



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA**

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**DESENVOLUPAMENT D'UN PROCÉS A ESCALA  
PILOT PER AL TRACTAMENT DEL COLORANT  
TÈXTIL GRIS LANASET G AMB *Trametes  
versicolor***

Memòria de Tesi Doctoral

Paqui Blánquez Cano

Bellaterra, febrer 2005

**Títol:** Desenvolupament d'un procés a escala pilot per al tractament del colorant tèxtil Gris Lanaset G amb *Trametes versicolor*.

**Realitzat per:** Paqui Blánquez Cano.

**Dirigit per:** Montserrat Sarrà i Adroguer i M<sup>a</sup> Teresa Vicent i Huguet.

Programa de Doctorat de Biotecnologia.

Departament d'Enginyeria Química.

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria.

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. 2005.

MONTSERRAT SARRÀ i ADROGUER i M<sup>a</sup>. TERESA VICENT i HUGUET, Professores Titulars del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que l'Enginyera Química Paqui Blánquez Cano ha realitzat sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química el treball que amb títol "**Desenvolupament d'un procés a escala pilot per al tractament del colorant tèxtil Gris Lanaset G amb *Trametes versicolor***", es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

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

Bellaterra, febrer de 2005

Dra. Montserrat Sarrà i Adroguer

Dra. M<sup>a</sup>. Teresa Vicent i Huguet

*"Research is to see what everybody else sees, and  
to think what nobody else has thought."*

Albert Szent-Gyorgyi

## Agraïments

Ha arribat el moment d'escriure els paràgrafs de la Tesi que tothom llegeix primer, els agraïments, de fet per mi són tan importants com qualsevol altre capítol de la Tesi perquè sense l'ajuda, suport o ànims de les persones que anomenaré a continuació la realització d'aquest treball no hagués estat possible.

En primer lloc vull agrair a les meves directores, la Teresa i la Montse, que em donessin la oportunitat de realitzar aquest treball de Tesi, la seva ajuda durant aquests anys, i sobretot l'esforç que han realitzat amb la correcció de la memòria. He disfrutat MOLT amb la feina que he fet i m'ho he passat MOLT bé durant aquests anys.

Al Xavi, a la Glòria, que sempre està disposada a resoldre qualsevol dubte o problema, i a la Núria i a l'Ernest, que m'han fet companyia al laboratori i han fet divertides les hores de feina.

A la Noelia, per ajudar-me en la recta final dels experiments, i a l'Anna Font.

A la Tri i a la Maite, que han sigut les meves companyes de viatge durant tot aquest temps, juntament amb la Núria, la Neus i l'Eli, que han anat baixant del tren en diferents parades, per les bones estones passades entre experiment i experiment i perquè en tot moment estan disposades a escoltar i aconsellar a una amiga.

Al David i a l'Albert, que fan de l'hora del cafè una sessió de riure desestressant. A la resta de companys de cafè i de laboratori, la Cristina Sendra, la Cristina Ruiz, la Irene, la Vane, la Lorena, l'Anna Ubach, la Sandra, la Surri, el Jaume, l'Anna Montràs i el Luis.

Als companys de despatx, Joan Albiol, Goyo, Julián i Pau, amb els que resolc els meus dubtes de llenguatge, informàtics, i que em fan riure quan menys m'ho espero. I a la Rosi, perquè mai m'ha donat un no per resposta.

A Ana y a Yolanda, porque siempre están conmigo, en los buenos momentos y en los no tan buenos, porque hemos hecho del té del jueves una cita con la amistad, y.....por el ojalá.

A Jordi y a Miguel, por los buenos vinos y momentos que hemos compartido.

Als pares del Ramon, al Santi, a la Rocio i al David, pels ànims que m'han donat.

A "los López", Encarni, Ciscu i los peques Izan i Héctor, sois estupendos.

A Antonio y Rebeca, por demostrar que todo se puede conseguir, aunque sea con mucho esfuerzo. Ánimo!!

A mis padres, porque sin vuestra confianza y ayuda durante estos años no estaría escribiendo estas líneas. GRACIAS POR TODO.

Al Ramon, perquè sempre has estat al meu costat i m'has ajudat, i animat en moments en els que era quasi una missió impossible. MOLTES GRÀCIES GUAPO.

## Índex

<b>CAPÍTOL 0: PRESENTACIÓ</b> .....	1
<b>CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL</b> .....	5
<b>1.1. La indústria tèxtil</b> .....	5
1.1.1. Tenyit.....	6
1.1.2. Impactes ambientals.....	6
1.1.3. Minimització dels impactes ambientals.....	10
<b>1.2. Els colorants</b> .....	14
1.2.1. Classificació dels colorants.....	17
<b>1.3. Tecnologies pel tractament dels efluents tèxtils</b> .....	25
1.3.1. Mètodes químics.....	27
1.3.2. Mètodes físics.....	29
1.3.3. Tractaments biològics.....	31
<b>1.4. Tractament de decoloració amb fongs ligninolítics</b> .....	33
1.4.1. El nexa d'unió entre l'estructura de la lignina i altres compostos aromàtics en efluents industrials.....	33
1.4.2. Degradació de colorants.....	35
<b>1.5. El fong <i>Trametes versicolor</i> i la seva morfologia</b> .....	40
<b>1.6. Bibliografia</b> .....	43
<b>CAPÍTOL 2: OBJECTIUS GENERALS</b> .....	53
<b>CAPÍTOL 3: MATERIALS I MÈTODES GENERALS</b> .....	55
<b>3.1. Microorganisme</b> .....	56
<b>3.2. Medis i condicions de cultiu</b> .....	56
3.2.1. Medi de creixement.....	56
3.2.2. Medi de tractament.....	56
<b>3.3. Colorant tèxtil Gris Lanaset G</b> .....	57
<b>3.4. Reactor fluïditzat per polsos d'aire</b> .....	58
<b>3.5. Metodologia experimental</b> .....	60
3.5.1. Metodologia de posada en marxa del sistema.....	60
3.5.2. Metodologia d'obtenció de pèl·lets.....	61
<b>3.6. Mètodes analítics</b> .....	62
3.6.1. Determinació de la concentració de glucosa.....	62
3.6.2. Determinació de la concentració de colorant.....	62
3.6.3. Determinació de la toxicitat.....	63
3.6.4. Determinació de la biomassa.....	63
3.6.5. Determinació de l'activitat enzimàtica lacasa.....	63
<b>3.7. Bibliografia</b> .....	64
<b>CAPÍTOL 4: TRACTAMENT EN CONTINU DEL COLORANT GRIS LANASET G EN UN BIOREACTOR FLUÏDITZAT</b> .....	65
<b>4.1. Introducció</b> .....	66
<b>4.2. Materials i mètodes</b> .....	69
4.2.1. Equipament i condicions d'operació.....	69
4.2.2. Mètodes analítics.....	69
<b>4.3. Resultats i discussió</b> .....	69
4.3.1. Estudi fluidodinàmic.....	69

---

4.3.2. Establiment de la concentració de glucosa en el procés en continu.....	72
4.3.3. efecte del TRH.....	78
<b>4.4. Conclusions.....</b>	<b>85</b>
<b>4.5. Bibliografia.....</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTOL 5: MECANISME DE BIOTRANSFORMACIÓ D'UN COLORANT TÈXTIL METÀL·LIC PER <i>Trametes versicolor</i>.....</b>	
<b>5.1. Introducció.....</b>	<b>91</b>
<b>5.2. Materials i mètodes.....</b>	<b>92</b>
5.2.1. Equipament i condicions d'operació.....	93
5.2.2. Biodegradació <i>in vitro</i> .....	94
5.2.3. Obtenció de l'enzim lacasa intracel·lular.....	94
5.2.4. Mètodes analítics.....	94
<b>5.3. Resultats i discussió.....</b>	<b>94</b>
<b>5.4. Conclusions.....</b>	<b>103</b>
<b>5.5. Bibliografia.....</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTOL 6: DETERMINACIÓ DEL TEMPS DE RESIDÈNCIA CEL·LULAR MÀXIM I D'OPERACIÓ EN UN PROCÉS EN CONTINU.....</b>	
<b>6.1. Introducció.....</b>	<b>107</b>
<b>6.2. Materials i mètodes.....</b>	<b>108</b>
6.2.1. Equipament i condicions d'operació.....	112
6.2.2. Metodologia de renovació de biomassa.....	112
6.2.3. Mètodes analítics.....	112
<b>6.3. Resultats i discussió.....</b>	<b>114</b>
6.3.1. Establiment del temps de residència cel·lular màxim.....	114
6.3.2. Establiment del temps de residència cel·lular d'operació.....	118
<b>6.4. Conclusions.....</b>	<b>126</b>
<b>6.5. Bibliografia.....</b>	<b>127</b>
<b>CAPÍTOL 7: TRACTAMENT DEL COLORANT GRIS LANASET G AMB CARBÓ ACTIU GRANULAR (GAC).....</b>	
<b>7.1. Introducció.....</b>	<b>129</b>
7.1.1. Adsorbents industrials.....	130
7.1.2. Adsorció en carbó actiu.....	130
7.1.3. Formes d'operació.....	131
<b>7.2. Materials i mètodes.....</b>	<b>132</b>
7.2.1. Carbó actiu.....	133
7.2.2. Colorant.....	133
7.2.3. Mètodes analítics.....	133
7.2.4. Muntatge i metodologia experimental.....	133
<b>7.3. Resultats i discussió.....</b>	<b>135</b>
7.3.1. Experiments en discontinu.....	135
7.3.2. Experiments en continu.....	136
<b>7.4. Conclusions.....</b>	<b>141</b>
<b>7.5. Bibliografia.....</b>	<b>142</b>

<b>CAPÍTOL 8: DISSENY I OPERACIÓ EN BIOREACTOR PILOT (10 l).....</b>	<b>145</b>
<b>8.1. Introducció.....</b>	<b>146</b>
8.1.1. Canvi d'escala.....	146
8.1.2. Llits fluiditzats.....	147
<b>8.2. Materials i mètodes.....</b>	<b>149</b>
<b>8.3. Resultats .....</b>	<b>149</b>
8.3.1. Disseny del bioreactor a escala pilot (10 l).....	149
8.3.2. Estudi fluidodinàmic del bioreactor pilot.....	153
8.3.3. Operació en discontinu amb el bioreactor pilot.....	155
8.3.4. Operació en continu amb el bioreactor pilot.....	157
<b>8.4. Discussió dels resultats.....</b>	<b>159</b>
<b>8.5. Conclusions.....</b>	<b>160</b>
<b>8.6. Bibliografia.....</b>	<b>161</b>
<b>CAPÍTOL 9: ADAPTACIÓ DEL SISTEMA PILOT A CONDICIONS INDUSTRIALS.....</b>	<b>163</b>
<b>9.1. Introducció.....</b>	<b>164</b>
<b>9.2. Materials i mètodes.....</b>	<b>167</b>
9.2.1. Equipament i condicions d'operació.....	167
9.2.2. Característiques de les aigües residuals reals.....	168
<b>9.3. Resultats i discussió.....</b>	<b>168</b>
9.3.1. Tractament de la solució de colorant Gris Lanaset G.....	168
9.3.2. Tractament en continu d'aigües tèxtils reals.....	171
<b>9.4. Conclusions.....</b>	<b>174</b>
<b>9.5. Bibliografia.....</b>	<b>174</b>
<b>CAPÍTOL 10: AVALUACIÓ ECONÒMICA I VALORACIÓ AMBIENTAL DEL PROCÉS BIOTECNOLÒGIC DE TRACTAMENT D' EFLUENTS TÈXTILS I COMPARACIÓ AMB EL PROCÉS FÍSICOQUÍMIC.....</b>	<b>177</b>
<b>10.1. Introducció.....</b>	<b>178</b>
<b>10.2. Resultats i discussió.....</b>	<b>180</b>
10.2.1. Compostatge de la biomassa purgada.....	181
10.2.2. Avaluació econòmica.....	187
10.2.3. Discussió ambiental qualitativa.....	197
<b>10.3. Conclusions.....</b>	<b>205</b>
<b>10.4. Bibliografia.....</b>	<b>206</b>
<b>CAPÍTOL 11: CONCLUSIONS I TREBALL FUTUR.....</b>	<b>207</b>
<b>11.1. Conclusions.....</b>	<b>207</b>
<b>11.2. Treball futur.....</b>	<b>209</b>
<b>ANNEX I: FITXA DE SEGURETAT DEL COLORANT GRIS LANASET G...</b>	<b>211</b>
<b>ANNEX II: FULL D'ESPECIFICACIONS DEL CARBÓ ACTIU.....</b>	<b>215</b>
<b>ANNEX III: DADES D'AVALUACIÓ ECONÒMICA.....</b>	<b>217</b>
<b>ANNEX IV: WORKING DOCUMENT ON SLUDGE 3<sup>rd</sup> DRAFT.....</b>	<b>219</b>



## Capítol 0

### Presentació

En aquest memòria es recullen els resultats més rellevants del treball experimental realitzat amb l'objectiu d'avançar en el coneixement per a desenvolupar un procés de tractament en continu de decoloració d'aigües residuals tèxtils utilitzant fongs ligninolítics.

Aquest és un objectiu de la línia de recerca que agrupa a un conjunt de persones que treballen en equip, de manera que a l'inici del projecte de recerca que ara es presenta com a memòria de Tesi Doctoral es parteix de l'experiència d'investigació adquirida prèviament, en la que s'ha estudiat el tractament de depuració d'aigües residuals de paperera (lleixius negres) amb els fongs de podridura blanca *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor*, aigües residuals de la indústria pelletera amb *Phanerochaete chrysosporium* i *Bjerkandera* sp. BOS55, colorants tèxtils amb els fongs *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor* i aigües residuals de les almàsseres (alpechín) amb el fong de podridura blanca *Phanerochaete flavido-alba*. Aquesta experiència prèvia ha permès:

- Seleccionar un colorant tèxtil, Gris Lanaset G, com a model de mescla de colorants complexes i organometàl·lics, utilitzat a una indústria tèxtil ubicada a prop de la Universitat Autònoma de Barcelona.
- Seleccionar el fong *Trametes versicolor* per al seu tractament.

- Seleccionar l'enzim lacasa com a possible catalitzador de la degradació i establir les condicions nutricionals del fong per produir aquest enzim.
- Seleccionar la morfologia de creixement del fong en forma de pèl·lets, per evitar el creixement del fong sobre sondes, parets del bioreactor,..i per tant establir les condicions per la formació de pèl·lets.
- Establir les condicions que permetin la producció enzimàtica en condicions limitants per al creixement.
- Seleccionar el tipus de bioreactor, fluiditzat per polsos d'aire, per evitar la compactació del llit i afavorir la transferència de matèria.
- Establir la metodologia general de posada en marxa del bioreactor.

Amb aquests coneixements del sistema s'inicia el present treball realitzant un estudi sobre les condicions d'operació per al tractament en continu d'una solució del colorant tèxtil Gris Lanaset G, establint la concentració de nutrients i el temps de residència hidràulic al qual s'ha d'operar per assolir percentatges de decoloració que compleixen la normativa d'abocament (capítol 4).

En el capítol 5 es proposa el mecanisme de decoloració, que té lloc en varies etapes en sèrie, l'adsorció inicial del colorant sobre la biomassa, la transferència cap al seu interior, el trencament del complex metàl·lic i finalment l'excreció al medi dels productes de degradació.

Es determina el temps de residència cel·lular màxim i s'estableix la metodologia de renovació de biomassa en forma de pèl·lets per al tractament en continu (capítol 6). La renovació total de la biomassa es realitza en tres etapes, renovant un terç de la biomassa total del bioreactor en cada etapa.

Donat que el procés d'eliminació de color més utilitzat a escala industrial és l'adsorció, en el capítol 7 s'estudia a escala laboratori l'adsorció del colorant Gris Lanaset G amb carbó actiu granular per tal de realitzar posteriorment un anàlisi comparatiu.

En el capítol 8 es dissenya un reactor fluiditzat per polsos d'aire a escala pilot de 10 litres de volum útil i es realitza un estudi del comportament fluidodinàmic determinant el temps de mescla del sistema. Un cop comprovada la bondat de l'escalat del bioreactor, en el capítol 9, s'introdueixen canvis paulatinament per adaptar el procés a condicions d'operació industrials, i així acabar tractant aigües residuals reals d'una indústria tèxtil sense esterilitzar on es posen de manifest alguns problemes que requeriran estudis posteriors.

En el capítol 10 es compara la viabilitat econòmica i ambiental dels dos processos que tenen per objectiu l'eliminació del colorant tèxtil Gris Lanaset G de les aigües residuals, el biològic amb *Trametes versicolor*, i el fisicoquímic amb carbó actiu.

En els capítols 1, 2 i 3 es presenten respectivament una introducció general, els objectius generals i els materials i mètodes generals.

# Capítol 1

## Introducció general

### 1.1. La indústria tèxtil

El sector de la indústria tèxtil consisteix en diferents processos de producció i processament de productes tèxtils (fibra, fil, teixits) per a la posterior transformació en roba, teixits per la casa i articles industrials. Els establiments tèxtils reben i preparen les fibres, les transformen en fil i converteixen el fil en teixit. Tenyir i finalitzar aquests materials suposa diferents passos en la producció de manera que les fibres primeres es converteixen en productes tèxtils acabats.

La indústria tèxtil comprèn les següents activitats:

- Tractament dels materials bruts, per exemple la preparació o producció de fibres tèxtils, i/o fabricació de fils.
- Producció de gèneres de punt i teixits
- Activitats d'acabat: amb la finalitat de donar als teixits l'aspecte físic, visual i estètic que els clients demanden.
- Transformació d'aquests teixits en productes tals com: roba de vestir, moquetes, catifes, teixits per la casa i teixits tècnics.

Les principals fibres que es processen es divideixen en dos grups: naturals i artificials. Les fibres naturals inclouen el cotó, la llana, la seda, el lli, el cànem, etc. Les artificials inclouen fibres de cel·lulosa (viscosa), fibres sintètiques (fibres orgàniques

com el polièster, el nylon, fibres acríliques, polipropilè, etc.) i fibres provinents de materials inorgànics (fibra de vidre, de metall, de carbó o ceràmica).

L'impacte ambiental més important de la indústria tèxtil es deriva dels anomenats processos humits, principalment implementats per la indústria tèxtil d'acabats.

Els teixits no són productes acabats fins que no passen diverses operacions d'acabat que suposen l'utilització de molta aigua per donar l'aparença, durabilitat i utilitat als teixits. Els processos d'acabat inclouen quatre etapes principals: preparació del teixit, tenyit, impressió i acabats especials. No sempre són necessaris tots aquests passos d'acabat, i els mètodes utilitzats poden variar en funció dels diferents productes finals i aplicacions.

L'etapa de tenyit és la que està més relacionada amb la realització d'aquest treball.

### **1.1.1. Tenyit**

Les operacions de tenyit s'utilitzen per donar color als teixits i poden tenir lloc en diferents etapes del procés de producció. Les fibres o teixits es tenyeixen aplicant una gran varietat de colorants i utilitzant diferents tècniques i equipament. El procés de tenyit es pot dur a terme en continu o discontinu. En el tenyit en discontinu, una determinada quantitat de teixit es col·loca en una màquina de tenyir i es porta a l'equilibri amb una solució que conté el colorant. Alguns productes químics auxiliars i les condicions controlades del bany de tenyit acceleren i optimitzen la migració de les molècules de colorant de la solució a les fibres. El colorant es fixa a la fibra utilitzant calor o productes químics, i el teixit es renta per eliminar el colorant no fixat i els productes químics.

En els processos de tenyit en continu, els teixits o les fibres s'alimenten contínuament a un bany de tenyit. El procés de tenyit en continu consta de l'aplicació del colorant, fixació amb productes químics o calor i rentat. La quantitat de colorant utilitzat depèn de la relació del bany, definida com la relació entre el pes del bany i el pes de la fibra o teixit. La relació del bany normalment varia entre 5 i 50 depenent del tipus de colorant, sistema de tenyit i afinitat del colorant per les fibres.

### **1.1.2. Impactes Ambientals**

Com s'ha dit anteriorment la major part dels residus generats per la indústria tèxtil es deriven de les etapes del procés humit. S'utilitza aigua i productes químics en grans quantitats i com a conseqüència es generen grans volums d'aigua residual.

Aquests corrents contenen una àmplia varietat de contaminants que han de ser eliminats dels efluent abans de la seva disposició final o reutilització.

La indústria tèxtil es caracteritza per utilitzar colorants estructuralment diferents durant períodes curts de temps en una mateixa factoria, de manera que es generen uns efluent extremadament variables en composició i complexes, que poden incloure colorants no biodegradables i substàncies tòxiques (Correia et al., 1994). Normalment es fa difícil el tractament d'aquests efluent, doncs cada tipus de colorant té unes característiques pròpies.

El color és el principal contaminant reconegut en aquest tipus d'aigües residuals, i s'ha d'eliminar abans de descarregar-les. La presència de molt poca quantitat de colorant a l'aigua (menys de 1ppm per alguns colorants), és generalment visible i afecta l'aspecte estètic, la transparència de l'aigua, la solubilitat dels gasos en els llacs, rius i altres fonts d'aigua. L'eliminació del color de les aigües residuals sol ser més important que eliminar substàncies orgàniques solubles i incolores que, normalment, contribueixen a la major fracció de càrrega orgànica. Els mètodes per eliminar la càrrega orgànica de la majoria d'efluent estan ben establerts, en canvi els colorants són més difícils de tractar degut al seu origen sintètic i a les seves estructures moleculars més complexes.

A part del color, el potencial contaminant dels colorants tèxtils és degut a la seva possible toxicitat i carcinogènesi (Brown i de Vito, 1993). Això es deu bàsicament a que molts dels colorants provenen de carcinògens coneguts, com la benzidina i altres compostos aromàtics.

En el passat, els corrents residuals altament colorats eren considerats desagradables principalment per raons estètiques. Actualment, el principal problema està associat als compostos xenobiòtics, perquè són recalcitrants i potencialment tòxics (Chagas i Durrant, 2001). Encara que alguns colorants considerats tòxics s'han retirat del mercat i nous, més biodegradables s'han sintetitzat, els colorants tèxtils són encara una gran font de contaminació de les aigües. De les 700 000 tones de colorants produïts anualment en el món, aproximadament un 10-15% es perd en les operacions de tenyit (Snowden-Swan, 1995).

La legislació cada vegada s'està tornant més estricta en els països més desenvolupats, vigilant l'eliminació dels colorants en els efluent industrials. Quan l'anàlisi de l'aigua indica una elevada toxicitat, cal buscar-ne el compost responsable i substituir-lo per un altre de menys conflictiu. Actualment s'està tendint a què cada indústria tèxtil tracti els seus efluent abans de descarregar-los a la xarxa de

sanejament urbana, ja que si els colorants són tòxics caldrà utilitzar processos de depuració específics, processos que segurament no es solen dur a terme en depuradores urbanes.

A Catalunya, moltes de les empreses del sector tèxtil es troben situades a prop de nuclis urbans. En funció de la gestió de les seves aigües residuals es classifiquen en dos grups: El primer compren les indústries que poden realitzar l'abocament al clavegueram connectat a un sistema de sanejament conjunt, donant-se lloc la depuració conjunta de les aigües residuals industrials i urbanes. El segon grup compren les indústries que estan obligades a fer un tractament de depuració per arribar als límits de qualitat fixats per l'Administració competent del medi receptor. Aquest fet suposa generalment un esforç tècnic i econòmic per part de l'empresa.

A Espanya l'any 1999 es van utilitzar un total de 1.2 milions de metres cúbics d'aigua en la indústria tèxtil i del cuir, generant 1.16 milions de metres cúbics d'aigües residuals. D'aquests 1.2 milions, 1.12 s'utilitzen a Catalunya, dels quals només es reutilitza a la indústria un 0.9% ( web INE, 2003).

Degut a la regulació dels abocaments, a Catalunya les empreses estan obligades a realitzar la declaració de residus. El Catàleg de Residus de Catalunya classifica i especifica els tractaments idonis per als residus generats, i potencia la minimització i el reciclatge abans d'arribar al tractament i a la disposició final.

Existeixen dues opcions de què es disposa a Catalunya per al tractament d'aigües industrials: Una primera opció que consisteix en tractar les aigües a la planta depuradora de la indústria per eliminar contaminants específics i després abocar a la xarxa de sanejament. Aquesta alternativa està indicada per efluents generats en grans cabals i amb contaminants com nutrients, salinitat, color... El Decret 130/2003 (DOGC 3894, 2003) estableix que el color és un paràmetre contaminant difícilment tractable a les EDAR i que la concentració de color límit per a poder ser admès, ha de ser inapreciable en una dilució 1/30. La segona opció s'aplica davant residus difícils de tractar o efluents molt concentrats i generats en baixes quantitats. En aquest cas els residus són enviats a plantes de tractament de residus centralitzades.

En la Unió Europea la normativa de la descàrrega d'efluents industrials s'està actualitzant contínuament, s'ha prohibit la fabricació i aplicació de detergents no biodegradables i també de colorants tòxics, com els que deriven de la benzidina. També s'ha reduït progressivament el contingut metàl·lic (Cu, Fe, Co,..) dels colorants organometàl·lics. En alguns països ja s'aplica la directiva EU 91/271, que obliga a eliminar el color de les aigües residuals abans d'abocar-les.

Tant les indústries com els científics estan treballant conjuntament per trobar una manera innovadora per decolorar efluentes que contenen colorants. Els processos biològics, amb menys subproductes, un cost més baix i simples de fer servir, han guanyat importància en els estudis més recents de degradació i eliminació de colorants.

A més de l'impacte directe de l'aigua residual, el consum d'aigua excessiu està esdevenint intolerable en països sotmesos a restriccions d'aigua (com a la part sud d'Europa). Una política racional de gestió d'aigua hauria d'assignar les fonts d'aigua pura per a ús potable i impulsar noves solucions de reciclatge pel consum industrial. Malgrat el valor dels productes químics i de l'aigua, reciclar i reutilitzar en la indústria tèxtil d'acabats és encara una pràctica incipient.

Un impacte ambiental també important és el gran consum d'energia principalment degut a l'escalfament dels banys i a l'assecatge de les fibres i teixits (Snowden-Swan, 1995), que pot ser substancialment reduït si es fa un reciclatge eficient de l'aigua.

Generalment, en el procés tèxtil es consumeixen 160 Kg d'aigua per Kg de producte acabat (EPA, 1996) i el procés d'acabat genera efluentes que contenen quantitats significatives d'un ampli ventall de residus. Tant el consum d'aigua com les característiques de les aigües són molt variables. El consum d'aigua més elevat es dona amb les fibres naturals, especialment amb el cotó. Les fibres sintètiques requereixen quantitats menors d'aigua per unitat de producte, principalment degut a les baixes necessitats de rentat i estovat. Quasi tot el volum d'aigua utilitzat és abocat perquè les pèrdues són mínimes. En percentatge, el volum d'efluents representa un 90-95% de l'aigua utilitzada.

A la taula 1.1. es recullen dades de volum d'aigua utilitzada per pes de fibres processades a l'àrea tèxtil de Como, al nord d'Itàlia, on es fabriquen productes de gran qualitat.

Les aigües residuals són el corrent residual més gran de la indústria tèxtil. Inclou: aigua de rentat, aigua de procés, aigua de refrigeració i aigua de pluja (EPA, 1997). La quantitat d'aigua utilitzada varia molt en funció del procés específic, de l'equipament utilitzat i de l'enfoc predominant vers l'ús de l'aigua de la direcció de l'empresa. Per exemple en l'àrea tèxtil de Como, en la majoria dels processos de tenyit són reticents a reduir les quantitats d'aigua utilitzada, argumentant que la gran qualitat dels productes només s'aconsegueix utilitzant grans volums d'aigua.



**Taula 1.1.** Consum d'aigua per unitat de pes de fibra processada a l'àrea tèxtil de Como (Itàlia) (Antonelli i Rozzi, 2001)

Tipus de fibra	Consum d'aigua (m <sup>3</sup> ·Kg <sup>-1</sup> )
<i>Tenyit de fils</i>	
Poliester	0.051
Seda	0.082
Viscosa	0.082
<i>Tenyit de teixits</i>	
Poliester	0.090
<i>Impressió i acabat</i>	
Poliester	0.320
Seda	0.183
Cotó-viscosa	0.458
Llana	0.275

L'estovat, el tenyit, l'impressió i l'acabat generen la majoria de les aigües residuals de la indústria tèxtil, perquè tots aquests processos requereixen moltes etapes d'esbandit. D'un 60 a un 90% de tot el consum d'aigua és per a aquest propòsit (Groves *et al.*, 1979).

Les aigües residuals de la indústria tèxtil contenen mesclades complexes de productes químics orgànics i inorgànics. En el procés de tenyit els compostos potencialment contaminants són: color, metalls, sals, surfactants, àcids/bases i formaldehid.

### 1.1.3. Minimització dels impactes ambientals

Les accions que es realitzen per reduir la contaminació i reutilitzar l'aigua residual es poden enumerar en el següent ordre segons el seu cost i efectivitat (Lens *et al.*, 2002):

- a) Tècniques de prevenció de la generació de contaminació
- b) Reutilització i reciclatge d'aigua i productes químics en efluent provinents d'operacions específiques dins del procés general
- c) Reutilització i reciclatge dels efluent finals

Com a regla general, les accions preventives contra la contaminació es donen en totes les empreses. Les empreses grans i mitjanes porten a terme aquestes accions

preventives des dels efluents que es generen en cada operació del procés, mentre que les petites empreses solen aplicar aquestes accions només en els efluents finals.

a) Tècniques de prevenció de la contaminació

Les tècniques de prevenció de la contaminació han demostrat ser un mètode efectiu per millorar l'eficiència del procés, per incrementar els beneficis de l'empresa i per minimitzar l'impacte ambiental del procés. En cada cas on s'implementen aquestes tècniques, s'han de tenir en compte les condicions específiques, cada opció i cada canvi s'ha d'examinar i s'ha de saber com afectarien aquests canvis al medi ambient. S'han publicat molts exemples d'aplicacions pràctiques de tècniques de prevenció de la contaminació (EPA, 1996). A continuació es descriuen breument algunes d'aquestes tècniques.

*Control de qualitat de les matèries primeres*

Les empreses tèxtils poden reduir les emissions d'aigua contaminada treballant per trobar substituïts de les matèries primeres que siguin menys contaminants. Analitzar les possibles matèries primeres és una pràctica molt important per determinar les interaccions amb el procés, substrats, i altres productes químics i possiblement reduir els residus.

*Substitució de productes químics*

El tractament final dels productes tèxtils és químicament intensiu, per aquesta raó s'ha de dedicar una atenció especial a la selecció dels productes químics utilitzats en el procés tèxtil. Les accions possibles a realitzar són:

- Substitució de productes químics i colorants per altres menys contaminants.
- Substitució dels tractaments químics per processos mecànics o altres tractaments no-químics.

*Modificació del procés*

L'optimització del procés es pot obtenir modificant algunes operacions. Alguns exemples de les possibles modificacions són:

- Substitució de les màquines de tenyit per d'altres que utilitzin menor relació de colorant en el bany de tenyit, que permetin estalviar energia, aigua, colorants i productes químics.
- Optimització de les condicions del procés, com temperatura i temps.

- Combinació d'operacions com per exemple estovat i blanquejat de les fibres, per estalviar energia i aigua.

#### *Modificació dels equips*

Una manera efectiva de reduir els residus és modificar o reemplaçar equipament i introduir automatitzacions, per exemple un sistema de dosificació del colorant automatitzat, controladors de paràmetres com pH, temperatura o color en la màquina de tenyit, etc.

#### *Bones pràctiques d'operació*

La introducció dels procediments de prevenció de la contaminació, que inclouen la investigació en la prevenció de la contaminació, nou disseny de les instal·lacions, i programes de formació per als treballadors, és una bona opció per prevenir la contaminació sense canviar el procés industrial.

#### b) Reutilització i reciclatge d'aigua i productes químics en efluent provinents d'operacions específiques dins del procés general

La reutilització i reciclatge de productes químics i aigua en els processos anomenats humits és una possibilitat que pot o no requerir tractaments previs. El reciclatge (amb el significat de reutilització de l'aigua i productes químics en el mateix procés on s'han generat els efluent que es reutilitzen), quan es pot aplicar, pot suposar un estalvi no només d'aigua i productes químics, sinó també un estalvi energètic. Un exemple és la reutilització dels banys calents esgotats de tinció per més lots de tinció. Com a conseqüència, per respectar les característiques requerides pel següent cicle de tinció, el bany s'ha de reconstituir afegint aigua, productes químics auxiliars, i colorants (EPA, 1997).

La majoria d'exemples de reutilització d'aigua sense tractament previ estan basats en la recuperació de l'aigua utilitzada en l'operació d'esbandit. L'implementació del rentat en contracorrent pot reduir significativament el total d'aigua consumida. Aquest procés s'utilitza molt en els sistemes en continu. Per tal d'optimitzar l'ús total d'aigua s'ha de realitzar un anàlisi de les xarxes d'aigua i avaluar noves opcions de tractament i reutilització d'aigües. El tractament que es requereix pels efluent provinents d'operacions específiques dins del procés general tèxtil està basat en la possibilitat d'aplicar tractaments eficients, segurs, econòmicament viables i de fàcil implementació a aquests corrents residuals individualitzats. Utilitzant operacions adequades de

tecnologia de membranes es poden obtenir bons resultats. Un exemple de metodologia proposada per fer un bon ús de l'aigua en les indústries tèxtils és el següent:

- Caracterització detallada del procés tèxtil (aigua, contaminants, balanços d'energia)
- Caracterització dels efluent que es volen avaluar per tractar i reutilitzar.
- Identificació de les opcions viables de reutilització d'aigua d'acord amb els requeriments del procés tèxtil i de la caracterització dels efluent.
- Disseny del possible tractament de les aigües a reutilitzar d'acord amb els requeriments del procés i de la caracterització dels efluent.
- Caracterització del tractament de l'efluent final en una planta de tractament d'aigües residuals.

Amb aquesta metodologia s'espera reduir el consum d'aigua, i per tant també reduir les aigües residuals finals generades. La composició d'aquest efluent final canviarà significativament (reducció en la quantitat generada, increment en la concentració de contaminants). El fet de que molts components de l'aigua residual tèxtil siguin recalcitrants i biotòxics fa que, amb un tractament individualitzat dels corrents residuals, la concentració d'aquests compostos sigui major comparat amb el cas de fer un tractament final de tots els corrents, i això pot afectar al funcionament de les plantes de tractament existents a la indústria, i per tant suposar un canvi en el disseny de la planta de tractament de les aigües residuals.

Per últim, però no per això menys important, s'ha d'avaluar si els contaminants son transferits de l'aigua a l'aire o al sòl, això es pot realitzar mitjançant un anàlisi de cicle de vida (ACV).

Aquesta metodologia integrada de multicriteri, conjuntament amb una regulació efectiva, s'espera que contribueixi a la competitivitat de les indústries tèxtils i a atenuar els efectes negatius de la globalització en la indústria tèxtil a Europa.

#### c) Reutilització i reciclatge d'aigua al final del procés

El tractament dels efluent final per a la reutilització i reciclatge de l'aigua també poden ser efectius i viables econòmicament en alguns casos. A Europa hi ha àrees que es poden definir com districtes tèxtils, on moltes indústries tèxtils, principalment petites i mitjanes empreses utilitzen les mateixes instal·lacions de subministrament i tractament d'aigües.

Actualment la descontaminació d'aquests efluent generalment implica una planta de tractament centralitzada per a aigües industrials i municipals utilitzant una

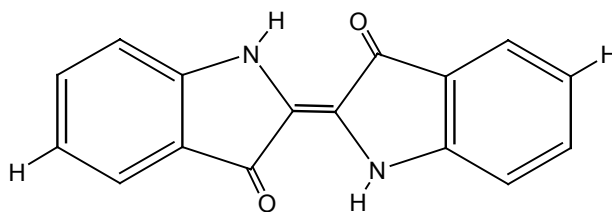
etapa biològica aeròbia. Alguns compostos són totalment biodegradats, mentre que altres com colorants, surfactants i altres metabòlits, o bé són adsorbits sobre la biomassa, o bé surten amb l'efluent final. Les aigües residuals tèxtils contenen pocs compostos orgànics biodegradables, almenys sota condicions aeròbies, i poden contenir compostos tòxics, sovint poc biodegradables. Això fa que un tractament aerobi tradicional presenti serioses limitacions per a la depuració de les aigües residuals de la indústria tèxtil.

S'han proposat diferents processos combinats per millorar les actuals plantes de tractament d'aigües residuals de la indústria tèxtil. Un d'ells consisteix en realitzar un pretractament: un mòdul per la precipitació química de metalls pesats i adsorció de colorants sobre fangs anaerobis (Terras *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2000). Un altre és la millora del tractament biològic per eliminar productes orgànics biodegradables, per oxidar compostos de nitrogen i per monitoritzar la toxicitat potencial (Terras *et al.*, 1999; Massone *et al.*, 1998; Guwy *et al.*, 1998). En aquest procés s'afegeix biomassa aclimatada i nutrients per augmentar l'activitat biològica. Per últim s'ha proposat l'optimització del tractament terciari, per portar l'aigua cap a als estàndards requerits per la seva reutilització industrial (Bergna *et al.*, 1999; Rozzi *et al.*, 2000). El post-tractament dels efluents mixtes tèxtils i domèstics s'han provat amb èxit en els següents processos unitaris: ozonització, floculació/clarificació, filtració, adsorció sobre carbó actiu, microfiltració i osmosis inversa.

Noves metodologies avançades de respirometria i valoracions (Rozzi *et al.*, 1999) es poden utilitzar com a tècniques per a la caracterització d'aigües residuals. Són particularment indicades per avaluar els efectes dels efluents abocats a la planta depuradora, a partir de la seva biodegradabilitat i potencial inhibitori. L'ús d'aquests mètodes de caracterització fa possible que es puguin prevenir problemes de tractament deguts per exemple a descàrregues tòxiques (Lens *et al.*, 2002)

## **1.2. Els colorants**

El color és present a tot el què ens envolta i ha fascinat als humans ja des de temps prehistòrics quan es van començar a utilitzar pigments i colorants d'origen natural. Provenents de plantes, arbres, moluscs i insectes... s'utilitzaven per pintar les cases, la pell i la roba. Un bon exemple de colorant natural utilitzat al llarg dels segles és l'indigo que prové de la planta *Indigofera tinctoria* (Índia). A la figura 1.1 es pot veure un exemple d'estructura d'un colorant indigoid.

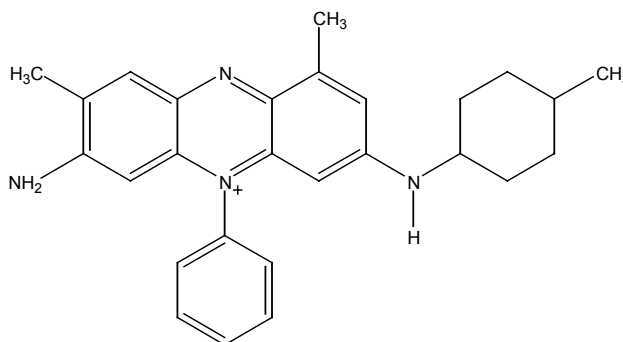


**Figura 1.1.** Exemple de colorant natural. Estructura del colorant indigoid Tyrian purple

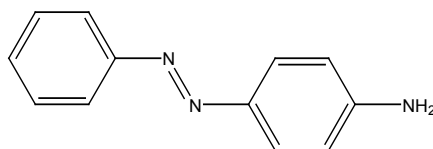
La història dels colorants sintètics també es pot remetre a temps ancestrals. Es creu que fou ja a l'Egipte antic quan es van desenvolupar els primers colorants sintètics com l'*Egyptian Blue* (mescla de silicats, coure i calci) d'origen inorgànic. Els colorants sintètics tèxtils però, són tots d'origen orgànic i el seu ús és molt més recent ja que no es van sintetitzar fins a meitats del segle XIX. Fins aleshores els materials tèxtils eren acolorits amb colorants naturals, tot i que s'havia anat millorant el procés de fixació del colorant al teixit per mitja de l'utilització de fixadors, que en alguns casos fins i tot desenvolupaven una major intensitat i brillantor del color.

Tot i que es creu que el primer colorant sintètic va ser l'àcid pícric, preparat per primera vegada a l'any 1771; l'inici de la indústria del colorant sintètic s'atribueix a William Henry Perkin, que va sintetitzar al 1856 el colorant sintètic *Aniline Purple* (actualment anomenat *Mauveine*). A la figura 1.2 es pot veure la seva estructura.

Posteriorment a aquest, un dels descobriments més importants en aquest camp el portà a terme Peter Griess qui desenvolupà la química dels colorants azo, la classe més important que es coneix fins ara dins del grup dels colorants (figura 1.3).



**Figura 1.2.** Estructura del colorant Mauveine



**Figura 1.3.** Exemple colorant monoazo, colorant Aniline Yellow

Des d'aleshores la indústria dels colorants ha anat a l'alça i encara avui, a principis del segle XXI, s'investiga la producció de nous tipus de colorants i pigments per aplicacions tèxtils, pelleteres, en pintures, en plàstics, etc.

Actualment a més, el camp dels colorants s'ha obert cap a noves aplicacions, són els anomenats "colorants funcionals" que es caracteritzen per complir amb altres funcions a part de donar color. Es tracta per exemple dels colorants aplicats a camps com l'electrònica (làsers, pantalles de cristall líquid...), l'electrofotografia i en medicina (fluorimetries, teràpies fotodinàmiques contra el càncer...) (Christie, 2001).

El terme colorant s'utilitza freqüentment per referir-se a dos tipus de compostos (colorants i pigments) ja que els dos s'utilitzen en la coloració de materials i fins i tot arriben a ser substàncies semblants químicament. Però es necessari distingir les diferències en les seves propietats i especialment en la seva utilització. Colorants i pigments es diferencien principalment en la seva solubilitat: si els colorants són solubles els pigments son insolubles. La utilització tradicional del colorants és en la indústria tèxtil on normalment es requereix que siguin solubles en medi aquós i en les noves aplicacions com en l'electrònica en dissolvents orgànics. Per al contrari els pigments són completament insolubles en el medi i les seves principals aplicacions es troben en pintures, plàstics, coloració de materials com el ciment, materials ceràmics, vidre, etc. Una distinció més acurada entre aquests dos materials seria, que mentre els colorants es dissenyen perquè siguin atrets fortament a molècules polimèriques per a dur a terme la coloració en el procés; els pigments no són atrets pel medi sinó entre ells per a formar una estructura en forma de xarxa cristal·lina i així resistir qualsevol dissolució (Christie, 2001).<sup>(1)</sup>

Un dels mètodes més simples però que actualment encara s'utilitza per explicar l'origen del color fou proposat per Witt al 1876. La seva teoria postula l'existència de dos grups principals (cromòfor i auxocrom) com a responsables de l'aparició del color.

---

<sup>(1)</sup> En els següents apartats es parlarà de colorants i pigments alhora referint-s'hi amb el terme "colorants".

Segons aquesta teoria, el primer grup anomenat *cromòfor* es defineix com el grup d'àtoms responsable del color. En segon lloc es troba el grup *auxocrom* com a potenciador del color. Posteriorment s'ha vist que per explicar la presència de color és necessari que el grup cromòfor estigui dins de l'estructura conjugada (alternant enllaços senzills amb dobles). Aquesta terminologia es encara avui utilitzada per tal de donar una simple explicació del color, tot i que suggeriments inicials de Witt com que els grups auxocroms eren tant essencials com els grups cromòfors per a garantir les propietats dels colorants, han resultat ser poc vàlids, ja que l'element essencial s'ha considerat l'existència de conjugació dins la molècula.

Els grups cromòfors més importants són: en primer lloc l' azo (-N=N-) seguit pel grup carbonil (-C=O), metilè (-CH=) i nitro (-NO<sub>2</sub>). Com a grups auxocroms principals trobem el grup hidròxid (-OH), sulfat (HSO<sub>3</sub>), àcid (COOH) i amino (-NR<sub>2</sub>). Algunes teories també associen el grup auxocrom amb l'estat d'ionització de la molècula, així grups com el COOH i HSO<sub>3</sub> donen caràcter àcid a la molècula mentre que el grup amino dóna a la molècula un estat d'ionització positiu, per tant caràcter bàsic ( web Stansfile).

Actualment han sorgit noves teories sobre la base del color, les dues més importants són: "València d'enllaç" basada en els lligams que mantenen les diferents molècules que componen l'estructura del colorant per explicar les propietats d'aquest; i "Teoria de l'acostament de l'orbital molecular al color i la constitució", on s'hi relaciona el color amb l'energia d'excitació dels orbitals moleculars. Aquesta última és una de les més utilitzades sobretot pel que fa a prediccions en la síntesi de nous colorants (Christie, 2001). Aquestes últimes teories relacionen el color d'una molècula en funció de l'energia d'excitació necessària per a la deslocalització dels electrons.

### **1.2.1. Classificació dels colorants**

En l'identificació dels colorants la referència més utilitzada es la de l' Índex Color (*Color Index*) (publicació de la *Society of Dyes and Colourists, Bradford, England*). Conèixer aquest índex numèric permet obtenir informació molt útil per cada colorant sobre les seves propietats i els mètodes d'aplicació. Els colorants i pigments poden ser classificats de dues formes principals, en funció de la seva estructura química o segons el mètode d'aplicació.



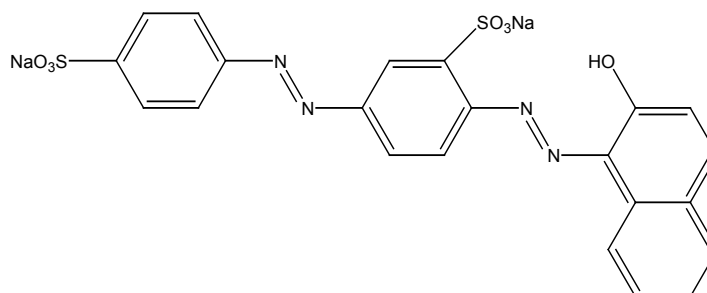
✓ **Classificació química**

La classificació química, la més important per als colorants, és basa en certes característiques químiques comunes i és la classificació que s'ha utilitzat en aquest treball com a referència. Segons aquesta, les classes de colorants i pigments per ordre d'importància decreixent són: azo (-N=N-), carbonil (C=O) (incloent-hi els antraquinònics), ftalocianina, ió arilcarbeni, sulfur, polimetè i nitro. Cal dir que existeixen altres grups de colorants que no han estat mencionats en aquesta classificació química, o bé perquè no han estat prou investigats o no tenen sortida comercial (Christie, 2001; web Stansfile).

**Colorants azo**

Els colorants azo constitueixen la classe més important de colorants orgànics comercials. Inclouen el 60-70% de tot el mercat de colorants utilitzats en les aplicacions tèxtils, ja que són els colorants amb la relació cost-efectivitat millor. Són capaços de donar el doble d'intensitat de color que molts altres colorants i alhora són fabricats a un cost menor. Una altra raó es pot trobar en la seva estructura química; ja que es poden preparar grans quantitats de colorants azo segons necessitats d'aplicació amb pocs requeriments energètics i a baix cost.

L'estructura comuna per als colorants azo ve determinada per l'enllaç N=N. Normalment, tot i que no de forma exclusiva, els grups azo van lligats a dos sistemes d'anells aromàtics. La majoria dels colorants azo contenen un sol enllaç N=N, i s'anomenen colorants monoazo. Tot i que també se'n troben, ja en menys quantitat, amb dos o més enllaços, com l'estructura del colorant diazo Biebrich Scarlet que es mostra en la figura 1.4.



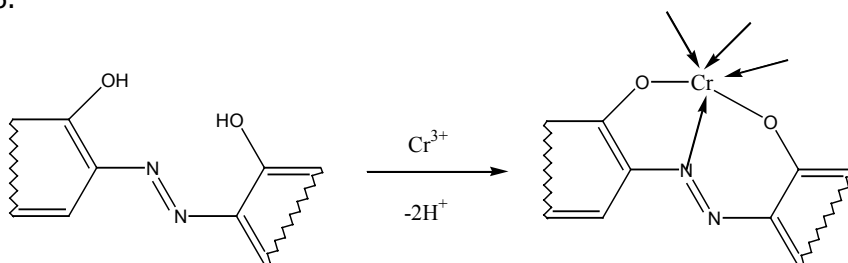
**Figura 1.4.** Exemple de colorant diazo, colorant Biebrich Scarlet

En termes de propietats de color els colorants azo són molt importants en colors com els grocs, taronges i vermells. Un dels subgrups dins la classe azo que té una importància significativa és la dels colorants complexos metàl·lics azo.

Ja des de fa segles la formació de colorants azo combinats amb metalls s'ha aplicat amb la finalitat de millorar la rapidesa i la brillantor en els tenyits on s'utilitzaven colorants industrials. És el que s'anomena procés de fixació. Aquests colorants s'utilitzen encara avui, però el seu ús ha quedat restringit bàsicament al tenyit de la llana, on s'hi complexen certs colorants azo amb  $\text{Cr}^{3+}$ .

Dins dels fixadors, els més importants són els colorants formats a partir de la reacció d'ions de metalls de transició amb lligands en els que en la posició ortoadjacent al grup azo contenen grups capaços de coordinar-se amb l'ió metàl·lic. Els grups més importants són l'àcid ( $-\text{CO}_2$ ), l'amina ( $\text{NH}_2$ ) i l'hidroxil ( $-\text{OH}$ ).

Un exemple de la formació d'un colorant complex metàl·lic azo es pot veure a la figura 1.5.



**Figura 1.5.** Formació d'un complex metàl·lic azo entre o,o'-dihidroxi azo i crom(III)

### Colorats carbonil

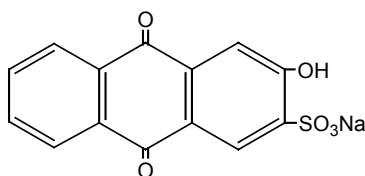
És el grup més important després dels colorants azo, i es caracteritza per la presència del grup carbonil ( $-\text{C}=\text{O}$ ) com a grup cromòfor. Els colorants carbonil es troben en una gamma estructural més ampla que el grup dels colorants azo. Dins d'aquest grup cal remarcar que destaca de forma important, especialment per les seves aplicacions, el subgrup format pels colorants antraquinònics. També, comercialment rellevants es troben altres subgrups com són: indigoids, benzodifuranones, coumarins, naftaliamides...

Una de les característiques més importants que tenen els colorants carbonils és la capacitat de donar una ampla banda de longitud d'ona amb sistemes conjugats relativament curts. Aquesta característica es troba especialment en colorants antraquinònics i derivats indigoids.

Respecte a les propietats de fermesa i rapidesa en el tenyit, aquests colorants solen ser superiors als colorants azo i s'utilitzen (sobretot els colorants antraquinònics) en aplicacions de tenyit de fibres com el cotó; gràcies a l'habilitat del grup carbonil per reduir-se de forma reversible en medi soluble. En aquests casos la inestabilitat del grup azo en processos de reducció fa inadequada la seva aplicació.

Tot i això la producció dels colorants carbonil, si la comparem amb la dels azo, és molt menys versàtil i molt més laboriosa implicant múltiples etapes intermitges i la utilització d'intermediaris.

Degut a la importància que tenen els colorants antraquinònics, s'ha considerat oportú fer una petita presentació referida a aquest subgrup de colorants carbonils. Els colorants antraquinònics contenen un sistema característic de tres anells alineats de sis àtoms, en el que el grup carbonil es troba en l'anell central i els dos anells exteriors són aromàtics, tal i com s'observa a la figura 1.6.



**Figura 1.6.** Estructura model dels colorants antraquinònics.

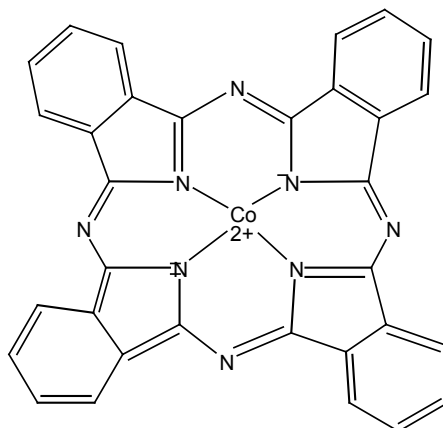
Avui en dia existeixen al voltant d'uns 200 tipus de colorants antraquinònics diferents, i la seva utilització s'ha basat fins ara en l'aplicació de colors verds, blaus i violetes. En els processos de tenyit actuen de forma més ràpida i solen donar un color molt més brillant que no pas els colorants azo, però amb una relació efectivitat-cost molt baixa.

### **Colorants ftalocianines**

Les ftalocianines representen sens dubte el grup cromòfor més important desenvolupat durant el segle XX. Després del seu descobriment la indústria comença a explotar ràpidament les seves propietats úniques pel que fa a colors intensos i elevada brillantor; essent la classe de colorants que ha estat més extensament estudiada.

L'estructura bàsica de les ftalocianines és plana i consisteix en quatre unitats isoindole connectades per quatre àtoms de nitrogen. La majoria de les ftalocianines contenen un àtom metàl·lic central, tal com es mostra a la figura 1.7.

Aquesta classe de compostos té molta importància en el camp dels pigments, sobretot pel que fa a aplicacions plàstiques dels colors blau i verd, ja que són estructuralment molt estables, fins i tot a temperatures elevades.

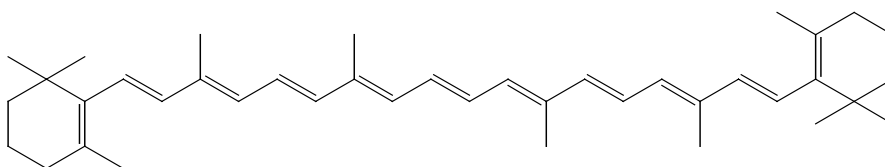


**Figura 1.7.** Estructura model ftalocianina, Pigment Blue 75

#### Colorants poliens i polimetens

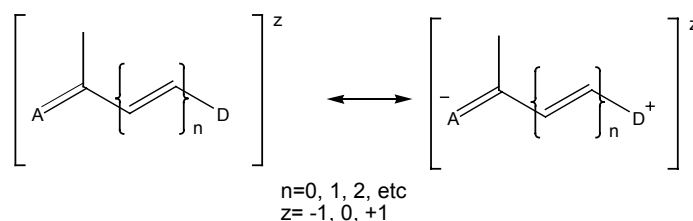
Els colorants poliens i polimetens es fomenten en la relació entre estructures que compten amb un o més d'un metè (-CH=). Són estructures que contenen una sèrie de dobles enllaços conjugats que donen color a la molècula. Aquestes cadenes solen acabar amb grups alifàtics i alicíclics.

El grup del poliè més conegut i utilitzat és el de  $\beta$ -carotens (d'origen natural), tot i que la seva aplicació no es troba a la indústria tèxtil sinó a la bioquímica. La seva estructura típica es mostra a la figura 1.8.



**Figura 1.8.** Estructura típica dels colorants poliens

Els colorants del grup polimetè es caracteritzen per tenir una àmplia varietat estructural. De forma bàsica però, la seva estructura es resumeix com es mostra a la figura 1.9. On els grups donador (D) i acceptor (A) li donen el caràcter: aniònic, catiònic o neutre.



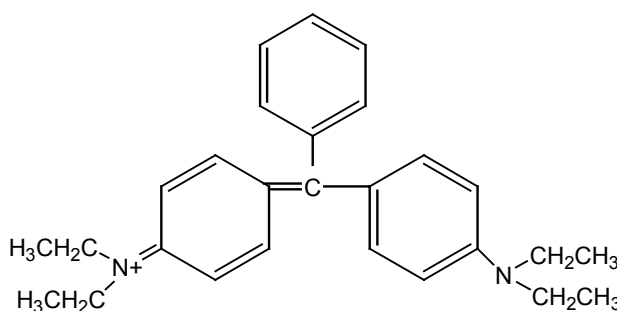
**Figura 1.9.** Estructura típica dels colorants polimetens

Si bé aquest últim grup és capaç de donar gran intensitat de color; pel que fa a la seva velocitat de tinció és tan pobra que pràcticament no s'utilitzen en la indústria tèxtil (únicament en el tenyit de fibres de poliester); si en canvi en la indústria fotogràfica.

### Colorants ió arilcarbeni

Són els primers colorants tèxtils que es van desenvolupar ja que, *Mauveine* el primer colorant orgànic sintetitzat pertany a aquest grup (veure apartat 1.2). La majoria d'aquests colorants van ser desenvolupats al llarg del segle XIX i XX. Tot i que la seva importància ha anat minvant considerablement, encara avui conserven cert pes dins la indústria tèxtil (s'utilitzen en el tenyit de fibres acríliques). Encara que en el procés donen colors molt vius i extremadament intensos en una àmplia gamma de tons, tècnicament es troben molt per sota del colorants azo i carbonil.

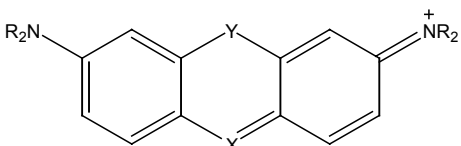
L'estructura bàsica d'aquests colorants es fonamenta en un carboni central rodejat per tres anells aromàtics, aquesta forma els ha donat el nom comú de triarilmetans. Un exemple de l'estructura d'aquests colorants el podem veure a la figura 1.10.



**Figura 1.10.** Estructura del colorant aril, Malachita Green.

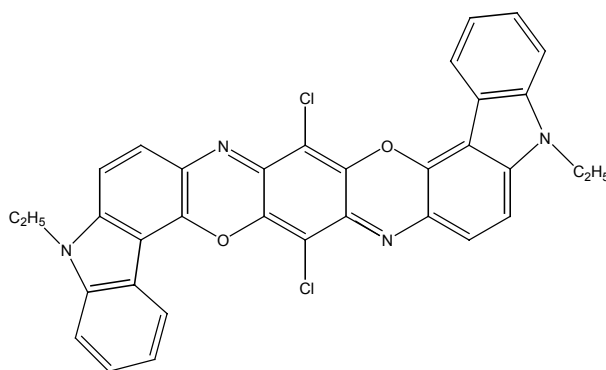
Anàlegs a aquests colorants són aquells que l'àtom de carboni central s'ha substituït per un àtom de nitrogen, i que també s'inclouen en aquesta classe. A la taula 1.2 es mostra un resum de les estructures d'aquests colorants. Existeixen també derivats que s'obtenen enllaçant dos anells aromàtics en la posició orto amb un heteroàtom.

**Taula 1.2.** Ió arilcarbeni i els seus derivats

		
X	Y	Tipus
-C(Ar)=	-O-	Xantè
-C(Ar)=	-S-	Tioxantè
-C(Ar)=	-NR-	Acridina
-N=	-O-	Oxazina
-N=	-S-	Tiazina
-N=	-NR-	Azina

### Colorants dioxazines

Són colorants que es caracteritzen per contenir dos grups oxazines com a grup cromòfor. Tenen una estructura angular, com la que es mostra a la figura 1.11.



**Figura 1.11.** Estructura del colorant dioxazine, Carbazole Violet.

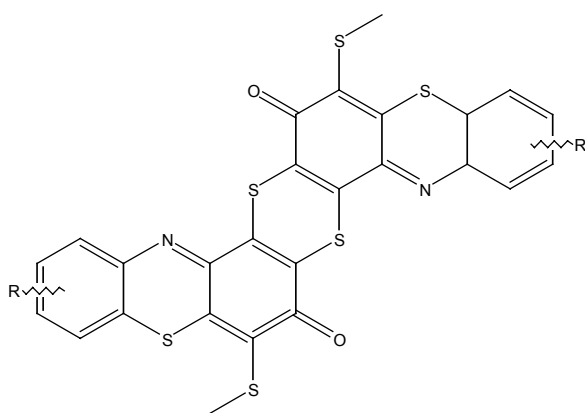
Hi ha relativament pocs colorants d'aquesta classe que fonamentalment donen colors violetes. La majoria d'ells però són pigments i tenen una alta resistència a elevades temperatures.

### **Colorants sulfur**

Aquest grup està format per una quantitat petita de colorants. Individualment però, es produeixen en grans quantitats sobretot pel què fa a colors com els negres.

Actualment es coneix que són mescles d'estructures polimèriques que compten amb un gran nombre de sulfurs en forma de (-S-) sulfit, (-S-S-) disulfit i (-S<sub>n</sub>-) polisulfit. A la figura 1.12 es mostra l'estructura bàsica que constitueix els colorants de tipus sulfur.

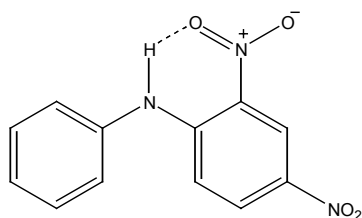
Són productes tradicionalment poc solubles en aigua i que un cop solubilitzats, tot i produir-se a cost baix, provoquen problemes mediambientals tant greus que la seva utilització ha disminuït de forma molt important en els últims anys.



**Figura 1.12.** Estructura model dels colorants sulfur.

### **Colorants nitro**

El que es troba en aquest petit grup de colorants recau en el grup cromòfor (NO<sub>2</sub>), tal i com es mostra en la figura 1.13.



**Figura 1.13.** Estructura model dels colorants nitro

Tot i que la síntesi d'aquests colorants és relativament simple i, fins a cert punt, a baix cost; la gran majoria d'aquests colorants no s'han arribat a aplicar comercialment, degut a que les seves propietats de tinció són pobres, que la seva toxicitat elevada i que cal prendre mesures especials durant la seva manipulació a causa de la seva elevada explosivitat.

✓ **Classificació segons l'aplicació dels colorants**

La classificació segons l'aplicació s'utilitza sobretot quan es parla de pigments i es fonamenta bàsicament en la utilitat que té un colorant per tenyir un determinat tipus de fibra. Segons aquesta segona classificació es troben per exemple colorants fixadors utilitzats en el tenyit de fibres proteiques, colorants directes per a fibres de cel·lulosa, colorants dispersos per al poliester...

En funció de la classe segons aplicació a la que pertany, el colorant té un determinat mecanisme de fixació al teixit. Per exemple, els colorants directes utilitzen forces de Van der Waals per adherir-se al cotó, la solubilitat dels colorants dispersos és bàsica en el tenyit del poliester... (Christie, 2001)

Un grup important dins la indústria tèxtil és el grup dels colorants reactius. El desenvolupament dels colorants reactius ha significat una de les innovacions més importants en el sector tèxtil. Són els colorants que es comporten millor durant i després del procés de tenyit, i si fins ara la seva aplicació bàsicament es trobava en el tenyit de fibres de cel·lulosa, ja s'han fet estudis per aplicar-los a fibres sintètiques. L'essència dels colorants reactius es troba en que no utilitzen diferents forces d'enllaç sinó que són capaços de reaccionar químicament amb els grups reactius de les mateixes fibres. Així per exemple aquests colorants realitzen un atac nucleofílic a la fibra de cel·lulosa aprofitant els grups -OH que aquesta té. Si bé els colorants reactius es poden preparar amb gairebé qualsevol de les diferents classes químiques, els que tenen més importància són els preparats a partir del grup azo.

### **1.3. Tecnologies per al tractament dels efluent tèxtils**

La presència de concentracions molt baixes de colorants en els efluent de la indústria tèxtil és molt visible i indesitjable (Nigam *et al.*, 2000). La seva estructura química fa que siguin resistents a agents externs com la llum, aigua i agents químics (Poots i McKay, 1976a; McKay, 1979). La major part de les solucions de colorants són difícils de decolorar degut a la seva estructura complexa i al seu origen sintètic. Al 1974 es va crear l'Associació Ecològica i Toxicològica d'Indústries de Fabricació de



Colorants (ETDA), amb l'objectiu de minimitzar el dany ambiental , protegir als usuaris i consumidors, cooperar amb el govern i preocupar-se per l'impacte toxicològic dels seus productes (Anliker, 1979). Aproximadament el 90% dels 4000 colorants que es van analitzar per l'ETDA van superar valors de LD<sub>50</sub> de 2 g/Kg. Es va trobar que els colorants més tòxics són els bàsics i els diazo (Shore, 1996).

Els governs de molts països cada vegada són més estrictes, especialment en els països desenvolupats, amb el tema d'eliminar els colorants dels efluent industrials, degut a que el 90% dels colorants tèxtils que entren en una planta de tractament per llocs actius passarien sense experimentar cap transformació, i per tant serien abocats a la llera pública. A continuació es mostra un estudi dels mètodes d'eliminació de colorants més àmpliament utilitzats per l'eliminació d'aquests dels efluent industrials. Aquests mètodes es divideixen en tres categories: químics, físics i biològics. Actualment la majoria de tractaments d'eliminació de colorants són físics o químics. A la taula 1.3 es mostren les avantatges i desavantatges dels mètodes actuals d'eliminació de colorants segons informació recollida en la bibliografia que s'especifica en els apartats següents.

**Taula 1.3.** Avantatges i desavantatges dels mètodes actuals d'eliminació de colorants dels efluent industrials tèxtils.

