

**TRACTAMENT
BIOLÒGIC
DE LLEIXIUS NEGRES
DE PAPERERA
AMB FONGS
*PHANEROCHAETE
CHRYSOSPORIUM***

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Biblioteca General

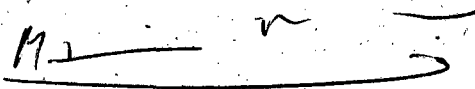
Edifici A

08193 Bellaterra (Barcelona) Espanya

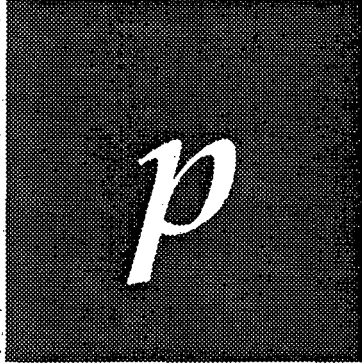
M. TERESA VICENT I HUGUET, PROFESSORA TITULAR DE LA UNITAT D'ENGINYERIA QUÍMICA, DEL DEPARTAMENT DE QUÍMICA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

CERTIFICA: Que el llicenciat Xavier Gabarrell i Durany ha realitzat amb la meua direcció, en els laboratoris de la Unitat d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol "**Tractament biològic de lleixius negres de paperera amb el fong *Phanerochaete chrysosporium***" es presenta en aquesta memòria, i constitueix la seva Tesi, dins del programa de doctorat de **Biotecnologia**, per a optar al Grau de Doctor en Ciències, Secció de Química.

I per a que en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presente i apadrine davant la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona aquesta Tesi, signant aquesta certificació a Bellaterra, 7 de Novembre de 1995



M. TERESA VICENT I HUGUET



Presentació

s SUMARI

i INTRODUCCIÓ

La lignina

 Importància ecològica de la lignina

 Estructura química

Biodegradació de la lignina

 Microorganismes que dedraden la lignina

Phanerochaete chrysosporium

 Les peroxidases

 LiP i MnP

 Altres peroxidases

 Regulació del carboni i el nitrogen

 Efecte de l'alcohol veratrílic

 Regulació de MnP pel manganès

 Producció de LiP i MnP

 Importància dels fongs «white rot» en la degradació

El paper

 Fabricació de pasta i paper

Procés al sulfat Kraft

 Procés de fabricació del paper

 La contaminació de la indústria del paper

Els lleixius negres

Bibliografia

0 L'EFLUENT I ELS LLEIXIUS NEGRES

L'efluent i els lleixius negres

Mètodes analítics

 Característiques mitjanes dels lleixius negres

Resultats	
Influència del pH en la distribució de mides moleculars	
Influència del pH en la mesura dels compostos aromàtics	
Influència del pH en la mesura del color	

1

PRETRACTAMENT DE DESTOXIFICACIÓ DE LLEIXIUS NEGRES PROCEDENTS DE LA PASTA DE CÀNEM AMB FONGS «WHITE ROT»

Introducció	
Materials i mètodes	
Resultats i discussió	
Temperatura i agitació	
Efecte dels tensoactius	
Font de carboni	

2

PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM IMMOBILITZAT EN ESPUMA DE POLIURETÀ I NILO EN DIFERENTS TIPUS DE REACTORS TREBALLANT EN DISCONTINU I EN CONTINU

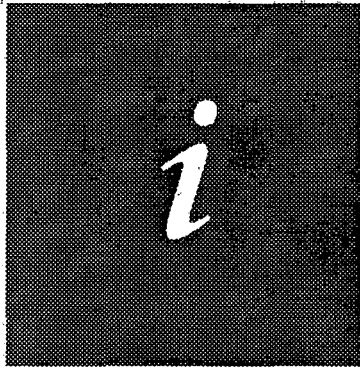
Introducció	
Materials i mètodes	
Resultats	
Suport d'immobilització	
Estudi de la immobilització	
Tractament en discontinu	
Reactor discontinu de tanc agitat	

3

CONDICIONS AMBIENTALS DEL PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM PER REDUIR LA TOXICITAT DELS LLEIXIUS NEGRES AMB ENZIMS LIGNINOLÍTICS (MANGANÈS PEROXIDASA)

Introducció	
Materials i mètodes	
Resultats i discussió	
Consideracions prèvies	
Bioreactor sense inocular	
Anàlisi de la reproductibilitat experimental	
Activitat enzimàtica	
Comparació de l'activitat enzimàtica de dues soques en el temps	

Estudi de les condicions de producció dels enzims	
Relació C/N	
Efecte de l'aireació	
Manteniment de la glucosa residual	
Discussió i conclusions	
C/N	
Oxigen	
Reducció del color i dels components aromàtics	
Reducció de la toxicitat	



Introducció

La lignina

Importància ecològica de la lignina

La lignina és una de les fonts de carboni i energia renovables més abundants a la terra. El polímer lignina procedent del món vegetal és el segon component orgànic més important de la Terra (Gold, 1993), i solament la cel·lulosa el supera (Ronald L Crawford 1981). La matèria lignocel·lulòsica és biosintetitzada per les plantes en grans quantitats. En la taula i.1 presentem la composició química d'algunes d'aquestes plantes. (Ronald L Crawford 1981).

