

ESTUDI DE LA DEGRADACIÓ ANAERÒBIA DE TRES CONTAMINANTS EMERGENTS: ÀCID CLOFÍBRIC, CARBAMAZEPINA I IBUPROFÈ.

PROJECTE FINAL DE CARRERA DE CIÈNCIES AMBIENTALS
Setembre 2009

AUTOR:
Mauro Rodríguez Rey

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

Departament d'Enginyeria Química

Treball dirigit per: Raquel Barrena i M. Teresa Vicent



“Motivació, la salvació”

Sempre has de buscar un motiu per seguir. Per tots els moments difícils i durs al llarg d'aquests anys. I com no, per totes les bones estones compartides amb els meus companys.

Tot s'acaba, tot arriba al seu fi.

Nota: aquest projecte ha estat imprès en paper lliure de clor elemental per tal de minimitzar l'impacte ambiental. Així mateix, s'adjunta un CD on hi ha una còpia en format digital. S'adjunta també, un article-resum.

AGRAÏMENTS

Sense l'ajuda d'algunes persones, aquest projecte no hauria estat possible.

En primer lloc, estar sincerament agraït a la persona que m'ha donat l'oportunitat a, d'alguna manera, entrar en el Departament d'Enginyeria Química i d'aquesta forma poder realitzar el projecte experimental que desitjava, així com a tutoritzar la recerca i reorientar- quan aquesta no era l'esperada. Moltes gràcies Teresa.

En segon lloc, i no menys important, molt agraït a Raquel Barrena. Gràcies per tantes hores de laboratori ensenyant-me tot el necessari per l'estudi, així com per solucionar els dubtes puntuals que han anat sorgint durant la recerca i animant-me a seguir treballant tot i què els resultats no sempre fossin els esperats. Gràcies per tutoritzar-me tot el treball i dedicar part de les teves vacances al meu projecte.

A Lucía Delgado, per totes les estones explicant-me amb paciència com realitzar certes tasques de laboratori.

A Manuel Plaza, pels *trainings* realitzats per saber fer anar els cromatògrafs.

A Lucia Martín i Ernest Marco, per suportar dubtes puntuals sobre receptes i/o mètodes.

Per últim, agrair al Departament d'Enginyeria Química, en concret al grup de Tòxics i al de compostatge l'oportunitat d'utilitzar tot el material del que disposen, així com les instal·lacions per a dur a terme tota la part experimental d'aquest treball.

Gràcies a tots i totes.

ÍNDIX

1. Introducció	7
1.1. Justificació del treball realitzat i antecedents	7
1.2. Objectius.....	11
2. Fonaments teòrics	13
2.1. Els productes farmacèutics i de cura personal	13
2.2. El procés de digestió anaeròbia.....	14
2.2.1. Etapes de la degradació anaeròbia.....	15
2.2.1.1 Etapa hidrolítica.....	15
2.2.1.2. Etapa acidogènica.....	16
2.2.1.3. Etapa acetogènica.....	17
2.2.1.4 Etapa metanogènica.....	17
2.2.2. Factors mediambientals.....	20
2.2.2.1. variables fisicoquímiques.....	21
2.2.2.2. Nutrients.....	24
2.2.2.3 Inhibidors.....	25
3. Materials i mètodes.....	27
3.1. Materials	28
3.1.1. Productes químics.....	28
3.1.2. Inòcul.....	28
3.2. Procediment experimental.....	28
3.2.1. Disseny i posada en marxa de l'experiment.....	28
3.2.2. Seguiment de la producció de biogàs.....	36
3.2.3. Desmuntatge de l'experiment.....	37

3.3. Mètodes analítics.....	39
3.4. Anàlisi estadística.....	40
4. Resultats i discussió	41
4.1. Activitat de l'inòcul.....	41
4.2. Activitat metanogènica	42
4.2.1. Àcid clofíbric	42
4.2.2. Carbamazepina	44
4.2.3. Ibuprofè	48
4.3. Activitat acetogènica.....	51
4.3.1. Carbamazepina	51
4.3.2. Ibuprofè	54
4.3.3. Àcid clofíbric	56
5. Conclusions	61
6. Consideracions finals.....	63
7. Bibliografia	65
8. ANNEXES	69
8.1. Pressupost.....	69
8.2. Programació.....	71
8.3. Acrònims i paraules clau.....	72
8.4. Taules i figures.....	73

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Justificació del treball realitzat i antecedents.

Actualment, un dels problemes ambientals més comuns en el camp del medi ambient és la qualitat de l'aigua. Durant les últimes tres dècades, els contaminants orgànics més monitoritzats en el medi aquàtic han estat principalment els pesticides, hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) i els bifenils policlorats (Santos et al., 2009). Darrerament però, s'està donant una especial atenció a la presència de compostos farmacèutics en el medi aquàtic ja que el seu efecte tòxic potencial pot afectar directament a l'ecosistema aquàtic i indirectament a l'ésser humà i a la resta d'ecosistemes. Això pot esdevenir perquè els fàrmacs han estat dissenyats per interferir en la funció biològica dels elements del cos humà. Per tant, es podria anticipar que els compostos farmacèutics podrien interferir en el funcionament normal dels bacteris implicats en el procés de digestió anaeròbia, especialment en aquells grups de microorganismes que han estat caracteritzats com els més sensibles com són els bacteris metanògens (Fountoulakis et al., 2008).

La principal font d'aportació de fàrmacs a l'ambient és la descàrrega de les aigües residuals provinents de les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) on els productes químics arriben del sistema de clavegueram (Santos et al., 2009; Gartiser et al., 2007). Els medicaments no es metabolitzen completament pel cos humà i es vessen contínuament a la xarxa de clavegueram a través de l'orina i els excrements. Més concretament, un 70% dels productes excretats està a l'orina i un 30% als excrements (Marsalek, 2008).

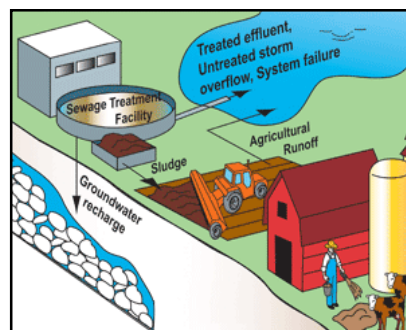


Fig 1.1. Esquema de les fonts dels PPCPs a l'aigua. Font: EPA.

Aquest compostos no només es detecten en les aigües residuals, sinó també en rius i aqüífers. És per aquest motiu, que les aigües residuals municipals són la principal ruta d'exposició pels fàrmacs utilitzats als centres mèdics (Gartiser et al., 2007).

A la majoria de països europeus el tractament de les aigües residuals ha millorat ostensiblement en els últims 10 o 15 anys. Aquest fet s'ha donat ja que la major part de la població està connectada a EDARs, variant el grau de tractament segons les zones. Mentre que a l'Europa del Sud i de l'Est hi ha hagut un canvi de tractament primari (mecànic) cap a secundari (biològic), a l'Europa de l'Oest i del Nord s'han incorporat tractaments terciaris que inclouen l'eliminació de nutrients. Malgrat aquestes millores, hi ha compostos com els farmacèutics i de cura personal - *Pharmaceuticals and Personal Care Products* - (d'ara endavant PPCPs) d'ús generalitzat i baix poder de degradació que romanen en els efluentes, escapant molts d'ells del tractament secundari. (Congreso Nacional de Medio ambiente, CONAMA). Seguint en aquesta línia de recerca, s'elimina un 10% aproximadament dels PPCPs amb el tractament primari, un 50% amb el tractament secundari i fins a un 99% en el tractament terciari (Marsalek, 2008).

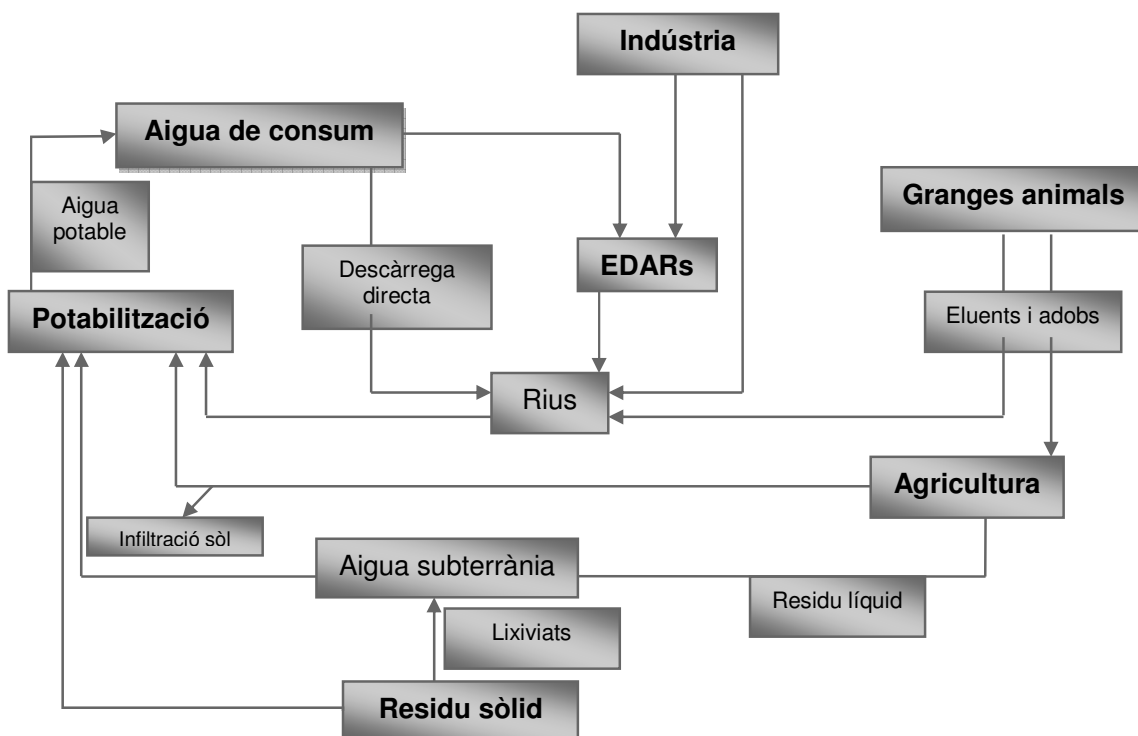


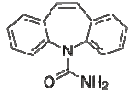
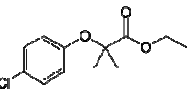
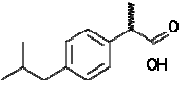
Fig 1.2. Esquema de l'introducció dels PPCPs en l'ambient i en l'aigua de consum. Elaboració pròpia a partir de Petrovic, 2003.

En aquest treball s'han triat tres productes farmacèutics d'ús generalitzat. En concret s'han seleccionat els fàrmacs àcid clofíbric, carbamazepina i ibuprofè pel seu extens

consum a diferents països europeus i Nord Amèrica amb la consegüent àmplia presència a les EDAR (Marco-Urrea et al., 2009). A part, els antiinflamatoris estan rebent una atenció creixent per la seva alta polaritat, i per tant alta mobilitat al medi aquàtic. La concentració mitjana dels fàrmacs testats als efluent de les EDAR estan entre 0,1-1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. (Marco-Urrea et al., 2009).

A més a més, aquests medicaments tenen diferents propietats físico-químiques que poden manifestar diferents comportaments en les EDAR. En la Taula 1.1. es poden veure els paràmetres físicoquímics dels fàrmacs estudiats, així com la seva estructura i el seu ús terapèutic.

Taula 1.1. Propietats físico-químiques i informació sobre l'ús terapèutic dels fàrmacs estudiats.

Compost	Estructura	Us terapèutic	Solubilitat aigua ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Log K_{ow}
Carbamazepina		Antiepilèptic	17,7	2,4
Àcid Clofíbric		Metabòlit d'un regulador de lípids.	582,5	2,6
Ibuprofè		Analgèsic / antiinflamatori	0,08	4,0

És per aquesta raó que en la darrera dècada s'han posat en marxa algunes recerques per tal de d'esbrinar com degradar aquests productes tan comuns¹ així com saber quin és el nivell d'afectació en el funcionament d'alguns tractaments biològics com és el cas de la digestió anaeròbia. En aquest context es basa la recerca que està realitzant el grup de Tòxics. Aquest grup pertany al Departament d'Enginyeria Química de la Universitat autònoma de Barcelona (UAB) i una de les seves línies de recerca consisteix en l'estudi de la biodegradació de productes tòxics per mitjà de fongs (*Trametes versicolor*), degradació anaeròbia, etc.

¹ El consum anual de fàrmacs en la població urbana és d'unes 100.000 tones, que dona un consum mitjà de 15 g/persona/any (Marsalek, 2008).

En aquesta línia d'investigació s'han publicat diferents treballs que estudien com entra l'aigua a l'EDAR (influent) i com surt després del tractament biològic (efluent). No obstant, molts autors es fixen només en la qualitat de l'aigua. És a dir, si aquesta entra contaminada però surt lliure dels anomenats PPCPs donen per correcte el tractament utilitzat considerant que aquesta tecnologia degrada o elimina els fàrmacs. Per exemple, les taxes d'eliminació de fàrmacs d'un estudi sobre el tractament d'aigües residuals a Sevilla van del 8,1% per la carbamazepina al 87,5% per l'ibuprofè (Santos et al., 2009).

Tot i així, lluny d'aquesta realitat, que no es trobin concentracions elevades en l'efluent no vol dir que el compost químic s'hagi degradat. Els fàrmacs entren amb l'influent cap a l'EDAR i poden quedar adsorbits en el llot del tractament primari i/o en els fangs activats. D'aquesta manera entren als digestors anaeròbics d'aquestes plantes (Gartiser et al., 2007). Un cop el llot arriba al digestor anaerobi es segueix tractant. En aquest punt sorgeixen les següents qüestions: *influeix la presència d'aquest tipus de compostos en la degradació anaeròbia? Presenten toxicitat suficient per inhibir significativament el procés de digestió? Si hi són presents, es degraden per mitjà d'aquest sistema? En cas de que es degradin, es formen metabòlits o subproductes inerts o tòxics?*

Per exemple, en un estudi amb 18 antibiòtics provats, cap d'ells es va degradar completament. Les taxes de degradació varien entre el 4% i el 27% (Gartiser et al., 2007). El treball que es presenta a continuació neix fruit de la necessitat de donar resposta a les qüestions plantejades anteriorment.

1.2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest estudi és el següent:

ESTUDIAR L'EFECTE DE LA PRESENCIA D'ÀCID CLOFÍBRIC, CARBAMAZEPINA I IBUPROFÈ EN EL PROCÉS DE DEGRADACIÓ ANAERÒBIA.

Per tal d'assolir aquest objectiu general, es preveuen una sèrie d'objectius específics.

- I) Estudiar l'evolució típica de l'activitat metanogènica i acetogènica mitjançant tècniques baromètriques.
- II) Comprovar si els fàrmacs provoquen toxicitat en el procés de digestió anaeròbia en funció de la dosi de fàrmac assajada.
- III) Observar si hi ha degradació del fàrmac durant el procés de digestió anaeròbia.
- IV) En cas de que existeixi degradació, comprovar si es metabolitza en subproductes.

2. FONAMENTS TEÒRICS

2.1. Els productes farmacèutics i de cura personal (PPCPs)

Els PPCPs són un grup de compostos xenobiòtics que es consumeixen àmpliament per diverses vies de productes quotidians (Fountoulakis et al., 2008). Aquest grup de productes formen part dels últimament denominats contaminants emergents (Barceló et al., 2007).

Aquests compostos s'han detectat al medi des de la dècada dels '70, però no han rebut una especial atenció fins la darrera dècada (Marsalek, 2008). En un estudi es mostra que aquests contaminants estan presents al 80% de rius dels EUA (Onesios et al., 2008).

Segons l'Agència Americana per la Protecció del Medi ambient (EPA) en els PPCPs està inclòs qualsevol producte utilitzat per les persones per usos farmacològics, cosmètics o agraris. En aquesta descripció s'inclouen milers de productes químics incloent fàrmacs amb o sense prescripció mèdica, productes químics d'ús animal o veterinari, fragàncies i cosmètics.

Actualment, els científics de l'EPA no han trobat evidències de que siguin perjudicials per la salut dels humans tot i que amb les noves tecnologies d'anàlisi s'han detectat i quantificat aquests compostos a les aigües però en concentracions molt baixes (de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ a $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). No obstant, molts d'aquests productes són molt poc solubles i es van bioacumulant als teixits animals, de manera que va augmentant la seva concentració als organismes (Marsalek, 2008).

El servei geològic dels EUA inclou que hi ha risc potencial pels organismes que, en el seu medi, estan exposats als PPCPs, com per exemple, els organismes aquàtics que tenen una exposició contínua i multigeneracional.

Pels humans, el consum d'aigua potable, que possiblement contingui aquests compostos en concentracions traça, s'ha identificat com a la principal ruta potencial d'exposició. Altres rutes d'exposició relativament importants per humans són el consum de peix i derivats que continguin PPCPs i el contacte dèrmic amb aquests compostos en les dutxes o banys amb aigua domèstica (Marsalek, 2008).