<b>Mètodes físic-químics</b>	<b>Avantatges</b>	<b>Desavantatges</b>
Reactiu Fenton	Decoloració efectiva de colorants solubles i insolubles	Generació de fangs
Ozonització	S'aplica en estat gasós, no s'altera el volum	Vida mitja de l'ozó curta (20 min)
Fotoquímic	No es produeixen fangs	Es formen productes secundaris
NaOCl	Inicia i accelera el trencament de l'enllaç azo	Es produeixen amines aromàtiques
Electroquímic	Els compostos de degradació no són perillosos	Cost elevat de l'electricitat
Adsorció amb carbó actiu	Eliminació d'una àmplia varietat de colorants	Car
Altres adsorbents	Bona capacitat d'adsorció per molts colorants.	Es requereixen elevats temps de contacte, producció de fangs.
Sílica gel	Efectiva per l'eliminació de colorants bàsics	Reaccions paral·leles fan que no es comercialitzi
Filtració amb membrana	Elimina tota classe de colorants	Producció de fangs concentrats
Intercanvi iònic	No hi ha pèrdues d'adsorbent en la regeneració	No és efectiu per tots els colorants

### 1.3.1. Mètodes químics

#### Processos oxidatius

Aquest és el mètode més utilitzat de decoloració mitjançant agents químics, principalment degut a la simplicitat d'aplicació. L'agent oxidant més comú es el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ). Aquest agent necessita ser activat, per exemple amb llum ultraviolada, i degrada les molècules de colorant a  $CO_2$  i  $H_2O$  (Yang *et al.*, 1998; Peralto-Zamora *et al.*, 1999). Els mètodes de decoloració química varien en funció de com és activat l'  $H_2O_2$  (Slokar i Le Marechal, 1997). L'oxidació química elimina el colorant de les aigües per oxidació, obtenint anells aromàtics de les molècules de colorant (Raghavacharya, 1997; Mohey El-Dein *et al.*, 2003). Rodríguez Couto *et al.* (2002) utilitzen un reactor fotoquímic, amb òxid de zinc immobilitzat per la degradació de colorants tèxtils. A continuació es descriuen altres processos oxidatius utilitzats per l'eliminació de colorants.

#### Reactiu Fenton $H_2O_2$ - Fe(II)

El reactiu Fenton és un mètode indicat per tractar aigües residuals que són resistents al tractament biològic o són tòxiques per la biomassa (Slokar i Le Marechal, 1997). S'ha demostrat que és un mètode efectiu tant per decolorar colorants solubles com insolubles (Pak i Chang, 1999). La principal desavantatge d'aquest mètode és la generació de fangs degut a la floculació del reactiu amb les molècules de colorant. El fang requereix una disposició final. Normalment aquest fang s'incinera per obtenir energia, però aquesta disposició té nombrosos inconvenients ambientals. El rendiment de decoloració depèn de la formació dels flocs i de la seva sedimentabilitat.

#### Hipoclorit sòdic (NaOCl)

Aquest mètode consisteix en atacar al grup amino de la molècula de colorant amb Cl. L'utilització de Cl per l'eliminació de colorants cada vegada és menys freqüent degut als efectes negatius per al medi ambient que tenen els productes de reacció (Slokar i Le Marechal, 1997). També es formen amines aromàtiques que són cancerígenes i altres tipus de molècules tòxiques (Banat *et al.*, 1999).

#### Ozonització

Es va començar a utilitzar ozó als anys 70. Aquest és un oxidant molt fort degut a seva elevada inestabilitat (potencial d'oxidació 2.07) comparat amb altres oxidants com clorurs (1.36), i  $H_2O_2$  (1.36). La dosi d'ozó aplicada al corrent que conté el

colorant depèn del color total i de la càrrega orgànica que s'ha d'eliminar. No es generen ni residus ni fangs (Ince i Gonenc, 1997) ni tampoc subproductes tòxics (Garh *et al.*, 1994). Amb l'ozonització s'obté un efluent sense color i amb baixa càrrega orgànica que es pot abocar a la llera pública. La principal avantatge de l'ozó és que es pot aplicar en estat gasós i no augmenta el volum d'aigües residuals ni produeix fangs.

Els grups cromòfors dels colorants generalment són compostos orgànics amb dobles enllaços conjugats que es poden trencar formant petites molècules, amb el resultat de la reducció de color (Peralto-Zamora *et al.*, 1999). Aquestes petites molècules poden tenir propietats cancerígenes o tòxiques, per això l'ozonització s'ha d'aplicar juntament amb un mètode físic.

La principal desavantatge de l'ozonització és la generació de l'ozó in-situ degut a que té una vida mitjana molt curta, de 20 min aproximadament. Aquest temps pot ser curt per l'eliminació d'alguns colorants, a més l'estabilitat de l'ozó es veu afectada per la presència de sals, el pH i la temperatura. En solucions alcalines s'accelera la descomposició de l'ozó i per tant es requereix una monitorització del pH de l'efluent. Un dels majors inconvenients de l'ozonització és el cost, ja que es requereix una ozonització contínua degut a que té una vida mitja molt curta. Per aquesta raó s'han proposat combinacions d'ozonització amb processos biològics (Libra i Sosath, 2003).

#### **Destrucció electroquímica**

És una tècnica relativament nova, desenvolupada a mitjans dels anys 90. Les avantatges més importants són que hi ha molt poc consum de reactius químics, i no es produeixen fangs. Generalment els productes de la reacció que es generen no són perillosos, per tant les aigües tractades amb aquest mètode poden ser abocades a la llera pública. És un mètode eficient per l'eliminació de colorants i degradació de contaminants recalcitrants (Ogutveren i Kaparal, 1994; Pelegrini *et al.*, 1999). Cabals relativament elevats provoquen una disminució d'eliminació de colorant, i el cost de l'electricitat és comparable al cost dels productes químics.

#### **Processos fotoquímics: irradiació**

Es requereixen quantitats suficients d'oxigen dissolt per trencar de manera efectiva les molècules de matèria orgànica per radiació. L'oxigen dissolt es consumeix ràpidament i per tant es requereix un aport constant i adequat. Això suposa un cost. Es va mostrar que amb aquesta metodologia alguns colorants i molècules fenòliques es poden oxidar però només a escala laboratori (Hosono *et al.*, 1993).

### **1.3.2.Mètodes físics**

#### **Adsorció**

Els processos d'adsorció s'estan utilitzant força actualment degut a l'eficiència d'aquesta operació en l'eliminació de contaminants difícils de tractar amb mètodes convencionals. Amb l'adsorció s'obtenen efluent de gran qualitat (Choy *et al.*, 1999). La decoloració es produeix com a resultat de dos mecanismes: adsorció i intercanvi iònic (Slokar i Le Marechal, 1997), i està influenciada per molts factors fisicoquímics, com per exemple, la interacció colorant adsorbent, l'àrea d'adsorció, la mida de partícula, la temperatura, el pH, i el temps de contacte (Kumar *et al.*, 1998).

#### Carbó actiu

És l'adsorbent més utilitzat per l'eliminació de colorants (Nasser i El-Geundi, 1991) i és molt efectiu per l'adsorció de colorants catiónics, mordant i àcids. La seva efectivitat és lleugerament menor en l'eliminació de colorants dispersos, directes, vat i reactius (Raghavacharya, 1997; Rao *et al.*, 1994). El rendiment depèn del tipus de carbó actiu utilitzat i de les característiques de l'aigua residual. Es poden millorar les velocitats d'eliminació de colorant utilitzant dosis massives de carbó actiu. Això fa disminuir el rendiment, i l'eficiència d'eliminació esdevé imprevisible i dependent de les dosis de carbó utilitzat (Robinson *et al.*, 2001). L'adsorció amb carbó actiu és un procés car, el carbó s'ha de reactivar, o s'ha de gestionar la disposició final del residu. La reactivació suposa una pèrdua del 10-15% del carbó actiu inicial.

#### Cucurbituril

És un polímer cíclic de glicoluril i formaldehid. Buschmann (1992) va mostrar que aquest polímer tenia una capacitat d'adsorció molt elevada per diversos tipus de colorants tèxtils. Se sap que el cucurbituril forma complexes amb els compostos aromàtics. Aquest pot ser el mecanisme d'adsorció, però també s'ha proposat un altre mecanisme basat en les interaccions hidrofòbiques o a la formació de compostos cucurbituril-cations insolubles que fan que l'adsorció es doni ràpidament. El cost és el principal inconvenient d'aquest mètode.

#### Turba

L'estructura cel·lular de la turba fa que sigui ideal com a adsorbent. Té la capacitat d'adsorbir metalls de transició i compostos orgànics presents en els efluent colorats. La turba és un adsorbent viable en països com Irlanda i UK, on és abundant.

Aquest adsorbent no requereix activació i és molt més barat que el carbó actiu (Poots i McKay, 1976a). Però el carbó actiu té molta més àrea superficial, i per tant més capacitat d'adsorció. La turba utilitzada es crema per l'obtenció de vapor, o potencialment pot ser utilitzada com a substrat en una fermentació en estat sòlid (SSF) (Robinson *et al.*, 2001).

#### Astelles de fusta (adsorbent de baix cost)

Mostren una elevada capacitat d'adsorció per colorants àcids, encara que degut a la seva duresa, no són tan bones com altres adsorbents (Nigam *et al.*, 2000) i es requereixen temps de contacte més llargs. La fusta utilitzada normalment es crema per produir energia.

#### Cendres i carbó (mescla)

Concentracions elevades de cendra augmenten la velocitat d'adsorció degut a l'augment de la superfície de contacte disponible per l'adsorció.

#### Sílica gel

És un material efectiu per l'eliminació de colorants bàsics, però les reaccions paral·leles fan que no s'utilitzi comercialment.

#### Altres materials

La utilització de substrats com l'argila natural, morenc, pellofa d'arròs, etc. per l'eliminació de colorant té com avantatge principal que són adsorbents disponibles i barats. Són materials tan barats que no és necessària cap regeneració. Aquests materials amb el colorant adsorbit són potencialment utilitzables com a substrat en SSF (Robinson *et al.*, 2001).

#### **Membranes de filtració**

Amb aquest mètode es clarifica, es concentra, i el que és més important, se separa contínuament el colorant de l'efluent (Xu i Lebrun, 1999). El residu concentrat que queda després de la separació suposa problemes de disposició final, l'elevat cost, el fet de que les membranes es colmatin i haver-les de canviar són els principals desavantatges. Aquest mètode és efectiu per reciclar aigua d'efluents que contenen baixes concentracions de colorant.

**Bescanvi iònic**

Aquesta metodologia s'ha utilitzat molt poc en l'eliminació de colorants degut a la opinió de que els intercanviadors d'ions no funcionen amb gran varietat de colorants (Slokar i Le Marechal, 1997). L'avantatge d'aquest mètode és que no es produeixen pèrdues d'adsorbent en la regeneració, i el principal desavantatge és el cost.

**1.3.3. Tractaments biològics**

Les aigües residuals tèxtils de banys esgotats de tinció tenen una càrrega orgànica molt baixa, per tant per la seva càrrega orgànica són aigües residuals que poden ser admeses en una EDAR per a ser tractades, però l'elevat contingut en color fa que s'hagin de tractar prèviament per eliminar-lo. En els casos en que la DQO sigui molt baixa i s'elimini el color amb un pretractament no serà necessari el tractament en una EDAR sinó que l'aigua residual podrà ser abocada directament a la llera pública. En la majoria de les EDARs el tractament de les aigües residuals és biològic. La DQO dels banys esgotats encara que sigui baixa és de naturalesa no biodegradable, tant perquè els colorants tenen una estructura química complexa com per anar acompanyats d'un elevat contingut en sals i altres compostos, com tensioactius. Un altre problema associat al tractament de les aigües residuals tèxtils en una EDAR és l'adsorció del colorants sobre la biomassa. En plantes on es mesclen aigües residuals domèstiques i aigües colorades no hi ha problemes de nutrients, però en plantes on només hi ha tractament d'aigües amb color se'ls ha d'afegir. De totes maneres, concentracions excessives de metalls tòxics, pH's extrems, la presència de substàncies inhibidores, i la poca biodegradabilitat de la majoria de colorants i productes químics utilitzats durant el procés de tenyit, fan que els tractaments biològics no sempre siguin efectius.

**Cultius microbians**

Consortis bacterians de diferents habitats han mostrat la seva capacitat per decolorar colorants azo en 15 dies (Knapp i Newby, 1995). Nigam i Marchant (1995) i Nigam *et al.* (1996) van demostrar que bactèries anaeròbies eren capaces de decolorar una mecla de colorants en 24-30 hores, utilitzant cèl·lules lliures o formant biopel·lícules sobre diferents suports. Ogawa i Yatome (1990) també van demostrar la biodegradació de colorants azo per bactèries. La capacitat de les bactèries per metabolitzar colorants azo s'ha investigat específicament. Sota condicions aeròbiques aquests colorants són difícilment metabolitzables, tot i que Kulla (1981), va publicar la capacitat de soques de *Pseudomonas* per degradar aeròbicament alguns colorants azo.

Però de fet els intermedis formats van interrompre les rutes metabòliques i els colorants no van ser mineralitzats. Sota condicions anaeròbiques moltes bacteries redueixen els colorants azo degut a la producció de reductases. Aquests enzims produeixen amines aromàtiques que poden ser tòxiques, mutagèniques, i possiblement cancerígenes pels animals (Hu, 2001).

S'ha publicat que moltes bacteries redueixen una gran varietat de colorants azo sulfonats i no sulfonats sota condicions anaeròbiques sense cap especificitat significant. També se sap que colorants azo carregats i amb pes molecular elevat i polimèrics no són capaços de traspasar la membrana cel·lular, per tant ha d'existir una activitat reductora, independent de la disponibilitat intracel·lular del colorant azo (Kerck *et al.*, 1997).

Els llevats, com *Kluyveromyces marxianus*, són capaços de decolorar colorants. Banat *et al.* (1999) van demostrar que *K. marxianus* es capaç de decolorar Remazol Black B d'un 78 a un 98%. Zissi *et al.* (1997) van mostrar que *Bacillus subtilis* es podia utilitzar per trencar p-aminoazobenzè, un colorant azo.

#### **Adsorció sobre biomassa**

L'acumulació de productes químics sobre massa microbiana s'ha denominat biosorció (Hu, 1992, 1996; Tsezos i Bell, 1989; Kumar *et al.*, 1998). Bacteries, llevats i fong morts s'han utilitzat amb el propòsit de decolorar efluent amb colorants.

Els colorants tèxtils presenten gran varietat d'estructures químiques, i per això la interacció d'aquests amb els microorganismes depèn de l'estructura d'un colorant determinat i de la biomassa (Polman i Brekenridge, 1996). En funció del colorant i dels microorganismes utilitzats es donaran diferents velocitats i capacitats d'adsorció.

S'ha descrit que la biomassa derivada de la soca del llevat termotolerant *K. Marxianus* IMB3, presenta una elevada afinitat pels metalls pesats (Riordan *et al.*, 1997; Bustard i McHale, 1998; Riordan i McHale, 1998). La capacitat de bioadsorció va mostrar que aquesta biomassa té una elevada afinitat pels colorants.

La utilització de biomassa té els seus avantatges, especialment si l'efluent que conté el colorant és tòxic, ja que l'adsorció sobre biomassa és efectiva quan les condicions pel creixement i manteniment d'aquesta no són favorables. Hu (1992) va demostrar la capacitat de les bacteries per adsorbir colorants reactius.

#### **1.4. Tractament de decoloració amb fongs ligninolítics**

S'ha demostrat com els fongs de podridura blanca són capaços de degradar molècules complexes com la lignina gràcies a la producció d'enzims com la lacasa, lignina peroxidasa (LiP) o manganès peroxidasa (MnP). Tot i que la lignina és un material potencialment energètic, aquesta no serveix com a única font de carboni i energia per al fong, es necessiten substrats més accessibles, com la glucosa o la glicerina, entre altres (Kirk *et al.*, 1976; Kirk *et al.*, 1978). En el cas de la degradació de colorants també és necessària aquesta font de carboni externa accessible per a l'activitat del fong. El fong ligninolític més àmpliament estudiat en referència a la degradació de productes xenobiòtics és *Phanerochaete chrysosporium*.

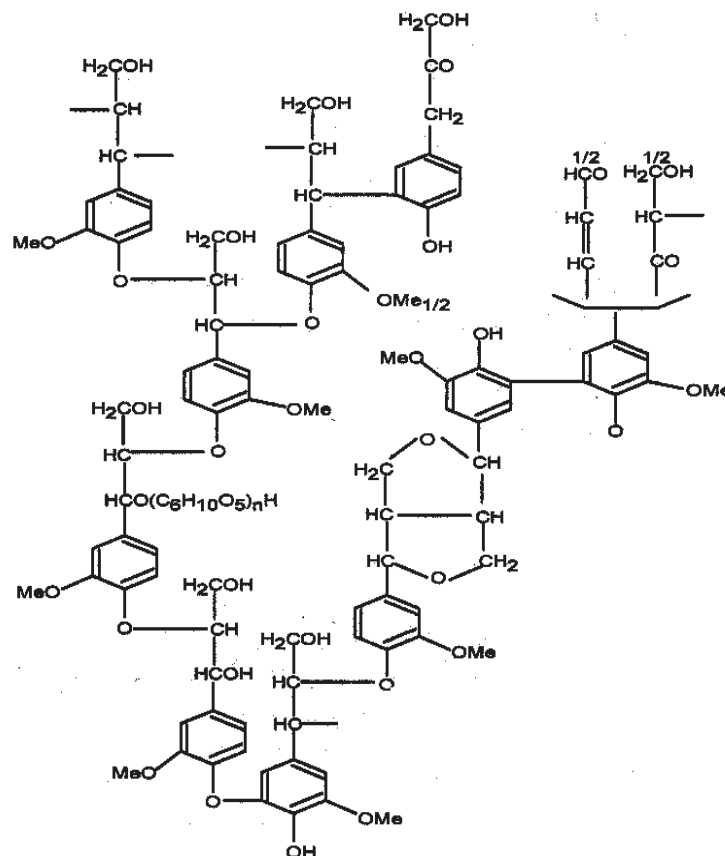
##### **1.4.1. El nexa d'unió entre l'estructura de la lignina i altres compostos aromàtics en efluents industrials**

La lignina és el segon biopolímer més important en la biosfera després de la cel·lulosa, essent un 35% del pes sec del teixit llenyós. La lignina és un polímer aromàtic que forma una xarxa tridimensional sobre les microfibrilles de cel·lulosa i confereix a les cèl·lules de la planta rigidesa, impermeabilitat a l'aigua i resistència a l'atac microbià. Aquest polímer es sintetitza a partir d'unions a l'atzar entre tres precursors fenilpropanoics diferents : *p*-cumaril, coniferil i alcohol sinapílic. Amb enllaços irregulars generen una estructura heterogènia, tridimensional, hidrofòbica i de pes molecular molt elevat (Barceló *et al.*, 1990). A la figura 1.14 es mostra una possible estructura de la lignina.

Aproximadament un 80-90% dels grups fenil i hidroxil que hi ha en la lignina participen en la formació d'enllaços intermoleculars, donant-li a la lignina un caràcter predominantment no fenòlic. La complexitat física i les característiques químiques que té la lignina fan d'ella un polímer inaccessible per als mecanismes hidrolítics de degradació, més típics d'altres biopolímers (ex: cel·lulosa). D'aquesta forma, l'atac per microorganismes a la lignina té lloc per un procés extracel·lular, no específic i oxidatiu.

Si es compara l'estructura de la lignina amb la dels compostos aromàtics presents en els efluents industrials es pot observar que els tipus d'enllaços i anells aromàtics són presents en ambdós casos. Fou aquesta similitud la que va fer plantejar la possibilitat que els colorants poguessin ser substrats susceptibles a ser atacats pels enzims ligninolítics, com ja s'havia observat amb altres contaminants orgànics (Bumpus i Aust 1996; Field *et al.*, 1993).





**Figura 1.14.** Possible estructura de la lignina

El sistema enzimàtic degradador de la lignina és molt complex i implica diferents activitats, algunes bàsiques i d'altres complementàries, totes elles necessàries per a completar el procés. S'han identificat principalment quatre grups d'enzims relacionats directament amb la degradació de la lignina destacant lignina peroxidasa (LiP), manganès peroxidasa (MnP), lacases i oxidases involucrades en la generació de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; aquests tenen un alt poder oxidant i un paper important en la degradació de la lignina (Boominathan *et al.*, 1992; Gold *et al.*, 1993). Així com diferents fongs productors d'aquests enzims: *Phanerochaete Chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera* com els més estudiats. Només un grup d'organismes –els basidiomicets– han desenvolupat l'habilitat de degradar la lignina de manera substancial. Aquests fongs segreguen oxidoreductases no específiques entre les quals es troba la lacasa, manganès peroxidasa (MnP) i lignina peroxidasa (LiP) (Hofrichter, 2002). Amb aquest sistema enzimàtic no específic els fongs de podridura blanca són capaços de degradar

compostos ligninolítics i aromàtics difícilment biodegradables amb sistemes de tractament convencionals. Alguns exemples de tractament d'efluents industrials amb diferents fongs ligninolítics són: melasses provinents de fermentacions alcohòliques amb *Trametes versicolor* (González *et al.*, 1997) o *Aspergillus niger* (Peña *et al.*, 1996); efluents de papereres amb *Phanerochaete chrysosporium* (Jaspers *et al.*, 1994) o *Aspergillus foetidus* (Sumathi i Phatak, 1999); lleixius negres amb *Trametes versicolor* (Pallerla i Chambers, 1997; Font *et al.*, 1997) i aigües residuals de les almàsseres amb *Phanerochaete flavido-alba* (Blánquez *et al.*, 2002).

#### **1.4.2. Degradació de colorants**

Estudis realitzats amb *P. chrysosporium* han demostrat per exemple que colorants azo, que tenen problemes de degradació en sistemes biològics convencionals, poden ser degradats amb eficàcia (Paszczynski i Crawford, 1995). Alguns estudis han confirmat que en el mecanisme responsable de la decoloració, participen enzims extracel·lulars com la lignina peroxidasa, manganès peroxidasa o lacases; però no es té constància que s'hagi arribat a relacionar la producció enzimàtica amb la decoloració (Michel *et al.*, 1990).

En els últims anys s'han estudiat una gran varietat de colorants arribant a decoloracions superiors al 90% mitjançant fongs com *P. chrysosporium* (Paszczynski, 1991).

La capacitat de decoloració d'altres fongs com *Hirschioporus larincinus*, *Inonotus hispidus*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor* i *Coriolus versicolor* també s'ha estudiat (Moreira *et al.*, 2000; Banat *et al.*, 1996).

Tot i que existeix una ampla informació en la bibliografia especialitzada en referència a tractaments de colorants amb fongs i/o enzims lingnolítics, resulta difícil fer una comparació dels resultats degut a la gran diversitat de sistemes descrits, on hi ha diferències importants en les condicions experimentals.

A continuació es presenta la taula 1.4 on es fa referència a diferents estudis de tractament de colorants utilitzant sistemes variats; des de fongs a enzims comercials o purificats. Fins al moment, pocs sistemes a escala pilot s'han desenvolupat per la decoloració de tints industrials i la majoria dels referenciats són estudis en Erlenmeyer a escala laboratori.

**Taula 1.4.** Treballs publicats de tractament de colorants amb fongs o enzims lignolítics.

Colorant	Microorganisme	Enzim	% Decol.	Temps	Altres	Ref.
<b>Azo</b>						
Amaranth	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, $\beta$ -glucosidasa	98.5	8 d		Chagas <i>et al.</i> 2001
	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	Lacasa, glucosa oxidasa	97	8 d		
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		100	12 d		Swamy <i>et al.</i> 1999
	<i>Bjerkandera</i>		98	1 d		
	<i>Trametes versicolor</i>		100	1 d		
New Coccine	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, $\beta$ -glucosidasa	95	8 d		
	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	Lacasa, glucosa oxidasa	96.5	8 d		
Orange G (Sunset yellow FCF)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, $\beta$ -glucosidasa	96.8	8 d		Chagas <i>et al.</i> 2001
	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	Lacasa, glucosa oxidasa	47.5	8 d		
Tartrazine	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, $\beta$ -glucosidasa	60	8 d		
	<i>Pleurotus sajorcaju</i>	Lacasa, glucosa oxidasa	20	8 d		
Reactive violet 5		MnP ( <i>B. adusta</i> ) LiP ( <i>B. adusta</i> )	87	20 min	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Veratril alcohol	Heinfling <i>et al.</i> 1998
		MnP ( <i>B. adusta</i> ) LiP ( <i>B. adusta</i> )	50	20 min	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Veratril alcohol	
Acid yellow 9	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>				No calcula % de decoloració sinó % de mineralització en prod de CO <sub>2</sub>	Paszczynski <i>et al.</i> 1992
Orange G II	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>					
Orange G I	<i>Streptomyces chromofuscus</i>					
Direct blue 71		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	84	3 h	Enzim+DMHAP	Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
Reactive black 5		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	88	3 h	Enzim+HOBT	
Congo red		LiP ( <i>P. chrysosporium</i> )	55	15 min	Enzim+ VA	Ollikka <i>et al.</i> 1993
Methyl orange		LiP ( <i>P. chrysosporium</i> )	90	15 min		
Reactofix gold yellow	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	73	72 h	Brou	Capalash <i>et al.</i> 1992
Reactofix orange	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	60	72 h	Brou	
Reactofix blue HE <sub>2</sub> R	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	49	72 h	Brou	
Navilene black	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	64	72 h	Brou	
Sulphur green	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	67	72 h	Brou	
Sulphur red	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	62	72 h	Brou	
Navion blue	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	71	72 h	Brou	
Vat brown	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	40	72 h	Brou	

Colorant	Microorganisme	Enzim	% Decol.	Temps	Altres	Ref.
Reactofix red	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Navilene golden yellow	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Suphur cofee brown	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Vat green	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Vat orange	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	Capalash <i>et al.</i> 1992
Naphtol base scarlet	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Naphtol ASTR	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Naphtol ASBS	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Naphtol base bordears	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
Lissamyne fast yellow	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	No decol.	72 h	Brou	
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	95	24 h		Cripps <i>et al.</i> 1990
		LiP	10	10 min		
Tropaeolin O	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nd	89	13 d		Swamy <i>et al.</i> 1999
	<i>Bjerkandera</i>	Nd	0	20 d		
	<i>Trametes versicolor</i>	Nd	100	3 d		
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	91	24 h 5 d		Cripps <i>et al.</i> 1990
		Lip	40	10 min		
Orange II	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP	95	30 d	Reactor continu de llit fix	Mielgo <i>et al.</i> 2001
		MnP	95	3 d	Llit fluiditzat	Zhang <i>et al.</i> 1999
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		95	4d	Llit fixe	
Congo red	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	93 97	24 h 5 d		Cripps <i>et al.</i> 1990
Brillant yellow 3	Mescla de fongs ligninolítics	Nd	99	20 d		
Chrysophenine	Mescla de fongs ligninolítics	Nd	26	20 d		Knapp <i>et al.</i> 1995
Chlorazol yellow	Mescla de fongs ligninolítics	Nd	67	20 d		
N,N-dimethyl-4-phenylazoaniline (Diazo)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP MnP	46	7 d	Carcinogen	
Disperse orange 3 (Diazo)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP MnP	42.5	7 d	Tòxic	Spadaro <i>et al.</i> 1992
Solvent yellow 14 (Diazo)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP MnP	23.1	7 d	Tòxic	
4- phenyl-azoaniline (Diazo)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP MnP	25.8	7 d	Tòxic	
RP2B (Monoazo)	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	98	5 d	Toxicitat per aparició amines	Hu <i>et al.</i> 2001

Colorant	Microorganisme	Enzim	% Decol.	Temps	Altres	Ref.
V2RP (Monoazo)	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	95	4 d	Toxicitat per aparició amines	
Reactive red 22	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	99	2 d	Toxicitat per aparició amines	
Direct blue 15	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	72	6 d	Toxicitat per aparició amines	Hu <i>et al.</i> 2001
Direct violet 9	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	82	6 d	Toxicitat per aparició amines	
Direct black 22	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	69	6 d	Toxicitat per aparició amines	
Leather dye	<i>Pseudomonas uteola</i>	Azoreductasa (CAR)	59	6 d	Toxicitat per aparició amines	
2,6-dimethyl-4-sulfophenyl-azo	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lacasa	Vel: 447 nmol/min·g	1 h		
2-methyl-4-sulfophenyl-azo	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lacasa	Vel: 20 mol/min·g	1 h		Chivukula <i>et al.</i> 1995
2-methoxy-4-sulfophenyl-azo	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lacasa	Vel: 200 mol/min·g	1 h		
2,6-dimetoxy-4-sulfophenyl-azo	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lacasa	Vel: 703 nmol/min·g	1 h		
PolyR-478	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP	80	1 d	Tanc agitat	Leiding <i>et al.</i> 1999
		LiP	50	15 min	Enzim+VA	Ollikka <i>et al.</i> 1993
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP	80	135 d	Immobilitzat	Palma <i>et al.</i> 1999
		LiP ( <i>P. chrysosporium</i> )	80	100 s		
		MnP ( <i>P. chrysosporium</i> )	20	5 min		Moredo <i>et al.</i> 2003
	Lacasa ( <i>T. versicolor</i> )	0	15 min			
<b>Arils</b>						
Acid violet 17		Lacasa ( <i>T. Modesta</i> )	100	3 h	Enzim+HBT	Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
Basic red 9		Lacasa ( <i>T. Modesta</i> )	95	3 h	Enzim+MPT	
Methyl green		LiP ( <i>P. chrysosporium</i> )	90	15 min	Enzim+VA o no	Ollikka <i>et al.</i> 1993
Crystal violet	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	100	24 h	Analitza metabolits	
Pararosaniline	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	75.5	24 h	Analitza metabolits	Bumpus <i>et al.</i> 1998
			100	48 h		
Cresol red	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	100	24 h	Analitza metabolits	
<b>Ió arilcarbeni</b>						
Bromphenol blue	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	97.7	24 h	Analitza metabolits	Cripps <i>et al.</i> 1990
			100	48 h		

Colorant	Microorganisme	Enzim	% Decol.	Temps	Altres	Ref.
Azure B	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	94.7	24 h	Analitza metabolits	Cripps <i>et al.</i> 1990
			100	48 h		
Malachite green	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	76.8	24 h	Analitza metabolits	Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
			100	48 h		
Brilliant green IV	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Enzims ligninolítics	89.7	24 h	Analitza metabolits	Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
			100	48 h		
Methylene blue		LiP ( <i>P. chrysosporium</i> )	82	15 min		Ollikka <i>et al.</i> 1993

#### Indigoids

Acid blue 74		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	3 h	Sense mediador	Swamy <i>et al.</i> 1999
Indigo Carmine		LiP, MnP ( <i>P. chrysosporium</i> )	97-100	2 h		Podgornik <i>et al.</i> 2001

#### Reactius monoazo i diazo

Ramazol brillant orange 3R	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nd	85	18 d		Swamy <i>et al.</i> 1999
	<i>Bjerkandera</i>	Nd	54	20 d		
	<i>Trametes versicolor</i>	Nd	100	3 d		
Ramazol black B	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nd	100	15 d		Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
	<i>Bjerkandera</i>	Nd	96	3 d		
	<i>Trametes versicolor</i>	Nd	100	100 d		

#### Reactius ftalocianines

Reactiu blue 221		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	3 h		Heinfling <i>et al.</i> 1998
Reactiu black 5		Mnp ( <i>B. adusta</i> ) LiP ( <i>B. adusta</i> )	70	15 min	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Veratril alcohol	Swamy <i>et al.</i> 1999
Reactiu blue 38	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	nd	73	19 d		Ollikka <i>et al.</i> 1993
Reactiu blue 15	<i>Bjerkandera</i>	MnP	0	20 d		Swamy <i>et al.</i> 1999
	<i>Trametes versicolor</i>	nd	100	7 d		

#### Reactius antraquinònics

Remazol brillant blue R		LiP ( <i>P. chrysosporium</i> )	75	15 min	Enzim+VA	Ollikka <i>et al.</i> 1993
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	nd	83	11 d		Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
	<i>Bjerkandera</i>	nd	65	20 d		
	<i>Trametes versicolor</i>	nd	100	1 d		

#### Antraquinònics

Reactive blue 19		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	3 h	Sense mediador	Nyanhongo <i>et al.</i> 2001
Acid blue 225		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	3 h	Enzim+ HBT	
Basic blue 22		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	2 h		
		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	24 h		

Colorant	Microorganisme	Enzim	% Decol.	Temps	Altres	Ref.
Basic blue 22		Lacasa ( <i>T. modesta</i> )	100	24 h		Nyanhongo <i>et al.</i> 2001

### 1.5. El fong *Trametes versicolor* i la seva morfologia

*Trametes versicolor* és un fong filamentós de podridura blanca i s'anomena així per l'aparença blanquinosa que adquireix la fusta després de l'atac del fong, ja que és un potent degradador de lignina on l'enzim lacasa és de gran importància donat que és constituït del fong. Aquest fong, per la seva forma i colors, és conegut popularment com a fong de la cua de gall d'indi (*turkey tail fungus*). Els colors de les seves bandes són variables, depenent de la genètica de l'organisme i del medi on es troba. Aquest fong es troba distribuït arreu del món i es pot trobar tot l'any, tot i que amb més facilitat a la tardor i a l'hivern que alliberen les seves espores (no s'ha descrit que ho faci en condicions de laboratori) (Gerhardt *et al.*, 2000).



**Imatge 1.1.** Fong *Trametes versicolor* en el seu estat natural.

Els fongs filamentosos tenen una importància creixent per la seva aplicació en els processos biotecnològics, com per exemple la indústria paperera, la de producció d'antibiòtics, essent els responsables de la producció d'un gran nombre de metabòlits primaris i secundaris.

La morfologia de creixement dels fongs filamentosos en els cultius submergits varia des del creixement dispers (miceli) a creixement en forma d'agregats compactes i esfèrics (pèl·lets). Generalment, els treballs amb cultius submergits es fan amb el fong en forma de pèl·lets.

El tipus de morfologia que s'obté durant el creixement del fong depèn tant de la composició del medi de cultiu com de les condicions de creixement. Així la font de carboni, relació C/N, pH, força iònica del medi influencien la morfologia, però també el nivell d'inòcul, l'aeració, el tipus i la velocitat d'agitació són determinants en el procés de creixement. La morfologia del fong condiona en molts casos l'aplicació industrial. Així per exemple s'ha observat que la producció d'alguns metabòlits secundaris està molt relacionada amb la morfologia de creixement (Smith i Lilly, 1990).

Els cultius amb predomini del creixement dispers es caracteritzen per assolir viscositats molt elevats i amb clar comportament no-newtonià del brou de cultiu (Sarrà *et al.*, 1996). Aquest fet influeix de forma significativa els processos de transferència de matèria i energia. Per altra part, els cultius amb una morfologia de pèl·lets no experimenten variacions de viscositat del brou i aquesta es comparable a la de l'aigua. Tanmateix l'estructura de pèl·let implica generalment pel microorganisme unes condicions limitants de nutrients, entre els que cal incloure l'oxigen, a causa dels problemes difusionals. Aquestes limitacions depenen fortament de la mida del pèl·let.



**Imatge 1.2.** Pèl·lets del fong *Trametes versicolor* resuspendos en medi líquid

Altrament, el creixement en forma de pèl·let és molt interessant en processos en continu ja que permet retenir el fong sense necessitar un suport d'immobilització.

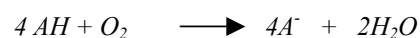
✓ **Sistema enzimàtic de *Trametes versicolor***

Pel que respecta a la capacitat de produir enzims del fong *Trametes versicolor*, estudis realitzats en medis on s'ha limitat la font de nitrogen mostren una forta estimulació del seu sistema ligninolític (Leatham *et al.*, 1983). Archibald (1992) produeix LiP de *T. versicolor* en un medi limitat en nitrogen. El fong també produeix



MnP (Paice *et al.*, 1993). *T. versicolor* pot produir lacasa de forma induïda o constitutiva tenint en ambdós casos una activitat catalítica similar (Sariaslani, 1989).

La lacasa és un p-difenol oxigen oxidoreductasa (EC 1.10.3.2). Aquest tipus d'enzim es troba en els fongs de podridura blanca i marró. Es diferencia d'altres fenoloxidasas per l'especificitat del substrat i per no ésser inhibides pel monòxid de carboni. Les lacases dels basidomicets descrites fins al moment, són glicoproteïnes amb 4 àtoms de coure per molècula i amb un pes molecular que varia entre 60 i 80 KDa depenent de les espècies. A diferència d'altres oxidases, redueixen l'oxigen donant dos molècules d'aigua i catalitzen l'oxidació monoelectrònica i simultània de molts substrats aromàtics (Bourbonnais *et al.*, 1990). La reacció global que catalitzen és la següent:



L'enzim lacasa va ser el primer en ser relacionat amb la degradació de la lignina. Existeixen lacases tant intra com extracel·lulars, i es produeixen varies isoformes de lacases, possiblement quatre, (Dittmer *et al.*, 1997).

Les lacases presenten una àmplia especificitat de substrat respecte el donador electrònic (AH), i catalitza l'oxidació de molts compostos fenòlics i inclús no fenòlics en presència d'alguns intermediaris (Youn *et al.*, 1995; Bourbonnais *et al.*, 1990; Srebotnik i Hammel, 2000).

Els quatre àtoms de coure de la lacasa estan implicats en el seu cicle catalític, i es classifiquen en tres tipus de complexes (coure I, coure II i coure III, format per dos àtoms de coure) (Shin *et al.*, 1996). El cicle catalític d'aquest enzim es mostra a la figura 1.15. En presència d'oxigen, el donador electrònic (AH) transfereix un electró al coure I, després hi ha una transferència de dos electrons al complex binari coure III per part del substrat, electrons que seran acceptats després per un dels dos àtoms d'oxigen, que juntament amb l'altre electró transmès abans al coure I, donarà una primera molècula d'aigua i un radical hidroxílic dissociat O<sup>-</sup>.

A l'última etapa del cicle, per recuperar l'enzim natiu, es transfereix un quart electró del substrat al coure II, que originarà una altra molècula d'aigua al ser transferit al radical hidroxil juntament amb dos protons del medi. D'aquesta manera els electrons es transfereixen un a un a través dels compostos aromàtics i la interacció amb l'oxigen molecular es continua en tots els passos de reducció (Thurston, 1994).

Font (1997) demostra que la lacasa juga un paper important en la reducció de la toxicitat a partir de reaccions de polimerització, però sembla que en la natura l'acció de la lacasa vindria acompanyada per la de l'enzim cel·lobiosa: quinona oxidoreductasa (CBQasa), un enzim que reduiria els radicals fenoxi i, per tant, n'evitaria la polimerització i afavoriria la despolimerització de la lignina.

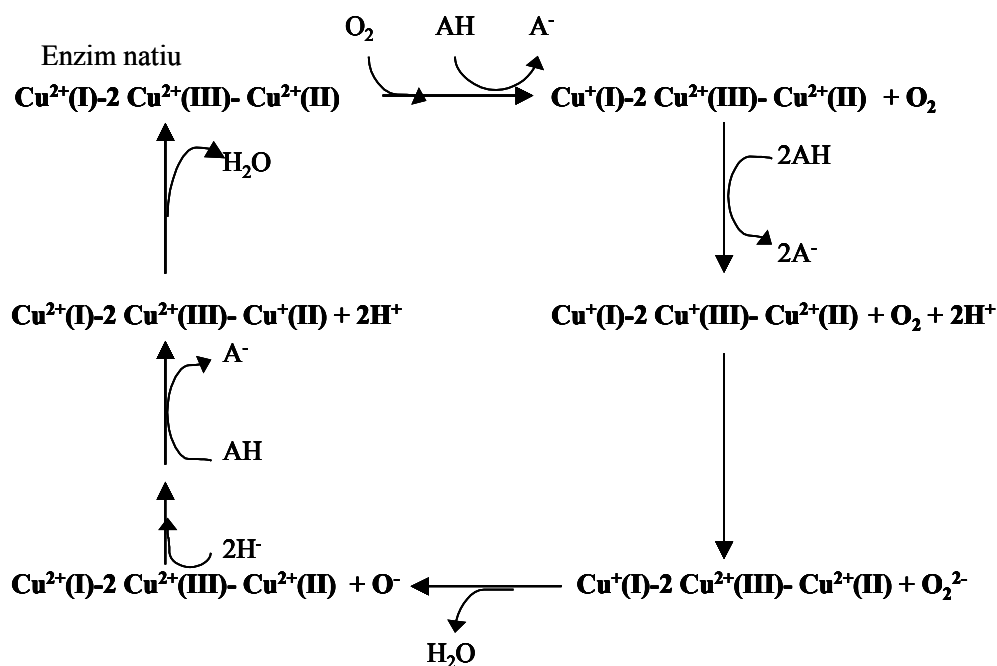


Figura 1.15. Cicle catalític de la lacasa

## 1.6. Bibliografia

- A**nliker R, 1979. Ecotoxicology of dyestuffs – a joint effort by industry. Ecotox. Environ. Safe. 3:59-74.
- Antonelli M, Rozzi A. 2001. Water minimisation and reuse in the textile industry. In Water Recycling and Resouce Recovery in Industry. Ed Piet Lens, Look Hulshoff Pol, Peter Wilderer and Takashi Asano. IWA publishing. UK. 2002. pp 545-584.
- Archibald FS. 1992. A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azure B. Appl. Environ. Microb. 58(9): 3110-3116.
- B**anat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. 1996. Microbiol decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. Bioresour. Technol. 58:217-227.

- Banat IM, McMullan G, Meehan C, Kirby N, Nigam P, Smyth WF, Marchant R. 1999. Microbial decolorization of textile dyes present in textile industries effluent. In Proceedings of the Industrial Waste Technical Conference, Indianapolis, USA, pp. 1-16.
- Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R. 1990. Fisiologia vegetal. Ed. Pirámide, 5a. Edició. Madrid
- Bergna G, Bianchi R, Malpei F. 1999. GAC adsorption of ozonated secondary textile effluents for industrial water reuse. *Wat Sci. Tech.* 40(4/5):518-525.
- Blánquez P, Caminal G, Sarrà M, Vicent MT, Gabarrell X. 2002. Olive oil mill waste waters decoloration and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Biotechnol. Prog.* 18 : 660-662.
- Boominathan K, Reddy CA, 1992. Fungal degradation of lignin, p 763-882. En DK Arora, RP Elander, KG Mukerji (ed.), *Handbook of applied mycology*, vol 4. Fungal biotechnology. Marcel dekker, Inc., New York.
- Bourbonnais R, Paice MG. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: an expened role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
- Brown MA, de Vito SC. 1993. Prediction azo dye toxicity. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 23: 234-249.
- Bumpus JA, Aust SD. 1996. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degraing system. *Bioassays.* 6:166-170.
- Bumpus JA, Brock BJ. 1998. Biodegradation of Crystal Violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1143-1150.
- Buschmann HJ. 1992. Cucurbituril as a ligand for the complexation of cations in aqueous solutions. *Inorg Chim. Acta.* 193:93-97.
- Bustard M, McHale AP. 1998. Biosorption of heavy metals by distillery-derived biomass. *Bioprocess Eng.* 19:351-353.
- C**apalash N, Sharma P. 1992. Biodegradation of textile azo-dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8:309-312.
- Chagas EP, Durrant TR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microbial Technol.* 29: 575-579.
- Chivukula M, Renganathan V. 1995. Phenolic azo dye oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4374-4377.
- Choy KKH, McKay G, Porter JF. 1999. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. *Resour. Conserv. Recy.* 27:57-71.

- Christie RM. 2001. Colour Chemistry. Ed RSC Paperbacaks. First edition. Cambridge, UK.
- Correia VM, Stephenson T, Judd J. 1994. Characterisation of textile wastewaters. *Environ. Technol.* 15:51-63.
- Cripps C, Bumpus JA, Aust S.D. 1990. Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 114-118.
- D**ittmer JK, Patel NJ, Dhawale SW, Dhawale SS. 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 149:65-70.
- DOGC. 2003. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya. Decret 130/2003 del 13 de maig. Num.3894. 11143-11158.
- E**PA. 1996. Best Management Practices for Pollution Prevention in the Textile Industry, Manual. EPA 625R96004.
- EPA. 1997. Profile of the Textile Industry. Sector Notebook Project EPA/310-R-97-00.
- F**ield JA, de Jong E, Feijoo G, de Bont JAM. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH.* 11:44-49.
- Font X, Caminal G, Gabarrell X, Lafuente J, Vicent MT. 1997. On-line enzyme activity determination using the stopped-flow technique: application to laccase activity in pulp mill waste water treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 168-173.
- Font X. 1997. Tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Monitorització del procés. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- G**ahr F, Hermanutz F, Opperman W. 1994. Ozonation – an important technique to comply with new German law for textile wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.* 30:255-263.
- Gerhardt E, Vila J, Llimona X. 2000. Bolets dels Països Catalans. Manual d'identificació. Ed. Omega.
- Gold MH, Variishi H, Valli K. 1993. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Sym. Ser.* 389: 127-140.
- González G, Peña M, de los Santos R. 1997. Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor*. *Bioresource Technol.* 61:33-37.
- Groves GR, Buckley CA, Turnbull RH. 1979. Closed loop recycle systems for textile effluents. *J. Wat. Pollution Control Federation* March. 499-517.

- Guwy AJ, Buckland H, Hawkes FR, Hawkes DL. 1998. Active biomass in activated sludge: comparison of respirometry with catalase activity measured using an on-line monitor. *Wat. Res.* 32(12):3705-3709.
- H**einfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M, Szewzyk U. 1998. Transformation of industrial dyes by Manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64.8:2788-2793.
- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technol.* 30:454-466.
- Hosono M, Arai H, Aizawa M, Yamamoto I, Shimizu K, Sugiyama M. 1993. Decoloration and degradation of azo dye in aqueous solution of supersaturated with oxygen by irradiation of high-energy electron beams. *Appl. Rad. Iso.* 44:1199-1203.
- Hu TL. 1992. Sorption of reactive dyes by *Aeromonas* biomass. *Wat. Sci. Technol.* 26:357-366.
- Hu TL. 1996. Removal of reactive dyes from aqueous solutions by different bacterial genera. *Wat. Sci. Technol.* 34:89-95.
- Hu TL. 2001. Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by *Pseudomonas luteola*. *Wat. Sci. Technol.* 43(2): 261-269.
- I**nce NH, Gonenc DT. 1997. Treatability of a textile azo dye by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Environ. Technol.* 18:179-185.
- J**aspers CJ, Jiménez G, Penninckx. 1994. Evidence for a role of manganese peroxidase in the decolorization of a kraft pulp bleach plant effluent by *Phanerochaete chrysosporium*: effects of initial culture conditions on enzyme production. *J. Biotechnol.* 37: 229-234.
- K**erck A, Klein J, Kudlich M, Stolz A, Knackmuss HJ, Mattes R. 1997. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. Strain BN6. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3684-3690.
- Kirk TK, Connors WJ, Zeikus JG. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two Wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 192-194.
- Kirk TK, Schulz E, Connors WJ, Lorenz LF, Zeikus JG. 1978. Influence of cultural parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117: 277-284.

- Knapp JS, Newby PS. 1995. The microbiological decolorization of an industrial effluent containing a diazo-linked chromophore. *Wat. Res.* 7:1807-1809.
- Kulla MG. 1981. Aerobic bacterial degradation of azo dyes. Microbial degradation of xerobiotics and recalcitrant compounds. In Lesinger T, Cook AM, Hutter R, Nuesch J. *FEMS Symposium*, 12. Academic Press, London, pp. 387-399.
- Kumar MNVR, Sridhari TR, Vahaban KD, Dutta PK. 1998. Trends in color removal from textile mill effluents. *Colorage.* 40:25-34
- L**eamtham GF, Kirk TK. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16:65-67.
- Leiding E, Prüsse U, Vorlop KD, Winter J. 1999. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non sterile conditions. *Bioprocess Engineering* 21:5-12.
- Lens P, Hulshoff L, Wilderer P, Asano T. 2002. Water recycling and resource recovery in industry. IWA publishing. London, UK.
- Libra JA, Sosath F. 2003. Combination of biological and chemical processes for the treatment of textile wastewater containing reactive dyes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78:1149-1156.
- M**assone A, Gernaey K, Rozzi A, Verstraete W. 1998. Measurement of ammonium concentration and nitrification rate by a new biosensor. *WEF Res. J.* 70(3):343-350.
- McKay G. 1979. Waste colour removal from textile effluents. *Am. Dyes. Rep.* 68:29-36.
- Michel FC, Grulke EA, Reddy CA. 1990. Development of a stirred tank reactor system for the production of lignin peroxidase (ligninases) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial Microb.* 5:103-112.
- Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2001. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *J. Biotechnol.* 89: 99-106.
- Mohey El-Dein A, Libra JA, Wiesmann U. 2003. Mechanism and kinetic model for the decolorization of the azo dye Reactive Black 5 by hydrogen peroxide and UV radiation. *Chemosphere.* 52:1069-1077.
- Moredo N, Lorenzo M, Domínguez A, Moldes D, Cameselle C, Sanroman A. 2003. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 665-669.

- Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 2000. Evaluation of different fungal strains in the decolourisation of syntetic dyes. *Biotechnol. Lett.* 22:1499-1503.
- N**asser NM, El-Geundi M. 1991. Comparative cost of colour removal from textile effluents using natural adsorbents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 50:257-264.
- Nigam P, Marchant R. 1995. Selection of the substratum for composing biofilm system of textile decolourizing bacteria. *Biotechnol. Lett.* 17:993-996.
- Nigam P, Banat IM, Singh D, Marchant R. 1996. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process biochem.* 31:435-442.
- Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Marchant R. 2000. Physical removal of textile dyes and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 72:219-226.
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, Zvauya R, Read J, Steiner W. 2001. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Wat. Res.* 36:1449-1456.
- O**gutveren UB, Kaparal S. 1994. Colour removal from textile effluents by electrochemical destruction. *J. Environ. Sci. Health A.* 29:1-16.
- Ollikka P, Alhonmäki K, Leppänen VM, Glumoff T, Rajola T, Suominen I. 1993. Decolorization of Azo, Triphenylmethane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4010-1016.
- O'Neill C, López A, Esteves S, Hawkes FR, Hawkes DL, Wilcox S. 2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl. Microbiol. Biot.* 53:249-254.
- Ogawa T, Yatome C. 1990. Biodegradation of azo dyes in multistage rotating biological contractor immobilized by assimilating bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44:561-566.
- P**aice MG, Reid ID, Bourbonnais R, Archibald FS, Jurasek L. 1993. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microb.* 59(1): 260-265.
- Pak D, Chang W. 1999. Decolorizing dye wastewater with low temperature catalytic oxidation. *Wat. Sci. Technol.* 40:115-121.

- Pallerla S, Chambers RP. 1997. Characterization of a Ca-Alginate-immobilized *Trametes versicolor* bioreactor for decolorization and AOX reduction of paper mill effluents. *Bioresource Technol.* 60: 1-8.
- Palma C, Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 1999. Use of fungal bioreactor as a pretreatment or post-treatment step for continuous decolourisation of dyes. *Wat. Sci. Technol.* 40:131-136.
- Paszczynsky A, Crawford RL. 1991. Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of veratryl alcohol. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 178.3:1056-1063.
- Paszczynsky A, Pati-Grigsby MB, Goszczynski S, Crawford RL, Crawford DL. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3598-3604.
- Paszczynsky A, Crawford RL. 1995. Potencial for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Progr.* 11:368-379.
- Pelegri R, Peralto-zamora P, de Andrade AR, Reyes J, Duran N. 1999. Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Appl. Catal B-Environ.* 22:83-90.
- Peña M, González G, San Cristóbal N, Heras C. 1996. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus Niger*. *Bioresource Technol.* 57:229-235.
- Peralto-Zamora P, Kunz A, Gómez de Morales S, Pelegri R, de Capos Moleiro P, Reyes J, Duran N. 1999. Degradation of reactive dyes I. A comparative study of ozonation, enzymatic and photochemical processes. *Chemosphere.* 38:835-852.
- Podgornik E, Poljansek I, Perdih A. 2001. Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technol.* 29:166-172.
- Polman A, Brekenridge CR. 1996. Biomass-mediated binding and recovery of textile dyes from waste effluents. *Tex. Chem. Colour.* 28:31-35.
- Poots VJP, McKay JJ. 1976a. The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents – I *Peat. Wat. Res.* 10:1061-1066.
- Poots VJP, McKay JJ. 1976b. The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents – II *Wood. Wat. Res.* 10:1067-1070.
- R**aghavacharya C. 1997. Colour removal from industrial effluents – a comparative review of available technologies. *Chem. Eng. World.* 32:53-54.



- Rao KLLN, Krishnaiah K, Ashutush. 1994. Colour removal from a dye stuff industry effluent using activated carbon. *Indian J. Chem. Technol.* 1: 13-19.
- Riordan C, Bustard M, Putt R, McHale AP. 1997. Removal of uranium from solution using residual brewery yeast: contaminated biosorption and precipitation. *Biotechnol. Lett.* 19:385-387.
- Riordan C, McHale AP. 1998. Removal of lead from solution using non-living residual brewery yeast. *Bioprocess Eng.* 19:277-280.
- Rodríguez Couto S, Domínguez A, Sanromán A. 2002. Photocatalytic degradation of dyes in aqueous solution operating in a fluidised bed reactor. *Chemosphere.* 46: 83-86.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* 77:247-255.
- Rozzi A, Ficara E, Cellamare CM, Bortone G. 1999. Characterization of textile wastewater and other industrial wastewaters by respirometric and titration biosensors. *Wat. Sci. Tech.* 40:161-168.
- Rozzi A, Malpei F, Bianchi R, Mattioli D. 2000. Pilot-scale membrane bioreactor and reverse osmosis studies for direct reuse of secondary textile effluents. *Wat. Sci. Tech.* 41:189-195.
- S**ariaslani FS. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Microbiol.*9:171-257.
- Sarrà, M; Ison, A.; Lilly, MD. 1996. The relationships between biomass concentration, determined by a capacitance-based probe, rheology and morphology of *Saccharopolyspora erythraea* cultures. *J. Biotech.* 51, 157- 165.
- Shin W, Sundaran UM, Cole JL, Zhang MH, Hedman B, Hodgson KO, Solomon EI. 1996. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide level intermediate in the multicopper oxidases. Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction of water. *J. Am. Chem. Soc.* 118:3302-3315.
- Shore J. 1996. Advances in direct dyes. *Indian J. Fib. Text. Res.* 21:1-29.
- Slokar YM, Le Marechal AM. 1997. Methods of decoloration of textiles wastewaters. *Dyes Pigments* 37:335-356.
- Smith JJ, Lilly MD. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 35:1011-1023.
- Snowden-Swan LJ. 1995. Pollution Prevention in the Textile Industries. In *Industrial Pollution Prevention Handbook*, ed. Freeman HM. Mc Graw-Hill, New York.

- Spadaro JT, Gold MH, Renganathan V. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading *Phanerochaete cryosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2598-2604.
- Srebotnik E, Hammel K. 2000. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hidroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology* 81: 179-188.
- Sumathi S, Phatak V. 1999. Fungal treatment of bagasse based pulp and paper mill wastes. *Environ. Technol.* 19: 93-98.
- Swamy J, Ramsay A. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology.* 24:130-137.
- T**erras C, Vandevivere PC, Verstraete W. 1999. Optimal treatment and racional reuse of water in textile industry. *Wat. Sci. Tech.* 39:81-88.
- Thurston, CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK.* 140:19-26.
- Tsezos M, Bell JP. 1989. Comparison of the biosorption and desorption of harzardous organic pollutants by live and dead biomass. *Wat. Res.* 23:561-568.
- X**u Y, Lebrun RE. 1999. Treatment of textile dye plant effluent by nanofiltration membrane. *Separ. Sci. Technol.* 34:2501-2519.
- Y**ang Y, Wyatt II DT, Bahorsky m. 1998. Decolorization of dyes using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photochemical oxidation. *Text. Chem. Color.* 30:27-35.
- Youn HD, Han YC, Kang SO. 1995. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fugi. *FEMS Microbiol. Lett.* 132:183-188.
- Z**hang FM, Knapp JS, Tapley KN. 1999. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technol.* 24:48-53..
- Zissi W, Lyberatus G, Pavlou S. 1997. Biodegradation of aminoazobenzene by *Bacillus subtillis* under aerobic conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:49-55.

### **Recursos Web**

- INE. 2003. Encuesta sobre el uso del agua en el sector industrial del año 1999. Instituto Nacional de Estadística. Pàgina web: <http://www.ine.es>.
- Stainsfile. Pàgina web. <http://members.pgonline.com/~bryand/StaisFile/dyes.htm>.

## Capítol 2

### Objectius generals

L'objectiu principal d'aquest treball de Tesi és el desenvolupament d'un procés biotecnològic de tractament d'efluents a escala pilot per a l'eliminació del colorant Gris Lanaset G (codi CIBA 080173.5), mitjançant l'utilització del fong *Trametes versicolor* (ATCC 42530) en forma de pèl·lets en un bioreactor fluiditzat per polsos d'aire.

Aquest objectiu general inclou els següents objectius parcials:

1. Establir les condicions d'operació en continu del bioreactor amb pèl·lets de *Trametes versicolor* per obtenir rendiments d'eliminació del colorant Gris Lanaset G satisfactoris.
2. Determinar la durada del període en el qual el microorganisme pot mantenir l'activitat metabòlica en condicions limitants per evitar el creixement.
3. Establir la metodologia per mantenir el procés de tractament durant períodes llargs de temps.
4. Dissenyar un bioreactor a escala pilot (10 l) i comprovar el bon funcionament d'aquest en el tractament del colorant.
5. Aproximar l'operació a condicions industrials

6. Avaluat la validesa del tractament d'un efluent tèxtil real que conté el colorant Gris Lanaset G com a colorant majoritari.

Un altre dels objectius, sens dubte important, és avançar en el coneixement bàsic del mecanisme d'actuació del fong sobre el colorant, així com els aspectes relacionats amb els enzims implicats en el procés, degut a que un coneixement sòlid d'aquestes bases farà possible una òptima aplicació del procés a escala industrial.

Es pretén amb aquest treball que les aigües residuals generades per una empresa tèxtil puguin ser decolorades per poder ser reutilitzades a la mateixa empresa, evitant els abocaments i disminuint el consum d'aigua. També es proposa valoritzar el residu generat en aquest procés, la biomassa, amb la finalitat de tancar el cicle complet d'eliminació/minimització de residus. En aquesta línia també es comparará el procés biotecnològic amb el procés d'adsorció de color sobre carbó actiu amb la finalitat d'avaluar si serà interessant el seu desenvolupament a escala industrial.

## Capítol 3

### Materials i mètodes generals

#### Resum

En aquest capítol es detallen els mètodes i tècniques emprades en la realització del treball experimental de la present tesi doctoral. S'especifiquen els diferents medis de cultiu emprats en el manteniment de la soca, en el creixement del fong *Trametes versicolor* i en els processos de tractament del colorant Gris Lanaset G. S'especifica el colorant tèxtil emprat en la realització del present treball i es fa una descripció dels bioreactors utilitzats. Es presenta la metodologia seguida per portar a terme el procés de decoloració en continu, que inclou diferents etapes que es realitzen en sèrie, des del creixement en placa de *Trametes versicolor* fins al tractament del colorant en el bioreactor amb la biomassa retinguda en forma de pèl·lets. Per finalitzar es descriuen els mètodes analítics per quantificar paràmetres com concentració de glucosa, concentració de colorant, toxicitat i activitat enzimàtica lacasa, que ens permetran avaluar els resultats obtinguts.

### 3.1. Microorganisme

*Trametes versicolor* (ATCC#42530). Es manté a 25°C en plaques de Petri en medi d'agar (1.5%) amb un 2% d'extracte de malta (Sharlau ref.07-080-500). Les plaques es resembren mensualment.

### 3.2. Medis i condicions de cultiu

#### 3.2.1. Medi de creixement

El medi de creixement del fong s'utilitza per la formació de pèl·lets. Aquest medi conté extracte de malta amb una concentració de 20 g/l. L'extracte de malta utilitzat és de la casa comercial Scharlau ref.07-080-500.

#### 3.2.2. Medi de tractament

✓ **Procés en discontinu**

A la taula 3.1. es presenta el medi emprat en els processos en discontinu.

**Taula 3.1.** Medi de tractament en discontinu.

Glucosa	8 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1.9 g/l
Micronutrients	1 ml/l
Macronutrients	10 ml/l
Gris Lanaset G	0.15 g/l

Un cop preparat el medi s'ajusta el pH a 4.5 amb àcid clorhídric 1 M i s'esterilitza a l'autoclaui durant 30 min a 121°C.

La composició de les solucions de macronutrients i micronutrients està descrita a la taula 3.3.

✓ **Procés en continu**

La composició del medi de tractament en continu es mostra a la taula 3.2. Les diferències respecte el medi en discontinu són la manca de nitrogen i la reducció de la quantitat de glucosa, aquesta serà diferent en funció de l'experiment.

**Taula 3.2.** Medi de tractament en continu

Glucosa	Conc. variable (s'especifica per cada experiment)
Micronutrients	1 ml/l
Macronutrients	10 ml/l
Gris Lanaset G	0.15 g/l

En aquest cas també s'ajusta el pH amb àcid clorhídric 1 M i s'esteritza a l'autoclau durant 30 min a 121°C.

Les composicions de les solucions de micronutrients i macronutrients s'especifiquen a la taula 3.3.

**Taula 3.3.** Composició de les solucions de macronutrients i micronutrients.

Micronutrients	Concentració (g/L)	Macronutrients	Concentració (g/L)
Àcid nitril-tri-acètic	1.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.5	CaCl <sub>2</sub>	1
NaCl	1.0		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1		
CoSO <sub>4</sub>	0.1		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01		
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.01		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01		
NaMoO <sub>4</sub>	0.01		

### 3.3. Colorant tèxtil Gris Lanaset G.

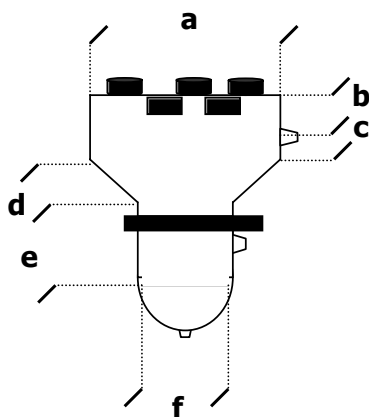
El colorant tèxtil Gris Lanaset G és àmpliament utilitzat en els processos de tenyit, ja sigui sol o combinat amb altres colorants. Aquest colorant és comercialitzat per Ciba (ref. 080173.5) i està format per una barreja de colorants metàl·lics complexos, l'estructura i composició del qual no és de coneixement públic. El colorant Gris Lanaset G no és un producte tòxic tal com mostra la fitxa de seguretat d'aquest producte que es presenta a l'Annex I, on es detallen també altres característiques de la seva composició.

### 3.4. Reactor fluiditzat per polsos d'aire

En aquest treball s'han utilitzat reactors fluiditzats per polsos d'aire de diferents mides i escales. En aquest capítol es descriuen detalladament els dos bioreactors utilitzats a escala laboratori, el bioreactor a escala pilot es descriu en el capítol 8, però tots aquests reactors tenen les següents característiques comunes:

- El cos central és una columna cilíndrica vertical en la que es troba un líquid, que constitueix la fase contínua. Per l'efecte de les bombolles de gas ascendents o de la corrent líquida que es desplaça verticalment fluiditzen les partícules sòlides.
- La part superior dels equips, denominada capçal, té un diàmetre més gran amb la finalitat de disminuir en aquesta zona la velocitat ascensional i aconseguir així una separació sòlid/líquid/gas més gran.

A la figura 3.1. es presenta un esquema dels bioreactors a escala laboratori utilitzats, i a la taula 3.4 les dimensions d'aquests. Els dos bioreactors emprats són de vidre amb un volum útil de 0.5 i 1.5 l i equipats amb un controlador de pH. L'esquema amb les característiques del sistema experimental es presenta a la figura 3.2. i a la imatge 3.1. s'observa l'aspecte del dispositiu experimental dins la càmera termostatitzada a 25°C.



**Taula 3.4.** Dimensions dels bioreactors

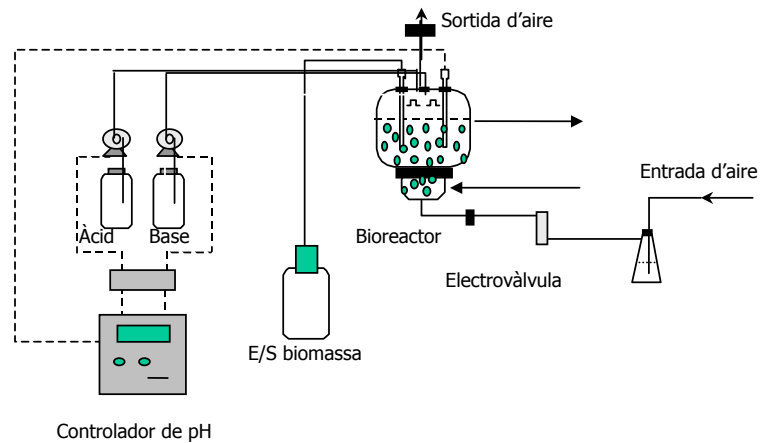
Volum	0.5 litres	1.5 litres
<b>a (<math>\phi</math> int)</b>	10 cm	14 cm
<b>b</b>	3.5 cm	2 cm
<b>c</b>	3 cm	5.5 cm
<b>d</b>	1.5 cm	2cm
<b>e</b>	8.5 cm	11.5 cm
<b>f (<math>\phi</math> int)</b>	5 cm	7.5 cm

**Figura 3.1.** Esquema del bioreactor fluiditzat per polsos d'aire.

Els reactors són tancats amb una entrada d'aire per la part inferior i sortida d'aire per la part superior. L'aire d'entrada es distribueix a través d'una placa porosa situada a la part inferior del reactor. A la tapa del bioreactor hi ha situades set



boques de connexió que permeten situar la sonda de pH, l'entrada d'àcid i base, la sortida d'aire, el sistema de recollida d'escumes, i el punt de presa de mostra. En els experiments en que es realitza renovació de biomassa una de les boques s'utilitza per connectar les ampolles utilitzades per extreure biomassa i inocular biomassa fresca. L'entrada de l'efluent a tractar es realitza per la part inferior del bioreactor, per sobre de la placa difusora, i la sortida per sobreixidor, situat a la part superior del bioreactor.

