gràcies a diferents tècniques de microscòpia electrònica s'han observat i confirmat la presència de substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS) en cultius purs, llots activats, grànuls i biofilms, formant una barreja de polímers de gran pes molecular. [Sheng *et al.*, 2010].

Els EPSs són polímers biosintètics o biopolímers, també coneguts com a productes microbians solubles (*soluble microbial products*). Geesey (1982) els va definir com a "substàncies polimèriques extracel·lulars d'origen biològic que participen en la formació d'agregats microbians". Uns anys més tard, Charalacklis & Wilderer (1989) van definir els EPS com a "polímers orgànics d'origen microbià responsables de la unió de les cèl·lules i d'altres substàncies que formen la biopel·lícula microbiana (cohesió) amb el substrat (adhesió)".

Els EPS tenen una influència significativa en les propietats fisicoquímiques dels agregats microbians com l'estructura, càrrega superficial, floculació, sedimentació, deshidratació i capacitat d'adsorció. Els EPS s'uneixen a les cèl·lules a través d'interaccions complexes per formar una gran estructura en forma de xarxa que protegeix les cèl·lules contra la deshidratació.

Els EPS, són substàncies que els microorganismes excreten del seu interior, aquestes secrecions, d'alt pes molecular, i els productes de la lisi cel·lular i la hidròlisi de les macromolècules contribueixen a formar el que es coneix com biofilm o pel·lícula.

Els EPS es poden dividir en dos grups: EPS lligats i EPS solubles (Figura 3). Els primers són polímers encapsulats, gels condensats, polímers dèbilment lligats i materials orgànics units, essent els més propers a la cèl·lula. Els segons són macromolècules solubles, col·loides i llots, que es troben a la part més externa de la cèl·lula, tot just després dels EPS lligats. [Sheng *et al.*, 2010].

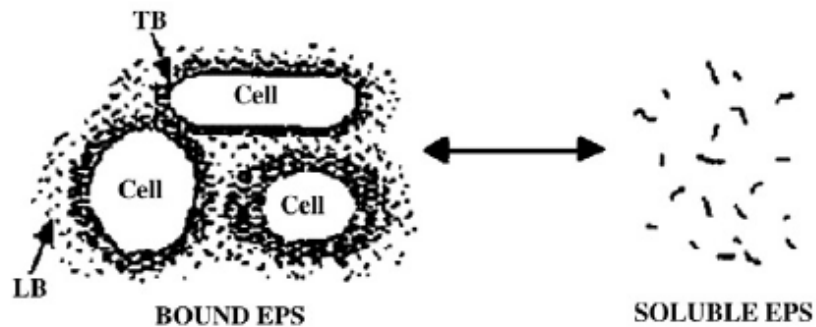


Figura 3: Representació dels diferents tipus de EPS. TB = EPS fortament lligats; LB= EPS dèbilment lligats [adaptat de Nielsen and Jahn, 1999].

Les característiques dels EPS, probablement les més importants, [Sheng *et al.*, 2010] són aquelles que donen estabilitat a la biopel·lícula com l'adhesió i la cohesió dels agregats bacterians per tal de que puguin sobreviure i interaccionar entre ells, a més del funcionament com a barrera de protecció davant de possibles contaminants presents al medi, utilitzant aquest sistema barrera per a captar substàncies tòxiques.

Com que els microorganismes han de subsistir a més de protegir-se de les agressions externes, el biofilm confereix característiques que permeten la seva supervivència. El biofilm ha de mantenir la humitat de la comunitat microbiana, permetent que els nutrients passin la barrera protectora i alhora que s'excretin els productes resultants del metabolisme dels microorganismes.

Més concretament, dins el funcionament de la comunitat microbiana, la biopel·lícula permet les interaccions entre microorganismes, fent que sigui possible l'intercanvi d'informació genètica, activitat enzimàtica i el transport d'electrons [Flemming *et al.*, 2011].

Una característica que fa molt especial aquest tipus de biopolímer, és la capacitat d'equilibrar el sistema davant de possibles desajustos per nutrients, fent que la comunitat microbiana sedimenti per un excés, o bé, que utilitzi els EPSs com a font de nutrients en cas de manca.

Els EPS s'utilitzen, degut a les seves característiques, per l'eliminació de la matèria orgànica en aigües minerals i per la purificació biològica de l'aigua potable en biofiltres i en tractaments biològics d'aigües residuals. Porten a terme processos de compostatge, degut a

que són organismes termòfils i generen prou calor com per aturar l'activitat de patògens [Windenger *et al.*, 1999].

1.3.1. Aplicacions Industrials dels EPS.

Els EPS són àmpliament utilitzats en aplicacions d'alt valor afegit. Hi ha diferents àrees d'aplicació: additius alimentaris, producció farmacèutica, aplicacions mèdiques, indústria cosmètica, etc., però sobretot en àrees en les que es requereixen agents espessants, estabilitzadors, i que siguin capaços de donar estructura i unió. La Figura 4 es presenta els EPSs més utilitzats a nivell industrial i les seves àrees d'aplicació.

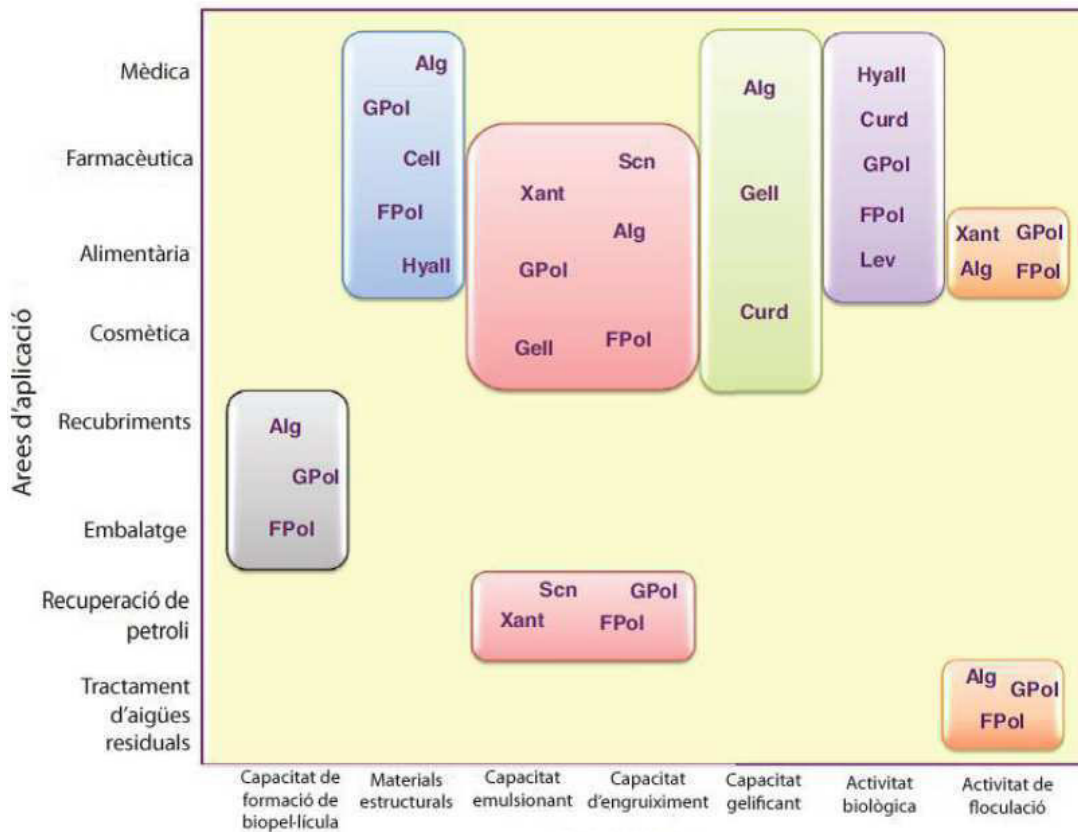


Figura 4: Diagrama on es representa la correlació entre els EPSs més utilitzats a nivell industrial i les seves àrees d'aplicació. Abreviatures: Alg (alginat), Curd (curdlan), FPoI (FucoPol), Gell (Gellan), GPol (GalactoPol), Hyall (hyaluronan), Lev (Ilevat), Scn (succinoglycan), Xant (xantana) [adaptat de Freitas *et al.*, 2011].

1.3.2. Aplicacions industrials EPS: Alimentàries.

Recentment, la investigació en el camp alimentari s'ha encaminat cap a la creació de noves estructures com micro / nano-esferes, perles de polímers i càpsules amb materials

comestibles i d'altres compostos bioactius com antioxidants, vitamines, probiòtics o prebiòtics que estan encapsulats. Aquestes tècniques d'encapsulació estan dissenyades per protegir les substàncies bioactives i per promoure el seu alliberament controlat.

Alguns polisacàrids tenen la capacitat d'establir interaccions fisicoquímiques que donen com a resultat una matriu polimèrica cohesiva que és capaç de formar una pel·lícula. El desenvolupament d'aquestes matrius polimèriques amb propietats tals com, transparència, propietats mecàniques, d'efecte barrera, de biocompatibilitat i bioactivitat, poden destinar-se a diverses aplicacions com a recobriments comestibles per productes alimentaris. Però cal tenir en compte els canvis de pH, de forces iòniques i la influència d'altres components alhora d'incorporar els EPS a les formulacions [Freitas *et al.*, 2011].

1.3.3. Producció i acumulació de EPSs.

Al mateix que els PHAs, la producció i acumulació dels EPSs també depèn de diversos factors com, el tipus de microorganismes utilitzats, la composició del medi, les condicions de fermentació (anaeròbia / aeròbia), fases de creixement, etc.

La síntesi d'EPS és afavorida, generalment, per la presència d'una font de carboni en excés combinat, per altra banda, amb una limitació de nutrients coma ara, nitrogen o fòsfor. Els sucres són la font de carboni més utilitzada per la producció d'EPS. No obstant això, existeixen substrats més barats, coma ara residus agroalimentaris o industrials i subproductes, que han demostrat se adequats per la producció d'EPSs. Aquestes altres fonts de carboni donen lloc a molasses, glicerol, etc. A més, aquests subproductes influeixen en la qualitat del producte final [Freitas *et al.*, 2011].

Com ja s'ha mencionat, el tipus de substrat té un efecte substancial en l'activitat microbiana i, per tant, influeix en la producció d'EPS. Liu i Fang (2003) van determinar que amb una alimentació a base de glucosa, s'obtenia una major producció d'EPSs que amb una alimentació a base d'acetat.

Les limitacions de nutrients com el fòsfor, el nitrogen o de l'oxigen en el substrat influencien en l'acumulació i composició dels EPS. La manca de fòsfor incrementa l'acumulació dels EPS, concretament dels carbohidrats. Alguns investigadors han determinat que una baixa

relació de carboni-nitrogen tendeix a produir EPS amb una elevada proporció de proteïnes/carbohidrats [Li i Yang *et al.*, 2011].

Un dels altres aspectes a considerar en quan a producció d'EPS, és el temps de residència cel·lular (TRC) (vegeu apartat 1.4.2.), tot i que els resultats recollits en la bibliografia són una mica contradictoris. Molts investigadors han trobat que una augment del TRC genera una major concentració d'EPS. Sesay (2006) va veure com la relació de proteïnes i carbohidrats va augmentar amb una augment 4 a 20 dies del TRC, mentre que en Liao (2001), va trobar que una augment del TRC no variava el contingut d'EPSs ni la relació de proteïnes / carbohidrats.

Les condicions de fermentació referides a l'aeració del medi també influeixen en l'acumulació d'EPSs. En condicions aeròbiques n'afavoreixen l'acumulació, augmentant la producció dels carbohidrats amb el temps. En canvi, en cas d'estar sota condicions anaeròbiques l'acumulació se'n veu desafavorida podent arribar a desintegrar-se la unió del biofilm per desintegració dels flòculs bacterians. Aquesta desintegració pot ser a causa de la hidròlisi dels EPSs [Sheng *et al.*, 2010].

Les fases de creixement microbianes estableixen l'acumulació d'EPSs, essent la fase de creixement el moment de la seva acumulació, mentre que la fase estacionària provoca una disminució en la seva acumulació [Seng *et al.*, 2010].

1.4. Tipus de cultius bacterians per l'acumulació de biopolímers.

Existeixen dos tipus de cultius bacterians, els cultius purs i els cultius mixtes. Els cultius bacterians purs es van utilitzar primerament per la producció de PHA, el problema que representa aquests tipus de cultiu són les condicions d'esterilitat que requereixen per obtenir una bona producció de biopolímers [Philip *et al.*, 2007].

Sota aquestes condicions, els costos de producció augmenten degut a les condicions d'esterilitat que s'han de mantenir durant tot el procés de producció, es per això, que l'interès en la recerca s'ha centrat en l'estudi del cultius bacterians mixtes, degut a que no requereixen cap tipus d'esterilitat del reactor i poden operar sota diferents condicions,

Durant la fase anaeròbia són alimentats amb una font de carboni, en aquestes condicions els PAO són capaços de transportar els AGV dins la cèl·lula i emmagatzemar-los en forma de PHA utilitzant com a font d'energia el polifosfat intracel·lular, que dóna lloc a l'alliberació de fosfat, i la hidròlisi del glicogen (GLY). En condicions aeròbiques (l'oxigen és l'acceptor d'electrons), el PHA és oxidat restablint-se el glicogen i emmagatzemant l'energia en forma de polifosfats a partir de la incorporació de fosfats de l'aigua en la cèl·lula.

Hi ha un altre grup de microorganismes anomenats organismes acumuladors de glicogen (GAO) que són capaços de proliferar sota condicions anaeròbiques / aeròbiques [Liu *et al.*, 1996] i de captar AGVs utilitzant el poder reductor i l'energia de la glicòlisi del glicogen. A diferència dels PAO, el fòsfor no està vinculat en el seu procés metabòlic i per tant, no té lloc l'eliminació de fòsfor. Aquest grup són competidors dels PAO i afecten a la capacitat d'eliminació de fòsfor degut a una presència significativa [Bond *et al.*, 1995].

1.4.2. Temps de residència cel·lular i cabal de purga.

Hi ha dos factors importants que estan relacionats amb el funcionament dels organismes PAO, aquests factors són el cabal de purga i el temps de residència cel·lular (TRC) o temps de retenció de sòlids (TRS). Per obtenir una bona eliminació de fòsfor de les aigües residuals es requereix d'un cultiu bacterià en unes òptimes condicions. El TRC o TRS, fa referència al temps mitjà que els microorganismes resideixen en el reactor.

És important controlar el volum de sòlids al reactor per tenir un control del cabal de purga, degut a que poblacions envellides de microorganismes donaran un mal rendiment en l'eliminació del substrat desitjat. Per contra, si la purga és superior al temps de duplicació o de creixement de la biomassa, s'obté una concentració molt baixa de sòlids en el reactor, amb la conseqüència d'una mala eliminació del substrat per falta d'individus.

És doncs, per aquesta raó, que cal determinar un cabal de purga per mantenir un temps de residència cel·lular en funció de la producció de biomassa nova (PNB) i de la pèrdua de biomassa per l'efluent de sortida (PBE). Si $PNB > PBE$ cal realitzar una purga del sistema degut a que està acumulant biomassa en el reactor, per contra, si $PNB < PBE$ no cal realitzar

cap purga, degut a que està perdent biomassa per l'efluent de sortida i això, actua com purga.

D'altra banda per calcular les produccions de biomassa i pèrdues per l'efluent s'utilitzen les equacions reportades de la bibliografia. Aquestes es detallen en l'apartat 3.4 de materials i mètodes.