No obstant, encara hi ha molta incertesa i desconeixement sobre aquest tema, ja que hi ha molt poca recerca realitzada fins al moment.

2.2. El procés de digestió anaeròbia

La digestió anaeròbia és un procés biològic degradatiu en el qual part dels materials orgànics d'un substrat són convertits en biogàs (barreja de CO_2 i CH_4 amb traces d'altres elements) per un conjunt de bacteris que són sensibles o completament inhibits per la presència d'oxigen². Es tracta d'una tecnologia força madura utilitzada arreu del món, els avantatges de la qual ja són ben coneguts. Emprant aquest procés de digestió és possible convertir gran quantitat de residus³ de diferents tipologies, incloent els de la indústria química i farmacèutica, en subproductes útils. Amb aquest tractament més del 90% de l'energia disponible per oxidació directa es transforma en metà, consumint-se només un 10% de l'energia en creixement bacterià, contrastant amb el 50% consumit en un sistema aerobi. (Muñoz *et al.*, 1987). Per tant hi ha baix consum energètic i baixa producció de llocs. No obstant, els microorganismes anaerobis son força sensibles quan estan exposats a certs compostos tals com metalls pesats, entre d'altres.

Respecte la microbiologia i bioquímica del procés de degradació anaeròbia cal dir que la matèria orgànica s'utilitza en el metabolisme microbià amb una doble finalitat: per l'obtenció de l'energia necessària per al desenvolupament de les funcions vitals (catabolisme) i per la síntesi de les estructures cel·lulars (anabolisme).

L'oxidació dels diferents compostos intermitjos metabòlics està lligada a la reducció d'un número limitat de cofactors (NADH , NADPH , FADH_2). En el metabolisme aerobi l'oxidació d'aquests cofactors comporta, en últim terme, la reducció de l'oxigen molecular. Malgrat això, en els processos anaerobis, les reaccions d'oxidació de les formes reduïdes dels cofactors estan acoblades a la reducció d'algun compost oxidat,

² s'inhibeixen quan la concentració d' O_2 dissolt del medi és de l'ordre de 0,01 mg/L, i en menor proporció per anaerobis facultatius.

³ En el catabolisme aerobi l'oxidació dels compostos orgànics a CO_2 i H_2O és una reacció molt exotèrmica; amb això, un organisme aerobi requereix petites quantitats de substrat per a mantenir un determinat nivell de creixement. Per altra banda, el metabolisme anaerobi allibera una quantitat d'energia relativament baixa. Per tant, per mantenir un determinat nivell d'anabolisme es requereix una quantitat més gran de substrat per al procés anaerobi que l'aerobi. Aquesta característica dels processos anaerobis els fa més adequats per al tractament d'altres càrregues orgàniques.

originant-se una àmplia gamma de productes finals (etanol, àcid làctic, àcid propiònic, àcid acètic, etc (Ratledge, 2001).

La coordinació i interdependència de les diferents reaccions metabòliques d'oxidoreducció és el que aporta estabilitat al procés. Les molècules de CO_2 i CH_4 són els productes resultants de la degradació anaeròbia, més oxidat i reduït, respectivament. Aquests productes són els més estables i, termodinàmicament, no poden patir degradacions posteriors en sistemes on la llum i els acceptors d'electrons inorgànics (nitrats i O_2) estan absents.

La microbiota responsable del procés es compon de varis grups bacterians associats simbiòticament, que han de mantenir un delicat equilibri entre si, ja que els productes finals de les rutes metabòliques de cadascun d'ells constitueixen el substrat adequat per al següent. (Schink, 2000).

2.2.1. Etapes de la digestió anaeròbia

La digestió anaeròbia està constituïda per quatre etapes:

1. Hidròlisi, on els polímers (unitats complexes) es descomponen en monòmers (unitats simples).
2. Acidogènesi, etapa en la que els monòmers obtinguts en l'etapa anterior passen a ser àcids grassos volàtils (d'ara endavant AGVs).
3. Acetogènesi, en que els AGVs es converteixen en àcid acètic, CO_2 i H_2 .
4. Metanogènesi, última etapa de la digestió, en que els acetats passen a CH_4 i CO_2 al mateix temps que es consumeix H_2 .

2.2.1.1. Etapa hidrolítica

L'etapa hidrolítica constitueix la primera etapa del procés digestió anaeròbia i en ella, es produeix la hidròlisi de macromolècules tals com lípids, proteïnes i hidrats de carboni d'alt pes molecular mitjançant enzims extracel·lulars excretats per bacteris fermentatius. La funció d'aquests enzims és promoure la ruptura de la matèria orgànica complexa, que no pot ser assimilada per les cèl·lules.

L'etapa hidrolítica pot ser l'etapa limitant de la velocitat del procés global, sobre tot tractant residus d'alt contingut en sòlids. Fins a tal punt, que inclòs en casos on les

fases acidogèniques o metanogèniques són considerades com a passes limitants, la hidròlisi pot afectar al conjunt del procés (Campos, 2001).

Les proteïnes són hidrolitzades per proteases en proteoses, peptones, pèptids i aminoàcids. Aquests aminoàcids produïts són degradats a AGVs, CO₂, H₂, amoni i sulfur reduït. Cal dir, que generalment la taxa d'hidròlisi de proteïnes és menor que la d'hidrats de carboni (Campos, 2001).

La degradació de lípids en ambients anaerobis consisteix en una ruptura inicial dels greixos per un grup d'enzims hidrolítics (lipases) en els corresponents àcids grassos de cadena llarga i molècules de glicerol o galactasa.

Per acabar amb aquesta etapa, cal comentar que la inhibició de la hidròlisi de macromolècules es pot donar si estigués present algun compost tòxic per a la població bacteriana responsable de la producció d'enzims extracel·lulars. Alguns autors consideren que la concentració d'amoni influeix negativament en la desaminació de peptones, altres diuen que la taxa d'hidròlisi de carbohidrats i proteïnes està limitada per la concentració total d'AGVs.

2.2.1.2. Etapa acidogènica

Alguns productes de la fermentació poden ser metabolitzats directament pels organismes metanogens, per exemple H₂ i acetat. En canvi, altres (propionat, butirat, lactat,...) necessiten passar a formes més simples. Aquesta simplificació la fan els organismes acetogènics a partir dels productes resultants de les reaccions d'hidròlisi prèvies, és a dir, sucres, aminoàcids i àcids grassos de cadena llarga. Com els processos acetogènics són generalment difícils energèticament parlant, hi ha cops que necessiten ser ajudats pels organismes metanogens o consumidors d'hidrogen (Campos, 2001).

Respecte als inhibidors d'aquesta fase, el principal és l'hidrogen molecular tot i que també pot influir el propi àcid acètic o els àcids grassos de cadena llarga.

2.2.1.3. Etapa acetogènica

Els bacteris acetogènics converteixen els àcids grassos resultats de la fase anterior (propionic i butíric principalment) en els substrats propis de la metanogènesi (acetat,

CO₂ i H₂). Les reaccions d'oxidació d'àcids grassos són endergòniques⁴, en les concentracions habituals de substrats i productes; malgrat això, es tornen favorables termodinàmicament a baixes concentracions d'H₂ en el medi. Per tant, per a que la acetogènesi tingui lloc en els digestors anaerobis, es necessari que l'H₂ generat en la mateixa sigui utilitzat i consumit amb la mateixa velocitat amb la que es produeix. Per aquesta raó, aquests bacteris només poden desenvolupar-se òptimament en associació sintròfica amb microorganismes utilitzadors d'H₂ (bacteris metanogènics utilitzadors d'H₂ i/o bacteris homoacetogènics (Schink, 2000). Aquests bacteris que formen únicament acetat i que, per tant, només creixen en condicions de baixes pressions d'H₂ en el medi, són anomenats acetogens protó-reductors obligats (OHPA). L'acetat i l'H₂ sintetitzat per ells suposa un 54% del total del metà produït en els digestors anaerobis (Stronach, 1986). Són bacteris molt sensibles als canvis de pH, presentant un màxim d'activitat al voltant de la neutralitat. En les condicions més òptimes per al seu creixement (baixes concentracions d'H₂ en el medi) posseeixen un temps mínim de duplicació comprès entre 2 i 6 dies, superior al d'alguns metanogènics. De tot l'anterior es pot concloure que en un digester estable, l'acetat és el principal producte format en la degradació dels àcids grassos, i la seva concentració dependrà del temps de retenció imposat en el sistema. En el mateix sentit, la presència dels àcids butíric i propiònic en un digester indica un mal funcionament del mateix.

2.2.1.4. Etapa metanogènica

La metanogènesi és l'última etapa de la degradació anaeròbia de la matèria orgànica. La formació de metà es produeix a partir d'un limitat grup de substrats (H₂-CO₂, acetat, metanol i metilamines) en condicions d'estricta anaerobiosi. Els bacteris responsables d'aquesta etapa constitueixen un únic i especialitzat grup de microorganismes (família *Methanobacteriaceae*) amb una característica fisiològica comuna: la capacitat de producció de metà. Pertanyen al regne dels *Archeobacteris* entre d'altres. A part dels ambients controlats com són els digestors anaerobis, els ambients on es desenvolupen els metanogens són molt variats i van des de sòls a ambients aquàtics, passant per interiors d'organismes vius (com intestins d'animals per exemple). Aquests ecosistemes es caracteritzen per ser anaerobis, contenir compostos orgànics i escassetat de llum, nitrats i sulfats. Els nitrats i els sulfats inhibeixen la metanogènesi a l'actuar com acceptors finals d'electrons en el metabolisme dels bacteris desnitrificants

⁴ Reacció desfavorable o no espontània termodinàmicament.

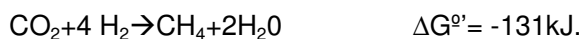
o sulforreductors, termodinàmicament més eficients que els metanogens, i que presenten una alta afinitat per l'H₂. No obstant això, la metanogènesi i la reducció de sulfat poden succeir simultàniament en alguns casos.

Cal dir que la distribució d'aquests microorganismes és molt dependent de les condicions de temperatura, pH i salinitat. Així, la majoria de gèneres creixen en un rang de pH que va de 6 a 8. Respecte a l'aigua salada, aquesta inhibeix fortament la metanogènesi. En experiments amb marcadors isotòpics s'ha demostrat que el 73% del metà prové de l'acetat, mentre que la resta ho fa del CO₂-H₂ (Solera del Río, 1999). Segons la utilització del substrat els bacteris metanogens es classifiquen en acetoclàstics i utilitzadors d'H₂, respectivament. En la reacció acetoclàstica els productes finals són metà i CO₂. Aquesta reacció es porta a terme específicament pels gèneres *Methanosarcina* i *Methanotrix*.

Cal dir també que existeix una complexa relació entre els bacteris metanogènics i els no metanogènics. Els metanogènics poden utilitzar diversos substrats de la fermentació directament (H₂-CO₂, format o acetat) o en simbiosi amb acetògens productors d'H₂. Aquest fenomen és conegut com transferència d'H₂ entre espècies. Els bacteris metanogens consumeixen H₂ i actuen com a embornal d'electrons per a les espècies sensibles a l'H₂. Sense aquests embornals d'electrons les reaccions d'oxidació d'aquests bacteris són endergòniques; no obstant, quan l'H₂ és consumit, les reaccions arriben a ser exergòniques i els bacteris simbiòtics poden créixer i oxidar el substrat.

En quant als inhibidors, s'han descrit varis; entre els més destacats es troba el nitrogen amoniacal, els àcids grassos de cadena llarga, AGVs i alguns cations.

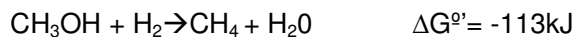
Observant ara els substrats per la metanogènesi, existeixen tres classes. La primera classe inclou un substrat molt important com és el CO₂ que és reduït fins a metà amb l'H₂ com a font de poder reductor.



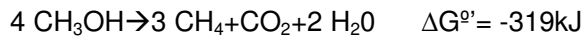
Altres substrats inclouen el format i el CO₂.

La segona classe de substrat metanogènic són substàncies amb grups metil. Utilitzant metanol com model metílic, la formació de metà pot ocórrer de dues formes. La

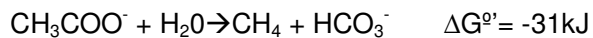
primera que inclou la reducció del metanol per una font externa d'electrons com és l'hidrogen.



Alternativament i en absència d' H_2 , una mica de metanol pot oxidar-se fins a CO_2 per generar els electrons necessaris per a reduir altres molècules de metanol fins al metà:



Per acabar, el darrer procés metanogènic és la ruptura d'acetat fins a CO_2 i metà:



Només alguns metanògens són acetotròfics però aproximadament dos tercers parts del metà generat en la metanogènesi a partir de fangs actius deriva de l'acetat, i només el terç restant ho fa de l'anhidrid carbònic i hidrogen (Solera del Río, 1999); és a dir, aquest tipus d'acetofia té un gran significat en la natura.

A la Fig. 2.1. es mostra esquemàticament el conjunt d'etapes de la degradació anaeròbia amb els substrats i productes corresponents, des de la hidròlisi fins la metanogènesi.

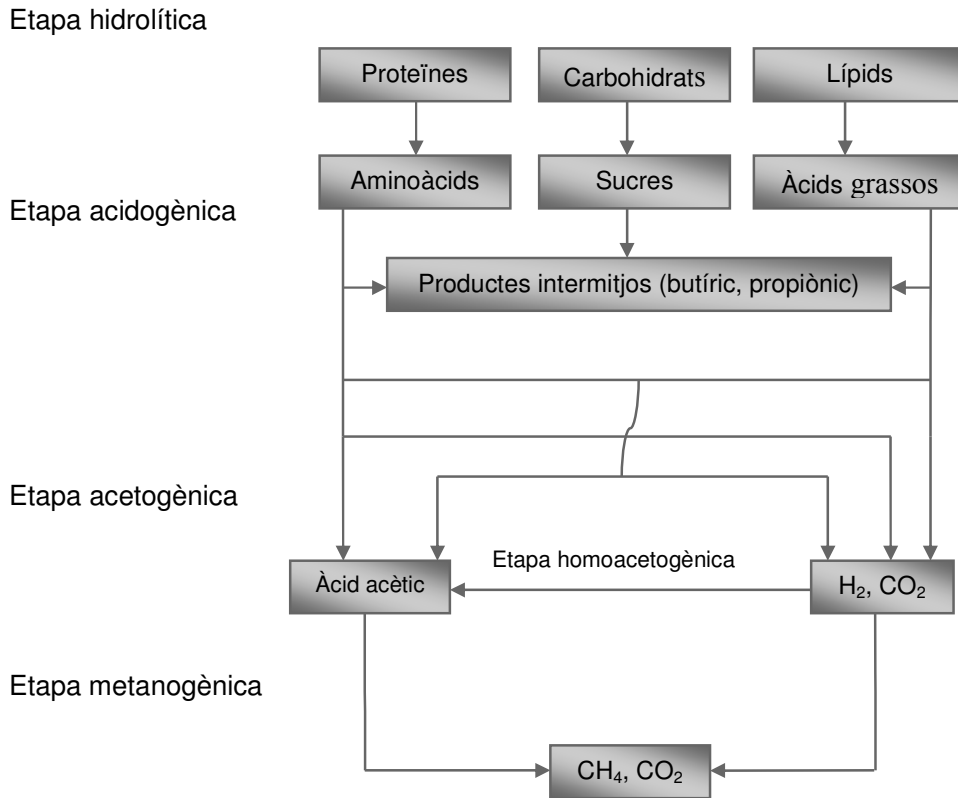


Fig 2.1. Etapes metabòliques implicades en la formació de metà. Elaboració pròpia a partir de (Campos, 2001).

2.2.2. Factors mediambientals

El conjunt de condicions ambientals en les que es desenvolupen les poblacions bacterianes implicades en el procés de digestió anaeròbia està determinat per les variables d'operació seleccionades, els requeriments nutricionals dels diferents microorganismes, així com la presència o absència d'inhibidors en el sistema.

Qualsevol variació dels factors ambientals determinarà tant la velocitat de creixement i activitat dels microorganismes, com el tamany relatiu de les poblacions de diferents espècies en l'interior dels reactors. S'ha de considerar que els grups bacterians implicats en el procés de digestió anaeròbia presenten diferents requeriments mediambientals i, per tant, les variables d'operació que han de seleccionar-se seran diferents segons la tecnologia utilitzada, ja que, en cada cas es seleccionarà en l'interior dels digestors el conjunt de microorganismes que millor s'adapti a aquestes condicions.

El funcionament estable del procés anaerobi en un reactor monoetapa, és a dir, tots els microorganismes actuen en la mateixa unitat, comporta la necessitat de fixar unes condicions operatives tals que tots els grups bacterians poden ser actius simultàniament i, a més, que la velocitat de generació de productes d'un grup microbià estigui equilibrada amb la del consum del mencionat producte per un altre dels grups implicats. L'última consideració té una especial importància degut a que un gran percentatge dels problemes que es presenten en els reactors anaerobis es deu a l'existència d'un desequilibri entre dites velocitats.