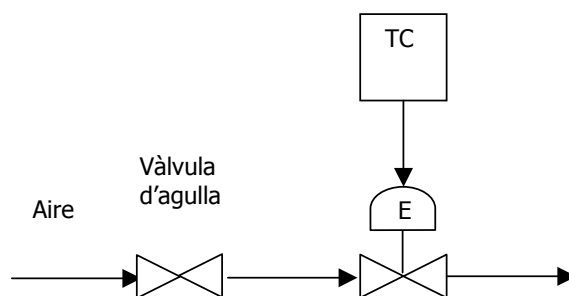


**Figura 3.2.** Esquema del sistema experimental del bioreactor fluiditzat per polsos d'aire.



**Imatge 3.1.** Muntatge experimental dels bioreactors fluiditzats de 0.5 i 1.5 l de volum útil.

El flux polsant es genera mitjançant la transmissió pneumàtica d'una pertorbació en forma de pols de gas (aire) al medi de cultiu del bioreactor (Feijoo G, *et al.*, 1994). El dispositiu utilitzat per generar la pulsació es presenta en la figura 3.3, on el cabal d'aire d'entrada al reactor és regulat per una vàlvula d'agulla, i el control de les pulsacions es fa utilitzant un temporitzador cíclic (TC), sobre el que es pot fixar el temps d'obertura i el temps de tancament de l'electrovàlvula (E) (Font, 1997; Romero, 2000).



**Figura 3.3.** Sistema generador de polsos d'aire.

La freqüència de pulsació es defineix com la inversa de la suma dels temps d'obertura i tancament de l'electrovàlvula:  $F = 1/(t_0 + t_t)$ , on  $F$  és la freqüència,  $t_0$  és el temps d'obertura i  $t_t$  és el temps de tancament. En el treball que es presenta el temps d'obertura és d'un segon i el de tancament de cinc segons. L'aire és introduït per la part inferior del reactor, i surt per la part superior, mantenint la biomassa en suspensió mitjançant els polsos.

La temperatura es manté constant a 25°C i els cabals d'aeració varien en funció del volum del reactor, en el de 500 ml de volum útil el cabal d'aire en condicions estàndards utilitzat és de 12 l/h i en el de 1500 ml de volum útil s'utilitza un cabal d'aire de 30 l/h.

### 3.5. Metodologia experimental

#### 3.5.1. Metodologia de posada en marxa del sistema

Tant per la realització dels experiments en continu com en discontinu es segueix la mateixa metodologia de posada en marxa del sistema, que consta dels següents passos:

- Preparació del medi de tractament en discontinu
- Esterilització tèrmica del reactor omplert amb el medi de tractament

- Inoculació amb el fong *Trametes versicolor* en forma de pèl·lets prèviament formats seguint la metodologia que es descriu a continuació.

### **3.5.2. Metodologia d'obtenció de pèl·lets**

A la figura 3.4 es presenta de forma esquemàtica la metodologia d'obtenció de pèl·lets per ser utilitzats finalment en el tractament del colorant Gris Lanaset G en bioreactor.

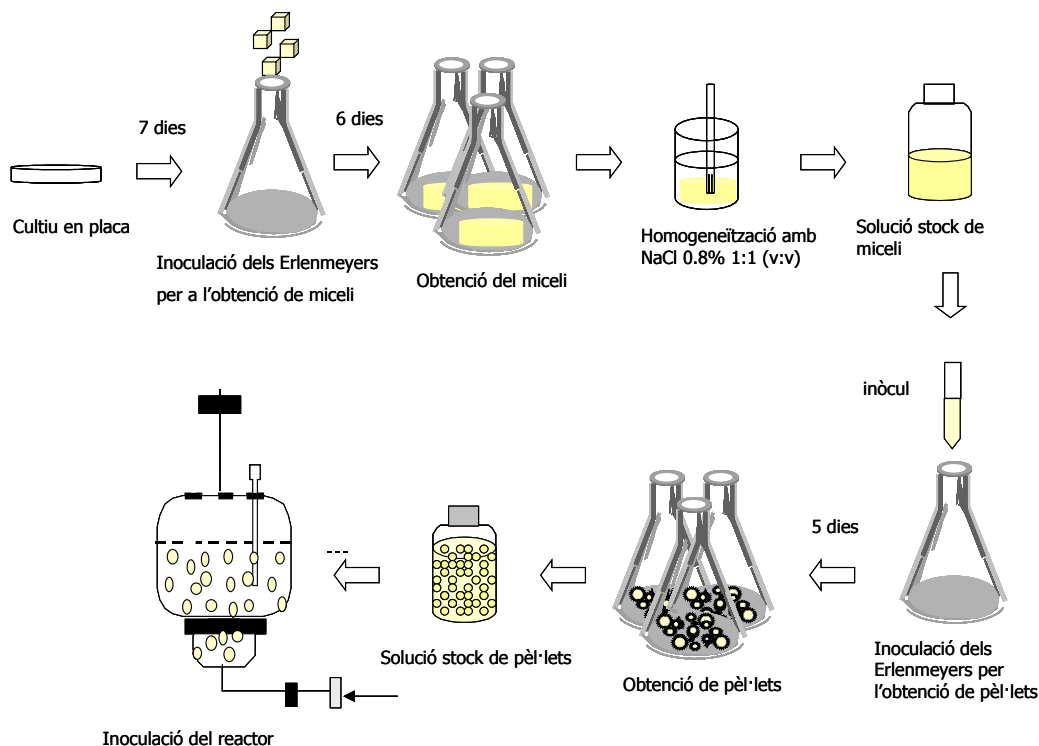
El procés d'obtenció de pèl·lets consta de dues etapes; en una primera etapa s'obté l'inòcul en forma de miceli, i en la segona etapa s'obtenen els pèl·lets a partir del miceli triturat.

#### ✓ **Obtenció de l'inòcul en forma de miceli**

De la zona de creixement del fong en una placa de manteniment, s'agafen quatre cubs d'agar de 1 cm<sup>2</sup> i aquests, s'utilitzen per inocular 150 ml de medi de creixement en un Erlenmeyer de 500 ml. Es mantenen a 25°C i agitació orbital (135 rpm, r=25 mm) durant 6 dies. Transcorregut aquest temps es forma una densa capa de miceli que es separa del medi. Al miceli obtingut se li afegeix NaCl (0.8% en pes esterilitzat prèviament a 121°C durant 30 min) en relació 1/1 (v/v) i es tritura. La suspensió resultant es guarda a 4°C o s'utilitza acte seguit per la formació de pèl·lets.

#### ✓ **Obtenció de pèl·lets**

S'afegeix 1 ml de la suspensió triturada de miceli a un Erlenmeyer d' 1 l amb 250 ml de medi de creixement ajustat a pH 4.5 amb àcid clorhídric 1 M . Es manté el cultiu durant 5-6 dies a 25°C i agitació orbital (135 rpm, r=25 mm), i s'obté una solució de pèl·lets de 2-3 mm de diàmetre. Aquests es separen del medi, se'ls hi afegeix NaCl (0.8% en pes esterilitzat prèviament a 121°C durant 30 min) en relació 1/1 (v/v) i es guarden a 4°C, o s'utilitzen tot seguit per inocular el reactor.



**Figura 3.4.** Esquema de la metodologia seguida des del cultiu en placa fins la inoculació del bioreactor.

### 3.6. Mètodes analítics

#### 3.6.1. Determinació de la concentració de glucosa

La glucosa es mesura amb un analitzador enzimàtic de glucosa i lactat model YSI 2000 de Yellow Springs Instruments and Co. El rang de concentració de glucosa admissible per aquest analitzador és de 0 a 20 g/l, amb una precisió de  $\pm 2\%$  o 0.04 g/l. L'anàlisi es basa en la reacció enzimàtica d'oxidació de la glucosa a peròxid per mitjà de la glucosa oxidasa immobilitzada a la membrana i la posterior reducció del peròxid a l'ànode de platí.

Les mostres a analitzar es centrifugen prèviament durant 10 minuts a 6000 rpm (6240 x g) amb una centrífuga Heraeus Sepatech, model Megafuge 1.0.

#### 3.6.2. Determinació de la concentració de colorant

L'absorbància a la longitud d'ona de 590 nm s'utilitza com a mesura del color. A aquesta longitud d'ona l'absorbància del colorant Gris Lanaset G és màxima. Un calibrat d'absorbància a 590 nm versus la concentració permet determinar la

concentració de colorant en cada mostra a partir de la mesura d'absorbància. Es fan servir cubetes de vidre d'1 ml de volum. L'espectrofotòmetre utilitzat és el model PV 8620 de Philips.

Prèviament a la mesura de l'absorbància, les mostres es centrifugen a 6000 rpm (6240 x g) durant 10 minuts amb una centrífuga Heraeus Sepatech, model Megafuge 1.0.

### **3.6.3. Determinació de la toxicitat**

La toxicitat es determina amb el mètode 8050 B proposat a l'Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA, 1995). S'utilitza l'aparell Microtox Systems de Microbics Corporation. Aquest assaig es basa en la pèrdua d'intensitat lluminosa emesa per un bacteri bioluminiscent (*Photobacterium phosphoreum*) provocada per l'efecte inhibidor de la mostra. El valor de la EC<sub>50</sub> (t,T) correspon a la concentració efectiva de la mostra que causa un 50% de disminució en la lluminositat sota unes condicions determinades de temps i temperatura. En aquest cas el temps d'assaig és de 15 minuts i la temperatura de 15°C. Segons la definició anterior de toxicitat, com més elevat és el valor calculat d'EC<sub>50</sub> menys tòxica serà la mostra.

Degut a què les aigües utilitzades són colorades s'aplica un protocol de correcció de color, on es té en compte aquest paràmetre a l'hora de mesurar la toxicitat (Microtox Manual, 1992).

### **3.6.4. Determinació de la biomassa**

La biomassa es determina com a pes sec segons descriu el mètode 2540 D de l'Standard Methods for the examination of water and wastewater (APHA, 1995).

### **3.6.5. Determinació d'activitat enzimàtica lacasa**

L'activitat lacasa s'analitza segons una versió modificada del mètode de Paszczyński (Paszczyński *et al.*, 1988) per a la determinació de l'enzim manganès peroxidasa. El medi de reacció conté: 200 µL de malonat sòdic 250 mM a pH 4.5, 50 µL de 2,6-dimetoxifenol (DMP) 20 mM i 600 µL de mostra. El DMP és oxidat per la lacasa inclús en absència de cofactors. Es mesura durant dos minuts la variació de l'absorbància a 468 nm i 30°C en un espectrofotòmetre Varian Cary 3 UV/Vis equipat amb termòstat. Les unitats d'activitat (U.A.) es defineixen com el número de

micromols de DMP oxidats per minut ( $\mu\text{mol DMP}/\text{min}$ ). El coeficient d'extinció del DMP és de  $10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.7. Bibliografia

- A**PHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19<sup>th</sup> ed. American Publishers Health Association. Washington DC, USA.
- F**ejjoo G, Dosoretz C, Lema JM. 1994. Production of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in packed bed bioreactors with recycling. *Biotechnol. Technol.* 40:21-29.
- Font X. 1997. Tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Monitoratge del procés. PhD. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.
- M**icrotox Manual, a Toxicity Testing Handbook. 1992.
- R**omero S. 2000. Tractament amb fongs d'aigües residuals colorades. PhD. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.
- P**aszczynski A, Crawford RL, Huynh VB. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Method. Enzymol.* 161:264-270.

## Capítol 4

### Tractament en continu del colorant Gris Lanaset G en un bioreactor fluïditzat

#### Resum

En aquest capítol es realitza un estudi per establir la concentració de glucosa a la que s'ha d'alimentar el sistema per al tractament en continu d'una solució del colorant tèxtil Gris Lanaset G en bioreactor fluïditzat per polsos d'aire amb el fong *Trametes versicolor*. També es realitza l'estudi del temps de residència hidràulic (TRH) que es pot aplicar a aquest sistema. Prèviament als experiments d'operació en continu, es realitza un estudi fluidodinàmic dels reactors polsants per determinar el temps d'homogeneïtzació del colorant en els bioreactors. Es determina el temps de mescla sense biomassa per dos reactors fluïditzats, de 1.5 l i de 0.5 l de volum útil, i el temps de mescla amb biomassa pel bioreactor de 1.5 l. Un cop determinat el temps de mescla es realitzen diferents experiments amb els dos bioreactors per analitzar el comportament del procés en funció de la concentració de glucosa en l'aliment que acompanya al colorant i en funció del TRH. Es determina que la velocitat de consum de glucosa és de  $0.31 \pm 0.03$  g glucosa/d·g pes sec. S'opera a diferents TRH: 120, 48, 24 i 18 hores, en tots els experiments s'obtenen rendiments d'eliminació de color superiors al 80% en estat estacionari hidràulic. L'efluent de sortida compleix la normativa respecte al color per ser admès en una EDAR si fos necessari, ja que amb la concentració inicial de colorant que es treballa, amb un 70% de decoloració ja s'està complint la normativa.

#### 4.1 Introducció

Una característica important dels fongs ligninolítics és la seva capacitat per degradar la lignina i altres compostos aromàtics mitjançant els enzims extracel·lulars no específics que produeixen. Amb aquest sistema enzimàtic poden oxidar compostos resistents a altres atacs microbians, com per exemple molts colorants tèxtils (Cripps *et al.*, 1990). En els últims anys molts estudis han demostrat la capacitat dels fongs ligninolítics per oxidar un ampli ventall de compostos orgànics contaminants (Reddy, 1995) i diferents tipus de colorants sintètics, entre ells els azo, els trifenilmetans, els polimèrics, i els heterocíclics, en cultius submergits (Heinfling *et al.*, 1997; Ollikka *et al.*, 1993; Paszczyński *et al.*, 1992). Els enzims ligninolítics semblen ser els principals responsables de la degradació d'aquests compostos (Libra *et al.*, 2003).

Des de que Glen *et al.* (1983) i Tien i Kirk (1988) van publicar el descobriment de l'enzim oxidatiu LiP, s'han perseguit dues estratègies per la seva aplicació en la degradació de compostos recalcitrants: la primera és la transformació directa dels contaminants per cultius actius dels fongs de podridura blanca, i la segona és la utilització dels enzims ligninolítics purificats del brou de cultiu.

L'avantatge de la segona estratègia és que l'activitat del fong no es veu afectada per factors ambientals ni per la composició de les aigües a tractar, però el principal desavantatge és el cost d'obtenció de l'enzim a partir del brou de cultiu. En qualsevol dels casos, prèviament a poder realitzar una aplicació industrial cal el desenvolupament de bioreactors i estratègies de cultiu que permetin el cultiu del fong durant temps llargs. Els sistemes més utilitzats han estat: reactors agitats (Kirkpatrick i Palmer, 1987; Willershausen *et al.*, 1987), columnes de bombolles (Bonarme i Jeffries, 1990) i llits fixos (Zhang *et al.*, 1999) o llits fluïditzats (Pallerla i Chambers, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Els modes d'operació en discontinu, semicontinu (Feijoo *et al.*, 1995), i continu (Moreira *et al.*, 1998) han estat estudiats, com també la producció enzimàtica en bioreactor operant en condicions semi-sòlides i amb diferents configuracions (Rodríguez Couto *et al.*, 2002). Totes les configuracions esmentades anteriorment proporcionen elevades activitats enzimàtiques que tard o d'hora disminueixen degut a l'envelliment del cultiu i a la presència de proteases en el medi (Moreira *et al.*, 1998). Són pocs però els treballs publicats relatius a la decoloració en continu o en discontinu repetits amb fongs ligninolítics.



En tests de decoloració utilitzant bioreactors discontinus de tanc agitat amb cultius purs de diferents fongs de podridura blanca, Swamy i Ramsay (1999) van demostrar que el fong *Tametes versicolor* era el millor. Es va investigar la degradació de 6 colorants tèxtils amb concentracions inicials entre 20 i 80 mg/l. Swamy i Ramsay afegixen polsos de colorant concentrat directament al brou, després de que cada fase de decoloració s'ha completat. Els colorants poden ser decolorats completament pels enzims presents en el medi, però tot i que la decoloració es produeix ràpidament, aquest cas no reflecteix les condicions que es tindrien que aplicar al tractament dels efluent reals. Borchert *et al.* (2001) aconseguixen elevats percentatges de decoloració en experiments duts a terme simultàniament en Erlenmeyers agitats i en reactors de tanc agitat amb els colorants azo Reactive black 5 i Reactive blue 13. Realitzen tractaments discontinus repetits amb glucosa com a font de carboni i energia durant 20 dies sense afegir biomassa fresca, i obtenen percentatges de decoloració elevats i estables en ambdós sistemes.

Els assaigs de discontinus repetits realitzats per Yang i Yu (1996a) amb *P. chryso sporium* immobilitzat sobre espuma mostren un descens en la eficàcia de decoloració del colorant cicle a cicle, així com l'envelliment de la biomassa. En canvi utilitzant un reactor continu de biopel·lícula són capaços d'arribar a velocitats de decoloració de 0.8 a 1.8 mg/l·h pel colorant diazo Red 533 durant un període de 17 dies (Yang i Yu, 1996b).

Al 1999 Zhang *et al.* van publicar resultats obtinguts amb un basidiomicet no identificat que es va assumir que era un fong de podridura blanca. Es va operar en continu amb diferents configuracions amb l'objectiu de degradar el colorant Orange II a elevades concentracions (aprox. 1000 mg/l). Les diferents configuracions són: Llit empaquet amb el fong immobilitzat i llit fluïditzat, amb el fong lliure i amb el fong immobilitzat, operant en continu i discontinus repetits. Amb totes les configuracions es va obtenir almenys un 95% de decoloració, i a més el fong es va mantenir estable durant més de dos mesos. La configuració que va funcionar pitjor va ser el llit empaquet en continu, probablement degut a la dificultat en la transferència de matèria i per tant d'oxigen, i al creixement excessiu del fong. En els bioreactors fluïditzats els pèl·lets presenten clarament una millor transferència de matèria, un nivell d'oxigen dissolt més elevat i per tant elevades velocitats de degradació. Suggereixen que el llit fluïditzat continu és millor per al tractament d'efluents amb concentracions baixes de compostos inhibitoris per la biomassa, mentre que els

processos discontinus repetits són millors per concentracions elevades però de compostos no inhibitoris.

Palma *et al.* (1999) obtenen una correlació entre la decoloració del colorant Poly R-478 amb l'activitat enzimàtica de *P. chrysosporium* immobilitzat en un lit empacat polsant. La tendència general de l'activitat durant el període d'operació de 120 dies es correlaciona amb la tendència en la decoloració, però els valors diaris d'activitat no es poden utilitzar per predir el grau de decoloració que s'obtindrà en el reactor.

El mateix reactor amb polsos de la fase gas és utilitzat per Mielgo *et al.* (2001 i 2002) per la degradació biològica contínua dels colorants Orange II i Poly R-478 respectivament amb *P. chrysosporium*. Tracten el colorant Orange II durant períodes superiors a 30 dies, obtenint decoloracions superiors al 95%. Amb el colorant Poly R-478 obtenen percentatges de decoloració elevats, entre 65 i 80%, sota condicions òptimes. El sistema va demostrar tenir elevada estabilitat amb períodes operacionals llargs (com a mínim 90 dies). Només es detecta activitat enzimàtica MnP, i atribueixen a aquest enzim la decoloració. Les condicions òptimes establertes van ser: 37°C, utilització d'O<sub>2</sub> en comptes d'aire, concentracions de Mn<sup>2+</sup> entre 33 i 330 microM i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afegida en polsos periòdics.

Rodríguez Couto *et al.* (2004) utilitzen un bioreactor d'un litre de volum útil amb *Trametes hirsuta* immobilitzat sobre esponja d'acer inoxidable. Degraden els colorants, Índigo Carmine i Lanaset Marine operant en discontinus repetits. Determinen que és necessària una quantitat mínima de lacasa per iniciar el procés de decoloració, però que activitats enzimàtiques més elevades no impliquen un augment en el percentatge de decoloració.

Romero (2000) va realitzar estudis preliminars en relació a la decoloració en continu del colorant Gris Lanaset G amb el fong *T. versicolor* en un bioreactor fluïditzat per polsos d'aire de 0.5 l de volum útil. Estableix els medis de creixement i de tractament en continu, i la concentració de glucosa en el medi a la que s'inicia el procés en continu (2 g/l aproximadament). Obté una reducció de color entre el 85 i el 90% en funció del temps de residència, i aconsegueix mantenir el cultiu durant més de 30 dies.

A partir d'aquests estudis preliminars s'inicia aquest treball de tesi.

## **4.2. Materials i mètodes**

### **4.2.1. Equipament i condicions d'operació**

En la realització d'aquest treball s'utilitzen dos bioreactors fluïditzats per polsos d'aire de volum útil diferent, 1.5 l i 0.5 l descrits a l'apartat 3.4. del capítol de materials i mètodes generals. Els bioreactors s'omplen de medi de tractament en discontinu, s'esterilitzen a 121°C durant 30 min i s'inoculen amb una quantitat de pèl·lets de 64 g de biomassa humida/l, equivalent a 3.2 g/l de pes sec. Els reactors operen en discontinu i un cop s'assoleix una concentració de glucosa en el medi aproximadament de 2 g/l s'inicia el procés en continu de tractament d'una solució de 150 mg/l del colorant Gris Lanaset G. El temps de residència hidràulic (TRH) varia en funció de cada experiment entre 120 i 18 hores. La biomassa, en forma de pèl·lets queda retinguda en el bioreactor, sense pèrdues en el corrent de sortida.

### **4.2.2. Mètodes analítics**

La determinació del contingut en glucosa, del color i de l'activitat lacasa estan descrits a l'apartat 3.6 del capítol de materials i mètodes generals.

✓ **Determinació del contingut en Liti**

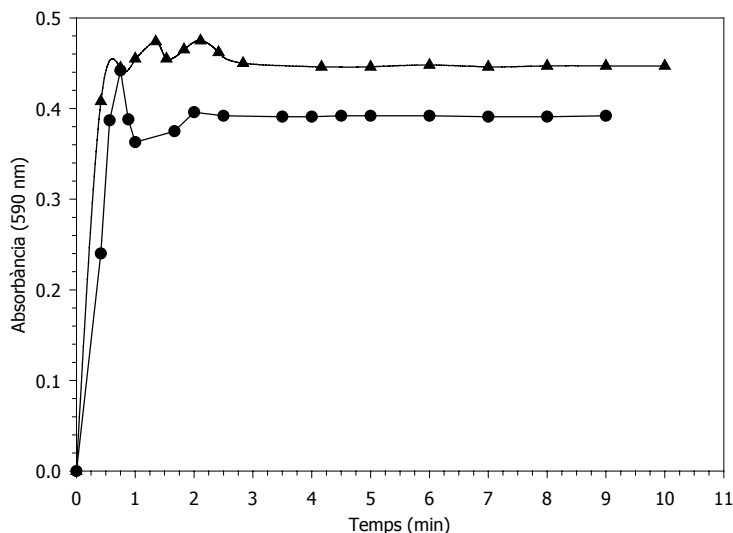
El contingut en Li es determina per emissió atòmica de flama (aire-acetilè) utilitzant Cs com a tampó d'ionització (1000 ppm de Cs en patrons i mostres).

## **4.3. Resultats i discussió**

### **4.3.1. Estudi fluidodinàmic**

Es realitzen experiments amb l'objectiu de determinar el temps de mescla dels reactors fluïditzats, per tal d'establir el temps necessari a partir del qual la concentració de qualsevol component es pot considerar homogènia a tot el contingut del bioreactor. Aquest temps és important degut a la repercussió que té per exemple en el control del pH, on l'àcid o base afegits necessiten un temps per que la seva concentració sigui homogènia, també quan s'afegeix antiespumant, o l'addició de qualsevol reactiu al sistema, i també en la presa de mostra. Es realitzen primer els experiments per determinar el temps de mescla sense biomassa en els bioreactors. Per dur a terme aquests experiments s'omplen els reactors d'aigua, i es posa en marxa el sistema d'aeració per polsos d'aire, un cop està el sistema fluïditzant s'addiciona un pols de colorant per la part inferior del reactor. Al bioreactor de 1.5 l se li afegeix un pols de 25 ml de volum de dissolució que conté 60 mg de colorant Gris Lanaset G, i el pols addicionat al bioreactor de 0.5 l de volum és de 25 mg de colorant en 25 ml d'aigua. Amb aquestes concentracions de

colorant s'obtenen absorbàncies a 590 nm entre 0.4 i 0.5 unitats als bioreactors. Les mostres es prenen en el punt de presa de mostra del bioreactor a la part superior. A la figura 4.1 es mostren les absorbàncies mesurades per als reactors de 0.5 l i 1.5 l.



**Figura 4.1.** Temps de mescla del reactor de 0.5 l (▲) i 1.5 l (●) sense biomassa.

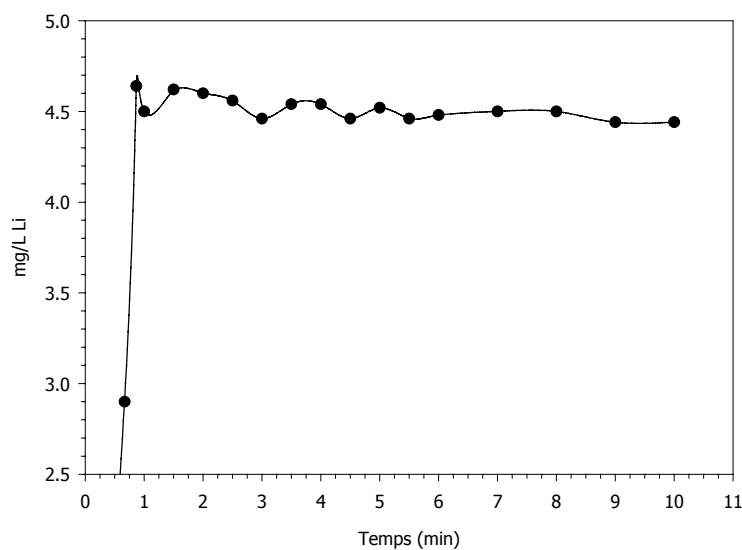
Com es pot veure a la figura 4.1, per al reactor de 1.5 l durant els dos primers minuts després d'afegir el pols de colorant es produeix una fluctuació important en el valor de l'absorbància, que s'estabilitza a partir del minut 2.5, per tant s'estableix que el temps de mescla del reactor de 1.5 l sense biomassa és de 2.5 min.

Per al reactor de 0.5 l es veu com la fluctuació inicial es dona fins al minut 3 i a partir d'aquest moment es pot considerar que les mesures ja són representatives del sistema, per tant en el reactor de 0.5 l sense biomassa el temps de mescla és de 3 min.

Aquests temps de mescla que s'han determinat no tenen en compte que en el sistema experimental hi ha biomassa. Per poder fer l'anàlisi del temps de mescla amb la biomassa s'ha de realitzar l'experiment amb el bioreactor inoculat amb pèl·lets (64 g/l de biomassa humida, corresponent a 3.2 g pes sec/l) i utilitzant com a traçador clorur de liti, que no s'adsorbeix sobre la biomassa. Aquest experiment es realitza només amb el bioreactor de 1.5 l, donat que com s'ha vist en els resultats anteriors el comportament dels dos reactors és molt semblant.

Un cop el bioreactor és inoculat i els sistema està fluïditzant per polsos d'aire s'afegeix un pols de 25 ml de dissolució amb 45.97 mg de LiCl. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4.2.

En aquesta figura es pot observar com a partir del minut 4.5 es pot considerar que tenim una concentració de liti aproximadament constant, ja que les fluctuacions a partir d'aquest temps són molt petites. Per tant s'estableix el temps de mescla del sistema amb biomassa en 4.5 min. Si es comparen les figures 4.1 i 4.2, s'observa que quan hi ha biomassa en el bioreactor les oscil·lacions durant el primer minut i mig són menors, i això és degut a que la biomassa ajuda a homogeneïtzar el sistema, augmentant la turbulència.



**Figura 4.2.** Temps de mescla del reactor de 1.5 l amb biomassa.

Si es comparen els temps de mescla sense biomassa en els bioreactors de 1.5 i 0.5 l veiem que encara que són molt semblants, en el bioreactor de menys volum el temps de mescla és més gran. Aquest fet es pot relacionar amb la velocitat ascencional aparent. En el reactor de 0.5 l la velocitat ascencional aparent té un valor de 0.17 cm/s, inferior a 0.19 cm/s que és la velocitat ascencional aparent en el bioreactor de 1.5 l. El fet que la velocitat ascencional aparent sigui inferior en el bioreactor de 0.5 l fa que el temps de mescla requerit sigui superior, però s'observa una distribució de corrents de colorant més uniforme ja que es produeixen menors

fluctuacions de la concentració de colorant en el punt de presa de mostra (figura 4.1).

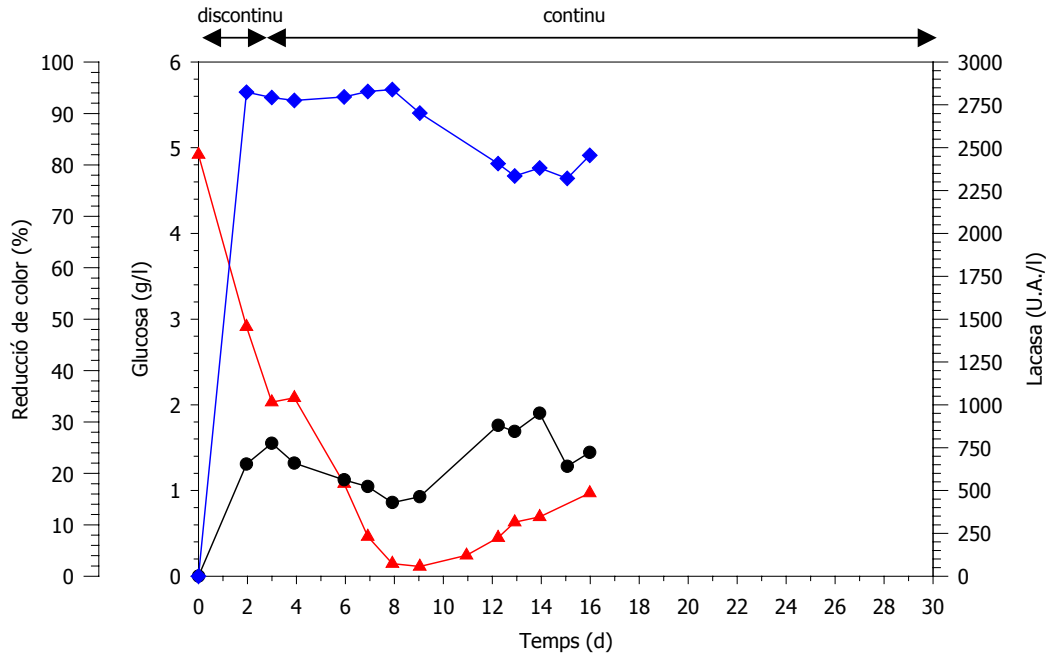
Com a conclusió global podem establir amb seguretat que a partir de cinc minuts d'iniciar l'operació la mescla en qualsevol dels dos reactors és homogènia.

#### **4.3.2. Establiment de la concentració de glucosa en el procés continu**

Per establir les condicions de manteniment del fong *Trametes versicolor* en el bioreactor fluïditzat per polsos d'aire es parteix de l'informació obtinguda en estudis preliminars anteriors (Romero, 2000). El paràmetre estudiat és la concentració de glucosa en el brou de cultiu durant l'etapa d'operació en continu dels experiments realitzats. En aquesta etapa en continu, no hi ha creixement de biomassa degut a que es treballa en condicions únicament de manteniment del fong, alimentant glucosa juntament amb el colorant però no nitrogen. En el primer experiment (A), dut a terme amb un temps de residència de 48 hores, la concentració de glucosa en el medi d'alimentació en continu és de 5 g/l. Els resultats obtinguts en aquest primer experiment es mostren a la figura 4.3.

Un cop s'arriba a una concentració de glucosa de 2 g/l en el sistema s'inicia el procés en continu, però s'observa com en cap moment s'assoleix el consum total de glucosa en el bioreactor. Contràriament, a partir del dia 8 la concentració de glucosa augmenta progressivament fins una concentració en el bioreactor de 1 g/l al final del tractament, quan s'atura l'experiment degut a la disminució de la decoloració i a l'augment de la concentració de glucosa en el medi.

Es pot observar com a partir del dia 8, a mida que s'acumula la glucosa en el medi la decoloració disminueix, i es passa de tenir una decoloració al voltant del 95% a tenir una decoloració del 80% els últims dies de tractament. Aquest perfil de concentració de glucosa indica una acumulació d'aquesta en el brou de cultiu, per tant un excés de glucosa a l'entrada del sistema, ja que els microorganismes no són capaços de metabolitzar tota la glucosa que hi entra. El fet de que tinguem glucosa en el efluent de sortida suposa un problema mediambiental degut a que ens augmenta la DQO de les aigües. També suposa el malbaratament d'un nutrient, i la disminució del rendiment de decoloració. Per tant s'han d'obtenir efluentes de sortida amb concentracions de glucosa nul·les, o molt baixes.



**Figura 4.3.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment en continu (A).

Amb els resultats obtinguts en l'experiment anterior (A), l'objectiu és determinar la velocitat específica de consum de glucosa a partir del balanç de glucosa, les dades experimentals de glucosa a la sortida, la concentració d'entrada i el temps de residència hidràulic. L'equació del balanç es presenta a continuació:

$$\frac{dC}{\frac{1}{\tau} \cdot (C_e - C) - \frac{m_s \cdot X}{V}} = dt \quad (4.1)$$

on:

$m_s$  és la velocitat específica de consum de glucosa (g/d·g de pes sec)

$X$  és la quantitat de biomassa present en el sistema (g pes sec)

$\tau$  és el temps de residència hidràulic (d)

$C_e$  és la concentració de glucosa a l'entrada (g/l)

$C$  és la concentració de glucosa a la sortida (g/l)

$V$  és el volum del reactor (l)

El terme  $m_s \cdot X$  correspon a la velocitat de consum de glucosa en el cas de tenir únicament manteniment, i no creixement de la biomassa. Si es considera que no hi ha creixement  $\mu = 0$ , i tal com mostra la següent equació  $-r_s = m_s \cdot X$ .

$$-r_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X + m_s \cdot X \quad (4.2)$$

Es determina que la velocitat específica de consum de glucosa és  $0.31 \pm 0.03$  g glucosa/d·g pes sec. La velocitat de consum obtinguda multiplicada per la quantitat de biomassa present en el sistema dona un consum de 0.5 g glucosa/d. Aquest valor és el consum per al manteniment del microorganisme, ja que com s'ha dit anteriorment durant el procés en continu es treballa en condicions en les que no hi ha creixement del fong.

La velocitat de consum per al manteniment es pot comparar amb la que s'obté mitjançant l'energia de Gibbs necessària per al manteniment del microorganisme. Aquesta es calcula mitjançant una correlació tipus Arrhenius (Heijnen, 1999) que es mostra a continuació.

$$m_G = 4.5 \cdot \exp \left[ \frac{-69,000}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right] \quad (4.3)$$

on:

$m_G$  és l'energia de Gibbs necessària pel manteniment de la biomassa (KJ/mol biomassa·h)

R és la constant del gasos ideals (atm·l/K·mol)

T és la temperatura (K)

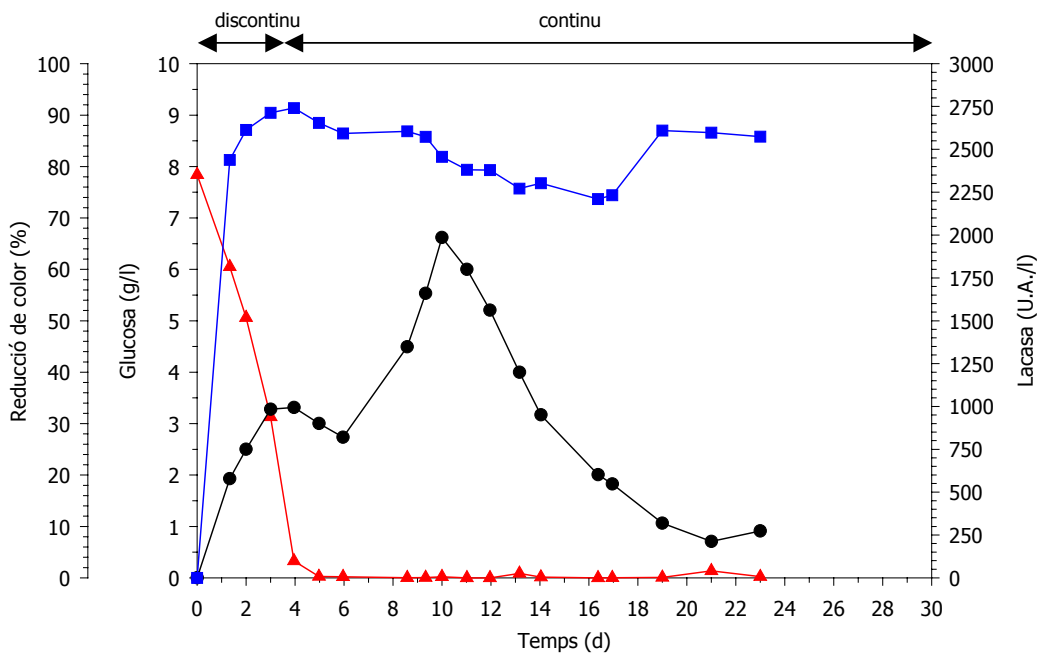
Aquesta correlació es va establir utilitzant gran quantitat d'experiments amb diferents microorganismes (bacteris, fongs, cèl·lules vegetals), diferents fonts de carboni, incloent  $\text{CO}_2$  i gran varietat de substrats orgànics, diferents acceptors d'electrons (aeròbics, anaeròbics i desnitrificants) i diferents donadors d'electrons. El valor de  $m_G$  que s'obté és de 4.5 KJ/mol biomassa·h ja que es treballa a 298 K. A partir d'aquesta energia de Gibbs es determina el consum de glucosa en 0.44 g/d per al nostre sistema experimental.

Existeix una altra correlació del mateix tipus que l'anterior però en la que només s'han utilitzat microorganismes aerobis. L'única diferència està en que el factor 4.5 de l'equació 4.3 es substitueix per un altre factor de valor 5.7, i amb aquesta nova correlació la velocitat de consum de glucosa és de 0.56 g/d.



Per tant podem concloure que la velocitat de consum de glucosa determinada amb les dades experimentals,  $0.5 \pm 0.05$  g glucosa/d és de l'ordre de les calculades teòricament a partir de l'energia de Gibbs necessària per al manteniment del microorganisme.

Atès la velocitat de consum determinada, en el primer experiment, realitzat a un temps de residència hidràulic de 48h, s'hauria d'haver alimentat amb una concentració de glucosa de 2 g/l, quan es va alimentar amb una concentració de 5 g/l. Per tant es realitza un altre experiment (B) alimentant la glucosa a la velocitat de consum. En aquest segon experiment, el temps de residència hidràulic és de 48 hores i la concentració d'entrada de glucosa equivalent a la de consum en aquestes condicions és de 2g/l. El resultats obtinguts es mostren a la figura 4.4.

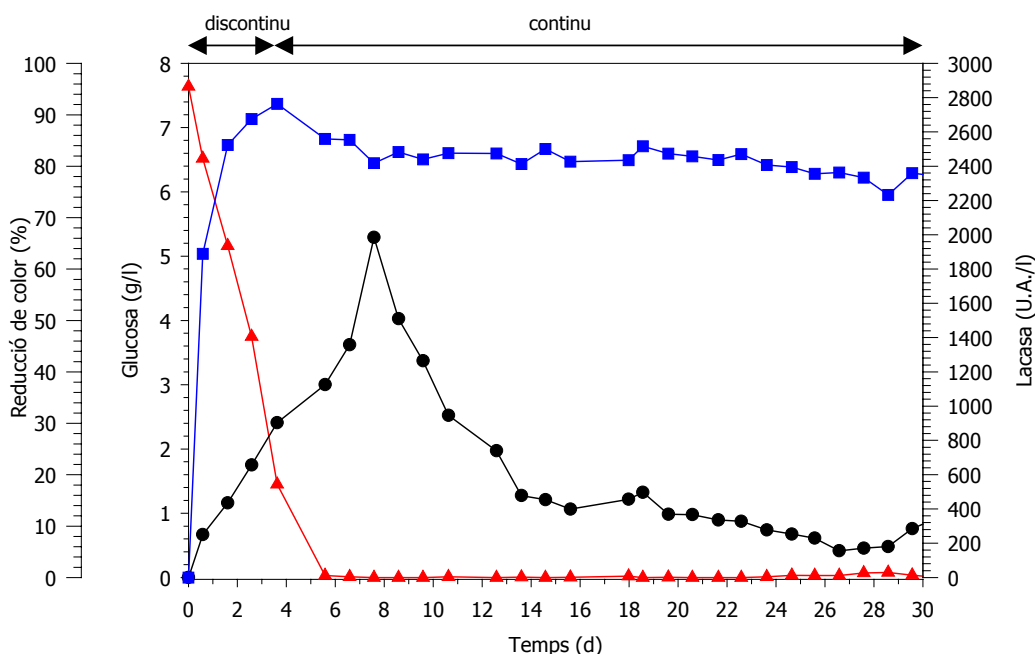


**Figura 4.4.** Evolució de la concentració de glucosa ( $\blacktriangle$ ), activitat lacasa ( $\bullet$ ) i percentatge de decoloració ( $\blacksquare$ ) en l'experiment en discontinu (B).

S'observa com en aquest cas tenim concentracions de glucosa en el medi nul·les, s'observa també en el gràfic com la decoloració obtinguda està per sobre del 80% excepte entre els dies 13 i 17, on es troba al voltant del 74%, però el sistema es recupera posteriorment i s'assoleixen decoloracions superiors al 85% quan estem en estat estacionari hidràulic. L'activitat lacasa presenta un pic de 2000 U.A./l el desè dia de tractament, i a partir d'aquest moment decau fins a valors al

voltant de les 300 U.A./l quan s'atura l'experiment. Queda corroborada per tant, la velocitat específica de consum de glucosa determinada a partir de les dades experimentals obtingudes amb l'experiment A, en que es produeix acumulació de glucosa. Respecte a la producció enzimàtica, s'obté un pic de 1985 U.A./l després de sis dies sense detectar glucosa en el corrent de sortida, a partir d'aquest moment la producció enzimàtica disminueix significativament per establir-se al voltant de 250 U.A./l.

A partir d'aquests resultats es realitza un darrer experiment (C) amb una concentració de glucosa a l'entrada un 15% inferior a la concentració de glucosa corresponent a la velocitat específica de consum. El temps de residència hidràulic és de 48 hores i en comptes d'alimentar la glucosa en continu amb una concentració de 2 g/l s'alimenta a 1.7 g/l, amb la intenció de comprovar la resposta del sistema davant una possible pertorbació com per exemple un dèficit en l'alimentació de la font de carboni. Els resultats obtinguts en aquest darrer experiment es mostren a la figura 4.5.



**Figura 4.5.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment en continu (C).

Com es pot observar a la figura 4.5, la concentració de glucosa en el medi és nul·la. La decoloració obtinguda està al voltant del 80% i si comparem aquesta

figura amb la figura 4.4 veiem que als 22 dies de tractament en la figura 4.4 la decoloració és del 86%, i a la figura 4.5, transcorreguts 22 dies, la decoloració és del 82%. S'obté un rendiment d'eliminació de color lleugerament superior quan s'alimenta el continu amb una concentració de glucosa al sistema corresponent a la velocitat de consum, però en tots dos experiments els rendiments d'eliminació de color són altament satisfactoris. Respecte la producció enzimàtica s'obté un pic de 2000 U.A./l, similar al de l'experiment B, amb l'única diferència que en aquest cas es requereixen només tres dies sense glucosa en el medi per a detectar el pic enzimàtic. Després del pic s'observa una disminució inicial de la producció enzimàtica fins i tot més ràpida que en l'experiment B, fins valors de 500 U.A./l. A partir d'aquest moment la disminució és constant però molt més lenta. A la taula 4.1 es resumeixen els resultats obtinguts.

**Taula 4.1.** Resum dels resultats experimentals per la determinació de la concentració de glucosa d'entrada al sistema.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b><math>C_0/C_c</math></b>	2.5	1	0.85
<b><math>\tau</math> (h)</b>	48	48	48
<b>% decoloració</b>	80	80	80
<b>Activitat mitjana (U.A./l)</b>	650	900	625

Està descrit a la bibliografia (Dosoretz *et al.*, 1990) que en cultius amb limitació de glucosa el fong produeix proteases que fan disminuir la concentració d'enzim, i per tant afectaria a la decoloració, però en els experiments realitzats no es detecta disminució significativament diferent de l'activitat enzimàtica de l'experiment realitzat amb limitació de glucosa (C), respecte al realitzat amb glucosa alimentada a la velocitat de consum (B).

Probablement s'hagi de disminuir encara més la glucosa a l'entrada per veure clarament l'efecte de les proteases, aquest fet però no s'ha comprovat experimentalment en aquest treball. En treballs anteriors (Romero, 2000) es va comprovar en un sistema experimental similar que el fong *Trametes versicolor* en absència de glucosa durant un període llarg no era capaç de decolorar un pols de colorant, amb una activitat enzimàtica de 180 U.A./l.

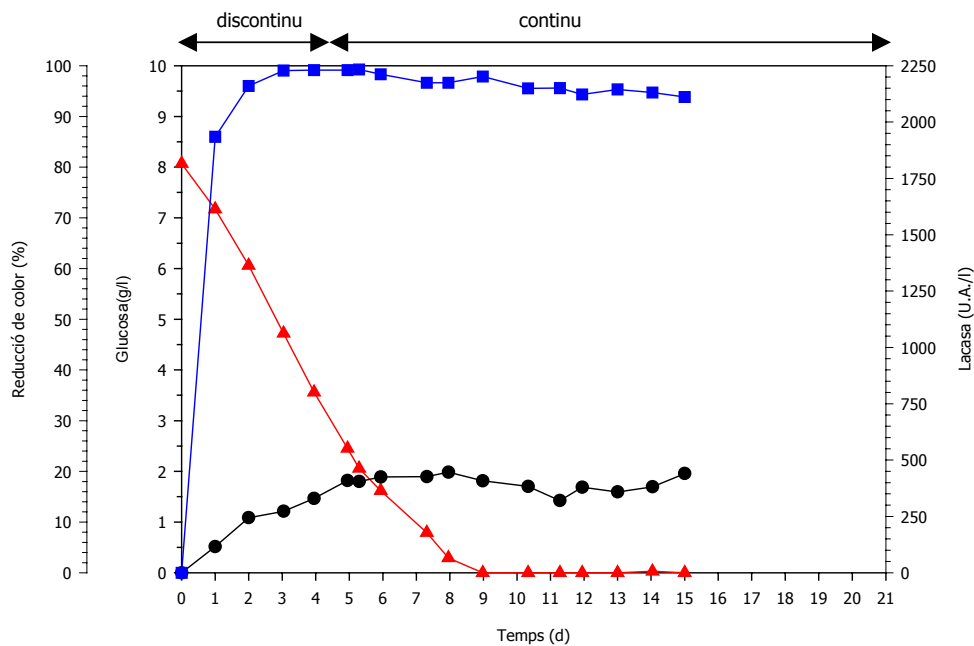
Sembla que a nivell de procés de depuració d'un efluent és millor que es produeixi un dèficit de glucosa en l'alimentació que un excés, degut a que l'augment

de la DQO en l'efluent suposa problemes mediambientals com s'ha dit anteriorment, i un dèficit durant un cert temps, el sistema és capaç de suportar-lo obtenint percentatges de decoloració satisfactoris.

S'observa en aquests experiments que no hi ha una relació directa entre l'activitat enzimàtica i la decoloració. Romero (2000) ja havia demostrat que activitats enzimàtiques de 200 U.A./l són suficients per obtenir bons rendiments de decoloració, el que permet plantejar la hipòtesi que es requereix un nivell enzimàtic relativament baix per assolir elevats percentatges de decoloració.

#### 4.3.3. Efecte del TRH

Amb l'objectiu d'analitzar l'efecte del temps de residència hidràulic es duen a terme diferents experiments. El primer es realitza a un temps de residència de 120 hores, ja que en una prova preliminar amb aquest temps de residència els resultats varen ser satisfactoris (Romero, 2000). Aquest primer experiment es realitza amb el bioreactor de 1.5 l. La càrrega volumètrica és de 30 g de colorant/d·m<sup>3</sup>, i la càrrega massica és de  $9.4 \cdot 10^{-3}$  g de colorant/d·g de pes sec. La figura 4.6 correspon als resultats d'aquest experiment.



**Figura 4.6.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment amb TRH 120h.

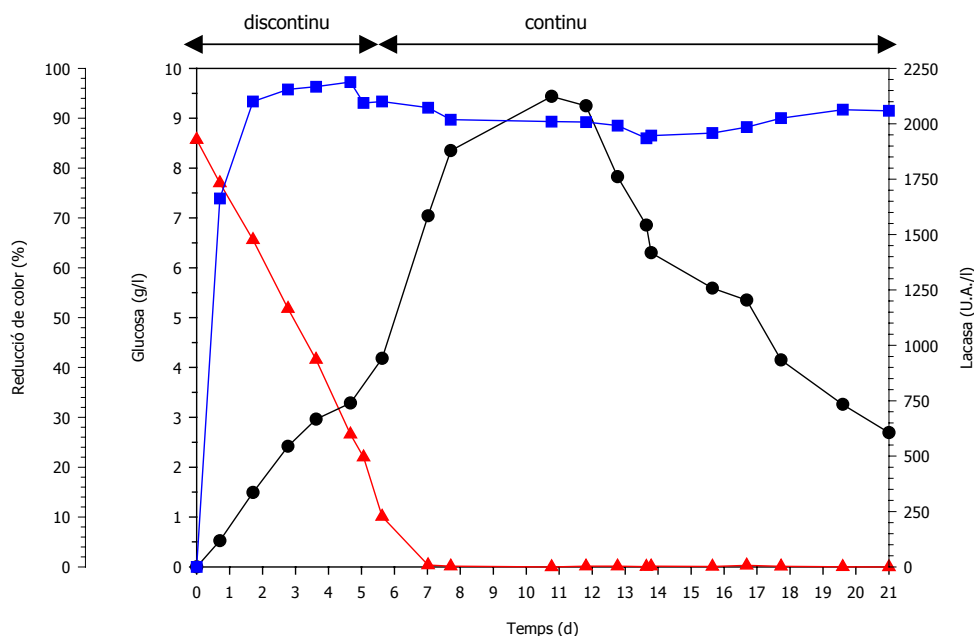
S'observa com al decoloració roman pràcticament constant des del moment en que s'inicia el continu el cinquè dia de tractament, quan la concentració de glucosa ha disminuït fins a 2 g/l. El percentatge de decoloració obtinguts transcorreguts 3 temps de residència hidràulics és de 93.8%, això es tradueix en una concentració de colorant a la sortida del reactor de 9.3 mg/l. Es pot observar també en aquesta figura com l'enzim lacasa extracel·lular es manté pràcticament constant des del moment en que s'inicia el continu al voltant de 400 unitats d'activitat. La glucosa inicial es consumeix en la primera etapa de tractament en discontinu i un cop s'inicia el procés en continu, on la glucosa s'alimenta al reactor amb una concentració de 5 g/l i continua disminuint fins que la seva concentració en el reactor és nul·la.

Es comparen aquests resultats obtinguts operant amb un temps de residència hidràulic de 120 h amb els obtinguts en l'experiment B (fig. 4.4) realitzat a un temps de residència de 48 hores en el bioreactor de 0.5 l de volum. La càrrega volumètrica en aquest experiment és de 75 g de colorant/d·m<sup>3</sup>, i la càrrega massica de  $2.34 \cdot 10^{-2}$  g de colorant/d·g de pes sec. Tant la càrrega volumètrica com la càrrega massica són 2.5 vegades més grans que en l'experiment realitzat a 120 h de TRH. Es pot observar com tot i la disminució del temps de residència de manera significativa, que implica l'important augment en la càrrega de colorant al bioreactor, la decoloració obtinguda és també elevada, s'aconsegueix mantenir una decoloració en tot moment per sobre del 74%, i transcorreguts 10 temps de residència hidràulics, la decoloració és del 86%. A la figura 4.4 es pot observar com l'activitat lacasa presenta un pic de 1985 U.A./l el desè dia de tractament, i que a partir d'aquest moment l'activitat decau fins a 212 U.A./l quan s'atura l'experiment. Si es compara aquest perfil d'activitat amb el que s'obté a 120 h de TRH (figura 4.6) es pot veure que operant a 48 h s'obté un pic d'activitat molt superior a la mitjana d'enzim obtingut treballant a 120 h de TRH. Tot i el major rentat que es produeix degut a la disminució de TRH es detecta més activitat enzimàtica que operant a 120 h. Es pot observar també en els dos últims punts de la figura 4.4 que tot i tenir activitats baixes, per sota de 350 U.A./l, la decoloració en aquests punts ha estat superior al 85%. Aquest fet corrobora que no calen activitats extracel·lulars massa elevades per obtenir bons rendiments de decoloració.

A partir d'aquests resultats es decideix realitzar un altre experiment treballant també amb un temps de residència hidràulic de 48h però en el bioreactor de 1.5 l, en aquest cas tant la càrrega volumètrica com la càrrega massica són

iguals que en l'experiment reflexat a la figura 4.4 ja que es treballa amb el mateix temps de residència i la mateixa concentració de colorant en les aigües a tractar. A la figura 4.7 es mostren els resultats obtinguts.

Tant en la figura 4.7 com en la figura 4.4 es donen perfils semblants de decoloració, de consum de glucosa i d'activitat enzimàtica, presentant-se els màxims d'activitat al mateix temps, transcorreguts 10-11 dies de tractament en ambdós casos. La figura 4.7 mostra com la decoloració obtinguda en aquest experiment és sempre superior al 86.5% i transcorreguts 10 temps de residència la decoloració és del 91.5%. La màxima activitat lacasa produïda en aquest experiment és de 2123 U.A./l transcorreguts 11 dies des de l'inici del tractament, i aquesta decau fins a 605 U.A./l al final del tractament. Donats aquests resultats, treballant amb un TRH de 48 hores, es decideix disminuir més el temps de residència hidràulic, i es realitza un experiment amb un temps de residència hidràulic de 24 h en el bioreactor de 1.5 l.

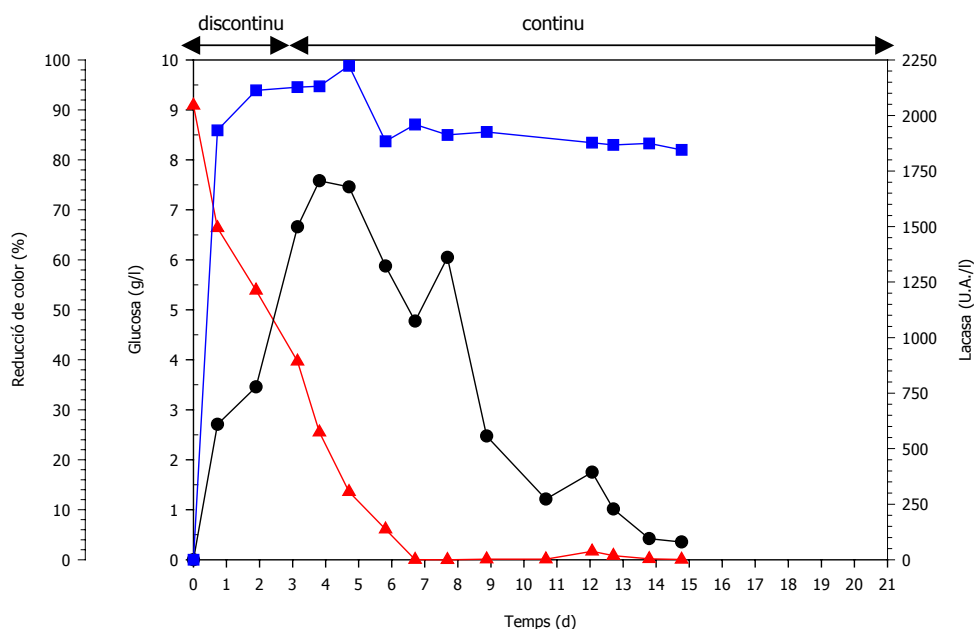


**Figura 4.7.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment amb TRH 48h.

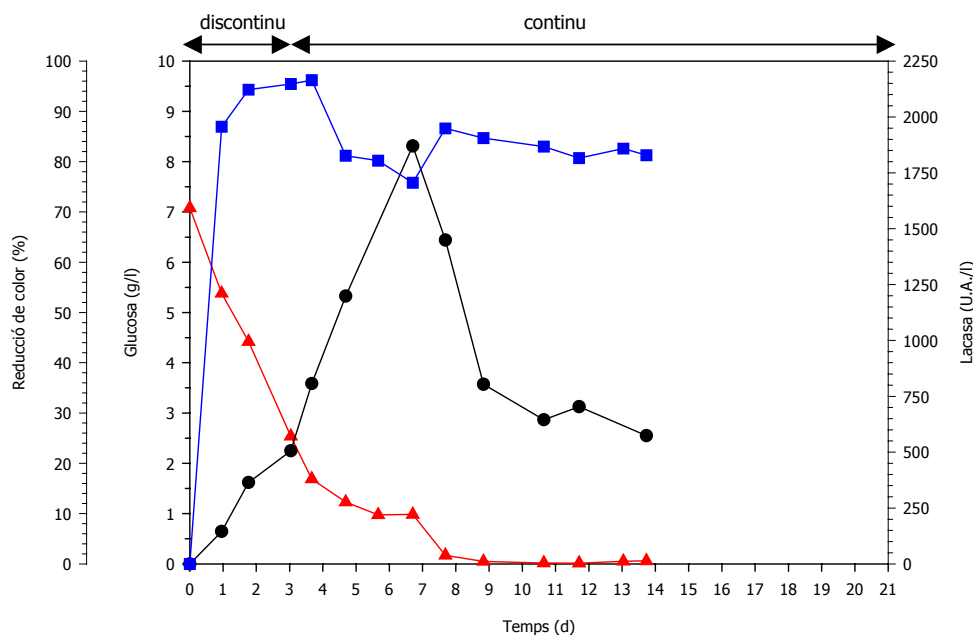
En disminuir a la meitat el temps de residència hidràulic s'augmenta el doble tant la càrrega volumètrica com la càrrega massica de colorant, que són respectivament 150 g de colorant/d·m<sup>3</sup> i 4.68·10<sup>-2</sup> g de colorant/d·g de pes sec. Els resultats obtinguts en aquest experiment es mostren a la figura 4.8.

Al final de l'experiment, transcorreguts 11 temps de residència hidràulics s'obté una decoloració del 82%, i durant el tractament s'obtenen percentatges de decoloració superiors a aquest valor. En aquest experiment el pic d'activitat es dona el quart dia del tractament, amb un valor de 1705 U.A./l i decau fins a 80 U.A./l al final del tractament, però tot i la poca activitat enzimàtica la decoloració es manté a nivells elevats, per sobre del 80%. Degut a que la decoloració obtinguda amb un temps de residència de 24 hores és superior al 80% es decideix reduir encara més el temps de residència, fins a 18 hores.

En aquest darrer experiment s'augmenta encara més la càrrega volumètrica i la càrrega massica de colorant, la càrrega volumètrica té un valor de 200 g de colorant/d·m<sup>3</sup> i la càrrega massica és de  $6.25 \cdot 10^{-2}$  g de colorant/d·g de pes sec. Els resultats experimentals es presenten a la figura 4.9.



**Figura 4.8.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment amb TRH 24h.



**Figura 4.9.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment amb TRH 18h.

Tot i l'augment de les càrregues màssica i volumètrica, s'aconsegueix una reducció de color superior al 75% durant el tractament, i transcorreguts 15 TRH la decoloració és del 81%. El pic d'activitat es dona al setè dia, amb un valor de 1870 U.A./l, i aquesta disminueix fins a 574 U.A./l al final de l'experiment.

A la taula 4.2 es presenta un resum dels experiments realitzats on es mostren els temps de residència als que s'ha operat, la càrrega volumètrica de colorant, la càrrega màssica de colorant, el percentatge de decoloració mitjà obtingut durant el procés en continu i la mitjana del percentatge de decoloració obtingut transcorreguts tres TRH des del moment en que s'inicia el continu fins al final de l'experiment, excepte pel primer experiment que degut a l'elevat temps de residència només tenim dades de dos temps de residència a partir del moment en que s'inicia el procés en continu. També es presenta en aquesta taula la mitjana de l'activitat lacasa durant el procés en continu i la quantitat mitjana de colorant eliminat.



Si es comparen els resultats obtinguts a diferents temps de residència podem observar lògicament que com major és el temps de residència millor és el percentatge de decoloració obtingut.

**Taula 4.2.** Taula resum dels experiments realitzats per determinar el temps de residència de treball.

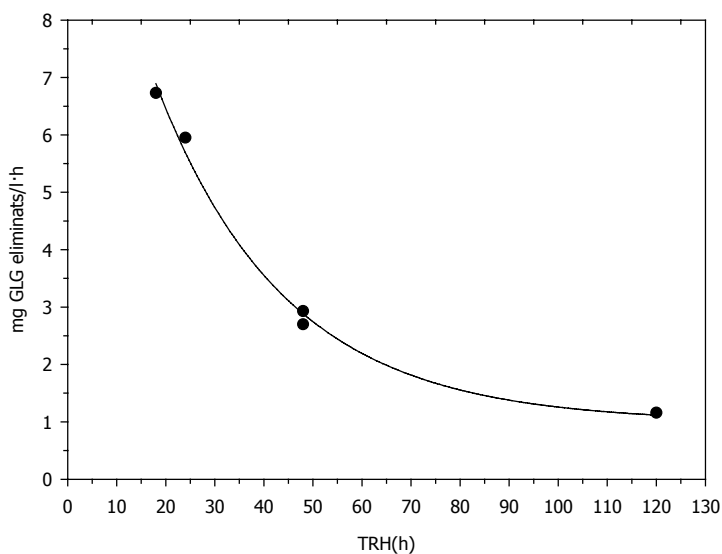
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>TRH (h)</b>	120	48	48	24	18
<b>V (l)</b>	1.5	0.5	1.5	1.5	1.5
<b>Cv(g GLG/d·m<sup>3</sup>)</b>	30	75	75	150	200
<b>Cm(g GLG/d·g pes sec)</b>	$9.4 \cdot 10^{-3}$	$2.34 \cdot 10^{-2}$	$2.34 \cdot 10^{-2}$	$4.68 \cdot 10^{-2}$	$6.25 \cdot 10^{-2}$
<b>Decoloració mitjana continu (%)</b>	96	82	90	86	83
<b>Decoloració mitjana a partir de 3TRH (%)</b>	-	80 (74-87)	89 (86-92)	84 (82-86)	82 (76-87)
<b>Lacasa (U.A./l)</b>	395	974	1420	1043	1015
<b>mgGLG eliminats/l·h</b>	1.16	2.70	2.93	5.95	6.73

Si s'analitza la diferència entre el temps de residència i la decoloració obtinguda s'observa que reduir un 85% el temps de residència, de 120 a 18 hores, només implica una reducció en la decoloració del 13.5%. Aquest fet és un indicador de la robustesa del sistema ja que petits canvis en el temps de residència no suposaran cap canvi important en el percentatge de decoloració obtingut.

Si es compara el percentatge de decoloració mitjà amb el temps de residència en el cas del bioreactor de 1.5 l, (experiments 1, 3, 4 i 5) es veu que augmentant en 72 hores el TRH, passant de 48h a 120 h, s'aconsegueix augmentar en un 6% el percentatge de decoloració obtingut, però amb un 90% de decoloració l'efluent queda pràcticament decolorat i no és necessari obtenir decoloracions superiors. Aquests resultats mostren que no és necessari treballar a temps de residència hidràulics superiors a 48 hores, és a dir no cal més temps de contacte entre el fong i el colorant, per obtenir bons percentatges de decoloració, però el que no s'ha arribat a comprovar experimentalment és fins a quin punt es pot disminuir el TRH, obtenint reduccions de color acceptables.

S'ha fet la representació gràfica de la quantitat de colorant Gris Lanaset G eliminat per litre i per hora en funció del temps de residència. La gràfica es mostra a

la figura 4.10 on els resultats experimentals s'ajusten a una equació exponencial decreixent.