1.4.3. Acumulació de PHA/EPS en un cultiu bacterià mixta.

Els principals obstacles per la producció de PHAs/EPSS són els seus costos de producció, la majoria relacionats amb el substrat utilitzat [Freitas *et al.*, 2011]. És per això, que la investigació es centra en l'ús de substrats de baix valor afegit com residus de matèries primeres [Reddy *et al.* 2003] i l'ús de cultius microbians mixtes [Laycock *et al.*, 2012]. Aquests factors permeten un estalvi energètic en la producció de biopolímers i alhora una reducció dels costos de producció degut a que no es requereixen condicions d'esterilitat [Laycock *et al.* 2012].

L'emmagatzematge de PHAs/EPSS per llots activats pot donar altes concentracions d'aquests si els fangs són sotmesos a condicions de *feast-famine* (vegeu apartat 1.2.5.) [Majone *et al.*, 1996; Serafim *et al.*, 2004]. Sota aquestes condicions els microorganismes acumulen PHAs/EPSS a la fase amb excés de carboni, mentre que en la fase d'absència de substrat utilitzen aquesta acumulació de biopolímers com a font de carboni [Lemos *et al.*, 2006].

En la revisió de W. Punrattanasin (2006), es va presentar un reactor discontinu seqüencial (SBR) (vegeu apartat 1.5.) per la producció de PHAs mitjançant el tractament d'aigües residuals amb un cultiu bacterià mixta. Aquest reactor es va operar en diferents condicions, microaeròbic aeròbic (MAA), anaeròbic / aeròbic (AN / AE) i totalment aeròbic (AE), alimentats amb un alt contingut d'acètic i diferents configuracions en la limitació de nutrients com, fòsfor i nitrogen [Serafim *et al.*, 2004]. Els millors resultats en l'acumulació de PHAs van ser sota condicions totalment aeròbiques i amb limitació de nitrogen i fòsfor [Punrattanasin *et al.*, 2006].

Jang *et al.*, (2007), van determinar que la concentració de EPSs als llots incrementava amb una limitació de nutrients en la fase *feast*. D'altra banda, Liu i Fang (2003) van determinar que en condicions desfavorables pel que fa al suplement de Carboni/Nitrogen (C/N), es detectava un augment en la producció de proteïnes en vers polisacàrids. En presència de substàncies tòxiques com metalls pesants, també s'incrementa l'acumulació d'EPSs per a protegir la integritat de la comunitat microbiana [Priester *et al.*, 2006], essent representatiu l'increment de proteïnes per sobre de la resta de components dels EPSs [Sheng *et al.*, 2010].

D'altra banda, el tipus de substrat utilitzat esta relacionat amb el tipus i quantitat de biopolímers produïts [Albuquerque *et al.*, 2011]. Per la producció de PHAs, els millors resultats s'han obtingut utilitzant AGV com ara, acetat, propiònic, butirat o valerat [Dias *et al.*, 2006], mentre que els substrats utilitzats per una producció optima d'EPSs solen ser derivats del sucre com ara, glucosa, sucrosa, etc, ja que s'obtenen menors concentracions si són alimentats amb AGVs [Miqueleto *et al.*, 2010].

1.5. Reactor Discontínu Seqüencial (SBR).

Un Reactor Discontínu Seqüencial (en anglès, *Sequencing batch reactor, SBR*), és un sistema de tractament de llots actius que opera en discontinu, és a dir, treballa per càrregues. En un SBR s'utilitza el mateix tanc per les fases de reacció i sedimentació, mentre que en una planta convencional de flux continu es requereix de més tancs per realitzar els diferents processos de tractament.

El funcionament consta de cinc etapes: omplerta (alimentació), reacció, sedimentació, buidatge, equilibri. Aquestes etapes estan seqüenciades en el temps formant cicles que es repeteixen consecutivament. A la Figura 6 es mostra les diferents etapes en les que a operat aquest reactor:

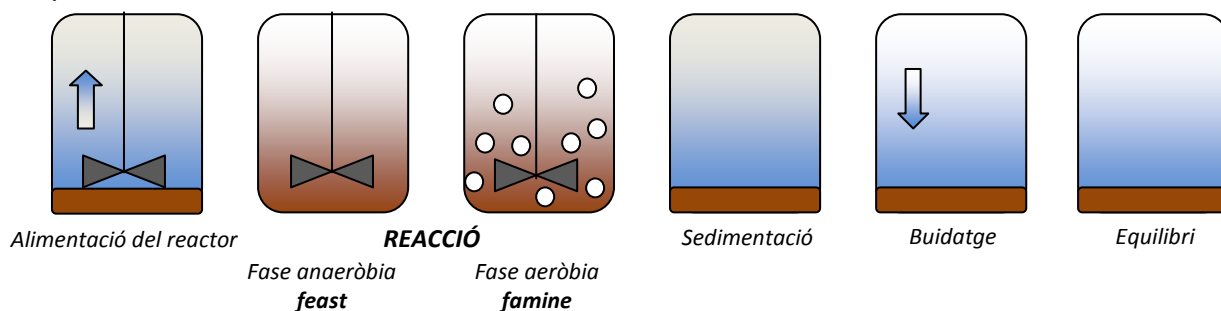


Figura 6: Esquema del funcionament d'un reactor seqüencial discontinu (SBR) amb una configuració anaeròbia /aeròbia per afavorir l'activitat dels organismes PAO per l'eliminació de fòsfor i l'acumulació de PHA/EPS. Elaboració pròpia. 18

1.6. Justificació del projecte.

El present projecte final de carrera s'ha desenvolupat a partir dels resultats presentats per Penalva (2013), l'estudi s'ha basat en determinar el potencial de producció de biopolímers a partir de biomassa procedent de diferents tractaments d'aigües residuals (vegeu apartat 3.1.). L'estudi conclou que, el tipus de biomassa que més potencial d'acumulació de biopolímers presenta, és la provinent del reactor d'eliminació biològica millorada de fòsfor en reactor continu de tanc agitat (EPBR-RCTA).

A partir d'aquests resultats conjuntament amb els revisats per Punrattanasin (2006), s'ha procedit a l'estudi de la posta en marxa d'un reactor discontinu seqüencial per la producció de biopolímers utilitzant la biomassa del reactor EPBR-RCTA. Segons la revisió de Punrattanasin (2006) (vegeu apartat 1.4.3.), les millors condicions d'operació per la producció de biopolímers és sotmetre als microorganismes a situacions d'estrés amb limitació de fòsfor i nitrogen, però amb excés de carboni. D'altra banda, les variacions d'oxigen també afecten a la producció de biopolímers, això s'ha tingut en compte alhora de determinar les diferents condicions operacionals del reactor.

Un segon estudi, inclòs en el projecte, ha estat la comparació de dos SBR alimentats amb diferents fonts de carboni. Com s'ha esmentat anteriorment (vegeu apartat 1.4.3.), diferents fonts de carboni afecten a la producció de biopolímers, degut això, s'aprofitat dos reactors en funcionament del grup de recerca Bio-GLS que operen amb diferents fonts de carboni per realitzar l'estudi del potencial d'acumulació de biopolímers en front a la font de carboni utilitzada.

1.7. Estructura de la memòria

L'estructura de la memòria consta dels següents apartats: Objectius, Material i Mètodes, Resultats i Discussió, Conclusions, Llistat d'Acrònims, Bibliografia, Pressupost, Programació i Annexos.

En l'apartat dels Objectius s'han definit les fites plantejades per desenvolupar aquest projecte en funció de les necessitats requerides i dels recursos disponibles en el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

A l'apartat de Material i Mètodes s'han detallat els recursos utilitzats per la realització del projecte, així com les metodologies i tècniques analítiques emprades i els diferents equips instrumentals utilitzats durant el projecte.

En l'apartat Resultats, s'han presentat els resultats obtinguts en el monitoratge del reactor sota diferents condicions operacionals per mostrar el potencial d'acumulació de PHAs/EPSs. S'han presentat també els resultats del monitoratge de dos SBRs del grup de recerca Bio-GLS alimentats amb diferent font de carboni per mostrar sota quines condicions d'alimentació els microorganismes tenen més potencial ha acumular PHAs/EPSs.

S'ha realitzat un pressupost del cost per desenvolupar aquest projecte on es detallen els costos de l'equipament, del material de laboratori utilitzat en el projecte i les despeses de personal.

Per últim, es mostra la programació seguida en el projecte i el temps dedicat a cadascuna de les tasques que el componen.

2. Objectius.

L'objectiu general d'aquest projecte es avaluar la factibilitat de produir biopolímers simultàniament amb l'eliminació de fòsfor. En el procés d'eliminació de fòsfor i de qualsevol procés de tractament d'aigües residuals, al finalitzar s'obté un residu que són els fangs de depuradora. L'objectiu és obtenir un producte del fang residual amb un valor afegit.

Així, s'han comparat diferents condicions operacionals que poden afavorir un major percentatge d'acumulació de biopolímers a partir d'una biomassa obtinguda en un projecte anterior [Penalva 2013] per a l'acumulació de biopolímers de manera simultània a l'eliminació de matèria orgànica i fòsfor d'una aigua residual de la indústria làctica. Per assolir-lo s'ha dut a terme el monitoratge d'un reactor discontinu seqüencial o *sequencing batch reactor* (SBR) en el que s'ha sotmès la biomassa a diferents condicions operacionals: condició 1: experiments control sense limitació de fòsfor a 10 mg/L en fases AN (156 min) / AE (138 min); condició 2: limitació de fòsfor a 4 mg/L en fases AN /AE iguals que en condició 1; condició 3: sense limitació de fòsfor però amb augment del temps en fase AE (182 min, d'acord amb els millors resultats observats en l'estudi fet per W. Punrattanasin (2006) (vegeu apartat 1.4.3).

Un segon objectiu, dins del mateix projecte, ha estat comparar el grau d'acumulació d'aquests biopolímers amb diferents fonts de carboni. Per assolir-ho, a més del SBR anterior, s'utilitza dos SBR addicionals també amb la biomassa eliminadora de matèria orgànica i fòsfor, alimentats, un amb una aigua residual amb glicerol i l'altre amb una aigua residual amb àcids grassos de cadena llarga, per observar simultàniament l'acumulació de biopolímers i l'eliminació de matèria orgànica i fòsfor en funció de la font de carboni utilitzada.

3. Material i Mètodes.

En aquest projecte s'ha posat en marxa un SBR per a l'acumulació de PHA/EPS amb l'enriquiment d'un cultiu bacteriana utilitzat en l'eliminació biològica de fòsfor i matèria orgànica d'un aigua residual de la indústria làctica [Guerrero *et al.*, 2011]. S'ha dut a terme el monitoratge del reactor pel que fa a, sòlids en suspensió volàtils (SSV), sòlids en suspensió totals (SST), $P-PO_4^{-3}$, $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, carboni orgànic total (TOC), demanda química d'oxigen (DQO) i a l'acumulació de PHA i EPS sota diferents condicions operacionals. D'altra banda, també s'ha realitzat la presa de mostres de dos SBR més del grup de recerca Bio-GLS alimentats amb diferents fonts de carboni que es trobaven en condicions operacionals semblants. L'objectiu es poder comparar l'acumulació de PHA i EPS amb diferents fonts de carboni, per determinar sota quines condicions aquesta acumulació de biopolímers és major.

3.1. Caracterització de la biomassa potencial.

Per a la posada en marxa del reactor SBR, primerament s'ha analitzat les biomasses de diferents tractaments biològics d'aigües residuals per a determinar aquella amb més potencial per a l'acumulació de PHA i EPS [Penalva, 2013].

Penalva 2013 va utilitzar la biomassa de diferents reactors del grup de recerca Bio-GLS, del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona. A continuació es detallen els tipus de reactor i la seva funció:

- *Reactor d'eliminació autotròfica de nitrogen amb bacteris d'oxidació anaeròbia d'amoni (anaerobic ammonia oxidation, Anammox).*
- *Reactor d'eliminació biològica millorada de fòsfor en reactor continu de tanc agitat (EPBR-RCTA):*
- *Reactor d'eliminació biològica millorada de fòsfor en reactor discontinu seqüencial (EBPR-SBR):*
- *Reactor d'eliminació de p-nitrofenol (pNP) en reactor discontinu seqüencial (pNP-SBR):*

- *Reactor d'eliminació d'o-cresol + nitrificació en reactor granular aerobi (o-cresol + nitrificació –RGA):*
- *Reactor d'eliminació de pNP + nitrificació parcial en reactor granular aerobi (pNP + nitrificació parcial-RGA):*

Per la determinació del potencial intrínsec d'acumulació de biopolímers en les diferents biomasses dels tractaments d'aigües residuals, s'ha utilitzat el mètode de quantificació plantejat per Pijuan *et al.*, (2004), però amb les modificacions pertinents, per a optimitzar i reduir l'impacte ambiental d'aquest tractament, plantejades en el mètode de Weker *et al.*, (2008). L'objectiu d'aquesta modificació es va centrar en utilitzar hexà, solvent no halogenat ni cancerigen, en comptes de cloroform com a solvent orgànic polar per el procés d'extracció dels PHA i en la substitució de la liofilització de la biomassa per un assecatge en estufa convencional per al pre-tractament de les mostres.

Segons les dades obtingudes en la caracterització de la biomassa, s'ha conclòs que la biomassa que millor potencial presentava per l'acumulació de PHA/EPS, era la provinent del *reactor d'eliminació millorada biològica de fòsfor en reactor continu de tanc agitat (EPBR-RCTA)*.

El funcionament d'aquest reactor es basa en la operació en sèrie de 3 RCTA configurats en diferents fases anaeròbia/anòxica/aeròbia. L'efluent a tractar prové de la indústria làctica amb una relació de carboni, nitrogen i fòsfor (C:N:P) de 40:2:1.

Aquest bioreactor conté microorganismes PAO i GAO, coneguts com acumuladors de PHAs (vegeu apartat 1.4.1.) [Pijuan *et al.*, 2009].

3.2. Posada en marxa d'un SBR per a l'acumulació de PHA/EPS amb l'enriquiment d'un cultiu bacterià mixt.

Una vegada Penalva (2013) va determinar la biomassa amb més potencial, en aquest projecte s'ha posat en marxa un SBR per a avaluar diferents condicions operacionals que poden influir en l'acumulació dels biopolímers. L'equip utilitzat per el desenvolupament d'aquest projecte consta de :

- SBR amb capacitat per a 50 l.
- Tanc refrigerat per l'aliment amb capacitat per a 350 l.
- Bomba d'alimentació amb un cabal de 2,5 l/min.
- Agitador (0,5 CV i 1500 rpm).
- Difusor d'O₂
- Vàlvula de buidatge
- Sondes d'O₂, pH i temperatura.

Per a la posada en marxa del reactor, primerament s'han mesurat els cabals d'entrada i sortida per determinar el temps necessari per omplir el reactor exactament fins a 30 l. i buidar-lo fins a 15 l. Posteriorment s'ha procedit a configurar les condicions del SBR, 4 cicles/dia de 6 hores cadascun, per a reproduir de la manera més semblant la configuració original del EBPR-RCTA mantenint la proporció del temps entre la fase anaeròbia i aeròbia. Cada cicle consta de :

- Equilibri del bioreactor (1 min).
- Fase anaeròbia amb alimentació *feed-batch* (156 min, 6 min d'alimentació)
- Fase aeròbia (138 min).
- Fase de sedimentació de llots (59 min).
- Descàrrega de l'aigua depurada (6 min).