Els bacteris responsables de la fase acidogènica són relativament poc sensibles als canvis de pH del medi i presenten uns temps de duplicació molt baixos (30 min). Els bacteris acetogens i metanogènics acetoclàstics, no obstant, són altament dependents del pH i de creixement lent (1-4 i 2-3 dies respectivament). Finalment, els metanogens utilitzadors d'H₂ creixen ràpidament (6 hores) però són dependents del pH del medi. Així mateix, l'H₂ actua com a fort inhibidor de l'activitat dels bacteris de la fase acidogènica.

A continuació es comentaran tots els factors mediambientals que poden influir en el creixement bacterià.

2.2.2.1. Variables físico-químiques.

Les variables físico-químiques més influents en el procés de degradació anaeròbia són la temperatura, el pH, l'alcalinitat i l'acidesa volàtil. Totes exerceixen una gran influència sobre el tipus de microorganismes i la velocitat de creixement dels mateixos.

- Temperatura

La metanogènesi s'ha portat a terme en rangs que van des dels 4°C (en sediments) fins a 60°C (digestors de fems). Malgrat l'ampli rang de temperatura al que poden créixer els microorganismes anaerobis, la major part dels estudis d'aplicacions pràctiques s'han realitzat en condicions ambientals (20-25°C), mesòfiles (35°C) o termòfiles (55°C).

La temperatura és el factor físic que més repercussió té en el tipus i creixement de la població bacteriana present en l'interior dels digestors (Solera del Río,

1999). Cada tipus de microorganismes només pot créixer dins d'un rang específic de temperatura.

Els valors màxims i mínims que defenen els límits de l'interval de temperatura dins del qual és possible el creixement microbià es denominen temperatures cardinals. A temperatures més altes o més baixes que aquestes el creixement no té lloc. Les temperatures cardinals es consideren característiques per a cada tipus de microorganisme, no obstant, estan influenciades per altres factors mediambientals com el pH, la concentració de sals, nutrients i inhibidors. Per una banda, en funció del valors de les temperatures cardinals s'estableixen tres rangs de temperatura de creixement característic dels microorganismes: psicròfils (<20°C), mesòfils (20-40°C) i termòfils (>40°C).

Per altra banda, si el rang de temperatura és estret o ample, els microorganismes es classifiquen en estenotermals i euritermals respectivament.

La temperatura d'operació determina l'activitat microbiana. Així, dins de cada rang determinat, la velocitat de creixement augmenta exponencialment amb l'increment de temperatura, arriba a un màxim (temperatura òptima) i decau sobtadament fins anul·lar-se uns graus després de l'òptim. La causa d'aquest fenomen és que l'energia d'activació dels processos metabòlics és apreciablement menor que la dels processos de mort tèrmica dels microorganismes (Solera del Río, 1999). S'ha d'afegir, que els bacteris termòfils posseeixen unes taxes de creixement més elevades que els bacteris del rang mesòfil o psicròfil. També s'ha de dir que la temperatura exerceix una forta influència sobre l'activitat dels bacteris, degut a que els aspectes termodinàmics de la conversió de compostos depèn de la temperatura. Així la majoria de les reaccions de biodegradació requereixen menors energies a altes temperatures, que implica un procés de digestió més ràpid (Solera del Río, 1999). Hi ha certs estudis que indiquen que en digestors discontinus amb mateix temps de residència hidràulic però que operaven a temperatures diferents, la producció era més gran en el reactor d'alta temperatura que en el de mitjana, però això era degut a l'augment de l'activitat enzimàtica, no del número de bacteris (Solera del Río, 1999).

- pH, alcalinitat i acidesa volàtil

El pH, igual que la temperatura, exerceix un marcat efecte sobre la velocitat de creixement i en la selecció del tipus de microorganismes preponderants en el procés. El creixement de cada tipus de microorganismes només es realitza dins d'un rang de pH característic. La velocitat màxima de creixement té lloc a un valor òptim de pH que acostuma a coincidir amb el valor mig de l'interval (Solera del Río, 1999).

En general, els microorganismes no poden tolerar valors de pH extrems; de fet, la majoria dels bacteris tenen un pH òptim de creixement comprès entre 6 i 8. Generalment, sota condicions fortament àcides o alcalines es poden hidrolitzar alguns compostos cel·lulars i desnaturalitzar alguns enzims tot i què, de forma excepcional, els bacteris acidòfils i alcalinòfils poden tolerar i fins i tot requerir ambients de pH extrems.

El pH del medi determina la solubilitat de moltes molècules que, de forma indirecta, poden afectar als microorganismes que es troben en ell. Els canvis de pH poden provocar la ionització de nutrients essencials, disminuint la seva accessibilitat pels microorganismes, donat que, en aquest estat, són menys permeables per a les cèl·lules. També afecta el grau de toxicitat d'alguns compostos, com per exemple, els metalls pesats.

En general, l'interval de l'òptim de pH es situa en les proximitats de l'òptim metanogènic, és a dir, valors entre 7 i 7,5 (Solera del Río, 1999).

Com ja s'ha dit, els diversos grups implicats en el procés presenten sensibilitats molt diferents als canvis mediambientals. Trobem que els bacteris metanogènics i acetogènics són els que presenten requeriments més estrictes així com una major dificultat per aclimatar-se quan es produeix una modificació en les condicions del medi. Aquests microorganismes són els que presenten velocitats de creixement menors. Per tot això, quan es produeix alguna distorsió en les condicions mediambientals del medi, els bacteris acetogènics que transformen els àcids grassos (propioníc i butíric) en acètic i els metanògens que transformen l'acètic i la barreja H_2-CO_2 en metà, s'inhibeixen temporalment.

Quan el pH del medi augmenta massa (superior a 8,5 en el rang termofílic) es pot observar un efecte inhibitor degut, probablement, a que es genera una alta quantitat d'amoni, que presenta un acusat poder tòxic (Solera del Río, 1999).

L'acidesa volàtil és una mesura de la quantitat de d'AGVs presents en el medi. L'acumulació d'àcids en els digestors monoetapa es deu a un desequilibri entre les velocitats de producció i consum d'àcids. Es diu que els bacteris metanogènics resisteixen bé altes concentracions d'àcids, sempre que es mantingui el pH del medi pròxim a la neutralitat, i inclús un augment espontani d'alguns àcids pot estimular el procés en comptes d'inhibir-lo. Algun autor (Mosey, 1983), indica que tot i què la digestió del procés vingui acompanyada per un augment de l'acidesa volàtil, aquesta acumulació és la conseqüència més que la causa de la inhibició de la metanogènesi.

Per corregir el descens del pH i l'augment de l'acidesa volàtil s'acostuma a afegir al medi algun tipus d'agent bàsic.

2.2.2.2. Nutrients

Els requeriments nutricionals dels microorganismes són agrupats en dues categories: macronutrients i micronutrients.

- **Macronutrients**

Els principals macronutrients requerits pels microorganismes són el C, N i P. La concentració d'aquests nutrients en el medi ha de trobar-se en un rang tal que permeti cobrir els requeriments nutricionals dels microorganismes sense arribar a ser tòxics o a inhibir el procés.

Els macronutrients són utilitzats únicament en certes formes específiques i, per això, influeixen en la selecció de les espècies predominants. Els micronutrients, en canvi, al ser utilitzats per tots els microorganismes d'igual forma i requerits en petites quantitats, exerceixen poca o cap pressió selectiva (Solera del Río, 1999).

- Micronutrients

A més dels requeriments de micronutrients, els microorganismes anaerobis necessiten créixer en un medi complementat amb vitamines, aminoàcids i minerals que són incapaços de sintetitzar i que són vitals per al seu creixement i activitat. Alguns micronutrients són, de més a menys importants el Ni, S, Mo, Se, riboflavina i vitamina B₁₂.

En resum, l'addició adequada de nutrients augmenta la velocitat del procés fins a 15 cops.

2.2.2.3. Inhibidors

La inhibició en el procés de digestió anaeròbia pot provenir de substàncies presents en la alimentació o dels productes resultants de l'activitat metabòlica dels bacteris del digestor. L'amoni, els sulfats, els metalls pesants i alguns cations són els principals compostos inorgànics que poden provocar algun tipus de toxicitat a l'interior dels digestors anaerobis. L'oxigen, els compostos orgànics difícilment degradables i els de natura xenobiòtica, que posseeixen caràcter tòxic, també estan considerats en aquest apartat.

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, quasi tots els nutrients necessaris per al desenvolupament del procés es converteixen en tòxics quan sobrepassen determinats nivells de concentració.

- Inhibició per amoni

Els efectes de la concentració d'amoni en el reactor són dobles, ja que, per una banda, pot actuar com a inhibidor a partir de determinades concentracions mentre que, per l'altra, a l'estar per sota de certes concentracions podria passar a ser un substrat limitant.

- Inhibició per sulfur

Els compostos de sofre que poden tenir efecte inhibidor i tòxic en el procés de digestió anaeròbia a partir de concentracions de 9mM. A part, la presència de sulfat pot limitar la metanogènesi per la competència a nivell de substrat que s'estableix entre els bacteris sulfat-reductors i els metanògens (Solera del Río, 1999).

- Inhibició per metalls pesats
Els metalls pesats generalment es troben en baixes concentracions dins dels digestors ja que precipiten degut al pH de l'interior d'aquests.
- Inhibició relacionada amb l'activitat bacteriana.
Entre els productes finals del metabolisme bacterià que poden exercir un efecte d'inhibició en la microbiota anaeròbia, es troben els AGVs, H_2 i CO_2 . La inhibició causada per l'acumulació d'AGVs i H_2 ja s'ha comentat anteriorment. Respecte al CO_2 , actua com factor de creixement per a molts bacteris, és utilitzat en la formació d'àcid succínic en la fermentació de carbohidrats i és una font de carboni per a bacteris fermentatius i metanògens. No obstant, al ser producte final de la fermentació de carbohidrats i donat que la metanogènesi també pot produir-se a partir d'acetat, actua com a inhibidor en els dos casos. Hansson y Molin (Hobson, 1993) van comprovar que la fermentació de glucosa en un digester es realitza un 30% més ràpidament sota atmosfera de N_2 que sota una de CO_2 .
- Inhibició per oxigen
La digestió anaeròbia és un procés dut a terme per bacteris que requereixen anaerobiosi estricta en cultiu pur. Per això, en presència d'aquest es desenvoluparien bacteris facultatius i s'alteraria el procés.
- Inhibició per compostos xenobiòtics i orgànics recalcitrants
Per últim, algunes de les substàncies orgàniques i inorgàniques introduïdes amb l'alimentació en el digester poden produir inhibició en el desenvolupament de la digestió (organoclorats, compostos fenòlics, hidrocarburs, etc.) L'excés de tamany d'aquestes molècules requereix l'activitat combinada de diverses espècies bacterianes per a trencar-les en subunitats fàcilment assimilables per les cèl·lules.

3. MATERIALS I MÈTODES

A continuació s'explica la metodologia seguida per a dur a terme aquest projecte. La Fig 3.1. esquematitza el procediment seguit.

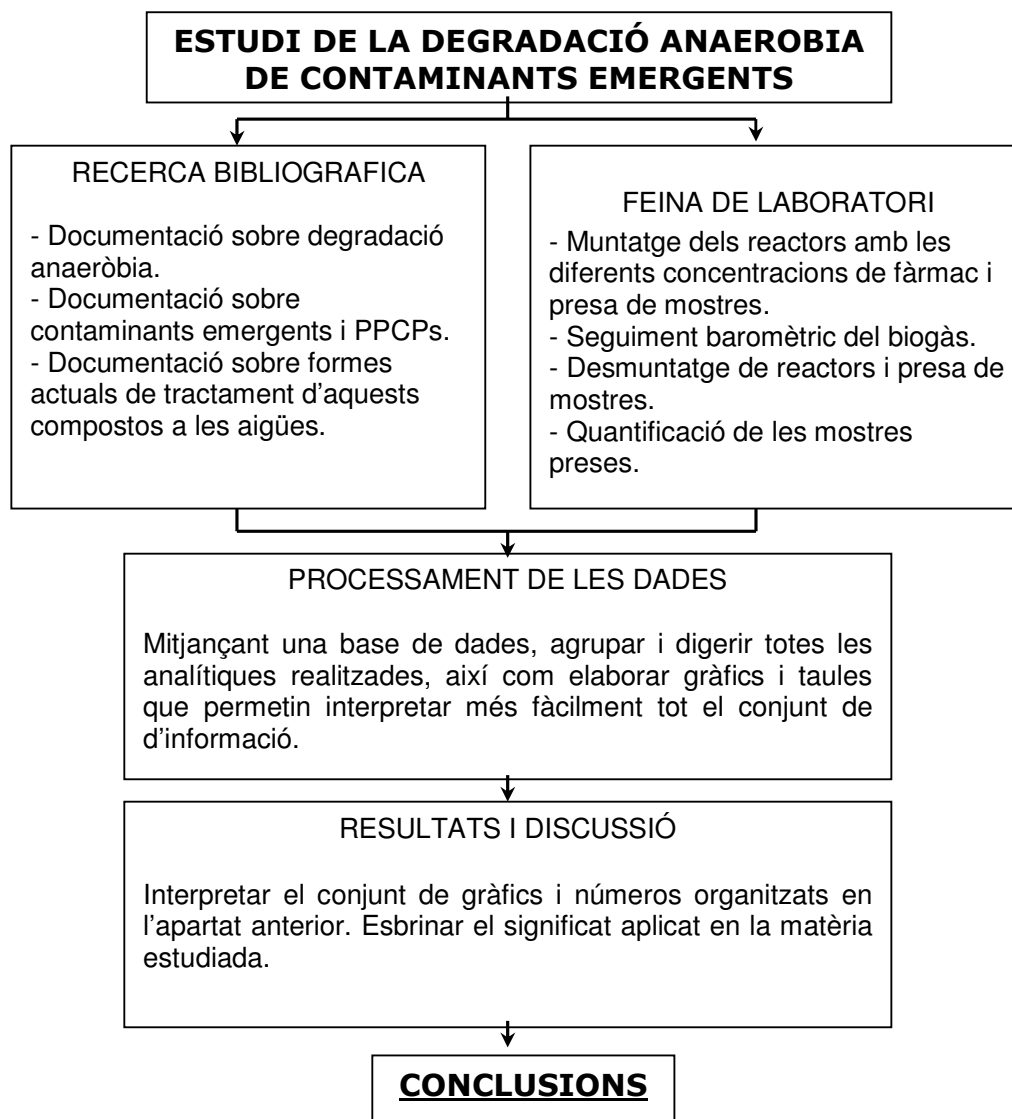


Fig. 3.1. Esquema de la metodologia de treball. Elaboració pròpia.

3.1 Materials

3.1.1. productes químics

Àcid clofíbric, carbamazepina i ibuprofè s'han obtingut de SIGMA-ALDRICH Co. (St Louis, MO) amb la màxima puresa.

Tanmateix tots els productes químics emprats han estat de la màxima puresa.

3.1.2. Inòcul

L'inòcul es va obtenir del digestor de l'EDAR de Granollers. La primera presa va ser al novembre de 2008 i la segona al gener de 2009. Es va transportar en un bidó de 15L i es va emmagatzemar a la cambra calenta a 37°C.

3.2. Procediment experimental

La feina de laboratori realitzada consta bàsicament de tres etapes:

En primer lloc el disseny de l'experiment, on s'han fet els diferents muntatges dels reactors i les analítiques prèvies.

En segon lloc el seguiment de la producció de biogàs, mitjançant un control baromètric periòdic.

Per últim, el desmuntatge de l'assaig, on s'ha realitzat la pressa de mostra final i les respectives analítiques finals.

3.2.1. Disseny i posada en marxa de l'experiment

A les següents taules (veure Taules 3.1., 3.2., 3.3. i 3.4.) s'esquematitza el nombre i composició dels reactors emprats a cadascun dels 4 experiments realitzats. A la primera columna es pot observar el codi del reactor, que són les sigles del fàrmac amb la concentració emprada i el número del triplicat corresponent. Per exemple, AC 10.2 és el reactor corresponent a l'àcid clofíbric, amb 10 ppm de fàrmac i seria el segon replicat.

En la segona columna es veu el fàrmac estudiat. A la tercera, la concentració de fàrmac que s'experimenta. A la quarta, el dissolvent o substrat utilitzat. I per últim, a la cinquena, la temperatura de digestió dels reactors, que és sempre 37 °C.

Cada experiment es dissenya de manera que cal fer un blanc, que consisteix en la digestió de l'inòcul amb aigua per estimar la producció de gas a partir de la matèria orgànica continguda en l'inòcul.

A més, es fa un reactor control que conté l'inòcul en aigua juntament amb el dissolvent pertinent, per saber la producció de biogàs que provoca aquest substrat. Respecte a aquests últims reactors control, cal dir que en el primer experiment el volum de dissolvent que s'afegeix al reactor varia segons la concentració final que es vol obtenir. És a dir, s'afegeixen diferents volums de substrat a cada tipus de reactor, i per això cada tipus de reactor té el seu respectiu control. A partir dels segon experiment i en endavant, es fa una dissolució mare del medicament a estudiar en el substrat per a cada concentració de fàrmac, de manera que afegit 1mL de dissolució a cada reactor, s'aconsegueix la concentració final desitjada i només cal un control.

Finalment, hi ha els reactors que contenen tot l'anterior juntament amb el fàrmac en la concentració a estudiar.