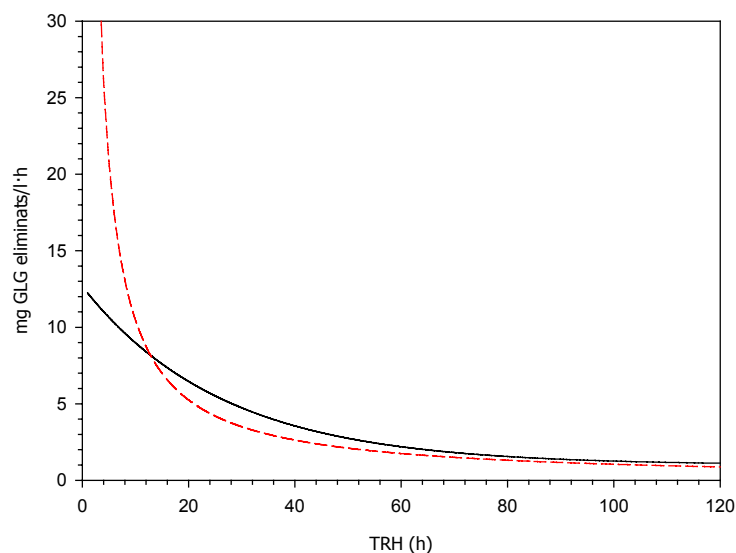


**Figura 4.10.** Evolució de la quantitat de colorant eliminat amb el temps de residència hidràulic.

Els dos punts que es troben a temps de residència de 48 hores corresponen als experiments realitzats amb els bioreactors d'1.5 i 0.5 l, i com es pot observar són molt semblants, tant en un sistema com en l'altre la quantitat de colorant eliminada és aproximadament igual. S'observa que com més petit és el temps de residència major és la quantitat de colorant eliminada per temps i per volum, això és degut a que tot i tenir temps de residència petits el percentatge de decoloració és elevat, superior al 80%, i això fa que la quantitat de color eliminada sigui bastant més gran quan es treballa a temps de residència petits, tot i que la decoloració global del sistema és superior quan es treballa a temps de residència elevats.

Es poden comparar aquestes dades experimentals amb la velocitat teòrica d'eliminació de colorant necessària per estar dins dels marges de decoloració de les aigües per abocar-les a una EDAR. La concentració de colorant límit és de 45 mg/l, degut a que si es dilueix 30 vegades una solució de colorant amb una concentració de 45 mg/l el color és inapreciable.

Per tant, si es parteix d'una solució de colorant de 150 mg/l s'han d'eliminar 105 mg/l de colorant. A la figura 4.11 es mostra l'evolució teòrica de la velocitat de decoloració en funció del temps de residència i es compara amb la corba experimental obtinguda.



**Figura 4.11.** Evolució de la velocitat de decoloració, teòrica (—) i experimental (---)

El punt d'intersecció de les dues corbes de la figura 4.11 es dona a TRH de 13 hores. Operant a temps de residència superiors a 13 hores s'elimina més color del que exigeix la normativa vigent per la nostra solució inicial de colorant, però per sota d'aquest temps no s'obtidria un efluent que compleixi la normativa per poder ser admès a una EDAR. Per tant el mínim TRH al que pot operar el sistema experimental és de 13 hores, i s'obtidria una decoloració del 70% respecte la solució inicial de 150 mg/l de colorant Gris Lanaset G.

#### 4.4. Conclusions

S'obtenen bons rendiments de decoloració en tots els experiments realitzats amb diferents concentracions de glucosa, per tant la decoloració no es veu afectada de forma important per la concentració de glucosa en el sistema amb les concentracions que s'han provat.

La velocitat de consum de glucosa determinada amb les dades experimentals,  $0.5 \pm 0.05$  g glucosa/d, és de l'ordre de les calculades teòricament a partir de l'energia de Gibbs necessària per al manteniment del microorganisme.

Amb les concentracions de glucosa que s'ha treballat no s'ha detectat cap efecte significatiu sobre la producció enzimàtica, tot i que està descrit que amb limitació de glucosa es produeixen proteases que fan disminuir la concentració d'enzim.

S'hauria d'alimentar la glucosa en continu a la velocitat de consum per no tenir acumulació de glucosa en el sistema i evitar obtenir un efluent amb major DQO.

S'ha establert el temps de mescla del bioreactor de 0.5 l sense biomassa en 3 minuts i en 2.5 minuts el temps de mescla del bioreactor de 1.5 l sense biomassa. El temps de mescla del bioreactor d'1.5 l amb biomassa en el sistema és de 4.5 minuts.

S'ha operat en continu a diferents temps de residència hidràulics, 18, 24, 48, 72 i 120 hores arribant a l'estat estacionari hidràulic .

No calen activitats extracel·lulars elevades per obtenir rendiments de decoloració superiors al 80%. S'ha comprovat experimentalment que amb activitats de 250 U.A./l la decoloració és superior al 80%.

En augmentar el TRH augmenta el percentatge de decoloració però en reduir un 85% el TRH passant de 120 h a 18 h la reducció en la decoloració és només del 13.5%, el que indica la robustesa del sistema.

En disminuir el TRH augmenta la velocitat de decoloració ja que tot i tenir TRH baixos els percentatges de decoloració són superiors al 80%.

Es pot estimar el TRH mínim per poder tractar l'efluent decolorat en una EDAR. El mínim TRH al que pot operar el sistema experimental és de 13 hores, i s'obté una decoloració del 70% respecte la solució inicial de 150 mg/l de colorant Gris Lanaset G.

#### **4.5. Bibliografia**

**B**orchert M, Libra JA. 2001. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. Biotechnol. Bioeng. 75:313-321.

- Bonarme P, Jeffries TW. 1990. Selective production of extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* in an airlift bioreactor. J. Ferment. Bioeng. 70: 158-163.
- C**ripps C, Bumpus JA, Aust SD. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56:1114-1118.
- Dosoretz CG, Dass SB, Reddy CA, Grethlein HE. 1990. Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3429-3434.
- F**eijoo G, Dosoretz C, Lema JM. 1995. Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in a packed bed bioreactor in semi-continuous mode. J. Biotechnol. 40:247-257.
- G**len JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH. 1983. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 1077-1083.
- H**ejijnen JJ. Bioenergetics of microbial growth, in Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. John Wiley & Sons, Inc. 1999. 267:291
- Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U. 1997. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:261-266.
- K**irkpatrick TK, Palmer JM. 1987. Semi-continuous ligninase production using foam-immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 51:177-185.
- L**ibra JA, Borchert M, Banit S. 2003. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. Biotechnol. Bioeng. 82:736-744.
- M**ielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2001. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). J. of Biotechnol. 89: 99-106.
- Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2002. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. Wat. Res. 36:1896-1901.

- Moreira MT, Palma C, Feijoo G, Lema JM. 1998. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidized bed bioreactors. *J. Biotechnol.* 66:27-39.
- O**llikka P, Alhornmäki K, Leppänen VM, Glumoff T, Rajjola T, Suominen I. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4010-4016.
- P**allerla C, Chambers RP. 1998. Reactor development for biodegradation of pentachlorophenol. *Catalysis Today.* 40: 103-111.
- Palma C, Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 1999. Use of a fungal bioreactor as a pretreatment or post-treatment step for continuous decolorization of dyes. *Wat. Sci. Technol.* 40(8):131-136.
- Paszczynski A, Pasti-Grigsby MB, Goszczynski S, Crawford RL, Crawford DL. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3598-3604.
- R**eddy CA. 1995. The potential for white rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:328-328.
- Rodríguez Couto S, Moldes D, Liébanas A, Sanromán A. 2002. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. *Biochem. Eng. J.* 15:21-26.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA, Hofer D, Gübitz GM. 2004. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresour. Technol.* 95: 67-72.
- Romero. 2000. Tractament amb fongs d'aigües residuals colorades. Ph.D. Tesi. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 2000.
- S**wamy J, Ramsay JA. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enz. Microb. Technol.* 24:130-137.
- T**ien M, Kirk TK. 1988. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* 221:661-663.
- W**illerhausen H, Jäger A, Graf H. 1987. Ligninase production of *Phanerochaete chrysosporium* by immobilisation in bioreactors. *J. Biotechnol.* 6:239-243.

- Y**ang FC, Yu JT. 1996a. Development of a bioreactor system using immobilized white rot fungus for decolorization. Part I: cell immobilization and repeated-batch decolorization tests. *Bioprocess Eng.* 15:307-310.
- Yang FC, Yu JT. 1996b. Development of a bioreactor system using immobilized white rot fungus for decolorization. Part II: continuous decolorization tests. *Bioprocess Eng.* 16:6-11.
- Z**hang FM, Knapp JS, Kelvin, NT. 1999. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enz. Microb. Technol.* 24: 48-53.

## Capítol 5

### Mecanisme de biotransformació d'un colorant tèxtil metàl·lic per *Trametes versicolor*

Els resultats d'aquest capítol estan publicats a:

Blánquez P, Casas N, Font X, Gabarrell X, Sarrà M, Caminal G, Vicent T. 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*. 38: 2166-2172.

#### Resum

S'ha estudiat la biodegradació del colorant Gris Lanaset G, format per una mescla de colorants metàl·lics complexos. Els experiments es porten a terme en un bioreactor amb pèl·lets del fong *Trametes versicolor* retinguts en el seu interior, operant en condicions de producció de lacasa. S'ha observat que els pèl·lets inicialment tenyits al llarg d'un procés en discontinu esdevenen incoloros, i s'ha comprovat en experiments *in vitro* que l'enzim extracel·lular només és capaç de degradar parcialment el colorant. Aquests fets permeten proposar que el mecanisme de decoloració té lloc en varies etapes en sèrie, l'adsorció inicial del colorant sobre la biomassa, la transferència a l'interior de les cèl·lules, el trencament de l'enllaç complex metàl·lic i finalment els compostos de degradació són excretats al medi. El contingut de metalls (Cr i Co) a la biomassa i a la solució tractada, i l'estreta relació entre el contingut en enzim intracel·lular i la degradació del colorant, confirma la hipòtesi proposada. Es demostra que l'eliminació de color és deguda a l'activitat ligninolítica del fong i no al procés d'adsorció de color sobre la biomassa.



## 5.1. Introducció

Els colorants conformen un ampli grup de compostos químics, descrits detalladament a la introducció general d'aquests memòria. L'eliminació del color d'efluents industrials per bioprocessos és difícil. Amb un tractament convencional de llocs actius els rendiments d'eliminació de color no són satisfactoris, i la decoloració es dona bàsicament per adsorció del colorant sobre els bacteris, i no per l'oxidació durant el metabolisme aerobi (Bustard *et al.*, 1998). Són molts els treballs publicats en relació a l'eliminació d'aquests compostos, utilitzant tècniques alternatives al tractament biològic convencional, i en els últims anys la major part dels treballs publicats en relació a la decoloració biològica d'efluents colorats s'han centrat en processos anaerobis amb bacteris (Méndez, 2002; Sen i Demirer, 2002; Kapdan *et al.*, 2003a) i en processos utilitzant fongs ligninolítics (Crips *et al.*, 1990; Paszczynski *et al.*, 1992; Mielgo *et al.*, 2002; Wesenberg *et al.*, 2002). També s'han publicat estudis en els que es combina el tractament anaerobi amb l'aerobi (O' Neill *et al.*, 2000; Kapdan *et al.*, 2003b).

En la majoria de treballs relatius a la decoloració biològica els colorants utilitzats són azo, diazo, o mescles d'aquests ( Sparado *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 2000; Sumathi *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2002). En alguns treballs, els autors fan una selecció entre diferents microorganismes, generalment fongs, per determinar quins són els millors per a la decoloració (Swamy *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000; Chagas i Durrant, 2001; Robinson *et al.*, 2001; Jarosz-Wiilkolazka *et al.*, 2002). En altres, els autors demostren la capacitat de nous microorganismes per decolorar diferents colorants (Heinfling *et al.*, 1998; Schliephake i Lonergan, 1996; Nigam *et al.*, 1996; Sani *et al.*, 1999; Sumathi *et al.*, 2001; Wesenberg *et al.*, 2002; Hatvani *et al.*, 2002). S'han publicat treballs on el tipus de colorant o l'estructura química es diferent degut a canvis en el substituent de l'anell fenòlic o entre dos enllaços azo. La mineralització o transformació del colorant és funció en aquest cas dels diferents substituents (Spadaro *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2002), i conclouen que l'estructura química de l'anell fenòlic i els substituents afecten a la cinètica de decoloració.

Un altre grup de treballs estan referits a la decoloració del colorant Cristall violeta i altres colorants trimetilmetans per diferents microorganismes, incloent fongs i bacteris (Bumpus *et al.*, 1988; Sani *et al.*, 1999; Sun-Young *et al.*, 2002). I finalment alguns treballs publicats es refereixen a l'eliminació del colorant poly R-478, que presenta una elevada resistència a la degradació degut a la seva estructura d'anell aromàtic (Mielgo *et al.*, 2002; Hatvani i Mécs, 2002).

En quant a l'anàlisi dels enzims que intervenen en el procés de decoloració, els treballs publicats es poden dividir en dos grans grups. En un, els autors no donen informació dels enzims presents durant el procés de decoloració, i en alguns casos (Sparado *et al.*, 1992; Sani *et al.*, 1999; Kapdan *et al.*, 2000) ni tan sols es discuteix o s'avalua si la decoloració és un procés de biodegradació o d'adsorció, altres presenten només el procés com una bioadsorció (Bustard *et al.*, 1998; Dönmez, 2002). L'altre gran grup de treballs demostra que hi ha degradació o biotransformació dels colorants i relacionen la decoloració amb l'enzim ligninolític majoritari obtingut en les condicions de treball (Tatarko i Bumpus, 1998; Moreira *et al.*, 2000; Chagas i Durrant, 2001; Robinson *et al.*, 2001; Wesenberg *et al.*, 2002; Mielgo *et al.*, 2002; Hatvani i Mécs, 2002; Sun-Young *et al.*, 2002). En alguns casos es treballa únicament amb l'enzim purificat (Soares *et al.*, 2002; Nyanhongo *et al.*, 2002) normalment lacasa o manganès peroxidasa, i la velocitat de decoloració depèn també de l'estructura i dels substituents de la molècula de colorant.

A la bibliografia però, no es troben treballs en els que s'estudii la biodegradació de colorants que tinguin un enllaç metàl·lic, com el colorant Gris Lanaset G, que conté crom i cobalt. En aquest capítol es presenta el treball que té com objectiu demostrar la biodegradació del colorant Gris Lanaset G pel fong i la implicació de l'enzim lacasa, i degut a que no es coneix l'estructura del colorant s'utilitza un procediment indirecte.

## **5.2. Materials i mètodes**

### **5.2.1. Equipament i condicions d'operació**

El bioreactor utilitzat en aquest experiment és el bioreactor fluïditzat per polsos d'aire amb un volum útil de 1.5 l descrit a l'apartat 3.4 del capítol de materials i mètodes generals. El reactor s'omple de medi de tractament en discontinu s'esterilitza durant 30 min a 121°C i s'inocula amb una quantitat de pèl·lets equivalents a 3.2 g/l de pes sec. El bioreactor opera en discontinu i un cop s'assoleix una concentració de glucosa en el medi aproximadament de 2 g/l s'inicia el procés en continu, alimentant amb el medi de tractament en continu descrit a la taula 3.2 de materials i mètodes generals amb una concentració de glucosa de 5 g/l, corresponent a la velocitat de consum per un temps de residència hidràulic és de 120h. La biomassa, en forma de pèl·lets queda retinguda en el bioreactor, sense pèrdues en el corrent de sortida.

### **5.2.2. Biodegradació *in vitro***

El medi de cultiu es centrifuga a 10000 x g a 4°C durant 10 min. El sobrenedant es filtra a través de filtres de 0.22 µm de mida de porus (Millipore) i s'ajusta el pH a 4.5. La capacitat de biodegradació es determina afegint 15 mg de colorant a 100 ml del brou de cultiu filtrat. La concentració de colorant i l'activitat enzimàtica es mesuren al llarg del temps.

### **5.2.3. Obtenció de l'enzim lacasa intracel·lular**

La biomassa utilitzada per obtenir la lacasa intracel·lular es filtra i es renta amb aigua destil·lada, es resuspén en tampó malonat sòdic 250 mM a pH 4.5 i es tritura amb un homogeneïtzador. La suspensió resultant se sotmet a disrupció cel·lular a alta pressió (Constant Systems LTD), realitzant un únic tret a 2.86 atm. Finalment, la mescla es centrifuga a 20000 x g i 4°C durant 15 min. El contingut en enzim lacasa es mesura aplicant l'assaig enzimàtic al sobrenedant.

### **5.2.4. Mètodes analítics**

La determinació del contingut en glucosa, del color i de l'activitat lacasa estan descrits a l'apartat 3.6 del capítol de materials i mètodes generals.

✓ **Determinació del contingut en crom i cobalt**

El contingut en Cr i Co es mesura per espectroscopia d'absorció atòmica de flama utilitzant un espectròmetre Perkin-Elmer 2100. Per la determinació del Cr s'utilitza una flama d'acetilè i per la determinació del Co una flama d'aire i acetilè.

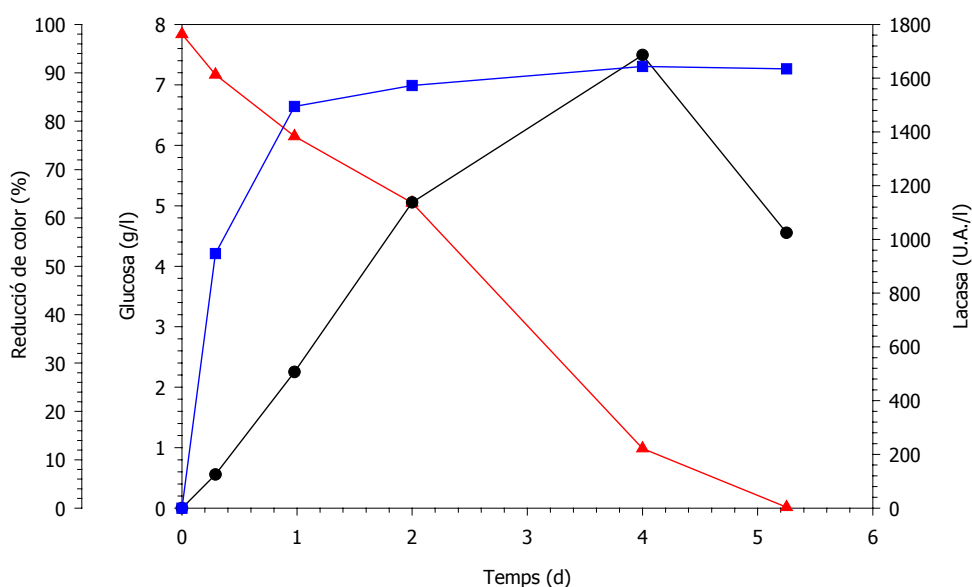
### **5.3. Resultats i discussió**

Es duen a terme dos tipus d'experiments. En el primer s'opera en mode discontinu, i en el segon, després d'un curt període d'operació en discontinu, quan la concentració de glucosa és aproximadament 2 g/l, el sistema comença a operar en continu. La solució de colorant, amb 5 g/l de glucosa, s'alimenta al reactor amb un cabal de 0.30 l/dia. La càrrega volumètrica és de 30 g de colorant/dia·m<sup>3</sup> de reactor, i la càrrega màssica és de  $9.4 \cdot 10^{-3}$  g de colorant/dia·g de pes sec.

Les variables analitzades en ambdós tipus d'experiments són concentració de glucosa, concentració de colorant, i activitat de l'enzim lacasa a la solució. El percentatge de decoloració es calcula com el quocient entre el color eliminat respecte l'inicial pel procés en discontinu, i com el quocient entre la reducció de

concentració de colorant respecte a la concentració d'entrada en el procés en continu.

La figura 5.1 mostra els resultats d'un procés en discontinu de cinc dies de durada durant el qual la glucosa es consumeix totalment. Tot i que la màxima activitat lacasa (1685 U.A./l) s'obté en el quart dia, la decoloració es produeix majoritàriament durant les primeres 24 hores de procés (84 %), quan la concentració d'enzim lacasa extracel·lular en el medi és molt baixa. A les 24 hores els pèl·lets estan tenyits i el medi decolorat, i al final del procés la reducció de color en el medi líquid no ha augmentat significativament (90 %) respecte la obtinguda durant les primeres 24 hores, però els pèl·lets s'han destenyit, per tant també ha hagut degradació del colorant inicialment adsorbit sobre la biomassa

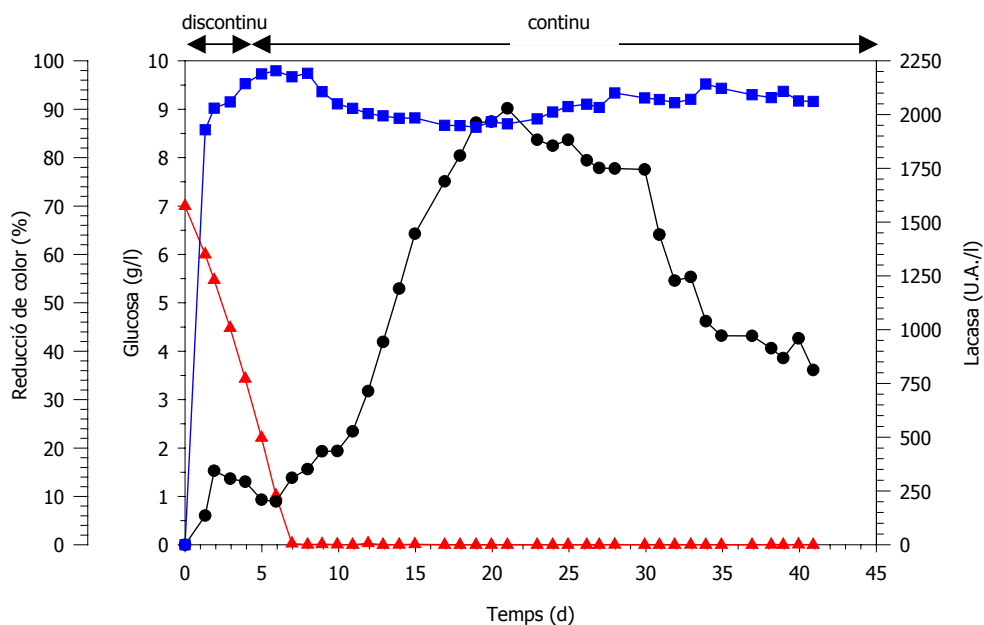


**Figura 5.1.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de reducció de color (■) durant el procés en discontinu.

La figura 5.2 mostra els resultats obtinguts en un procés en continu. Després d'una etapa en discontinu de 5 dies, es manté el sistema operant de manera contínua durant 40 dies. La màxima activitat enzimàtica és de 2028 U.A./l. Aquesta s'obté transcorreguts 21 dies i es manté a nivells elevats durant 10 dies més, i a partir d'aquí l'activitat extracel·lular comença a decréixer fins al final de l'operació. En canvi, el percentatge de decoloració obtingut durant el procés en continu es

manté gairebé constant, aproximadament al 90%. Per tant, com ja s'havia apuntat en el capítol 4, no hi ha una relació directa entre l'activitat enzimàtica extracel·lular i el percentatge de decoloració.

En ambdós processos, la reducció de color més important del medi es dona durant les primeres 24 h, durant les quals s'observa que els pèl·lets queden completament tenyits. Aquesta és una conseqüència clara de que el colorant s'adsorbeix a la superfície de la biomassa. El procés d'adsorció ha estat estudiat prèviament (Aretxaga *et al.*, 2001), i es determina que l'equilibri d'adsorció del colorant Gris Lanaset G en la biomassa es dona en 24 h i segueix una isoterma de tipus Langmuir. Aquests estudis previs es varen realitzar amb biomassa inactiva, i el colorant es transfereix de la fase líquida a la fase sòlida, per ser adsorbit a la superfície del fong. La desadsorció mesurada en aquests estudis previs és de menys del 5%, per tant, l'adsorció és un procés quasi irreversible durant el tractament amb fong actiu. La reducció de color més important es produeix durant les primeres 24 h, quan el sistema està operant en discontinu i després no s'observa un augment del color en el medi líquid, per tant tampoc es produeix desadsorció de colorant, ja que és un procés quasi irreversible.



**Figura 5.2.** Concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de reducció de color (■) durant el procés en continu de biodegradació del colorant Gris Lanaset G per *Trametes versicolor*.

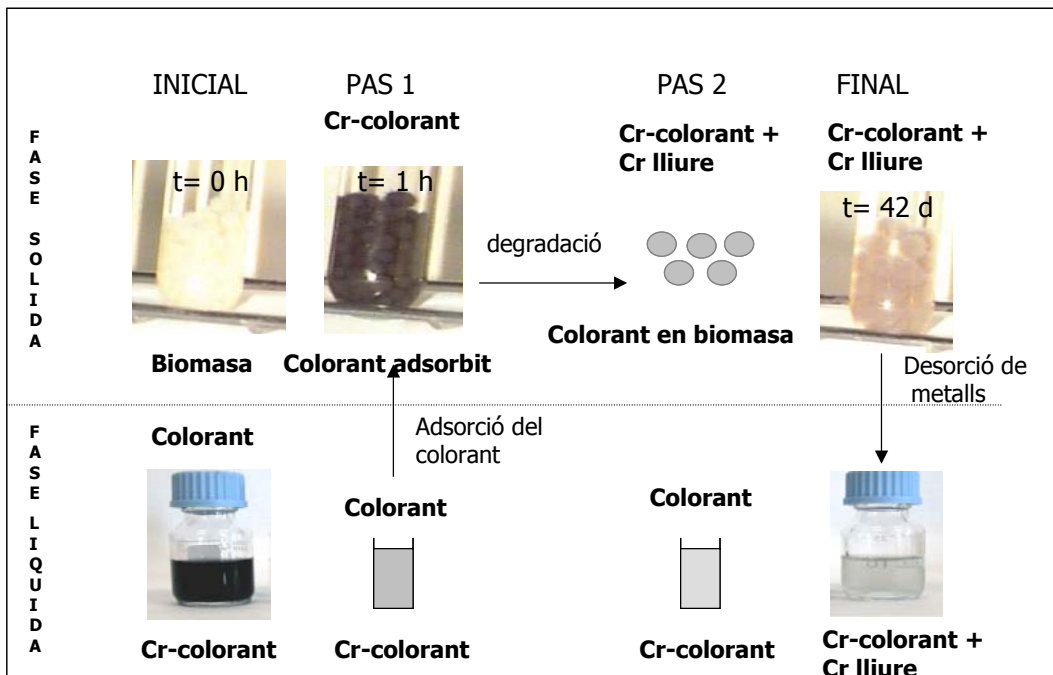
Tot i no augmentar el color en el medi, s'observa que els pèl·lets durant el procés en continu estan bastant destenyits, quan el colorant és alimentat contínuament al bioreactor. Aquests no s'enfosqueixen com succeeix durant les primeres hores de tractament, i es mantenen força decolorats. Això pot ser degut a que el medi en el bioreactor està perfectament agitat i homogeneïtzat, per tant la concentració a l'interior és igual a la de sortida, és a dir, molt baixa, i la concentració de colorant a la superfície de la biomassa està en equilibri amb la concentració a la fase líquida. Per tant la concentració de colorant en la biomassa és també molt baixa. La figura 5.3 mostra una diferència significativa entre el color de la fase líquida i els pèl·lets obtinguts quan ha transcorregut una hora des de l'inici del procés, i aquests després del tractament (42 dies). Es pot observar com després d'una hora de contacte entre la biomassa i el medi de tractament els pèl·lets estan totalment tenyits, en canvi transcorreguts 42 dies, la biomassa està bastant destenyida i la fase líquida final també presenta poc color, es reflecteix la degradació del colorant en ambdues fases durant el procés. Per tant es fa patent visualment que s'ha degradat tant la solució de colorant com el colorant adsorbit a la biomassa.

El colorant Gris Lanaset G, com s'ha dit anteriorment, és una mescla de diferents colorants organometàl·lics. L'estructura química del qual no està disponible, per què és un colorant patentat; però basant-se en les seves especificacions (Annex I) es coneix que conté cobalt (0.79%) com complex organometàl·lic i crom (2.5%) com complex organometàl·lic de Cr III. Es determina el contingut d'ambdós metalls en les diferents fases del procés, en el moment inicial i final, per ambdós processos, el continu i el discontinu, per facilitar la comprensió del mecanisme de decoloració.

La hipòtesis del mecanisme de decoloració sorgeix a partir d'observacions experimentals. La figura 5.3 mostra un esquema del mecanisme proposat.

Primer es produeix l'adsorció del colorant sobre la biomassa (pas 1) el qual és degradat després en el seu interior (pas 2), i finalment els metalls que ja no formen part de l'estructura del colorant, són alliberats al medi líquid. Per tant els metalls es poden trobar formant part del grup cromòfor en la fracció de colorant que no ha estat degradada a la fase líquida, com a metalls lliures a la fase líquida, o a la fase sòlida. Els que hi ha a la fase sòlida no es pot determinar si estan lligats a la molècula de colorant o estan lliures, ja que no es pot extreure el colorant; en canvi a la fase líquida es pot quantificar la fracció lligada a la molècula de colorant,

mitjançant la mesura de l'absorbància a 590nm i per diferència amb els metalls totals quantificats per adsorció atòmica es determina la fracció de metalls lliures.



**Figura 5.3.** Esquema del mecanisme proposat per la biodegradació del colorant. (Cr-colorant significa Cr lligat al colorant, mentre que Cr-lliure significa Cr no lligat).

Es determina la concentració de metalls en la fase líquida inicial i final, i a la biomassa final al procés en discontinu. En el procés en continu les anàlisis es duen a terme a l'influent, a l'efluent i a la biomassa al final del procés. Els resultats obtinguts per ambdós metalls, Cr i Co, són similars, com es mostra a la taula 5.1. A partir d'aquests resultats es calculen els percentatges de les diferents formes en que es poden trobar els metalls. A la taula 5.2 es mostra el contingut de metalls presents en cadascuna de les fases com un percentatge del contingut total de metalls a la sortida. Al final del procés, els metalls es poden trobar units a la molècula de colorant en el medi (Cr-colorant en fig. 5.3), lliure en el medi (Cr-lliure en fig. 5.3) o en la biomassa, tal com s'ha explicat anteriorment. Els dos metalls presenten percentatges semblants en les diferents fases del procés en discontinu. En el procés continu presenten una lleugera diferència que pot ser deguda a un error analític o a que els metalls presentin diferències a la velocitat d'adsorció, però això no és rellevant en la discussió. La discussió dels resultats es fa únicament per

al Cr perquè aquest presenta una concentració més elevada en el colorant que el Co, encara que els arguments són vàlids igual en ambdós metalls.

**Taula 5.1.** Concentració de crom, cobalt i colorant a cada fase pels experiments corresponents a la fig. 5.1 (procés discontinu) i fig. 5.2 (procés continu).

	Procés discontinu			Procés continu		
	Fase líquida	Fase sòlida		Fase líquida	Fase sòlida	
	(mg/l)	(mg/g pes sec)		(mg/l)	(mg/g pes sec)	
	Inicial	Final	Final	Entrada	Sortida*	Final
Crom	3.0	1.3	0.432	3.0	1.96	1.376
Cobalt	0.98	0.4	0.134	0.98	0.8	0.303
Colorant	150.0	10.7	nd	150.0	12.68	Nd

\* : valor mig

nd : no determinat

Un balanç de Cr entre l'entrada i la sortida mostra una diferència de metall aproximadament d'un 10%. Aquest valor és acceptable degut a la baixa concentració de metall. En ambdós processos, tant en el discontinu com en el continu, entre un 7.5% i un 8% del Cr en el efluent de sortida està unit a la molècula de colorant. En el procés en discontinu, un 37% del metall al final del procés està lliure en el medi, i un 54% en el cas del procés en continu. Aquestes diferències estan relacionades amb la unió del metall a la biomassa. Al procés discontinu un 55% del metall està unit a la biomassa, mentre que al continu únicament un 37% del metall hi està. Aquesta diferència pot ser deguda a que en el procés discontinu, que només dura 5 dies, potser no hi ha temps suficient per a que s'assoleixi l'equilibri de desadsorció del metall.

**Taula 5.2.** Contingut en metalls de cada fase del sistema al final del procés de biodegradació.

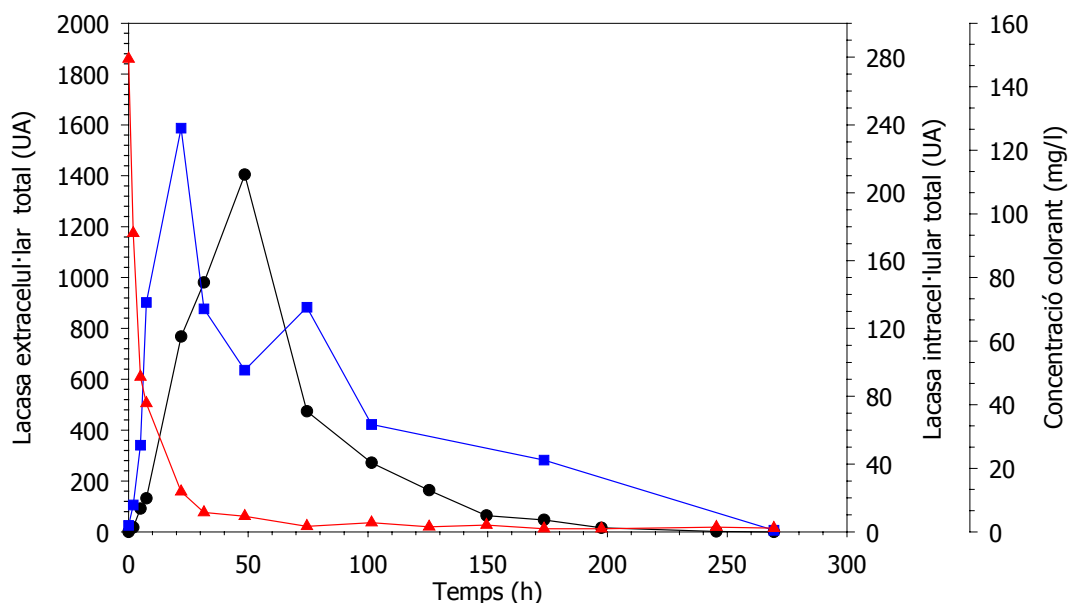
	Procés discontinu		Procés continu		
	Cr	Co	Cr	Co	
Fase sòlida (biomassa) (%)	55.0	55.1	37.2	24.3	
Fase líquida	Lligat al colorant (%)	7.4	7.5	8.1	7.5
	Lliure	37.7	37.2	54.7	68.1

Basant els resultats en el mecanisme proposat, la degradació del colorant pot estar relacionada amb l'activitat enzimàtica intracel·lular, la variació de la qual



pot ser consistent amb el grau de decoloració obtingut. Aquestes hipòtesis es comproven amb un nou experiment en discontinu on s'analitza l'activitat enzimàtica intracel·lular. La figura 5.4 mostra els resultats obtinguts en aquest segon procés en discontinu. Es mostren els perfils d'enzim intracel·lular i extracel·lular. L'activitat enzimàtica intracel·lular es determina per gram de pes sec, i la extracel·lular per mil·lilitre de solució, tot i que en la figura 5.4 les activitats estan expressades en U.A. totals per facilitar la discussió.

El percentatge de decoloració després de 22 h és del 90.6%, i un 23% del Cr es troba lliure en la fase líquida, el que significa que com a mínim un 23% del colorant es degradat pel fong. Segons la isoterma de Langmuir, que regeix l'equilibri d'adsorció del colorant sobre la biomassa (Aretxaga *et al.*, 2001) la concentració d'equilibri, partint d'una concentració inicial de 150 mg/l és de 63.67 mg/l, per tant el percentatge de decoloració si només hi hagués adsorció seria del 57.5%, el que significa que un 33.1% de decoloració no està justificada per l'adsorció, i per tant ha de ser deguda a la degradació biològica.



**Figura 5.4.** Evolució amb el temps de la lacasa total intracel·lular (■), concentració de colorant (▲) i lacasa total extracel·lular (●) per un procés en discontinu.

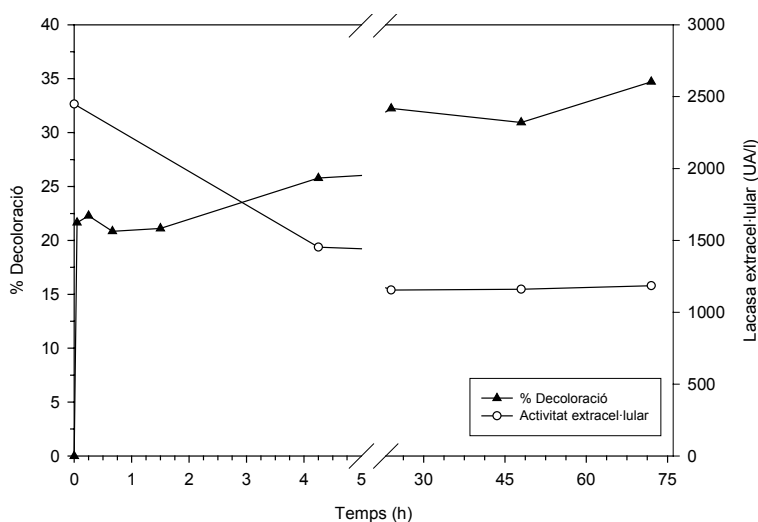
A la figura 5.4 s'observa que l'activitat lacasa intracel·lular presenta un pic dins les primeres 24 hores de tractament, quan la reducció de color assoleix valors

del 90%, en canvi l'activitat lacasa extracel·lular màxima es detecta a les 48 h, quan quasi no hi ha colorant en el medi. Sembla doncs que l'enzim intracel·lular és el responsable de la decoloració un cop el colorant s'adsorbeix sobre la biomassa. L'enzim extracel·lular podria contribuir a la decoloració del colorant no adsorbit, arribant a una decoloració del 98% després de 75 hores de tractament.

Per determinar si l'enzim extracel·lular és el responsable de la decoloració es duen a terme dos experiments *in vitro*, un primer utilitzant el brou de fermentació d'un experiment en discontinu de producció enzimàtica, a partir del qual s'estudia la capacitat de degradació *in vitro* de l'enzim contingut en la fase líquida, i un segon experiment amb l'enzim comercial.

#### ✓ Tractament del colorant amb brou de cultiu

Es realitza un experiment en discontinu sense colorant, i transcorreguts 5 dies, quan l'activitat extracel·lular és de 2500 U.A./l, s'extreu part del medi i es filtra. A aquest extracte filtrat se li afegeixen 0.15 g/l del colorant Gris Lanaset G i es fa un seguiment de la decoloració obtinguda i de l'enzim lacasa, que es mostra a la figura 5.5.



**Figura 5.5.** Decoloració del colorant Gris Lanaset amb extracte enzimàtic produït a partir de *Trametes versicolor*

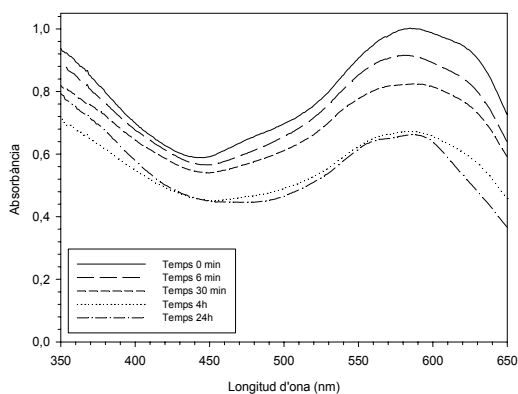
El percentatge de decoloració obtingut durant les primeres 24 hores és del 32%. La decoloració no augmenta de forma significativa tot i que la reacció continua fins a les 72 h, on s'assoleix un percentatge de decoloració del 35%.

L'activitat enzimàtica disminueix durant les primeres hores però després es manté, quedant al final de l'experiment el 48% de l'activitat inicial. Aquest resultat demostra que els metabòlits produïts i excretats al medi pel fong poden degradar parcialment el colorant, i un d'aquests metabòlits és l'enzim lacasa.

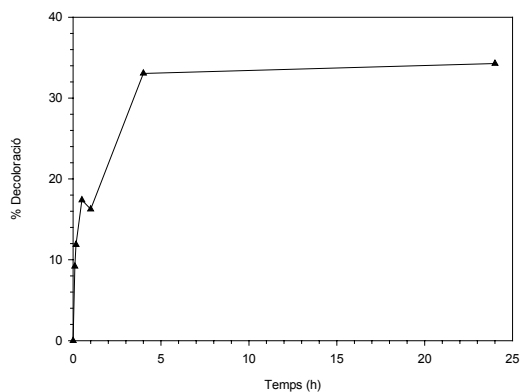
✓ **Degradació del colorant amb enzim comercial**

Amb la finalitat de relacionar la decoloració amb l'enzim lacasa, s'ha dut a terme un experiment amb l'enzim comercial purificat. Partint d'una solució enzimàtica amb una activitat inicial de 3118 U.A./l, s'afegeix colorant per assolir una concentració de 150 mg/l. Els resultats de la degradació de color es mostren a les figures 5.6 i 5.7.

En aquest experiment el percentatge de decoloració obtingut a les 24 h és del 34% quan l'activitat lacasa encara és elevada, 2100 U.A./l.



**Figura 5.6.** Espectres d'absorbància del colorant Gris Lanaset G amb enzim comercial



**Figura 5.7.** Decoloració del colorant Gris Lanaset G amb enzim comercial.

A la figura 5.6 es representa l'evolució dels espectres d'absorbància al llarg del temps. Els perfils demostren que no hi ha una disminució de color proporcional en totes les longituds d'ona, per tant hi ha d'haver degradació d'algun component de la solució. A la taula 5.3 es compara la relació d'absorbàncies obtingudes a les longituds d'ona 590 respecte 440 nm a temps igual a zero i temps igual a 24 hores. Els valors obtinguts demostren que hi ha una degradació de compostos que absorbeixen a 590 nm.

**Taula 5.3.** Relació absorbàncies entre les longituds d'ona 590 i 440 nm.

Relació Abs.	t= 0 h	t=24 h
590/440	1.7	1.44

Es pot veure que en els dos experiments, tant amb el brou produït pel fong (figura 5.5) com amb la lacasa purificada (figura 5.7) s'arriba aproximadament al mateix percentatge de decoloració. Per tant es pot afirmar que el metabolit responsable de la degradació del colorant Gris Lanaset G és la lacasa.

El percentatge de decoloració obtingut amb el fong és del 99%, mentre amb l'enzim és del 34%. Per tant, es pot pensar que *Trametes versicolor* produeix altres metabòlits que li permeten obtenir aquest alt grau de decoloració perquè la reacció no s'atura com sembla passar amb l'enzim. Aquesta aturada de la reacció enzimàtica *in vitro* pot ser deguda a una possible inhibició per productes, i que no es doni en presència del fong degut a que aquests siguin degradats de forma diferent pel microorganisme.

#### 5.4. Conclusions

El colorant Gris Lanaset G és degradat en un bioreactor amb pèl·lets del fong *Trametes versicolor*, operant tant en discontinu com en continu. L'operació en discontinu fins l'exhauriment de la glucosa dura 5 dies i a les 24 h ja arriba a una decoloració del 80% encara que la concentració enzimàtica extracel·lular és molt baixa. L'operació en continu es dona durant més de 40 dies amb una decoloració superior al 90% i sense problemes operacionals.

Observacions visuals de la fase líquida i la fase sòlida mostren que el colorant inicialment tenyeix fortament la biomassa per després gairebé desaparèixer de les dues fases al final del procés. Per tant es dedueix que el microorganisme es capaç de degradar el colorant.

L'anàlisi de Cr i Co que formen part de l'estructura de colorant i els balanços de metall aplicats als experiments realitzats mostren que al final del procés hi ha un elevat percentatge de Cr i Co alliberats, fet que demostra el trencament de la molècula de colorant pel fong.

Tots aquests resultats permeten proposar les etapes del mecanisme de degradació del colorant Gris Lanaset G pel fong *Trametes versicolor*, en els quals s'inclou l'adsorció del colorant en la biomassa, seguit de la transferència d'aquest al

seu interior, a on té lloc la degradació, i finalment els productes de degradació són alliberats al medi.

S'ha comprovat que l'enzim lacasa està involucrat en el procés de degradació del colorant Gris Lanaset G. S'obté el mateix percentatge de degradació tant amb el brou de cultiu com amb l'enzim comercial, i aquest és del 35%.

El percentatge de decoloració obtingut amb el fong és del 99%, molt superior a l'obtingut amb l'enzim comercial o brou enzimàtic. Tenint en compte que l'enzim manté l'activitat es conclou que durant la reacció enzimàtica hi ha inhibició per productes, mentre que el fong degrada el colorant de forma diferent, sense mostrar cap tipus d'inhibició.

## 5.5 Bibliografia

- A**retxaga A, Romero S, Sarrà M, Vicent MT. 2001. Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. *Biotechnol. Prog.* 17:664-668.
- B**umpus JA, Brock BJ. 1988. Biodegradation of Crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1143-1150.
- Bustard M, McMullan G, McHale AP. 1998. Biosorption of textile dyes by biomass derived from *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Bioprocess Engineering* 19: 427-430.
- C**hagas EP, Durrant LR. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microbial Technology* 29: 473-477.
- Crips C, Bumpus JA, Aust SD. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1114-8.
- D**önmez G. 2002. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme. Microb. Technol.* 30: 363-366.
- H**atvani N, Mécs I. 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme. Microb. Technol.* 30: 381-386.
- Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Berbauer M, Szewzyk U. 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (8): 2788-2793.

- J**arosz-Wiilkolazka A, Kochman ´nska-Redst J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 566-572.
- K**apdan IK, Kargi F, McMullan G, Marchant R. 2000. Biological decoloration of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in a packed bed column reactor. *Environ. Technol.* 22: 231-236.
- Kapdan IK, Oztekin R. 2003a. Decolorization of textile dyestuff Reactive Orange 16 in fed-batch reactor under anaerobic condition. *Enzyme Microb. Technol.* 33:231-235.
- Kapdan IK, Tekol M, Sengul F. 2003b. Decolorization of simulated textile wastewater in anaerobic-aerobic sequential treatment system. *Process Biochem.* 38 (7): 1031-1037.
- M**éndez D. 2002. Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.
- Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2002 Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed biorreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. *Wat. Res.* 36: 1896-1901.
- Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 2000. Evaluation of different fungi strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnol. Lett.* 22: 1499-503
- N**igam P, Mc Mullan G, Banat I M, Marchant R. 1996. Decolourisation of effluent from the textile industry by a microbial consortium. *Biotechnol. Lett.* 18 (1): 117-120.
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, Zvauya R, Read J, Steiner W. 2002. Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Wat. Res.* 36: 1449-1465.
- O**'Neill C, López A, Esteves S, Hawkes FR, Hawkes DD, Wilcox S. 2000. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:249-254.
- P**aszczynski A, Pasti-Grigsby MB, Goszczynski S, Crawford RL, Crawford DL. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofucus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(11): 3598-604.

- R**obinson T, Chandran B, Nigam P. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textiles dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 575-579.
- S**ani R K, Banerjee U CH. 1999. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme Microbiol. Technol.* 24: 433-437.
- Sen S, Demirer GN. 2002. Anaerobic treatment of real textile wastewater with a fluidized bed reactor. *Wat. Res.* 37:1868-1878.
- Schliephake K, Lonergan G. (1996) Laccase variation during dye decolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 18 (8) : 881-886.
- Soares G, Pessoa MB, Amorim MT, Oliveira-Campos AM, Hrdina R, Costa Ferreira M. 2002. Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 607-612.
- Spadaro J T, Gold MH, Renganathan V. 1992. Degradation of azodyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (8): 2397-2401.
- Sumathi S, Manju BS. 2001. Fungal mediated decolorization of media containing procion dyes. *Wat. Sci. Technol.* 43(2): 285-290.
- Sun-Young A, Sang-Ki M, In-Ho C, Yong-Lark C, Young-Su C, Cherol-Ho K, Young-Choon L. 2002. Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnol. Lett.* 24:1037-40.
- Swamy J, Ramsay JA. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 130-7.
- T**atarko M, Bumpus JA. 1998. Biodegradation of congo red by *Phanerochaete chrysosporium* *Wat. Res.* 32 (5): 1713-1717.
- W**esenberg D, Buchon F, Agathos SN. 2002. Degradation of dye-containing textile effluent by agaric white-rot fungus *Clitocybula duseinii* . *Biotechnol. Lett.* 24: 989-993.

## **Capítol 6**

### **Determinació del temps de residència cel·lular màxim i d'operació en un procés en continu.**

#### **Resum**

En aquest capítol es determina el temps de residència cel·lular màxim en 40 dies. Temps superiors impliquen problemes operacionals relacionats amb l'estat de la biomassa, com la formació d'agregats, que dificulten la fluïdització. Posteriorment s'implementa la metodologia de renovació de biomassa pel tractament en continu del colorant Gris Lanaset G en un bioreactor fluïditzat per polsos d'aire. La renovació total de la biomassa és parcial, renovant un terç de la biomassa total del bioreactor cada vegada. Es treballa a diferents temps de residència cel·lulars i finalment s'estableix en 21 dies, realitzant les renovacions parcials de biomassa cada set dies. Amb aquest TRC i amb un TRH de 48 hores i 18 hores s'obtenen percentatges de decoloració superiors al 90% i al 80% respectivament. Es realitza la simulació per visualitzar l'evolució de l'edat de la biomassa present en el bioreactor per diferents temps de residència cel·lulars.



## 6.1. Introducció

El temps de residència cel·lular és un dels paràmetre més importants a tenir en compte quan es planteja un procés biològic de tractament d'un efluent en continu durant llargs períodes. En els treballs que es troben a la bibliografia de tractament en continu d'un colorant amb columnes empacades o biopel·lícules -la majoria d'ells referenciats en el capítol quatre, com per exemple els realitzats per Yang i Yu (1996b) per la decoloració del colorant dispers Red 533 en un reactor de biopel·lícula, on obtenen decoloracions superiors al 80%, o el realitzat per Zhang *et al.* (1999) de decoloració contínua del colorant azo Orange II en un bioreactor de llit empaquet amb una decoloració del 95%- el problema que es planteja amb aquest tipus d'operació és la curta vida mitja del fong degut a la limitació de nutrients i oxigen necessaris. En el reactor empaquet per exemple, el creixement excessiu del fong impedeix el moviment dels fluids en el bioreactor, per tant disminueix l'eficàcia en la transferència de matèria. La solució que es planteja en aquests sistemes és realitzar una purga de biomassa quan es detecten problemes operacionals degut al creixement excessiu del fong.

Mielgo *et al.* (2001 i 2002) amb un bioreactor empaquet amb *Phanerochaete chrysosporium* immobilitzat sobre espuma de poliuretà treballen en continu amb pulsacions de la fase gas per la decoloració dels colorants Orange II i Poly R-478 respectivament. Aconsegueixen percentatges d'eliminació del colorant Orange II entre el 85 i 99% i en condicions òptimes un 80% d'eliminació de Poly R-478 durant llargs períodes d'operació, uns 90 dies.

Borchert i Libra (2001) aconsegueixen operar durant 200 dies realitzant processos discontinus repetits amb un reactor de tanc agitat sense reinocular el bioreactor, eliminen part dels pèl·lets a l'etapa de buidat i abans de començar la següent etapa de decoloració fragmenten els que han quedat en el reactor per a què serveixin de llavors per la nova formació de pèl·lets.

És important assenyalar que tant Zhang *et al.* (1999) com Yang i Yu (1996b) i Mielgo *et al.* (2002) aturen els seus experiments quan els cultius en els bioreactors encara presenten percentatges de decoloració elevats i hi ha activitat enzimàtica, per tant la màxima durada del procés de decoloració no es determina.

A la taula 6.1 es resumeixen els treballs trobats a la bibliografia referents al tractament en continu o en discontinus repetits de colorants amb fongs ligninolítics.

S'ha demostrat en el capítol anterior que s'obtenen millors percentatges de decoloració amb el fong que amb l'extracte enzimàtic produït pel fong, per tant cal

desenvolupar un procés en continu del tractament del colorant operant durant períodes llargs de temps amb el reactor amb fongs.

Per això, l'objectiu del treball que es presenta en aquest capítol és establir el temps màxim que el fong pot romandre actiu en el bioreactor, i posteriorment, per perllongar aquest temps, realitzar la purga i renovació de biomassa mantenint percentatges de decoloració satisfactoris.

**Taula 6.1.** Resum dels resultats publicats per flux continu (FC) o discontinus repetits (DR) en el tractament de colorants amb fongs ligninolítics.

Autors	Configuració	Volum útil (l) Tipus de cultiu	Temps de retenció/cicle (d)	Substrat auxiliar (g/l)	Fong	Colorant	Tipus de colorant	Concentració de colorant (mg/l)	Decoloració (%)	Velocitat de decoloració mitjana (mg/l·h)	Durada de l'operació o reutilització del miceli
Mielgo <i>et al.</i> 2002	FC-llit empacat polsant	0.167 cultiu pur	1	glucosa 6	<i>P. chrysosporium</i>	Poly R-478	poly-antraquinona	100	50-80	7.9	90d
Mielgo <i>et al.</i> 2001	FC-llit empacat polsant	0.167/2 cultiu pur	1-2	glucosa 6	<i>P. chrysosporium</i>	Orange II	monoazo	100	85-99	7- 4	30d
Borchert i Libra 2001	DR-RTA	4 cultiu pur	5-10	glucosa 5-10	<i>T. versicolor</i>	RB5	diazo	100-500	97-99.5	0.5-1	18 cicles/200d
			5-14			RR198	monoazo		91-99	3-7	
		4 no estèril	6-14			RBBR	antraquinona	100	72-98	0.5-3	5 cicles/55d
	DR-cultius agitats	Erlenmeyers 250 ml medi cultiu pur	8-14	glucosa 5		RB5	diazo	100-500	97-99	0.4-0.6	14 cicles/200d
		8-12				92-99.5	2-3				
Romero 2000	FC- fluiditzat	0.5 cultiu pur		glucosa	<i>T. versicolor</i>	Girs Lanaset G	organometàl·lic	150			
Zhang <i>et al.</i> 1999	FC-empacat	1 cultiu pur	3.5	glucosa 5	Basidiomicet no identificat	Orange II	monoazo	1000	95	7.2	60d
	DR-fluiditzat	1 cultiu pur	2	extracte de manta 0.4				1000-2000	>95	30-40	9 cicles/30d
	DR-fluiditzat	1 cultiu pur	1					1000	97	40-50	27 cicles/60d
	FC-fluiditzat	1 cultiu pur	1					1000	95-97	13.2	17d

Autors	Configuració	Volum útil (l) Tipus de cultiu	Temps de retenció/cicle (d)	Substrat auxiliar (g/l)	Fong	Colorant	Tipus de colorant	Concentració de colorant (mg/l)	Decoloració (%)	Velocitat de decoloració mitjana (mg/l·h)	Durada de l'operació o reutilització del miceli
Palma <i>et al.</i> 1999	FC-llit empaquetat polsant	0.167 cultiu pur	0.5, 1, 1.5	glucosa 0.24	<i>P. chrysosporium</i>	Poly R-478	poly-antraquinona	100	27-73	1-3	120d
Leidig <i>et al.</i> 1999	FC-RTA, Fong encapsulat	1 no estèril	1	glucosa 10	<i>T. versicolor</i>	Poly R-478	poly-antraquinona	200	80±9	6.6	42d
Yang i Yu 1996a	DR- cultiu agitat (immobilitzat)	Erlenmeyers 250 ml medi cultiu pur	6	glucosa 10	<i>P. chrysosporium</i>	Red 553	dispers, diazo	250	90-95	4.7-5	16 cicles/12d
								500	30-95	3-10	
								1000	10-80	2-16	
Yang i Yu 1996b	FC-biopel·lícula	10 no estèril 10 cultiu pur	2	glucosa 10	<i>P. chrysosporium</i>	Red 553	dispers, diazo	200	87-99	3.6	11d
			2-5					100	87-96	0.8-1.8	17d
			2					50-250	88	4.6	12d

## **6.2. Materials i mètodes**

### **6.2.1. Equipament i condicions d'operació**

S'utilitza el bioreactor fluïditzat per polsos d'aire de 1.5 l de volum útil descrit a l'apartat 3.4. del capítol de materials i mètodes. El bioreactor s'omple de medi de tractament en discontinu que conté el colorant, s'esterilitza a 121°C durant 30 min i s'inocula amb una quantitat de pèl·lets de 64 g de biomassa humida/l, equivalent a 3.2 g/l de pes sec. Un cop s'assoleix una concentració de glucosa en el medi aproximadament de 2 g/l s'inicia el procés en continu de tractament del colorant alimentant la glucosa a una concentració equivalent a la velocitat específica de consum,  $0.31 \pm 0.03$  g glucosa/d·g de pes sec, com s'ha determinat en el capítol quatre. El temps de residència hidràulic varia en funció de l'experiment realitzat i s'especifica en cada cas. La biomassa, en forma de pèl·lets queda retinguda en el bioreactor, sense pèrdues en el corrent de sortida.

### **6.2.2. Metodologia de renovació de biomassa.**

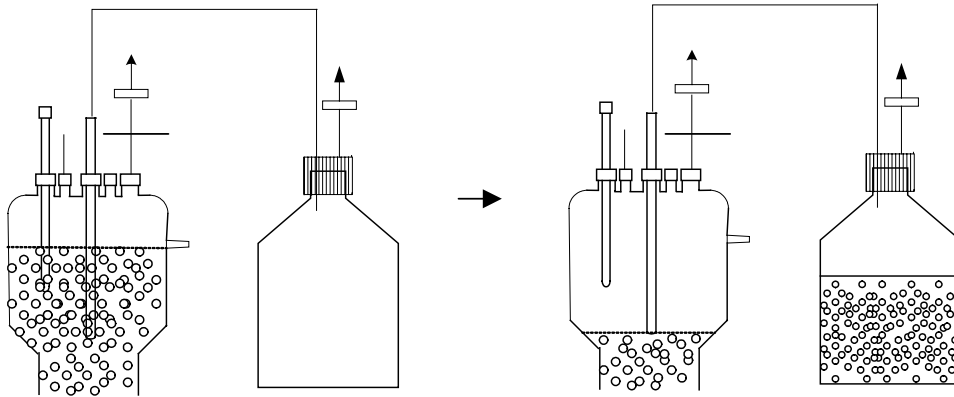
La renovació de biomassa per a cada temps de residència cel·lular es realitza en tres passos, de manera que, per exemple, per al TRC de 15 dies, es renova 1/3 de la biomassa del reactor cada 5 dies. En cada renovació s'introdueix la mateixa quantitat de biomassa fresca que se n'extreu de vella, d'aquesta manera s'evita la renovació total de biomassa del bioreactor, que seria com si es realitzessin càrreges successives de biomassa. La renovació total de la biomassa implicaria disposar d'un reactor molt gran de producció de pèl·lets i que estaria infrautilitzat. A escala laboratori seria factible, però no a escala industrial. Aquesta etapa del procés és molt important ja que des del punt de vista d'evitar la contaminació és un punt crític.

La metodologia seguida per realitzar la renovació de biomassa consta de diferents passos que s'especifiquen a continuació:

#### **1) Buidat d'1/3 del contingut del reactor (figura 6.1)**

Es connecta un tub de vidre situat en una de les boques del bioreactor a una ampolla mitjançant un tub de silicona. El tub de vidre està submergit en el bioreactor fins a una alçada que pugui buidar només 1/3 del contingut, per evitar que es buidi excessivament el bioreactor. El buidat es realitza per pressió, és a dir es tanquen totes les sortides del bioreactor i s'augmenta el cabal d'aire, d'aquesta manera per desplaçament del contingut del reactor

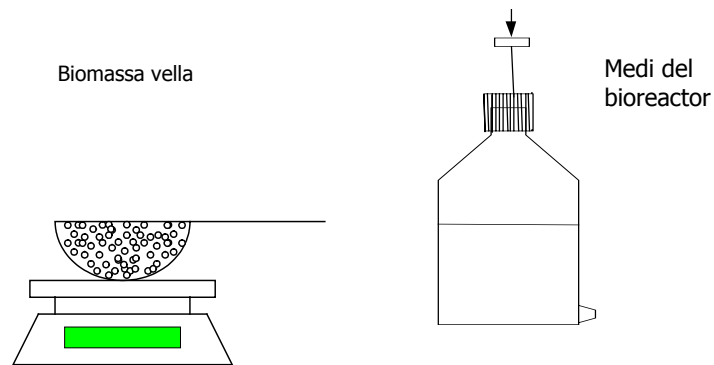
s'aconsegueix un buidat ràpid. Tot aquest procés es realitza en condicions d'esterilitat.



**Figura 6.1.** Buidat d' 1/3 del contingut del bioreactor per pressió.

## 2) Separació sòlid/líquid

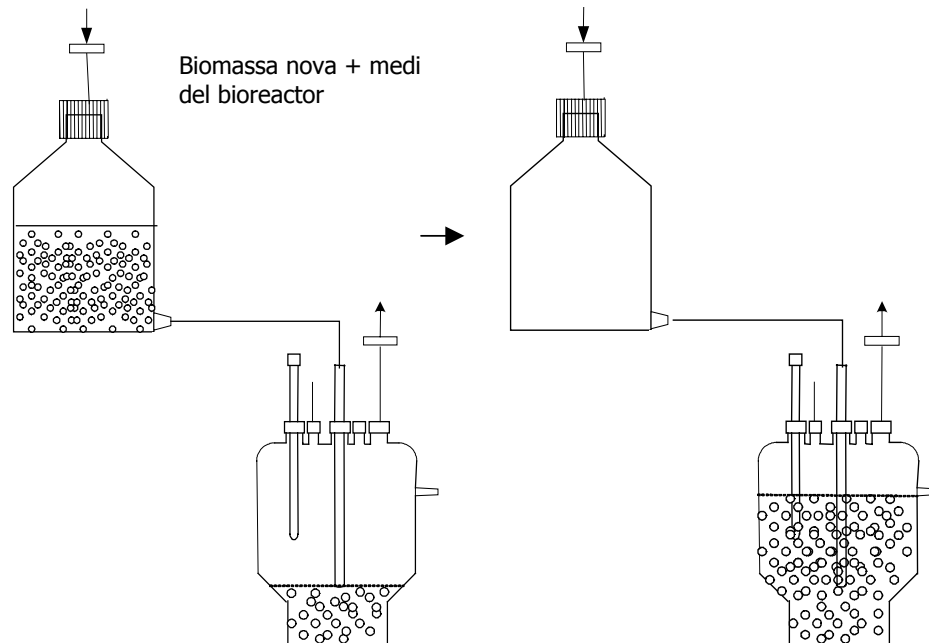
Aquesta operació es realitza en condicions estèrils a la cambra de flux laminar. S'utilitza un colador metàl·lic per separar les dues fases i es pesa la quantitat de biomassa purgada. Es pesa la mateixa quantitat de pèl·lets frescos i es resuspenen en el mateix brou. La suspensió s'introdueix en una ampolla que té una oliva a la part inferior de 7mm de diàmetre interior (figura 6.2).



**Figura 6.2.** Separació sòlid/líquid.

### 3) Reinoculació

Aquesta ampolla amb la oliva en la part inferior permet introduir en el reactor, per la mateixa boca que s'ha fet la purga, el brou amb la biomassa fresca per desplaçament de líquid, mitjançant la introducció d'aire estèril a l'ampolla (figura 6.3).



**Figura 6.3.** Reinoculació.

La biomassa fresca s'obté de la solució stock de pèl·lets que es formen segons la metodologia descrita a l'apartat 3.5.2. del capítol de materials i mètodes generals.

### 6.2.3. Mètodes analítics

La determinació del contingut en glucosa, del color i de l'activitat lacasa estan descrits a l'apartat 3.6 del capítol de materials i mètodes generals.

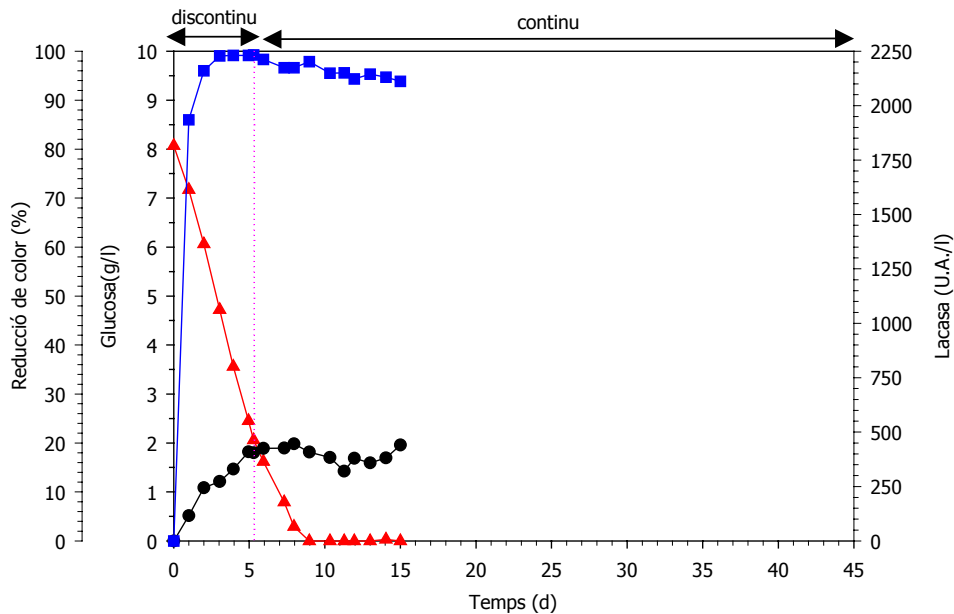
## 6.3. Resultats i discussió

### 6.3.1. Establiment del temps de residència cel·lular màxim

Amb l'objectiu d'establir el temps de residència cel·lular màxim del sistema experimental es realitzen experiments amb el bioreactor de 1.5 l de volum útil i s'opera a un temps de residència hidràulic de 120 hores. S'utilitza aquest elevat TRH

perquè s'ha demostrat en els capítols anteriors que la decoloració amb aquest temps de residència és superior al 90%, per tant si es vol avaluar l'efecte del TRC s'assegura que el percentatge de decoloració no es veurà afectat pel TRH.