Les plantes majors sintetitzen una gran quantitat de macromolècules aromàtiques insolubles, incloent-hi els tanins, i la lignina. Aquestes macromolècules aromàtiques són biodegradables però de forma molt lenta.

La lignina es troba en totes les plantes vasculares, en les que està com un component estructural de suport i en el teixit conductor. També ha estat identificada en certs grups de plantes no tan evolucionades, si bé, hi ha alguns grups de plantes en les que no s'ha identificat, com les algues verdes.

La lignina proveeix una estructura rígida a les plantes i els dóna el caràcter recalitrant alhora que serveix per protegir a la

Taula i.1. Composició química de les plantes terrestres

Plant	Constituent, Percent of Dry Weight		
	Holocellulose ^a	Lignin ^b	Other ^c
Birch (<i>Betula alleghaniensis</i>) ^d	77.6	19.3	3.1
Spruce (<i>Picea excelsa</i>) ^d	70.7	26.3	3.0
Elm (<i>Ulmus americana</i>) ^d	74.0	24.0	2.0
Pine (<i>Pinus strobus</i>) ^d	68.0	29.0	3.0
Beech (<i>Fagus grandifolia</i>) ^d	72.0	22.0	6.0
Hemlock (<i>Tsuga canadensis</i>) ^d	64.0	33.0	3.0
Mistletoe (<i>Viscum album</i>) ^e	—	22.0	—
Pine (<i>Pinus sylvestris</i>) ^d	63.0	28.0	9.0
Red Alder (<i>Alnus rubra</i>) ^d	63.1	25.4	11.5
Balsam poplar (<i>Populus balsamifera</i>) ^d	66.7	22.3	11.0

Figura i. 1. Composició química d'una selecció d'algunes plantes terrestres segons Crawford (1981)

cel·lulosa i hemicel·lulosa dels atacs microbians. La lignificació pot ser també una resposta a una infecció o ferida que pateix la planta. La curació de la planta inclou la lignificació i suberificació de les cèl·lules que estan relacionades amb la resistència a la infecció. A més a més però, li confereix altres propietats a les plantes com la distribució de l'aigua, els nutrients i els metabolits. En la taula i.2 hi ha resumides les principals funcions de la lignina en les plantes. (Ramos, L. 1991)

Taula i.2. Contribució de la lignina a les propietats de la planta

<i>Funcions de la lignina</i>	<i>Propietats de la planta</i>
<i>Sistema d'emmagatzematge d'energia.</i>	<i>Fotosíntesi.</i>
<i>Pont entre cèl·lules, que dona l'estructura de la fusta.</i>	<i>Resistència a esforços mecànics com és la compressió.</i>
<i>Impedeix la penetració en la planta de components com poder ser enzims destructius o inhibidors de la degradació enzimàtica. Antioxidant i estabilitzador de la llum UV.</i>	<i>Resistència a esforços bioquímics, com l'atac microbià o la infecció.</i>
<i>Agent resistent a l'aigua.</i>	<i>Resistència a esforços físio-químics, resposta a la humitat, balanç d'aigua i transport, i transport de nutrients.</i>

Taula i.2 Contribució de la lignina a les propietats de la planta (Ramos, 1991)

Fins fa ben poc la microbiologia de la degradació de la lignina no era coneguda; solament se sabia que alguns microorganismes eren capaços de degradar-la. Les rutes metabòliques de la seva degradació no estaven perfectament establertes i, es coneixia molt poca cosa sobre els enzims que l'atacaven. Per tant, bona part del coneixement sobre la seva biodegradació es basava en hipòtesis fonamentades per una recerca encara limitada. Una de les principals raons d'aquesta incertesa era que encara no es coneixia l'estructura de la mateixa lignina. Una vegada coneguda, s'ha sabut que la diversitat estructural dels elements necessita de l'atac per múltiples enzims per degradar-la.