Tots els reactors anteriors es munten per triplicat.

A més a més, en els primers experiments es munten uns reactors que contenen la totalitat dels compostos anteriors: inòcul, fàrmac i dissolvent, però en aquest cas l'inòcul s'ha esterilitzat. D'aquesta manera es pretén esbrinar a quina fase passa el fàrmac si no es degrada: al llot o a la fase líquida. Aquest tipus de reactors es munten per duplicat.

3. MATERIALS I MÈTODES

Taula. 3.1. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 1er experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent. Prefix E= inòcul esterilitzat.

Codi reactor	Fàrmac	Conc. Fàrmac (ppm)	Dissolvent	Temperatura digestió (°C)
Experiment 1				
AC 5.1	Àcid clofíbric	5	Metanol	37
AC 5.2	Àcid clofíbric	5	Metanol	37
AC 5.3	Àcid clofíbric	5	Metanol	37
AC 10.1	Àcid clofíbric	10	Metanol	37
AC 10.2	Àcid clofíbric	10	Metanol	37
AC 10.3	Àcid clofíbric	10	Metanol	37
AC 20.1	Àcid clofíbric	20	Metanol	37
AC 20.2	Àcid clofíbric	20	Metanol	37
AC 20.3	Àcid clofíbric	20	Metanol	37
E AC 5.1	Àcid clofíbric	5	Metanol	37
E AC 5.2	Àcid clofíbric	5	Metanol	37
E AC 10.1	Àcid clofíbric	10	Metanol	37
E AC 10.2	Àcid clofíbric	10	Metanol	37
E AC 20.1	Àcid clofíbric	20	Metanol	37
E AC 20.2	Àcid clofíbric	20	Metanol	37
Control 5.1	-	-	Metanol	37
Control 5.2	-	-	Metanol	37
Control 5.3	-	-	Metanol	37
Control 10.1			Metanol	37
Control 10.2			Metanol	37
Control 10.3			Metanol	37
Control 20.1			Metanol	37
Control 20.2			Metanol	37
Control 20.3			Metanol	37
Blanc 1	-	-	-	37
Blanc 2	-	-	-	37
Blanc 3	-	-	-	37

3. MATERIALS I MÈTODES

Taula. 3.2. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 2n experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent. Prefix E= inòcul esterilitzat.

Codi reactor	Fàrmac	Conc. Fàrmac (ppm)	Dissolvent	Temperatura digestió (°C)
Experiment 2				
C 5.1	Carbamazepina	5	Metanol	37
C 5.2	Carbamazepina	5	Metanol	37
C 5.3	Carbamazepina	5	Metanol	37
C 10.1	Carbamazepina	10	Metanol	37
C 10.2	Carbamazepina	10	Metanol	37
C 10.3	Carbamazepina	10	Metanol	37
C 20.1	Carbamazepina	20	Metanol	37
C 20.2	Carbamazepina	20	Metanol	37
C 20.3	Carbamazepina	20	Metanol	37
E C 5.1	Carbamazepina	5	Metanol	37
E C 5.2	Carbamazepina	5	Metanol	37
E C 10.1	Carbamazepina	10	Metanol	37
E C 10.2	Carbamazepina	10	Metanol	37
E C 20.1	Carbamazepina	20	Metanol	37
E C 20.2	Carbamazepina	20	Metanol	37
Control 1	-	-	Metanol	37
Control 2	-	-	Metanol	37
Control 3	-	-	Metanol	37
Blanc 1	-	-	-	37
Blanc 2	-	-	-	37
Blanc 3	-	-	-	37

Taula. 3.3. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 3er experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent. Prefix E= inòcul esterilitzat.

Codi reactor	Fàrmac	Conc. Fàrmac (ppm)	Dissolvent	Temperatura digestió (°C)
Experiment 3				
I 5.1	Ibuprofè	5	Metanol	37
I 5.2	Ibuprofè	5	Metanol	37
I 5.3	Ibuprofè	5	Metanol	37
I 10.1	Ibuprofè	10	Metanol	37
I 10.2	Ibuprofè	10	Metanol	37
I 10.3	Ibuprofè	10	Metanol	37
I 20.1	Ibuprofè	20	Metanol	37
I 20.2	Ibuprofè	20	Metanol	37
I 20.3	Ibuprofè	20	Metanol	37
E I 5.1	Ibuprofè	5	Metanol	37
E I 5.2	Ibuprofè	5	Metanol	37
E I 10.1	Ibuprofè	10	Metanol	37
E I 10.2	Ibuprofè	10	Metanol	37
E I 20.1	Ibuprofè	20	Metanol	37
E I 20.2	Ibuprofè	20	Metanol	37
Control 1	-	-	Metanol	37
Control 2	-	-	Metanol	37
Control 3	-	-	Metanol	37
Blanc 1	-	-	-	37
Blanc 2	-	-	-	37
Blanc 3	-	-	-	37

Taula. 3.4. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 4t experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent.

Codi reactor	Fàrmac	Conc. Fàrmac (ppm)	Dissolvent	Temperatura digestió (°C)
Experiment 4				
AC 20.1	Àcid clofíbric	20	À. Propiònic	37
AC 20.2	Àcid clofíbric	20	À. Propiònic	37
AC 20.3	Àcid clofíbric	20	À. Propiònic	37
AC 100.1	Àcid clofíbric	100	À. Propiònic	37
AC 100.2	Àcid clofíbric	100	À. Propiònic	37
AC 100.3	Àcid clofíbric	100	À. Propiònic	37
C 20.1	Carbamazepina	20	À. Propiònic	37
C 20.2	Carbamazepina	20	À. Propiònic	37
C 20.3	Carbamazepina	20	À. Propiònic	37
C 100.1	Carbamazepina	100	À. Propiònic	37
C 100.2	Carbamazepina	100	À. Propiònic	37
C 100.3	Carbamazepina	100	À. Propiònic	37
I 20.1	Ibuprofè	20	À. Propiònic	37
I 20.2	Ibuprofè	20	À. Propiònic	37
I 20.3	Ibuprofè	20	À. Propiònic	37
I 100.1	Ibuprofè	100	À. Propiònic	37
I 100.2	Ibuprofè	100	À. Propiònic	37
I 100.3	Ibuprofè	100	À. Propiònic	37
Control 1	-	-	À. Propiònic	37
Control 2	-	-	À. Propiònic	37
Control 3	-	-	À. Propiònic	37
Blanc 1	-	-	-	37
Blanc 2	-	-	-	37
Blanc 3	-	-	-	37

Un cop s'ha dissenyat l'experiment es fa el muntatge dels reactors. El primer pas és acondicionar les ampolles. Són ampolles d'alumini marca LAKEN de 350mL de capacitat.



Imatge 3.1. Preparació dels reactors per a l'experiment. Elaboració pròpia. Abril 2009.

Un cop organitzat el número d'ampolles necessàries es comproven els taps. Aquests, són uns taps de rosca que tenen una vàlvula adaptada amb clau de pas que permeti

l'extracció controlada de biogàs pel seu posteriorment seguiment, així com un sèptum a la part superior per poder punxar el biogàs al cromatògraf de gasos en cas que fos necessari.

Una vegada cada ampolla té el seu respectiu tap preparat, cal comprovar l'estanqueïtat, és a dir, assegurar que no hi hagi fuites. Per fer-ho, es tapa el reactor, s'obre la clau de pas del tap, s'afegeix N₂ mitjançant un tub, es tanca la clau de pas del tap i es posa l'ampolla dins d'un recipient ple d'aigua per veure si bombolleja. En cas negatiu, el reactor està a punt per a fer l'experiment; en cas afirmatiu caldrà segellar el tap amb alguna goma d'enganxar com ara araldite i tornar a repetir l'operació anterior de comprovació de pèrdues. Cal dir que les ampolles són totalment opaques per evitar l'entrada de llum, ja que sobre tot l'ibuprofè i l'àcid clofbric són fotosensibles i es podrien degradar (Marco-Urrea et al., 2009).

Caracterització de l'inòcul:

La caracterització de l'inòcul es fa per duplicat i les pesades es fan amb balança analítica SCALTEC SBC MG 22 ± 0,01mg

- Es mesura el pH amb el pHímetre CRISON micro pH 2001.
- Es mesura la humitat, els sòlids totals (ST) i els sòlids volàtils (SV):
 - 1. Es pesen les càpsules de porcellana buides (Tara).
 - 2. S'afegeixen 25mL d'inòcul a la càpsula i es torna a pesar ($P_{inicial}$).
 - 3. Es deixa la càpsula a l'estufa P.SELECTA a 105°C fins a pes constant (≈24h).
 - Es deixa la càpsula una estona al dessecador i es torna a pesar (P_{estufa}).
 - Es posa la càpsula a la mufla OBERAL 12PR/300 a 550°C fins a pes constant (≈2h).
 - Es torna a pesar la càpsula (P_{mufla}).

Les equacions emprades per tal d'obtenir els resultats són:

$$\%Humitat = \frac{P_{inicial} - P_{estufa}}{P_{inicial} - tara}$$

$$\%ST = 100 - \%H$$

- $\%SV = \frac{P_{estufa} - P_{mufla}}{P_{estufa} - tara}$
- $g_{ST/L} = \frac{P_{estufa} - tara}{V_{mostra}}$
- $g_{SV/L} = \frac{P_{estufa} - P_{mufla}}{V_{mostra}}$



Imatge 3.2. Estufa i mufla emprades per a la caracterització del llot. Elaboració pròpia. Abril 2009.

Un cop s'ha caracteritzat l'inòcul, si tot és correcte, es procedeix al muntatge dels reactors.

A partir d'aquí, a cada reactor s'afegeix:

- 175mL d'inòcul procedent de la EDAR de Granollers.
- 125mL d'aigua de l'aixeta⁵.
- 1mL dissolució 1. Macronutrients. (Veure Taula 3.5.)
- 1mL dissolució 2. Elements traça. (Veure Taula 3.5.)
- 1mL dissolució 3⁶: (Veure Taula 3.5.)
- Punta d'espàtula d'extracte de llevat (S'afegeixen aproximadament 0,2g d'extracte de llevat·L⁻¹medi d'assaig).
- ≈ 1,5 g de bicarbonat de sodi per tal d'estabilitzar el pH.

Taula. 3.5. Composició química de les diferents dissolucions emprades per alimentar l'inòcul dels reactors.

⁵ S'empra aquesta proporció per tenir la concentració final de sòlids adequada.

⁶ Aquesta solució ha de preparar-se fresca abans de ser utilitzada.

Compost	Concentració afegida
Dissolució 1	
NH ₄ Cl	170 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	37 g·L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8 g·L ⁻¹
MgSO ₄ ·H ₂ O	9 g·L ⁻¹
Dissolució 2	
FeCl ₃ ·4H ₂ O	2000 mg·L ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2000 mg·L ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	500 mg·L ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
ZnCl ₂	50 mg·L ⁻¹
H ₃ BO ₃	50 mg·L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	90 mg·L ⁻¹
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	100 mg·L ⁻¹
NiCl ₂ ·6H ₂ O	50 mg·L ⁻¹
EDTA	1000 mg·L ⁻¹
HCl 36%	1 mL·L ⁻¹
Resazurin	500 mg·L ⁻¹
Dissolució 3	
Na ₂ S·9H ₂ O	100 g·L ⁻¹

Tots aquests compostos s'afegeixen a la totalitat dels reactors. A partir d'aquí, un reactor amb tot l'anterior sense res més és el blanc, que proporciona la producció de biogàs de l'inòcul.

Pel control, a més dels nutrients, s'afegeix també el dissolvent (1mL) però sense fàrmac. D'aquesta manera s'obté la producció de l'inòcul més la del dissolvent. Pel cas de l'activitat metanogènica el dissolvent és metanol, per l'activitat acetogènica és àcid propiònic en concentració de 7,5 g·L⁻¹ (Fountoulakis et al., 2008).

Una vegada s'han afegit els nutrients i preparat els blancs i els controls es procedeix al muntatge dels reactors amb els diferents fàrmacs. Es proven les concentracions de 5, 10 i 20 ppm per a la metanogènesi (Marco-Urrea et al., 2009.; Gartiser et al., 2007) i 20 i 100 ppm per a la acetogènesi (Fountoulakis et al., 2008) per estudiar si hi ha toxicitat/degradació a diferents dosi.

Per altra banda hi ha els reactors esterilitzats (amb el prefix E en el codi del reactor). Aquests contenen exactament el mateix que les ampolles amb 5, 10 i 20 ppm però en aquest cas l'inòcul està esterilitzat mitjançant l'autoclau P. SELECTA, AUTESTER E. Aquest pas, com s'ha dit anteriorment, només es va fer als primers experiments per tal

de comprovar a quina fase s'adsorbeix el fàrmac si no hi ha degradació ja que, un llot esterilitzat, al tenir el teixit bacterià desactivat, no pot degradar el fàrmac.

Per últim, es tanquen bé els reactors amb l'ajuda d'una clau anglesa i es purguen amb N_2 gas per evitar que hi hagi O_2 a l'interior ja que es tracta de bacteris anaerobis.

Un cop fet això, s'agiten els reactors per homogeneïtzar bé el contingut i es deixen a la cambra calenta a $37^\circ C$ per a que segueixin el procés de digestió.

3.2.2 Seguiment de la producció de biogàs

Quan el muntatge ja està preparat es va mesurant periòdicament la producció de biogàs de cada reactor mitjançant un manòmetre adaptat a les vàlvules dels taps utilitzats. Cada cop que es mesura una ampolla s'ha d'agitar abans i després d'efectuar el control manomètric, per homogeneïtzar el contingut periòdicament.



Imatge 3.3. Control baromètric dels reactors.
Elaboració pròpia. Abril 2009.

Durant la primera setmana hi ha poca activitat i mesurant cada 3 dies aproximadament és suficient. En canvi, quan la producció de biogàs és més elevada, cal controlar-la a diari per evitar fuites per l'alta pressió a l'interior de l'ampolla ja que en casos extrems l'ampolla podria arribar a esclatar.

Per últim, en els darrers dies de l'experiment també hi ha poca producció, i quan la producció és pràcticament zero es deixa de mesurar l'evolució del biogàs i es dona per finalitzat el seguiment.

Segons l'increment de pressió de cada dia de mesura es calculen els mL de biogàs produïts a diari, i a partir d'aquí, els mL de biogàs acumulats al llarg de tot l'experiment, que és el que es representa gràficament. Aquest procediment s'efectua seguint la llei dels gasos ideals, aplicant Boyle-Mariotte i els factors de conversió corresponents, on:

$$\left(\frac{P \cdot V}{T}\right)_i = \left(\frac{P \cdot V}{T}\right)_f$$

- P_i =Pressió en c.n. (1atm).
- T_i =Temperatura en c.n. (273K).
- V_i =Volum de l'espai en cap, *headspace* (50mL).
- P_f =Pressió que ens proporciona el manòmetre.
- T_f =Temperatura de la cambra calenta (310K).
- V_f =volum de biogàs produït (incògnita).

A part, es caracteritza el biogàs per saber la proporció de CH_4 i CO_2 que té. Per tal de fer això ha d'haver-hi un mínim de 0,15Pa de pressió al reactor. (veure apartat 3.3. Mètodes analítics)

3.2.3. Desmuntatge de l'experiment

Un cop ja no hi ha producció de biogàs significativa es procedeix a l'obertura dels reactors per realitzar les analítiques pertinents. Quan s'obren, es mesura el pH, els sòlids totals i els sòlids volàtils d'alguns reactors seguint el procediment explicat a l'apartat 3.2.1., comprovant així l'estat de l'inòcul.

Un cop fet això, s'agafa el contingut d'un dels 3 triplicats de cada concentració de fàrmac diferent i es fa el pretractament de la mostra per tal de poder-la analitzar i quantificar posteriorment.

Pretractament per anàlisi amb HPLC:

1. Sobrenedant:

- Es centrifuga a 6000 rpm a 25°C durant 15 minuts a la centrífuga BECKMAN J2-21.

- S'agafen alguns mL de sobrenedant amb una xeringa de 5mL de capacitat i a aquesta se li acobla un filtre de 0,45NYL.
- Es fa pressió sobre l'èmbol de la xeringa filtrant així el sobrenedant i posant el filtrat a un vial d' HPLC AGILENT amb tap de rosca.
- Aquesta operació es fa per duplicat: un dels vials es congela a -20°C per si calgués fer anàlisis futures i l'altre el deixem a la cambra freda a -5°C preparat per l'anàlisi cromatogràfica a l'HPLC.