Es vol determinar el temps que el sistema es capaç de funcionar correctament sense renovar la biomassa. Amb aquest objectiu es realitza un primer experiment (A), on s'aconsegueix mantenir la biomassa funcionant correctament durant 15 dies. Els resultats d'aquest experiment es reflecteixen a la figura 6.4.

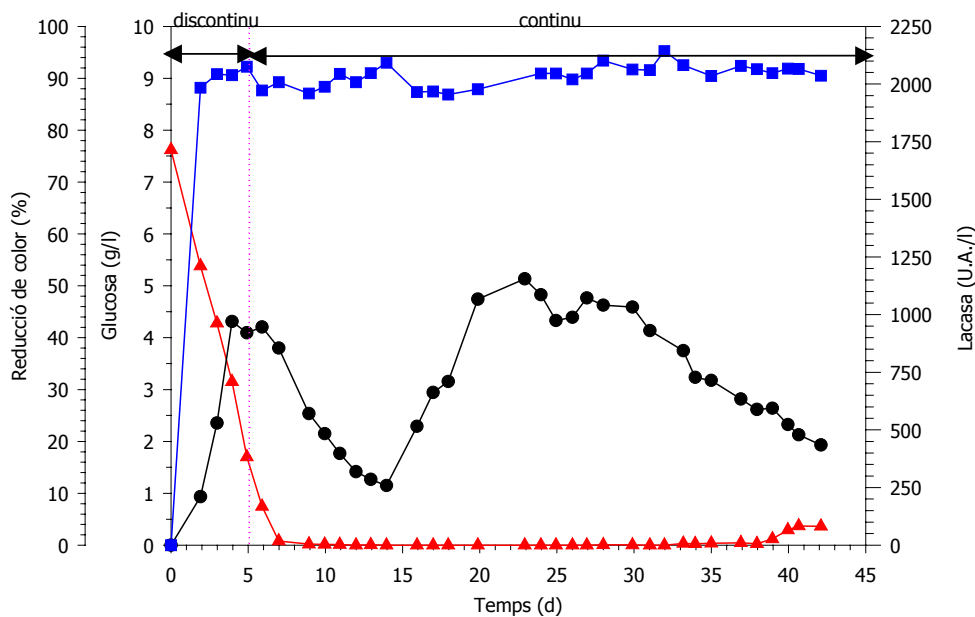


**Figura 6.4.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment A.

L'experiment s'atura degut a problemes operacionals de taponament de l'entrada i sortida de medi del sistema, degut a una acumulació de pèl·lets. Es pot observar, però a la figura 6.4 que s'obtenen bons resultats, amb un percentatge mitjà de decoloració del 93%. L'activitat enzimàtica es manté al voltant de les 400 U.A./l des de que s'inicia el procés en continu fins que s'atura l'experiment. En quant a la concentració de glucosa a la sortida del sistema es manté a zero. Els problemes operacionals es solucionen posant una petita malla de plàstic esterilitzable a l'entrada i a la sortida de medi del bioreactor, que permet el pas del fluid però no de la biomassa. Amb aquesta millora es fa un segon experiment (B) amb les mateixes condicions que s'ha realitzat l'experiment A on s'aconsegueix



mantenir el sistema funcionant correctament durant 43 dies. Els resultats de l'experiment B es mostren a la figura 6.5.



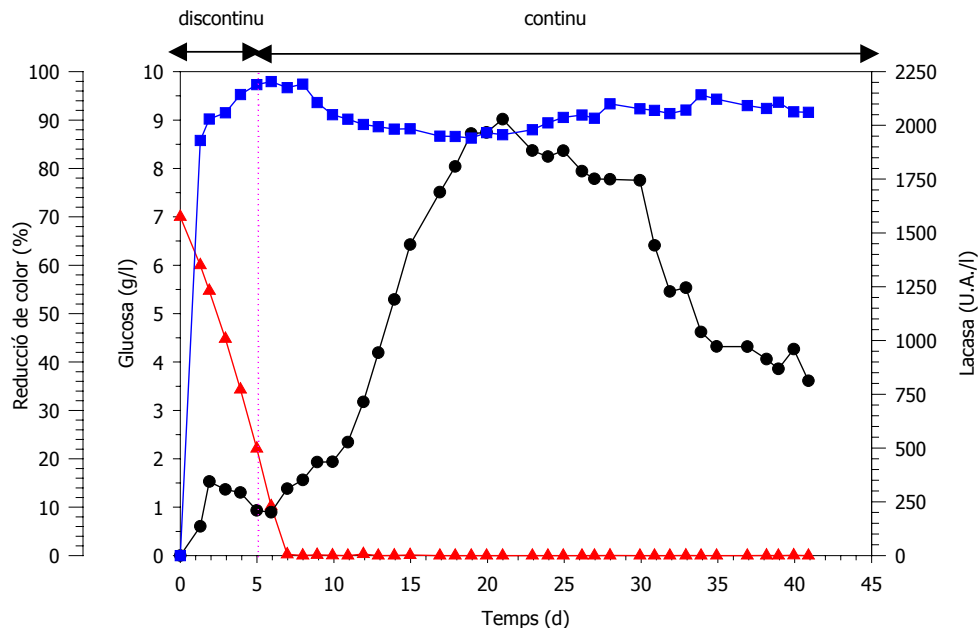
**Figura 6.5.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment B.

S'observa que la decoloració obtinguda al llarg del procés està al voltant del 90%, per tant la biomassa manté l'activitat fins al final del procés. L'activitat enzimàtica presenta dos pics, un al inici del procés en continu amb una activitat de 1000 U.A./l, i un altre transcorreguts 23 dies des del inici del procés, amb una activitat de 1160 U.A./l. A partir d'aquest moment l'activitat enzimàtica decau fins al final del procés, però es manté en valors d'activitat per sobre de les 400 U.A./l. Aquesta variació en el nivell d'activitat no comporta cap disminució en el percentatge de decoloració obtingut. Quan els nivells d'activitat estan per sobre de 1000 unitats la decoloració és la mateixa que quan estan a nivells de 400 unitats. Aquest fet s'ha observat en capítols anteriors i en aquests experiments es ratifica el mateix comportament.

En quant a la concentració de glucosa es veu que es manté a nivells nuls a la sortida del bioreactor fins el dia 39 que comença a augmentar la concentració a la sortida. Això pot ser degut a que s'estigui produint lisi cel·lular, i disminueixi el consum de glucosa. Visualment s'aprecia com els darrers dies de tractament els

pèl·lets no són tan compactes com a l'inici del tractament i es comencen a veure fragments de pèl·lets i un increment de petits agregats d'hifes en el bioreactor. Aquest fet fa que es decideixi aturar el procés, tot i que els percentatges de decoloració són bons.

Es realitza un tercer experiment per comprovar els resultats obtinguts anteriorment, i com es pot observar a la figura 6.6 s'aconsegueix que el sistema funcioni correctament també durant 42 dies.



**Figura 6.6.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment C.

La decoloració obtinguda durant quasi tot el procés és superior al 90%, excepte entre els dies 12 i 24 que és lleugerament inferior. L'activitat enzimàtica presenta un pic de 2028 U.A./l transcorreguts 21 dies de tractament i es manté a nivells elevats durant 10 dies. A partir d'aquest moment decau fins a 800 U.A./l quan s'atura l'experiment. En quant al consum de glucosa s'observa que no hi ha acumulació, tota la glucosa que entra al sistema és consumida, sembla que el sistema funciona correctament perquè tenim percentatges de decoloració elevats, activitat enzimàtica també elevada, i no es produeix acumulació de glucosa. La raó per la que s'atura l'experiment és que s'observa que s'estan produint aglomeracions de pèl·lets en la part superior del reactor, al igual que en l'experiment anterior, probablement degut al creixement de petits agregats d'hifes que fan que els pèl·lets

s'enganxin els uns als altres i no es puguin moure individualment, dificultant l'homogeneïtzació del sistema.

A partir dels resultats obtinguts en els experiments B i C s'estableix el temps de residència cel·lular màxim en 40 dies. Durant aquest temps el procés funciona correctament sense problemes operacionals i amb la biomassa activa.

### **6.3.2. Establiment del temps de residència cel·lular d'operació.**

Analitzant els trets en comú del comportament del procés de decoloració s'observa que:

- El percentatge de decoloració és sempre molt elevat degut a que es requereix un nivell enzimàtic relativament baix per assolir elevats percentatges de decoloració.
- La producció enzimàtica augmenta durant els primers dies del procés fins assolir un pic, moment a partir del qual disminueix la producció enzimàtica de forma irreversible.
- No s'ha pogut establir els paràmetres operacionals que alenteixen o acceleren aquest comportament.

D'altra banda, aquest comportament de l'activitat lacasa s'ha observat en altres treballs publicats ( Borchert i Libra 2001; Rodríguez Couto *et al.*, 2004).

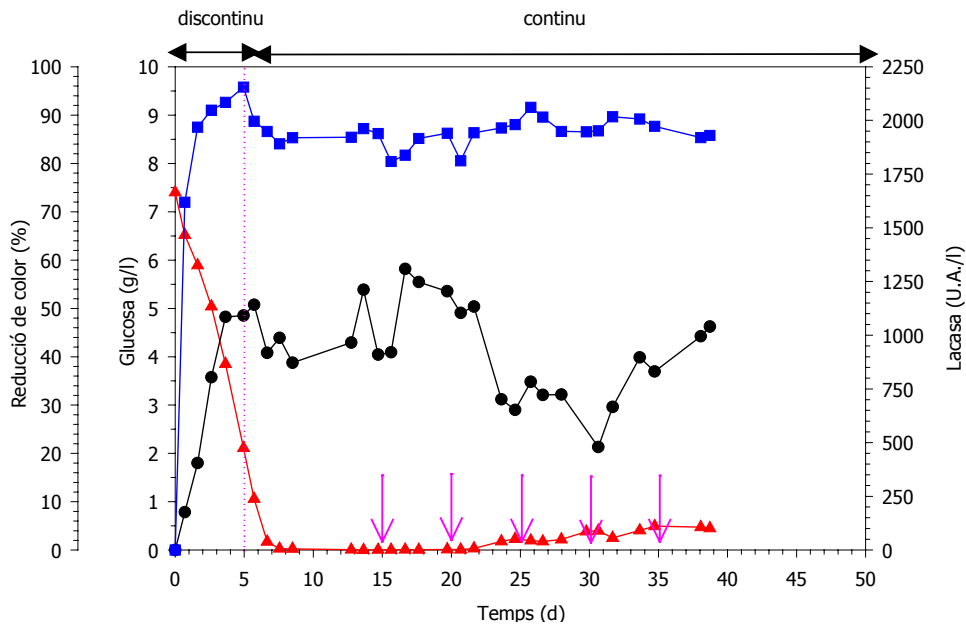
Aquestes observacions, juntament amb la pèrdua d'integritat observada en els pèl·lets a partir d'aproximadament 40 dies, obliguen a plantejar una estratègia de renovació de biomassa amb l'objectiu d'estabilitzar l'activitat enzimàtica i evitar problemes operacionals. La renovació ha de permetre operar en continu durant llargs períodes, sense haver de parar el sistema cada 40 dies.

Pensant en el procés a escala industrial, si es realitzessin càrregues successives seria necessari un reactor per l'obtenció de pèl·lets més gran, i el procés de buidat del contingut del reactor, separació de la biomassa i reinoculació seria més complicat a nivell pràctic que realitzant renovacions parcials. Per tant es decideix realitzar renovacions parcials de biomassa, de manera que transcorregut un TRC s'hagi renovat tota la biomassa del bioreactor.

Es realitza un experiment (D) a un temps de residència hidràulic de 48 hores i un temps de residència cel·lular de 15 dies, cada 5 dies es renova 1/3 de la biomassa. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la figura 6.7.

S'escull aquest temps de residència cel·lular perquè cinc dies és el temps necessari per la producció de pèl·lets a partir de la solució stock de micel·li, per tant

no és convenient disminuir aquest temps de residència cel·lular de 15 dies si les renovacions són d'un terç de la biomassa.

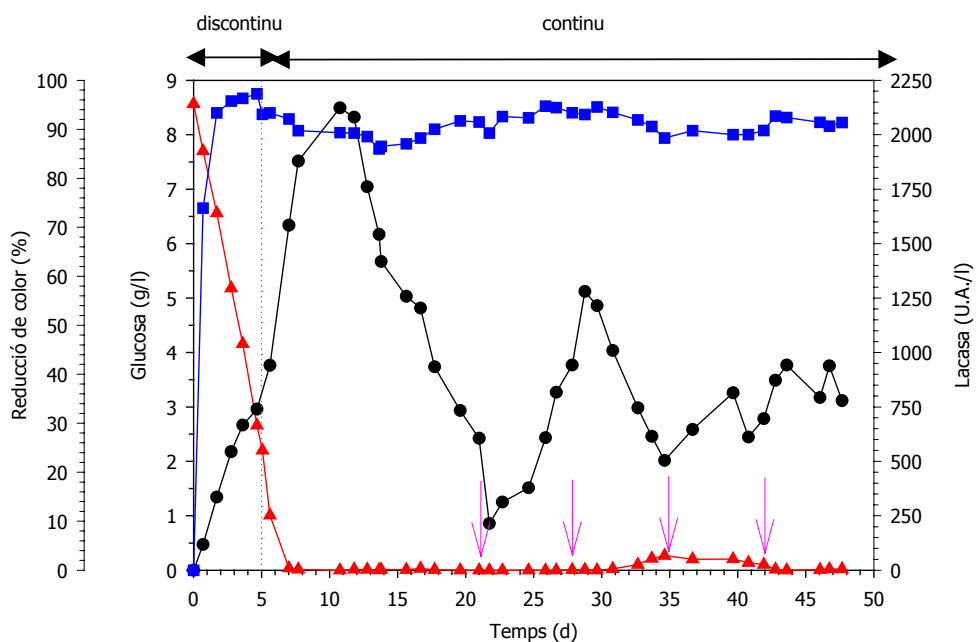


**Figura 6.7.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment D.

En aquest experiment es realitzen cinc renovacions parcials de biomassa, que correspon a 1.6 renovacions totals. S'inicien les renovacions transcorregut un temps de residència cel·lular, les fletxes de la gràfica indiquen els moments en que es realitza cada renovació, cada 5 dies en aquest cas. S'aconsegueix realitzar repetidament el procés de renovació sense que es contamina el sistema i mantenint percentatges de decoloració molt satisfactoris, per sobre del 85% durant el procés en continu. En el perfil de decoloració s'observen petits increments que coincideixen amb els moments en que es realitzen les renovacions. Aquests increments puntuals en la decoloració són deguts a l'adsorció inicial del colorant sobre la biomassa fresca que s'introdueix en el sistema, però la decoloració s'estabilitza quan es torna a assolir l'equilibri de concentració de colorant entre la fase sòlida i la fase líquida. També es produeixen increments en la producció enzimàtica quan s'introdueix biomassa fresca en el sistema, tot i que en la segona i tercera renovació aquest increment ha estat molt petit. Amb les renovacions de biomassa s'aconsegueix

trencar la tendència a la disminució de l'activitat enzimàtica que s'observa després del pic estabilitzant-se en valors superiors a 750 U.A./l.

Els bons resultats obtinguts en l'experiment D fan que es plantegi augmentar el temps de residència cel·lular a 21 dies, amb la idea de fer més sistemàtic el canvi de biomassa un cop per setmana. Un dels objectius és obtenir decoloracions satisfactòries amb el mínim de renovacions de biomassa, ja que d'aquesta manera es redueixen tant els costos com l'esforç humà. Es realitza l'experiment E amb un TRC de 21 dies, mantenint el TRH en 48 hores. Els resultats obtinguts en aquest experiment es mostren a la figura 6.8.

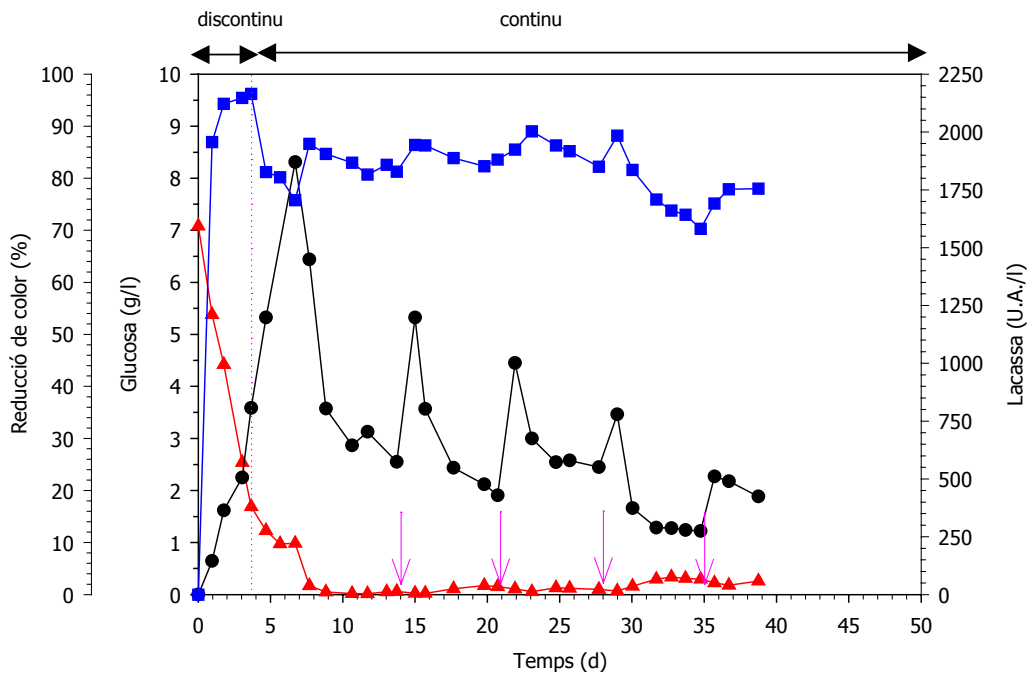


**Figura 6.8.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment E (TRC 21 d).

En aquest experiment s'obté un percentatge de decoloració mitjà del 91% durant el procés en continu. Es realitzen quatre renovacions parcials de biomassa que s'inicien transcorregut un temps de residència cel·lular. El procés, com en l'experiment anterior, funciona correctament. Realitzats quatre canvis de biomassa el percentatge de decoloració és superior al 90% i s'aconsegueix que l'activitat no decaigui dràsticament, mantenint-se a nivells per sobre de 750 U.A./l. La figura 6.8 mostra com entre la tercera i la quarta renovació de biomassa hi ha una petita acumulació de glucosa en el sistema que desapareix quan es realitza la quarta

renovació. Podem afirmar que operant amb un temps de residència hidràulic de 48 hores i un temps de residència cel·lular de 21 dies, s'obtenen rendiments de decoloració superiors al 90%, no es presenten problemes operacionals relacionats amb l'estat de la biomassa i l'activitat enzimàtica s'estabilitza a nivells superiors a 750 U.A./l.

A partir dels bons resultats obtinguts amb un TRC de 21 dies i un TRH de 48 hores es realitza un altre experiment (F) on es manté el TRC a 21 dies i es disminueix el TRH a 18 hores. En experiments realitzats anteriorment sense renovacions de biomassa (capítol 4) s'han obtingut percentatges de decoloració del 80% amb temps de residència hidràulics de 18 hores, es vol comprovar amb aquest experiment si amb les renovacions de biomassa es manté el percentatge de decoloració a aquests nivells. Els resultats obtinguts en l'experiment F es mostren a la figura 6.9.



**Figura 6.9.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en l'experiment F (TRC 15 d).

Com es pot observar, es realitza la primera renovació de biomassa el dia 14 en comptes del dia 21, tal com s'havia fet en els experiments anteriors, en que la primera renovació es realitza transcorregut un TRC. Es realitzen quatre renovacions de biomassa. Fins la tercera, realitzada el dia 28 s'obtenen percentatges de

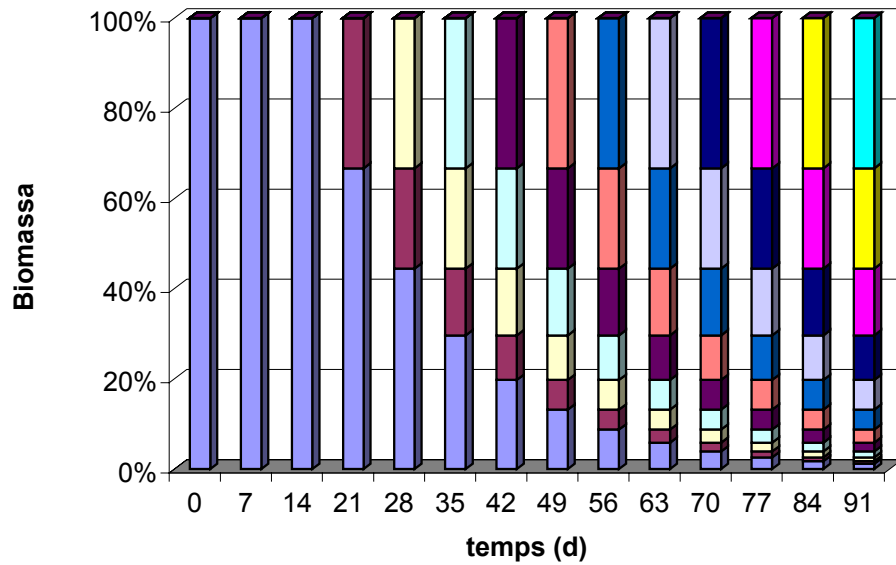
decoloració superiors al 80%, inclús en alguns punts superiors al 85%. A partir del dia 30 la decoloració disminueix i es situa en valors de fins el 70%. Aquest fet coincideix amb una averia de la xarxa general d'aire que impedeix el subministrament d'aire al bioreactor, no hi ha aport d'oxigen i a més el sistema no fluiditza, el que fa que els pèl·lets sedimentin en la part inferior del bioreactor. S'observa que s'està acumulant la glucosa en el sistema, el que indica que el fong no l'està consumint, degut segurament a la manca d'oxigen en el medi. La disminució de l'activitat lacasa és molt acusada, arribant fins a valors de 275 U.A./l. Un cop solucionat el problema d'aport d'oxigen i de fluidització i amb el quart canvi de biomassa el sistema es recupera bastant i s'obtenen decoloracions del 78%.

Els resultats obtinguts amb un TRC de 15 dies i amb un TRC de 21 dies es demostra que és possible mantenir l'activitat enzimàtica mitjançant la renovació de la biomassa. El nivell serà més elevat com menor sigui el TRC. Tot i això, donada la metodologia escollida de renovació parcial de la biomassa, cal considerar aspectes pràctics com la sistematització periòdica de l'operació de renovació.

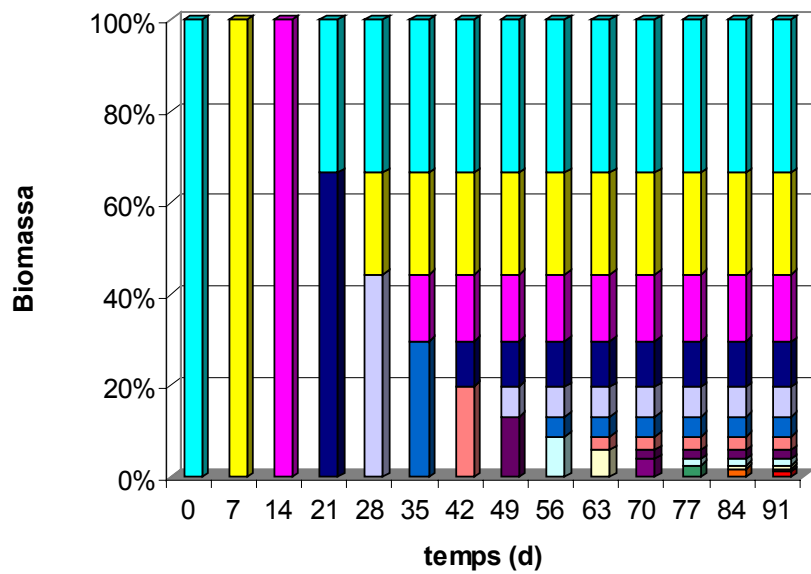
A continuació es realitza un estudi teòric sobre l'edat de la biomassa present dins del bioreactor al llarg del període d'operació. S'analitza la conseqüència de l'estratègia escollida i l'efecte que produiria sobre la biomassa l'augment del TRC.

A la figura 6.10 es visualitza el percentatge de biomassa per edats que hi ha dins del bioreactor. Es mostra com de la biomassa inicial que s'inocula al bioreactor (en color blau), el dia 21 de tractament es renova un terç, per tant el dia 21 en el bioreactor hi ha un 66.6% de la biomassa inicial inoculada i un 33.3% de biomassa nova (en color grana). El dia 28 es torna a renovar un terç de la biomassa del bioreactor, per tant eliminem un terç de la biomassa inicial, quedant un 44.4% en el bioreactor (en color blau), i també eliminem un terç de la biomassa inoculada el dia 21, representant en aquest moment un 22.2% de la biomassa total del bioreactor (en color grana) i la biomassa nova representa un 33.3% de la biomassa total (en color groc pàl·lid). Si es realitza aquesta operació de renovació successivament cada setmana, es pot observar com cada vegada tenim una població cel·lular més jove en el bioreactor, ja que les fraccions de biomassa més vella cada vegada són més petites. Per exemple en la última columna del gràfic, que correspon a 11 renovacions de biomassa, la biomassa inicial inoculada només representa un 1.15% de la biomassa en el bioreactor, la inoculada en la primera renovació un 0.58%, la de la segona un 0.86%, la de la tercera un 1.30%, la de la quarta un 1.95%, la de la cinquena un 2.93% i la de la sisena un 4.38%. Per tant el percentatge de

biomassa amb una edat de més de cinc setmanes és només del 13.15%. A la figura 6.11 es presenta el percentatge de biomassa per edats amb el temps d'operació.



**Figura 6.10.** Fraccions de biomassa per edats teòriques front al temps d'operació. TRC 21d, renovant 1/3 de la biomassa cada 7 dies.

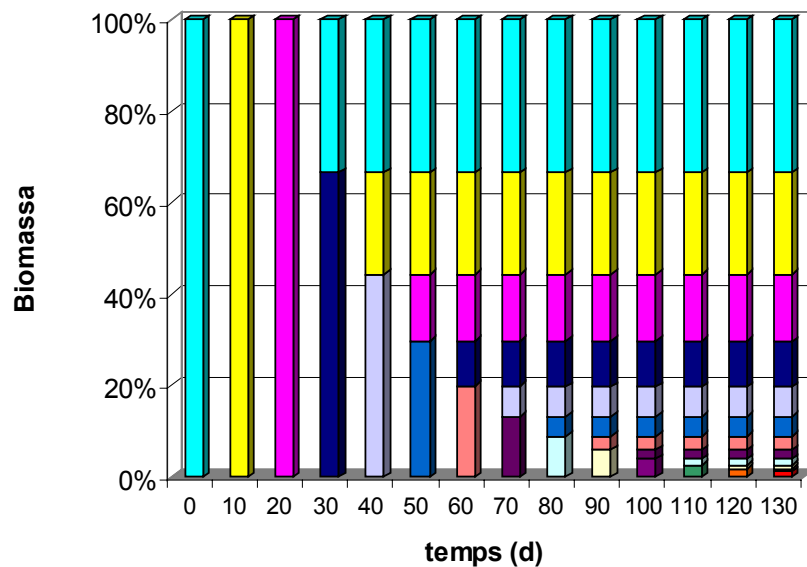


**Figura 6.11.** Edat de la biomassa teòriques front al temps d'operació. TRC 21 d, renovant 1/3 de la biomassa cada 7 dies.



El color ■ indica edat zero de la biomassa, és a dir el dia 0 tota la biomassa es fresca. El color ■ indica una edat de una setmana, el color ■ dues setmanes d'edat i el color ■ tres setmanes. Com es veu al gràfic, quan la renovació de la biomassa es fa cada setmana, a partir del dia 21, que és el temps de residència cel·lular, comencem a tenir biomassa amb edat zero de nou al bioreactor. El dia 21 hi ha un 66% de la biomassa amb una edat de 3 setmanes, en blau fosc, i un 33% de la biomassa fresca, en blau cel. S'observa en aquest gràfic que el dia 42, un cop feta la quarta renovació de biomassa, més del 80% de la població té una edat inferior o igual a tres setmanes. Per tant amb aquesta metodologia de renovació de la biomassa s'aconsegueix mantenir una població relativament jove en el bioreactor, i per tant es pot garantir l'activitat microbiana.

S'ha fet una simulació de què passaria si s'augmenta el temps de residència cel·lular a trenta dies. El resultat es presenta a la figura 6.12.

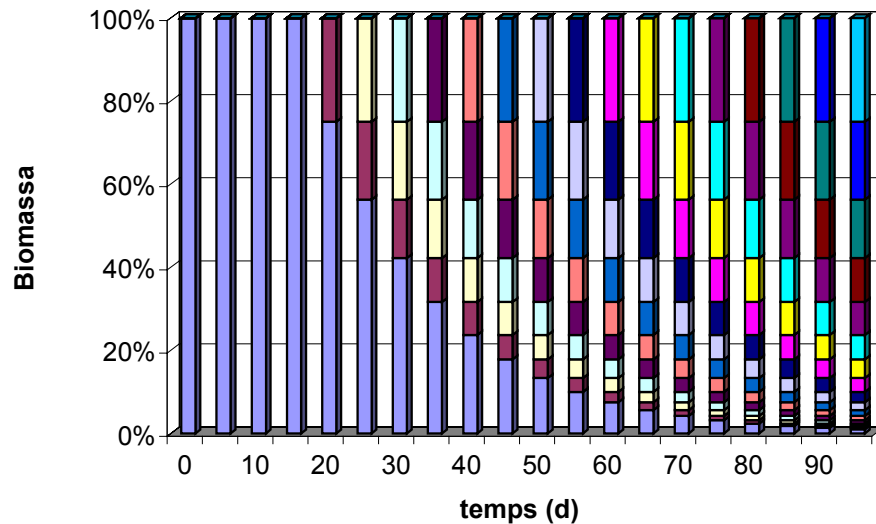


**Figura 6.12.** Edat de la biomassa teòriques front al temps d'operació amb un TRC de 30 dies, renovant 1/3 de la biomassa cada 10 dies.

En aquest cas el color ■ continua indicant edat zero de la biomassa, el color ■ indica una edat de 10 dies, el color ■ vint dies d'edat i el color ■ trenta dies. S'observa com en aquest cas fins transcorreguts 50 dies no tindríem majoria de biomassa amb una edat inferior a trenta dies. A partir del dia 60 més del 80% de la població tindria una edat inferior o igual a 30 dies, però fins arribar a aquest punt,

la fracció de biomassa amb una edat superior a 40 dies és significativa (>20%), i per tant podria tenir repercussions sobre la producció enzimàtica i estabilitat del procés.

A continuació es presenta una gràfica (figura 6.13) on es simulen les fraccions de biomassa teòriques front al temps que tindriem operant amb un temps de residència cel·lular 20 dies renovant un quart de la biomassa cada cinc dies, de manera que transcorregut un TRC s'haurà renovat tota la biomassa del sistema.

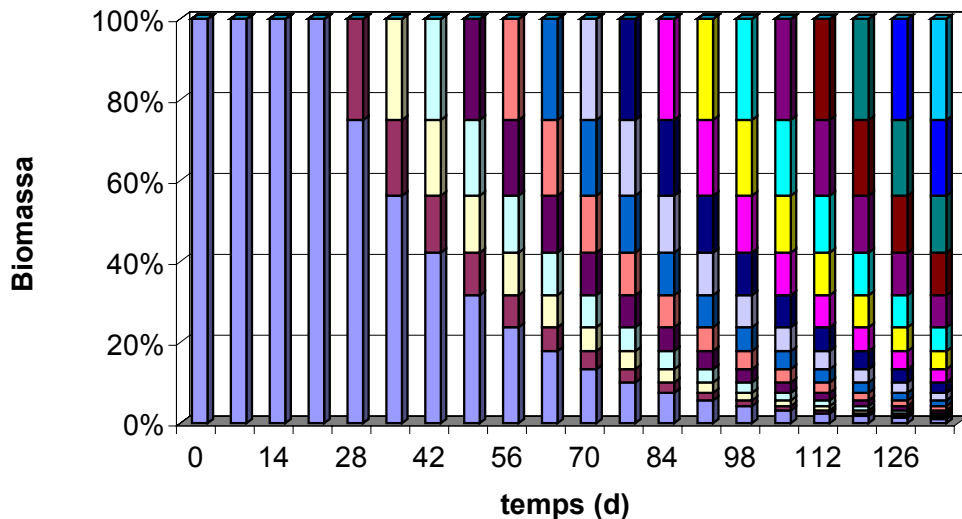


**Figura 6.13.** Fraccions de biomassa teòriques front al temps d'operació amb un TRC de 20 dies renovant  $\frac{1}{4}$  de biomassa cada 5 dies.

Si es compara amb la figura 6.10, en la que el TRC és de 21 dies i la renovació es fa cada 7 dies d'un terç de la biomassa s'observa que a partir de la tercera renovació (30 dies) la fracció de biomassa que s'inocula inicialment en el bioreactor (color blau) és molt semblant, per exemple el dia 35 en el cas del TRC de 21 dies i renovació d'un terç cada setmana, la fracció de biomassa inicial és del 29.6%, i amb un TRC de 20 dies i renovació d'un quart de la biomassa cada cinc dies, la fracció inicial que encara roman el dia 35 és del 31.6%, lleugerament superior que en la situació anterior. A efectes d'edat del cultiu, tant amb una estratègia com amb l'altra els resultats són semblants.

A la figura 6.14 es simulen les fraccions de biomassa teòriques front al temps que tindriem operant amb un temps de residència cel·lular 28 dies renovant un quart de la biomassa cada setmana. S'observa que després de cinc renovacions

el 84% de la biomassa tindria una edat inferior a 28 dies, per tant la fracció de biomassa activa dins del reactor seria molt elevada. A l'estat estacionari (4 TRH), la fracció de biomassa amb edat inferior a 28 dies és del 76 %, mentre que la fracció amb una edat superior a 40 dies és del 17.8 %. Si es compara la figura 6.13 amb la 6.14 s'observa que per un mateix temps, la fracció de biomassa amb edat igual a aquest temps sempre és més gran amb un TRC de 28 dies, com és lògic, per tant s'escull operar a un TRC de 21 dies i renovar la biomassa cada set dies.



**Figura 6.13.** Fraccions de biomassa teòriques front al temps d'operació amb un TRC de 28 dies renovant  $\frac{1}{4}$  de biomassa cada 7 dies.

#### 6.4. Conclusions

S'estableix el temps de residència cel·lular màxim en 40 dies. Malgrat que la decoloració es manté a nivells molt bons, a partir d'aquest temps els pèl·lets no són tan compactes com a l'inici del tractament, s'observa creixement de petits agregats d'hifes que fan que els pèl·lets s'enganxin entre si i es dificulti la fluidització.

Es comprova que la metodologia de renovació de biomassa en el bioreactor renovant  $\frac{1}{3}$  de la biomassa del sistema cada terç de TRC establert, de manera que transcorregut un TRC equival a una renovació de tota la biomassa del sistema, és una bona alternativa a la renovació total de la biomassa.

La renovació de biomassa és un punt crític del procés alhora de mantenir l'esterilitat del sistema.

S'estableix el temps de residència cel·lular en 21 dies, realitzant les renovacions parcials cada set dies el que permet mantenir l'activitat metabòlica i el tractament en continu de la solució de colorant sense problemes operacionals deguts a l'estat de la biomassa.

Amb un TRH de 48 hores i un TRC de 21 dies s'obtenen percentatges de decoloració superiors al 90% i amb un TRH de 18 hores i un TRC de 21 dies el percentatge de decoloració obtingut és del 80%.

Simulacions de l'edat del cultiu amb un temps de residència de 30 dies mostren que la fracció de biomassa amb una edat superior a 40 dies és significativa (>20%) durant el primer període, i per tant podria tenir repercussions sobre la producció enzimàtica.

Es simula la distribució d'edats amb un TRC de 20 dies renovant un quart de la biomassa, i es comprova teòricament que la edat del cultiu és molt semblant a la que es dona amb un TRC de 21 dies renovant un terç de la biomassa cada setmana. Augmentar el TRC a 28 dies i renovar un quart de la biomassa cada setmana fa augmentar l'edat de la biomassa respecte l'opció d'un TRC de 21 dies i renovar un terç cada setmana, per tant s'estableix aquesta última estratègia com a metodologia pel canvi de biomassa.

## 6.5. Bibliografia

- B**orchert M, Libra JA. 2001. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 75:313-321.
- L**iedig E, Prüse U, Vorlop KD, Winter J. 1999. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess Eng.* 21:5-12.
- M**ielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2001. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *J. of Biotechnol.* 89: 99-106.
- Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema, JM. 2002. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*. *Wat. Res.* 36:1896-1901.

- P**alma C, Moreira MT, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 1999. Use of a fungal bioreactor as a pretreatment or post-treatment step for continuous decolorization of dyes. *Wat. Sci. Technol.* 40(8):131-136.
- R**omero. 2000. Tractament amb fongs d'aigües residuals colorades. Ph.D. tesis. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra 2000.
- Y**ang FC, Yu JT. 1996a. Development of a bioreactor system using immobilized white rot fungus for decolorization. Part I: cell immobilization and repeated-batch decolorization tests. *Bioprocess Eng.* 15:307-310.
- Yang FC, Yu JT. 1996b. Development of a bioreactor system using immobilized white rot fungus for decolorization. Part II: continuous decolorization tests. *Bioprocess Eng.* 16:6-11.
- Z**hang FM, Knapp JS, Kelvin, NT. 1999. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enz. Microb. Technol.* 24: 48-53.

## Capítol 7

### Tractament del colorant Gris Lanaset G amb carbó actiu granular (GAC)

#### Resum

En aquest capítol s'estudia l'adsorció del colorant Gris Lanaset G en carbó actiu granular (GAC). S'estudia el procés d'adsorció en discontinu, per determinar la capacitat d'adsorció del colorant en GAC. S'estudia també el procés en continu amb una columna de llit fix amb la qual es realitzen una sèrie d'experiments amb diferent alçada de llit de carbó amb l'objectiu d'obtenir la corba de ruptura i determinar el temps de ruptura corresponent al 90% d'eliminació de colorant, mantenint el mateix cabal en tots els experiments. La solució de colorant té una concentració inicial de 150 mg/l. Es determinen els paràmetres de l'equació de Bohart i Adams per aquestes condicions, la capacitat d'adsorció i la constant de velocitat d'adsorció. Es determina també l'alçada crítica de llit i s'estudia l'efecte de l'alçada de llit en la corba de ruptura.

## 7.1 Introducció

Adsorció és la concentració d'un solut en una interfase. Aquest fenomen té lloc quan es col·loca un sòlid en contacte amb una solució. Una capa de molècules de solut s'acumulen en la superfície del sòlid degut al desequilibri de les forces superficials. En l'interior del sòlid, les molècules estan envoltades totalment per molècules similars i per tant subjectes a forces equilibrades. Les molècules en la superfícies estan sotmeses a forces no equilibrades. Degut a que aquestes forces residuals són suficientment elevades, poden atrapar molècules d'un solut que es trobi en contacte amb el sòlid. Aquest fenomen es denomina adsorció física (o de Van der Waals).

El sòlid (per exemple carbó actiu) es denomina adsorbent, i el solut adsorbat. La capacitat d'adsorció és funció de la superfície total de l'adsorbent, ja que com més gran és aquesta superfície es disposa d'un número de forces residuals no equilibrades majors per a l'adsorció.

### 7.1.1. Adsorbents

Els adsorbents que s'utilitzen en les aplicacions industrials i de laboratori es caracteritzen per tenir una elevada superfície específica.

Els adsorbents industrials es poden classificar en tres grans grups (Kirk-Othmer, 1991): carbons actius, polímers sintètics (resines) i tamisos moleculars (zeolites). Els més utilitzats són els carbons actius, malgrat que l'elecció del tipus d'adsorbent es fa d'acord a les característiques particulars de cada sistema. Els tamisos moleculars s'utilitzen sobretot en la separació de dissolucions o mescles no aquoses, generalment hidrocarburs; en el tractament de dissolucions aquoses s'utilitzen els adsorbents polimèrics i els carbons actius. En el tractament d'aigües s'acostuma a utilitzar els carbons actius ja que posseeixen gran capacitat adsorbent i menys cost. És interessant l'estudi del procés d'adsorció des del punt de vista tant de la millora de la capacitat d'adsorció del carbó actiu (González-Serrano *et al.*, 2004), com d'utilitzar adsorbents de baix cost, per fer més rendible el procés.

#### Adsorbents de baix cost

En els últims anys s'ha investigat el funcionament d'altres substàncies com a adsorbents alternatius. A escala de laboratori s'ha vist que són eficaços a l'hora d'eliminar grups de contaminants, però la seva aplicació en el tractament d'aigües a escala industrial no ha estat provada. Alguns d'aquests adsorbents alternatius serien

la quitina (per adsorció de colorants, pesticides i metalls); les cendres volants resultants de la combustió del carbó pulveritzat (Gaitan *et al.*, 1996); la pellofa d'arròs (McKay *et al.*, 1987), la palla i la llana (Knaebel, 1995); argila vermella (López *et al.*, 1998)

Els fangs biològics excedents de depuradores han estat provats també amb aquesta finalitat. Molts microorganismes tenen la capacitat d'acumular en la seva paret cel·lular compostos del medi. Aquest ús de fangs de depuradora suposa un aprofitament de residus i aquesta capacitat de biosorció és constatable tant en el cas de la biomassa viva com en el cas que els microorganismes estiguin morts. Aquest procés de separació de compostos amb l'ajuda de material biològic ha estat emprat especialment per a l'eliminació de metalls i colorants en aigües residuals, i males olors en gasos (Martin MJ, *et al.*, 2002, 2003)

### **7.1.2. Adsorció en carbó actiu**

El carbó actiu té una estructura molt porosa amb grans àrees superficials compreses entre 500 i 1500 m<sup>2</sup>/g. Aquests porus es divideixen segons la seva mida en macroporus, amb un radi superior a 25 nm, mesoporus entre els 25 i 1 nm, i els microporus, inferiors a 1nm (web aguapotable).

Les formes en les que es pot trobar el carbó actiu són diverses, les principals que es poden trobar comercialment són:

- Carbó Actiu en Pèl·lets. Forma cilíndrica i distorsionada amb un diàmetre entre 0.8 i 5 mm. S'utilitza especialment per aplicacions en fase gas per la seva poca caiguda de pressió, per la seva força mecànica elevada i pel seu baix contingut en pols.
- Carbó Actiu Granular (GAC). Partícules de forma irregular i amb una mida que pot oscil·lar entre els 0.2 i els 5 mm. S'utilitza principalment en aplicacions de fase líquida o gasosa.
- Carbó Actiu en Pols (PAC). Carbó pulveritzat amb una mida predominantment inferior a 0.18 mm. S'utilitza en aplicacions de fase líquida i per tractament de gasos humits.

El carbó actiu també pot estar en formes especials, com ara en teixits i fibres (web chemvironcarbon).



### 7.1.3. Formes d'operació

L'adsorció sobre carbó actiu es pot dur a terme en forma discontinua o en forma contínua (Ramalho, 1993). L'operació discontinua es duu a terme en un tanc agitat on es manté en contacte la dissolució amb una determinada quantitat de carbó. Les operacions en continu normalment es realitzen en columnes reblides de GAC. El sistema en continu més utilitzat és el llit fixe, on la dissolució es fa passar contínuament a través d'un llit de GAC que roman immòbil en una columna. Com més gran és la mida de la partícula menor és la pèrdua de pressió però la velocitat d'adsorció és menor. Per arribar a una situació de compromís, s'acostumen a utilitzar partícules de 0.55 i 1.35 mm de diàmetre.

#### Operació d'una columna de llit fix.

L'operació d'una columna d'adsorció no té lloc fins al seu esgotament, sinó que es treballa fins a una concentració de sortida de 0.05 a 0.1 vegades la concentració de l'influent. Aquesta concentració de sortida és l'anomenada concentració de ruptura,  $C_b$ . Inicialment, quan el carbó actiu no està saturat la concentració a la sortida és inferior a  $C_b$ , però a mesura que la solució a tractar passa a través del llit carbó aquest es va saturant, fins que la concentració de sortida és igual a  $C_b$ . En aquest moment s'ha arribat al punt de ruptura. Bohart i Adams (1920), que van ser els primers en proposar la relació entre l'alçada del llit de carbó ( $Z$ ) i el temps necessari per assolir el punt de ruptura. El temps de servei ( $t$ ) es va relacionar amb les condicions del procés i paràmetres d'operació:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C_b} - 1\right) = \ln\left(e^{K_a N_0 Z / F} - 1\right) - K_a C_0 t \quad (7.1)$$

on:

$C_0$  = Concentració inicial de solut (mg/l)

$C_b$  = Concentració de ruptura (mg/l)

$F$  = Velocitat lineal (cm/min)

$K_a$  = Constant de velocitat d'adsorció (l/mg·min)

$N_0$  = Capacitat d'adsorció (mg/l)

$t$  = Temps (min)

$Z$  = Alçada de llit (cm)

Hutchins (1973) va proposar una relació lineal entre l'alçada del llit i el temps de servei, simplificant l'equació (1), considerant que normalment el terme

exponencial d'aquesta equació és molt superior a la unitat, i per tant es menysprea el terme unitat de la part dreta de l'equació:

$$t = \frac{N_0}{C_0 F} Z - \frac{1}{K_a C_0} \ln\left(\frac{C_0}{C_b} - 1\right) \quad (7.2)$$

## 7.2. Materials i mètodes

### 7.2.1. Carbó actiu

El carbó actiu utilitzat és Carbó Actiu Granular (GAC) F400 (ref. FE 02131 C de Chemviron Carbon) cedit per Aguas de Levante S.A. El full d'especificació es troba a l'Annex II.

### 7.2.2. Colorant Gris Lanaset G

Les característiques d'aquest colorant tèxtil es descriuen a l'apartat 3.3 del capítol de materials i mètodes generals.

### 7.2.3. Mètodes analítics

La determinació del color està descrita a l'apartat 3.6 del capítol de materials i mètodes generals.

### 7.2.4. Muntatge i metodologia experimental

#### ✓ Experiments en discontinu

Per determinar la capacitat adsorbent del carbó actiu granular (GAC) es realitzen diferents experiments en discontinu. En un vas de precipitats de 600 ml es posen 250 ml de solució amb colorant (150 mg/l) amb una concentració determinada de carbó actiu i s'agita magnèticament. Els experiments es realitzen a 25°C dins d'una cambra termostatitzada.

Quan la solució de colorant entra en contacte amb el carbó actiu, es posa en marxa el cronòmetre. Es treu mostra de la dissolució de colorant amb una pipeta Pasteur, es centrifuga i es llegeix la seva absorbància. La presa de mostra es realitza cada 10 minuts a partir de la primera mitja hora de contacte entre el carbó actiu i la solució de colorant. Quan les mesures d'absorbància s'estabilitzen, la presa de mostra es realitza més espaiada en el temps.

✓ **Experiments en continu**

En els estudis en continu, es fa passar una dissolució de 150 mg/l de colorant Gris Lanaset G a través d'una columna de 21 cm d'alçada i de 1.8 cm de diàmetre (imatge 7.1). Al seu interior conté el carbó actiu, el qual ocupa una alçada determinada en funció del temps de residència desitjat. La columna es dissenya per que funcioni com un reactor flux pistó. Al carbó actiu se li ha d'eliminar l'aire per evitar la presència de bombolles en la columna, que afavoreixen la formació de camins preferents, i redueixen la superfície disponible per la transferència de matèria entre el carbó actiu i la solució. Per evitar aquests problemes s'introdueix la quantitat desitjada de carbó actiu sec a la columna i es fa circular un corrent d'agua en sentit ascendent. Quan es posa en marxa el sistema per sobre del carbó actiu hi ha 2 o 3 mm d'aigua que fan que al caure les gotes de solució de colorant per la part superior de la columna aquesta avanci en sentit descendent, sense crear camins preferents. Una bomba peristàtica s'encarrega de transportar la solució amb colorant tèxtil fins al cap de la columna. L'efluent de la columna és recollit per un col·lector de fraccions, que es pot veure també a l'imatge 7.1. De les fraccions recollides es llegeix l'absorbància, i es relaciona amb la concentració de colorant.



**Imatge 7.1.** Muntatge experimental utilitzat en els experiments d'adsorció en continu.

El quocient entre el volum que ocupa el carbó actiu dins de la columna i el cabal de circulació del colorant és el temps de contacte.

L'alçada de carbó actiu en la columna i el cabal de circulació de colorant s'escullen en funció del temps de contacte a columna buida, EBCT (Empty Bed Contact Time), desitjat.

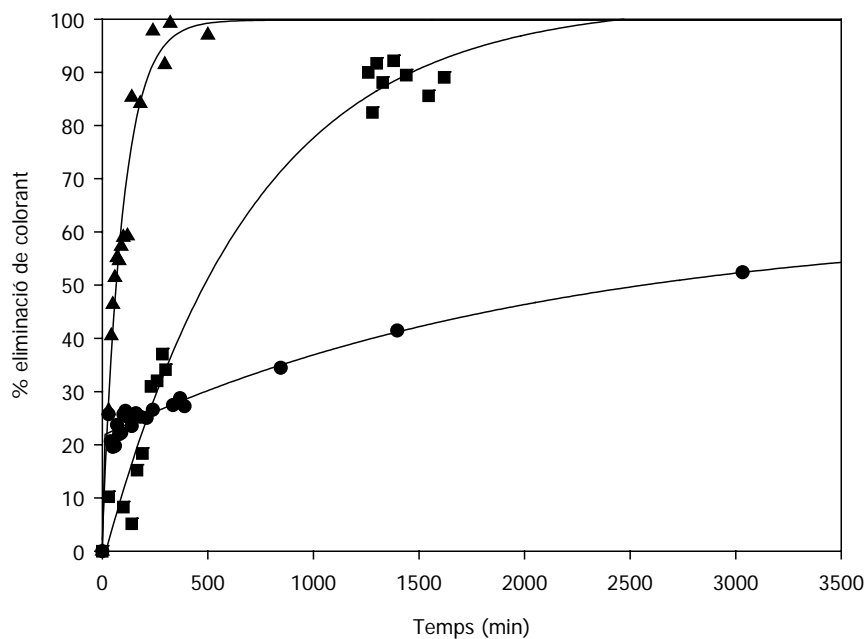
$$EBCT = \frac{Secció(cm^2) \cdot z_{Cactiu}(cm)}{Cabal(cm^3/min)} \quad (7.3)$$

### 7.3. Resultats i discussió

#### 7.3.1. Experiments en discontinu.

Per determinar el poder adsorbent del carbó actiu, es realitzen diversos experiments en discontinu. S'analitza la quantitat de colorant eliminat amb el temps en suspensions de carbó actiu de concentració variable, a 25°C.

A continuació es presenta a la figura 7.1. l'evolució del percentatge d'eliminació del colorant tèxtil Gris Lanaset G amb el temps per a cada experiment en discontinu.



**Figura 7.1.** Evolució del percentatge d'eliminació de colorant amb una concentració de carbó actiu de 0.816 g/l (●), 2.0 g/l (■) i 19.947 g/l (▲)

De la figura anterior es pot deduir que l'adsorció del colorant és més elevada durant els primers minuts de contacte entre la solució i el carbó actiu. A mesura que passa el temps la velocitat d'adsorció decau. S'hauria d'esperar que amb el temps, l'absorbància i, per tant, la concentració de colorant, tendís a estabilitzar-se. Però el que s'observa és que la concentració de colorant en la solució no acaba d'estabilitzar-se, sempre hi ha una petita adsorció del colorant. Això es pot atribuir al fet de que degut a l'agitació el carbó actiu es trenca, augmentant la superfície d'adsorció. Sembla que a qualsevol concentració de carbó actiu, a temps molt llarg es podria assolir una eliminació quasi total del colorant.

La taula 7.1. mostra un resum dels diferents experiments en discontinu realitzats. El temps necessari per assolir el 30% d'eliminació del colorant de la solució original varia en funció de la concentració de carbó actiu utilitzada. Com major és la concentració de carbó actiu, menor és el temps per assolir aquest nivell d'eliminació ja que hi ha més superfície a la qual el colorant es pot adsorbir.

**Taula 7.1.** Resum dels diferents experiments en discontinu realitzats

Concentració de carbó actiu (g/l)	Temps per assolir el 30% d'eliminació de colorant (min)	Resultats a temps llargs	
		Temps (h)	%eliminació
0.816	500	51	52.40
2.000	200	21	90.00
19.947	30	4	97.77

Amb els resultats obtinguts, com que és pràcticament impossible determinar quina és la concentració en equilibri de colorant en la solució, degut al trencament de les partícules de carbó actiu, es desestima determinar la isoterma d'adsorció.

### 7.3.2. Experiments en continu

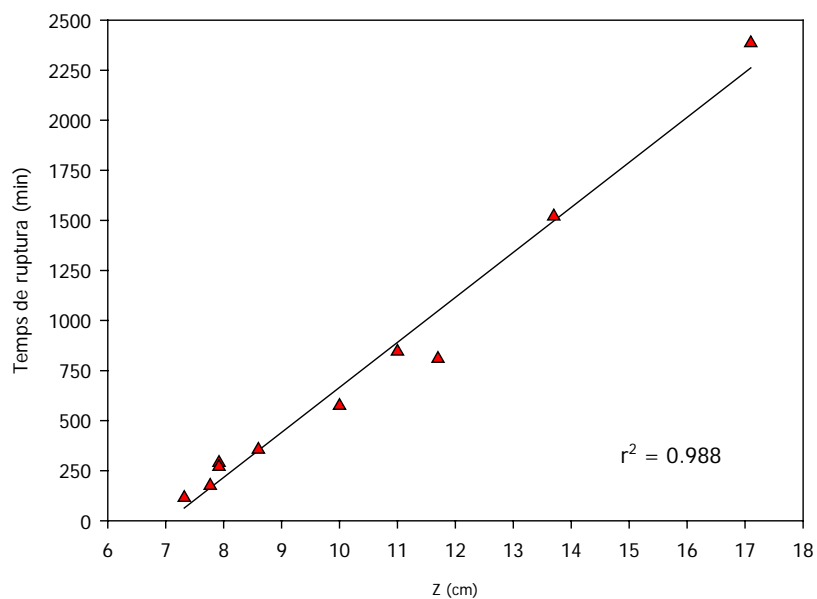
✓ **Determinació dels paràmetres de l'equació de Bohart i Adams.**

En l'operació d'adsorció, inicialment, quan el carbó actiu no està saturat la concentració de colorant a la sortida de la columna és inferior a la concentració màxima desitjada,  $C_b$ , a la sortida de la columna. Aquesta concentració és fixa en 15 mg/l, ja que la concentració inicial de colorant és de 150 mg/l,  $C_0$ , i es vol eliminar un 90% del colorant de la solució inicial. A mesura que l'efluent va passant per la

columna aquesta es va saturant fins que arriba un moment que la concentració a la sortida és igual a  $C_b$ , és a dir s'assoleix el punt de ruptura.

L'equació de Bohart i Adams (eq. 7.1), com s'explica a la introducció relaciona l'alçada del llit de carbó amb el temps necessari per a que s'arribi al punt de ruptura. Per la determinació dels paràmetres d'aquesta equació s'utilitza la linealització de Hutchins (eq. 7.2).

A la figura 7.2 es mostra la linealització de les dades del temps de ruptura obtingut per diferents alçades de carbó actiu en la columna operant a un cabal de 1.3 ml/min. Els paràmetres de l'equació de Bohart i Adams són la capacitat d'adsorció  $N_0$ , i la constant de velocitat,  $K_a$ . Amb l'equació 7.2, la velocitat lineal i les concentracions inicial i de ruptura es determina que la capacitat d'adsorció pel nostre sistema experimental és de 17.22 g/l i la constant de velocitat és de  $9.6 \cdot 10^{-3}$  l/g·min.



**Figura 7.2.** Linealització de l'equació de Bohart i Adams

#### ✓ **Determinació de l'alçada crítica de llit**

L'alçada crítica de llit,  $Z_0$ , és l'alçada mínima d'adsorbent necessària per evitar que a  $t=0$  la concentració de colorant a la sortida sigui superior a  $C_b$ . Es calcula a partir de l'equació 7.2 per  $t=0$ . Normalment el terme exponencial d'aquesta equació és molt superior a la unitat, per tant es pot menysprear el terme

unitat de la part dreta de l'equació, i s'obté la següent equació, que permet determinar l'alçada crítica de llit coneixent els paràmetres de l'equació de Bohart i Adams.

$$Z_0 = \left( \frac{F}{K_a N_0} \right) \ln \left( \frac{C_0}{C_b} - 1 \right) \quad (7.4)$$

L'alçada crítica de llit obtinguda és de 6.77 cm. Amb aquesta alçada es calcula l'EBCT mínim d'operació, que té un valor de 13.25 min. Així, tot i que els valors d'EBCT recomanats al full d'especificació del carbó actiu estan entre 10 i 30 min, el sistema experimental no pot treballar a EBCTs inferiors a 13.25 min per garantir una eliminació de colorant igual o superior al 90% .

✓ **Efecte de l'alçada de llit en la corba de ruptura**

En aquest apartat es realitzen diferents experiments d'adsorció en continu a diferents alçades de llit. Les característiques de les diferents columnes i resultats es presenten a la taula 7.2. En tots els experiments el cabal ha estat de 1.3 ml/min i la concentració inicial de colorant de 150 mg/l.

**Taula 7.2.** Característiques dels diferents experiments d'adsorció realitzats

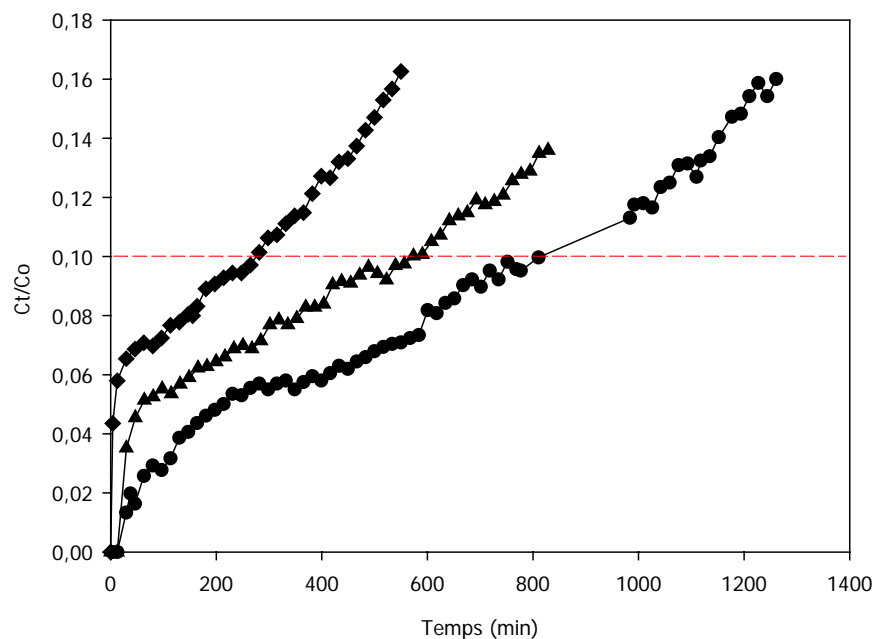
Z carbó (cm)	M carbó (g)	EBCT (min)	t ruptura (90%) (min)	Vol tractat (90%) (ml)
7.92	8.15	15.50	290	380
10	11	19.57	575	750
11.70	13.08	22.90	810	1060

Per cadascun dels experiments realitzats s'obté una corba de ruptura que es presenta a la figura 7.3. El nivell  $C_b/C_0$  marcat amb una línia indica el temps de ruptura corresponent al 90% d'eliminació de colorant de la solució original (150 mg/l de Gris Lanaset G). Es fixa aquest valor de decoloració per poder comparar posteriorment el procés fisicoquímic i el procés biològic. Cada sèrie de punts representa l'evolució de cadascuna de les columnes amb una alçada diferent i per tant un EBCT diferent.

Com es pot observar a la figura 7.3, com més petit és el temps de residència (EBCT), més ràpidament se satura la columna, és a dir s'assoleix el 90% de decoloració més ràpidament, i tal com es reflexa a la taula 7.2, el volum de solució

tractada per gram de carbó actiu és menor com més petit és l'EBCT. En canvi augmentant el temps de residència la operació d'adsorció és més lenta però s'aconsegueix tractar més volum de solució per gram de carbó actiu. Aquest fet indica que s'haurà d'arribar a una solució de compromís entre el temps de contacte i la capacitat de tractament, que es tradueix en un cost mínim per volum d'aigua tractada (euros/m<sup>3</sup>).

El comportament de les corbes de ruptura no és lineal, tenen un perfil sigmoïdal, la relació entre la concentració de sortida i la concentració inicial augmenta ràpidament en les primeres fraccions recollides, en les següents fraccions aquest augment en la relació de concentracions és més lent, però continua augmentant progressivament.



**Figura 7.3.** Corbes de ruptura per diferents EBCT: ◆ EBCT: 15.5, ▲ EBCT: 19.75, ● EBCT: 22.9.

En el disseny de columnes d'adsorció de llit fix hi ha moltes variables que poden influir en el seu disseny com són alçada de columna, cabal a tractar, o diàmetre de columna. Per optimitzar un sistema d'adsorció existeixen dos tipus de variables importants. En primer lloc aquelles característiques primàries que determinen la velocitat d'esgotament de l'adsorbent com són la capacitat d'adsorció



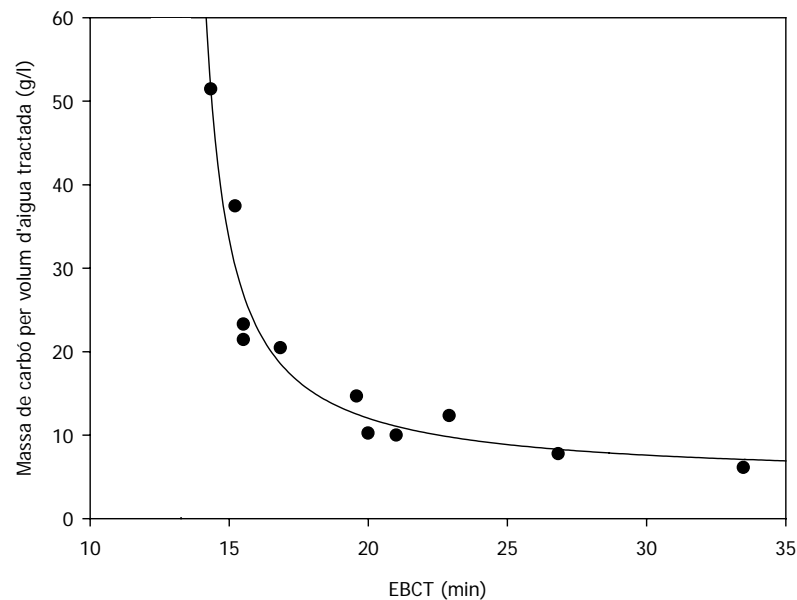
i la velocitat d'adsorció. En segon lloc, aquelles variables del procés que afecten als costos d'operació, per exemple el percentatge d'eliminació, concentració requerida a la sortida, mida de les partícules d'adsorbent, etc.

Per un sistema on la mida de partícula està fixada i també el percentatge de reducció del contaminant, el cost depèn de dues variables:

- Percentatge d'esgotament de l'adsorbent que generalment s'expressa com massa d'adsorbent per volum d'aigua tractada.
- Temps de residència a columna buida (Empty Bed Contact Time, EBCT o Empty Bed Residence Time, EBRT) que es una relació directa entre el cabal i el volum d'adsorbent.

Els costos d'operació es determinen a partir de la velocitat d'esgotament de l'adsorbent doncs això determina el temps de regeneració i per tant la vida útil de l'adsorbent. Fixades unes condicions d'operació (en aquest cas 90 % d'eliminació), hi ha una única corba que relaciona les dues variables (massa de carbó actiu per volum d'aigua tractada) amb l'EBCT. Aquesta relació es coneix com línia operativa.

Amb les dades obtingudes per cadascuna de les columnes amb les quals s'ha treballat, es representa la massa de carbó actiu per volum d'aigua tractada al temps de ruptura del 90% enfront del EBCT (figura 7.4) obtenint la corba operativa per aquest sistema.



**Figura 7.4.** Corba operativa per columnes empacades per l'eliminació al 90% de colorant Gris Lanaset G.

El concepte de línia operativa es pot utilitzar per optimitzar el disseny que permet assolir el cost mínim. Per altra part la línia operativa aproxima un mínim per cada eix. La velocitat mínima d'adsorció s'assoleix quan l'adsorbent es troba en equilibri amb la concentració de l'influent (asíptota a l'eix d'abscisses) i el temps de retenció mínim representa el temps mínim que necessita la solució per travessar un volum mínim de carbó actiu per assolir el percentatge de decoloració desitjat a una velocitat d'esgotament de l'adsorbent infinita.