La capacitat de la biosfera per produir grans quantitats de materials lignocel·lulòsics és el motor de la vida a la Terra, ja que si trenquem el cicle geoquímic carboni-oxigen –esquematitzat en la figura i.1–, que es realitza a través de la fotosíntesis de les plantes, la vida a la terra es veuria alterada (Crawford 1981). Aquesta capacitat juntament amb l'abundància de la lignina obre importantíssims camps per la seva possible utilització i dona origen a una important indústria que hi fonamenta la seva producció, com és la silvicultura, el paper,... I tota aquesta indústria en algun moment del seu procés productiu produeix residus lignocel·lulòsics (taula i.3). És per això que la recerca orientada a esbrinar quins són els mecanismes de degradació i transformació de la lignina pels microorganismes ha

Estructura química

La lignina és el biopolímer més complex. És un polímer aromàtic, amorf, tridimensional, insoluble en aigua, compost per unitats de oxifenilpropanoïds lligades per una gran varietat d'enllaços químics, i amb un pes molecular elevat.

La lignina es sintetitzada per les plantes a partir del diòxid de carboni per la ruta de l'àcid siquímic (figura i.2). El siquimat és convertit a L-fenilalanina, el qual és el primer precursor de tres alcohols: p-cumarílic, coniferílic i sinapílic representats en la figura i.3. (Crawford 1981) Els alcohols són polimeritzats enzimàticament per les feniloxidases (enzims que polimeritzen els alcohols aromàtics) (Leisola, 1985) i es formen radicals lliures que espontàniament i de forma irreversible, sense cap control enzimàtic, polimeritzen per formar di, i tri oligolignols que tornen a reaccionar amb els monòmers inicials.

Raons filogenètiques determinen les proporcions relatives de cada alcohol en la lignina de cada planta. Alguns autors classifiquen la lignina en 3 tipus. La guaiacil lignina és la que trobem majoritàriament en les plantes coníferes i es forma per la

Figura i.2

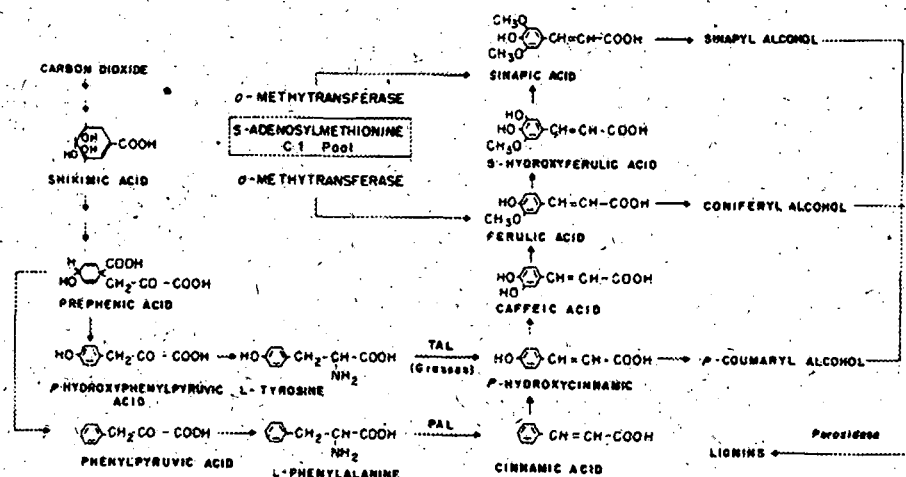


Figure 2.2 Biosynthetic pathway from CO_2 to lignin [from Higuchi et al. (1977)].

Figura i.2. Ruta de biosíntesi de la lignina a partir de CO_2 .

polimerització de l'alcohol coniferilic amb petites quantitats dels altres dos, en proporcions properes a 80:14:6 (Ronald L Crawford 1981). En la figura i.4 hi ha representada l'estructura de la lignina procedent d'una planta conífera. La guaicaial-sinapílica lignina és la lignina que trobem en les plantes de fulla caduca i està formada per polimerització dels alcohols coniferilic i sinapílic, a parts iguals, i

Figura i.3

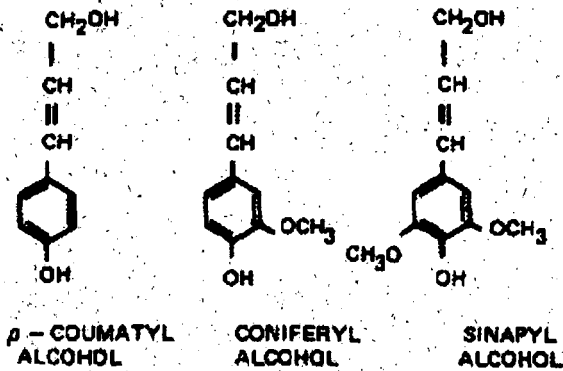


Figura i.3. Alcohols cinamítics

molt poques unitats de l'alcohol cumarilic. La tercera classe de lignina es formaria per polimerització dels tres alcohols a parts aproximadament iguals. En la figura i.5 podem observar una altra representació de l'estructura de la lignina. El pes molecular de les lignines varia àmpliament, però en la natura tenen pesos moleculars superiors als 100.000 daltons.