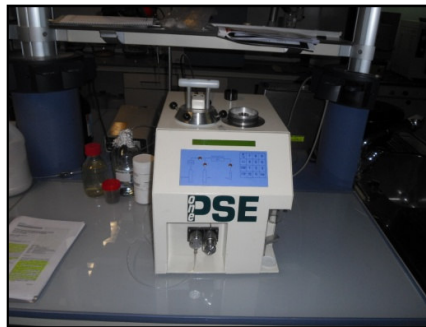
2. Llot:

- S'agafa el llot de la centrifugació de l'apartat anterior amb l'espàtula i es col·loca a un pot de plàstic. Aquest es diposita al congelador a -20°C per si més tard calgués fer una extracció en fase sòlida. En cas que fos necessari fer l'extracció es segueix el pretractament tal i com s'explica en els següents punts.
- Es col·loca la mostra de llot en un recipient de vidre especial per liofilitzar i es deixa durant 24h en el congelador a -80°C.
- Es col·loca un tap de goma amb un filtre incorporat en el recipient anterior.
- Es col·loca el recipient de vidre a la vàlvula del liofilitzador VIRTIS SENTRY BENCHTOP 5B amb bomba EDWARDS RV5. Estarà liofilitzant durant 24h més. En aquest pas s'aconsegueix assecar la mostra completament, ja que l'aigua de la mostra passa d'estat sòlid a gas directament per l'elevada pressió negativa que exerceix l'aparell.
- Un cop la mostra està preparada per l'extracció, s'agafa una quantitat coneguda i es pesa ($\approx 0,6$ g ja que més quantitat dificulta l'extracció en el sistema utilitzat).
- Es barreja bé la mostra liofilitzada amb una sorra inert per donar-li porositat a la mostra, es col·loca tot a la columna d'extracció amb un disc de paper de filtre a la part inferior i es comença l'extracció mitjançant l'extractor en fase sòlida ONE PSE Applied Separations.
- Es realitzen 3 cicles d'extracció a 103 bar de pressió i 100°C de temperatura segons el mètode descrit per (Miao, 2003). Combinant altes temperatures i pressions s'aconsegueix, passant un eluent (metanol-aigua (1/2) (v/v)) per la columna, un extracte de la mostra.

- Aquest extracte, s'enrasa en un volum conegut amb el mateix eluent utilitzat per l'extracció anterior, s'agafa una alíquota que es filtra de la mateixa manera que al segon apartat del pretractament del sobrenedant, i es col·loca en un vial d'HPLC.



Imatge 3.4. Centrífuga Beckman.
Elaboració pròpia. Abril 2009.



Imatge 3.5. Extractor PSE.
Elaboració pròpia. Abril 2009.

3.3. Mètodes analítics

La quantificació es fa mitjançant l'HPLC Dionex 3000 ULTIMATE equipat amb un detector d'UV a 230 nm i a una temperatura de 30 °C. El volum de mostra injectada és de 20µL, i es fa mitjançant l'automostrejador DIONEX. La separació cromatogràfica s'aconsegueix amb una columna GraceSmart RP18 (250mm x 4.6mm, 5µm), segons el mètode descrit per Stafiej et al., (2007). Els eluents utilitzats per l'anàlisi són àcid acètic 6.9 mmol·L⁻¹(A), preparat amb 394 µL en 1 L d'aigua MilliQ i ajustat a pH 4, i acetonitril (B). El mètode utilitzat és isocràtic⁷, utilitza un 65% i 35% dels eluents A i B respectivament amb un flux d'1 mL·min⁻¹.

Els límits de detecció són de <0,5mg·L⁻¹per l'ibuprofè i de <0,2mg·L⁻¹per la carbamazepina i l'àcid clofíbric.

La caracterització del biogàs es fa mitjançant l'equip de GC HP 5890.

La columna cromatogràfica utilitzada és una PORAPAK. El volum de mostra injectada és de 100µL, i es fa mitjançant una xeringa i de forma manual. La temperatura de l'injector és de 150 °C, la temperatura del detector és 180°C i la temperatura de la

⁷ La fase mòvil és de composició constant al llarg del temps.

columna de 130°C. El detector utilitzat és de flama ionitzant (FID). El gas portador emprat és l'heli.

3.4. Anàlisi estadística

La significància estadística dels valors s'ha realitzat per les mitjanes del F-test (anàlisi de la variança) i el test de la t-student. Ambdós amb el nivell de probabilitat del 5% utilitzant el paquet estadístic SPSS 15.0. Les diferències son estadísticament significatives quan la probabilitat del resultat, assumint l'hipòtesi nul·la, és de menys de 0,05.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Activitat de l'inòcul

En primer lloc s'ha realitzat un experiment per comprovar que l'activitat metanogènica de l'inòcul és correcte i es pot utilitzar en els experiments plantejats. L'inòcul emprat es va obtenir provinent del digester anaerobi d'una EDAR. L'assaig s'ha realitzat per quadruplicat. La corba de producció de biogàs obtinguda és la que es mostra a la Fig. 4.1.

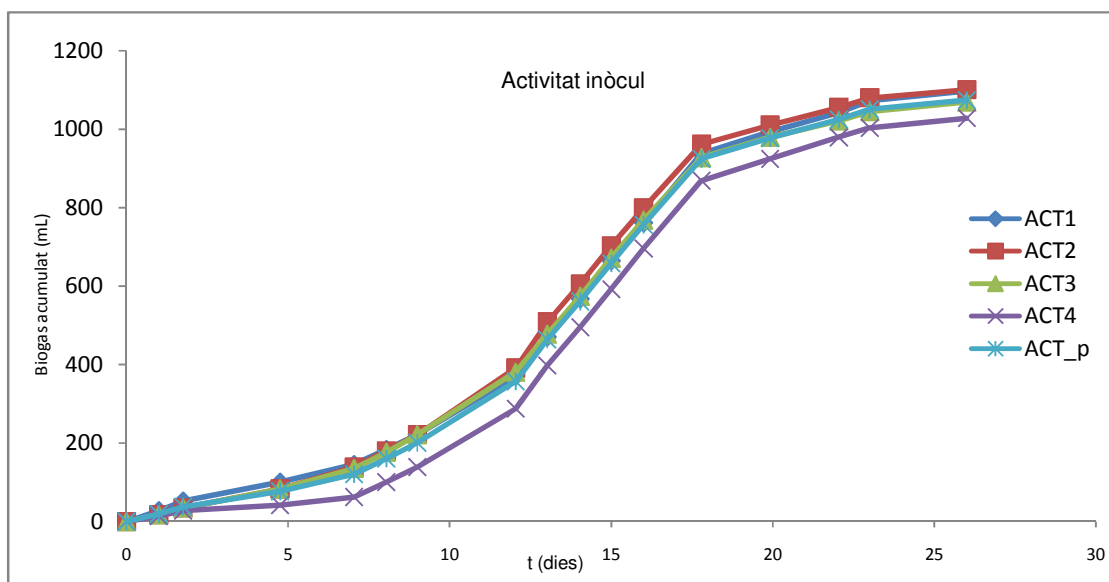


Fig. 4.1. Activitat de l'inòcul. Temps = 26 dies.

Taula. 4.1. Condicions inicials inòcul Granollers novembre 2008.

% Humitat	% ST	% SV	g ST/L	g SV/L	pH
99,69	0,31	54,94	2,94	1,61	7,25

A la Fig. 4.1. es representa el volum de biogàs acumulat en funció del temps en els 4 reactors provats juntament amb el promig de tots 4 (ACT_p). Amb això, juntament amb la Taula 4.1., on es representen el percentatge d'humitat, els sòlids totals i volàtils en percentatge i en quantitat i el pH, s'observa que el llot està en bones condicions i és adequat per començar l'experiment amb fàrmacs. El gràfic representa un primer període de latència, on es produeix l'activació de la població a les noves condicions. A partir d'aquí, una fase de creixement exponencial on està el major increment de

producció de biogàs ja que els nutrients abunden. Per últim, una fase d'estancament, on els nutrients comencen a ser un factor limitant.

4.2. Activitat metanogènica

En aquest apartat s'exposaran els resultats de la primera part del treball, on es promouen els bacteris metanogènics ja que el substrat utilitzat és el metanol.

4.2.1. Àcid clofíbric

En primer lloc, s'estudia la influència de l'àcid clofíbric en la producció de biogàs fent un test de toxicitat tal i com s'explica a l'apartat de materials i mètodes. El que es representa és el biogàs acumulat al llarg de l'experiment en funció del temps, depenent de les diferents concentracions (Fig. 4.2.). Cal dir que en aquest primer experiment el volum que s'afegeix al reactor de la dissolució de fàrmac en metanol varia segons la concentració final que es volia obtenir. És a dir, s'afegeixen diferents volums de substrat a cada tipus de reactor, i per això cada tipus de reactor té el seu respectiu control. A partir del següent fàrmac, es fa una dissolució mare del medicament a estudiar en el substrat per a cada concentració de fàrmac, de manera que afegit 1mL de dissolució a cada reactor, s'aconsegueix la concentració final desitjada i només cal un control.

Observant els resultats, es veu que hi ha moltes diferències en les corbes obtingudes pels diferents reactors.

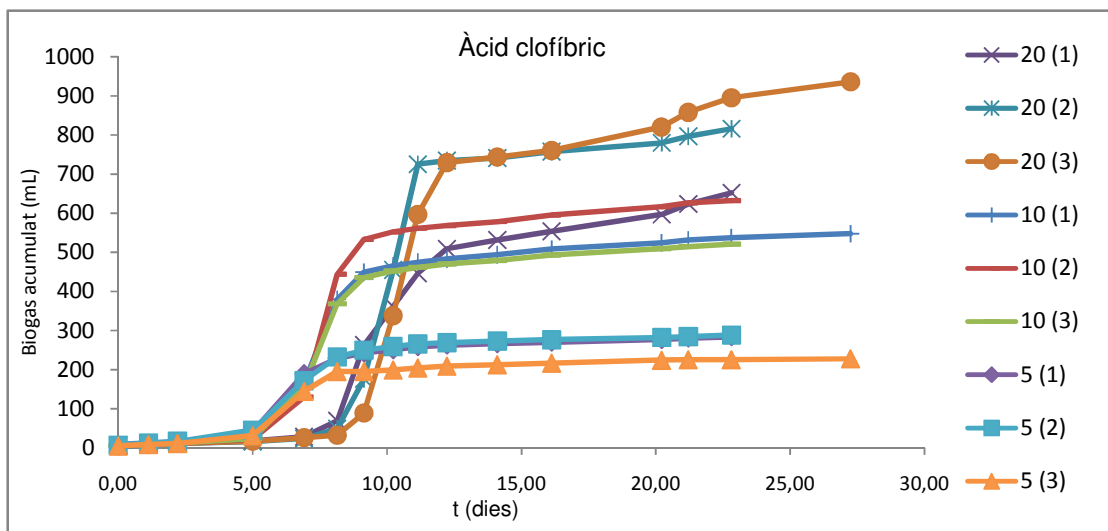


Fig 4.2. Influència de l'àcid clofíbric en la de producció de biogàs dels bacteris metanògens. Concentracions d'àcid clofíbric de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. No s'han representat els controls del metanol ni de l'inòcul.

Això es deu bàsicament a l'efecte del metanol, ja que és un substrat directe dels metanògens i, per tant, afegir diferents quantitats fa variar notablement la producció.

A la Taula 4.2., es presenta la producció de biogàs acumulada de cadascuna de les 3 concentracions provades de fàrmac amb metanol, amb el seu propi control de metanol i un cop restada l'activitat de l'inòcul. A més es presenta el promig i la desviació estàndard de cada triplicat.

Taula 4.2. Producció acumulada de biogàs amb metanol i àcid clofíbric. Temps = 23 dies. Valors amb X s'han descartat per problemes experimentals.

Reactor	1	2	3	Promig	Desv. Est.
20 ppm	583,5	747,9	826,8	719,4	124,1
Control 20	886,0	523,5	x	704,7	256,3
10 ppm	469,3	564,0	452,6	495,3	60,1
Control 10	501,9	x	x	501,9	-
5 ppm	215,8	220,2	157,0	197,7	35,3
Control 5	151,1	202,6	203,9	185,8	30,1

Amb l'ajuda de la Taula 4.3., on es presenta la comparativa estadística entre els reactors i els respectius controls, es pot veure que no hi ha diferències significatives entre cap reactor i el seu control. És per aquesta raó que pels resultats obtinguts es pot dir que l'àcid clofíbric no afecta a la producció de biogàs d'un llot en condicions anaeròbies. No és tòxic en aquestes concentracions. És a dir, no hi ha més producció que indicaria que el fàrmac s'està degradant, ni tampoc menys producció, que indicaria que el fàrmac comporta toxicitat cap al llot anaerobi.

Taula 4.3. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

	Control 20 ppm	Control 10 ppm	Control 5 ppm
20 ppm	0,934		
10 ppm		0,933	
5 ppm			0,682

* Hi ha diferències significatives quan $p < 0,05$

4.2.2. Carbamazepina

En el següent gràfic (Fig. 4.3.) es representa la producció de biogàs del llot anaerobi amb el segon fàrmac estudiat, la carbamazepina. Com en el cas anterior, es torna a representar la quantitat de biogàs acumulada en funció del temps.

El blanc (B) és la producció de l'inòcul. El control és la producció de l'inòcul i del metanol. A més, estan les produccions de les diferents concentracions provades: 20, 10 i 5 ppm. Tots aquests reactors es preparen per triplicat.

Cal dir que a partir d'aquest compost en endavant, s'ha fet una dissolució mare del fàrmac en el substrat per a cada concentració de compost químic, de manera que afegint 1mL de dissolució a cada reactor, s'aconsegueix la concentració final desitjada. D'aquesta manera, la quantitat de substrat afegida als reactors és sempre la mateixa i només cal utilitzar un control que serveix per a la totalitat de concentracions, que porta 1mL de metanol també. Així s'elimina l'efecte substrat sense fer un control específic per a cada concentració.

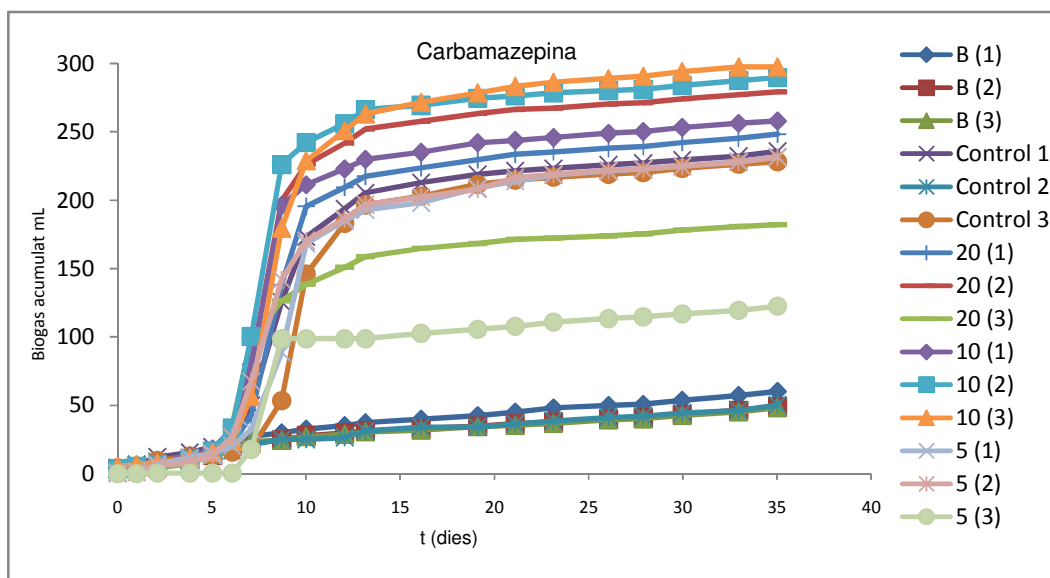


Fig 4.3. Influència de Carbamazepina en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris metanògens. Concentracions de carbamazepina de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+metanol.

A la Taula 4.4., es presenten les 3 concentracions provades de carbamazepina amb metanol juntament amb els 3 controls de metanol generals amb els promitjos i desviacions estàndards de cada triplicat. A tots ja se'ls ha restat l'activitat de l'inòcul (Blanc). Comparant amb el control, es veu que 5 ppm de carbamazepina donen exactament el mateix que el control, per tant no afecten per res. Per a les altres dues concentracions (10 i 20 ppm) s'aprecia que són lleugerament més altes, però com no

hi ha diferències significatives (veure Taula 4.5.), es pot dir que cap concentració afecta al bon funcionament de l'inòcul. Per tant, es pot concloure que la carbamazepina no presenta toxicitat en cap de les 3 concentracions estudiades.

Taula 4.4. Producció acumulada de biogàs amb metanol i carbamazepina. Temps = 35 dies.

Reactor	1	2	3	Promig	Desv. Est.
Control	183,3	x	175,8	179,5	5,4
20 ppm	195,8	227,0	x	211,4	22,0
10 ppm	205,6	237,4	245,2	229,4	21,0
5 ppm	179,4	179,0	x	179,2	0,3

Taula 4.5. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

	Control	20 ppm	10 ppm	5 ppm
Control	1	0,194	0,046	0,799
20 ppm		1	0,411	0,180
10 ppm			1	0,047
5 ppm				1

* Hi ha diferències significatives quan $p < 0,05$

Observant la Taula 4.6, on es presenta el pH a l'inici i al final de l'assaig, es veu que els pH estan en un rang raonable, acabant en la neutralitat. Això indica un bon funcionament dels reactors.

Taula 4.6. pH inicial i final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i carbamazepina en metanol. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+metanol. E= inòcul esterilitzat.