Pel sistema estudiat d'eliminació del colorant tèxtil Gris Lanaset G, la mínima massa de carbó actiu per volum d'aigua tractada és de 6 g/l i el temps de retenció mínim (EBCT) és de 13.25 minuts. Aquests valors acoten les variables de disseny i s'han de considerar juntament amb els criteris econòmics (analitzats posteriorment) per obtenir les condicions òptimes d'operació. Una possible solució de compromís és operar a un EBCT de 21 min, ja que per EBCTs inferiors la massa de carbó actiu per volum d'aigua tractada augmenta exponencialment, i per EBCTs superiors no hi han variacions significatives de l'utilització de carbó actiu per volum d'aigua tractada.

#### **7.4. Conclusions**

Els experiments en discontinu mostren que amb concentracions molt baixes de carbó actiu es poden assolir rendiments d'eliminació del colorant Gris Lanaset G elevats. A temps molt llarg, es pot aconseguir una eliminació superior al 95% amb una concentració de carbó actiu de 2 g/l. Per tant el sistema presenta una elevada capacitat d'adsorció prolongada a temps de contacte llargs, afavorida pel trencament dels grànuls de carbó actiu.

La cinètica d'adsorció és molt lenta, el que fa pràcticament impossible determinar la concentració d'equilibri de colorant en la solució, i per tant es desestima determinar les isoterms d'adsorció.

S'han determinat els paràmetres de l'equació de Bohart i Adams pel sistema experimental; la capacitat d'adsorció ( $N_0$ ) és de 17.22 g/l i la constant de velocitat d'adsorció ( $K_a$ ) és de  $9.6 \cdot 10^{-3}$  l/g·min.

L'alçada crítica de llit obtinguda és de 6.77 cm, que correspon a un EBCT mínim de 13.25 min, per tant el sistema no pot treballar a temps de contacte inferiors.

Dels experiments realitzats a diferents temps de contacte els resultats obtinguts mostren que a menor EBCT la columna presenta la saturació molt més ràpidament. El comportament no és lineal, sinó que la relació entre la concentració

de sortida i la concentració inicial augmenta ràpidament en les primeres fraccions recollides, per establir-se posteriorment. Aquest fet ha de permetre establir unes condicions que seran un compromís entre el temps de contacte i la capacitat de tractament.

La mínima massa de carbó actiu per volum d'aigua tractada pel sistema estudiat és de 6 g/l i l'EBCT mínim de 13.25 min. S'escull un EBCT de 21 minuts com a solució de compromís entre la utilització de carbó actiu i la capacitat del sistema.

## 7.5. Bibliografia

- B**ohart GS, Adams EQ. 1920. Adsorption columns. J. Chem. Soc. 42:523
- G**aitan I, Balaguer MD, Rigola M. 1996. Capacidad de adsorción de colorantes de los fangos biológicos. Ingeniería Química. Feb:159-163.
- González-Serrano E, Cordero T, Rodríguez-Mirasol J, Cotoruelo L, Rodríguez JJ. 2004. Removal of water pollutants with activated carbons prepared from H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation of lignin from kraft black liquors. Wat. Res. 38(13): 3043-3050.
- Hutchins RA. 1973. New method simplifies design of activated carbon systems. Chem. Eng. 80 (19): 133-138
- K**irk-Othmer.1991. Kirk-Othmer encyclopedia of Chemical Technology. 4th edition, vol 1:572-600. New York, John Wiley&Sons.
- Knaebel, KS. 1995. For your next separation consider adsorption. Chemical Engineering. Nov: 92-102.
- L**ópez E, Soto B, Arias M, Núñez A, Rubinos D, Barral MT. 1998. Adsorbent properties of red mud and its use for wastewater treatment. Wat. Res. 32 (4):1314-1322.
- M**artín MJ, Artola A, Balaguer MD, Rigola M. 2002. Towards waste minimisation in WWTP: Activated carbon from biological sludge and its application to liquid phase adsorption. Chem. Technol. Biotechnol. 77:825-833.
- Martín MJ, Artola A, Balaguer MD, Rigola M. 2003. Activated carbons developed from surplus sewage sludge for the removal of dyes from dilute aqueous solutions. Chemical Engineering J. 94: 231-239.
- McKay G, Ramprasad G, Mowli P. 1987. Desorption and regeneration of dye colours from low-cost materials. Wat. Res. 21 (3):375-377.

**R**amalho RS. 1993. Tratamiento de aguas residuales. Barcelona, editorial Reverté DL.

**Recursos Web**

[www.aguapotable.fcpages.com/tratamiento\\_de\\_olores\\_y\\_sabores.htm](http://www.aguapotable.fcpages.com/tratamiento_de_olores_y_sabores.htm)

[www.chemvironcarbon.com](http://www.chemvironcarbon.com)

## Capítol 8

### Disseny i operació en bioreactor pilot (10 l)

#### Resum

En aquest capítol es dissenya un reactor fluïditzat per polsos d'aire a escala pilot de 10 l pel tractament d'aigües residuals colorades de la indústria tèxtil amb el fong *Trametes versicolor* en forma de pèl·lets. Es realitza un estudi del comportament fluidodinàmic del reactor determinant el temps de mescla del sistema. S'opera en discontinu i es constata que la glucosa es consumeix més ràpidament que en els reactors a escala laboratori. Aquest fet provoca un creixement excessiu de biomassa que dificulta la fluïdització. Per evitar problemes operacionals es disminueix en un 20% la quantitat d'inòcul en els experiments següents amb el bioreactor pilot. Es comprova la bondad de l'escalat operant en continu a un TRH de 48 hores, obtenint percentatges de decoloració del 90% durant un període superior a 10 dies.

## **8.1 Introducció**

### **8.1.1. Canvi d'escala**

Es ben conegut que en la indústria química i farmacèutica els processos comercials s'han de basar en dades experimentals, obtingudes a nivell de laboratori i de planta pilot. Un canvi d'escala satisfactori podria requerir un augment progressiu de grandària fins arribar al volum desitjat a escala industrial, però aquest procés seria molt costós. Les diferents metodologies de canvi d'escala tenen l'objectiu de poder anticipar els efectes del canvi d'escala, i introduir les variacions requerides en el disseny dels equips quan canvien de mida. En qualsevol cas, s'ha d'entendre que el canvi d'escala és un procés complicat degut a la combinació de múltiples factors: les equacions representatives del procés sovint no es poden resoldre, els paràmetres físics químics i biològics estan interconnectats, les solucions que s'obtenen a nivell laboratori o inclús planta pilot poden no ser vàlides a nivell industrial, etc (Solà i Gòdia,1994).

La complexitat del procés i el nivell previ de coneixement d'aquest solen fixar el factor d'escala, que serà més gran com més seguretat i experiència es tingui sobre el canvi d'escala del procés estudiat. Quan el coneixement previ del procés es baix se sol agafar com a factor segur el 10. En reactors químics es poden arribar a utilitzar factors d'escala de 50-80,000. En el cas del processos biotecnològics, més recents en el seu desenvolupament industrial, els factors d'escala més grans s'utilitzen en el disseny de plantes de tractament biològic d'aigües residuals, en les que s'han dissenyat plantes de l'ordre de 10-20,000 m<sup>3</sup> amb factors d'escala molt elevats.

L'indústria farmacèutica utilitza bioreactors de tanc agitat convencionals, encara que degut a l'augment de la potència d'agitació amb l'escala d'operació també s'han desenvolupat bioreactors de tipus air-lift en els que s'elimina la necessitat d'agitació mecànica. En els casos en els que s'utilitzen cèl·lules immobilitzades en o sobre suports, els reactors utilitzats són de llit fix, llit fluïditzat o "air-lift". S'ha de considerar que no tots els processos biotecnològics requereixen canvis d'escala molt elevats. Per exemple, la producció de proteïnes terapèutiques o per diagnòstic, de les que es requereixen quantitats petites per la preparació de un número d'assaigs molt elevat, no requereix grans volums de reactor en el canvi d'escala del procés industrial.

La finalitat del canvi d'escala és la selecció de les condicions de disseny que assegurin que l'efecte de les diferents variables sobre un procés és el mateix en unitats de diferent mida.

#### *Teoria de la similitud*

La base del concepte de similitud s'expressa de forma general en la següent relació lineal

$$m' = k \cdot m \quad (8.1)$$

entre els valors d'una magnitud independent en ambdós equips, el de petita escala ( $m$ ) i el de gran escala que s'està dissenyant ( $m'$ ), essent  $k$  el factor d'escala. En funció de si l'equació 8.1 es pot aplicar a totes les variables implicades en el sistema o només per algunes, es diu que la similitud entre els dos sistemes és total o parcial respectivament. La similitud es classifica en funció de la naturalesa de les variables que obeeixen a l'equació (8.1), de forma que es pot tenir:

- Similitud geomètrica
- Similitud dinàmica
- Similitud tèrmica
- Similitud màssica (concentració)
- Similitud (bio)química

essent normalment cada una d'elles un pre-requisit per a la següent en l'ordre esmentat. La similitud estricta entre dos sistemes de diferent volum és impossible. Com a conseqüència, quan es dissenya un equip a partir de dades d'un altre de menor mida, la similitud entre ambdós sistemes només pot ser parcial.

La teoria de la similitud conjuntament amb l'anàlisi de règim ha guiat la formulació d'una sèrie de criteris que són els més utilitzats en el canvi d'escala. Així, molts treballs s'han basat en mantenir per una part la proporcionalitat geomètrica, i a més mantenir constant en ambdós reactors una de les següents variables:

- Agitació
- Coeficient volumètric de transferència de matèria
- Esforç tallant màxim
- Temps de mescla

#### **8.1.2. Llits fluïditzats**

Els bioreactors aerobis que operen en llit fluïditzat estan equipats amb dispositius de contacte en els que un gas es dispersa en la zona inferior d'una columna vertical on es troba un líquid, que constitueix la fase contínua. Si per

l'efecte de les bombolles de gas ascendents o de la corrent líquida que es desplaça verticalment fluïditzant partícules sòlides, l'equip es denomina reactor de bombolleig o reactor fluïditzat trifàsic, depenent sobretot de la mida de les partícules en suspensió. Les partícules sòlides poden ser microorganismes (pèl·lets), agregats de microorganismes (floculs) o un suport sòlid on s'immobilitzen els microorganismes. La part superior del reactor, denominada capçal, té un diàmetre més gran amb la finalitat de disminuir en aquesta zona la velocitat lineal i aconseguir així una separació sòlid/líquid/gas més efectiva.

S'han utilitzat reactors de llit fluïditzat en moltes aplicacions: producció de cervesa, alcohol combustible, tractament d'aigües residuals (aerobi i anaerobi), cultiu de cèl·lules animals en suspensió, desulfuració microbiana de carbons, etc.

Els llits fluïditzats presenten un marge estret de condicions d'operació. Així, quan s'utilitzen partícules petites amb densitats similars a les del fluid s'ha de treballar a baixes velocitats lineals per evitar l'arrossegament massiu de biopartícules. En aquestes condicions la transferència de matèria externa pot controlar la velocitat global, essent especialment important en sistemes en els que les partícules a fluïditzar són floculs. D'altra banda, l'operació pot resultar inestable si la velocitat de fluïdització és similar a la de sedimentació.

S'han proposat diferents millores, entre d'altres la utilització d'equips troncocònics, en els que la superfície transversal augmenta en la direcció del flux permetent l'expansió progressiva del llit des de una zona d'àrea relativament petita a una altra que pot ser varies vegades la d'entrada. Aquesta disposició permet que la velocitat del fluid sigui progressivament més lenta al llarg del reactor, fent que la caiguda de pressió per fregament sigui menor a la zona superior, i a més hi hagi una menor resistència al flux dels gasos produïts durant la bioconversió.

A la bibliografia no s'ha trobat cap treball de recerca en el que es presenti l'escalat d'un reactor fluïditzat amb fongs. Entre els treballs més recents d'escalat de processos biotecnològics es presenten els escalats de bioreactors "air-lift" pel cultiu de cèl·lules vegetals, en els que es passa de treballar a escala Erlenmeyer a operar en bioreactors de 2.5 l. En aquests treballs es fa un escalat de producció, però no fan un escalat del reactor, i per tant no apliquen cap criteri d'escalat. (Zhang *et al.*, 2004; Kintzios *et al.*, 2004a i Kintzios *et al.*, 2004b).

Wong *et al.*, 2001, presenten l'escalat del procés de producció de l'antígen K99 recombinant clonat en *E. coli*. Els criteris d'escalat són mantenir constant el  $K_L a$



i el cabal volumètric d'aire per unitat de volum de reactor, passen de treballar en un reactor de 5 litres a fer-ho en un reactor de 200 litres. Mantenir constant el  $K_La$  és important en els processos en els que hi ha creixement, degut a que els requeriments d'oxigen són importants.

Durand (2002) publica una revisió bibliogràfica dels treballs publicats d'escalat de processos amb fermentadors en estat sòlid i conclou que fins al moment la majoria dels processos d'escalat s'han fet de forma sistemàtica sense seguir uns criteris concrets d'escalat, tot i que s'està treballant en el desenvolupament de millores en la transferència de matèria i calor, models matemàtics, etc. És un tipus de fermentació en el que hi ha paràmetres molt importants que en els cultius submergits no són rellevants, com poden ser per exemple la temperatura, per la intensa generació de calor i el contingut en aigua del medi sòlid.

A continuació es presenta el treball realitzat per dissenyar un bioreactor de 10 l a partir del coneixement adquirit en els reactors de laboratori. S'avaluarà la bondad de l'escalat en funció del rendiment de decoloració en diferents modes d'operació.

## **8.2. Materials i mètodes**

La determinació del color, toxicitat, glucosa i lacasa està descrita a l'apartat 3.6 del capítol de materials i mètodes generals.

La determinació del contingut en crom i cobalt està descrita a l'apartat 5.2.4 del capítol 5.

L'obtenció de l'enzim lacasa intracel·lular està descrita a l'apartat 5.2.3 del capítol 5.

## **8.3 Resultats**

### **8.3.1. Disseny del bioreactor a escala pilot (10 l)**

Amb l'objectiu de dur a terme el procés de decoloració del colorant Gris Lanaset G en continu a escala pilot es dissenya un bioreactor cilíndric fluïditzat per polsos d'aire de 10 l de volum útil.

No s'ha utilitzat com a criteri d'escalat el  $K_La$  perquè una de les característiques dels bioreactors fluïditzats per polsos d'aire utilitzats a menor escala és l'oxigen en excés present en el medi líquid, degut a que la mescla i la fluïdització es produïda bàsicament per l'aire, ja que la velocitat ascensional del líquid és molt

petita comparada amb la velocitat ascensional del gas en el bioreactor, això fa que el cabal d'aire sigui un paràmetre important alhora de determinar els paràmetres d'operació a escala pilot, a més el consum d'oxigen és baix, doncs no hi ha creixement de biomassa.

A la bibliografia no s'han trobat relacions típiques entre els diàmetres del capçal i del cos del reactor ni tampoc relacions d'alçades entre les dues parts del bioreactor. De fet, en els bioreactors fluiditzats industrials trobats a la bibliografia aquestes relacions són molt variables.

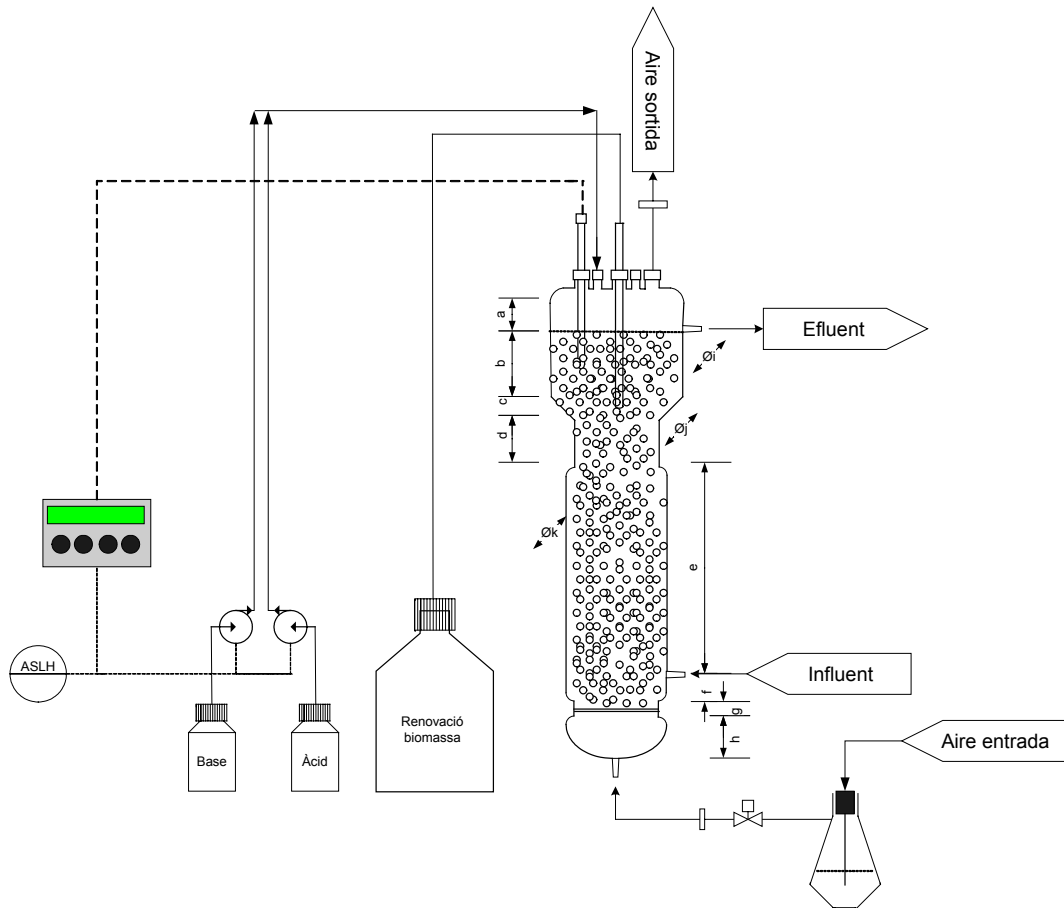
De manera semblant als reactors petits, el reactor pilot hauria de tenir tres parts:

- La part inferior per on entra l'aire i es distribueix a través d'una placa foradada. Aquesta placa ha de tenir una mida de porus adequada per a retenir els pèl·lets en el bioreactor.
- Una part central cilíndrica amb un orifici a la part inferior per on entra l'influent. Aquesta peça podria tenir altres orificis per preses de mostra i instrumentació per exemple.
- Una part superior o capçal de bioreactor amb un diàmetre major al de la part central, per facilitar la separació de fases. Conté diferents orificis en la part superior per situar l'instrumental de mesura, la sortida d'aire, l'entrada/sortida de biomassa, l'entrada d'àcid i base. També ha de disposar d'un orifici lateral per on sobreix l'efluent tractat.

En el disseny del reactor pilot es van tenir en compte altres aspectes com l'alçada total, per poder instal·lar-lo dins d'una cambra termostatitzada.

Per qüestions pràctiques a l'hora de renovar la biomassa el capçal havia de contenir com a mínim el 33% del contingut del reactor, i els dissenys es van proposar de tal forma que el capçal contingués un 40% del volum útil del bioreactor i el cos la resta del volum. Es van proposar dues alternatives, en la primera l'alçada del capçal era de 21 cm i el diàmetre de 15 cm, i el cos era de 76 cm d'alçada i 10 de diàmetre, i la segona és la que es mostra a la taula 8.1 i a la figura 8.1.

La primera alternativa es va desestimar perquè l'alçada total, tenint en compte les sondes, i la part inferior del bioreactor superava l'alçada màxima de que es disposava, ja que el bioreactor s'havia d'instal·lar en el laboratori dins d'una cambra termostatitzada.

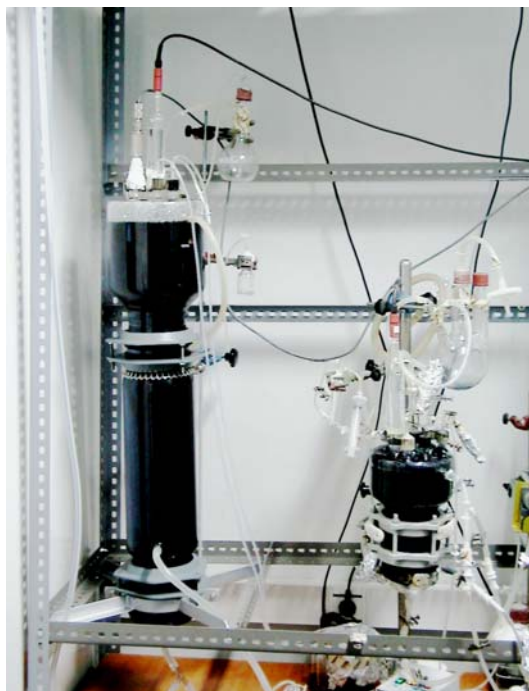


**Figura 8.1.** Esquema del sistema experimental pilot

**Taula 8.1.** Dimensions del bioreactor pilot

<b>a</b>	7 cm
<b>b</b>	9 cm
<b>c</b>	3.5 cm
<b>d</b>	9.5 cm
<b>e</b>	33 cm
<b>f</b>	3 cm
<b>g</b>	9 cm
<b>h</b>	6 cm
<b>Φi (int)</b>	18 cm
<b>Φj (int)</b>	10 cm
<b>Φk (int)</b>	140 cm

Amb aquestes restriccions es va dissenyar del bioreactor a escala pilot, amb un angle d'expansió progressiva del llit des del cos central al capçal de 62°, i que es mostra a l'imatge 8.1 (esquerra) junt al reactor a escala laboratori de 1.5 litres.



**Imatge 8.1.** Muntatge experimental dels bioreactors fluiditzats de 10 i 1.5 l de volum útil.

### **Sistema d'aeració**

El flux polsant es genera com es descriu a l'apartat 3.4.1. del capítol de materials i mètodes generals, ja que s'utilitza el mateix sistema generador de polsos d'aire i la mateixa freqüència de pulsació que en els reactors petits. Per establir el cabal d'aeració en el bioreactor pilot es parteix de les dades de velocitat ascensional de l'aire que es donen en els bioreactors a escala laboratori. En el bioreactor de 0.5 l la velocitat ascensional és de 0.17 cm/s i en el de 1.5 l aquesta és de 0.19 cm/s, tal com es reflecteix a la taula 8.2. Amb un cabal d'aire de 50 l/h en el reactor pilot la velocitat ascensional és de 0.18 cm/s, semblant a la que es dona en els bioreactors a escala laboratori, per tant en principi s'estableix aquest cabal d'aeració com a cabal d'aeració d'operació, però un cop posat el sistema en marxa amb aquest cabal d'aire es produeixen moltes escumes i s'ha de baixar a 40 l/h. Es comprova experimentalment que amb aquest cabal no hi han problemes operacionals de formació d'escumes i s'estableix com a cabal d'aeració d'operació.

La velocitat ascensional de l'aire en el bioreactor pilot corresponent a aquest cabal és de 0.14 cm/s.

El cabal d'aire que entra al bioreactor no és constant, durant el temps que la vàlvula d'agulla està tancada l'aire es va acumulant a l'humidificador i quan s'obre la vàlvula passa tot de cop, per tant en un segon s'introdueix l'aire que hauria d'haver passat en els cinc segons anteriors més el corresponent al segon d'obertura de la vàlvula. El volum d'aire que entra en el bioreactor en un segon és de 66.6 cm<sup>3</sup>, i aquest fa augmentar el nivell de líquid del bioreactor, que queda minimitzat per l'eixamplament del capçal i només augmenta 2.6 mm cada vegada que es produeix el pols d'aire. Visualment s'observa que els polsos d'aire provoquen una bona fluidització dels pèl·lets.

### 8.3.2. Estudi fluidodinàmic del bioreactor de 10 l

Abans de realitzar experiments de decoloració s'analitza el temps de mescla del reactor pilot. Per dur a terme aquest experiment s'omple el bioreactor d'aigua, i es posa en marxa el sistema d'aeració per polsos d'aire. Un cop el sistema està fluiditzant s'addiciona un pols de colorant de 50 ml de solució que conté 0.25 g del colorant Gris Lanaset G per la part inferior del reactor. A partir d'aquest moment s'agafen mostres en el punt de presa de mostra que està situat a la part superior del bioreactor (imatge 8.1). Els resultats obtinguts es mostren a la figura 8.2.

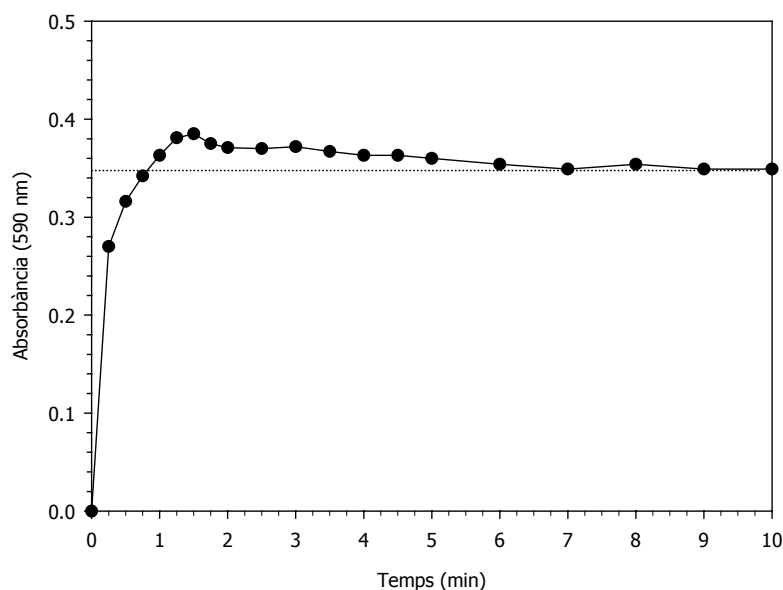
S'observa una petita fluctuació durant els dos primers minuts que es va suavitzant al llarg del temps fins que s'arriba al minut sis, on es pot considerar que s'ha assolit l'estabilitat, ja que les diferències d'absorbància en les mostres són molt petites, i per tant es consideren mesures representatives del sistema. En els reactors de 0.5 i 1.5 l de volum útil, els temps de mescla experimentals sense biomassa són de 4.5 i 2.5 minuts respectivament (determinats en el capítol 4). Com es pot veure a la taula 8.2, el temps de mescla està relacionat amb la velocitat ascensional del gas, com més petita és aquesta, més gran és el temps de mescla.

Un cop determinat el temps de mescla introduint el traçador per la part inferior del bioreactor, que és per on entra l'aliment, es determina el temps de mescla introduint el traçador per la part superior, ja que reactius com l'àcid i la base, per controlar el pH, l'antiespumant, etc. s'addicionen al reactor per la part superior. En aquest cas se segueix la mateixa metodologia que anteriorment però s'addiciona un pols de colorant de 50 ml de solució que conté 0.70 g del colorant

Gris Lanaset G per la part superior del reactor, i també es prenen les mostres per la part superior per analitzar el color. Els resultats es mostren a la figura 8.3.

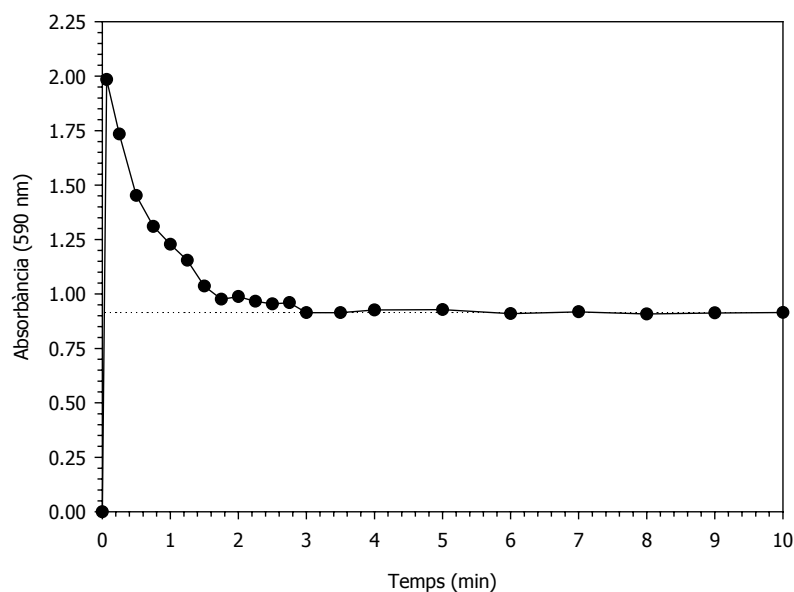
**Taula 8.2.** Velocitats ascensionals de l'aire i temps de mescla en els diferents bioreactors

<b>Volum (l)</b>	<b>Cabal d'aire (l/h)</b>	<b>Velocitat ascensional (cm/s)</b>	<b>Temps de mescla (min)</b>
0.5	12	0.17	4.5
1.5	30	0.19	2.5
10	40	0.14	6



**Figura 8.2.** Temps de mescla del bioreactor de 10 l sense biomassa, introduint el traçador per la part inferior del bioreactor.

S'observa en la figura 8.3 com el temps de mescla disminueix considerablement, ja que a partir del minut tres es pot considerar que les mesures d'absorbància són representatives del sistema. Al realitzar la injecció del pols per la part superior, durant els primers minuts, fins que s'homogeneïtza el sistema, la concentració de colorant és molt elevada a la part superior del reactor, i aquest fet queda reflectit en la gràfica, però s'assoleix l'homogeneïtzació ràpidament.

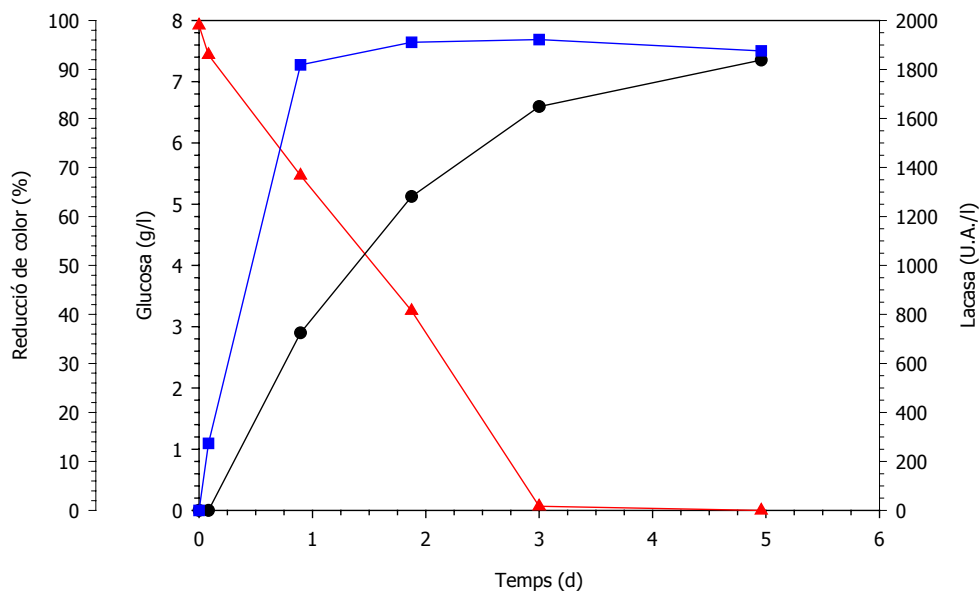


**Figura 8.3.** Temps de mescla del bioreactor de 10 l sense biomassa, introduint el traçador per la part superior del bioreactor.

Aquest comportament facilita el control automàtic d'algunes variables com el pH doncs l'acció de control feedback consisteix en activar una bomba per l'addició d'un component. Això requereix que la sonda (situada a prop del punt d'addició) detecti ràpidament l'efecte de l'addició i pugui desactivar la bomba ràpidament. Altrament provocaria una addició excessiva de reactiu i per tant desestabilitzacions de la variable controlada.

### 8.3.3. Operació en discontinu del bioreactor pilot

La figura 8.4 mostra els resultats de decoloració obtinguts en un procés en discontinu amb una concentració inicial de colorant de 150 mg/l, i el medi de tractament en discontinu descrit a l'apartat 3.2.2. del capítol de materials i mètodes. S'observa que en 24 hores s'assoleix una decoloració superior al 90% i al final del procés en discontinu, transcorreguts 5 dies, la reducció de color és del 94%. L'activitat lacasa extracel·lular augmenta des de l'inici del procés fins a 1838 U.A./l al final del procés, i la glucosa es consumeix quasi totalment durant els primers 3 dies de tractament.



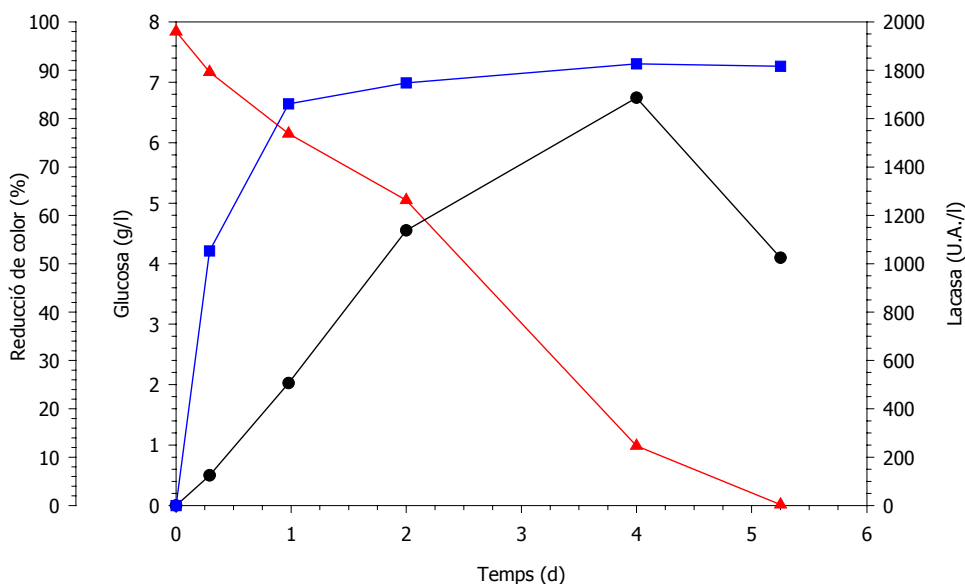
**Figura 8.4.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en discontinu amb TRH de 48 h i volum de bioreactor 10 l.

Si es comparen aquests resultats amb els obtinguts en el bioreactor de 0.5 l (figura 8.5) s'observa que el sistema segueix el mateix comportament. La diferència principal que s'observa és que el consum de glucosa en el reactor pilot és més ràpid que en el bioreactor de 0.5 l. En aquest la glucosa s'esgota el cinquè dia de tractament, quan s'atura el procés, en canvi en el reactor pilot s'esgota transcorreguts tres dies. Aquest fet pot ser degut a que en el reactor pilot l'eficàcia de la transferència d'oxigen sigui millor. S'observa també que en el reactor pilot s'assoleixen percentatges de decoloració superiors al 90% més ràpidament que en el bioreactor a escala laboratori. L'activitat lacasa màxima assolida en ambdós sistemes és similar, lleugerament superior en el reactor pilot.

Al final del procés discontinu en el bioreactor de 10 l s'observa que la fluïdització és lenta, degut al increment de la biomassa en el bioreactor, provocada pel creixement. En els bioreactors a escala laboratori aquest creixement de biomassa durant l'etapa discontinua no afecta a la fluïdització, perquè probablement no hi ha tant creixement de biomassa. Per tant no es pot descartar que les diferències en el comportament no siguin degudes a la diferent concentració de biomassa. Per evitar problemes operacionals de fluïdització es decideix disminuir la



quantitat d'inòcul inicial en el bioreactor de 10 l en els següents experiments. Es passa de inocular 3.2 g de pes sec/l a inocular 2.5 g de pes sec/l. Aquest fet és una millora del sistema ja que es redueix en més d'un 20% els requeriments d'inòcul i la producció de pèl·lets és un punt crític del procés.



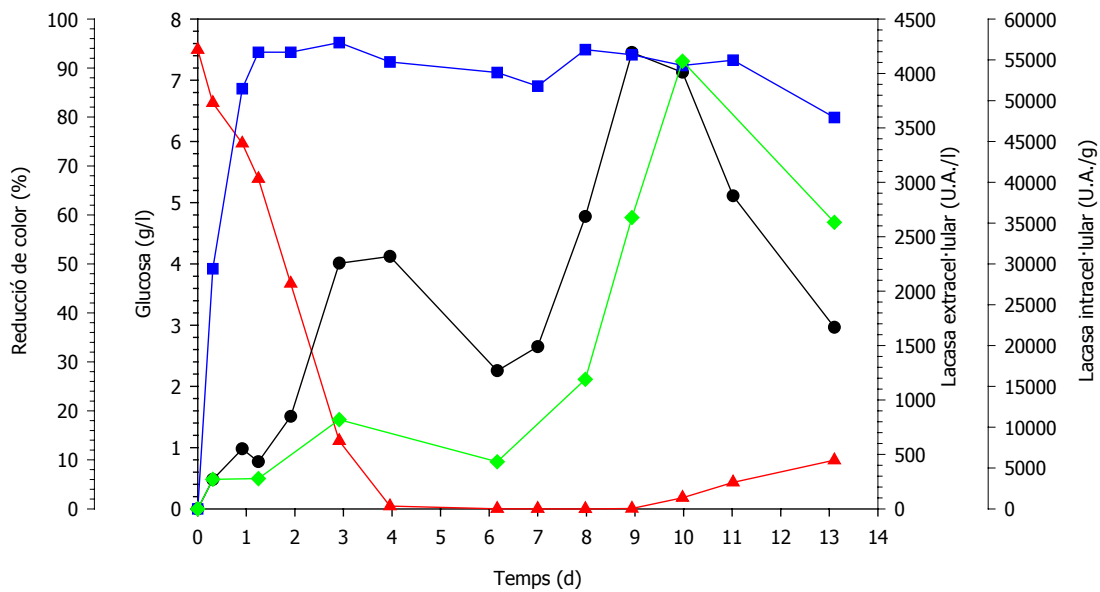
**Figura 8.5.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en discontinu amb TRH de 48 h i volum de bioreactor 0.5 l.

### 8.3.4. Operació en continu amb el reactor pilot

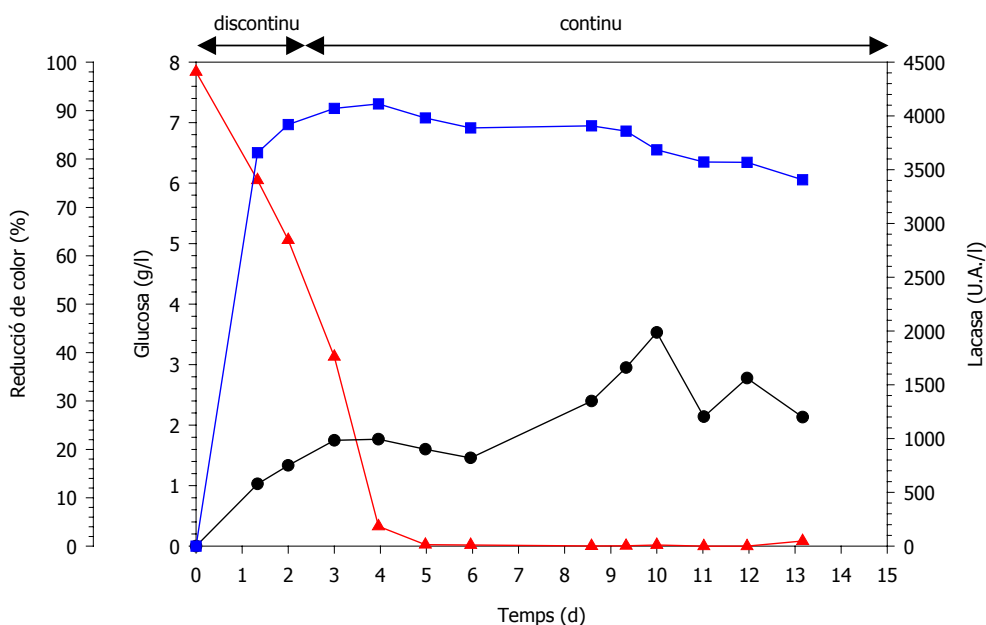
A la figura 8.6 es mostren els resultats obtinguts en un procés continu en el bioreactor de 10 l. Després d'una etapa discontinua de 3 dies, s'inicia el funcionament en continu i es manté durant 10 dies, amb el medi descrit a l'apartat 3.2.2. del capítol de materials i mètodes generals, amb un temps de residència hidràulic de 48 hores. En aquest experiment es mesura tant l'enzim intracel·lular com l'extracel·lular, perquè s'ha demostrat que tots dos intervenen en el procés de decoloració (Capítol 5).

L'activitat enzimàtica extracel·lular màxima és de 4192 U.A./l, molt superior a la obtinguda en el procés en discontinu, 1838 U.A./l (fig. 8.4). Aquesta activitat màxima s'assoleix al novè dia de tractament, i a partir d'aquí comença a disminuir fins que s'atura el procés el 13è dia de tractament. En canvi el percentatge de decoloració es manté aproximadament constant al 90% durant tot el procés.

S'observa que l'enzim intracel·lular presenta un perfil similar al que presenta l'enzim extracel·lular, expressat en diferents unitats. L'enzim intracel·lular presenta un màxim de 55000 U.A./g el desè dia de tractament. Si es compara aquest experiment amb un realitzat en un bioreactor de 0.5 l amb el mateix temps de residència hidràulic, 48 h (figura 8.7), s'observa que el comportament és molt similar, tot i que amb el bioreactor pilot s'assoleixen activitats extracel·lulars més elevades, aproximadament el doble, i la decoloració excepte en el últim punt és sempre superior al 90% en el bioreactor pilot.



**Figura 8.6.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa extracel·lular (●), activitat lacasa intracel·lular (◆) i percentatge de decoloració (■) en continu amb TRH de 48 h i volum de bioreactor 10 l.



**Figura 8.7.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en continu amb TRH de 48 h i volum de bioreactor 0.5 l.

#### 8.4. Discussió dels resultats

En ambdós processos la reducció de color més important es dona en les primeres 24 hores de tractament, durant les quals els pèl·lets queden completament foscos degut a l'adsorció inicial el colorant. A partir de les 24 hores els pèl·lets s'aclareixen, inclús en el procés en continu quan s'està alimentant colorant al bioreactor contínuament. Es demostra d'aquesta manera que la decoloració no és deguda a un procés d'adsorció.

Els resultats demostren que el reactor petit dissenyat té un comportament similar als de laboratori, atensant rendiments de decoloració de fins el 90%.

S'ha avaluat la qualitat de l'efluent analitzant els metalls presents i la toxicitat. La taula 8.4 mostra, pel procés en discontínu, el contingut en metalls a l'inici i al final del procés. A la fase líquida s'obté una reducció del 20% per ambdós metalls, crom i cobalt. Aquesta disminució de metalls en la fase líquida és deguda a l'adsorció sobre la fase sòlida, i una petita part està lligada al colorant residual.

Pel procés en continu es mostra el contingut en metalls en el medi líquid en diferents etapes del procés. Es pot observar que el tercer dia, just abans d'iniciar el procés en continu el contingut en metalls és inferior que a l'inici, es redueix un 15% el contingut en crom i un 35% el contingut en cobalt. Això és degut a l'adsorció del

colorant sobre la biomassa en les primeres hores del tractament. Durant els dies següents augmenta el contingut en metalls degut a l'alimentació contínua de colorant. En estat estacionari (9 dies) la concentració de crom i cobalt hauria de ser aproximadament igual a la d'entrada, que és el que s'observa (taula 8.3), però quan la decoloració disminueix vol dir que una part més gran de colorant adsorbit no es degrada i per tant no es desadsorbeixen els productes i fa que la concentració de metalls en el medi líquid sigui més petita, que és el que s'observa al final del tractament, a més de que una major part de metalls està lligada al colorant.

L'ús de l'efluent final per altres processos en la indústria és possible degut al baix contingut en metalls i al fet de que l'efluent no és tòxic ( $EC_{50} > 3$ ), tal com es mostra a la taula 8.3.

**Taula 8.3.** Principals paràmetres estudiats en els experiments amb el bioreactor pilot

	Procés discontinu		Procés continu			
	0 dies	5 dies	0 dies	3dies	9dies	13dies
% Reducció de color	0	93.8	0	95.2	92.7	92.2
Glucosa (g/l)	7.92	0	7.5	1.11	0.005	0.148
Lacasa extracel·lular (U.A./l)	0	1838	0	2255.8	4192.16	2423
Lacasa intracel·lular (U.A./g)	0	30	0	35.74	166.74	237.77
Cr medi líquid (ppm)	1.11	0.87	1.31	1.11	1.34	1.13
Co medi líquid (ppm)	0.57	0.46	0.57	0.37	0.57	0.55
Toxicitat ( $EC_{50}$ )			13.26	26.07	20.94	26.64

## 8.5. Conclusions

S'ha realitzat el disseny d'un reactor pilot de volum útil de 10 l, en base a la similitud geomètrica amb els d'escala inferior utilitzats, tenint en compte dos restriccions: l'alçada de la cambra termostatitzada on ha d'anar ubicat el bioreactor i el volum útil contingut en el capçal del bioreactor.

Estudis fluidodinàmics en el reactor pilot mostren que el temps de mescla sense biomassa introduint el traçador per la part inferior del bioreactor és de 6 min, i introduint el traçador per capçalera aquest temps de mescla es redueix a 3 min, aspectes que cal tenir en compte en futurs dissenys per situar l'instrumental de mesura i punt d'addició de components per als bucles de control.

En els experiments de decoloració en el bioreactor pilot, tant en discontinu com en continu amb un temps de residència hidràulic de 48 hores, s'obtenen percentatges de decoloració superiors al 90%.

La concentració de crom i cobalt en l'efluent de sortida és inferior a 3ppm, que és el límit de concentració de metalls d'un efluent per ser admès en una planta de tractament d'aigües residuals.

L'acció del fong sobre el colorant no dóna productes de degradació tòxics, i per tant l'efluent pot ser reutilitzat en un altre punt del procés en la indústria o inclús com a aigua de reg.

## 8.6. Bibliografia

- D**urand A. 2003. Bioreactors designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering J.* 13:113-125.
- K**intzios S, Kollias H, Straitouris E, Makri O. 2004a. Scale-up micropropagation of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in an airlift bioreactor and accumulation of rosmarinic acid. *Biotechnol. Let.* 26: 521-523.
- Kintzios S, Makri O, Pistola E, Matakadiadis T, Shi HP, Economou A. 2004b. Scale-up production of puerarin from hairy roots of *Pueraria phaseoloides* in an airlift bioreactor. *Biotechnol. Let.* 26: 1057-1059.
- Solà C, Gòdia F. Scale-Up. In *Bioreactor System Design*. Ed Asenjo JA i Merchuk JC. Marcel Dekker, Inc. 1994. New York.
- W**ong I, Hernández A, García MA, Segura R, Rodríguez I. 2001. Fermentation scale up for recombinant K99 antigen production cloned in *Escherichia coli* MC1061. *Process Biochemistry.* 37: 1195-1199.
- Z**hang ZY, Zhong JJ. 2004. Scale-up of centrifugal impeller bioreactor for hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high-density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Biotrechnol. Prog.* 20: 1076-1081.

## Capítol 9

### Adaptació del sistema pilot a condicions industrials

#### Resum

En aquest capítol es realitza una cerca de patents per a determinar l'existència d'invençions relatives a patents o procediments de tractament d'efluents en les quals s'emprin fongs ligninolítics. També es realitza una revisió bibliogràfica dels diferents treballs publicats realitzats, ja sigui a escala laboratori o pilot en els que es tracten aigües residuals no estèrils (sintètiques o reals) de la indústria tèxtil amb fongs ligninolítics.

Es realitza el tractament del colorant en continu amb el bioreactor fluiditzat per polsos d'aire de 10 l, en el que s'introdueixen canvis paulatinament per adaptar el procés des de condicions de laboratori a condicions d'operació industrials. Aquests canvis són la no esterilitat del corrent d'entrada de colorant Gris Lanset G al sistema, la supressió dels macronutrients i micronutrients de l'aliment i la preparació de la dissolució de colorant amb aigua de xarxa, i per últim la substitució de la glucosa utilitzada per glucosa de qualitat industrial. Amb tots aquests canvis s'aconsegueix mantenir el sistema funcionant durant tres mesos amb diferents temps de residència hidràulics, de 48 a 72 hores, i temps de residència cel·lular constant de 21 dies, obtenint percentatges de decoloració per sobre del 70% la major part del temps.

Es realitza finalment un experiment amb aigües residuals reals d'una indústria tèxtil sense esterilitzar.

### 9.1. Introducció

S'ha realitzat una cerca de patents en bases de dades per a determinar l'existència d'invençions relatives a plantes o procediments de tractament d'efluents (residus industrials, agrícoles, etc.) en les quals s'empren fongs de podridura blanca pel tractament d'aquests. A la taula 9.1 es presenta un resum de patents relacionades amb el tractament d'efluents colorats amb fongs ligninolítics.

**Taula 9.1.** Patents relacionades amb el tractament de compostos i efluents colorats amb fongs ligninolítics.

	<b>Autors</b>	<b>Microorganisme</b>	<b>Configuració</b>	<b>Efluents</b>
Patent US 4,554,075	Chang <i>et al.</i> 1985	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Condicions estèrils	Bioreactor rotacional (2-3l) Discontinuu	Compostos organoclorats
Patent US 4,665,926	Chang <i>et al.</i> 1987	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Condicions estèrils	Bioreactor rotacional (2-3l) Discontinuu	Efluents de la indústria paperera
Patent US 5,091,089	Shen <i>et al.</i> 1992	<i>Myrothecium</i> i <i>Ganoderma</i> Condicions estèrils	Decoloració. Erlenmeyer	Colorants tèxtils + efluents colorats com melasses
Patent US 6,613,559 B2	Raghukumar <i>et al.</i> 2003	<i>Flavodon flavus</i> modificat Condicions estèrils	Decoloració + detoxificació. Erlenmeyer.	Melasses
Sol·licitud de patent WO 03/035561	Vanhulle <i>et al.</i> 2003	Fongs ligninolítics Condicions estèrils	Ozonització + tractament amb fongs o enzims immobilitzats. Erlenmeyer.	Aigües residuals tèxtils, efluents agrícoles.

A la patent US 4,554,075, "Process of degrading chloro-organics by "white-rot fungi" es descriu un procediment de degradació de compostos organoclorats mitjançant el fong *Phanerochaete chrysosporium* en un estat de metabolisme secundari i exposat periòdicament a una atmosfera enriquida en oxigen. La patent descriu a escala laboratori els experiments, realitzats en un reactor rotacional dotat de discos en els quals s'immobilitza el fong formant una biopel·lícula. El

procediment es pot dur a terme en continu o en discontinu en condicions estèrils o semi-estèrils i es poden tractar volums de 2 a 3 litres.

De la mateixa manera, a la patent US 4,655,926 dels mateixos autors que l'anterior, "Process of treating effluent from a pulp or papermaking operation", es descriu un procediment per decolorar efluents reals d'una indústria paperera en un reactor rotacional a escala laboratori en el que el fong, preferentment *Phanerochaete chrysosporium*, s'immobilitza en forma de biopel·lícula. Un cop està en condicions de metabolisme secundari, entra en contacte amb l'efluent. El procediment inclou una etapa d'addició de font de nitrogen i minerals, i exposició del fong a una atmosfera enriquida en oxigen. Afirment també com en la patent anterior que es pot operar en discontinu i en continu, però només presenten resultats d'operació en discontinu, tant en aquesta com en l'anterior.

S'han trobat patents com la US 5,091,089, "Microbial decolorization of wastewater" i la més recent US 6,613,559, "Simultaneous decolorization and detoxification of molasses spent wash using novel white rot-lignin-modifying fungus *Flavidon flavus*" en les quals es realitzen experiments només a escala Erlenmeyer. A la primera es descriu l'identificació i caracterització dels fongs *Myrothecium* i *Ganoderma* amb capacitat per decolorar colorants tèxtils en condicions estèrils. A la segona es descriu un procés de decoloració i de detoxificació d'efluents en condicions estèrils emprant el fong *Flavidon flavus* modificat. Aquest procediment és eficaç front colorants fenòlics i pigments de base melanoïdina. Es descriu que el procediment es pot dur a terme a concentracions salines elevades i que s'empra el fong en forma de miceli, però no descriu un procediment a gran escala.

En la sol·licitud de patent WO 03/035561, "Sustainable process for the treatment and detoxification of liquid waste" es descriu un procediment pel tractament d'efluents que comprèn una etapa de pretractament, generalment d'ozonització, i una segona etapa en la que es posen en contacte les aigües pretractades amb fongs ligninolítics o agents actius d'aquests. En aquesta sol·licitud es descriu també, que de manera preferent, el fong s'utilitza immobilitzat en un suport o encapsulat en una matriu polimèrica. Tot i que el procediment és efectiu d'acord amb les dades que figuren en els exemples de la sol·licitud, en aquests es descriu el tractament en discontinu de l'efluent a escala Erlenmeyer i no es mostra la manera de portar aquest procediment a escala industrial. Amés, aquest procediment té l'inconvenient de requerir dues etapes pel tractament de les aigües.



Es dedueix, per tant, que no existeix un mètode o procediment operable en continu, adaptat per la degradació de compostos tòxics i/o per decolorar a escala industrial grans volums de líquids o efluent residuals.

Per altra part s'han publicat quatre treballs en els que s'utilitzen bioreactors en condicions no estèrils per al tractament en continu de colorants amb fongs ligninolítics, que es resumeixen a la taula 9.2. Yang i Yu (1996) mantenen un reactor de biopel·lícula amb el fong *Phanerochaete chrysosporium* en condicions no estèrils durant 11 dies per al tractament del colorant dispers Red 533. El percentatge de decoloració es manté per sobre del 87% durant els primers 8 dies de tractament. No especifiquen per què s'atura l'experiment i afirmen que l'acidificació del medi per *Phanerochaete chrysosporium* (pH 3.1) minimitza el risc de contaminació.

Leidig *et al.* (1999) descriuen la biotransformació del colorant Poly R-478 amb *Trametes versicolor* encapsulat. La càpsula d'alcohol polivinílic protegeix el fong i les peroxidases de l'activitat bacteriana durant 6 setmanes. Però com en el cas anterior l'experiment s'atura i no es pot determinar la durada màxima d'operació en aquestes condicions.

Borchert i Libra (2001) descriuen la transformació del colorant diazo reactive black 5 en reactor de tanc agitat operant en discontinus repetits amb el fong *Trametes versicolor*, realitzant cicles. Mantenen l'experiment durant 55 dies (5 cicles). Durant els quatre primers cicles obtenen una decoloració del 91 al 98%, però en el cinquè cicle es perd totalment la capacitat de decoloració degut a la presència de bacteris. Libra *et al.* (2003) continuen treballant amb el fong *Trametes versicolor* pel tractament del colorant reactive black 5, provant diferents estratègies a escala Erlenmeyer per poder mantenir el percentatge de decoloració a nivells elevats operant en condicions no estèrils. Aconsegueixen percentatges elevats de decoloració del colorant en condicions no estèrils fent créixer *T. versicolor* sobre grans de blat com a única font de carboni durant els dos primers cicles que duren 35 dies, però en el tercer el percentatge de decoloració no supera el 55%.

No s'han trobat publicacions on es tractin aigües residuals reals en continu en un bioreactor amb fongs ligninolítics.

Els objectius dels experiments realitzats en aquest capítol són:

- Tractament en continu del colorant Gris Lanaset G no estèril en el bioreactor amb fongs.

- Tractar aigües residuals reals en continu sense esterilitzar en el bioreactor amb fongs

**Taula 9.2** Publicacions relacionades amb el tractament de colorants en continu i condicions de no esterilitat.

<b>Autors</b>	<b>Microorganisme</b>	<b>Configuració</b>	<b>Efluents</b>
Yang i Yu 1996	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> No estèril	Reactor continu de biopel·lícula	Colorant Red 533
Leidig <i>et al.</i> 1999	<i>Trametes versicolor</i> No estèril	Reactor continu de tanc agitat.	Colorant Poly R-478
Borchert i Libra 2001	<i>Trametes versicolor</i> No estèril	Reactor de tanc agitat. Discontinus repetits	Colorant RB 5
Libra <i>et al.</i> 2003	<i>Trametes versicolor</i> No estèril	Immobilitzat sobre grans de blat. Erlenmeyer	Colorant RB 5

## 9.2. Materials i mètodes

La determinació del color, glucosa i lacasa està descrita a l'apartat 3.6 del capítol de materials i mètodes generals.

### 9.2.1. Equipament i condicions d'operació

S'utilitza el bioreactor fluiditzat per polsos d'aire de 10 litres de volum útil, descrit a l'apartat 8.3.1. del capítol 8. El bioreactor s'esterilitza buit i s'omple de medi de tractament en discontinu estèril que conté 150 mg/l del colorant Gris Lanaset G i nutrients, juntament amb l'inòcul inicial de *Trametes versicolor* de 50 g de biomassa humida/l en forma de pèl·lets, equivalent a 2.5 g/l de pes sec. El reactor opera en discontinu i un cop s'assoleix una concentració de glucosa en el medi aproximadament de 2 g/l s'inicia el tractament en continu. En els casos en que l'aliment no és estèril, la glucosa s'alimenta de forma separada, concentrada i estèril. El temps de residència hidràulic (TRH) inicial és de 48 hores. El pH es manté a 4.5 mitjançant un controlador de pH. La biomassa, en forma de pèl·lets queda retinguda en el bioreactor, sense pèrdues en el corrent de sortida, i el temps de

residència cel·lular és de 21 dies. La renovació de biomassa es realitza cada set dies segons la metodologia descrita a l'apartat 6.2.2 del capítol 6.

### 9.2.2. Característiques de les aigües residuals reals

La indústria Artèxtil S.A. de Sabadell (Barcelona) utilitza un bany de tinció (de 600 litres per tenyir 60 Kg de llana), la composició del qual es detalla a la taula 9.3. Després del procés de tinció s'obté un bany esgotat amb un pH de 5.2, del qual no es coneix la composició i és l'efluent tèxtil real que s'utilitza per al seu tractament al reactor amb fongs.

**Taula 9.3.** Composició del bany de tinció

<b>Component</b>	<b>Pes/Volum relatiu</b>
Esterol 126	1.0%
Àcid cítric	1.5 g/l
Amplex DG	1.0 g/l
Antiescumant SAE	0.3%
Gris Lanaset G	0.7491%
Groc Lanaset 2R	0.2677%
Vermell Lanaset G	0.1257%

\* els percentatges en pes són relatius al pes de fibra.

L'esterol 126 és un igualador, l'àcid cítric és per ajustar el pH i l'amplex DG és un additiu per evitar la reducció. Els tres últims components són els colorants utilitzats en el bany de tinció, tots tres subministrats per Ciba.

## 9.3. Resultats i discussió

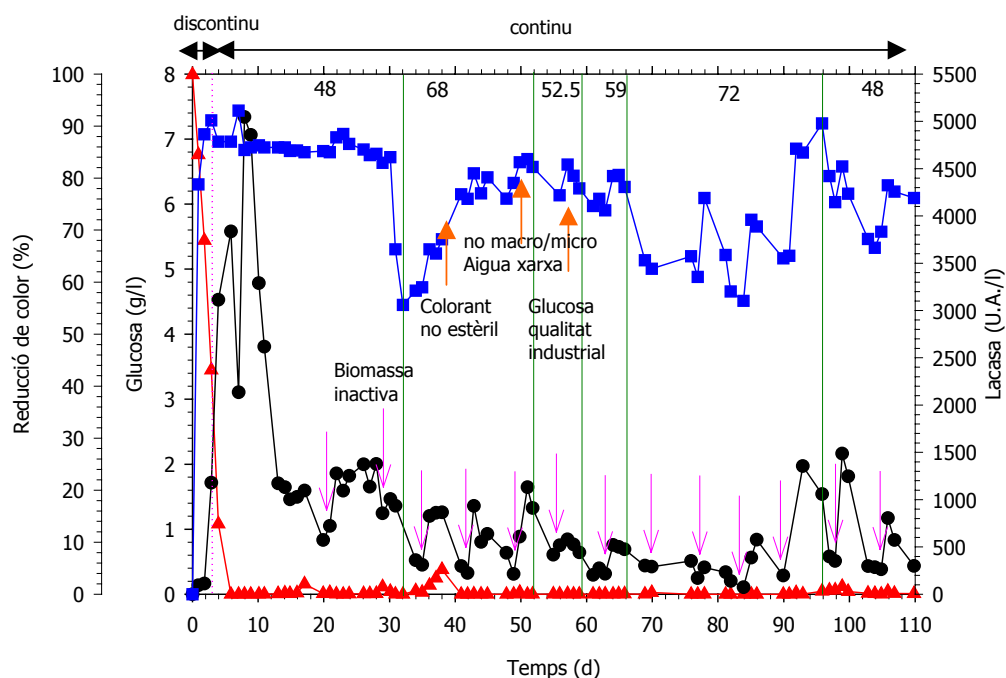
### 9.3.1. Tractament de la solució de colorant Gris Lanaset G

Es realitza un experiment amb el reactor de 10 litres on s'opera tal com es descriu en l'apartat 9.2.1 d'aquest capítol. Amb aquest experiment es pretén comprovar la robustesa del sistema davant possibles canvis introduïts, i també adaptar el procés a condicions industrials, com per exemple no esterilitzar l'aliment, eliminar els macronutrients i micronutrients, i substituir la glucosa de gran puresa per glucosa de qualitat industrial. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la figura 9.1.

L'etapa discontinua té una durada de tres dies, i el tercer dia, quan la concentració de glucosa en el medi és de 2g/l comença el tractament en continu de

la solució de colorant de 150 mg/l del colorant Gris Lanaset G, com en els experiments realitzats anteriorment.

↳ Fins el dia 31 el temps de residència hidràulic es manté a 48 hores, i s'obtenen percentatges de decoloració del 85%. A partir del dia 21 es comença el procés de renovació de biomassa, purgant i renovant un terç d'aquesta cada setmana, establint d'aquesta manera el TRC en 21 dies.



**Figura 9.1.** Evolució de la concentració de glucosa ( $\blacktriangle$ ), activitat lacasa ( $\bullet$ ) i percentatge de decoloració ( $\blacksquare$ ) en continu amb el bioreactor de 10 l. La fletxa  $\downarrow$  indica purga i renovació de biomassa.

↳ En la segona renovació de biomassa, realitzada el dia 28, s'introdueix accidentalment biomassa no activa en el bioreactor, el que permet analitzar la resposta del sistema a possibles problemes que podrien sorgir en relació a l'estat de la biomassa. Aquesta pertorbació provoca una disminució del rendiment de decoloració d'un 85 a un 55 %, el que equival a una reducció d'un terç del percentatge de decoloració.

↳ A partir d'aquest moment, dia 31, s'augmenta el TRH de 48 a 68 hores i les renovacions de biomassa següents es fan amb biomassa en perfectes condicions, i el sistema es recupera favorablement augmentant la decoloració.

☛ Quan la decoloració és del 77%, als 41 dies de tractament, es considera que el sistema s'ha recuperat i s'alimenta la solució de colorant en condicions no estèrils. Inclús amb el colorant no estèril el sistema continua recuperant-se fins assolir percentatges de decoloració del 83%, el dia 51 de tractament.

☛ A partir d'aquest moment s'eliminen els macronutrients i micronutrients de la solució de colorant d'entrada, es substitueix l'aigua destil·lada per aigua de xarxa, i es disminueix el temps de residència a 52.5 hores. El sistema es manté funcionant correctament, els canvis introduïts no afecten l'operació.

☛ A partir del dia 59 de tractament, quan la decoloració és del 78%, es substitueix la glucosa per glucosa de qualitat industrial, i el sistema es manté funcionant correctament.

☛ El dia 66, s'augmenta el TRH a 72 hores i es decideix comprovar el comportament del sistema alimentant la glucosa a una concentració inferior a la concentració corresponent a la velocitat de consum. En comptes d'alimentar la glucosa a una concentració de 3 g/l, que correspon a una velocitat de consum de 0.31 g glucosa/g de pes sec·d, s'alimenta a una concentració de 2 g/l, corresponent a 0.21 g glucosa/ g de pes sec·d, s'alimenta glucosa amb un dèficit del 33% respecte la corresponent a la velocitat de consum. Això fa disminuir el percentatge de decoloració a nivells entre el 60 i el 70%.

☛ A partir del dia 90 es restableix la concentració de glucosa corresponent a la de consum i el sistema es recupera assolint rendiments de decoloració superiors al 85%.

☛ Finalment, en l'últim període, a partir del dia 96 d'operació es disminueix el TRH a 48 hores i s'assoleixen percentatges de decoloració del 78%.

Per tant el procés s'ha dut a terme durant 70 dies tractant el colorant no estèril amb bons rendiments de decoloració (78% de mitjana), superant alguns problemes que fan decaure el rendiment de decoloració al 60%, i que confirmen que el sumistre de la font de carboni a la velocitat de consum és necessari.