La participació de radicals lliures en els mecanismes de síntesi ocasiona una heterogeneïtat en els enllaços i, per tant, també d'estructures. Aquesta gran varietat d'estructures aconsellaria parlar de lignines (Meunier, 1994); més que d'una sola lignina. Ara bé, a l'igual com la majoria d'autors parlarem aquí de lignina per referir-nos al conjunt d'aquest variat polímer de polifenols.

Figura i.4. La lignina

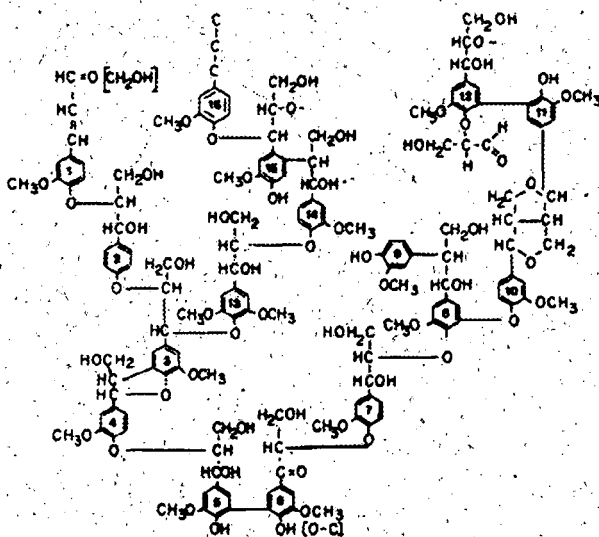


Figura i.4. Estructura de la lignina procedent d'una planta conífera, realitzada per Adler (1994) (Crawford, 1981)

S'ha identificat tres tipus d'enllaços principals

Figura i.5

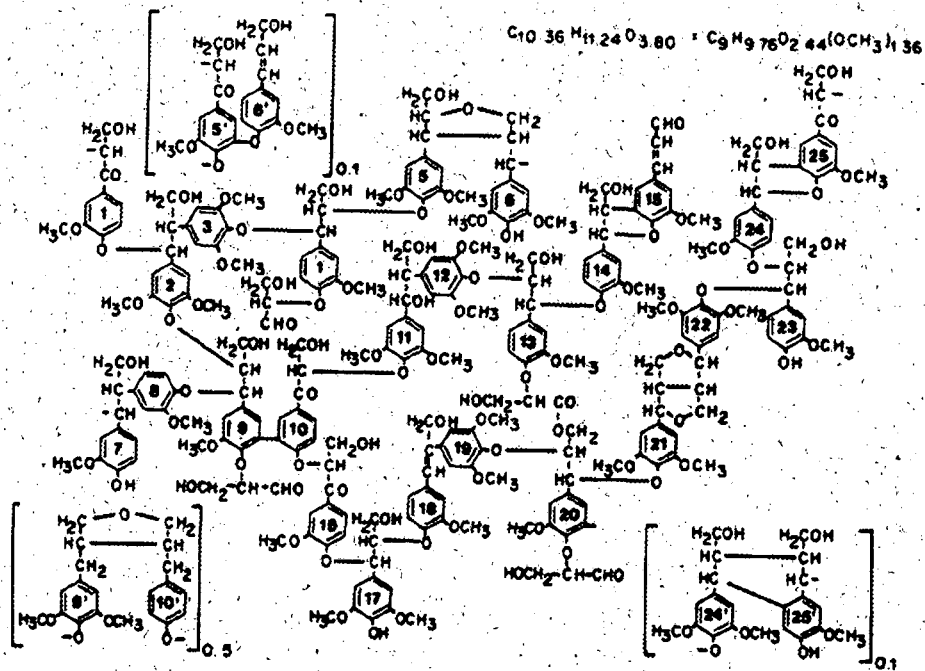


Figura i.5. Estructura de la lignina per Nimz 1974

en la lignina: arilglicerol-B-arylèter que representa el 48-55 % dels enllaços, l'enllaç bifeníl (9-11 %) i les unions fenilcumaran (9-12 %). Un resum d'aquests enllaços el trobem en la taula i.4. (Meunier, 1994).