Reactor (ppm)	pH inicial	pH final
Control 1		7,43
Control 2	8,42	7,53
Control 3		7,41
Blanc 1		7,42
Blanc 2	7,82	7,26
Blanc 3		7,31
5.1 (5 ppm)		7,43
5.3 (5 ppm)		7,67
10.1 (10 ppm)		7,47
10.3 (10 ppm)		7,37
20.1 (20 ppm)	8,28	7,45
20.3 (20 ppm)		7,41
E5.2 (5 ppm)		7,87
E10.1 (10 ppm)		8,03
E20.1 (20 ppm)		8,00

Les taules 4.7 i 4.8. mostren els paràmetres de caracterització dels reactors (humitat, sòlids totals i volàtils) a l'inici i al final de l'experiment respectivament.

Es pot dir que els bacteris, representats pels SV, han disminuït d'una forma semblant als ST (veure % reducció). Per tant, els bacteris que han mort ho han fet per la durada temporal de l'experiment en sí, no perquè hi hagi hagut algun problema amb l'inòcul.

Taula 4.7. Caracterització reactor inici carbamazepina.

% Humitat	% ST	% SV	g ST/L	g SV/L
98,55	1,45	62,82	14,54	9,13

Taula 4.8. Caracterització reactors final carbamazepina.

Reactor	% Humitat	% ST	% SV	g ST/L	g SV/L
20.1 (20 ppm)	98,84	1,16	46,26	11,59	5,36
10.1 (10 ppm)	98,85	1,15	46,10	11,50	5,30
5.2 (5 ppm)	98,84	1,16	46,74	11,56	5,41
% reducció				79%	59%

A la vista dels resultats anteriors, per a les concentracions assajades, no s'observa major producció de biogàs que en els controls. Per tant es conclou que la carbamazepina no es degrada anaeròbiament.

Per corroborar aquesta conclusió, al final de l'experiment es quantifica la carbamazepina que roman, ja que si no s'ha degradat ha d'estar en la fase líquida (sobrenedant) o adsorbida en la fase sòlida (llot).

L'anàlisi del sobrenedant per HPLC es mostra a la Taula. 4.9. juntament amb l'anàlisi del llot esterilitzat.

La quantitat de carbamazepina recuperada en el sobrenedant del llot esterilitzat és aproximadament d'un 50%. Tenint en compte que al llot esterilitzat no pot haver-hi degradació, es dedueix que en aquests reactors autoclavats el que no s'ha recuperat al sobrenedant ha d'estar adsorbit al llot.

Als reactors anaerobis no autoclavats de 10 i 20 ppm es recuperen valors similars als autoclavats (≈50%). Per tant, com segons el test de biogàs no hi ha degradació, la carbamazepina que no s'ha quantificat en el sobrenedant estarà adsorbida al llot.

Taula 4.9. Concentració final de carbamazepina en els reactors. Nombres en vermell els considerem erronis i no s'han tingut en compte. Concentracions de carbamazepina de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. (E= inocul esterilitzat).

Reactor	Carbamazepina (ppm)
5.1 (5 ppm)	5,09
5.3 (5 ppm)	0,85
10.2 (10 ppm)	6,77
10.3 (10 ppm)	4,67
20.1 (20 ppm)	11,59
20.2 (20 ppm)	10,95
E5.2 (5 ppm)	2,83
E10.1 (10 ppm)	6,01
E20.1 (20 ppm)	11,57

4.2.3. Ibuprofè

En la Fig. 4.4. es representa la producció de biogàs per a l'experiment realitzat amb ibuprofè. Com en els experiments anteriors, s'observa el biogàs acumulat en funció del temps i que comença a arrencar el creixement a partir de la setmana aproximadament. En aquest cas, totes les corbes de producció de biogàs estan força solapades, per tant es fa difícil treure resultats concloents amb el gràfic.

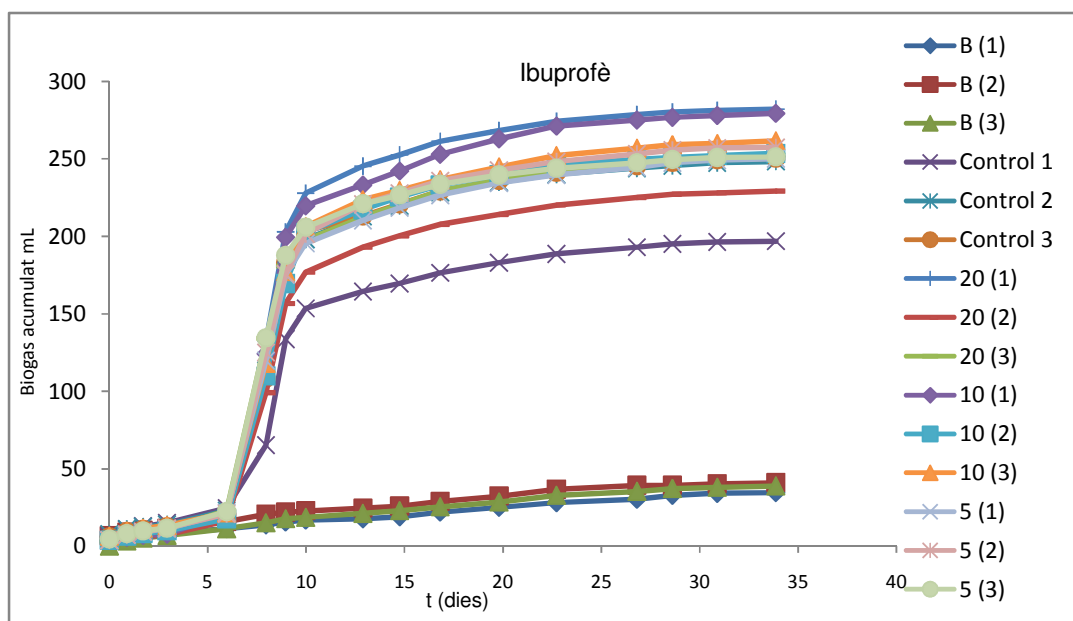


Fig 4.4. Influència d'ibuprofè en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris metanògens. Concentracions d'ibuprofè de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+metanol.

A la Taula 4.10., es mostren les produccions totals amb l'activitat de l'inòcul restada de les 3 concentracions provades i del control. També es presenta el promig i la desviació estàndard dels triplicats. Es veu que, tot i què les 3 concentracions provades donen produccions lleugerament més elevades que el control, no es troben diferències significatives (veure Taula 4.11.). Per tant, es pot dir que l'ibuprofè en aquestes concentracions tampoc no genera cap mena de toxicitat o inhibició sobre l'activitat metanogènica del llot ni es degrada.

Taula 4.10. Producció acumulada de biogàs amb metanol i ibuprofè. Temps= 34 dies.

Reactor	1	2	3	Promig	Desv. Est.
Control	158,6	210,1	212,2	193,6	30,4
20 ppm	243,8	191,0	214,4	216,4	26,4
10 ppm	241,2	215,3	223,5	226,7	13,3
5 ppm	211,8	219,2	213,1	214,7	3,9

Taula 4.11. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P

	Control	20 ppm	10 ppm	5 ppm
Control	1	0,390	0,165	0,294
20 ppm		1	0,594	0,947
10 ppm			1	0,240
5 ppm				1

* Hi ha diferències significatives quan $p < 0,05$

Respecte a la caracterització dels reactors (Taula. 4.12.), es mostra el pH d'alguns reactors a l'inici i al final de l'assaig. S'observa que tant a l'inici com al final de l'assaig trobem pHs dins la neutralitat, per tant els resultats corroboren un bon funcionament del mateix.

Taula 4.12. pH inicial i final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i ibuprofè en metanol. Concentracions d'ibuprofè de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. Blanc=inòcul. Control= inòcul+metanol. E= inocul esterilitzat.

Reactor	pH inicial	pH final
Control 1		7,34
Control 2	8,04	
Control 3		7,38
Blanc 1		7,18
Blanc 2	7,65	
Blanc 3		7,18
5.1 (5 ppm)		7,37
5.3 (5 ppm)		7,36
10.1 (10 ppm)		7,46
10.3 (10 ppm)		7,36
20.1 (20 ppm)	8,06	7,37
20.3 (20 ppm)		7,39
E5.1 (5 ppm)		7,54
E10.1 (10 ppm)		7,35
E20.1 (20 ppm)		7,4

Per últim, la taula 4.13 mostra la recuperació de fàrmac mesurada amb l'HPLC per a cada reactor. S'observen recuperacions força baixes. Per tant es pot dir que com segons el test de biogàs l'ibuprofè no es degrada, la diferència entre la quantitat de fàrmac afegida inicialment i la que es recupera al sobrenedant, hauria d'estar adsorbida al llot.

Taula 4.13. Concentració final d'ibuprofè en els reactors. Concentracions d'ibuprofè de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. E= inocul esterilitzat.

Reactor	Ibuprofè (ppm)
5.1 (5 ppm)	1,97
5.3 (5 ppm)	0,09
10.1 (10 ppm)	0,23
10.3 (10 ppm)	1,24
20.1 (20 ppm)	2,24
20.3 (20 ppm)	2,62
E5.1 (5 ppm)	1,98
E10 (10 ppm)	4,37
E20 (20 ppm)	8,52

4.3. Activitat acetogènica

En els experiments presentats en l'apartat anterior (4.2.) s'ha avaluat l'efecte dels fàrmacs carbamazepina, ibuprofè i àcid clofíbric sobre els bacteris metanògens utilitzant com a substrat el metanol. A continuació es presenten els resultats dels experiments realitzats per avaluar l'efecte d'aquests mateixos fàrmacs sobre una altra població de bacteris, molt important en els reactors anaerobis, com són els acetògens utilitzant com a substrat l'àcid propiònic. En aquest cas les concentracions de fàrmac estudiades són 20 i 100 ppm amb els respectius blancs i controls (Fountoulakis et al., 2008; Gartiser et al. 2007.). El substrat proporcionat és l'àcid propiònic, afegint 1mL a un volum final de 300mL, ja que és el que potencia l'activitat dels bacteris acetogènics.

La caracterització de l'inòcul es mostra a la Taula. 4.14. Es presenten els paràmetres d'humitat, sòlids totals, volàtils i pH. El pH dins la neutralitat posa de manifest les bones condicions del llot.

Taula 4.14. Condicions inicials inòcul Granollers abril 2009.

% Humitat	% ST	% SV	g ST/L	g SV/L	pH
98,50	1,50	43,75	14,95	6,54	7,23

4.3.1. Carbamazepina

Per al cas de la carbamazepina, a la Fig. 4.5., es mostra la quantitat de biogàs acumulat en funció del temps per a les dues concentracions provades (20 i 100 ppm), el blanc (activitat de l'inòcul) i el control (activitat de l'inòcul amb àcid propiònic). S'observa que les corbes producció de biogàs en els reactors està solapada amb el control o lleugerament per sota.

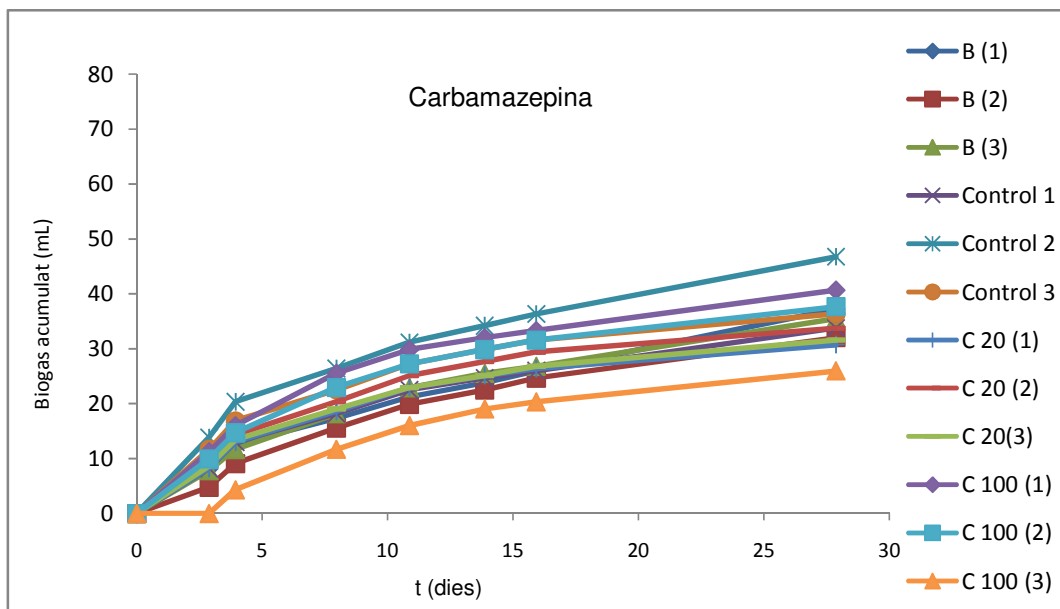


Fig 4.5. Influència de carbamazepina en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris acetògens. Concentracions de carbamazepina de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+àcid propiònic.

A la taula 4.15. es presenten els resultats de producció de biogàs final per al control amb propiònic i per als reactors amb carbamazepina i propiònic, després de restar la producció de biogàs de l'inòcul (blanc). Els resultats negatius indiquen que en alguns casos la producció de biogàs deguda al fàrmac ha estat inferior a la de l'inòcul. Això pot ser causat perquè el propiònic s'ha pogut degradar fins a l'àcid acètic però no fins a metà, per tant, no es veu un increment de pressió ja que no es produeix biogàs en l'etapa acetogènica.

No obstant, com les diferències no són significatives (veure Taula 4.16.), no es pot dir que la carbamazepina en aquestes dues concentracions sigui tòxica.

Taula 4.15. Producció acumulada de biogàs amb àcid propiònic i carbamazepina. Temps= 28 dies.

Reactor	1	2	3	Promig	Desv. Est.
Control	-1,2	11,8	1,4	4,0	6,9
20 ppm	-4,2	-1,2	-3,3	-2,9	1,6
100 ppm	5,8	2,7	-8,9	-0,1	7,8

Taula 4.16. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

	Control	20 ppm	100 ppm
Control	1	0,219	0,524
20 ppm		1	0,606
100 ppm			1

* Hi ha diferències significatives quan $p < 0,05$

A la taula 4.17 es mostra el pH al final de l'assaig. Es veu que, com en els casos anteriors, es mantenen al voltant de la neutralitat, que indica que no hi ha massa producció d'àcids grassos volàtils (AGVs) que provoquin toxicitat.

Taula 4.17. pH final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i carbamazepina en àcid propiònic.

Reactor	pH
C 20.1 (20 ppm)	7,50
C 100.1 (100 ppm)	7,42

Respecte a la quantificació de carbamazepina en el sobrenedant dels reactors al final de l'experiment (Taula 4.18), es veu que de les 20 ppm es recupera aproximadament la meitat, i que de les 100 ppm es recuperen dos tercers parts. Amb el test de biogàs es veu que no hi ha més producció que en els controls. Amb això es dedueix que la carbamazepina no s'ha degradat en cap de les dues concentracions provades. Per tant, el que no s'ha recuperat al sobrenedant del reactor és d'esperar que estigui adsorbit en el llot.

Taula 4.18. Concentració final de carbamazepina en els reactors.

Reactor	Carbamazepina (ppm)
C 20.1 (20 ppm)	11,49
C 100.1 (100 ppm)	66,99

4.3.2. Ibuprofè

A la Fig. 4.6. es presenta la producció de biogàs acumulada en funció del temps de les dues concentracions provades d'ibuprofè (20 i 100 ppm), juntament amb la producció de l'inòcul (Blanc) i la producció de l'inòcul amb l'àcid propiònic (Control). Es veu que tots els reactors segueixen una producció molt semblant i es fa difícil treure conclusions amb el gràfic.

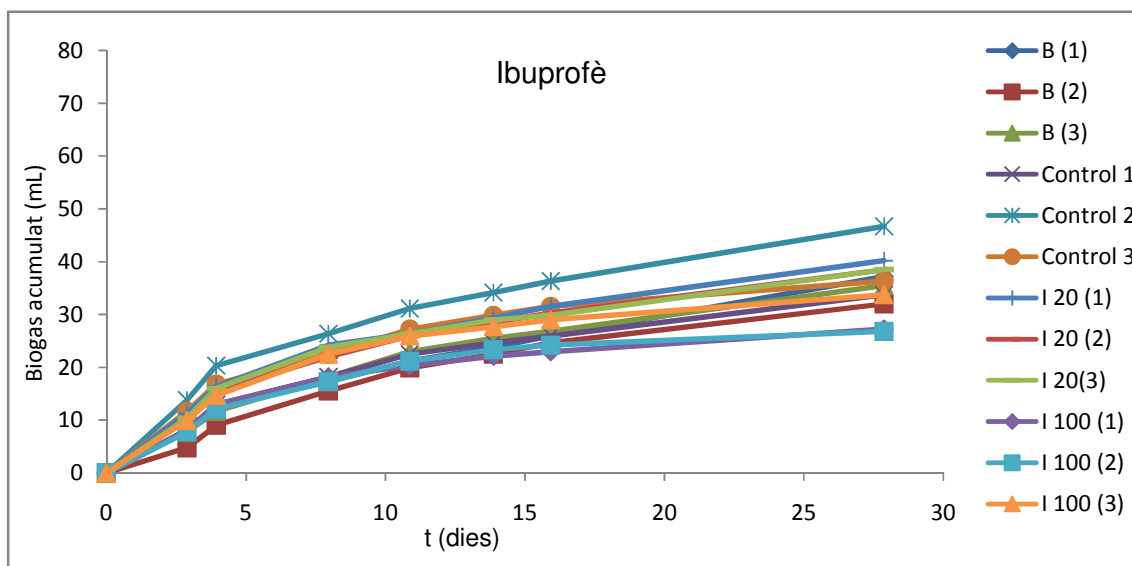


Fig 4.6. Influència de l'ibuprofè en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris acetògens. Concentracions d'ibuprofè de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+àcid propiònic.