La fase anaeròbia es l'etapa de *feast*, degut a que els microorganismes PAO són alimentats en *feed-batch* en aquesta etapa. L'etapa de *famine* es correspon amb la fase aeròbia, ja que en aquesta els microorganismes no són alimentats. La temperatura s'ha fixat a 25 °C i el pH a 7,3.

S'ha fet una prova hidràulica per comprovar el correcte funcionament de la configuració del sistema i dels diferents aparells que el configuren. La simulació s'ha deixat funcionant durant 3 dies per comprovar que no hi haguessin pèrdues d'aigua, en els diferents punts del sistema susceptibles a tenir-ne, i que la configuració dels diferents dispositius, que controlen les diferents fases del cicle, funcionaven correctament. Un cop enllestida la primera prova de funcionament s'ha procedit a la inoculació del reactor.

El reactor, amb una capacitat de 50 L, s'ha inoculat amb 15 l de biomassa provinent de la purga del bioreactor EBPR-RCTA, els altres 15 l per arribar als 30 l de volum real són els que provenen del tanc d'aliment. La composició de l'efluent de la indústria làctia que serveix d'entrada (aliment) al SBR es detalla a l'apartat 3.4.

3.3. Monitoratge del SBR.

En el monitoratge del SBR, s'han analitzat els següents paràmetres: SSV, SST, $P-PO_4^{-3}$, $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, TOC i DQO.

Les mostres del reactor s'han pres 3 dies a la setmana (dilluns, dimecres i divendres), en canvi, per l'aliment, les mostres s'han agafat el mateix dia de preparació d'aquest (dos cops per setmana).

Els paràmetres analitzats en l'aliment han estat: $P-PO_4^{-3}$, $N-NH_4^+$, TOC i DQO, per confirmar que la concentració de cada nutrient era la correcta i que es coneixia exactament la composició de l'efluent d'entrada.

Els diferents analits que s'han seguit s'han pres en diferents i determinats moments del cicle, degut a que hi ha certs moments del cicle on les seves concentracions són màximes i mínimes. D'aquesta manera s'aconsegueix un control del funcionament del reactor, i així es pot observar si l'activitat dels microorganismes és l'adequada.

Al començament del cicle no hi ha presa de mostra. Es correspondria agafar la del cabal d'entrada, però com aquesta prové del tanc d'alimentació, en el qual es porta un control paral·lel, no es recull cap mostra perquè ja es té coneixement de la composició del cabal d'entrada.

La primera presa de mostra es fa al final de la fase anaeròbia, en aquest punt la concentració de fòsfor ha de ser màxima degut a l'activitat dels PAO (vegeu apartat 1.4.1).

La segona presa de mostres es fa a l'inici de la fase aeròbia, en aquest punt la mostra es destina a la determinació de sòlids al reactor. La decisió d'agafar la mostra per sòlids en aquest punt rau en que hi ha una millor agitació a l'interior del reactor perquè l'aeració funciona juntament amb l'agitador, així, s'obté una mostra més homogènia.

El tercer i últim punt on s'agafa mostra del reactor es al final del cicle després del temps de sedimentació. Aquest punt fa referència al cabal de sortida del SBR i s'analitzen tots el paràmetres del sistema: SSV, SST, $P-PO_4^{-3}$, $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$, TOC i DQO.

El fòsfor, s'analitza tres cops en diferents punts del cicle com a indicador de que els PAO estan desenvolupant un correcte funcionament. Els sòlids es mesuren dos cops, la primera mesura equival a la concentració de sòlids a dins del reactor i la segona a l'efluent de sortida. Aquests valors juntament amb els de DQO permeten calcular si hi ha necessitat de realitzar una purga en el sistema (Taula A.1 annex 1).

Cada paràmetre a analitzar ha requerit de diferents aparells i tècniques analítiques per a determinar la seva concentració, (tots els equips utilitzats en el desenvolupament d'aquest projecte pertanyen al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i ha estat necessari realitzar la corresponent formació per poder utilitzar-los. La formació ha estat a càrrec de l'equip de tècnics del mateix departament), a continuació es detallen quins han estat.

El $P-PO_4^{-3}$, tant del reactor com de l'aliment, s'ha analitzat mitjançant l'aparell PHOSPHAX sc (*Hach Lange*). El Phosphax, mesura el fòsfor del reactor *d'eliminació millorada biològica de fòsfor en reactor continu de tanc agitat (EPBR-RCTA)*, que produeix la biomassa utilitzada en aquest projecte. El funcionament d'aquest aparell es basa en determinar la concentració de fòsfor a través de l'espectrofotometria. La mostra requereix un filtrat previ amb filtres de $0,22 \mu m$ (Millipore), per evitar possibles interferències en la lectura i errades en l'aparell. Un cop filtrada la mostra, es canvia la configuració de l'equip a través del controlador SC1000, el qual dona l'ordre al Phosphax per mesurar la mostra.

Per determinar la concentració d'Amoni ($N-NH_4^+$), tant del reactor com de l'aliment, s'ha utilitzat l'aparell AMTAX sc, (*Hach Lange*). Es basa en la mateixa tècnica que el Phosphax i també requereix un filtrat de la mostra.

Per als ($N-NO_2^-$) i ($N-NO_3^-$) les mostres es filtren amb filtres de $0,22 \mu m$ (Millipore) i es transvasen en vials de 2,5ml. La determinació de la concentració de les mostres es fa per cromatografia iònica (IC) amb un cromatògraf ICS-2000 (DIONEX).

Per mesurar el carboni, primerament s'utilitzava l'aparell per mesurar el TOC, però degut a molts problemes tècnics de funcionament amb l'ordenador i amb els resultats que s'obtenien es va començar a mesurar amb "kits" de DQO (*Hach Lange*). Per l'anàlisi amb aquests "kits" es prenen 2ml de mostra a analitzar i es fa una digestió de 2h a 155 °C. Un cop acabada la digestió es mesura amb un espectrofotòmetre DR 2800 (*Hach Lange*). Aquest tipus de espectrofotòmetre ja venen calibrats de sèrie, per tant no cal realitzar cap recta de calibrat per obtenir els resultats.

Per als sòlids en suspensió volàtils i totals (SSV/SST), es pesen els filtres per determinar el seu pes i poder restar-lo al finalitzar l'anàlisi (Eq.1, Eq.2). Es prenen 10ml de mostra per triplicat i es filtren amb un Kitasato, amb els filtres pesats anteriorment. Els filtres, que contenen la biomassa filtrada, es posen a l'estufa a 105 °C durant 4h amb l'objectiu d'eliminar l'aigua. Passades les 4h, es tornen a pesar els filtres i seguidament s'introdueixen a una mufla a 550°C durant 30 minuts per acabar d'eliminar tota la matèria volàtil. Després es tornen a pesar els filtres. Amb aquest paràmetre es controla l'augment de la biomassa en el reactor i es determina la necessitat de realitzar una purga depenent de la quantitat de sòlids obtinguda i el temps de residència cel·lular fixat.

$$SST = \frac{(P_{estufa} - P_{filtres})}{V_{mostra}} \cdot 10^6 \quad (Eq.1)$$

$$SSV = \frac{(P_{estufa} - P_{mufla})}{V_{mostra}} \cdot 10^6 \quad (Eq.2)$$

3.4. Purga del sistema.

Per tal de saber quin cabal s'ha de purgar, en primer lloc s'ha de comprovar si és necessari fer la purga del reactor. Per això s'han de calcular els paràmetres PNE i PNB definits a l'apartat 1.4.2. Les equacions Eq. 3 i Eq. 4 mostren els paràmetres necessaris per calcular-los.

$$PBE = V_{buidatge} \cdot [SSV_E] \quad (Eq.3)$$

$$PNB = V_{omplerta_reactor} \cdot [DQO_a] \cdot Y_n \quad (Eq.4)$$

On $[SSV_E]$ són els sòlids en suspensió volàtils a la sortida, $[DQO_a]$ és la concentració de DQO a l'entrada del reactor, Y_n és el rendiment de la biomassa, que per aquests tipus

d'organismes (heteròtrofs) pren un valor constant de $Y_n = 0,40$ mg SSV/mg DQO [Sin i col. 2005].

Si la pèrdua de biomassa a l'efluent és més gran que la producció de nova biomassa, llavors no s'ha de purgar el sistema.

En el cas que $PBE < PNB$, llavors cal calcular el cabal de purga (Q_w) necessari. El cabal de purga es basa en el TRC (temps de residència o retenció cel·lular, vegeu apartat 1.4.2), el qual ha estat fixat a un valor de 20 dies [Guerrero *et al.*, 2012]. El TRC mitjà es defineix com la massa de microorganismes en el reactor dividida per la massa diària de microorganismes purgada del sistema (Eq.5).

$$TRC = \frac{V_R \cdot SSV_R}{Q_W \cdot SSV_R + Q_E \cdot SSV_E} \quad (Eq.5)$$

Si aïllem Q_w de Eq.5 obtenim l'equació Eq.6 que ens permet calcular el cabal de purga.

$$Q_W = \frac{V_R \cdot SSV_R - TRC \cdot SSV_E}{TRC \cdot SSV_R} \quad (Eq.6)$$

Els càlculs del cabal de purga es mostren a la Taula A.1. annex 1

3.5. Condicions d'operació.

L'acumulació de PHAs es dona quan els microorganismes són sotmesos a situacions d'estrès, ja sigui per excés o dèficit de nutrients (fòsfor i nitrogen) o per excés o dèficit d'oxigen, però sempre amb excés de carboni [Punrattanasin *et al.*, 2006]. S'han establert diferents configuracions del sistema per tal d'analitzar sota quines condicions s'acumula més PHA. En total s'han establert 3 tipus de configuracions. En dues d'elles es modifica la concentració de fòsfor (variació en els nutrients), mentre que a la que resta es modifica el temps de la fase aeròbia i de la fase de sedimentació (modificació de la disponibilitat d'oxigen) i prolongació de la fase *famine*.

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

A Taules 4 i 5 es detalla la composició de l'efluent, tant els macro com els micro nutrients, de la indústria làctia que serveix d'entrada al SBR.

Taula 4: Composició de macro nutrients a l'efluent d'entrada: (volum 350 l)[adaptat de Guerrero et al. 2011]

Font de DQO	400 mg DQO/l
Llet en pols	150 mg COD/l
Midó	150 mg COD/l
Sucrosa	50 mg COD/l
Àcid acètic (Acetat sòdic)	25 mg COD/l
Àcid propiònic (Propionat sòdic)	25 mg COD/l
N	20 mg N/l
Clorur d'amoni	20 mg N/l
P	10 mg P/l
K ₂ HPO ₄	6.6 mg P/l
KH ₂ PO ₄	3.4 mg P/l
Ajustament de pH	concentració
Bicarbonat sòdic	40 g en 350 l

Taula 5: Composició de micro nutrients a l'efluent d'entrada: (4 ml en 350 l)[adaptat de Guerrero et al., 2011]

Compost	g/l	Concentració al volum final (mg/l)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,5	0,0250
KI	0,18	0,0030
H ₃ BO ₃	0,15	0,0025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,15	0,0025
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,12	0,0020
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,12	0,0020
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,06	0,0010
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03	0,0005
EDTA	10	0,1667

L'aliment utilitzat a la condició 1 o "control" correspon a l'especificat a la Taula 4, l'aliment de la condició 2 presentava dèficit de P, per tant la proporció C:N:P era de 400:20:4.

Per a les condicions d'operació 3, s'han deixat les mateixes condicions d'operació 1 en relació a l'alimentació, però s'ha canviat la disponibilitat d'oxigen prolongant la fase aeròbia o de *famine* [Punrattanasin *et al.*, 2006] de la següent manera:

- Equilibri del bioreactor (1 min).
- Fase anaeròbia amb alimentació *feed-batch* (156 min, 6 min d'alimentació)
- Fase aeròbia (182 min).
- Fase de sedimentació de llots (15 min).
- Descàrrega de l'aigua depurada (6 min).

3.6. Presa de mostres per la determinació de PHA i EPS durant un cicle d'operació.

La presa de mostres per als PHA/EPS de cada condició s'ha fet seguint tot un cicle (6 hores de durada, fase anaeròbia, aeròbia i sedimentació) per veure com varia la concentració de biopolímers i dels diferents paràmetres que s'analitzen en el cicle. Per a la presa de mostres s'han utilitzat dues metodologies diferents, una per els PHA i EPS i l'altre per els altres paràmetres (fòsfor, DQO, amoni, nitrits i nitrats).

Per als PHA/EPS s'agafen 10ml de la biomassa per triplicat en intervals de 20 minuts, dues per l'anàlisi de PHA i l'altre per els EPS. Es posen en tubs Falcon amb formaldehid per aturar l'activitat microbiana i poder guardar les mostres per posterior anàlisi.

Les mostres dels altres paràmetres s'agafen cada 5, 10, 15, 20 i després cada 30 minuts fins a completar el temps que dura cada fase. Les mostres es tracten conjuntament, es filtra uns 90 ml de mostra, per extreure tota la biomassa i obtenir una mostra lliure de sòlids. Per el fòsfor i l'amoni es necessiten uns 40ml aproximadament per cada un, per la DQO 2ml i per nitrits i nitrats 2,5ml.

3.7. Quantificació de PHAs i EPSs.

Un dels objectius d'aquest projecte es determinar l'acumulació de PHA's a través del tractament d'aigües residuals. Per fer-ho s'ha utilitzat el mètode de Pijuan *et al.*, (2004) amb les modificacions plantejades per Weker *et al.*,(2008). Aquest mètode va ser adaptat per Penalva (2013) que ha servit de base per inicialitzar aquest projecte.

3.7.1. Tractament de mostres per determinació de PHA amb el mètode de Werker (2008) i mètode de quantificació per GC.

Es centrifuguen les mostres a 2500xg durant 15 minuts. Un cop obtingudes les dues fases, pellet i sobrenedant, s'extreu aquest últim. Per finalitzar, s'asseca el pellet a 104°C, un cop temperat, es congela a -20°C. Per digerir les mostres es traspasa la totalitat del pellet a un tub de vidre amb junta de tefló. S'afegeixen 1,5ml de butanol i 0,5ml d'àcid clorhídric i es deixen a l'estufa a 104 °C durant 8h.

Un cop digerida la mostra, es deixa refredar. S'addicionen 2,5 ml d'hexà i 4 ml d'aigua desionitzada. S'homogeneïtza amb l'ajut d'un vòrtex durant 10 s. Es separa la fase aquosa i s'afegeixen 4 ml més d'aigua desionitzada per tal d'arrossegar les restes de l'HCl que podrien interferir a l'hora de dur a terme l'anàlisi posterior. S'homogeneïtza amb l'ajut d'un vòrtex durant 10 s. Es centrifuga durant 10 min a 2500xg. Un cop centrifugat, es filtra un volum aproximat de 1,5 ml de la fase superior amb un filtre de 0,22 µm.

Per a l'anàlisi s'utilitza un cromatògraf de gasos d'Agilent Technologies (model 7820 A), equipat amb una columna capil·lar, un injector automàtic i un detector d'ionització de flama (FID). Les condicions cromatogràfiques per a dur a terme la quantificació de PHA de les mostres biològiques i patrons, són les següents [Pijuan *et al.*, 2004]:

- Columna: INNOWAX 30m x 0.53mm x 1.00µm de pel·lícula (19095N-123 HP-InnoWax, Agilent).
- Portador: heli, 54 mL min⁻¹.
- Injecció: 1µl, Split 1:2.
- Temps d'anàlisi: 16min
- Temperatura injector: 220°C
- Temperatura FID: 275°C
- Temperatura del forn: 2 min a 70°C, fins 160°C en rampa de 10°C/min, 2min a 160°C.