Taula i.4

BOND TYPE	STRUCTURE	PROPORTION(%)
Arilglicerol-β-aryl ethers		48
Noncyclic benzyl aryl ethers		6-8
Biphenyl		9.5-11
1,2-Dioxetane structures		7
Phenylcoumaron structures		9-12
Diphenyl ethers		3.5-6

Taula i.4. Proporcions dels enllaços més importants de la lignina per Adler 1977 (Crawford, 1981)

Biodegradació de la lignina

Microorganismes que degraden la lignina

En la natura hi ha diversos mecanismes biològics per degradar la lignina. Una àmplia varietat de bacteris i fongs són coneguts per la seva capacitat de modificar la lignina i metabolitzar algunes de les seves molècules. En el medi natural aquesta degradació la podrien dur a terme una acció combinada de fongs i bacteris.

Un dels gèneres de bacteris més estudiats per degradar la lignina són els actinomicets. Així, per exemple, *Streptomyces*, i *Nocardia* s'han utilitzat per degradar-la. Ara bé, s'aconseguirien només reduccions de la lignina inferiors al 40%. (Crawford, 1981b; Kirk, 1987). En la taula i.5 presentem alguns dels bacteris amb capacitat per atacar la lignina. Aquests bacteris són aerobis i sembla que en assatjos realitzats sota condicions anaeròbies la lignina es mostra estable (Ronald L. Crawford 1981).

Taula i.5

TABLE 4.3 Representative Species of Brown Rot Fungi*

Species	Reference
<i>Botryotinia doeringii</i>	Kirk (1978)
<i>Botryotinia subramis</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Coniophora albipora</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Coniophora puteana</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Coniophora sulphurea</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Leucoglyphium ananiasii</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Leucoglyphium mullanae</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Leucoglyphium nigriceps</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Leucoglyphium rubromerula</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Leucoglyphium vauveri</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Mecuria aurea</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Phallia nigromerula</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Phallia pustulata</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Phallia rotundata</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Phallia rotundata</i>	Nelson and Glenn (1979)
<i>Poria canaliculata</i>	Schubert and Nord (1982)
<i>Poria cephalota</i>	Schubert and Nord (1982)
<i>Poria micropora</i>	Kirk and Highley (1973)
<i>Poria olivacea</i>	Kirk and Highley (1973)
<i>Poria repens</i>	Kirk and Highley (1973)

* Not a *Coniophoraceae* genus

Taula i.5. Bacteris implicats en la degradació de la lignina (Crawford, 1981)b

Taula i.6

<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (=Sporotrichum pteruleatum)	Kirk et al. (1975); Lundquist et al. (1977)
<i>Phanerochaete velutina</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Polyporus abietinus</i> (=Hirschioporus abietinus)	Day et al. (1949)
<i>Polyporus versicolor</i> (=Coriolus versicolor)	Cowling (1961); Kawase (1962); Pelczar et al. (1959); Kirk and Highley (1973); Højstet and Trojanowski (1973)
<i>Polyporus dichrous</i> (=Cloeloporus dichrous)	Ander and Eriksson (1977); Selin et al. (1975)
<i>Polyporus adustus</i> (=Bjerkandera adusta)	Sundman and Näse (1971)
<i>Polyporus brumalis</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Polyporus pilipes</i> (=P. badius)	Sundman and Näse (1971)
<i>Polyporus resinosa</i> (=Hirschioporus resinosa and P. benzoniensis)	Kirk and Moore (1972); Ander and Eriksson (1977)
<i>Polyporus betulety</i>	Kirk and Moore (1971); Kawase (1962); Kirk and Moore (1972)
<i>Polyporus giganteus</i> (=Polypilus giganteus)	Kirk and Moore (1972)
<i>Polyporus frondosus</i>	Day et al. (1949)
<i>Poria subacida</i> (=Perenniporia subacida)	Ander and Eriksson (1977)
<i>Poria ambigua</i> (=P. latemarginata)	Himi and Eriksson (1976); Sundman and Näse (1971); Kirk and Moore (1972); Højstet and Trojanowski (1973)
<i>Pleurotus nitens</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Bjerkandera adusta</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Trametes zonata</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Trametes hirsuta</i> (=Coriolus hirsutus)	Ander and Eriksson (1977)
<i>Trametes versicolor</i> (=Coriolus versicolor)	Ander and Eriksson (1977); Sundman and Näse (1971); Selin et al. (1975)
<i>Trametes pini</i> (=Phellinus pini)	Sundman and Näse (1971)
<i>Pholiotia muscibilis</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Pholiotia spectabilis</i> (=Cymonophus spectabilis)	Ander and Eriksson (1977)
<i>Pholiotia squarrosa</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Cerrena unicolor</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Phellinus isabellinus</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Phlebia gigantea</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Phlebia radiata</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Merulius tremellosus</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	Ander and Eriksson (1977)
<i>Fomes applanatum</i> (=Canoderma applanatum)	Kawase (1962)
<i>Fomes ulmarius</i> (=Rigidoporus ulmarius)	Ander and Eriksson (1977); Kirk and Moore (1972)
<i>Fomes annosus</i> (=Heterobasidion annosum or Fomitopsis annosa)	Sundman and Näse (1971); Shikawa et al. (1963)
<i>Fomes fomentarius</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Fomes ignarius</i> (=Phellinus ignarius)	Sundman and Näse (1971)
<i>Fomes pini</i> (=Phellinus pini)	Shikawa et al. (1963)
<i>Marasmius androsaceus</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Marasmius scrodonius</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Armillaria mellea</i> (=Armillariella mellea)	Sundman and Näse (1971)
<i>Hypholoma capnoides</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Polystictus abietinus</i> (=Hirschioporus abietinus)	Sundman and Näse (1971)
<i>Lenzites betulina</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Panus cuneatus</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Stecium purpureum</i> (=Chondrostereum purpureum)	Sundman and Näse (1971)
<i>Xanthochorus obliquus</i>	Sundman and Näse (1971)
<i>Canoderma applanatum</i> (=Elliptigia applanatum)	Kirk and Highley (1973); Kirk and Moore (1972)
<i>Peniophora sp.</i>	Kirk and Highley (1973)
<i>Cryptoderma yamanii</i>	Kirk and Moore (1972)
<i>Radulum casearium</i>	Thiévet and Letwren (1969)