A la imatge 9.1 es mostra una fotografia de la solució d'entrada i sortida del reactor en l'últim període.

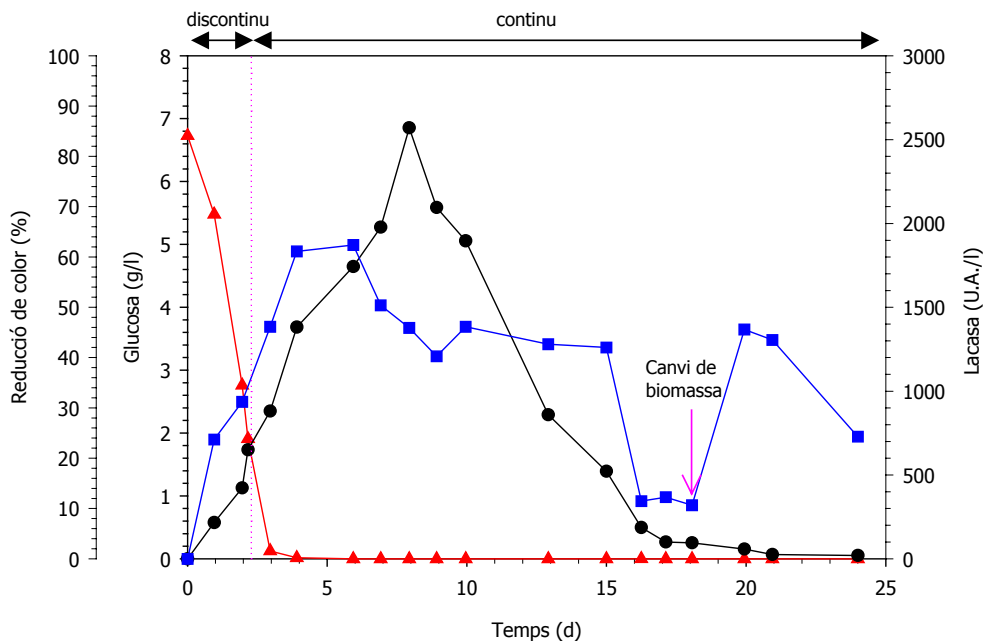


**Imatge 9.1.** Efluent d'entrada i sortida del bioreactor de 10 l en condicions no estèrils (78% decoloració).

### **9.3.2. Tractament en continu d'aigües tèxtils reals**

Els bons resultats obtinguts en el tractament del colorant no estèril permeten que es plantegi el tractament d'efluents reals, la procedència de les quals està descrita a l'apartat 9.2.2 d'aquest capítol. Inicialment però s'esterilitza el bioreactor buit i el medi inicial per separat. Aquest medi es prepara amb aigües residuals reals i la resta de nutrients del tractament discontinu. S'inocula el reactor amb 50 g de biomassa humida/l i opera en discontinu fins assolir una concentració de glucosa de 2 g/l. A partir d'aquest moment, el dia 3, comença el tractament en continu de l'efluent no estèril a un TRH de 48 hores. La glucosa s'alimenta per separat en condicions d'esterilitat. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 9.2.

Les aigües residuals presenten una absorbància molt inferior a la absorbància inicial de les solucions de colorant sintètiques utilitzades fins ara, que era de 1.8-2 unitats per una concentració de 150 mg / l de colorant Gris Lanaset G. L'absorbància inicial d'aquestes aigües és de 0.370 unitats a 590 nm, per tant són aigües amb menys color. S'assoleix una reducció de color màxima del 60%, aquesta decoloració decau fins al 40% i es manté fins el dia 15 de tractament. El 40% d'eliminació de color suposa un efluent amb una absorbància de 0.222 unitats a 590 nm. Si es dilueix la solució tractada 30 vegades, el color és inapreciable, per tant encara que la reducció de color sigui del 40%, l'aigua tractada podria ser admesa en una EDAR si ho requerís.



**Figura 9.2.** Evolució de la concentració de glucosa (▲), activitat lacasa (●) i percentatge de decoloració (■) en continu d'aigües residuals tèxtils reals amb TRH de 48 h en bioreactor de 10 l.

Durant el període de tractament es detecta una elevada contaminació bacteriana en el tanc d'alimentació, el que provoca una excessiva contaminació del bioreactor. El dia 15, s'intenta reduir la contaminació rentant amb una solució de NaCl 0.1 % i reintroduint nova aigua residual. Malgrat tot, el sistema no es recupera.

A l'imatge 9.2 es mostren les aigües residuals d'entrada i sortida del bioreactor, on es pot observar el color de les aigües amb una reducció del 40% del color inicial.



**Imatge 9.2.** Efluent d'entrada i sortida de les aigües residuals reals en condicions no estèrils en el bioreactor de 10 l (reducció 40%).

Borchert i Libra (2001) demostren que l'activitat de les peroxidases presents en un cultiu de *Trametes versicolor* disminueix molt més ràpidament en presència de bacteris que en cultius purs. No especifiquen si la manca d'activitat és deguda a l'inactivació de l'enzim o a la falta de producció. De fet a la figura 9.2 s'observa que l'activitat lacasa decau fins a nivells molt baixos, i que no és capaç de recuperar-se ni amb la introducció de biomassa fresca al sistema.

Una possible solució als problemes de contaminació és la reducció del pH d'operació. Aquest pH però no pot ser inferior a 3.5, *Trametes versicolor* a partir d'aquest pH deixa de créixer i de produir enzims (Borchert i Libra, 2001). Aquesta és una solució a curt termini, perquè transcorregut un cert temps els bacteris s'adapten al nou pH, tot i que segurament la contaminació no seria tan important. Seria interessant provar la reducció del pH en els tancs d'emmagatzematge, per evitar la contaminació en aquests i continuar operant a pH 4.5. Aquesta és una inactivació química temporal, i una altra possibilitat per reduir la contaminació és aplicar un xoc tèrmic a l'efluent a tractar abans d'entrar al bioreactor, que és una inactivació tèrmica menys dràstica que l'esterilització.

A l'imatge 9.3 es mostra una fotografia del bioreactor durant el tractament en continu de les aigües residuals tèxtils reals.



**Imatge 9.3.** Fotografia del reactor pilot durant el tractament d'aigües residuals reals de la indústria tèxtil.



S'observa que la biomassa està poc tenyida, corroborant que la decoloració de l'efluent és deguda majoritàriament a la biotransformació. S'aprecia també el moviment i fluïdització dels pèl·lets provocats pels polsos d'aire.

#### **9.4. Conclusions**

Es tracta en continu la solució del colorant Gris Lanaset G i s'adapta el sistema experimental a condicions industrials, introduint les següents millores:

- la no esterilitat de la solució de colorant que s'ha de tractar,
- la supressió de macronutrients i micronutrients en la solució de colorant i
- la utilització de glucosa de qualitat industrial,

S'aconsegueix treballar en continu durant 3 mesos, un període més llarg del referenciat a la bibliografia fins al moment. Durant aquest temps s'ha fet front a pertorbacions provocades, i altres accidentals obtenint rendiment de decoloració superiors al 70%.

Quan es tracten aigües residuals reals de la indústria tèxtil sense esterilitzar els rendiments de decoloració assolits estan entre el 40 i el 60% durant 15 dies. És important tenir en compte que el percentatge d'eliminació de color assolit es menor que l'assolit al treballar amb colorant, però això és degut a que l'efluent real presenta menor coloració inicial que les dissolucions de colorant Gris Lanaset G utilitzades. El rendiment de decoloració assolit però, és suficient per obtenir un efluent que compleix els requeriments per ser admès a una EDAR.

Es comprova que la contaminació bacteriana es produeix al tanc d'emmagatzematge de les aigües residuals tèxtils, per tant s'haurien de provar diferents estratègies per evitar la seva massiva contaminació.

#### **9.5. Bibliografia**

Borchert M, Libra J. 2001. Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):313-321.

Chang H, Joyce TW, Kirk TK, Huynh V. 1985. N° Patent 4,554,075. Process of degrading chloro-organics by white rot fungi.

Chang H, Joyce TW, Kirk TK, Huynh V. 1987. N° Patent 4,655,926. Process of treating effluent from a pulp or papermaking operation.

- L**eidig E, Prusse U, Vorlop K, Winter J. 1999. Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Bioprocess Engineering*. 21(1):5-12.
- L**ibra J, Borchert M, Banit S. 2003. Competition strategies for the decolorization of atextile-reactive dye with the white rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 82(6):736-744.
- R**aghukumar C, Shailaja MS. 2003. Nº Patent 6,613,559 B2. Simultaneous decolorization and detoxification of molasses spent wash using novel white rot-lignin-modifying fungus *Flavodon flavus*.
- S**hen HP, Mou DG, Lim KK, Feng P, Chen CH. 1992. Nº Patent 5,091,089. Microbial decolorization of wastewater.
- V**anhulle S, Lucas M, Mertens V, Gobeaux B, Corbisier AM, Bols CM, Buchon F, Wesenberg D, Agathos S. 2003. Sol·licitud de patent Nº WO 03/035561 A2. Sustainable process for the treatment and detoxification of liquid wate.
- Y**ang FC, Yu JT. 1996. Development of a bioreactor system using immobilized white rot fungus for decolorization. Part II: continuous decolorization tests. *Bioprocess Eng.* 16:6-11.

## Capítol 10

### **Avaluació econòmica i valoració ambiental del procés biotecnològic de tractament d'efluents tèxtils i comparació amb el procés fisicoquímic**

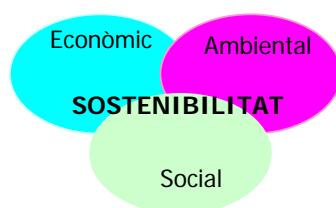
Els experiments de compostatge presentats en aquest capítol formen part del treball de Tesi de Teresa Gea, i han estat realitzats a l'Escola Universitària Politècnica de Medi Ambient de Mollet.

#### **Resum**

En aquest capítol es compara la viabilitat econòmica i ambiental de dos processos que tenen per objectiu l'eliminació del colorant tèxtil Gris Lanaset G de les aigües residuals. Per valorar l'aplicabilitat del procediment d'eliminació del colorant de les aigües residuals mitjançant el fong *Trametes versicolor*, es compara aquest procés amb el procediment més utilitzat a escala industrial actualment: l'adsorció sobre carbó actiu. Per cadascun dels dos processos es fa una anàlisi dels residus generats i de la seva valorització o disposició final. Aquesta avaluació es fa a partir de l'informació obtinguda en els experiments de laboratori, però aproximant-nos a les característiques dels tractaments a escala industrial. Finalment en aquest capítol es realitza una avaluació qualitativa dels impactes ambientals de cadascun dels processos.

### 10.1. Introducció

La sostenibilitat és la característica d'un estat o procés que pot romandre estable indefinidament, de manera que el Desenvolupament Sostenible és una meta necessària si es vol fer compatible el benestar actual dels països desenvolupats amb el de les futures generacions. Des de la publicació de l'informe Burtland l'any 1987, en el qual es va proclamar que aquesta havia de ser la meta central de la política ambiental, la investigació sobre eines per assolir el desenvolupament sostenible ha estat contínua. Tal com es mostra a la figura 10.1, s'han de tenir en compte els aspectes econòmics, socials i ambientals per determinar la sostenibilitat d'un procés.



**Figura 10.1.** Representació de la intersecció de prioritats per assolir el Desenvolupament Sostenible

Fins als anys 80 les polítiques sobre les problemàtiques ambientals associades a la indústria s'havien centrat en la depuració i tractament dels efluentes generats, tractaments al final de canonada. La investigació en el camp de l'enginyeria ambiental, buscava tractaments que resolguessin els impactes causats per la producció industrial, centrant-se en buscar solucions als danys ambientals causats pels efluentes. Actualment, en canvi, nous camps com l'Ecologia Industrial volen donar una nova visió, més global, a la solució dels impactes ambientals d'origen industrial. El sistema industrial no s'analitza de forma aïllada sinó que les problemàtiques vinculades als processos de producció són analitzades dins l'entorn (natural i industrial) en el que es troba situada l'empresa, i es busca evitar l'existència dels impactes ambientals, no la remediació. Es pretén donar un nou enfoc als sistemes industrials, buscant o creant interdependències entre els elements que el conformen, per tal de passar d'un model lineal de consum a un model cíclic (Jelenski et al., 1992), tal com mostra la figura 10.2. A la figura 10.3 es mostra un possible model de cicle tancat del procés de tractament desenvolupat en aquest treball de recerca, des de la generació de les aigües colorades fins a la seva reutilització, passant pel tractament i la valorització dels residus generats durant el

tractament. Se suposa que abans de la generació de les aigües colorades, la indústria ha aplicat mesures de minimització de residus, tecnologies netes, etc.

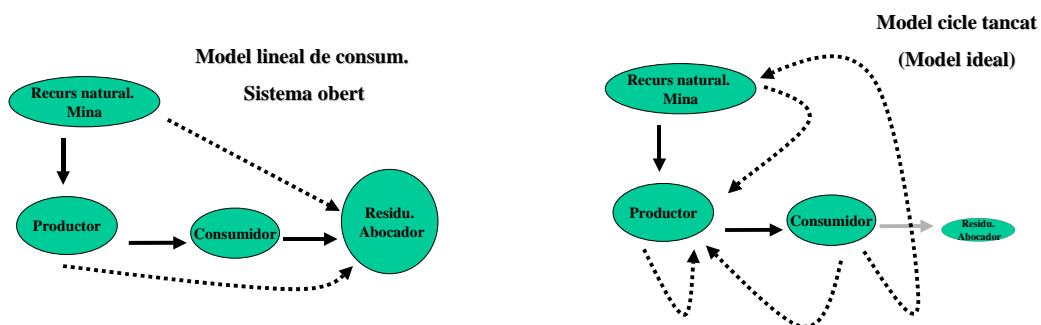


Figura 10.2. Comparació dels models de producció obert i tancat (Sendra, 2004).

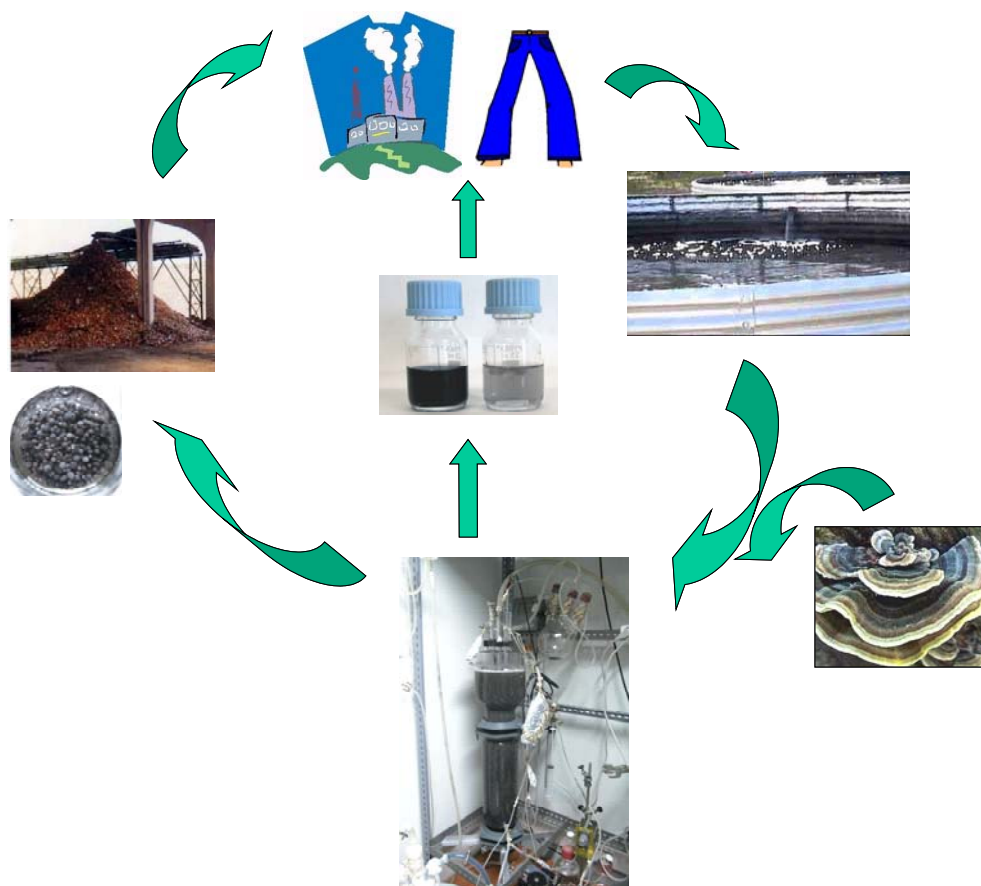


Figura 10.3. Cicle tancat del tractament biotecnològic de decoloració d'aigües residuals tèxtils.

En el procés biotecnològic proposat consisteix en tractar aigües generades en els processos de tenyit mitjançant un fong retingut en un bioreactor. El tractament genera dos corrents de sortida del bioreactor, un corrent continu d'aigua decolorada, i un corrent discontinu de biomassa provinent de la purga periòdica del reactor. Les aigües decolorades, per les seves característiques no tòxiques (taula 8.3) es podrien utilitzar en qualsevol altre punt del procés industrial o com aigua de reg, i la biomassa es podria compostar juntament amb altres residus, per poder ser utilitzat finalment com adob.

Un procés industrial sostenible busca la màxima eficiència en l'ús dels recursos, per tal de minimitzar el consum de matèries primeres i la generació de residus. Per tal d'aconseguir-ho l'ecologia industrial utilitza eines i disciplines desenvolupades en les últimes dècades, entre les quals es destaquen (Ayres R i Ayres L, 2002; Lowe *et al.*, 1997):

- La producció més neta (Cleaner Production, CP)
- Disseny pel Medi Ambient (Design for the Environment, DfE)
- Valoració i Anàlisi del Cicle de Vida (Life-Cycle Analysis and Assessment, LCA)
- Anàlisi de Fluxos de Materials (Material Flow Analysis, MFA) i Necessitats Totals de Materials (Total Material Requirement, TMR)
- Índex Verd (Green Index, GI)
- Anàlisi d'Ecoeficiència (Eco-Efficiency Analysis, EEA)

L'objectiu d'aquest capítol és la realització d'un estudi econòmic i ambiental dels processos biotecnològic i fisicoquímic, amb la finalitat de comparar-los econòmicament i ambientalment. Els mètodes que s'utilitzen per determinar la sostenibilitat del procés són l'Índex Verd i l'Anàlisi d'Ecoeficiència.

## **10.2. Resultats i discussió**

El fong provinent de la purga del bioreactor és una font de carboni important, i un dels objectius d'aquest capítol és comprovar si el residu es pot aprofitar valoritzant-lo. A més de veure si és possible el procés de compostatge amb el fong, s'avalua la qualitat del producte final tenint en compte que el colorant Gris Lanaset G conté metalls i poden quedar adsorbits en la biomassa.

L'avaluació econòmica i valoració ambiental es realitza en base als resultats obtinguts en els experiments d'adsorció en carbó actiu i dels resultats obtinguts en

el reactor biològic i en el compostatge del fong. En l'avaluació econòmica de cada procés s'ha tingut en compte el cost del carbó actiu pel procés fisicoquímic, el creixement i manteniment dels microorganismes pel tractament biològic, el cost de l'energia necessària pel funcionament d'un hipotètic procés industrial, i la disposició final del carbó actiu/biomassa en cada cas.

Abans d'afrontar l'avaluació econòmica i ambiental es presenten els resultats obtinguts en un estudi preliminar per valorar les possibilitats de compostatge del fong.

### 10.2.1. Compostatge de la biomassa purgada

#### ✓ Co-compostabilitat de *Trametes versicolor* amb FORM

En aquest apartat s'avalua el potencial de co-compostabilitat del fong *Trametes versicolor* provinent del procés biològic amb la fracció orgànica dels residus municipals (FORM), provinents de la planta de compostatge de Jorba (província de Barcelona) i l'efecte de la seva addició sobre el procés de compostatge.

Es realitzen tres experiments de compostatge:

- Dos experiments amb barreja FORM+fong al 7.5% en pes.
- Un control amb FORM sense addició de fong.

La FORM emprada en aquests experiments es mescla amb una fracció vegetal com estructurant. Per a una millor homogeneïtzació del material, es garbella a 80 mm, i s'empra la fracció fina pels experiments de compostatge.

Aquests experiments es realitzen en vasos Dewar condicionats pel seu ús com a reactors de compostatge situant una xarxa rígida al fons per separar el material de possibles lixiviats, i perforant la tapa per permetre l'entrada d'aire, la monitorització del contingut en oxigen i la inserció d'una sonda de temperatura.

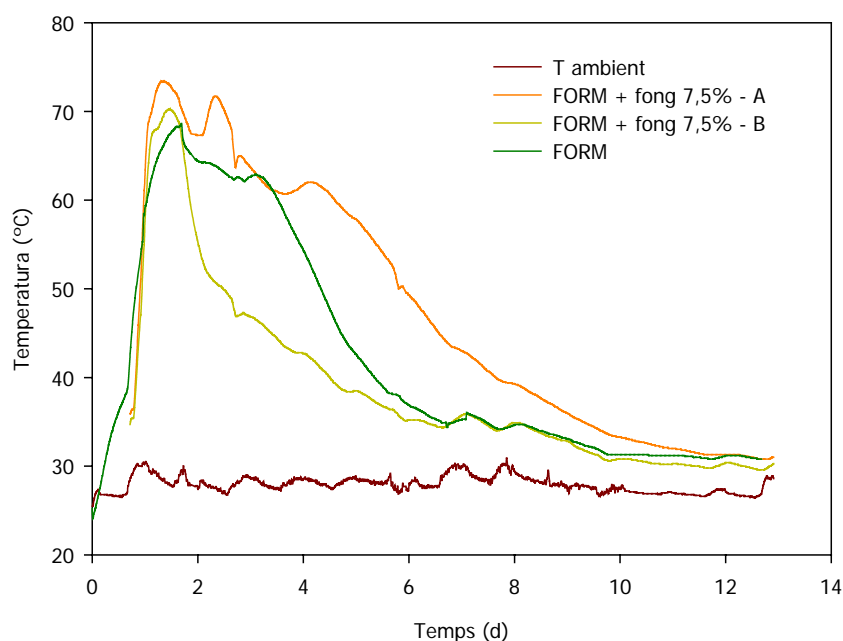
Les mesures d'oxigen es realitzen manualment amb un sensor portàtil d'oxigen i un mecanisme manual d'aspiració de gasos. El cabal d'aeració s'ajusta manualment per assegurar un contingut en oxigen adient per garantir condicions aeròbies durant tot l'experiment de compostatge.

La mesura de temperatura es realitza mitjançant sondes Pt-100 inserides a la meitat de la profunditat del material, i connectades a un sistema d'adquisició de dades.

Com a paràmetres d'estabilitat s'han avaluat el Test d'Autoescalfament, que mesura la calor despresa durant la respiració microbiana associada a un vas Dewar,

i l'Índex Repiromètric, que determina la velocitat a la que els microorganismes respiren, oxidant la matèria orgànica.

Com es pot observar a la figura 10.4, el perfil de temperatures es correspon amb el perfil típic dels processos de compostatge. En tots tres experiments es produeix un ràpid escalfament del material, arribant a temperatures superiors a 60° C en les primeres 24 hores de procés. Aquestes temperatures elevades es mantenen prou temps per assegurar la higienització del material en el punt de mesura.



**Figura 10.4.** Evolució de la temperatura en els diferents experiments de compostatge amb FORM.

A la taula 10.1 es pot observar com les temperatures màximes que s'assoleixen en els tres experiments són similars, al voltant dels 70°C, en canvi s'aprecien diferències importants en la durada de l'etapa termòfila per a les dues rèpliques (temperatures superiors als 45°C).

Tot i les diferències observades, les elevades temperatures assolides i la durada d'aquestes asseguren la higienització del material i indiquen que la fase de descomposició es porta a terme de forma adient tant en l'experiment control com en les mescles amb *Trametes versicolor*.



**Taula 10.1.** Resultats del experiments de compostatge.

Paràmetre	FORM + 7.5% fong (A)	FORM + 7.5% fong (B)	FORM Experiment Control
Temperatura màxima assolida [°C]	73.4	70.3	68.6
Durada fase termófila (T > 45°C) [dies]	5.71	2.49	3.96
Test Autoescalfament	GRAU V	GRAU V	GRAU III
Índex Respiromètric [mg O <sub>2</sub> /g MOT.h]	1.30	1.58	4.33

Respecte els paràmetres d'estabilitat considerats, el Test d'Autoescalfament i l'Índex Respiromètric, s'observa que per mescles amb *Trametes versicolor* s'assoleixen valors d'estabilitat o molt propers – es considera compost madur grau V i valors d'IR entre 0.5 i 1.5 mg O<sub>2</sub>/g MO·h – mentre que l'experiment control se situa lluny de l'estabilitat. Per tant es pot concloure que *Trametes versicolor* és un bon additiu per al compostatge.

Es realitzen anàlisis del contingut en metalls Cr i Co del compost final estabilitzat però degut a la heterogeneïtat de les mostres els resultats obtinguts són molt dispersos i poc fiables, per tant no es pot determinar si el producte obtingut presenta les característiques adients pel seu ús com adob orgànic.

Aquest fet i la dispersió de les rèpliques dificulta un anàlisi més complert i es tria un altre residu per valorar la co-compostabilitat del fong.

✓ **Co-compostabilitat de *Trametes versicolor* amb llots de depuradora**

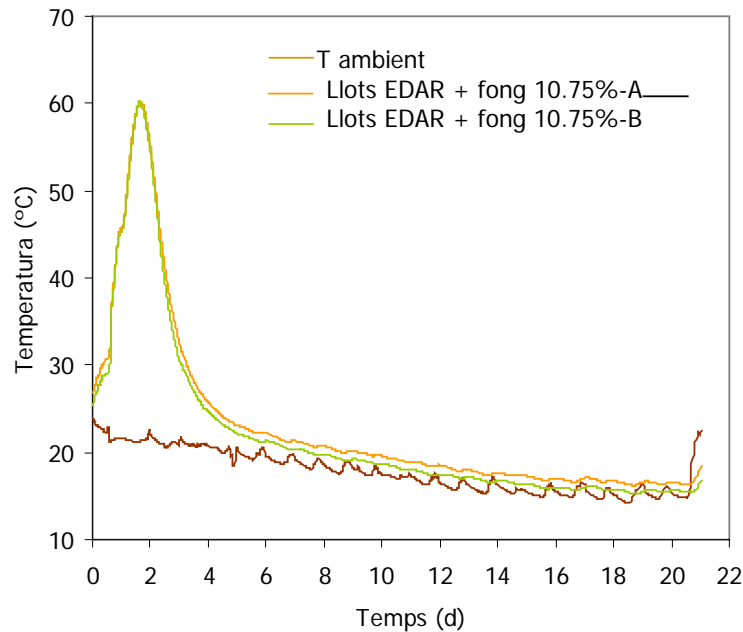
Els llots provenen de la depuradora de Santa Eulàlia (província de Barcelona), i les quantitats utilitzades i percentatges estimats de la mescla de compostatge es presenten en la taula 10.2.

**Taula 10.2.** Mescla de compostatge. Quantitats i percentatges.

	Pes (g)	% mescla
<b>Fong</b>	240	10.75
<b>Llots d'EDAR</b>	1760	78.85
<b>Serradures</b>	232	10.40
<b>Total</b>	2232	100

El fong representa un 10.75% de la mescla final. Les serradures s'afegeixen com a material estructurant i s'utilitza el mateix sistema experimental descrit anteriorment.

Es pot observar a la figura 10.5 que els dos experiments realitzats segueixen el mateix perfil de temperatura, típic dels processos de compostatge. La temperatura màxima que s'assoleix és de 59.6°C, i es dona a les 44 hores.



**Figura 10.5.** Perfil de temperatura en els experiments de compostatge amb llots d'EDAR.

La durada de l'etapa termòfila, en aquest cas, ha estat per tots dos experiments de 56 hores, comparable amb l'etapa termòfila de l'experiment de compostatge B realitzat amb FORM. Marco (2003) va demostrar la no viabilitat de *Trametes versicolor* després d'una exposició de 50 hores a 50°C i retorn a les condicions òptimes. Així doncs, la possibilitat de que el fong sobrevisqui després del procés del compostatge és mínima, ja que s'assoleixen aquestes temperatures i per tant la seva aplicació al sòl no representa risc de proliferació no natural d'aquest fong.

A la taula 10.3 es mostren els resultats de reducció de volum i pes obtingudes en el procés de compostatge. Es pot observar com en ambdós experiments es produeix una reducció del 7.1% en pes. La reducció de volum és

elevada, amb valors al voltant del 30%. Aquesta reducció de volum pot ser en part deguda a la compactació del material. En processos a escala industrial la reducció de volum màxima està sobre el 40% (Haug, 1993).

**Taula 10.3.** Reducció de pes i volum durant el procés de compostatge  
Amb llots d'EDAR.

10.75% - A		10.75% - B	
% red. pes	% red. volum	% red. pes	% red. Volum
7.1	33.3	7.1	29.2

Finalment es realitzen anàlisis de Cr en el fong, en els llots de depuradora utilitzats i en les mescles inicial i finals de compostatge. El contingut en crom es determina per espectrometria d'absorció atòmica de flama (nitrós-acetilè). Prèviament les mostres són digerides amb HNO<sub>3</sub> concentrat en un forn de microones. Els resultats obtinguts es presenten a la taula 10.4.

**Taula 10.4.** Contingut en Cr dels materials i mescles  
de compostatge.

	mg Cr/Kg	rsd %
<b>Fong</b>	2180*	1.2
<b>Fang de depuradora</b>	69.2*	1.1
<b>Mescla inicial</b>	76.2*	0.3
<b>Mescla final A</b>	83.7*	1.3
<b>Mescla final B</b>	95.2*	0.2

\* Valor promig dels replicats analitzats

Amb el contingut en crom, la humitat i el pes de les diferents fraccions es comprova el balanç de crom, s'obté una desviació entre la quantitat de crom a l'inici del procés i el crom al final d'un 2.6%, que es considera acceptable. El límit de Cr present en un residu per poder ser admès a un procés de compostatge és de 1000 ppm<sup>1</sup>, per tant el fong purgat del sistema estudiat, amb la concentració inicial i el colorant utilitzat no es podria acceptar en una planta de compostatge. Però l'anàlisi i conclusions que es presenten en aquest capítol són igualment vàlides perquè els banys esgotats reals de la indústria tèxtil contenen concentracions de colorant molt

<sup>1</sup> Working document on sludge 3<sup>rd</sup> draft. Unió Europea. (Annex IV).

més baixes que la utilitzada per la realització d'aquest treball, per tant la concentració de metalls en el residu fong i en el compost final també seran més baixes i segurament estarà dins dels límits establerts per poder utilitzar el fong en compostatge. A més, no tots els colorants tèxtils contenen metalls en la seva estructura, i normalment s'utilitzen mescles de colorants en els processos de tenyit, el que afavoreix la disminució de metalls en la biomassa purgada.

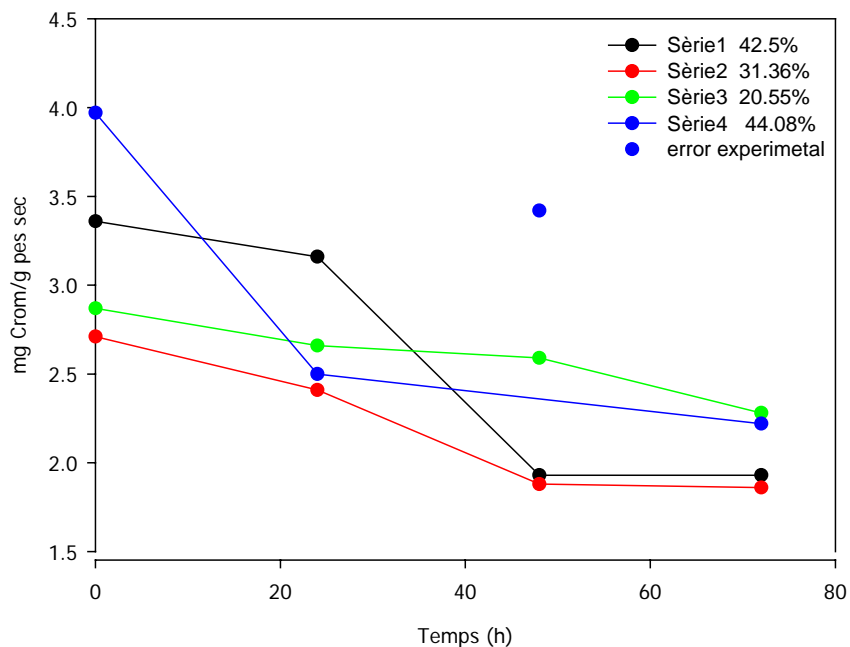
De tota manera també s'estudia la possibilitat de reduir el contingut en crom de la biomassa purgada mitjançant un post-tractament. Es tracta de provar diferents condicions en les que es pugui afavorir la degradació del colorant adsorbit i la desadsorció dels productes de degradació. Es realitzen 4 sèries d'experiments, amb 4 Erlenmeyers de 500 ml amb 250 ml del medi descrit a la taula 10.5. S'inoculen amb 25 grams de biomassa purgada del reactor, i es manté en agitació orbital (135 rpm, r=25 mm). Cada 24 hores s'analitza el crom contingut en la biomassa d'un Erlenmeyer de cada sèrie (mostra unitària). Els resultats obtinguts es mostren a la figura 10.6.

**Taula 10.5.** Medis de les sèries d'experiments realitzats en discontinu per reduir la concentració de crom en la biomassa purgada.

Sèrie	Glucosa (g/l)	NH <sub>4</sub> Cl	Macronutrients	Micronutrients	pH
1	3	0	0	0	4.5
2	3	3.77	10	1	4.5
3	8	10	10	1	4.5
4	8	5	10	1	4.5

Com es pot observar en tots els experiments s'ha reduït el contingut en crom. En la sèrie 4 la reducció ha estat d'un 44%, en canvi en la sèrie 3 només d'un 21%. La diferència en el medi únicament es troba en el contingut en NH<sub>4</sub>Cl. Pel contrari en la sèrie on no hi ha NH<sub>4</sub>Cl també s'obtenen elevades reduccions. Per tant la composició del medi sembla no tenir una influència clara en la desadsorció del metalls. Amb tot es pot concloure que amb les concentracions de crom en la biomassa obtingudes després del procés en discontinu durant 4 dies i les condicions assajades, no es pot utilitzar aquesta biomassa per fer compostatge, ja que el límit està en 1000 ppm. De totes formes si la biomassa purgada no presentés nivells de crom tan elevats, el post-tractament permetria reduir la concentració de crom de la biomassa entre un 20 i un 40%.

En tot cas no tots els colorants presenten crom, ni l'efluent a tractar és tan concentrat. Per tant el compostatge és una bona opció per la disposició final de la biomassa purgada.



**Figura 10.6.** Reducció del contingut en crom de la biomassa purgada en experiments en discontinu.

### 10.2.2. Avaluació econòmica

L'avaluació econòmica es realitza en base al tractament d'un cabal de 430 l/d d'una aigua residual tèxtil. Aquest cabal es dedueix de la informació subministrada per l'empresa Artèxtil S. A. que utilitza banys de tinció de 600 l. Considerant que es realitza un bany diari de dilluns a divendres, suposant un tractament en continu de l'efluent durant set dies setmanals.

Es dimensionaran els equips necessaris per realitzar la decoloració en continu d'una solució del colorant Gris Lanaset G de 150 mg/l, amb l'objectiu d'aconseguir una decoloració del 90%, mitjançant el procés biotecnològic i mitjançant l'adsorció amb carbó actiu.

✓ **Avaluació econòmica del procés biotecnològic**

El procés biotecnològic de tractament de colorant tèxtil en continu es pot esquematitzar en les següents etapes:

1) *Formació dels pèl·lets*. La formació dels pèl·lets té lloc en un fermentador de tanc agitat operant en discontinu durant 5 dies a una temperatura controlada de 25°C i en condicions estèrils.

2) *Inoculació dels pèl·lets en el reactor de tractament i etapa d'operació en discontinu*. Els pèl·lets formats s'inoculen en el reactor de tractament que conté les aigües a decolorar. El període d'operació d'aquesta etapa discontinua és de 5 dies.

3) *Tractament en continu*. Després de l'etapa d'operació en discontinu es comença a operar en continu tractant el colorant amb un temps de retenció hidràulic de 24 hores i amb un temps de residència cel·lular de 21 dies.

4) *Compostatge dels pèl·lets*. Els pèl·lets purgats del reactor es co-composten amb llots d'EDAR.

La concentració d'inòcul en el reactor és de 2.5 g/l en pes sec. La relació entre pes humit i pes sec és de 20 g pes humit/g pes sec.

Es suposa que es subministra un cabal d'aire de 41.47 m<sup>3</sup>/d per a un reactor de 430 l, equivalent al subministrat al reactor de 10 l.

Les característiques de funcionament del reactor biològic es detallen a la taula 10.6. La metodologia proposada de renovació de biomassa és la descrita en el capítol 6.

**Taula 10.6.** Característiques del reactor i procés biotecnològic avaluat

Concentració colorant (mg/l)	150
Concentració pèl·lets reactor (g pes sec/l)	2.5
Temps de residència hidràulic (hores)	24
Temps de residència cel·lular (dies)	21
Volum reactor (l)	430
Etapa de tractament en discontinu (dies)	5
Etapa de tractament en continu (dies)	43
Cabal d'aeració (m <sup>3</sup> /d) (condicions estàndars)	41.47
Cabal d'aigua tractada (l/d)	430

Els nutrients i reactius necessaris pel creixement del fong *Trametes versicolor* i el funcionament del reactor biològic, són els següents:

1.- Formació dels pèl·lets: La concentració de malta requerida és de 20 g/l.

2.- Tractament.

- Medi de l'etapa discontinua: La composició de nutrients del medi per litre està descrita a la taula 3.1 del capítol de materials i mètodes generals.

- Medi de tractament en continu: La composició del medi de tractament en continu es descriu a la taula 3.2 del capítol de materials i mètodes generals, amb una concentració de glucosa corresponent a la velocitat de consum ( $0.31 \pm 0.03$  g glucosa/ g pes sec·d).

### ***Desglossament de costos***

L'avaluació econòmica s'ha realitzat en tres apartats diferents corresponents a la matèria primera, a l'energia necessària i a la disposició final dels pèl·lets purgats.

#### *a) Matèria primera*

S'ha considerat per als reactius el cost dels productes de qualitat industrial en els casos en que ha estat possible (glucosa, clorur amònic, clorur càlcic...), encara que en els experiments s'han utilitzat reactius de laboratori.

#### *Formació dels pèl·lets*

Utilitzant un fermentador de tanc agitat de 5 litres de volum útil per formar els pèl·lets se n'obtenen 300 grams (pes humit). Tenint en compte la quantitat d'extracte de malta necessària i el seu preu, el cost d'obtenció de pèl·lets és de 0.014 €/g (pes humit).

A la taula A.1 de l'annex III es presenten els costos de l'extracte de malta requerit per a la formació dels pèl·lets.

Durant el període analitzat (48 dies) tenint en compte que el TRC és de 21 dies, i que transcorreguts els primers 21 dies es realitzen renovacions parcials de biomassa cada 7 dies, es realitzen un total de quatre renovacions parcials que corresponen a 1.33 renovacions totals de la biomassa del bioreactor. Per tant la massa de pèl·lets que es necessita correspon a la massa de l'inòcul inicial (g pes humit) més 1.33 vegades aquesta massa. Coneixent el volum del reactor, i que la concentració de pèl·lets és de 50 g pes humit/l, s'obté que el cost de la matèria primera per obtenir els pèl·lets és de 702 €, equivalent a un cost diari de 14.6 €. Cal destacar que el preu de l'extracte de malta és el de laboratori, no s'ha trobat en una primera cerca cap de qualitat industrial, caldria fer proves amb d'altres productes

industrials (extractes de llevat, hidrolitzats de proteïnes.....) però no es evident que serveixi qualsevol, per tant fins que no es demostrï que es pot utilitzar algun substitut no es pot rebaixar aquest preu (la diferència entre els preus pot ser important dels 42 €/kg actuals per a l'extracte de malta a 6 €/kg com a màxim en el cas de l'extracte de llevat industrial).

#### Tractament

L'avaluació econòmica dels macronutrients i micronutrients es presenta en les taules A.2. i A.3 de l'annex III respectivament, i a la taula A.4 del mateix es presenta el cost del medi de l'etapa discontinua<sup>(1\*)</sup>.

El període de tractament consta d'una etapa discontinua, amb un volum tractat de 430 l, seguida d'una etapa contínua de 43 d en la que es tracten 18.49 m<sup>3</sup> d'aigua que només requereixen glucosa (1 g/ l de reactor ·d). Per tant l'etapa discontinua costaria 3.98 € i l'etapa contínua un cost de 16.64 €. Això representaria un cost diari de 0.43 €.

#### Cost total del creixement i requeriments nutricionals dels microorganismes

A la taula 10.7 es resumeix el cost associat a la biomassa requerida per portar a terme un procés típic com el que s'ha avaluat.

**Taula 10.7.** Cost diari total de matèria primera en el procés biotecnològic

<b>Etapa</b>	<b>€/d</b>
Formació pèl·lets	14.60
Tractament	0.43
<b>Total</b>	<b>15.03</b>

#### *b) Demanda energètica*

La demanda energètica fa referència a la quantitat d'energia consumida per aquells aparells que s'utilitzen en la producció del pèl·lets i en el funcionament del reactor biològic.

---

<sup>1</sup> El medi de tractament (etapa en discontinu i en continu) requereix un pH controlat de 4.5. Per tal de poder mantenir aquest pH s'empra NaOH i HCl. La quantitat necessària d'aquests és menyspreable i, per tant, no s'ha tingut en compte en l'avaluació del cost del medi.



*Avaluació de l'energia consumida durant la formació dels pèl·lets*

Per la formació dels pèl·lets s'utilitzaria un bioreactor de tanc agitat de geometria estàndard. La dimensió d'aquest reactor es calcula amb l'hipòtesis de produir en cada etapa de formació de pèl·lets (5 dies) un terç de l'inòcul necessari (64.4 kg pes humit) per al bioreactor fluïditzat, el que implica que és necessari un reactor de 120 l per la producció de pèl·lets.

Les condicions d'operació serien: agitació 100 rpm i aeració 0.5 vvm. Considerant les propietats físiques del medi iguals a les de l'aigua es determina un Reynolds d'agitació de  $7.35 \cdot 10^4$ . Amb aquest Re, una turbina de sis pales i el reactor amb quatre deflectors, s'obté que el número de potència és de 4. Per tant la potència necessària d'agitació és de 7.56 W. Durant el període de tractament establert són necessàries set càrregues del reactor per a la formació de pèl·lets, amb una durada cada una de 5 dies. Suposant una eficàcia de l'agitador del 80%, el consum energètic és de 28577 kJ, el que suposa un consum diari d'energia requerida per l'agitació de 0.165 kW·h.

La potència necessària per comprimir aire a temperatura ambient fins una pressió relativa d'una atmosfera és de 68.85 kJ/kg, per tant tenint en compte la densitat de l'aire a temperatura ambient ( $1.2 \text{ kg/m}^3$ ), el cabal màssic requerit (103.7 kg/d) i suposant una eficàcia del 80% del compressor, l'energia diària requerida per l'aeració és de 1.728 kW·h.

Per la formació dels pèl·lets són necessàries condicions estèrils. L'energia requerida per esterilitzar el medi es calcula com l'energia necessària per escalfar el medi des de temperatura ambient fins a 120°C i considerant un 5% de pèrdua d'energia per transmissió. Això equival a un consum diari d'energia en l'operació d'esterilització de 2.133 kW·h.

*Avaluació de l'energia consumida en el reactor de tractament*

El consum energètic necessari pel funcionament del reactor de tractament ve associat al funcionament de la bomba d'aliment d'aigües residuals i al funcionament del compressor per mantenir l'aeració. Es considera que la glucosa s'addicionaria en pols per gravetat.

Es realitza un càlcul aproximat de l'energia necessària per al bombeig donat que hi ha alguns paràmetres impossibles de conèixer sense realitzar un disseny detallat de l'hipotètic reactor a escala industrial. Es suposa que l'alimentació es realitza per la part superior del reactor, i que s'ha d'impulsar fins a 4 metres

d'alçada. Per impulsar el cabal establert es calcula que es requereix una bomba que subministri una energia de 50 J/kg. Considerant un rendiment del 80% l'energia diària necessària per realitzar el bombeig és de 0.007 kW·h.

D'altra banda, l'aeració amb un cabal màssic de 49.76 kg/d i suposant un rendiment del compressor del 80% es dedueix un consum energètic diari de 1.138 kW·h.

Total del cost energètic

La taula 10.8 resumeix el consum energètic diari pel procés biotecnològic.

**Taula 10.8.** Consum energètic diari en el procés biotecnològic.

<b>Etapa</b>	<b>KW·h/d</b>
Formació pèl·lets	4.026
Tractament	1.145
<b>Total</b>	<b>5.171</b>

Els cost energètic del procés biotecnològic tenint en compte la potència contractada i els kWh consumits (detallats a la taula A.5 de l'annex III), és de 0.473 €/d.

*c) Disposició final: compostatge*

Els pèl·lets (64.20 kg), un cop purgats del reactor, són enviats a la planta de compostatge per fer compost comercial. El cost de tractament de compostatge és de 48.50 €/tn<sup>(2)</sup>, per tant el cost diari de la gestió final dels pèl·lets utilitzats en tot el tractament (48 dies) és de 0.065 €.

**Cost total del procés biotecnològic**

La taula 10.9 recull els costos desglossats en els apartats anteriors:

**Taula 10.9.** Resum del cost diari total del procés biotecnològic.

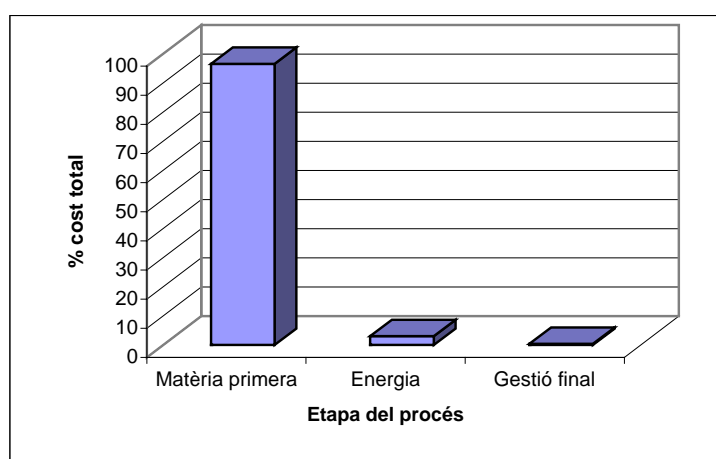
	€/d
Matèria primera	15.03
Demanda energètica	0.473
Disposició final (compostatge)	0.065
<b>Total</b>	<b>15.568</b>

---

<sup>2</sup> Preu segons l'empresa Tecnología y Medio Ambiente Grupo F. Sánchez, S. L. (planta compostatge de Rubí) (2003)

La matèria primera necessària per a la formació dels pèl·lets és el cost més significatiu en el cost total del procés, (representa el 96.54%), tal com es mostra a la figura 10.7. En canvi, el cost de l'energia representa el 3.04% del cost total del procés biotecnològic i la gestió final dels pèl·lets menys d'un 0.5%.

Per tant, per abaratir el cost del procés biotecnològic, cal plantejar una reducció o substitució de l'extracte de malta que s'utilitza per a la formació dels pèl·lets per un altre producte, però com s'ha assenyalat anteriorment fins al moment no s'ha trobat cap substitut més barat i adequat.



**Figura 10.7.** Pes de cada etapa del procés biotecnològic en el cost total.

✓ **Avaluació econòmica del tractament amb carbó actiu**

L'avaluació econòmica del procés d'adsorció es fa en base als resultats obtinguts en els experiments realitzats amb columnes de carbó actiu. S'ha treballat amb diferents columnes que operen en continu, cadascuna de les quals es caracteritza per tenir un temps de contacte (Empty Bed Contact Time) diferent. En el capítol 7 es demostra que per EBCT majors de 21 min la disminució de carbó actiu necessari per obtenir un 90% de decoloració és molt petita, en canvi disminuir l'EBCT implica augmentar considerablement la quantitat de carbó actiu a utilitzar per tractar el mateix volum d'aigua. Per aquesta raó l'avaluació econòmica es fa per al tractament d'adsorció del colorant en una hipotètica columna de carbó actiu granular de 21 min d'EBCT i que permetés tractar 430 l/d.

### ***Desglossament de costos***

A partir de les especificacions del carbó actiu utilitzat (Annex II), es considera una velocitat lineal de 5 m/h. Per tant, per tractar 430 l/d es requereix una columna de 7 cm de diàmetre intern. Per obtenir un EBCT de 21 min es determina que l'alçada del llit de carbó actiu és de 1.75 m.

Per avaluar els costos del procés d'adsorció es tenen en compte els següents aspectes:

#### ***a) Carbó actiu***

El preu ve donat per la casa comercial Chemviron Carbon, i és de 2.97€/kg. A la taula 10.10 es detallen les característiques de la columna i el cost del carbó actiu.

**Taula 10.10.** Característiques de la columna utilitzada i avaluació econòmica del material.

EBCT (min)	21
Massa de carbó actiu (kg)	2.54
Temps de ruptura (h)	14.10
Relació volum massa al 90% d'eliminació (ml/g)	99.05
Cost de carbó actiu (€/columna)	7.54
Cost diari de carbó actiu (€/d)	12.84

#### ***b) Demanda energètica***

Per tal d'avaluar l'energia necessària pel funcionament de la bomba que ha d'impulsar l'aigua residual a la columna d'adsorció amb flux descendent, es tenen en compte les pèrdues de càrrega que experimenta el fluid en travessar el llit fix de carbó actiu. Segons el full d'especificacions del carbó actiu (Annex II), la caiguda de pressió per una velocitat lineal de 5 m/h i una temperatura de 25°C és de 20 mbar/m. Per tant la potència de la bomba ha de ser de 12.6 kJ/d, el que representa un consum energètic diari suposant un rendiment del 80% de 0.005 kW·h.

Tenint en compte com es factura l'electricitat, el cost de l'energia consumida és de 0.0474 €/d.

#### ***c) Disposició final***

El carbó actiu, un cop saturat, es pot regenerar per tal que aquest pugui ser de nou utilitzat en les columnes d'adsorció. La regeneració es pot fer a la planta de Sant Joan Despí que té l'empresa Aguas de Levante S.A. Però el cost de regeneració

del carbó actiu és molt elevat (2.97€/kg), el mateix que el de comprar carbó actiu nou. L'empresa recull el carbó actiu utilitzat sense cap cost, i el regeneren per tornar-lo a vendre, per tant en aquest cas el cost de la disposició final del carbó actiu és nul.

Per altra part el carbó actiu és un adsorbent industrial amb un elevat poder calorífic i com a tal, si no es porta a regenerar el seu tractament final pot ser el de la valorització energètica. La planta incineradora es troba a Constantí (Tarragona). El carbó actiu és recollit per Centres de Transferència, els quals acumulen el carbó actiu i el porten a la planta incineradora. El cost d'incineració és de 1.09 €/kg de carbó actiu. El transport costa 22.5 €/tn<sup>(3)</sup>. Així, el cost total de la disposició final és de 1.11 €/kg. El cost de la disposició final si el carbó actiu es duu a incinerar és de 4.80 €/d.

Una altra possibilitat de disposició final és la gestió en dipòsit controlat. Prèviament, però, cal fer una anàlisi de perillositat. Si l'anàlisi demostra que el carbó actiu residual és admissible, aquest, sense rebre cap tipus de tractament, pot ser dipositat en un abocador de Classe II (abocador de Residus No Especials).

El colorant Gris Lanaset G conté crom i cobalt en la seva estructura química. El crom és un metall pesat perillós pel medi ambient i com a tal, els dipòsits controlats de residus estableixen uns límits. Així, en un abocador de Classe II, els residus no han de sobrepassar el 5% en pes de crom. El colorant tèxtil estudiat té una concentració de crom de 2.5% en pes. Sabent el volum d'aigua tractada fins al temps de ruptura del 90% d'eliminació, la concentració inicial de colorant i el pes de carbó actiu empaquetat en la columna, la quantitat de crom adsorbit en el carbó actiu és de 0.335 mg de crom per g de carbó actiu, per tant la disposició final del carbó actiu utilitzat per eliminar el colorant Gris Lanaset G de les aigües residuals podria ser el dipòsit controlat en un abocador de classe II. El cost de gestió en abocador és de 51.10 €/tn<sup>(4)</sup> (cànon de l'abocador) i el cost del transport és de 22.5 €/tn. A la taula 10.11 queda recollit el cost de gestió en abocador del carbó actiu.

**Taula 10.11.** Contingut de crom adsorbit en el carbó actiu i cost d'abocament.

Massa carbó actiu (kg)	Volum aigua tractada (l)	Massa crom adsorbit en carbó actiu (%)	Gestió abocador?	Cost diari (€/d)
190.26	18920	0.0335	Sí	0.29

<sup>3</sup> Preu segons el GRECAT (Gestió de Residus Especials de Catalunya, S.A.) (2003)

<sup>4</sup> Preu segons l'empresa Browning-Ferris Industries Iberica, S.A. (abocador d'Hostalets de Pierola)

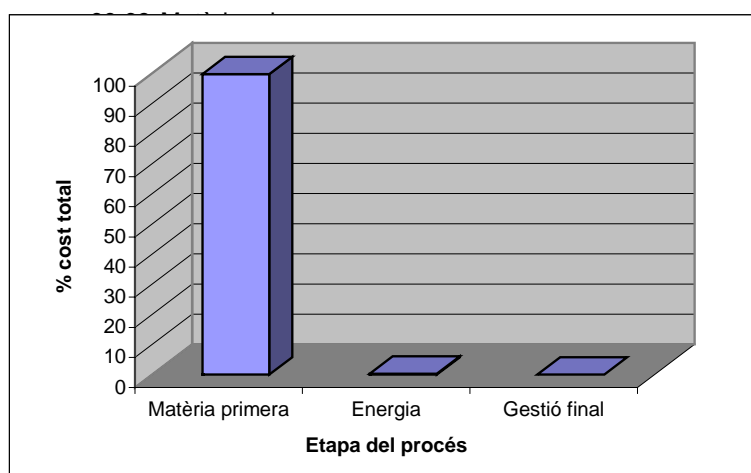
### **Cost total del procés fisicoquímic**

Si es suma el cost del carbó actiu (12.84 €/d), el cost de l'electricitat consumida (0.0474 €/d) i el cost de la disposició final s'obté el cost diari del procés d'eliminació del colorant tèxtil de les aigües residuals, recollit en la taula 10.12.

**Taula 10.12.** Cost total del procés fisicoquímic per les diferents disposicions finals.

<b>Cost amb valorització €/d</b>	<b>Cost amb abocador €/d</b>	<b>Cost amb regeneració €/d</b>
17.69	13.18	12.89

En el gràfic de la figura 10.8 es mostra quin és el pes de cada factor en el conjunt del procés escollint l'opció més favorable en la disposició final (regeneració) i que implica un cost zero.



**Figura 10.8.** Pes de cada factor en el cost total del funcionament de la columna.

✓ **Comparació del procés biotecnològic i del procés d'adsorció amb carbó actiu**

A la taula 10.12 es resumeixen les característiques i costos dels processos biotecnològic i fisicoquímic.

Per aconseguir una mateixa eliminació de colorant Gris Lanaset G (el 90% d'una solució inicial de 150 mg/l), el cost del tractament fisicoquímic amb carbó actiu és de 12.89 €/d suposant la regeneració com a disposició final del carbó actiu, mentre que en el cas del reactor biològic amb *Trametes versicolor*, el cost és de

15.57 €/d. El cost del procés biotecnològic és 1.20 vegades el preu del procés fisicoquímic, sense tenir en compte els costos d'immobilitzat.

**Taula 10.12.** Resum de les característiques i costos diaris dels dos processos.

	<b>Adsorció</b>	<b>Reactor biològic</b>
<b>Temps de residència</b>	21.53 min	24 h
<b>Temps de residència cel·lular (d)</b>	---	21
<b>Concentració de colorant (mg/l)</b>	150	150
<b>Temps de ruptura (h)</b>	14.1	1152
<b>Cost de l'adsorbent/pèl·lets (€/d)</b>	12.84	15.03
<b>Cost de l'energia consumida (€/d)</b>	0.0474	0.473
<b>Cost de la disposició final (€/d)</b>	-	0.065
<b>Cost total (€/d)</b>	12.89	15.57

### 10.2.3. Discussió ambiental qualitativa

En els apartats anteriors s'ha vist quin és el cost econòmic que suposa el funcionament dels dos processos estudiats per eliminar colorants tèxtils de les aigües residuals. Si bé l'avaluació econòmica proporciona una idea per estimar quin dels dos processos és més rendible a escala empresarial, aquesta amaga quins són els efectes ambientals a causa del funcionament de cadascun dels processos. El consum d'energia amb el sistema energètic actual beneficia l'esgotament dels recursos energètics, vessaments de contaminants més enllà de la capacitat de regeneració dels ecosistemes, dependències dels subministraments externs d'energia i tecnologia, perill d'accidents ambientals amb conseqüències greus... (Corominas *et al.*, 1990).

En aquesta discussió ambiental no es pretén fer un anàlisi numèric quantitatiu de les emissions i de les repercussions ambientals derivades del funcionament dels dos processos, sinó el que es pretén és fer una anàlisi de les conseqüències ambientals de forma qualitativa.

Partint dels pèl·lets o del carbó actiu, segons cada cas, el cicle de vida de cada procés està representat en les figures 10.9 i 10.10.

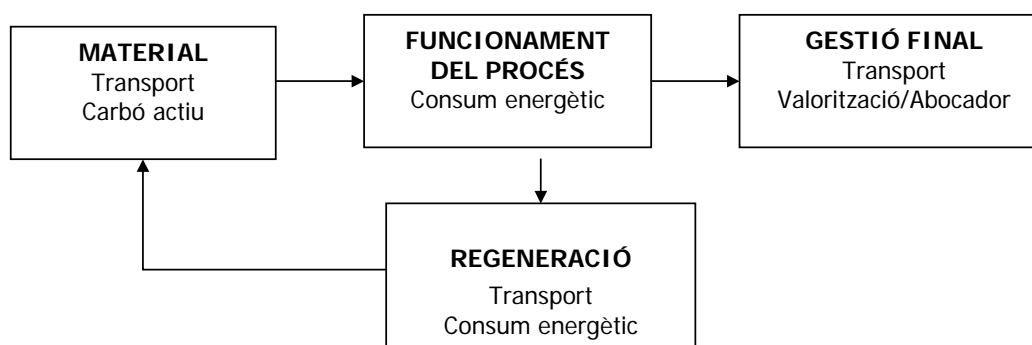
Per tal d'analitzar les conseqüències ambientals de cadascun dels processos, un dels aspectes a considerar ha de ser el consum de recursos no renovables necessaris per produir l'energia requerida. L'energia es consumirà en la fabricació/formació dels pèl·lets i del carbó actiu, en el funcionament de cada procés, en el transport dels pèl·lets o del carbó actiu ja saturats cap a l'emplaçament pel seu tractament final i la gestió final que rep cada material.

La fabricació dels pèl·lets s'ha analitzat en l'apartat anterior i l'etapa de fabricació del carbó activat queda fora de l'abast d'aquest treball, per tant no es pot fer l'anàlisi comparatiu.

L'energia necessària en l'etapa de funcionament del procés de depuració és majoritàriament la corresponent al bombeig de l'efluent cap al reactor/columna per al seu tractament.



**Figura 10.9.** Cicle de vida del procés d'eliminació de colorant mitjançant el fong.



**Figura 10.10.** Cicle de vida del procés d'eliminació de colorant mitjançant carbó actiu.

El consum energètic també s'ha de considerar en el transport de la gestió final. El transport per carretera suposa el consum de recursos no renovables. La crema de combustibles fòssils en el transport afavoreix el canvi climàtic i a la pluja àcida. La gestió final escollida per als pèl·lets és el compostatge i per al carbó actiu esgotat pot ser la valorització o l'abocador. Per poder calcular les emissions associades al transport tindriem que conèixer l'emplaçament de la indústria tèxtil i la distància a la planta de gestió final en cada cas, es a dir planta de compostatge, planta de valorització i abocador controlat. No es pot generalitzar perquè les combinacions de situacions que es poden presentar són múltiples.



Un altre aspecte important a tenir en compte a l'hora d'analitzar els impactes ambientals derivats de cada procés és la disposició final que se'n fa dels productes i dels residus. En ambdós casos, l'aigua un cop decolorada (el producte) pot ser utilitzada per rec de camps o jardins o pot ser emprada en la pròpia indústria tèxtil (refrigeració, neteja, etc.). El carbó actiu i els pèl·lets (els residus), un cop finalitzat el procés de depuració de les aigües reben dos processos totalment diferents.

Per al carbó actiu utilitzat, entre els diferents processos de disposició final s'escull la regeneració. Aquesta regeneració del carbó té lloc mitjançant un procés tèrmic, on s'escalfa el carbó utilitzat a 930°C aproximadament en una atmosfera aire-vapor. Els productes orgànics adsorbits es cremen i el carbó actiu es restaura bàsicament fins a la seva capacitat inicial d'adsorció. Però aquesta regeneració presenta dos desavantatges: requereix una inversió considerable de calor i provoca pèrdues de carbó (10%). A Catalunya només hi ha una planta regeneradora ubicada a Sant Joan Despí, pertanyent a l'empresa Aguas de Levante S.A.

En el cas del tractament final dels pèl·lets de *Trametes versicolor*, al ser un material orgànic no perillós, la seva disposició final pot ser el compostatge. L'objectiu principal del compostatge és el d'estabilitzar i higienitzar la matèria orgànica procedent dels residus orgànics, facilitant-ne i permetent-ne la reintroducció en els cicles naturals (Haug, 1993). El compostatge facilita la gestió dels residus orgànics procedents de les activitats industrials reduint-ne el pes i el volum, estabilitzant-los i podent generar un producte final (el compost) amb un valor afegit. El fet de que un residu sigui la matèria prima d'un producte amb valor afegit en el mercat suposa un gran avantatge ambiental.

Un cop exposats els diferents impactes associats al funcionament de cadascun dels dos processos, cal, per tant, buscar una eina que permeti qualificar quina de les dues alternatives estudiades és més agressiva pel medi ambient. Un indicador de sostenibilitat que utilitzen algunes empreses i organitzacions (OECD, 2001) per conèixer la contribució dels processos biotecnològics al desenvolupament sostenible és l'anomenat Índex Verd (*Green Index*). L'Índex Verd és una llista de diferents qüestions clau dintre del concepte d'Anàlisi del Cicle de Vida que calen que siguin contestades per tal de poder comparar processos i estimar la sostenibilitat de cadascun. Per poder utilitzar l'Índex Verd cal primer normalitzar els processos a comparar. Cal que els dos processos siguin comparats en base del mateix resultat. Per a cada paràmetre estudiat, les dades recollides per a cada procés són avaluades en una escala de magnitud determinada. Si un dels processos és clarament superior

a un altre, més sostenible, aquest rep una nota positiva. Si d'aquest no es disposa de suficients dades cal, doncs, millorar l'obtenció de les dades o es pot plantejar la possibilitat que el paràmetre no sigui massa rellevant per l'estudi.

L'inventari de les entrades i de les sortides cal que siguin escollits de manera que es disposin de dades suficients per estimar els impactes potencials més rellevants. ISO ha publicat una llista preliminar d'impactes potencials per a nous processos i productes. Cal tenir en compte, però, que no tots els paràmetres són rellevants per a cada procés. La llista preliminar de la ISO és la següent:

- ✓ Recursos abiòtics (recursos limitats)
- ✓ Recursos biòtics (ús sostenible o no sostenible)
- ✓ Ús de terres
- ✓ Escalfament global
- ✓ Reducció de l'ozó estratosfèric
- ✓ Formació d'oxidants fotoquímics
- ✓ Acidificació
- ✓ Eutrofització
- ✓ Impactes ecotoxicològics
- ✓ Impactes toxicològics sobre humans

En el cas concret a estudiar, la comparació de la sostenibilitat del procés fisicoquímic amb el biològic per a l'eliminació de colorant tèxtil de les aigües residuals, s'ha fet en base d'aquells experiments que assoliren un 90% d'eliminació de colorant tèxtil d'una solució inicial de 150mg/l i tenint en compte els factors que es detallen a la taula 10.13.

Cadascun d'aquests factors es puntua en una escala de 1 a 5 per a cada procés estudiat. El 1 correspon a baixa sostenibilitat i el 5 a alta sostenibilitat. Així doncs, les puntuacions de cada paràmetre pel procés biotecnològic i pel procés fisicoquímic són les que es presenten a la taula 10.13.

Pel que fa l'energia, el tractament fisicoquímic rep puntuacions més elevades doncs per al mateix propòsit consumeix menys energia. Per tant, l'eficiència energètica és major i el consum de recursos energètics per volum d'aigua tractada és menor.