3.7.2. Tractament i mètodes de quantificació d'EPSs.

3.7.2.1. Tractament mostres per EPS [adaptat de Adav i Lee, 2011].

Per a la determinació de proteïnes i polisacàrids, components majoritaris dels EPS, s'utilitza el tractament alcalí per tal de separar la fase aquosa de la fase sòlida [Adav i Lee, 2011]. S'addicionen 0,06ml de formaldehid al 36% a la mostra presa per tal d'aturar la reacció metabòlica dels microorganismes. Es deixa incubar 1h a 4°C. Passat aquest temps, s'afegeixen 4 ml de NaOH 1M i es deixa incubar 3h a 4°C.

Per finalitzar, s'extreuen aproximadament 10 ml de la fase aquosa i es centrifuguen 20 min a 4°C i a 12000xg, per tal de separar les partícules sòlides que puguin restar a la fase líquida. Es decanta el volum de sobrenedant a un tub nou i es congela a -20°C.

3.7.2.2. Determinació de Proteïnes: Mètode Lowry [adaptat de Gerhardt *et al.* 1994].

La determinació de proteïnes mitjançant el mètode de Lowry [Gerhardt *et al.*, 1994] es basa en l'ús del reactiu Folin per a obtenir una resposta colorimètrica, capaç de ser quantificada per espectrofotometria.

Es fan servir tres solucions anomenades com a A, B i C. Per a preparar la solució A, s'han pesat 1.4299 g de NaOH i 7.1542 g de Na₂CO₃ i s'han enrasat amb aigua Milli-Q a volum final de 250 ml. Per a preparar la solució B, s'han pesat 1.4232 g CUSO₄·(5H₂O) i s'ha enrasat a 100 ml amb aigua Milli-Q. Per a la solució C s'han pesat 2.85299 g Na₂Tartrate·(2H₂O) i s'ha enrasat a 100 ml amb aigua Milli-Q.

Amb la barreja de les solucions A, B i C es prepara la solució de Lowry. La proporció per a les tres solucions és 100:1:1, tenint en compte que són necessaris 0,7 ml de solució de Lowry per mostra.

Per a determinar la concentració de les mostres, es necessària la preparació d'una recta patró amb una concentració coneguda d'una proteïna coneguda, en aquest cas s'ha utilitzat BSA (de l'anglès *bovine serum albumina*) com a reactiu per a fer la recta patró (veure Figura A.1 Annex 1). S'han pesat 0,05 g de BSA i s'ha dissolt en 500 ml d'aigua Milli-Q, quedant així

a una concentració final coneguda de 100 mg BSA L-1 de la solució mare. (A la Taula A.2 annex 1 es mostren les diferents concentracions que s'han preparat per a la recta patró)

Un cop descongelades les mostres ja tractades, es transfereixen 0,5 ml de cada mostra a un tub eppendorf. Se li afegeix 0,7 ml de la solució Lowry. Per a la recta patró es segueix el mateix procediment. Per aconseguir una mescla homogènia, es vortexen tots els tubs, es protegeixen les mostres de la llum, i finalment s'incuba durant 20 min.

Uns cinc minuts abans d'acabar el temps d'incubació, es prepara la solució de Folin, barrejant 5 ml de Folin-Reagent 2N amb 6 ml d'aigua Milli-Q. Tenir cura de protegir la solució de la llum.

Un cop passat el temps d'incubació, s'addiciona 0,1 ml de la mescla de Folin a les mostres i els patrons. Es vortexen els tubs, es protegeixen novament de la llum, i s'incuben 30 min més.

Finalment, es tornen a vortexar els tubs per homogeneïtzar la mescla i es transvasa el volum de cada mostra a una cubeta de plàstic per mesurar l'absorbància de les mostres amb l'ajut d'un espectrofotòmetre, a $\lambda=750\text{nm}$.

3.7.2.3. Determinació de Polisacàrids [adaptat de Dubois *et al.*, 1956].

La determinació de polisacàrids presents en mostres biològiques es fa mitjançant l'ús de test colorimètric [Dubois *et al.*, 1956].

Es pesen 80g de Fenol i 20g d'aigua Milli-Q per a preparar Fenol 80%.

Per a determinar la concentració de les mostres, es necessària la preparació d'una recta patró amb una concentració coneguda d'un polisacàrid conegut, en aquest cas s'ha utilitzat D-Glucosa com a reactiu per a fer la recta patró. S'han pesat 0,025g de D-Glucosa i s'ha dissolt en 500 ml d'aigua Milli-Q, quedant així a una concentració final coneguda de 50mg D-Glucosa/l de la solució mare. (A la Taula A.3 annex 1 es mostren les diferents concentracions que s'han preparat per a la recta patró)

Un cop descongelades les mostres ja tractades, es transfereixen 2 ml de cada mostra i patró a un tub de vidre amb rosca i junta de tefló, ja que la reacció que es du a terme en aquest anàlisi és exotèrmica.

A partir d'aquí, és obligatori treballar en campana amb extracció de gasos. Se li afegeix 0,05 mL de la Fenol 80%. Molt ràpidament, s'addicionen 5 ml d'H₂SO₄ concentrat.

Es rosquen els tubs amb molt de compte, ja que la reacció produïda es exotèrmica i hi ha risc de cremades. Es deixa incubar durant 10 min. Passats els 10 min d'incubació, es vortexen els tubs i s'incuben 20 min més a 28°C.

Passats els 20 min de la segona incubació, es tornen a vortexar per homogeneïtzar la mescla i es transvasa el volum de cada mostra a una cubeta de plàstic per mesurar l'absorbància de les mostres amb l'ajut d'un espectrofotòmetre, a $\lambda=490\text{nm}$.

Com que per aquest anàlisi es mesuren mostres biològiques que poden contenir diferents concentracions de polisacàrids, es recomanable fer dilucions de les mateixes, per tal que els valors obtinguts entrin dins els marges de la recta patró preparada (vegeu Figura A.2 Annex 1).

3.8. Comparació de dos reactors discontinus seqüencials amb diferents fonts de carboni.

S'ha realitzat la presa de mostres de dos SBR més del grup de recerca Bio-GLS alimentats amb diferents fonts de carboni que es trobaven en condicions operacionals semblants, aquestes condicions es mostres a la Taula 6.

Taula 6: Condicions operacionals dels dos SBR del grup de recerca Bio-GLS amb diferent font de carboni. Elaboració pròpia.

SBR àcids grassos de cadena llarga	Temps (min)	SBR glicerol	Temps (min)
Fase anaeròbia	120	Fase anaeròbia	120
Fase aeròbia	220	Fase aeròbia	230
Sedimentació	15	Sedimentació	3
Buidatge	5	Buidatge	7
Total cicle	360	Total cicle	360

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

Els compostos analitzats durant els cicles d'aquests dos reactors han estat: SSV, SST, $P-PO_4^{-3}$, glicerol, PHA i EPS.

En aquests reactor no s'ha mesurat $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ degut a que en l'efluent d'entrada es posa Allylthiourea (ATU) per inhibir la nitrificació, tot i que hi ha amoni en l'aigua, perquè tots els microorganismes en fan servir petites quantitats pel creixement i pel manteniment cel·lular.

4. Resultats i Discussió.

En una primera part d'aquest projecte s'ha determinat de la producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes, sota diferents condicions operacionals (vegeu apartat 3.4) i s'ha realitzat el monitoratge d'un SBR amb biomassa procedent del tractament d'un aigua residual de la indústria làctia que elimina simultàniament matèria orgànica i fòsfor. Aquesta biomassa prové d'un EBPR-RCTA del grup de recerca Bio-GLS, del departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

En una segona part del projecte s'ha comparat el grau d'acumulació d'aquests biopolímers amb diferents fonts de carboni, glicerol i àcids grassos de cadena llarga, de dos SBRs addicionals del mateix grup de recerca Bio-GLS.

S'ha observat l'activitat dels microorganismes a través del monitoratge de fòsfor i DQO, també s'han mesurat altres paràmetres que garanteixen una correcta depuració de l'aigua residual (vegeu apartat 3.3).

Per el contingut de PHA, s'han determinat els continguts P(3HB) i P(3HV), com s'ha esmentat anteriorment, ja que aquests biopolímers tenen un elevat interès comercial. En el cas dels EPS, la seva determinació s'ha realitzat a través de l'anàlisi de proteïnes (PN) i polisacàrids (PS), i s'ha valorat també el contingut de PS front PN.

4.1. Posada en marxa d'un SBR per la producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes: Estat estacionari.

Pel desenvolupament d'aquest projecte s'ha posat en marxa un SBR sotmès a diferents condicions operacionals (vegeu apartat 3.4) per analitzar el contingut de PHA i EPS. Per a la determinació dels biopolímers s'ha deixat passar un TRC per assolir l'estat estacionari i deixar adaptar-se als microorganismes [Pijuan *et al.*, 2004] a les noves condicions del sistema, degut a que provenien d'un reactor operant en continu (EBPR-RCTA).

A la Figura 7 es mostra l'arribada a l'estat estacionari dels paràmetres de control al voltant dels 16 dies de la inoculació del reactor, això es degut a que les condicions establertes en el nou SBR han estat el més semblants possibles pel que fa a l'aliment i a les proporcions del

temps entre les fases anaeròbia / aeròbia [Guerrero *et al.*, 2011] per evitar sotmetre a la biomassa a canvis molt sobtats abans d'adaptar-se a les noves condicions del SBR.

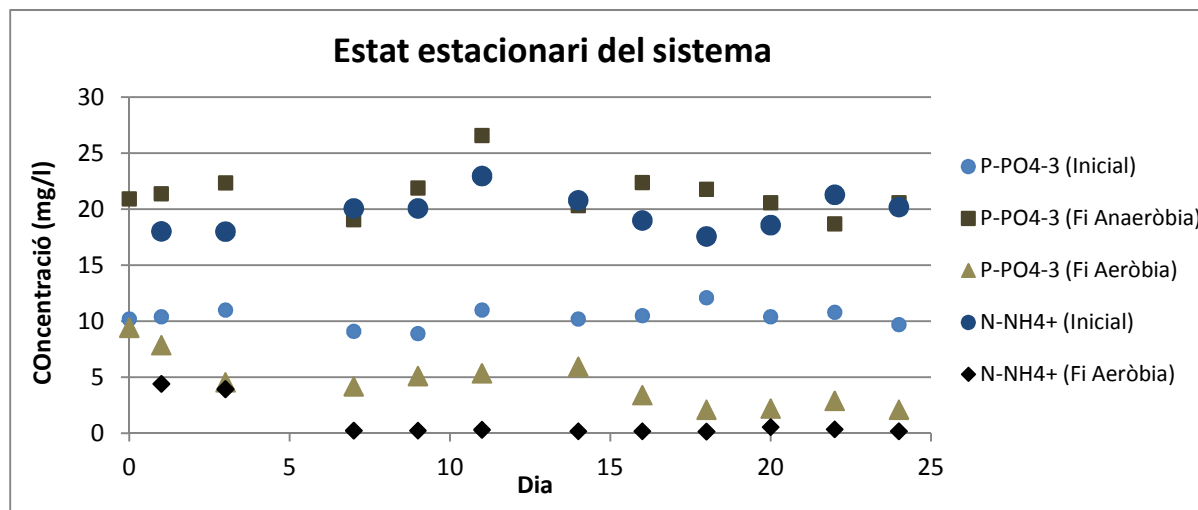


Figura 7: Representació de l'estat estacionari assolit als 16 dies de la posta en marxa del sistema. Elaboració pròpia

També s'observa en la Figura 7 l'activitat metabòlica i la capacitat de depuració dels microorganismes. Observant els valors de fòsfor, es veu com el valor inicial esta al voltant dels 10 mg/l, al final de la fase anaeròbia aquest es situa al voltant dels 22 mg/l, per tant, els PAO estan augmentant la concentració de fòsfor a dintre el reactor degut a la seva activitat metabòlica (vegeu apartat 1.4.1), però al finalitzar la fase aeròbia s'observa com la concentració de fòsfor a disminuït al voltant dels 2,5 mg/l, això indica que també hi ha eliminació de fòsfor. El mateix s'observa amb l'amoní on la seva concentració inicial esta al voltant dels 20 mg/l i al finalitzar el cicle dona valors propers als 0 mg/l.

4.2. Resultats de la producció de PHA/EPS en un SBR amb cultius bacterians mixtes.

La primera condició a la que s'ha sotmès a la biomassa es correspon amb el control de 10 mg/l de $P-PO_4^{-3}$, degut a que és la més semblant al funcionament original. La segona condició triada, es basa en la limitació de fòsfor com a nutrient [Punrattanasin *et al.*, 2006], baixant la concentració de l'efluent d'entrada a 4mg/l de $P-PO_4^{-3}$. La tercera i última condició triada per l'acumulació de biopolímers, s'ha basat en variar la proporció de *feast-famine* augmentant la proporció de la fase aeròbia (que correspon a la fase de fam) disminuint el temps emprat en la fase de sedimentació, però mantenint el temps de la fase

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

anaeròbia (*feast*) en les mateixes condicions [Guerrero *et al.*, 2012; Punrattanasin *et al.*, 2006].

La correlació de les diferents condicions establertes i l'acumulació de biopolímers en cadascuna d'elles, s'ha representat, tant per als PHA com per als EPS, segons el contingut de biopolímers a la biomassa (%) en les dues fases AN / AE (Figura 8 i 13) (A les Taules A.4, A.5 i A.6 annex 1, es mostren les dades obtingudes dels biopolímers en les 3 condicions operacionals).