Taula i.6. Fongs del podrint blanc que degraden la lignina

Ens centrarem en els fongs que són els microorganismes amb els que hem dut a terme el nostre treball. Així, els fongs amb capacitat de degradar la lignina, segons les característiques de la seva acció (textura i color) sobre els materials lignocel·lulòsics poden classificar-se en tres grans grups: els fongs de podrint blanc, podriments vermell o fosc, i podrint tou.

– Els fongs de podrint blanc (White-rot) són capaços de degradar tots els components de la fusta. Són principalment Basidiomicets, entre els quals es troben algunes famílies d'Himenomicets com l'Agaricaceae, la Hydimeaceae,... També n'hi ha que són Ascomicets de l'ordre Sphaeriales, com la Ustilina vulgari,... Els més estudiats de tots han estat el *Phanerochaete chrysosporium* i el *Trametes versicolor*. En la taula i.6 fem un resum dels principals fongs d'aquest grup. Ataquen als polímers de lignina inalterats, causant el trencament dels enllaços interlignol; també trenquen els anells aromàtics, i carbohidrats.

– Els fongs del podrint vermell o fosc (Brown-rot) pertanyen als Basidiomicets. En la taula i.7 presentem algunes de les espècies d'aquests fongs estudiades. Des del punt de vista taxonòmic són molt semblants als anteriors. Produeixen canvis limitats a la ligni-

na, com desmetilacions o hidroxilacions dels anells aromàtics. Descomposen principalment els polisacàrids de la fusta, ara bé, no poden trencar els anells aromàtics amb eficiència ni els enllaços alfa-beta de la lignina i si els obren no fan una descomposició significativa dels fragments resultants, deixant un residu modificat de color marró fosc.

Taula i.7

Species	Reference
↳ <i>Lenzites trabea</i> (= <i>Gloeophyllum trabeum</i>)	Kirk (1975)
<i>Coniophora fusispora</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Coniophora prasinoidea</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Coniophora suffocata</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Leucogyrophana arizonica</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Leucogyrophana olivascens</i>	Nilsson and Ginns (1979)
• <i>Leucogyrophana pulverulenta</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Leucogyrophana romellii</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Merulius aureus</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Paxillus atrotomentosus</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Paxillus involutus</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Serpula incrassata</i>	Nilsson and Ginns (1979)
• <i>Serpula lacrymans</i>	Nilsson and Ginns (1979)
<i>Poria vaillantii</i>	Schubert and Nord (1950)
<i>Lenzites sepiaria</i>	Schubert and Nord (1950)
• <i>Poria monticola</i> (= <i>Poria placenta</i>)	Kirk and Highley (1973)
<i>Lentinus lepideus</i>	Kirk and Highley (1973)

Taula i.7. Fongs del podriment fosc que degraden la lignina (Crawford, 1981b)

- Els fongs del podriment tou (Soft-rot) (coloració policroma de fusta) pertanyen als Ascomicets i deuteromicets. Degraden la lignina lentament i incompleta, i ataquen la fusta sota condicions humides.