Quan es parla de matèries primeres es fa referència a aquelles necessàries per als microorganismes en el procés biotecnològic i al carbó actiu en el fisicoquímic. Comptabilitzant en massa els recursos per volum d'aigua tractada, en el cas del procés biotecnològic es consumeixen 2.5 vegades menys que en el procés

fisicoquímic (3963 g/m<sup>3</sup> en el biotecnològic front els 10090 g/m<sup>3</sup> del fisicoquímic). Malgrat el gran consum de matèries primeres en el procés fisicoquímic, aquestes són reciclables (el carbó actiu es pot regenerar múltiples vegades), mentre que els nutrients i reactius necessaris pel creixement dels microorganismes no es poden reutilitzar. Pel que fa als recursos inutilitzats, el procés fisicoquímic està penalitzat ja que les condicions de treball de les columnes no arriben a saturar el carbó actiu.

En el camp dels residus generats cal tenir en compte la disposició final del carbó actiu saturat i dels pèl·lets. El fet que els pèl·lets siguin residus orgànics els quals poden ser compostats, guanya punts sobre el procés fisicoquímic. Són biodegradables, són utilitzats per altres objectius (compostatge) i el seu impacte ambiental és mínim. Pel que fa la disposició final del carbó actiu, la regeneració és un procés intensiu en l'ús d'energia, i per tant, el seu impacte ambiental és més elevat. En quant a les emissions, la pila de compostatge produeix diòxid de carboni però en la regeneració del carbó actiu es produeixen més emissions.

Els productes que es deriven del procés de decoloració de l'aigua és aquesta un cop decolorada. És altament estable i no representa un perill per a la salut pública. L'únic problema que pot presentar en el cas del procés biotecnològic és que el crom que, si bé inicialment està lligat a la molècula del colorant, passa a estar en forma lliure en l'aigua. L'activitat enzimàtica del fong trenca la molècula del colorant tot alliberant el crom de l'estructura molecular. Però el contingut de crom és tan baix que entra dintre dels límits legals i no presenta cap tipus de perill.

El procés biotecnològic podria presentar una millor eficàcia, com ara la reducció del temps d'esterilització en l'autoclau, la reducció de la etapa discontinua, etc. Però malgrat tot, és un procés força optimitzat.

A l'últim bloc d'aspectes considerats en l'Índex Verd és el camp de la seguretat. Ambdós processos reben puntuacions elevades en la seguretat del producte ja que aquesta és elevada (aigua decolorada) i no presenta perill per la salut humana. Per seguretat humana s'entén el risc de l'operari del procés. El risc vindria donat per l'etapa d'esterilització en el procés biotecnològic, però aquest representa una etapa molt curta en el temps. En el cas del procés fisicoquímic, vindria donat per l'etapa de regeneració, que té lloc a elevades temperatures.

**Taula 10.13.** Índex Verd per estudiar la sostenibilitat dels dos processos estudiats

	Procés físicoquímico	Procés biotecnològic
<b>Energia</b>		
Consum de recursos per a la producció de l'electricitat consumida en el procés	4	1
Quantitat relativa d'energia consumida en el procés	4	1
<b>Matèries primeres</b>		
Ús de matèries primeres	1	4
Recursos reciclables	4	1
Recursos inutilitzats	3	5
Quantitat relativa de recursos per volum d'aigua tractada	1	4
<b>Residus</b>		
Emissions	1	4
Ús per altres objectius	1	5
Biodegradabilitat	1	5
Reciclabilitat	1	5
Impacte ambiental	1	5
<b>Productes</b>		
Reciclabilitat	5	5
Estabilitat	5	5
Biodegradabilitat	5	5
Impacte ambiental	5	4
<b>Procés</b>		
Millora del procés	4	3
Disminució del número d'etapes	4	4
Disminució del temps	4	3
<b>Seguretat</b>		
Seguretat del producte	5	5
Seguretat humana	2	4
Seguretat ambiental	1	5
<b>Suma total</b>	<b>62</b>	<b>83</b>

Pel que fa a la seguretat ambiental, el procés físicoquímico rep baixa puntuació (poc sostenible) a causa de la disposició final de carbó actiu. Si es sumen les puntuacions donades per a cada procés en cadascun dels aspectes considerats,

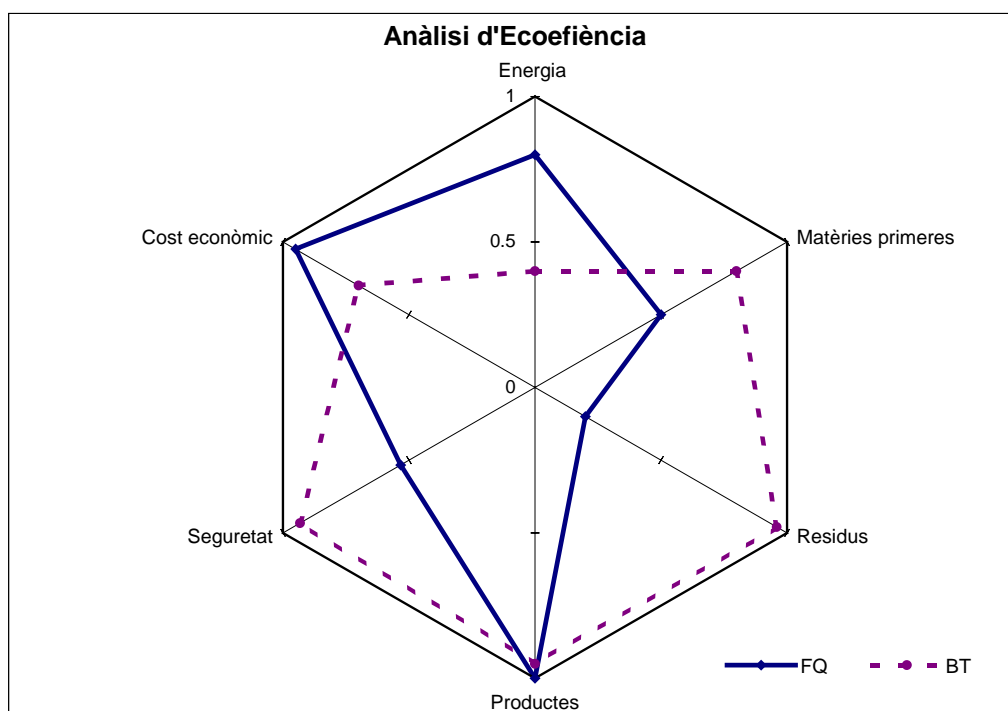
s'arriba a la conclusió que és el procés biotecnològic el més sostenible (una puntuació de 83 punts sobre un màxim de 105). El procés fisicoquímic clàssic obté una puntuació de 62/105. El fet que la disposició final dels pèl·lets de *Trametes versicolor* sigui el compostatge, guanya punts sobre el tractament fisicoquímic. Encara que el procés biotecnològic sigui més intensiu en energia, el seu tractament final és altament aconsellable. El fet que un residu sigui la matèria primera d'un producte amb valor de mercat (compost) és preferible que aquelles vies de gestió de residus finalistes. El compostatge afavoreix la idea de cicle dels productes i dels residus, idea imperant en l'Ecologia Industrial.

Per tal de poder veure gràficament la sostenibilitat de cadascun dels dos processos estudiats, s'ha utilitzat l'anomenat *Anàlisi d'Ecoeficiència (EEA)*. Aquest ha estat utilitzat en el camp de la biotecnologia per comparar la sostenibilitat de nous processos vers els processos químics clàssics. Un exemple d'aplicació d'aquest tipus d'anàlisi es pot trobar en la producció de la vitamina B12. Aquesta tradicionalment s'ha sintetitzat químicament, però en els últims anys, els processos de síntesi biotecnològics ofereixen processos més eficients ecològicament. Un altre exemple d'aplicació de EEA es pot trobar a l'empresa Basf que l'utilitza per optimitzar processos i productes (web basf). L'Anàlisi d'Ecoeficiència és una ajuda per optimitzar processos tot identificant els elements que tenen un major impacte ambiental o que són una porta oberta per millorar (OECD, 2001).

L'Anàlisi d'Ecoeficiència es realitza sobre un hexàgon (o una altra figura geomètrica plana) els eixos del qual representen un paràmetre ambiental a considerar. Cada eix va d'un valor mínim (baixa sostenibilitat) a un màxim (alta sostenibilitat). En aquest cas s'ha pres de 0 al 1. Donant puntuacions a cadascun dels processos per a cada paràmetre a valorar, s'obté un punt a cada eix. Unint els punts de cada eix, es pot observar un hexàgon el qual indica la major o menor sostenibilitat del procés. Com més perfecte i més gran sigui aquest hexàgon, major és la sostenibilitat del procés estudiat.

Cada eix de l'hexàgon representa cadascun dels camps estudiat en l'Índex Verd presentat anteriorment. Així, els eixos de l'hexàgon són: energia, matèries primeres, residus, productes i seguretat. La puntuació que cada procés ha obtingut en cada camp considerat es normalitza en l'escala del 0-1 segons la màxima puntuació que es podia obtenir en cada camp. Cada valor s'ha representat en l'eix corresponent.

Les figures hexagonals planes pels dos processos de decoloració d'aigua objecte del treball queden representades en la figura 10.11.



**Figura 10.11.** Anàlisi d'Ecoeficiència pel procés fisicoquímic (FQ) i biotecnològic (BT)

El contorn hexagonal extern representa el procés sostenible per excel·lència. La trama sòlida representa el EEA pel procés fisicoquímic; la trama en discontinu mostra el EEA pel procés biotecnològic. Observant la figura 10.11, el que es pot arribar a concloure és que els dos processos estan lluny de ser processos ecoeficients. Si bé el procés fisicoquímic presenta puntuacions molt elevades en el camp de l'energia, qualitat del producte i econòmic, el procés biotecnològic pren puntuacions elevades en la generació de residus, la qualitat del producte, la seguretat i l'ús de matèries primeres.

Per tal de millorar l'ecoeficiència del procés biotecnològic, caldria estudiar les possibilitats de reducció del consum energètic i el cost de les matèries primeres. Millorant aquests dos aspectes, la forma de l'hexàgon ja presentaria una forma quasi regular i, per tant estaria més a prop del concepte de procés sostenible. La millora de l'ecoeficiència és força difícil en el cas del procés fisicoquímic. La

generació de residus i l'elevat cost de les matèries primeres són els punts febles del procés i difícilment millorables.

### 10.3. Conclusions

S'ha avaluat el potencial del procés de co-compostabilitat del fong *Trametes versicolor* amb la FORM. L'addició del fong no presenta cap inconvenient al procés de compostatge. S'assoleixen temperatures elevades, dins del rang termòfil, i s'han mantingut durant prou temps com per assegurar la higienització del material. El producte obtingut presenta valors propers a l'estabilitat tant amb el Test d'Autoescalfament com amb l'Índex Respiromètric.

S'ha dut a terme el procés de compostatge del fong amb fangs de depuradora d'aigües residuals urbanes amb resultats satisfactoris, s'assoleixen temperatures de 60°C en la etapa termòfila, el que assegura la no viabilitat del fong després del procés de compostatge.

Amb la solució inicial de colorant utilitzada en el tractament biològic s'obté una biomassa purgada amb una concentració de crom superior a l'admissible en un procés de compostatge, però aquesta concentració es podria reduir entre un 20 i un 40% en un tractament posterior.

S'ha comparat econòmicament i ambientalment el procés fisicoquímic d'eliminació de colorant amb carbó actiu amb el procés biotecnològic de tractament mitjançant el fong *Trametes versicolor*.

S'ha calculat que el cost del tractament biològic és aproximadament 1.2 vegades superior al cost del procés fisicoquímic. El cost en ambdós processos es degut bàsicament a les matèries primeres, l'extracte de malta per la formació dels pèl·lets en el procés biotecnològic, i el carbó actiu en el procés fisicoquímic.

S'han emprat dues metodologies diferents per avaluar qualitativament els impactes ambientals dels dos processos: L'Índex Verd i l'Anàlisi d'Ecoeficiència. Aplicant l'anàlisi de l'Índex Verd es conclou que el procés biotecnològic és més sostenible (rep una puntuació de 83/105, respecte els 62/105 del procés d'adsorció amb carbó actiu). El fet que la disposició final dels pèl·lets *Trametes versicolor* sigui el compostatge, guanya punts sobre el tractament fisicoquímic. Encara que el procés biotecnològic sigui més intensiu en energia, el seu tractament final és altament aconsellable. El fet que un residu sigui la matèria primera d'un producte amb valor de mercat (compost) és preferible que aquelles vies de gestió de residus finalistes.

A partir de l'Anàlisi d'Ecoeficiència per a cada procés estudiat, el que es pot concloure és que als dos processos els falta millorar per ser ecoeficients. Per tal de millorar l'ecoeficiència del procés biotecnològic, caldria estudiar les possibilitats de reducció del consum energètic i cost de les matèries primeres.

L'estudi realitzat posa de manifest que el procés biotecnològic amb fongs de decoloració de les aigües residuals constitueix una alternativa interessant des de el punt de vista ambiental al tractament fisicoquímic d'adsorció amb carbó actiu.

#### **10.4. Bibliografia**

- Ayres R, Ayres L.** 2002. A handbook of industrial ecology. Cheltenham, UK. Edward Elgar.
- Corominas J, Puig J.** 1990. La ruta de la energia. Barcelona, Editorial Anthropos.
- Haug, RT.** 1993. The practical handbook of compost engineering. New York. Lewis publishers.
- Informe Burtland.** 1987. Our Common Future. Comissió Nacions Unides pel Medi Ambient i Desenvolupament, UNCED.
- Jelenski LW, Graedel TE, Laudise RA, Patel CKN.** 1992. Industrial Ecology: Concepts and Approaches. Proceedings National Academy of Science. 89:798-799.
- Lowe EA, Warren JL, Moran SR.** 1997. Discovering Industrial Ecology: An executive Briefing and Sourcebook. Ohio, Battelle Press.
- Marco E.** 2003. Estudi preliminar per a la realització d'una anàlisi de risc de l'alliberament de *Trametes versicolor* al sòl. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.
- OECD.** 2001. The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability. France.
- Rodríguez JJ, Irabien A.** 1999. Los residuos peligrosos. Caracterización, tratamiento y gestión. Madrid, Editorial Síntesis.
- Sendra C.** 2004. Anàlisi de fluxos de materials de Catalunya en el període 1996-2000. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Barcelona.
- Seoanez Calvo M.** 1998. Ecología industrial: Ingeniería Medioambiental aplicada a la industria y a la empresa. Madrid, Ediciones Mundi-Presa.

#### **Recursos Web**

[www.basf.com](http://www.basf.com)



## Capítol 11

### Conclusions i treball futur

#### 11.1 Conclusions

S'ha operat a diferents temps de residència hidràulics, 18, 24, 48 i 120 hores arribant a l'estat estacionari amb decoloracions entre el 80% i el 90%. En augmentar el TRH augmenta el percentatge de decoloració però en disminuir-lo de 120 a 18 hores, la reducció en el percentatge de decoloració és només del 13.5%, el que indica la robustesa del sistema.

No calen activitats enzimàtiques elevades per obtenir rendiments de decoloració superiors al 80%. Sembla que el nivell llindar d'activitat enzimàtica perquè la decoloració sigui superior al 80% està en 250 U.A./l.

Alimentar glucosa amb un excés o dèficit del 15% respecte la corresponent a la velocitat de consum no afecta significativament el rendiment de decoloració.

S'estableix el temps de residència cel·lular (TRC) màxim en 40 dies. A temps més elevats els pèl·lets es fragmenten i provoquen problemes operacionals.

S'estableix una metodologia de renovació de biomassa que consisteix en purgar i renovar 1/3 de la biomassa del sistema cada terç de TRC, per un TRC donat. Amb un TRC de 21 dies i diferents TRH s'obtenen percentatges de decoloració superiors al 80%.

Les observacions visuals, els resultats analítics i els balanços de matèria en les diferents fases permeten establir que el mecanisme de degradació té lloc en tres etapes en sèrie: l'adsorció del colorant en la biomassa, seguit de la transferència

d'aquest cap al seu interior, degradació del colorant Gris Lanaset G, i finalment alliberament dels productes de degradació al brou de cultiu.

S'ha comprovat que l'enzim lacasa està involucrat en el procés de degradació del colorant Gris Lanaset G. En experiments comparant els percentatges de decoloració obtinguts amb el fong (99%) i amb l'enzim (35%), tenint en compte que l'enzim manté l'activitat es conclou que la reacció enzimàtica presenta inhibició per productes, mentre que el fong no presenta cap tipus d'inhibició.

S'ha realitzat un disseny d'un reactor pilot de volum útil de 10 l, en base a la similitud geomètrica amb els d'escala inferior utilitzats, tenint en compte dos restriccions: l'alçada de la cambra termostatitzada on ha d'anar ubicat el bioreactor i el volum útil contingut en el capçal del bioreactor per a facilitar la separació entre fases.

Es comprova la bondat de l'escalat del bioreactor pilot obtenint bons percentatges de decoloració tant en el procés en discontinu com en el continu.

Es tracta en continu la solució del colorant Gris Lanaset G i s'adapta el sistema experimental a condicions industrials, introduint les següents millores:

- la no esterilitat de la solució de colorant que s'ha de tractar,
- la supressió de macronutrients i micronutrients en la solució de colorant i
- la substitució de glucosa pura per glucosa de qualitat industrial,

S'obtenen bons rendiments de decoloració i el sistema respon bé, inclús després de realitzar una renovació amb biomassa no activa, el que suposa una perturbació important. S'aconsegueix un funcionament correcte durant tres mesos, amb un rendiment de decoloració mitjà del 80%.

Es tracten aigües residuals reals de la indústria tèxtil sense esterilitzar durant 25 dies amb rendiments de decoloració entre el 40 i el 60%. És important assenyalar que el percentatge d'eliminació de color assolit es menor que l'assolit en experiments anteriors, però això és degut a que l'efluent real presenta menor coloració inicial que les dissolucions de colorant Gris Lanaset G utilitzades. El rendiment de decoloració assolit però, és suficient per obtenir un efluent que compleixi la normativa per ser tractat en una EDAR si cal.

S'ha comprovat que un efluent molt contaminat provoca problemes en el procés per tant sembla necessari un pretractament de l'efluent que doni un cert grau de desinfecció per preservar una contaminació massiva.

S'ha comprovat la co-compostabilitat del fong purgat *Trametes versicolor* amb la FORM i fangs d'EDAR. L'addició del fong no presenta cap inconvenient al

procés de compostatge. S'assoleixen temperatures elevades, dins del rang termòfil, i s'han mantingut durant prou temps com per assegurar la higienització del material.

S'ha comparat el procés biotecnològic desenvolupat amb el procés d'eliminació de colorant per adsorció amb carbó actiu granular, prèviament s'ha realitzat un estudi del procés d'adsorció amb una columna de llit fix, establint un EBCT de 21 minuts com a solució de compromís entre la capacitat de tractament i la utilització del carbó actiu.

A partir de les dades experimentals s'ha calculat el cost d'un tractament en continu per als dos sistemes, el biotecnològic i el d'adsorció realitzant una aproximació a escala industrial. El cost del procés biotecnològic és tan sols un 20% superior al cost del procés d'adsorció.

S'han emprat dues metodologies diferents per avaluar qualitativament els impactes ambientals dels dos processos: L'Índex Verd i l'Anàlisi d'Ecoeficiència. Aplicant l'anàlisi de l'Índex Verd es conclou que el procés biotecnològic és més sostenible (rep una puntuació de 83/105, respecte els 62/105 del procés d'adsorció amb carbó actiu). El fet que la disposició final dels pèl·lets *Trametes versicolor* sigui el compostatge, guanya punts sobre el tractament fisicoquímic. Encara que el procés biotecnològic sigui més intensiu en energia, el seu tractament final és altament aconsellable. El fet que d'un residu sigui la matèria primera d'un producte amb valor de mercat (compost) és preferible que aquelles vies de gestió de residus finalistes.

A partir de l'Anàlisi d'Ecoeficiència per a cada procés estudiat, el que es pot concloure és que als dos processos els falta millorar per ser ecoeficients. Si bé el procés biotecnològic presenta en la majoria dels camps puntuacions més elevades, l'anàlisi realitzat ens assenyalava els camps en que cal millorar per ser ecoeficients. Per tal de millorar l'ecoeficiència del procés biotecnològic, caldria estudiar les possibilitats de reducció del consum de matèries primeres.

L'estudi realitzat posa de manifest que el procés biotecnològic amb fongs de decoloració de les aigües residuals constitueix una alternativa interessant des de el punt de vista ambiental al tractament fisicoquímic d'adsorció amb carbó actiu.

### **11.2. Treball futur**

Amb el tractament de les aigües residuals reals es posen de manifest problemes de contaminació de l'influent no estèril, que impedeixen realitzar un tractament perllongat, tot i que durant el període d'operació estable el rendiment de

decoloració obtingut és satisfactori. Es fa necessari, per tant, en estudis posteriors, aprofundir en aquest aspecte d'higienització, emmagatzematge... de l'efluent industrial per reduir els problemes per contaminació.

També es detecta la necessitat d'analitzar altres estratègies d'operació, especialment indicades per tractar efluent poc colorats, com per exemple l'operació en discontinus repetits o semicontinus.

S'està estudiant actualment la degradació amb *Trametes versicolor* d'altres tipus de colorants, amb una estructura coneguda, amb l'objectiu de determinar quins són els productes de degradació de les molècules de colorant i establir quin és el paper de la lacasa en el mecanisme de degradació d'aquests colorants, ja que amb el colorant Gris Lanaset G al ser una mescla de colorants i davant la impossibilitat de conèixer l'estructura no ha estat possible determinar els productes de degradació.

L'estudi del procés de degradació d'altres colorants tèxtils de diferents classes permetrà conèixer les restriccions del procés i els efectes que pot tenir sobre el rendiment de decoloració la composició de les aigües residuals a tractar en un procés en continu de llarga durada. Tot això ha de permetre ampliar la versatilitat del procés de decoloració.

Un altre dels aspectes a abordar en treballs futurs és l'elaboració d'un protocol per l'obtenció de biomassa en forma de pèl·lets i de mida pre-establerta en un bioreactor de tanc agitat. Seria també interessant determinar si existeix alguna relació entre la mida del pèl·let i la producció enzimàtica o els rendiments de decoloració.

Es proposa aprofundir en l'optimització de l'etapa discontinua del procés.

El coneixement adquirit fins ara ha de permetre formular un model matemàtic que inclogui les etapes clau del procés. L'explotació del model permetrà realitzar simulacions de diferents estratègies d'operació per proposar, i per tant determinar experimentalment, quina serà la més interessant.

S'han establert les bases i es disposa del coneixement per abordar el disseny i l'aplicació d'aquest procés a escala pilot industrial tractant efluent reals, on s'hauran de tenir en compte aspectes importants en la configuració i equipament del bioreactor per a un millor control i desenvolupament del procés.



## Annex I: Fitxa de seguretat del colorant Gris Lanaset G



Ciba Specialty Chemicals

COLORS Y CONSUMER CARE

HOJA DATOS DE SEGURIDAD (91/155/CE)

1/4  
 Código del producto 080173.5  
 Fecha 06.01.1998  
 Sustituye HDS fecha 28.01.1997

<b>NOMBRE COMERCIAL</b>				
GRIS LANASET G				
<b>1. IDENTIFICACION DE LA SUSTANCIA/ PREPARADO Y LA EMPRESA</b>				
Descripción química	Mixture of metal complex dyes			
Fabricante	Ciba Specialty Chemicals, CH-4002 Basel			
Departamento responsable	Ecotox TD 2.5 Fax 0041 61 636 7996			
Proveedor	Ciba Specialty Chemicals s.a. Balmes, 117 08008 Barcelona			
Teléfono de emergencia	(93) 404 03 00	Fax	(93) 404 03 03	
<b>2. COMPOSICION/ INFORMACION SOBRE LOS COMPONENTES</b>				
Información sobre los componentes	%	No. CAS	Simbolo	Frases R
No aplicable				
<b>3. IDENTIFICACION DE LOS PELIGROS</b>				
Sin clasificación de riesgo segun EC				
<b>4. PRIMEROS AUXILIOS</b>				
Inhalación				
Contacto con la piel	Quitarse las ropas contaminadas. Lavarse las zonas del cuerpo afectadas con jabón y abundante agua.			
Contacto con los ojos	Lávese inmediata y abundantemente con agua durante 10 minutos como mínimo.			
Ingestión	Enjuáguese la boca con agua. Beber abundante agua.			
Información para el médico	Tratamiento sintomático			
<b>5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS</b>				
Medios de extinción adecuados	Agua, espuma, polvo seco, anhídrido carbónico.			
Medios de extinción que no deben utilizarse	Sin restricciones.			
Riesgo de fuego/ explosión	Ninguno.			
Gases de combustión	Oxidos de carbono, nitrógeno y azufre			
Protección personal	Aparato de respiración autónoma.			
<b>6. MEDIDAS A TOMAR EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL</b>				
Precauciones individuales				
Precauciones para la protección del medio ambiente	No verter an medio acuático			
Métodos de limpieza	Colocarlo en envases señalizados para su eliminación como residuo químico.			
Información adicional				

-- No aplicable

GRIS LANASET G

2/4  
 Código del producto 080173.5  
 Fecha 06.01.1998

7. MANIPULACION Y ALMACENAMIENTO						
Higiene laboral	Evítese su ingestión, inhalación y contacto con los ojos y la piel. Manipularlo de acuerdo con los principios de higiene industrial y estipulaciones legales pertinentes.					
Prevención del fuego						
Medios de almacenamiento	Almacenar en lugar fresco y seco con adecuada ventilación					
Segregación	No son necesarias precauciones especiales					
Condiciones de almacenamiento	No son necesarias precauciones especiales					
8. CONTROLES DE EXPOSICION Y PROTECCION PERSONAL						
Componentes con límites de exposición	Ninguna					
Protección personal						
9. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS						
Aspecto	Estado	Polvo				
	Color	Negro				
	Olor	Ninguno				
DATOS DE SEGURIDAD IMPORTANTES						
Punto de fusión	--		°C			
Punto de ebullición	--		°C			
Punto de destello	--		°C			
Descomposición térmica	> 200		°C			
Temperatura de inflamación	> 450		°C	BAM		
Autoinflamabilidad						
Propiedades oxidantes		Ninguna				
Límites de explosión		Inferior		Superior	--	
Presión de vapor	--			mbar	a	
Densidad					a	
Solubilidad en agua		100		g/l	a	30 °C
		100		g/l	a	90 °C
pH		7.5-8.5				1 g/l
Coefficiente de reparto				log Pow		
Viscosidad	--			mPa.s	a	°C
10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD						
Condiciones a evitar	Ninguna					
Materiales a evitar	Ninguno.					
Productos de descomposición peligrosos	Ninguno.					
Información adicional						

GRIS LANASET G

3/4  
 Código del producto 080173.5  
 Fecha 06.01.1998

**11. INFORMACION TOXICOLOGICA**

Toxicidad aguda	(LD50)	> 5000	mg/kg			Ratas (oral)
Irritación primaria	(Piel)	Non irritante	EC 83	OECD 404		Conejos
	(Ojos)	Non irritante	EC 83			Conejos
Efectos negativos en el hombre		No se conocen efectos negativos				
Información adicional						

**12. INFORMACIONES ECOLOGICAS**

Bioeliminación	70-80%, Análisis DOC,	OCDE 302B
Resumen	Eliminación po adsorción sobre lodo	

**DATOS ECOTOXICOLÓGICOS**

Toxicidad para el efluente bacterias	BST CI50	> 300	mg/l		
Toxicidad para los peces	CL0 CL50	6 18	mg/l mg/l	48 h trucha arcoiris	OECD 203

Resumen Nocivo para los organismos acuáticos (Modelo CE)

Comportamiento en las plantas de tratamiento No produce inhibición. No se conocen efectos nitrificadores inhibidores

**INFORMACION ECOLOGICA ADICIONAL**

DBO5	25	mgO2/g	DQO	1000	mgO2/g	COT	34.4 %
Contenido de nitrógeno	5.7	%					
Contenido de fósforo	0.1	%			as phosphate		
Contenido en halógeno orgánico	-	%					
Contenido de metales	0.79 2.5	% %			Cobalt as organo-metal complex Chromium as CrIII organo-metal complex		

Producto ensayado Basado en datos conocidos de los componentes

**13. CONSIDERACIONES SOBRE LA ELIMINACION**

Producto Incinerar, verter. Observar las disposiciones legales.

Clasificación de los residuos (91/689/CE)

Embalaje contaminado Tratar como residuos químicos los envases vacíos contaminados.

**PRAT BELTRAN, S. L.**  
 Narciso Monturiol, 35. Apartado 5  
 Tel. (93) 379 43 44 - Fax (93) 370 34 52  
 08820 El Prat de Llobregat (Spain)



GRIS LANASET G

4/4  
Código del producto 080173.5  
Fecha 06.01.1998

<b>14. INFORMACION RELATIVA AL TRANSPORTE</b> MANTENER LEJOS DE ALIMENTOS				
Número UN ADR/RID	FREE	Clase ADR/RID	FREE	
Nombre para el transporte ADR/RID				
Número UN IMO	FREE	Clase IMDG	FREE	Grupo de embalaje
Nombre para el transporte IMO				
Número UN ICAO	FREE	Clase ICAO		Grupo de embalaje
Nombre para el transporte ICAO				
<b>15. INFORMACION REGLAMENTARIA</b>				
CLASIFICACION Y ETIQUETADO			83/467 CE	
Símbolo y clasificación -- --				
Frases R				
Frases S				
Contiene				
<b>16. OTRAS INFORMACIONES</b>				
<b>17. INFORMACIONES APLICABLE EN SU USO COMO</b>				
Colorante textil				
<p>Los productos de la División de Colorantes y Productos Químicos de Ciba Specialty Chemicals son de calidad técnica y si no se ha especificado lo contrario, están recomendados únicamente para su utilización en aplicaciones industriales de preparación, tintura o acabado de textiles, papel o cuero. Si se desean utilizar para otras aplicaciones, inclusive en productos de consumo sujetos a estándares o legislaciones específicas, deben ser consultado al proveedor. Los datos indicados en las H.D.S. son aplicables únicamente a los productos de Ciba Specialty Chemicals comercializados bajo sus propias designaciones. A petición de las autoridades competentes, Ciba Specialty Chemicals facilitará la información técnica en que se basan dichos datos.</p>				

member of ETAD

A continuació es presenta una imatge fotogràfica de l'envàs de colorant Gris Lanaset G.

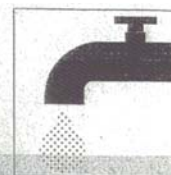


## ANNEX II: Full d'especificació del carbó actiu

Potable, Process and Waste Water Treatment

## Filtrisorb® 300 and 400

Agglomerated Coal Based Granular Activated Carbon



## PRODUCT DESCRIPTION

**Filtrisorb 300** and **400** are both from the renowned **Filtrisorb** range of Granular Activated Carbons which are installed in over 500 water treatment plants in Europe, the United States and Asia. **Filtrisorb** are produced by steam activation of selected grades of bituminous coal that have first been pulverised then **agglomerated**.

**Filtrisorb 300** and **400** have both high adsorption capacity and a high number of transport pores. This gives the carbon a greater selectivity for the removal of micropollutants such as pesticides in the presence of high concentrations of natural organic matter. In addition, these products are best suited to the removal of total organics such as disinfection by-product precursors, the humic substances which react with chlorine to form compounds such as trihalomethanes. **Filtrisorb 300** is also particularly suited to the treatment of bank infiltrated water.

## FEATURES

- The transport pores between the agglomerated particles within each granule allow the activation gases to penetrate much more within the structure of the activated carbon. The whole granule, not just the outside, is activated. This results in excellent adsorption in a wide range of applications.
- Combined with the high mechanical strength of the coal base, these transport pores also give the carbon excellent reactivation performance.
- The agglomerated structure ensure rapid wetting. There is no remaining floating material.
- By producing from a pulverised blend, the product is more uniform resulting in consistent high quality products.
- The carbon bed will be segregated which is where the larger granules go the bottom and smaller granules to the top of the bed. This stratification is retained after repeated backwashing, ensuring the adsorption profile remains unchanged with time and therefore maximising the bed life before breakthrough.
- **Filtrisorb 300** and **400** comply with EN12915, have KIWA ATA Certification and are approved by the United Kingdom Drinking Water Inspectorate.

## DESIGN INFORMATION

The following are typical design parameters for **Filtrisorb 300** and **400** installed for the treatment of surface water

- Empty bed contact time 10 - 30 minutes
- Bed depth 1 - 3m
- Linear velocity 5 - 20m/h
- Backwash bed expansion 20%

## SELECTION

**Filtrisorb 300** has a US Standard sieve size range of 8x30 giving an effective size range of 0.80 to 1.00mm. **Filtrisorb 400** has a 12x40 US Standard sieve size giving an effective size range of 0.60 to 0.70mm. In general, the smaller the granule size, the better the adsorption performance, therefore **Filtrisorb 400** should be selected unless the pressure drop is too high. In this case, **Filtrisorb 300** should be selected. Pressure drop graphs in function of linear velocity and temperature are shown on the reverse for both products.

## TECHNICAL DESCRIPTION

SPECIFICATIONS	F300 8 x 30	F400 12 x 40
Iodine number, minimum, mg/g	950	1050
Methylene blue number, minimum	230	260
Abrasion number, minimum	75	75
Moisture content, as packed, max. %	2.0	2.0
Effective size, mm	0.80-1.00	0.60-0.70
Mesh size, US Sieve Series		
> 8 mesh (4.75mm), max. %	15	-
> 12 mesh (1.70mm), max. %	-	5
< 30 mesh (0.60mm), max. %	4	-
< 7 mesh (0.425mm), max. %	-	4

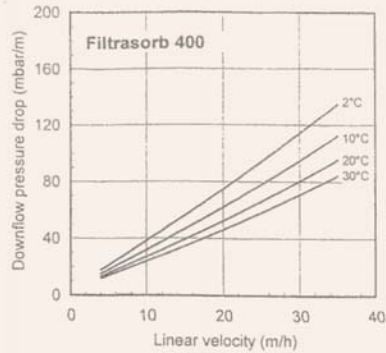
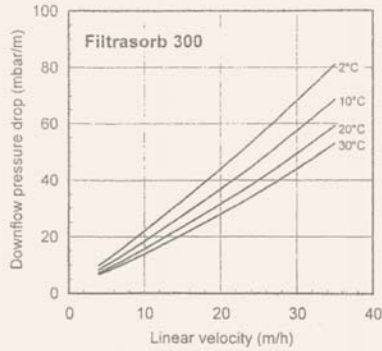
(Please refer to the Sales Specification Sheets which state the Chemviron Carbon test method used to define the above specifications. Copies available upon request.)

TYPICAL PROPERTIES	F300 8 x 30	F400 12 x 40
Bed density, backwashed and drained (for adsorber sizing), kg/m <sup>3</sup>	460	425
Floating content, TM-40, %w/w	0.1	0.1
Surface area, ISO 9277, m <sup>2</sup> /g	950	1050
Mean particle diameter, mm	1.6	1.0
Uniformity coefficient	1.9	1.7
Phenol loading at 1mg/l, DIN 19603, %	4.7	5.2
Detergent (TPBS) loading at 1mg/l, mg/g	150*	200*
Atrazine loading at 1µg/l, mg/g	40*	40*
Toluene loading at 1mg/l, mg/g	90*	100*
Trichloroethylene at 50µg/l, mg/g	20*	20*

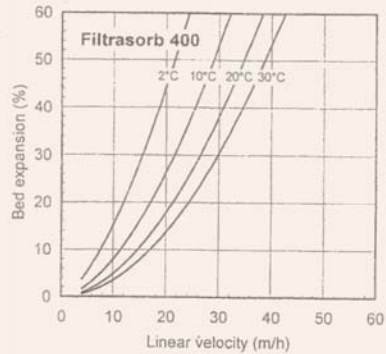
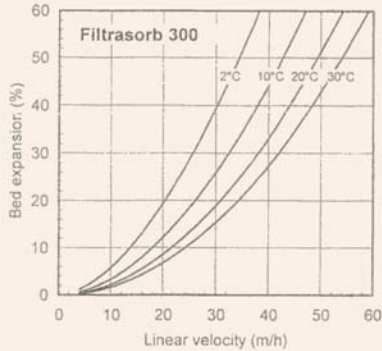
\*Isotherm loading in distilled water. These are reported for comparison and are unlikely to reflect loadings in practice.

Chemviron  
Carbon

Typical pressure drop curves for a backwashed and segregated bed



Typical bed expansion curve



**PACKING**

- 25kg paper bags
- F300 - 454 kg big bags, F400 - 450kg big bags
- Bulk

**QUALITY**

Each of our European Operations has achieved **ISO9002** for their quality management system related to activated carbon.

**CHEMVIRON CARBON**

**Chemviron Carbon** is the European operation of Calgon Carbon Corporation, a pioneer in carbon adsorption technology for over half a century.

**Chemviron Carbon** produces a range of pulverised, pelleted and granular carbons, including acid washed and impregnated products for use in a wide range of air, gas, water and process applications.

N.B. Chemviron Carbon reserve the right to change specifications without notice. All rights reserved for reproduction in part or in full without prior permission from Chemviron Carbon.

**Chemviron Carbon - European operation of Calgon Carbon Corporation**

**Sales Offices**

**Benelux and European Headquarters**

**CHEMVIRON CARBON**  
 Zoning Industriel C de Feluy  
 B-7181 Feluy, Belgium  
 Tel. +32 (0) 64 51 18 11  
 Fax. +32 (0) 64 51 15 91  
 e-mail: info@chemvironcarbon.com  
 Website: www.chemvironcarbon.com

**Germany**

**CHEMVIRON CARBON GmbH**  
 Robert-Koch-Strasse 1-3  
 D-63263 Neu Isenburg, Germany  
 Tel. +49 (0) 6102 3094-0  
 Fax. +49 (0) 6102 3094-33

**Corporate Headquarters**

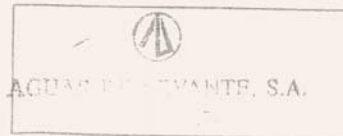
**Calgon Carbon Corporation**  
 400 Calgon Carbon Drive  
 Pittsburgh, PA 15205, USA  
 Tel. +1 (0) 412 787-6700  
 Fax. +1 (0) 412 787-6713  
 Mailing address: P.O. Box 717  
 Pittsburgh, PA15230-0717, USA  
 e-mail: ccc-info@calgoncarbon.com  
 website: www.calgoncarbon.com

**France**

**CHEMVIRON CARBON**  
 Immeuble "Expansion"  
 9-11 rue Georges Enesco  
 F-94008 Creteil Cedex, France  
 Tel. +33 (0) 1 43 77 12 63  
 Fax. +33 (0) 1 43 99 94 47

**United Kingdom**

**CHEMVIRON CARBON Ltd**  
 Number One Southlink  
 Oldham OL4 1DE, England  
 Tel. +44 (0) 161 628 5000  
 Fax. +44 (0) 161 628 5111



**Chemviron  
Carbon**

**Annex III: Dades de l'avaluació econòmica****Taula A.1.** Quantitat d'extracte de malta necessari per a la formació de pèl·lets

	<b>Quantitat requerida (g/l)</b>	<b>Preu (€/kg extracte malta)</b>	<b>Massa per fermentador 5 litres (g)</b>	<b>Cost extracte malta/ pèl·let format (€/g)</b>
Extracte de malta	20	42.06	100	0.014

**Taula A.2.** Composició de la solució de macronutrients i la seva avaluació econòmica

<b>Macronutrients</b>	<b>Concentració (g/l)</b>	<b>Preu (€/kg producte)</b>	<b>€/m<sup>3</sup> de medi</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20	3.91	78.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	1.74	8.7
CaCl <sub>2</sub>	1	2.75	2.75
Total			89.65

**Taula A.3.** Composició de la solució de micronutrients i la seva avaluació econòmica

<b>Micronutrients</b>	<b>Concentració (g/l)</b>	<b>Preu (€/kg producte)</b>	<b>€/m<sup>3</sup> de medi</b>
Àcid nitril-tri-acètic	1.5	93.60*	140.40
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0	1.74	5.22
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.5	42.90*	21.45
NaCl	1.0	0.46	0.46
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	23.30*	2.33
CoSO <sub>4</sub>	0.1	248.40*	24.84
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	36.10*	3.61
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	2.75	0.27
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01	20.08*	0.21
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.01	22.20*	0.22
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01	24.20*	0.24
NaMoO <sub>4</sub>	0.01	125.60*	1.26
Total			200.51

\* preu corresponent a reactius de laboratori i de qualitat industrial.

**Taula A.4.** Avaluació econòmica del medi de l'etapa en discontinu.

<b>Nutrients</b>	<b>Concentració</b>	<b>Preu (€/kg producte)</b>	<b>€/m<sup>3</sup> de medi</b>
Glucosa	8 g/l	0.90	7.20
NH <sub>4</sub> Cl	1.9 g/l	0.50	0.95
Micronutrients	1 ml/l		0.20
Macronutrients	10 ml/l		0.89
Total			9.25

**Taula A.5.** Detalls del cost de l'electricitat consumida. Tarifa segons l'empresa FECSA-ENDESA, aprovada BOE 31/12/2002. Tarifa de baixa tensió.

<b>Concepte</b>	
Potència contractada	1.407620 €/kW·mes
Energia	0.082402 €/kW·h

---

**ANNEX IV: Working document on sludge. 3<sup>rd</sup> draft**

Brussels, 27 April 2000  
ENV.E3/LM

**WORKING DOCUMENT ON SLUDGE**  
**3<sup>RD</sup> DRAFT**

An EU-initiative to improve the present situation for sludge management should be based on Article 175 EC Treaty and include the following elements:

**Definitions**

It is proposed to use the definition of sludge suggested by CEN: "mixture of water and solids separated from various types of water as a result of natural or artificial processes".

- Sewage sludge would then be sludge from urban waste water<sup>1</sup> treatment plants, septic tank sludge would be sludge from septic tanks which contain human excreta and domestic waste water<sup>2</sup> from single or multiple human dwellings, and industrial sludge would be sludge from the treatment of industrial waste water of the sectors listed in Annex VIII.
- The suggested definition of treated sludge is that of sludge which has undergone one of the treatment processes envisaged in Annex I or a combination of these processes, so as to significantly reduce its biodegradability and its potential to cause nuisance as well as the health and environmental hazards when it is used on land.
- The definitions of forest<sup>3</sup> (land with tree crown cover (stand density) of more than about 20% of the area. Continuous forest with trees usually growing to more than about 7 m in height and able to produce wood. This includes both closed forest formations where trees of various storeys and undergrowth cover a high proportion of the ground, and open forest formations with a high continuous grass layer in which tree synusia cover at least 10% of the ground) and reclaimed land (drastically disturbed land that is reclaimed using sludge) will also be introduced.

**Use on land**

In order to maintain or improve the present rate of recycling of nutrients and organic matter contained in sludge, it will be necessary to broaden the scope of the existing regulations and include the management of sludge in outlets such as silviculture, green areas and reclaimed land.

---

<sup>1</sup> The definition of 'urban waste water' in Directive 91/271/EEC reads: "domestic waste water or the mixture of domestic waste water with industrial waste water and/or run-off/rain water".

<sup>2</sup> The definition of 'domestic waste water' in Directive 91/271/EEC reads: "waste water from residential settlements and services which originates predominantly from the human metabolism and from household activities".

<sup>3</sup> Definition according to FAO guidelines.

- Sludge should be used on land whenever possible and only according to relevant Community or national legislation.
- Sludge should be used when there is an agronomic interest for the crops or the quality of soil can be improved. The application rate is to be adapted to the needs of crops and/or soil taking into account the amount of nutrients present in the soil, the supply of nutrients through the net mineralisation of the reserves in the soil and the addition of nutrients from livestock manure, chemical fertilisers and other organic fertilisers [without prejudice to other relevant Community legislation, in particular Directive 91/676/EEC on nitrates].
- The use of sludge shall be carried out in such a way as to minimise the risk of negative effects to:
  - human, animal and plant health,
  - the quality of groundwater and/or surface water,
  - the long-term quality of the soil, and
  - the bio-diversity of the micro-organisms living in the soil.
- Sludge should not be used in forests. However, Member States may allow the use of sludge in plantations (short-rotation plantations, plantations for growing energy crops, Christmas tree plantations and similar) and for re-forestation purposes where there is a need for an extra input of nutrients and as long as the provisions of Article 4 of Directive 75/442/EEC are complied with.

#### **Limit values**

There would be provisions on concentration limit values for heavy metals and organic compounds.

- The use of sludge in those soils where the concentration of one or more heavy metals exceeds the limit values suggested in Annex II would be prohibited; furthermore, Member States would have to ensure that those limit values are not exceeded as result of the use of sludge.
- If the concentration of one or more heavy metals in sludge is higher than the concentration limits suggested in Annex III or if the concentration of one or more organic compounds in sludge is higher than the concentration limits proposed in Annex IV, the use of sludge should not take place.
- When sludge is mixed with other wastes or products, the above-mentioned provision should apply to both the sludge before mixing as well as to the produced mixture. The mixing of sludge with other wastes or products solely for the purpose of diluting pollutants shall be prohibited.
- The maximum annual quantities of heavy metals set in Annex V that may be added to the soil because of the use of sludge should not be exceeded. An exemption could be envisaged for land reclamation where a one-off large application of sludge is needed

---

to raise the soil organic matter content and promote biological activity in the soil. Annexes II, III and IV shall still apply.

- The limit values in Annex III and V should be reviewed every six years with a view to achieving the medium and long-term concentrations set out in the paragraph on Prevention of pollution.

#### **Obligation for treatment**

In order to reduce the likelihood of spreading pathogens into the environment and to build up consumers' confidence, it will be necessary to treat the sludge.

- Sludge that has not been treated according to one of the treatment processes envisaged in Annex I should not be used.
- The competent authority may decide that the obligation of treatment does not apply to those industrial sludges listed in Annex VIII that do not contain potentially pathogenic micro-organisms.
- Sludge from septic tanks, cesspools and similar installations shall be taken to a waste water treatment plant for further treatment. In case of long distances, the competent authority may allow a derogation from the previous requirement on a case-by-case basis and as long as the provisions of Article 4 of Directive 75/442/EEC are complied with. The sludge shall be injected or worked into the soil as soon as it is spread.

#### **Conditions for use on land**

Sludge should not be used on soils whose pH is less than 5.0, on water saturated, flooded, frozen or snow-covered ground. Sludge should be spread in such a way as not to cause sludge run-off and minimise soil compaction as well as the production of aerosols.

Sludge may be used if the following conditions are met:

- the load limits set in Annex V are not exceeded (with the possible exception of land reclamation for one-off applications);
- there is an agronomic interest for nutrients or for the improvement of the content of organic matter in soil;
- the quantity of nutrients introduced is adapted to the needs of the crops or the soil according to best practice;
- the use does not cause unreasonable odour nuisance to the nearest dwellings.



Sludge shall be used according to the following table (advanced and conventional treatments are described in Annex I):

	<b>Advanced treatment</b>	<b>Conventional treatment</b>
Pastureland	Yes	Yes, deep injection and no grazing in the six following weeks
Forage crops	Yes	Yes, no harvesting in the six weeks following spreading
Arable land	Yes	Yes, deep injection or immediate ploughing down
Fruit and vegetable crops in contact with the ground	Yes	No. No harvest for 12 months following application
Fruit and vegetable crops in contact with the ground eaten raw	Yes	No. No harvest for 30 months following application
Fruit trees, vineyards, tree plantations and re-forestation	Yes	Yes, deep injection and no access to the public in the 10 months following spreading
Parks, green areas, city gardens, all urban areas where the general public has access	Yes, only well stabilised and odourless sludge	No
Forests	No	No
Land reclamation	Yes	Yes, no access to the public in the 10 months following spreading

**Producer responsibility & certification**

There should be a provision on producer responsibility and certification which provides that:

- Producers are to be responsible for the quality of sludge supplied (even when a contractor takes care of sludge marketing and spreading) and shall guarantee the suitability of sludge for use. Producers are to analyse the sludge for the agronomic parameters, heavy metals, organic compounds and micro-organisms with the frequency suggested in Annex VI and soils with the frequency and methods suggested in Annex VII.
- Producers shall implement a quality assurance system for the whole process, i.e. control of pollutants at source, sludge treatment, the way that the work is planned and the land evaluated, sludge delivery, sludge application and the communication of information to the receiver of the sludge. The quality assurance system shall be independently audited by auditors duly authorised by the competent authority.
- Analyses are to be carried out by an accredited laboratory which shall be authorised and duly monitored by the competent authority.

**Information requirements**

Information requirements should include the following elements.

The producer to provide the receiver of the sludge with the

- name and address of the producer;
- name and address of the treatment plant from which the sludge has origin;
- assurance that the quality of supplied sludge fulfils all relevant and applicable requirements;
- copy of the auditor's certificate;
- type of treatment carried out in relation to the list in Annex I and result of the analysis on *Salmonella spp* and *Escherichia Coli* if applicable;
- composition and properties of the sludge in relation to the agronomic parameters suggested in Annex VI;
- results of the analyses on sludge in relation to the heavy metals listed in Annex III and the organic compounds suggested in Annex IV.

The receiver of the sludge shall keep records of and provide the producer with the following:

- information about any other sludge, manure or other wastes that have been applied to the land;
- information about the land that is relevant to preventing water pollution;

- records of fertilisers and agrochemicals used on the land.

The producer to keep a copy of the information sent to the receiver along with the

- name and address of the receiver;
- location of the plot of land on which the sludge is used and its area;
- type of land use;
- treatment, quantity and analysis of sludge supplied for use;
- results of the analysis on the soil on which sludge is applied in relation to the heavy metals suggested in Annex II;
- details of the information supplied by the receivers.

The producer has to keep the above-mentioned information for at least ten years and has to report annually to the competent authority. This information, in an aggregated form, shall provide the basis for the consolidated report to be sent to the Commission.

This information, in an aggregated form, shall be available upon request to the general public.

Member States shall communicate to the Commission the competent authority responsible for the implementation and monitoring of these provisions on their territory. The Commission shall include this information in the consolidated report.

#### **Code of practice**

A part from obligatory requirements, it could be envisaged to set up codes of good practice for the use of sludge in the different outlets. Such codes would be implemented by producers on a voluntary basis.

The codes should contain certain provisions covering as a minimum the following items:

For all outlets:

- measures to be taken for not impairing the quality of groundwater;
- measures and precautions to be taken in order to prevent the leaching from sludge which is stored before use;
- periods in which the use of sludge is not suitable because of weather conditions.

For use in agriculture and silviculture:

- the sludge shall be used when there is an agronomic interest for growing of crops or for the improvement of the soil;
- the sludge nutrient load, especially as regards nitrogen and phosphorous, shall be taken into account when the amount of fertilisers needed by crops is calculated;

- periods in which spreading of sludge is not suitable because crops would not benefit from the supplied organic matter or nutrients.

**Prevention of pollution**

A very important element in a global strategy to ensure the long term availability for the beneficial use of sludge would be to engage in an active reduction of pollution in waste water. It could be envisaged to draw up detailed plans for reducing the amount of potentially hazardous substances, materials, elements or compounds that end up in the sewer, and therefore in sewage sludge, because of their presence in cleaning products, detergents, cosmetics, medicines, animal fodder, pipes, amalgam fillings or others.

These plans should aim at:

- reducing the quantities of potentially hazardous substances, materials, elements or compounds that end up in sewage sludge so that it complies with the concentration limits for heavy metals and organic compounds as suggested for the beneficial use of sewage sludge;
- maximising the share of sewage sludge suitable for beneficial use as well as minimising the quantities of heavy metals and organic compounds released into the environment;
- inform consumers of the composition of the products, substances or materials that could end up in the sewer and how to dispose of them in a way which does not pollute waste waters.

These plans should aim at reducing the overall amount of potentially hazardous substances and elements in waste water and sludge, with a view to achieving in the Community these medium and long-term targets for the 90-percentile of sewage sludge:

Elements	Medium term (about 2015)		Long term (about 2025)	
	Limit values for concentrations of heavy metals in sludge for use on land (mg/kg dm)	Limit values for amounts of heavy metals which may be added annually to soil, based on a ten year average (g/ha/y)	Limit values for concentrations of heavy metals in sludge for use on land (mg/kg dm)	Limit values for amounts of heavy metals which may be added annually to soil, based on a ten year average (g/ha/y)
Cd	5	15	2	6
Cr	800	2 400	600	1 800
Cu	800	2 400	600	1 800
Hg	5	15	2	6
Ni	200	600	100	300
Pb	500	1 500	200	600
Zn	2 000	6 000	1 500	4 500

The measures taken in drawing up such plans shall be part of the periodic report which is to be sent to the Commission. In particular, the report shall contain information on implemented policy measures, implemented concrete measures, achieved improvements, and implemented consumer advisory services.

**Committee procedure**

In the implementation and monitoring of sludge management, the Commission will be helped by a Committee of representatives of the Member States. This Committee will have the possibility of adapting the Annexes to the technological progress, in particular the definitions of suitable treatments in Annex I.

### Annex I: Sludge treatment processes

#### Advanced treatments (resensitisation)

- Thermal drying ensuring that the temperature of the sludge particles is higher than 80°C with a reduction of water content to less than 10% and maintaining a water activity above 0.90 in the first hour of treatment;
- Thermophilic aerobic stabilisation at a temperature of at least 55°C for 20 hours as a batch, without admixture or withdrawal during the treatment;
- Thermophilic anaerobic digestion at a temperature of at least 53°C for 20 hours as a batch, without admixture or withdrawal during the treatment;
- Thermal treatment of liquid sludge for a minimum of 30 minutes at 70°C followed by mesophilic anaerobic digestion at a temperature of 35°C with a mean retention period of 12 days;
- Conditioning with lime reaching a pH of 12 or more and maintaining a temperature of at least 55°C for 2 hours;
- Conditioning with lime reaching and maintaining a pH of 12 or more for three months.

The process shall be initially validated through a 6 Log<sub>10</sub> reduction of a test organism such as *Salmonella Senftenberg W 775*.

The treated sludge shall not contain *Salmonella spp* in 50 g (wet weight) and the treatment shall achieve at least a 6 Log<sub>10</sub> reduction in *Escherichia Coli* to less than 5·10<sup>2</sup> CFU/g.

#### Conventional treatments

- Thermophilic aerobic stabilisation at a temperature of at least 55°C with a mean retention period of 20 days;
- Thermophilic anaerobic digestion at a temperature of at least 53°C with a mean retention period of 20 days;
- Conditioning with lime ensuring a homogenous mixture of lime and sludge. The mixture shall reach a pH of more than 12 directly after liming and keep a pH of at least 12 for 24 hours;
- Mesophilic anaerobic digestion at a temperature of 35°C with a mean retention period of 15 days;
- Extended aeration at ambient temperature as a batch, without admixture or withdrawal during the treatment period<sup>(\*)</sup>;
- Simultaneous aerobic stabilisation at ambient temperature<sup>(\*)</sup>;

---

<sup>(\*)</sup> The minimum time length of the treatment shall be laid down by the competent authority taking into consideration the prevailing climatic conditions in the area where the treatment plant is located.

- Storage in liquid form at ambient temperature as a batch, without admixture or withdrawal during the storage period<sup>(\*)</sup>.

The sludge treatment shall at least achieve a 2 Log<sub>10</sub> reduction in *Escherichia Coli*.

- 0 -

The relevant process parameters shall be monitored at least daily, and preferably continuously if practicable. Records shall be kept and made available upon request to the competent authority for inspection purposes.

European standards for the monitoring of these treatment processes shall be developed. If CEN standards are not available and until they are developed, ISO, international or national standards shall apply.

When the competent authority of the concerned Member State is satisfied that a treatment process not listed in this Annex is capable of achieving the same results as the listed treatments, it shall inform the Commission thereof. The Commission, after evaluation of the information provided, may seize the Committee of representatives of Member States. If the opinion of the Committee is positive, the treatment process shall be included in this Annex.

[Without prejudice to other relevant Community legislation, in particular Directive 90/667/EEC on animal waste.]

**Annex II: Limit values for concentrations of heavy metals in soil**

Elements	Limit values (mg/kg dm)			
	Directive 86/278/EEC 6<math>pH</math><math><7</math>	5<math>pH</math>=6	6<math>pH</math><7	$pH\geq 7$
Cd	1 – 3	0.5	1	1.5
Cr	-	30	60	100
Cu	50 – 140	20	50	100
Hg	1 – 1.5	0.1	0.5	1
Ni	30 – 75	15	50	70
Pb	50 – 300	70	70	100
Zn	150 – 300	60	150	200

When the concentration value of an element in a specific land area is higher than the concentration limit as set in the table, the competent authority may still allow the use of sludge on that land on a case-by-case basis and after evaluation of the following aspects:

- uptake of heavy metals by plants,
- intake of heavy metals by animals,
- groundwater contamination,
- long term effects on bio-diversity, in particular on soil biota.

The areas of land with higher heavy metal concentrations shall be monitored and the possibility of using sludge shall be subject to a periodical assessment by the competent authority.



**Annex III: Limit values for concentrations of heavy metals in sludge for use on land**

Elements	Limit values (mg/kg dm)		Limit values (mg/kg P)
	Directive 86/278/EEC	Proposed	Proposed
Cd	20 – 40	10	250
Cr	-	1 000	25 000
Cu	1 000 – 1 750	1 000	25 000
Hg	16 – 25	10	250
Ni	300 – 400	300	7 500
Pb	750 – 1 200	750	18 750
Zn	2 500 – 4 000	2 500	62 500

The sludge producer may choose to observe either the dry matter related or the phosphorus related limit values.

**Annex IV: Limit values for concentrations of organic compounds and dioxins  
in sludge for use on land**

Organic compounds	Limit values (mg/kg dm)
AOX <sup>1</sup>	500
LAS <sup>2</sup>	2 600
DEHP <sup>3</sup>	100
NPE <sup>4</sup>	50
PAH <sup>5</sup>	6
PCB <sup>6</sup>	0.8

Dioxins	Limit values (ng TE/kg dm)
PCDD/F <sup>7</sup>	100

---

<sup>1</sup> Sum of halogenated organic compounds

<sup>2</sup> Linear alkylbenzene sulphonates

<sup>3</sup> Di(2-ethylhexyl)phthalate.

<sup>4</sup> It comprises the substances nonylphenol and nonylphenolethoxylates with 1 or 2 ethoxy groups.

<sup>5</sup> Sum of the following polycyclic aromatic hydrocarbons: acenaphthene, phenanthrene, fluorene, fluoranthene, pyrene, benzo(b+j+k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(ghi)perylene, indeno(1, 2, 3-c, d)pyrene.

<sup>6</sup> Sum of the polychlorinated biphenyls components number 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180.

<sup>7</sup> Polychlorinated dibenzodioxins/ dibenzofuranes

**Annex V: Limit values for amounts of heavy metals which may be added annually to soil, based on a ten year average**

Elements	Limit values (g/ha/y)	
	Directive 86/278/EEC	Proposed
Cd	150	30
Cr	-	3 000
Cu	12 000	3 000
Hg	100	30
Ni	3 000	900
Pb	15 000	2 250
Zn	30 000	7 500

The competent authority may decide to allow an increase in the loading rate for copper and zinc on a case by case basis for those plot of land that are copper or zinc-deficient and if it has been proven by qualified expert advice that there is a specific agronomic need for the crops.

#### Annex VI: Sampling frequency

The following parameters shall always be analysed in order to characterise the composition of sludge:

- dry matter and organic matter<sup>(\*)</sup>;
- pH;
- primary nutrients: nitrogen (as total N and NH<sub>4</sub>-N), phosphorus (P), potassium (K).

For agricultural and similar uses, the following parameters shall also be analysed in order to characterise the agronomic value of sludge:

- secondary nutrients: calcium (Ca), magnesium (Mg), sulphur (S);
- micro-nutrients: boron (B), cobalt (Co), iron (Fe), manganese (Mn), molybdenum (Mo).

As a minimum, the frequency of analysis for sludge shall be as in the following table. The analyses shall be carried out at regular intervals during the year.

Quantity of sludge produced per year and per plant (tonnes of dm)	Minimum number of analyses per year				
	Agronomic parameters	Heavy metals	Organic compounds	Dioxins	Micro-organisms
< 250	2	2	-	-	2
250 – 1 000	4	4	1	-	4
1 000 – 2 500	8	4	2	-	8
2 500 – 4 000	12	8	4	1	12
> 4 000	12	12	6	1	12

Sludge shall be assumed to be conform to the concentration limit values for heavy metals, organic compounds, dioxins and micro-organisms if, for each concentration limit considered individually, the 90-percentile of the samples within a twelve-month period are at or below the threshold value and if the 10-percentile of the samples exceed only one threshold value and by less than 50%.

<sup>(\*)</sup> Dry matter and organic matter shall be evaluated from the measurements of dry residue and loss on ignition.

The competent authority may decide on a case-by-case basis to allow a reduction of the frequency of the analysis of any of the pollutant parameters (heavy metals, organic compounds, micro-organisms) if in a two-year period it has been shown that each measured value of the parameter is consistently below 75% of the threshold limit.

The competent authority may decide on a case-by-case basis to allow a reduction of the frequency of the analysis of any of the agronomic parameters if in a two-year period it has been shown that each measured value of the parameter deviates for less than 20% from the average.

The competent authority may decide on a case-by-case basis and whenever justified on the analysis of pollutants other than those listed in Annexes II and IV and on the analysis of micro-organisms other than those listed in Annex I.

For those pollutants (heavy metals, organic compounds, micro-organisms) that are either not present at all or present only in negligible quantities in the industrial waste water of the sectors listed in Annex VIII, the competent authority shall decide on the parameters and the frequency of the analyses to be carried out. It shall inform the Commission thereof.

### Annex VII: Analysis and sampling

The soil shall be analysed before the first use of sludge on land and every ten years thereafter for the following parameters:

- pH;
- cadmium, chromium, copper, mercury, nickel, lead and zinc.

The representative soil sample for analysis shall be made up by mixing together 25 core samples taken over an area not exceeding 5 hectares which is farmed for the same purpose. In case of large agricultural exploitations and subject to the approval of the competent authority, the core samples may be taken over an area of 20 hectares which is farmed for the same purpose. The samples must be taken to a depth of 25 cm unless the depth of the surface soil is less than that value; however, the sampling depth in the latter case must not be less than 10 cm.

Sampling and analysis of the relevant parameters shall be carried out as given by CEN standards. If CEN standards are not available and until they are developed, ISO, international or national standards shall apply.

Methods for soil examination:

Parameter	Title	Reference(*)
Sampling	Soil quality – Sampling – Part: 1: Guidance on the design of sampling programmes	ISO/DIS 10381-1
	Soil quality – Sampling – Part: 4: Guidance on the design of sampling programmes	ISO/DIS 10381-4
Soil texture (clay and organic matter content)	Soil quality - Simplified soil description	ISO 11259
	Soil quality – Determination of particle size distribution in mineral soil material – Method by sieving and sedimentation	ISO 11277
	Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)	ISO 10694
pH	Soil quality – Determination of pH	ISO 10390
Heavy metals	Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia	ISO 11466
	Soil quality – Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel and zinc – Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods	ISO 11047
Nitrogen	Soil quality – Determination of nitrate nitrogen, ammonium nitrogen and total soluble nitrogen in air-dry soils using calcium chloride solution as extractant	ISO 14255
Phosphorus	Soil quality – Determination of phosphorus – Spectrometric determination of phosphorus soluble in sodium hydrogen carbonate solution	ISO 11263

(\*) Latest available edition.

Methods for sludge examination:

Parameter	Title	Reference(*)
Sampling	Water quality – Sampling - Part 13 : Guidance on sampling of sludges from sewage and watertreatment works	EN/ISO 5667P13
Dry matter	Characterization of sludge - Determination of dry residue and water content	prEN 12880
Organic matter	Characterization of sludges - Determination of the loss on ignition of dry mass	prEN 12879
pH	Characterization of sludge - Determination of pH-value of sludges	EN 12176
Nitrogen	Characterisation of sludges - Determination of Kjeldahl nitrogen	prEN 13 342
Phosphorus	Determination of phosphorus compounds	prEN 13 346
Potassium		
Heavy metals	Characterisation of sludges Aqua regia extraction methods - Determination of trace elements and phosphorus	prEN 13 346
Secondary nutrients and micro-nutrients		(prEN 13 346)
Salmonella Seftenberg W775		
Salmonella spp		
Escherichia Coli		
AOX		[ISO 15009]
LAS		
DEHP		
NPE		
PAH		[ISO 13877]
PCB		[CD 10382]
PCDD/F		

(\*) Latest available edition.

**Annex VIII: Industrial sectors**

The code in the entries refers to the European Waste Catalogue adopted on 20 December 1993 with Commission Decision 94/3/EC.

1. 02 02 04 sludges from on site effluent treatment from the preparation and processing of meat, fish and other foods of animal origin [without prejudice to other relevant Community legislation, in particular Directive 90/667/EEC on animal waste]
2. 02 03 05 sludges from on site effluent treatment from fruit, vegetables, cereals, edible oils, cocoa, coffee [, tea] and tobacco preparation, processing; conserve production; tobacco processing [, yeast industry]
3. 02 04 03 sludges from on site effluent treatment from sugar processing
4. 02 05 02 sludges from on site effluent treatment from the dairy production industry
5. 02 06 03 sludges from on site effluent treatment from the baking and confectionery industry
6. 02 07 05 sludges from on site effluent treatment from the production of alcoholic and non-alcoholic beverages (excluding coffee, tea and cocoa)
7. 03 03 06 fibre and paper sludge
8. 04 01 06 sludges containing chromium from the leather industry
9. 04 01 07 sludges free of chromium from the leather industry