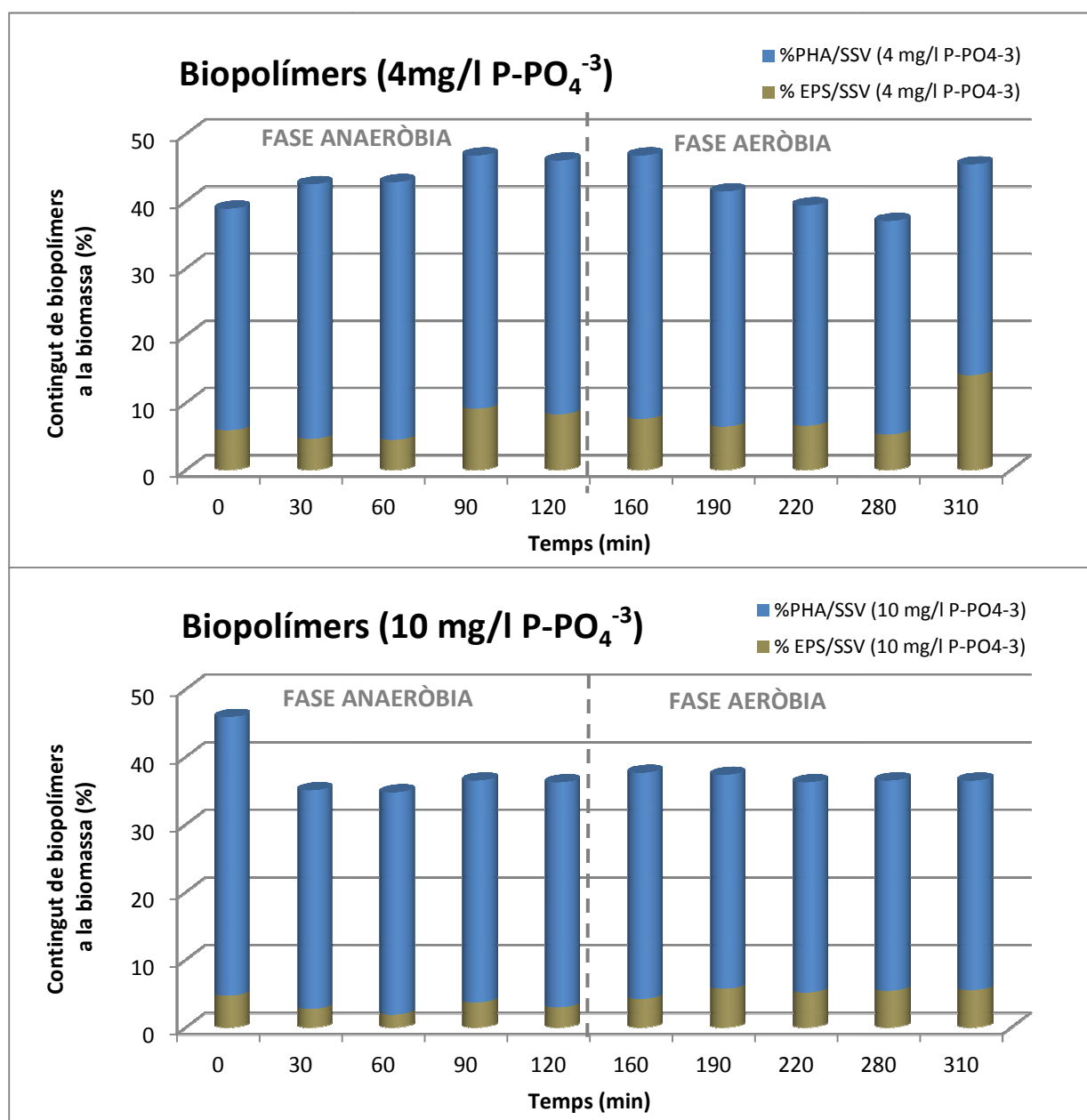


Figura 8: Contingut de biopolímers a la biomassa sotmesa a diferents concentracions de fòsfor a l'efluent d'entrada. Elaboració pròpia.

El l'estudi realitzat per determinar quin tipus de biomassa tenia més potencial a acumular biopolímers [Penalva, 2013], es va determinar que la biomassa procedent del EBPR-RCTA del grup de recerca Bio-GLS, era la que més acumulació de biopolímers presentava, situant-se en un valor del 50% de contingut de biopolímers a la biomassa. Amb aquesta biomassa s'ha inoculat el SBR per la producció de biopolímers sota la condició inicial com a control de 10 mg/l. Passats els dos TRC, esmentat anteriorment, en realitzar el primer cicle s'observa com el contingut de biopolímers ha disminuït al 40% al final de la fase AN respecte l'anàlisi realitzat en el cribatge [Penalva, 2013], on era del 50%. Aquest fet resulta de modificar el sistema al passar d'un RCTA a un SBR [Pijuan *et al.*, 2004].

Tot i la disminució esmentada, s'observa una tendència ha acumular PHAs en la fase AN, tant en la condició de 10 mg/l com en la de 4 mg/l, això es degut a l'activitat metabòlica dels PAO que en la fase AN acumulen PHAs com a font de carboni i energia. En canvi els EPS, s'observa una disminució a l'inici de la fase AN i un posterior augment al final de les fases AN i AE. Els EPS estan influenciats per la disponibilitat d'oxigen. En condicions AN l'acumulació se'n veu desafavorida podent arribar a desintegrar-se la unió del biofilm per desintegració dels flòculs bacterians que pot ser causada per la hidròlisi dels EPSs [Sheng *et al.*, 2010]. A més, el substrat utilitzat també influeix en la l'acumulació dels EPS la qual, es veu afavorida quan són alimentats amb derivats de sucres com ara sucrosa, en aquest cas, com s'ha explicat en l'apartat 1.4.3 [Miqueleto *et al.*, 2010; Taula 4.].

D'altra banda, també s'observa que l'acumulació de biopolímers és lleugerament superior amb la condició de 4 mg/l que no pas en la de 10 mg/l durant tot el cicle, però amb l'excepció dels valors inicials a la fase AN i als valors finals de la fase AE on s'observa més acumulació de biopolímers a la condició 1 (10 mg/l). Aquests resultats es contradiuen amb els presentats per Punrattanasin (2006), on obtenia un contingut a la biomassa de PHAs del 62% en condicions AN / AE amb limitació de fòsfor.

Per tant, es confirma que l'acumulació de PHA es veu afavorida en condicions AN, ja que en condicions AE disminueix el seu contingut a la biomassa degut al consum que realitzen els PAO, que n'utilitzen com a font de carboni i energia. Pel que fa als EPS, es confirma que hi ha més acumulació sota condicions AE que no pas AN.

Pel que fa a l'acumulació de PHAs, tant de PHB com de PHV (Figura 9), en el cicle del control s'han obtingut els valors de 26% mg PHB/mg SSV i 7% mg PHV/mg SSV. Per el cicle de 4 mg/l de $P-PO_4^{-3}$ s'han obtingut els valors de 28% mg PHB/mg SSV i 10% mg PHV/mg SSV. Aquest resultats tenen certa semblança amb l'estudi realitzat per Pijuan *et al.*, 2009 on comparava l'acumulació de PHAs segons la font de carboni utilitzada, acetat i propionat. Van obtenir resultats de major acumulació de PHB (70-90%) respecte el PHV (10-30%) amb l'ús d'acetat, al contrari que amb l'ús de propionat: acumulació de PHB de 3-6%, i acumulació de PHV entre 53-97%.

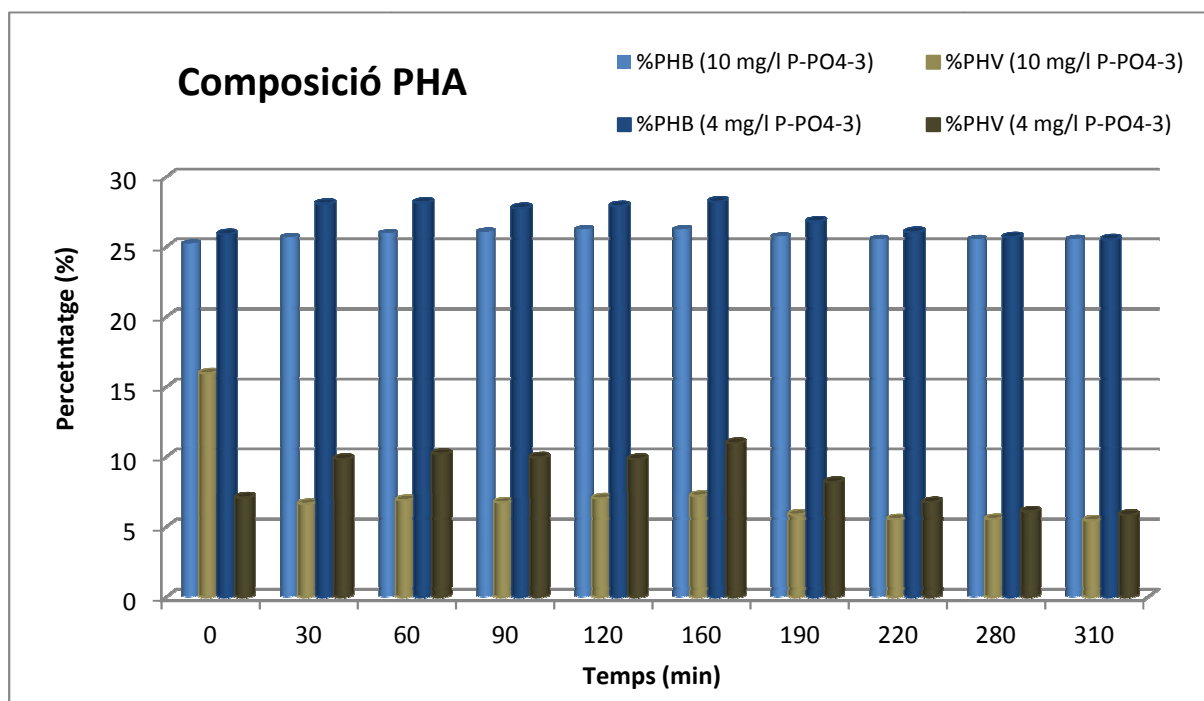


Figura 9: Acumulació de PHB i PHV en el cicle control (10 mg/l $P-PO_4^{-3}$) i en la limitació de nutrients (4 mg/l $P-PO_4^{-3}$). Elaboració pròpia.

L'acumulació de PN i PS, s'obtenen valors més elevats en la condició control arribant a valors del 11% de PS i 2'5% de PN, mentre que la condició amb limitació de fòsfor els valors de PS es situen sobre al 4'6% i de PN 1'5%.

Per tant, en general hi ha mes acumulació de biopolímers a la condició de 4 ppm, però amb menys quantitat d'EPS.

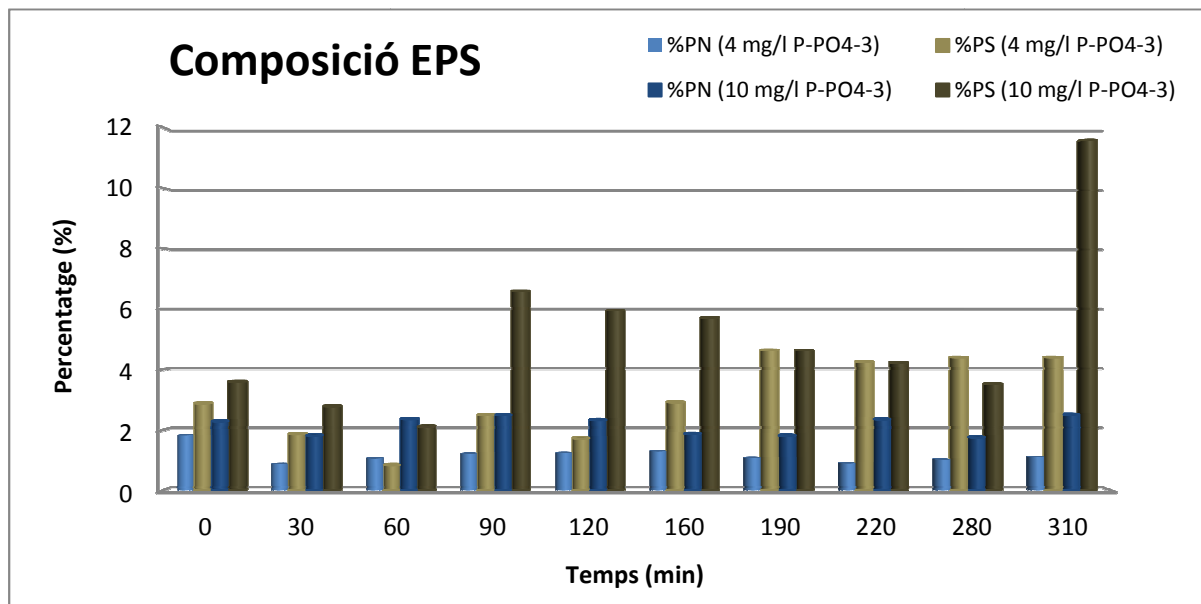


Figura 10: Acumulació de PN i PS en el cicle control (10 mg/l P-PO₄⁻³) i en la limitació de nutrients (4 mg/l P-PO₄⁻³). Elaboració pròpia.

S'ha valorat la proporció de PHV/PHB i de PS/PN a cada cicle, per veure com afecten les condicions operacionals, tant pel que fa a les variacions de fòsfor com als canvis de *feast-famine*, a les proporcions dels compostos analitzats. (Figures 11 i 12).

Pel que fa a les proporcions de PHV/PHB, en les condicions de 10 i 4 mg/l de P-PO₄⁻³ els valors obtinguts han estat de 0,28 i 0,33 mg PHV/mg PHB respectivament. Aquest valors són inferiors als obtinguts en les condicions originals de la biomassa amb un valor de 3 mg PHV/mg PHB [Penalva, 2013], però força similars als de Pijuan *et al.*,(2009) (0,14-0,33 mg PHV/mg PHB).

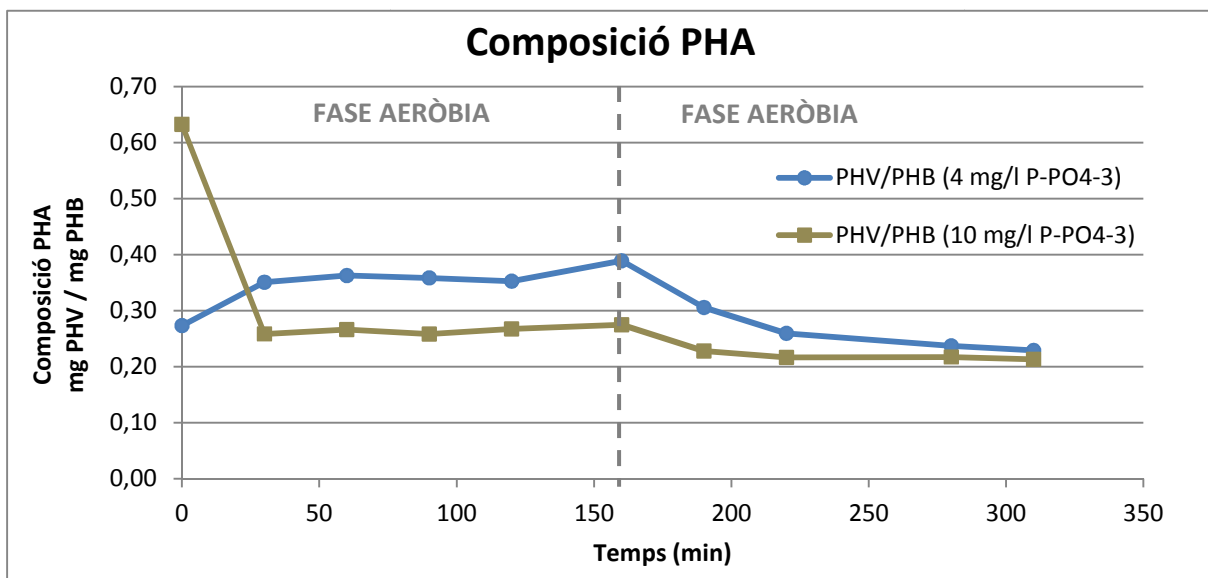


Figura 11: Composició de PHA segons el contingut de PHB respecte PHV. Elaboració pròpia.

L'acumulació de PS respecte la de PN segueix la tendència d'acumulació durant tot el cicle amb un augment més elevat en la fase aeròbia. A la condició de 4 mg/l de $P-PO_4^{-3}$ arriba a un màxim de 4,6 mg de PS/mg de PN, mentre que no passa el mateix a la condició de 10 mg/l de $P-PO_4^{-3}$. Això pot ser degut a que els microorganismes no es troben sota cap situació d'estrès o manca de fòsfor a la condició de 10 mg/l de $P-PO_4^{-3}$, i no acumulen tant contingut d'EPSs per a protegir-se de possibles adversitats.