Els fongs del podriment blanc, els «white rot», són els únics capaços de degradar tots els components de la fusta, i contitueixen el grup de fongs naturals amb major capacitat de degradar la lignina. La velocitat de produir aquesta degradació varia segons l'espècie i les condicions ambientals. En aquesta biodegradació de la lignina hi intervé un complex sistema enzimàtic que més endavant passarem a estudiar.

Phanerochaete chrysosporium

Dels fongs anteriorment citats el *Phanerochaete chrysosporium* ha estat el més estudiat, en les seves múltiples vessants: condicions ambientals, sistema enzimàtic, genètica, immobilització, aplicacions en la biodepuració,.... Aquest fong és capaç de degradar tant la lignina com d'altres substàncies aromàtiques recalctrants.

Produeix un sistema enzimàtic extracel·lular, consistent en diverses famílies d'hemo peroxidases, anomenades lignina peroxidasa, manganès peroxidasa i

altres peroxidases, que produeixen H_2O_2 extracel·lular. Aquest sistema enzimàtic ligninolític, les propietats del qual estan resumides en la taula i.8 (Fiechter, 1993), es produeix principalment durant el metabolisme secundari com a resposta a la limitació per nitrogen, carboni i/o sofre, però no per la limitació de fòsfor. Les condicions ambientals tals com la composició del medi, les condicions de creixement limitant, concentració d'oxigen dissolt en el medi, edat del cultiu, i agitació afecten també a aquest sistema ligninolític.

Taula i.8

Reactions catalyzed	Ring opening 1 electron transfer mechanism
Enzymes	H_2O_2 -dependent 21 isoenzymes are known, incl. 6 Mn(II)-peroxidases 5 isoenzymes investigated
Properties	43 kDa; pI 3.7-4.65
Post translational modification	Glycosilation (mannose-6-phosphate, asparagine linked)
References	Kirk and Farrell, 1987; Schmidt et al., 1990 Glumoff et al., 1990; Kuan and Tien, 1989

Taula i.8. Lignines peroxidases procedents del *Phikry*

El *Phanerochaete chrysosporium* és un fong de ràpid creixement, a una temperatura òptima de 37 °C i un pH entre 4.5 i 5. Té a més la facilitat d'esporejar: Aquestes característiques el fan fàcil d'utilitzar i manipular a nivell de laboratori i posteriorment d'aplicar en possibles tractaments i processos industrials.

Les peroxidases

Les peroxidases juguen un paper important en les oxidacions biològiques. Es troben en totes les parts de la natura i han estat aïllades a partir d'animals, plantes i microorganismes. Les peroxidases catalitzen l'oxidació d'un gran nombre de components orgànics i inorgànics pel peròxid d'hidrogen i peròxids substituïts. Peroxidases animals s'utilitzen com agents bactericides; també en la biosíntesis de productes com la toxina. La peroxidasa més àmpliament estudiada és segurament la procedent de les plantes, HRP (horse ..peroxidasa). Les peroxidases produïdes per microbis, tals com el citocrom C i la clorperoxidasa estan també àmpliament caracteritzades (Cai, 1993).

Les peroxidases que degraden la lignina poden catalitzar l'oxidació de substrats amb alt potencial redox. Aquesta facilitat és deguda a tenir un centre actiu amb un grup hemo que té una baixa densitat electrònica el qual és indicat per a reaccionar amb substrats d'un alt potencial redox. En la taula i.9 presentem un resum dels enzims ligninolítics produïts pels fongs del podriment blanc, i les reaccions que catalitzen.