Observant la taula. 4.19., que mostra la producció total de cada reactor un cop restada la producció de l'inòcul (blanc), juntament amb el promig i la desviació estàndard de cada triplicat, es veu que la producció promig dels reactors amb 20 de ppm de fàrmac són pràcticament iguals que el control. Per tant, es pot dir que 20 ppm d'ibuprofè, aparentment no són tòxiques per als bacteris acetogènics.

Com en el cas de la carbamazepina, es tornen a donar alguns valors negatius, en aquest cas, per als reactors amb 100 ppm de fàrmac. Això significa que els reactors només amb l'inòcul (blanc) tenen una producció lleugerament més alta que aquests reactors de 100 ppm. No obstant, com no hi ha diferències significatives (veure Taula 4.20), tot i què la producció per la concentració de 100 ppm és lleugerament més petita que el control, no es pot dir que 100 ppm d'ibuprofè suposin cap inconvenient en quant a toxicitat per als bacteris acetogènics.

Taula 4.19. Producció acumulada de biogàs amb àcid propiònic i ibuprofè. Temps= 28 dies.

Reactor	1	2	3	Promig	Desv. Est.
Control	-1,2	11,8	1,4	4,0	6,9
20 ppm	5,3	3,6	3,6	4,2	1,0
100 ppm	-7,6	-8,1	-1,2	-5,6	3,9

Taula 4.20. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades. Nivell de Significancia P.

	Control	20 ppm	100 ppm
Control	1	0,974	0,119
20 ppm		1	0,41
100 ppm			1

* Hi ha diferències significatives quan $p < 0,05$

La caracterització del pH dels reactors després de l'assaig (Taula 4.21.) un cop finalitzat l'assaig ens dona valors al voltant de la neutralitat que confirmen també el bon funcionament de l'experiment.

Taula 4.21. pH final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i ibuprofè en àcid propiònic.

Reactor	pH
I 20.1 (20 ppm)	7,42
I 100.1 (100 ppm)	7,49

Per últim, en quant a la quantificació de l'ibuprofè en el sobrenedant del final de l'experiment, es pot dir que aproximadament la meitat del fàrmac s'adsorbeix al llot ja que, com en casos anteriors, si aquest medicament no s'està degradant i no es recupera en la seva totalitat o similar en la fase líquida (sobrenedant), significa que estarà a la fase sòlida (llot). (Veure Taula 4.22).

Taula 4.22. Concentració final d' ibuprofè en els reactors.

Reactor	Ibuprofè (ppm)
I 20.1 (20 ppm)	7,78
I 100.1 (100 ppm)	57,05

4.3.3. Àcid clofíbric

En la Fig. 4.7. es presenten els resultats de la producció de biogàs acumulada respecte al temps per a l'àcid clofíbric. Per aquest fàrmac les produccions de biogàs dels reactors de 20 ppm són molt semblants al control, per tant, per aquesta concentració es pot dir que no hi ha cap mena de toxicitat ni afectació alguna.

Per altra banda, per a la concentració de 100ppm, es veu al gràfic (Fig. 4.7.) que hi ha dues corbes marcadament per sobre de la resta. Per aquesta concentració es donen produccions significativament més elevades (veure Taula 4.24) respecte al control, per tant, es pot dir que l'àcid clofíbric en aquesta concentració sembla que es degrada en condicions anaeròbiques. Quantitativament, a la Taula 4.23. on es presenta la producció total de cada reactor amb l'activitat de l'inòcul restada, juntament amb els promitjos i desviacions estàndards de cada triplicat, es veuen les diferències entre el promig del Control i el promig dels reactors amb 100 ppm de fàrmac.

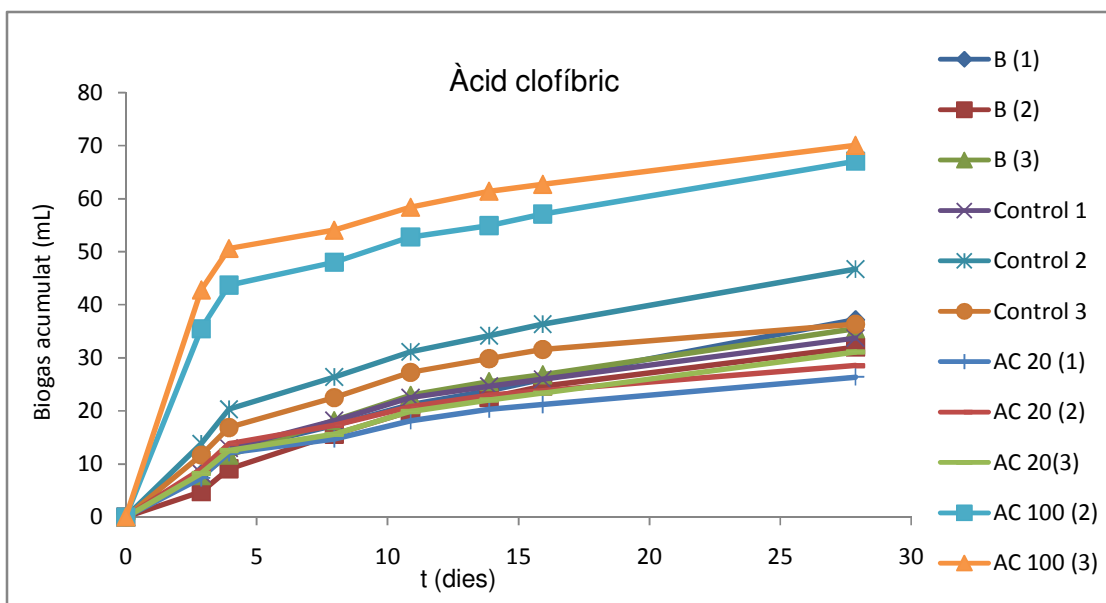


Fig 4.7. Influència de l'àcid clofíbric en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris acetògens. Concentracions d'àcid clofíbric de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+àcid propiònic.

Taula 4.23. Producció acumulada de biogàs amb àcid propiònic i àcid clofíbric. Temps= 28 dies. Reactors amb x no s'han tingut en compte per problemes experimentals.

Reactor	1	2	3	Promig	Desv. Est.
Control	-1,2	11,8	1,4	4,0	6,9
20 ppm	-8,5	-6,3	-3,7	-6,2	2,4
100 ppm	x	32,2	35,2	33,7	2,1

Taula 4.24. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

	Control	20 ppm	100 ppm
Control	1	0,111	0,011
20 ppm		1	0,010
100 ppm			1

* Hi ha diferències significatives quan $p < 0,05$

La caracterització al final de l'assaig, un cop més, indica que no hi hagut cap problema i tot el funcionament ha anat correctament. (Veure Taula 4.25. i Taula 4.26. on es representa el pH, humitat, sòlids totals i volàtils d'alguns reactors).

Taula 4.25. pH final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i àcid clofíbric en àcid propiònic. Concentracions d'àcid clofíbric de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=inòcul. Control=inòcul+àcid propiònic.

Reactor	pH
A.C. 20.1 (20 ppm)	7,48
A.C. 100.1 (100 ppm)	7,43
Control	7,41
Blanc	7,43

Taula 4.26. Caracterització reactors al final de l'experiment.

Reactor	% Humitat	% ST	% SV	g ST/L	g SV/L
A.C 100.1	98,61	1,39	46,59	13,34	6,22

Respecte a la quantificació de l'àcid clofíbric en els reactors (Taula 4.27.) es veu que del reactor de 20 ppm quasi no es recupera gens. Això pot indicar que la majoria d'aquest fàrmac queda adsorbit al llot, ja que a aquesta concentració no s'aprecia degradació en el test de biogàs.

En canvi, per als reactor de 100 ppm, igualment es recupera molt poc ($\approx 3\%$). Però en aquest cas, si que sembla que hagi existit degradació en les corbes de producció de biogàs. Per tant, es pot concloure que 100 ppm d'àcid clofíbric semblen degradar-se en un test d'activitat acetogènica.

Taula 4.27. Concentració final d' àcid clofíbric en els reactors.

Reactor	Àcid clofíbric (ppm)
20.1 (20 ppm)	1,01
100.1 (100 ppm)	2,99
100.2 (100 ppm)	3,81

Un fet que corrobora aquesta degradació és el cromatograma del reactor d'àcid clofíbric de 100 ppm obtingut amb l'HPLC (Fig. 4.8.).

S'observa que part de l'àcid clofíbric surt en un primer pic als 6,7 minuts. Just després hi ha un segon pic no quantificat ni determinat que surt als 7,2 minuts. Es pot deduir que l'ibuprofè que no s'ha recuperat s'ha degradat donant un metabòlit o producte de la degradació desconegut que és el que mostra el segon pic.

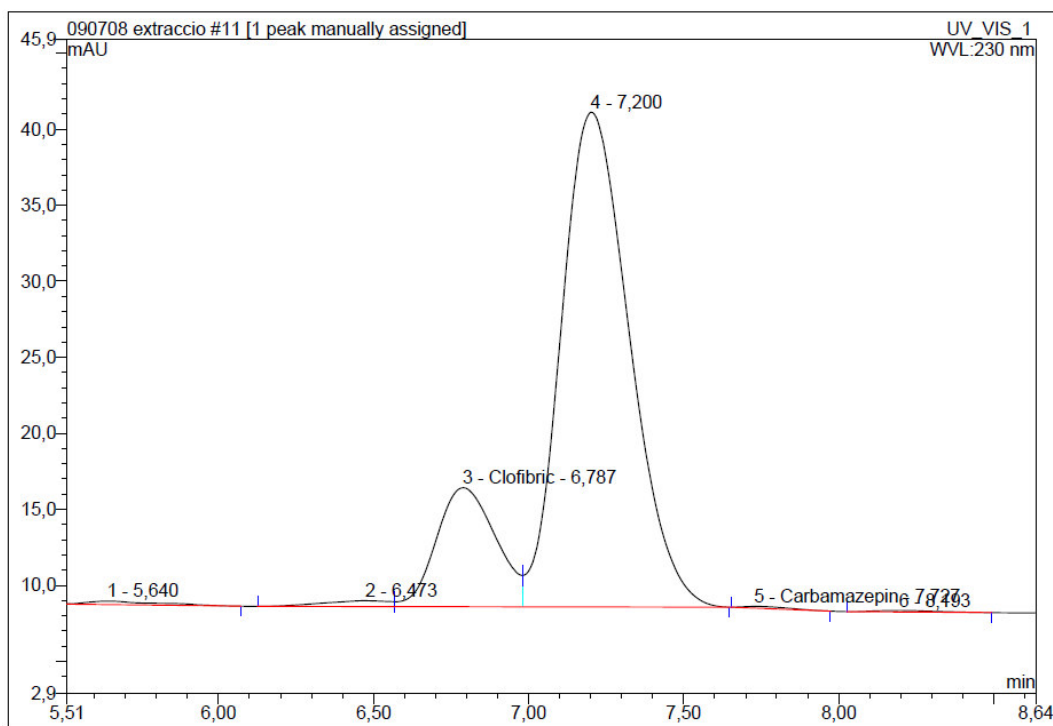


Fig 4.8. Cromatograma HPLC de l'àcid clofíbric en concentració de 100 ppm al final de l'assaig.

Per últim es va procedir a la caracterització del biogàs d'alguns reactors per corroborar la validesa de l'experiment. A la Taula 4.28 es presenta la composició del biogàs de diferents reactors al final de l'experiment en concentració i en percentatge. Tenint en compte que el biogàs ha de tenir una composició entre un 55-70% de metà i un 27-44% de CO₂ depenent de l'origen dels desfets emprats per produir-lo (Carrillo, 2003), es pot dir que l'experiment ha funcionat amb normalitat, ja que així ho demostren les dades.

Taula 4.28. Caracterització del biogàs mitjançant GC. Concentració i percentatge de metà i CO₂ al final de l'experiment dels reactors. I=ibuprofè. C= carbamazepina. Blanc=inòcul.

Reactor	CH ₄ (ppm)	% CH ₄	CO ₂ (ppm)	% CO ₂
I 20.2 (20 ppm)	26,24	62,5	15,75	37,5
I 20.3 (20 ppm)	22,24	63,3	12,89	36,7
I 100.3 (100 ppm)	15,89	64,9	8,61	35,1
C 20.2 (20 ppm)	16,30	68,4	7,54	31,6
C 100.1 (100 ppm)	16,53	64,4	9,12	35,6
C 100.2 (100 ppm)	23,26	64,8	12,63	35,2
C 100.3 (100 ppm)	21,61	65,2	11,55	34,8
Blanc 2 (0 ppm)	20,05	66,2	10,24	33,8
Blanc 3 (0 ppm)	18,93	65,4	10,00	34,6

5. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts es pot dir que:

- En l'estudi de la de la fase metanogènica, per a les concentracions de 5, 10 i 20 ppm dels següents fàrmacs es pot concloure que:
 - **L'àcid clofibríc** no afecta a la producció de biogàs d'un llot en condicions anaeròbies. No és tòxic en les concentracions provades ni es degrada.
 - **La carbamazepina** no influeix en la producció de biogàs d'un llot en condicions anaeròbies. Per tant es conclou que la carbamazepina no es degrada anaeròbiament ni presenta toxicitat. Es suposa que aproximadament un 50% d'aquest fàrmac es queda adsorbit en el llot, ja que no es recupera en el sobrenedant d'un reactor esterilitzat.
 - **L'ibuprofè** tampoc no genera cap mena de toxicitat o inhibició sobre l'activitat metanogènica del llot ni sembla que es degradi. La recuperació del fàrmac és força baixa, per tant, l'ibuprofè majoritàriament passa a la fase sòlida.
 - D'altra banda, la quantitat de **substrat** utilitzat en els reactors, en aquest cas metanol, condiona molt la producció de biogàs futura i, per tant, s'ha de tenir en compte en el disseny d'experiments.

- Per a l'estudi de la fase acetogènica, per a les concentracions de 20 i 100 ppm es pot concloure que:
 - **La carbamazepina** no presenta toxicitat ni semba degradar-se. Es donen produccions de biogàs més baixes que l'inòcul tot i no haver-hi diferències significatives. Aquest fet pot estar causat perquè el propiònic s'ha pogut degradar fins a àcid acètic però sense passar a metà, per tant, no s'aprecia un increment de pressió ja que a l'etapa acetogènica no hi ha producció de biogàs. En quant a la recuperació del fàrmac, es repeteixen els valors del test metanogènic, recuperant-se la meitat en les 20 ppm, i 2/3 parts en les 100 ppm. Això indicaria que si no hi hagut degradació gran part del fàrmac queda adsorbit al llot.

- **L'ibuprofè** tampoc té cap efecte en el correcte funcionament d'un llot anaerobi, és a dir, cap de les dues concentracions provades no presenten toxicitat. Per altra banda tampoc s'aprecia degradació. Com en casos anteriors, aproximadament la meitat del fàrmac quedaria adsorbit al llot.
- **L'àcid clofíbric** en la concentració de 20 ppm no es degrada ni presenta inhibició per als microorganismes del llot. En la quantificació, quasi no es recupera gens, per tant, es pot suposar que la immensa majoria queda adsorbit en el llot. En canvi, per 100 ppm es donen produccions de biogàs significativament més elevades que pel control, per tant en aquest cas és més evident que existeix degradació. Igual que per les 20 ppm, es recupera molt poca quantitat en la quantificació, en aquest cas però, perquè s'ha degradat el fàrmac donant un metabòlit com a producte intermediari.

6. CONSIDERACIONS FINALS

L'estudi que s'ha dut a terme és una aproximació inicial als potencials avantatges de la degradació anaeròbia per tal de degradar alguns compostos presents a les nostres aigües i dels que es desconeixen els efectes a llarg termini. Aquest és un tema força nou del que hi ha pocs estudis, però la preocupació creixent per la salut hidrològica i la bioacumulació de compostos xenobiòtics ha fet que cada cop se'n vagin desenvolupant més.

Un cop superat aquest primer experiment caldria fer un altre semblant amb més temps, ja que de tots els reactors s'ha quantificat el sobrenedant, però de la fase sòlida caldria fer una extracció i quantificar-la també per veure si quadra el balanç de matèria entre la concentració afegida, la que roman a la fase sòlida i la que resta a la fase líquida. Aquest pretractament s'ha realitzat en alguns casos, però és una part força feixuga a la que cal dedicar un temps i un esforç que s'escapa de les pretensions d'un projecte de final de carrera. A més a més, en el cas d'existir degradació i formar-se un metabòlit, fóra bo analitzar i quantificar aquest producte de la degradació per esbrinar si es tracta d'un compost menys perillós, o per contra, un compost encara més tòxic. D'aquesta manera es podrien extreure conclusions més específiques.