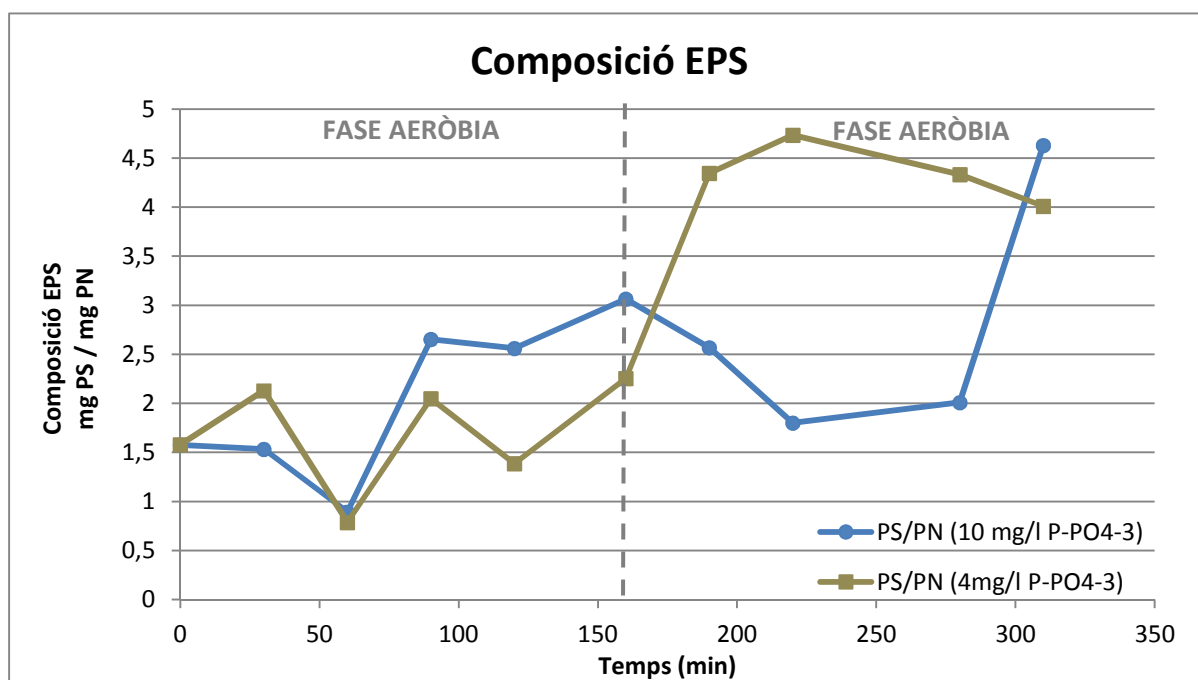


Figura 12: Composició d'EPS segons el contingut de PS respecte PN. Elaboració pròpia.

A l'última condició (Figura 13) basada en la variació de les proporcions de *feast-famine*, s'observa una gran disminució en el percentatge del contingut de biopolímers en la biomassa situant-se entre el 4,5% i 8%. Tot i això s'observa com la proporció de PHA i EPS es manté, sent el contingut de PHAs majoritari front al d'EPSs.

Tot i la gran davallada en el % del contingut de biopolímers a la biomassa, s'observa que la tendència acumular-se durant la fase AN es manté, al mateix que la disminució a la fase AE.

Alguns estudis mostren com a la fase AE hi pot haver acumulacions importants de biopolímers, és el cas de Punrattanasin *et al.*, (2006), va presentar que s'obtenia una major acumulació de biopolímers en condicions completament AE i sota la limitació d'ambdós nutrients, fòsfor i nitrogen, però amb un excés de carboni.

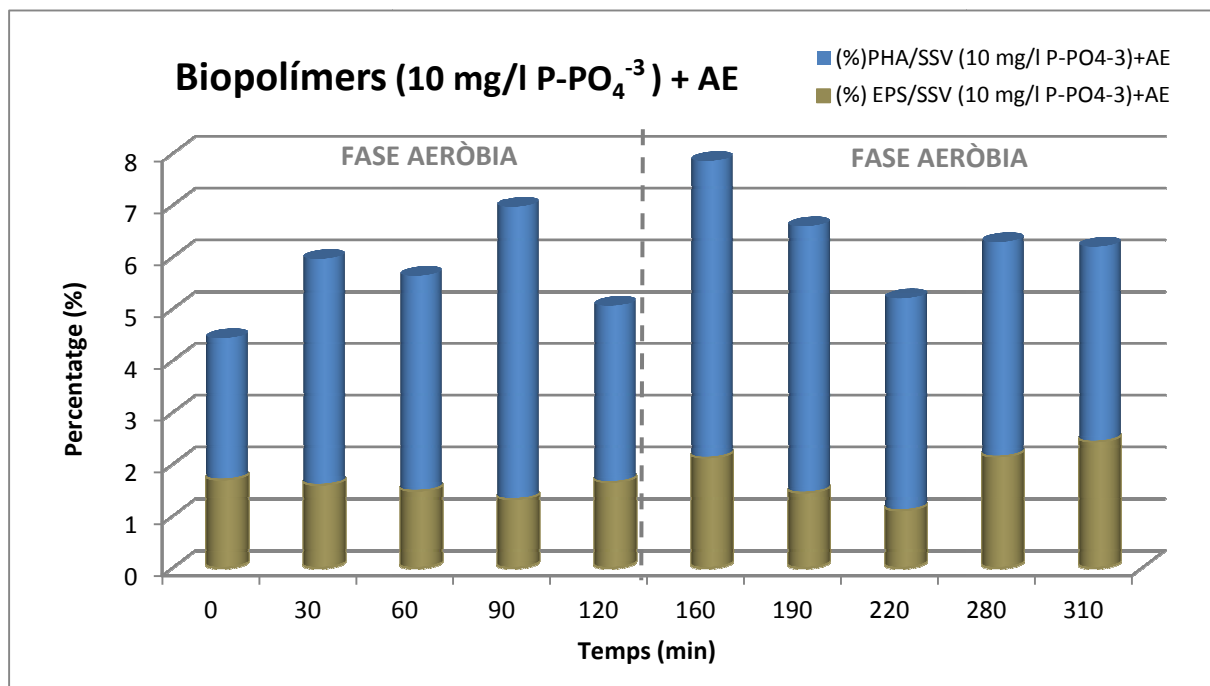


Figura 13: Contingut de PHA i EPS a la biomassa amb 10 mg/l de P-PO4-3 i un augment del temps en la fase aeròbia. Elaboració pròpia.

Tampoc s'ha operat amb condicions completament AE, degut a que es requereix una fase AN per que els PAO desenvolupin la seva doble funció metabòlica, per una banda l'acumulació de biopolímers i per l'altre l'eliminació simultània de fòsfor, degut a que l'objectiu no només és la producció de PHA i EPS, sinó que alhora també es pretén reduir la càrrega de contaminants presents en l'aigua residual, en aquest cas P i DQO (Figura 14-15).

Aquest resultat ha sorprès degut a la gran diferència que hi ha entre els cicles. Revisant les condicions operacionals i el monitoratge del SBR, s'ha trobat que durant el transcurs del funcionament no s'ha realitzat cap purga. Això s'explica degut als problemes tècnics amb l'equip que mesurava el TOC, els valors no han estat gaire fiables per un mal funcionament de l'aparell la qual cosa ha afectat als resultats en el càlcul del cabal de purga del sistema.

Les conseqüències de no realitzar cap purga al llarg del temps són que s'obté una població envellida de microorganismes degut a que no es deixa espai pel creixement de biomassa nova. Això explica la disminució de l'activitat metabòlica dels microorganismes en la producció de biopolímers, però també la poca eficiència en la eliminació de fòsfor a finals del monitoratge (Figura 14).

Rodrigo *et al.*, (1999) va estudiar aquest envelliment de la població de microorganismes i va observar com TRCs superiors als 9-11 dies afavorien la proliferació dels GAO, aquest organismes són competidors dels PAO i afecten a la seva activitat i capacitat depurativa del fòsfor [Bond *et al.*, 1995], es per això que es creu que el funcionament del SBR ha fomentat la proliferació d'aquests tipus de microorganismes.

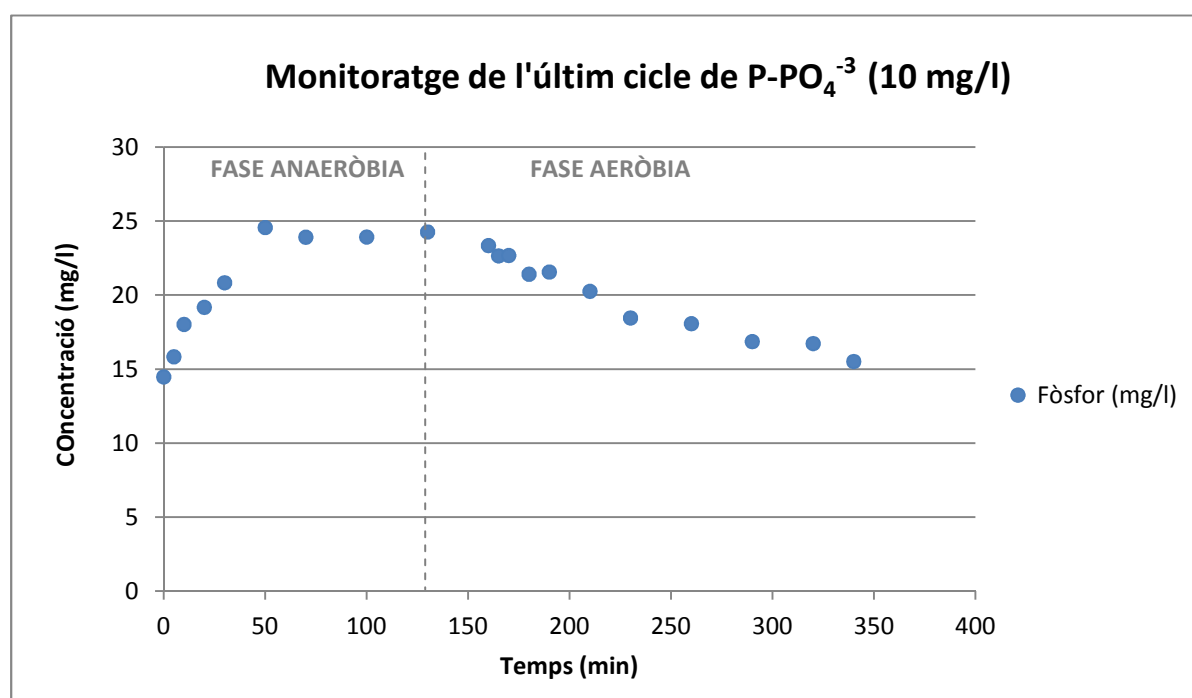


Figura 14: Representació de la concentració de fòsfor al llarg de l'últim cicle. Condicions operacional: 10 mg/l i augment del temps en la fase aeròbia. Elaboració pròpia.

En la Figura 14 s'observa com el fòsfor augmenta durant la fase AN i disminueix durant la fase AE. El problema és que aquesta disminució en la fase AE hauria de ser major perquè hi hagués eliminació de fòsfor. La poca eficiència que representa aquesta figura sobre la capacitat depuradora dels PAO pot ser explicada per la presència de GAO, com s'ha esmentat anteriorment.

En canvi, pel que fa al consum de carboni, la presència de GAO no afecta als PAO, ja que tots dos requereixen d'una font de carboni per desenvolupar la seva activitat metabòlica (vegeu apartat 1.4.1). Això s'observa en el Gràfic 7, on hi ha un clar consum de carboni al començament del cicle on s'elimina pràcticament tota la DQO.

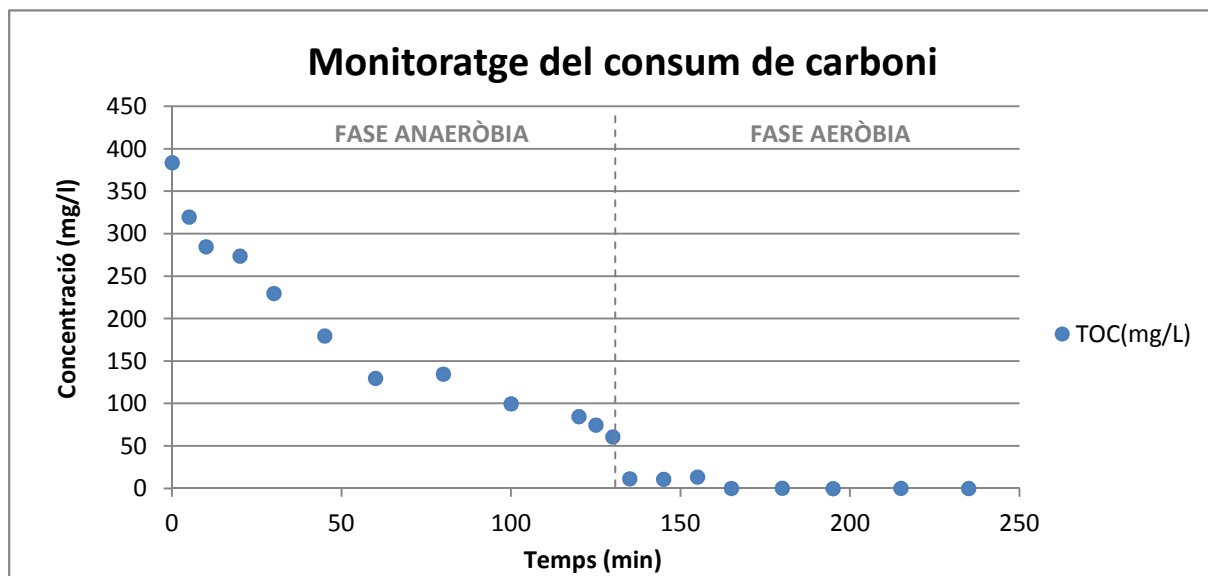


Figura 15: Representació de la concentració de carboni orgànic total (TOC) al llarg de l'últim cicle. Condicions operacional: 10 mg/l i augment de la fase aeròbia. Elaboració pròpia.

4.3. Resultats de la comparació de dos reactors discontinus seqüencials alimentats amb diferents fonts de carboni.

En aquests apartat s'ha analitzat l'acumulació de biopolímers en funció de la font de carboni utilitzada. Els SBRs s'han alimentat amb glicerol i àcids grassos de cadena llarga (AGCL), les condicions operacionals s'especifiquen en l'apartat 3.8.

Segons la Figura 16 i la Figura 17, sembla que el tipus de font de carboni utilitzat en cada SBR té una gran influència en l'acumulació de biopolímers. Això és cert, però si s'analitza el comportament general i la tendència d'acumulació dels dos SBR, es pot veure com el tipus de font de carboni utilitzada no afecta tant a l'activitat metabòlica dels microorganismes degut a que segueixen patrons força semblants, és a dir, per una part, si s'analitza el SBR alimentat amb glicerol s'observa com la tendència que segueix és la d'acumular els PHAs al final de la fase AN, això mostra el comportament del metabolisme dels PAO, els quals acumulen PHA durant la fase AN i el consumeixen durant la fase AE, fent que el seu valor màxim d'acumulació es situï al final de la fase AN i el mínim al final de la fase AE. Per l'altre part, si s'analitza el SBR alimentat amb AGCLL, s'observa també una lleugera acumulació durant la fase AN i una disminució a la fase AE, és cert que aquest patró s'observa amb més claredat al SBR alimentat amb glicerol, però això també confirma que el tipus de font de carboni que s'utilitza té una influència directa en el comportament dels microorganismes i la

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

seva activitat metabòlica. Un altre punt interessant, és el grau de degradació dels AGCLL, aquest són més difícils de degradar per els microorganismes, fet que explicaria el perquè hi ha un consum més lent i per això una acumulació menor de biopolímers.

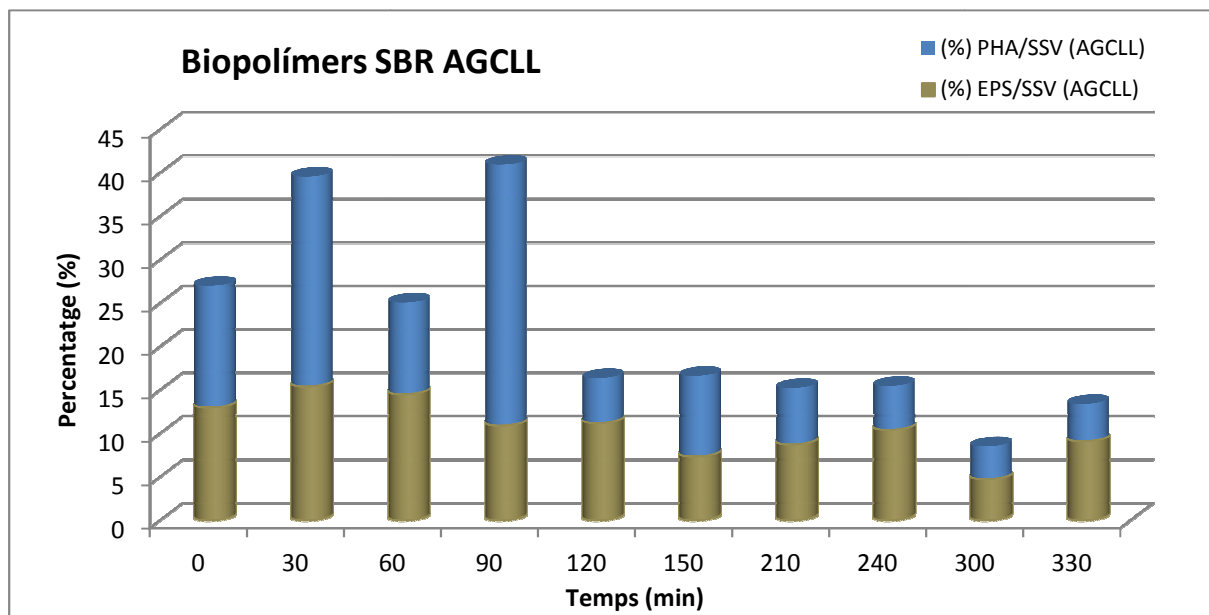


Figura 16: Contingut de biopolímers a la biomassa (%) en un SBR alimentat amb àcids grassos de cadena llarga. Elaboració pròpia.

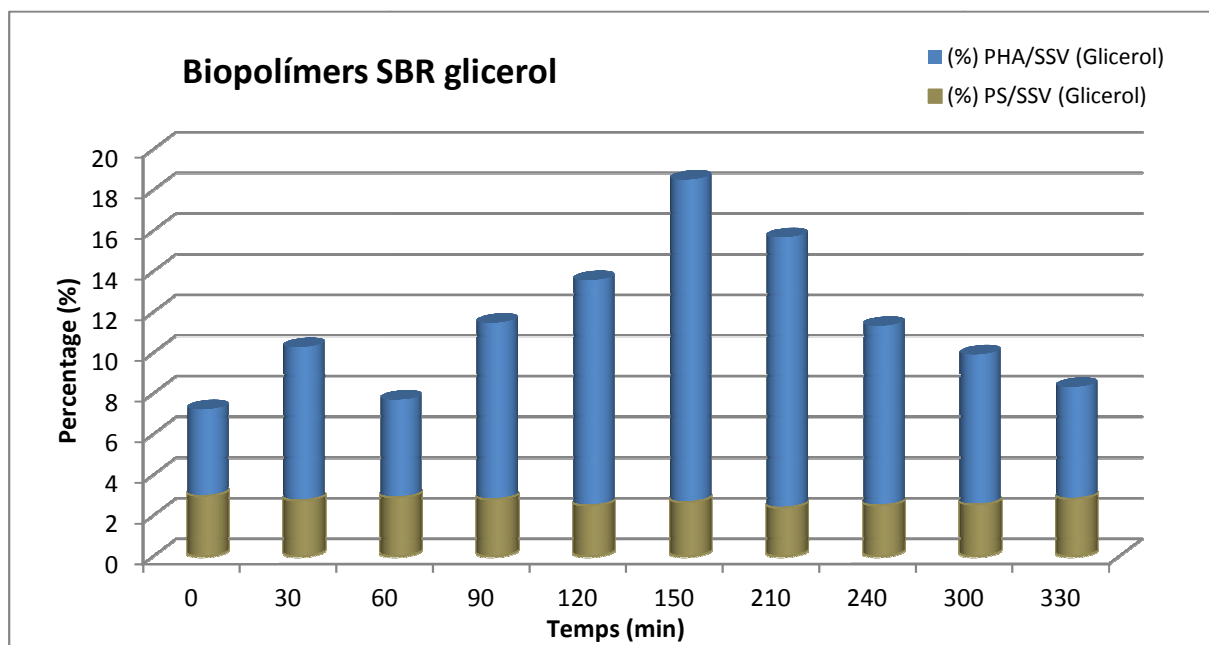


Figura 17: Contingut de biopolímers a la biomassa (%) en un SBR alimentat amb glicerol. Elaboració pròpia.

Diversos investigadors han analitzat l'acumulació de PHAs en funció de la font de carboni utilitzada. Guerrero *et al.*, (2012), van determinar l'acumulació de PHAs amb l'ús del glicerol

generat en excés durant el procés de producció del biodiesel com a font de carboni per a un sistema EBPR, i el van comparar amb l'acumulació de PHAs a partir de microorganismes PAO enriquits amb propionat. Guerrero *et al.*, (2012) van obtenir resultats d'acumulació del 25% en PHB i 45% en PHV amb els microorganismes alimentats amb glicerol. En el cas de l'alimentació amb propionat, es van obtenir resultats d'acumulació de 8% en PHB i 35% en PHV.

D'altra banda, Pijuan *et al.*, (2009) es va centrar en la utilització d'AGV com a font de carboni, acetat i propionat. Van obtenir resultats de major acumulació de PHB (70-90%) respecte el PHV (10-30%) amb l'ús d'acetat, al contrari que amb l'ús de propionat: acumulació de PHB de 3-6%, i acumulació de PHV entre 53-97%. (vegeu apartat anterior).

Els valors obtinguts del contingut de PHB respecte PHV (Figura 18), en ambdós SBRs han estat al contrari del que s'ha obtingut en el SBR alimentat amb efluents de la indústria làctica. En aquest cas l'acumulació ha sigut major en el cas de PHV respecte PHB, aquest resultat s'ha semblen als trobats per Guerrero *et al.*, (2012) esmentats anteriorment.

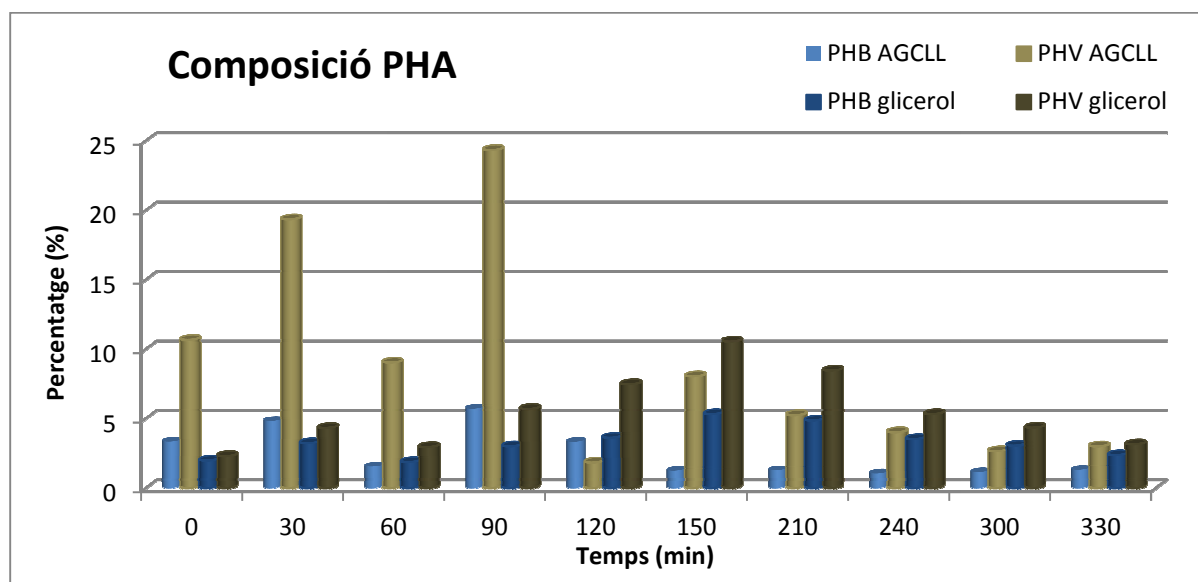


Figura 18: Acumulació de PHB respecte PHV en els dos SBR del grup de recerca Bio-GLS. Elaboració pròpia.

Pel que fa a l'acumulació de EPSs (Figura 19), només s'ha pogut valorar l'acumulació de PS degut a que la concentració de PN en el reactor alimentat amb AGCLL era molt baixa quedant fora del rang de treball, per tant fora de la linealitat. Però, si només s'observen els

resultats de PS obtinguts, es veu un percentatge més elevat en el reactor alimentat amb glicerol, arribant a valors de gairebé 11% i el SBR alimentat amb AGCLL arriba a un valor màxim de 2,5% , mentre que el reactor de alimentat amb l'efluent de la indústria làctica també arriba a valors del 11%.

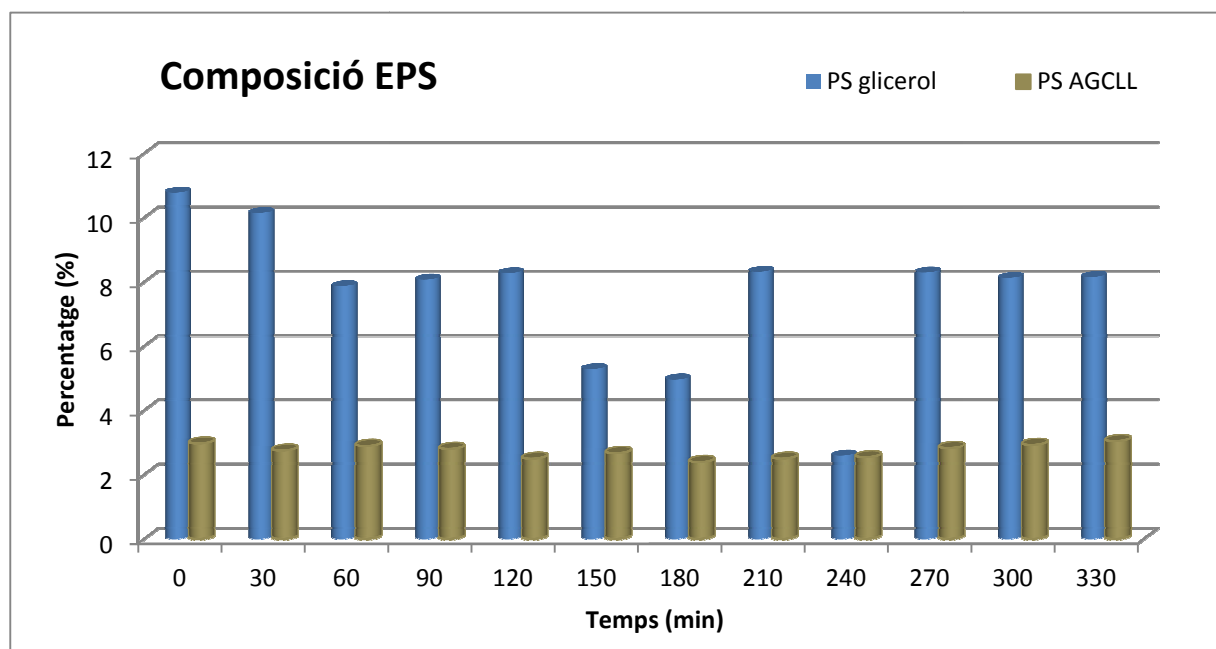


Figura 19: Acumulació de PS en els dos SBR del grup de recerca Bio-GLS. Elaboració pròpia.

En aquests dos casos, la tendència al llarg del cicle en l'acumulació d'EPS arriba a una estabilitat al finalitzar la fase AN i es manté durant la fase AE, això pot ser degut a que no es trobin en situació d'estrés per dèficit de nutrients, degut a que tots dos reactors tenen una concentració de $P-PO_4^{-3}$ a l'efluent d'entrada de 15 ppm.

5. Conclusions

La disminució del contingut de biopolímers a la biomassa, reflectida en la condició 1 o "control" de 10 mg/l P-PO₄⁻³, comparada amb la condició 2 de 4 mg/l P-PO₄⁻³, certifiquen que l'acumulació de biopolímers amb cultius bacterians mixtes amb dèficit de nutrients és lleugerament superior degut a que els microorganismes es troben en situació d'estrès.

Pel que fa al contingut de la biomassa en la condició 3 de 10 mg/l P-PO₄⁻³ i augment de la fase aeròbia o *famine*, no es pot acabar de concloure degut als problemes tècnics ocasionats amb la mesura del TOC ja que han impossibilitat els càlculs del cabal de purga i el manteniment del TRC per garantir l'eficiència i el bon funcionament del sistema.

En la comparació dels dos SBR alimentats amb diferents fonts de carboni, s'ha vist clarament com el tipus de substrat té una efecte directe sobre l'acumulació de biopolímers i en l'activitat metabòlica dels microorganismes, obtenint millors resultats amb els AGCLL com a font de carboni.

També s'ha observat com al mateix temps que acumulaven aquests compostos, els microorganismes desenvolupaven la seva tasca de depurar l'aigua residual, obtenint al final del cicle una aigua amb un baix contingut en matèria orgànica i altres contaminants com amoni i fòsfor, en aquest cas.

6. Llistat d'Acrònims

AE	Aeròbia.	PAO	Phosphorus Accumulating Organisms / Organismes acumuladors de fòsfor.
AGV	Àcids grassos volàtils.	PBE	Pèrdua de biomassa a l'efluent.
AN	Anaeròbia.	PHA	Polihidroxialcanoat.
DQO	Demanda Química d'Oxigen.	PHB	Polihidroxibutirat.
EBPR	Enhanced Biological Phosphorus Removal / Eliminació biològica de fòsfor.	PHV	Polihidroxivalerat.
EPS	Substàncies polimèriques extracel·lulars.	PN	Proteïnes.
FID	Flame ionization detector/ Detector d'ionització de flama.	PNB	Producció de biomassa nova.
GAO	Glicogen Accumulating Organisms/ Organismes acumuladors de glicogen.	PS	Polisacàrids.
GC	Cromatografia de gasos .	RCTA	Reactor continu de tanc agitat.
IC	Cromatografia Iònica.	SBR	Sequencing Batch Reactor/ Reactor discontinu seqüencial.
MAA	Microaerofilic aeròbia.	scl	Carboni de cadena curta.
mcl	Carboni de cadena mitja.	SST	Sòlid en Suspensió Totals.
		SSV	Sòlids en Suspensió Volàtils.
		TRC	Temps de residència cel·lular.
		TRS	Temps de retenció de sòlids.

TOC Total organic carbon / Carboni orgànic total.

7. Bibliografia.

Articles científics

Adav, S.S *et al.* (2011). *Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from phenol degrading aerobic granules.* Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42: 645–651.

Albuquerque, M.G.E. *et al.* (2011). *Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties.* Journal of Biotechnology 151 (2011) 66–76.