A partir d'aquí, i segons els resultats obtinguts, es podria mirar de realitzar l'experiment en un reactor a escala pilot amb totes les consideracions anteriors incorporades en el nou experiment.

7. BIBLIOGRAFIA

- Acebes Martínez, J. 2008. Biodegradación de fármacos β -bloqueantes por hongos ligninolíticos. Treball de recerca de Màster Oficial en Biotecnologia. ETSE, UAB.
- Angelidaki, I. et al. Anaerobic biodegradation, Activity and Inhibition (ABAI) Task group Meeting 9th to 10th October 2006. Prague.
- Barceló, D., Petrovic, M. 2007. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment. *Anal Bioanal Chem* 387:1141-1142
- Benito Quintana, J., Weiss, S., Reemtsma, T. 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research* 39 2642-2664
- Buser, H.R., Poiger, T., Mueller, M.D. 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface water and in wastewater.
- Campos, A.E. 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis doctoral. Universitat de Lleida.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llombart, M., Garcia-Jares, C., Rodríguez, I., Gomez, M., Ternes, T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38, 2918-2926.
- Carrillo, Leonor. 2003. *Microbiología Agrícola*.
- Chang-Ping, Y., Kung-Hui, C. 2009. Occurrence of pharmaceutical and care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. *Chemosphere* 75 1281-1286.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H. 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39, 4797-4807.
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N. 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations of the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* 38 947-954.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. 1999. Pharmaceutical and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health perspect.* 107 907-938.
- Field, J., Alvarez, R. S., Lettinga, G. *Ensayos anaerobios*.
- Fountoulakis, M.S., Stamatelatos, K., Lyberatos, G. 2008. The effect of pharmaceuticals on the kinetics of methanogenesis and acetogenesis. *Bioresource technology* 99 7083-7090.
- Gartiser, S., Ulrich, E., Alexy, R., Kümmerer, K. 2006. Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. *Chemosphere* 66 1839-1848.

- Hernando, M.D., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelo, D. 2004. Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 385 (6), 985-991.
- Ilho, K., Iroaki, T. 2009. Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment. *Environ. Int.* 35 793-802.
- Jos, A., Keller, E., Alder, A.C., Göbel, A., McArdell, C.S., Ternes, T., Siegrist, H. 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* 39 3139-3152.
- Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B., Vogel, B. 2004. Investigation on the behavior selected pharmaceuticals in the groundwater after infiltration of treated wastewater.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martin-Alonso, J., Barceló, D. 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of hydrology* 358, 112-123.
- Larson, D.G., de Pedro, C., Paxeus, N. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 148,751-755.
- Liebig, M., Moltmann, J. F., Knacker, T. 2006. Evaluation of measured and predicted environmental concentrations of selected humans pharmaceutical and personal care products. *Environ Sci & Pollut Res* 12(2) 110-119.
- Lienert, J., Gdel K., Escher, I. 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environ. Sci. Technol.* 41 (12), 4471-4478.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004, 10^a edición. *Biología de los Microorganismos*. Ed. Pearson.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. 2008. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765-722.
- Marsalek, J. 2008. Pharmaceuticals and personal care products (PPCP) in Canadian urban waters: a management perspective. *Dangerous pollutants in urban water cycle* 117-130.
- Matamoros, V., Garcia, J., Bayona, J.M. 2005. Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: a pilot scale study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5449-5454.
- Miao, X.-S., Metcalfe, C.D. 2003. Determination of Carbamazepine and its metabolites in aqueous using liquid chromatography-electrospray tandem massa spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 3731-3738.
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M. 2009. Fate of pharmaceutical and personal care products in wastewater treatment plants- Conception of a database and first results. *Environ Pollution* 157 1721-1756.

- Moreno Benito, M. 2007. Capacitat del fong lignonilític *Trametes versicolor* per degradar el contaminant emergent 17 β -estradiol. Treball de recerca de Màster Oficial en Tecnologia ambiental. ETSE, UAB.
- Muñoz Valero, J.A., Ortíz-Gañavate, J., Vázquez Minguela, J. 1987. Técnica y aplicaciones agrícolas de la biometanización. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación . Secretaria General Técnica.
- Onesios, K.M., et al. 2008. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. DOI 10.1007/s10532-008-9237-8.
- Ratledge, C., Kristiansen, B. 2001. Basic biotechnology. Cambridge University Press.
- Pan, B., Ning, P., Xing, B. 2009. Part V-Sorption of pharmaceuticals and personal care products. *Environ Sci Pollut Res* 16:106-116.
- Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E. 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *Journal of Hazardous Materials* 164 1509-1516.
- Schink, B. 2000. Structure and function relationships in natural microbial communities. Publicació Amsterdam : Elsevier.
- Solera del Río, R. 1999. Cuantificación de los microorganismos responsables de la degradación anaerobia. Aplicación al análisis del funcionamiento de reactores anaerobios. Tesis doctorales. Servicio de Publicaciones, Universidad de Cádiz.
- Sreekanth, D., Sivaramakrishna, D., Himabindu, V., Anjaneyulu, Y. 2009. Thermophilic treatment of bulk drug pharmaceutical industrial wastewaters by using hybrid up flow anaerobic sludge blanket reactor. *Bioresource Technology* 100, 2534-2539.
- Stronach, S.M., Rudd, T., Lester, J.N. 1986. Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment. Springer-Verlag. *Biotechnology Monographs*.
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J. 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Environ. Sci. Biotech.* 7:125-138.
- Vieno, N. Tuhkanen, T., Kronberg, L. 2007. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 41, 1001-1012.
- Zhang, Y., Geiben, S.U., Gal, C.2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73 1151-1161.
- Zwiener, C., Seeger, G, Glauner, T. Frimmel, F.H. 2002. Metabolites from biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Anal. Bioanal.Chem.* 372,569-575.

LLOCS WEB CONSULTATS

Centro Tecnológico AINIA: <http://www.ainia.es/pdf/asistencia/obtencionbiogas.pdf>

Centro de Investigaciones energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
http://www.energiasrenovables.ciemat.es/suplementos/sit_actual_renovables/biogas

U.S. Environmental Protection Agency website: www.epa.gov

Whatman: <http://www.whatman.com>

<http://www.textoscientificos.com/energia/biogas>

8. ANNEXES

ANNEX 8.1. PRESSUPOST

PRESSUPOST			
ACTIVITAT	COST (€)		
DESPESES DIRECTES:			
<u>Recursos humans</u>	<u>Total hores</u>	<u>€/hora</u>	
- Recerca bibliogràfica	20	10	200,00
- Treball experimental (laboratori)	180	12	2160,00
- Tractament de dades	15	12	180,00
- Redacció del projecte	45	12	540,00
- Reunions tutors	5	10	50,00
	<u>Quant. Menús</u>	<u>€/menú</u>	
- Dietes	20	6	120,00
	<u>Total km</u>	<u>€/km</u>	
- Desplaçaments en cotxe	60	0,20	12,00
	<u>Quant. viatges</u>	<u>€/10 viatges</u>	
- Desplaçaments transport públic	100	13	130
<u>Recursos materials</u>	<u>Temps</u>	<u>Preu</u>	
MATERIAL DE LABORATORI	5 mesos	600€/curs acadèmic	300
MATERIAL D'OFICINA			
- Paquet 500 u. DIN A4 reciclat i lliure clor	2	3,07	6,14
- Fotocòpies i impressions	500	0,05	25,00
- Material divers d'escriptura			10,00
SUBTOTAL			3.733,14
DESPESES INDIRECTES		20%	746,63
BASE IMPOSABLE			4.479,77
I.V.A.		16%	716,76
TOTAL			5.196,53
PREU APROXIMAT			5.200 €

Taula 8.1. Recursos humans. Desglossament d'hores i trajectes.**RECURSOS HUMANS: DESGLOSSAMENT D'HORES I TRAJECTES**

ACTIVITAT

	<u>Hores/persona</u>	<u>nº persones</u>	<u>Hores totals</u>
Recerca d'informació	20	1	20
Laboratori	180 ^{*1}	1	180
Tractament de dades	15	1	15
Redacció del projecte	45	1	45
Reunions	5	1	5
	<u>nº trajectes</u>	<u>Km / trajecte</u>	<u>km totals</u>
Desplaçaments (a/t)	2	60	120 ^{*2}

^{*1} Considerant anant 3 cops per setmana, una mitja de 3h, durant 5 mesos.

^{*2} El recorregut del trajecte consta d'aproximadament 60 km si considerem el desplaçament d'anada i tornada entre Barcelona (Sants) i la UAB (Bellaterra)

ANNEX 8.2. PROGRAMACIÓ

	GENER				FEBRER				MARÇ				ABRIL				MAIG				JUNY				JULIOL				AGOST				SETEMBRE							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Setmanes																																								
Primer contacte amb tutors, coneixement del tema a tractar. Objectius.																																								
Primer contacte amb el laboratori. Trainings d'aparells necessaris.																																								
Feina experimental. Laboratori																																								
Antecedents: Recerca bibliogràfica.																																								
Tractament dels resultats inicials																																								
Començament redacció primera part memòria (introducció, materials...)																																								
Tractament de les dades i resultats																																								
Elaboració de les conclusions.																																								
Revisió de la memòria i l'article																																								
Entrega del projecte																																								
Defensa oral del projecte																																								

ANNEX 8.3. ACRÒNIMS I PARAULES CLAU

ACRÒNIMS

CONAMA: Congreso Nacional de Medio ambiente.

COVs: Compostos orgànics volàtils.

EDAR: Estació depuradora d'aigües residuals.

EPA: U.S. Environmental Protection Agency, l'Agència de Protecció del Medi Ambient d'EE.UU.

FID: *Flame ionization detector*, detector d'ionització de flama

GC: gas chromatography, cromatografia de gasos.

HPLC: high performance liquid chromatography, cromatografia líquida d'alta resolució.

OHPA: acetogens protó-reductors obligats.

PAHs: hidrocarburs aromàtics policíclics.

PPCPs: pharmaceutical personal and care products, productes farmacèutics i de la cura personal.

RPM: revolucions per minut

UAB: Universitat Autònoma de Barcelona.

PARAULES CLAU

ANAEROBIOSI: capacitat que posseeixen alguns organismes, com fongs, bacteris, etc., per viure sense oxigen molecular lliure.

ACETOGÈNESI: procés a través del qual bacteris anaerobis produeixen acetat a partir de diverses fonts d'energia (com H₂) i de carboni (com CO₂).

DEGRADACIÓ: possibilitat de degradar o degradar-se. Disminució gradual de les qualitats o característiques.

DIGESTOR: Contenidor tancat, hermètic i impermeable en el qual es diposita el material orgànic a fermentar.

EFLUENT: sortida de fluxos de qualsevol sistema

INFLUENT: entrada de fluxos de qualsevol sistema.

METANOGENÈSI: formació de metà per mitjà de bacteris. Forma de metabolisme microbià important i estesa.

REACTOR: veure digestor.

TOXICITAT: capacitat o propietat d'una substància per provocar efectes adversos sobre la salut.

TRACTAMENT PRIMARI: tractament fisicoquímic que busca reduir la matèria en suspensió per mitjà de la precipitació o sedimentació.

TRACTAMENT SECUNDARI: tractament biològic utilitzat per eliminar la contaminació orgànica dissolta que costa molt d'eliminar per mètodes fisicoquímics.

TRACTAMENT TERCIARI: de caràcter fisicoquímic o biològic. No aplica tècniques diferents que els tractaments primaris o secundaris, sinó que utilitza tècniques d'ambdós tipus destinades a polir o afinar l'efluent final. Es pot arribar a obtenir aigua apta pel consum.

XENOBIÒTIC: compost sintetitzat per l'home en el laboratori.

ANNEX 8.4. ÍNDEX D'IMATGES, TAULES I FIGURES

IMATGES

Imatge 3.1. Preparació dels reactors per a l'experiment. Elaboració pròpia. Abril 2009.

Imatge 3.2. Estufa i mufla emprades per a la caracterització del llot. Elaboració pròpia. Abril 2009.

Imatge 3.3. Control manomètric dels reactors. Elaboració pròpia. Abril 2009.

Imatge 3.4. Centrífuga Beckman Elaboració pròpia. Abril 2009.

Imatge 3.5. Extractor PSE. Elaboració pròpia. Abril 2009.

TAULES

Taula 1.1. Propietats físico-químiques i informació sobre l'us terapèutic dels fàrmacs estudiats.

Taula. 3.1. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 1er experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent. Prefix E= inocul esterilitzat.

Taula. 3.2. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 2n experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent. Prefix E= inocul esterilitzat.

Taula. 3.3. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 3er experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent. Prefix E= inocul esterilitzat.

Taula. 3.4. Muntatge de reactors amb la composició corresponent del 4t experiment. Blanc= inòcul. Control= inòcul+dissolvent.

Taula. 3.5. Composició química de les diferents dissolucions emprades per alimentar l'inòcul dels reactors.

Taula. 4.1. Condicions inicials inòcul Granollers novembre 2008.

Taula 4.2. Producció acumulada de biogàs amb metanol i àcid clofíbric. Temps = 23 dies. Valors amb X s'han descartat per problemes experimentals.

Taula 4.3. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

Taula 4.4. Producció acumulada de biogàs amb metanol i carbamazepina. Temps = 35 dies.

Taula 4.5. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

Taula 4.6. pH inicial i final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i carbamazepina en metanol. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+metanol. E= inocul esterilitzat.

Taula 4.7. Caracterització reactor inici carbamazepina.

Taula 4.8. Caracterització reactors final carbamazepina.

Taula 4.9. Concentració final de carbamazepina en els reactors. Nombres en vermell els considerem erronis i no s'han tingut en compte. Concentracions de carbamazepina de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. (E= inocul esterilitzat).

Taula 4.10. Producció acumulada de biogàs amb metanol i ibuprofè. Temps= 34 dies.

Taula 4.11. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P

Taula 4.12. pH inicial i final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i ibuprofè en metanol. Concentracions d'ibuprofè de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. Blanc=inòcul. Control= inòcul+metanol. E= inocul esterilitzat.

Taula 4.13. Concentració final d'ibuprofè en els reactors. Concentracions d'ibuprofè de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. E= inocul esterilitzat.

Taula 4.14. Condicions inicials inòcul Granollers abril 2009.

Taula 4.15. Producció acumulada de biogàs amb àcid propiònic i carbamazepina. Temps= 28 dies.

Taula 4.16. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

Taula 4.17. pH final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i carbamazepina en àcid propiònic.

Taula 4.18. Concentració final de carbamazepina en els reactors.

Taula 4.19. Producció acumulada de biogàs amb àcid propiònic i ibuprofè. Temps= 28 dies.

Taula 4.20. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades. Nivell de Significancia P.

Taula 4.21. pH final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i ibuprofè en àcid propiònic.

Taula 4.22. Concentració final d' ibuprofè en els reactors.

Taula 4.23. Producció acumulada de biogàs amb àcid propiònic i àcid clofíbric. Temps= 28 dies. Reactors amb x no s'han tingut en compte per problemes experimentals.

Taula 4.24. Taula comparativa entre el control i les concentracions provades.. Nivell de Significancia P.

Taula 4.25. pH final de l'experiment de producció de biogàs de llot anaerobi i àcid clofíbric en àcid propiònic. Concentracions d'àcid clofíbric de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=inòcul. Control=inòcul+àcid propiònic.

Taula 4.26. Caracterització reactors al final de l'experiment.

Taula 4.27. Concentració final d' àcid clofíbric en els reactors.

Taula 4.28. Caracterització del biogàs mitjançant GC. Concentració i percentatge de metà i CO₂ al final de l'experiment dels reactors. I=ibuprofè. C= carbamazepina. Blanc=inòcul.

Taula 8.1. Recursos humans. Desglossament d'hores i trajectes.

FIGURES

Fig. 3.1. Esquema de la metodologia de treball.

Fig. 4.1. Activitat de l'inòcul. Temps = 26 dies.

Fig 4.2. Influència de l'àcid clofíbric en la de producció de biogàs dels bacteris metanògens.

Concentracions d'àcid clofíbric de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. No s'han representat els controls del metanol ni de l'inòcul.

Fig 4.3. Influència de Carbamazepina en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris metanògens. Concentracions de carbamazepina de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+metanol.

Fig 4.4. Influència d'ibuprofè en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris metanògens. Concentracions d'ibuprofè de 5, 10 i 20 ppm dissoltes en metanol. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+metanol.

Fig 4.5. Influència de carbamazepina en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris acetògens. Concentracions de carbamazepina de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+àcid propiònic.

Fig 4.6. Influència de l'ibuprofè en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris acetògens. Concentracions d'ibuprofè de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+àcid propiònic.

Fig 4.7. Influència de l'àcid clofíbric en les diferents corbes de producció de biogàs dels bacteris acetògens. Concentracions d'àcid clofíbric de 20 i 100 ppm amb àcid propiònic. B=producció de l'inòcul. Control=producció inòcul+àcid propiònic.

Fig 4.8. Cromatograma HPLC de l'àcid clofíbric en concentració de 100 ppm al final de l'assaig.