Artigues, Agramunt Anna. (2008): *Eliminació simultània de fòsfor i nitrogen en aigües residuals utilitzant microorganismes DPAO en un reactor discontinu seqüencial (SBR).* Projecte final de carrera, Universitat Autònoma de Barcelona

Bond *et al.* (1995). *Bacterial community structures of phosphate removing and non phosphate removing activated sludges from sequencing batch reactors.* Appl Environ Microbiol; 61:1910-1916.

Charalacklis, W.G. *et al.* (1989). *Structure and fuction of biofilms.* Wiley, Chichester, 369-371.

Chen, G-Q. *et al.* (2009). *A microbial PHA based bio- and materials industrial.* Chemical Society Reviews, 38: 2434-2446.

Dias *et al.* (2006). *Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product.* Macromolecular Bioscience, 6: 885-906.

Dubois, M. *et al.* (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.* Analytical Chemistry, 28, 350-356.

Flemming *et al.*, (2011). *Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens*. International Journal of Hygiene and Environmental Health 214 (2011) 417– 423.

Freitas, F. *et al.* (2011). *Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications*. Trends in Biotechnology, Vol. 29, No. 8.

Gessey, G.G. *et al.* (1982). *Microbial exopolymers: ecological and economic considerations*. ASM News, 48:9-14.

Gerhardt *et al.* (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM, Washington DC, p 518.

Guerrero, J. *et al.* (2011). *The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal*. Water Research, 45: 4793-802.

Guerrero, J. *et al.* (2012). *Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal*. Water Research, 46: 2983-2991.

Jacquel, N. *et al.* (2008). *Isolation and purification of bacterial PHAs*. Biochemical Engineering Journal, 39: 15-27.

Jang, N. *et al.* (2007). *Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse*. Desalination, 202: 90-98.

Keshavarz, T. *et al.* (2010). *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. Current Opinion in Microbiology, 13: 321-326.

Keshavarz, T. *et al.* (2010). *Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda*. Current Opinion in Microbiology, 13: 321-326.

Laycock *et al.*, (2012). *Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV)*. European Polymer Journal 49; 904-913.

Lemos, P.C *et al.* (2006). *Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding.* Journal of Biotechnology, 122: 226-238.

Li, Y. *et al.* (2003). *Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge.* Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 33: 237-73.

Li, Y. *et al.* (2011). *Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review.* Biotechnology Advances 28 (2010) 882–894.

Liu *et al.* (1996). *Biological phosphorus removal processes. Effect of phosphorus on anaerobic substrate metabolism.* Water Sci Technol. 30.25-32.

Majone, M. *et al.* (1996). *Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking.* Water Science and Technology, 34: 223–232.

Miqueleto, A.P. *et al.* (2010). *Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment.* Bioresource Technology, 101: 1324-1330.

Nielsen, H., Jahn, A.. *Extraction of EPS.* . Wingender J., Neu, T.R., Fleming H.-C, (editors) en *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*, Berlin: Springer, 1999, pp. 49-72.

Penalva, Rojas. Cristina (2013). *Estudi del potencial d'acumulació de biopolímers a partir de biomassa procedent de diferents tractaments d'aigües residuals.* Projecte final de carrera, Universitat Autònoma de Barcelona.

Philip *et al.* (2007). *Review Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82:233-247.

Pijuan, M. *et al.* (2004). *Response of an EBPR population developed in an SBR with propionate to different carbon sources.* Water Science and Technology, 10: 131-138.

Pijuan, M. *et al.* (2009). *Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities*. *Process Biochemistry* 44: 97-105.

Priester, J.H. *et al.* (2006). *Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in Pseudomonas putida unsaturated biofilms*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1988-96.

Reddy, CSK. *et al.* (2003). *Polyhydroxyalkanoates: an overview*. *Bioresource Technology*, 87: 137-146.

Rodrigo, M.A. *et al.* (1999). *The effect of sludge age on the deterioration of the enhanced biological phosphorus removal process*. *Environmental Technology*, 20: 1055-1063.

Serafim, L.S. *et al.* (2004). *Optimisation of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions*. *Biotechnology and Bioengineering*, 87: 145-160.

Siracusaa, V. *et al.* (2008). *Biodegradable polymers for food packaging: A review*. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 634-643.

Suchada Chanprateep *et al.*, (2010) *Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates* *Journal of Bioscience and Bioengineering* vol. 110 No. 6, 621–632, 2010.

Sudesh, K. *et al.* (2000). *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*. *Progress in Polymer Science*, 25: 1503-1555.

Sheng, G.P. *et al.* (2010). *Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review*. *Biotechnology Advances*, 28: 882-894.

Y. Gonzalez García *et al.*, (2012). *Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano*. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 77-115, 2013.

Werker, A. *et al.* (2008). *Chlorinated-solvent-free gas chromatographic analysis of biomass containing polyhydroxyalkanoates*. *Water Research*, 42: 2517-2526.

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

Wingender J. *et al.* *What are bacterial Extracellular Polymeric Substances?*, Wingender J., Neu, T.R., Fleming H.-C, (editors) *en Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*, Berlin: Springer, 1999, pp. 1-20.

W. Punrattanasin *et al* (2006). *Aerobic production of activated sludge polyhydrpxyalkanoates from nutrient deficient wastewaters*. *Water Science & Technology*. vol.54; 8 pp 1-8.

7. Pressupost. [adaptat de Artigues. (2008)]

El pressupost d'aquest projecte ascens als **12.458,45 €**

Per a la determinació de les despeses s'han tingut en compte els diferents apartats:

- Material i equips.
- Despesa personal.

No s'ha tingut en compte ni els desplaçaments i dietes, ni la despesa energètica dels diferents aparells.

7.1. Material i equips.

Material i equips	Cost total
Materials d'oficina	55,53
Material de laboratori fungible	1431,70
Material de laboratori amortitzable	1971,22
Total = 3458,45 €	

7.1.1. Material d'oficina.

Material	Unitats	Cost (€/unitat)	Cost total (€)
Llibreta	1	5,00	5,00
Bolígraf	2	1,20	2,40
Retolador permanent	2	1,80	3,60
Paper 100% reciclat DIN-A4 80g. Pack 500 fulls.	1	5,85	5,85
CD-R 700 Mb. 80min.	4	0,85	3,40
Tinta HP 336 negre	1	21,43	21,43
Enquadernació	3	2,95	8,85
Altres			5,00
Total = 55,53 €			

7.1.2. Material de laboratori fungible

Material	Unitats	Cost (€/unitat)	Cost total (€)
----------	---------	-----------------	----------------

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

Vials Eppendorf	150	0,05	7,50
Vials IC	80	0,395	31,60
Taps IC	80	0,163	13,04
Vials GC	64	0,395	25,28
Taps GC	64	0,163	10,43
Cubetes plàstic 1,5 ml	75	0,145	10,87
Tubs Falcon	200	0,120	24,00
Filtres Millipore	300	0,468	140,4
Filtres SST/SSV	150	0,05	7,50
Caixa guants làtex	1	5,66	5,66
Pipetes pasteur vidre	75	0,32	24,00
Pots d'orina	10	0,60	6,00
Kits de DQO	2	75,21	150,42
Altres: (Xeringues, puntes de pipetes, pipetes pasteur)			15,00

Total = 471.70 €

La resta de material fungible que fa referència a tots els productes i reactius químics emprats per el desenvolupament del projecte han assumit un cost aproximat de **960€**, dintre d'aquest valor queda inclòs tot el necessari per dur a terme la preparació de l'aigua sintètica (aliment) i els diferents reactius necessaris (vegeu apartats 3.4 i 3.7) per poder realitzar els diferents anàlisis. Total material fungible $471,70 + 960,00 = 1431,70 \text{ €}$.

7.1.3. Material de laboratori amortitzable

Material	Unitats	Preu adquisició (€)	Vida útil (anys)	Cost (€)
GC	1	37850	10	630,83
CI	1	48791	10	813,18
Planta pilot	1	18172	10	302,87
Nevera/congelador	1	750	10	12,50
Balança	2	1660	10	27,67

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

Micropipetes	3	450/pack (3)	5	15
Sonda de Temperatura	1	62,70	2	5,23
Sonda pH	1	139,2	2	11,60
Sonda d'Oxigen	1	1106,18	2	92,18
Columna gasos	1	750	5	12,50
Espectrofotòmetre	1	2860	10	47,66
Total =				1971.22 €

7.2. Despesa personal.

La despesa personal assignada aquest projecte s'ha calculat de la següent manera:

Preu per hora d'una persona per anàlisi i laboratori 15 €/h

Cost total personal = 15 €/h · 600 h = **9000 €**

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

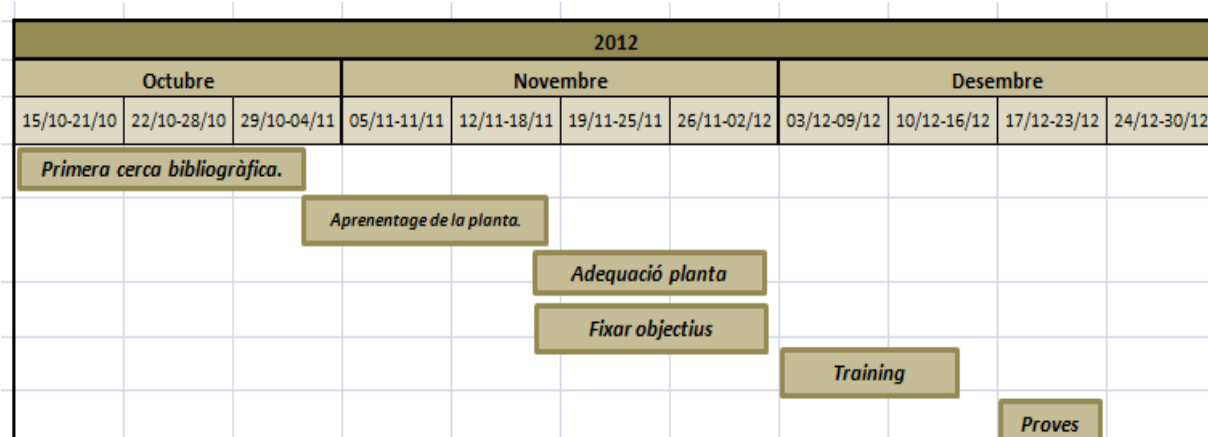
Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

8. Programació.

En aquest apartat es detalla la programació de les diferents tasques que s'han dut a terme per al desenvolupament del projecte. Aquestes es detallen a la Taula 7 i en forma de cronograma.

Taula 7: Tasques programades per el desenvolupament del projecte.

Tasca	Inici	Final	Duració (dies)
Primera recerca bibliogràfica.	15/10/2012	31/10/2012	17
Aprenentatge del funcionament de la planta.	01/11/2012	15/11/2012	15
Adequació de la planta.	15/11/2012	30/11/2012	15
Fixació d'objectius.	15/11/2012	30/11/2012	15
Formació pel funcionament dels equips d'anàlisi.	03/12/2012	14/12/2012	12
Posta en marxa de la planta. (proves de funcionament)	17/12/2012	21/12/2012	5
Laboratori. (Inoculació reactor)	15/01/2013	31/07/2013	198
Segona recerca bibliogràfica.	15/04/2013	30/04/2013	15
Conclusions.	31/07/2013	04/08/2013	5
Redacció memòria.	04/07/2013	14/08/2013	38
Entrega de la memòria.	02/09/2013	02/09/2013	1
Preparació presentació oral.	03/09/2013	10/09/2013	8
Presentació oral.	12/09/2013 o 13/09/2013	12/09/2013 o 13/09/2013	1



Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013

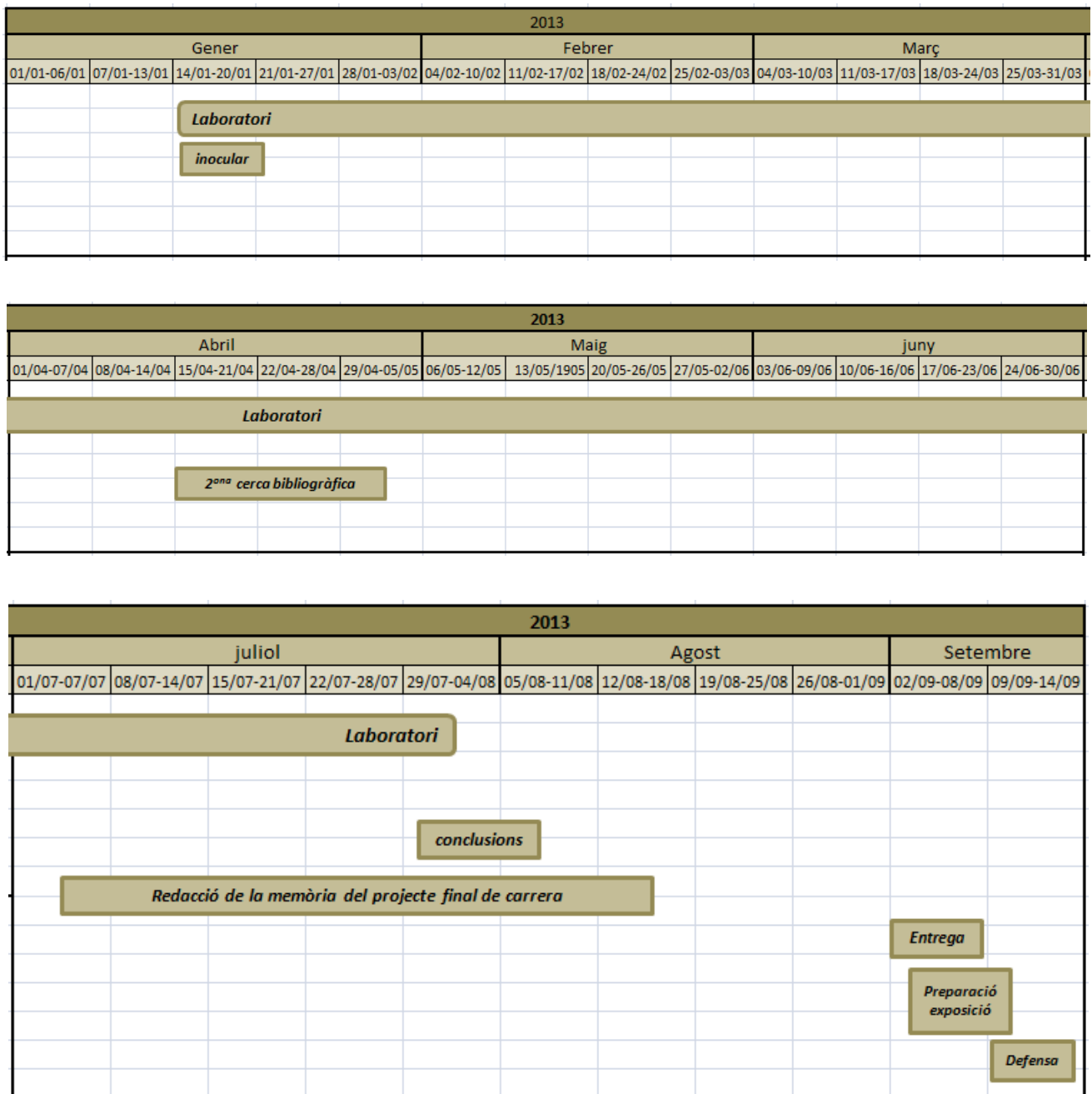


Figura 20: Tasques programades per el desenvolupament del projecte.

Producció de biopolímers amb cultius bacterians mixtes.

Comparació de tres reactors discontinus seqüencials amb diferents condicions operacionals.

Jordi Pérez i Forner, 2 de Setembre de 2013