Taula i.9

Enzyme	EC-No.	Reactions catalyzed	Source	Reference
Lignin peroxidase	1.11.1.7	Oxidation of benzylic alcohols Cleavage of C-C bonds Cleavage of C-O bonds Aromatic ring opening Polymerization of phenols	<i>P. chrysosporium</i> all white-rot fungi (?) <i>Streptomyces</i> sp.	Kirk and Farrell, 1987 Tien, 1987 Schoemaker, 1990 Ramachandra et al., 1988
Mn(II)-dependent peroxidase	1.11.1.7	Oxidation of phenols Cleavage of C-C bonds Cleavage of C-O bonds	<i>P. chrysosporium</i> some white-rot fungi	Gold et al., 1989 Schoemaker, 1990
Laccase	1.10.3.2	Similar to Mn(II)-dep. peroxidase	<i>T. versicolor</i> some white-rot fungi plants	Reinhammer, 1984 Higuchi, 1989
Dioxygenase		Aromatic ring cleavage	<i>P. chrysosporium</i>	Buswell and Eriksson, 1979
Aryl-alcohol dehydrogenase	1.1.1.91	Reduction of C α -aldehydes in symphony with LIP (?)	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. radiata</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	Waldner, 1987 Muhem et al., 1991 Pelmont et al., 1989
NAD(P)H:quinone oxidoreductase	1.6.99.2	Reduction of quinones	<i>P. chrysosporium</i> all white-rot fungi (?) <i>P. chrysosporium</i>	Buswell and Eriksson, 1988a Constam et al., 1991 Westemark and Eriksson, 1974a,b
Cellobiose : quinone oxidoreductase		Reduction of quinones Cellobiose degradation	<i>P. chrysosporium</i>	
Aromatic acid reductase		Reduction of aromatic acids	<i>P. chrysosporium</i> <i>P. radiata</i> <i>P. chrysosporium</i>	Leisola and Fiechter, 1985 Lundell et al., 1990 Buswell and Eriksson, 1988b
Vanillate hydroxylase		Oxidative decarboxylation of vanillic acid	<i>P. chrysosporium</i>	
Aryl-alcohol oxidase	1.1.3.7	Oxidation of aromatic C α -alcohols	<i>P. sajor-caju</i> <i>B. adusta</i>	Bourbonnais and Paice, 1988 Muhem et al., 1990a
Glucose oxidase	1.1.3.4	Production of H $_2$ O $_2$	<i>P. chrysosporium</i>	Kelley and Reddy, 1988
Glyoxal oxidase		Production of H $_2$ O $_2$	<i>P. chrysosporium</i>	Kersten and Kirk, 1987
Methanol oxidase	1.1.3.13	Production of H $_2$ O $_2$	<i>P. chrysosporium</i>	Eriksson and Nishida, 1988

Taula i.9. Enzims ligninolítics produïts pels fongs del podriment blanc (Fiechter, 1993)

Lignina Peroxidasa i Manganès Peroxidasa

La lignina i manganès peroxidases (LiP i MnP, respectivament) són sintetitzades i secretades pel *Phanerochaete chrysosporium* durant el metabolisme secundari en resposta a la limitació d'un nutrient (nitrogen, carboni, o sulfur) (Gold, 1993).

La lignina peroxidasa va ser la primera descoberta el 1983 (Tien, 1983), i ha estat descrita com una oxigenasa dependent de H_2O_2 o com a una diarilpropà-oxigenasa. La MnP va ser identificada per Gold el 1984 (Kawahara, 1984).

Si tenim limitació pel nitrogen, tant la LiP com la MnP, són expressades en múltiples formes. Les hemoproteïnes del *Phanerochaete chrysosporium* aïllades per mitjà de tècniques de FPLC o HPLC a partir del líquid extracel·lular concentrat s'han denominat H1, H2, ..., H10 de forma arbitrària segons l'ordre de sortida en l'eluent. Com a mínim sis isoenzims diferents de LiP (H1, H2, H6, H7, H8 i H10), i quatre isoenzims diferents de MnP (H3, H4, H5, i H9) han estat detectats (Reddy, 1994). Les propietats físiques, (Ronald L Crawford 1981), punt isoelèctric i pes molecular, d'aquests isoenzims els trobarem resumits en la taula i.10. Són hemoproteïnes glicosilades i cada isoenzim conté 1 mol de ferro hemo per mol de proteïnes. Tots els isoenzims de la LiP, excepte el H1, són fosforilats (presenten una fosforilació en el nitrogen unit al carbohidrat) en el seu N lligat al carbohidrat en la forma de 6-fosfat manosa. Cap isoenzim del MnP és fosforilat.

La seqüència d'amino àcids per les LiP i MnP va ser determinada a través de la seqüència de nucleòtids de clons d'ADN complementari (Gasbell, 1993). Les dades de la seqüenciació indiquen que la seqüència dels amino àcids és en un 60 % (aprox.) homòloga en els isoenzims de LiP i MnP.

Taula i.10

Isozyme	Peroxidase type *	MW ^b	pI ^c	Phosphate content (mol) ^d
H1	LiP	38000	4.7	0
H2	LiP	38000	4.4	1
H3	MnP	45000	5.2	0
H4	MnP	45000	4.5	0
H5	MnP	45000	4.2	0
H6	LiP	43000	3.7	1
H7	LiP	42000	3.6	1
H8	LiP	42000	3.5	1
H9	MnP			0
H10	LiP	46000	3.3	1

* Lignin peroxidase is labeled as LiP and Mn peroxidase as MnP.

^b See Tien, 1987.

^c See Tien, 1987; Kuan and Tien, 1989.

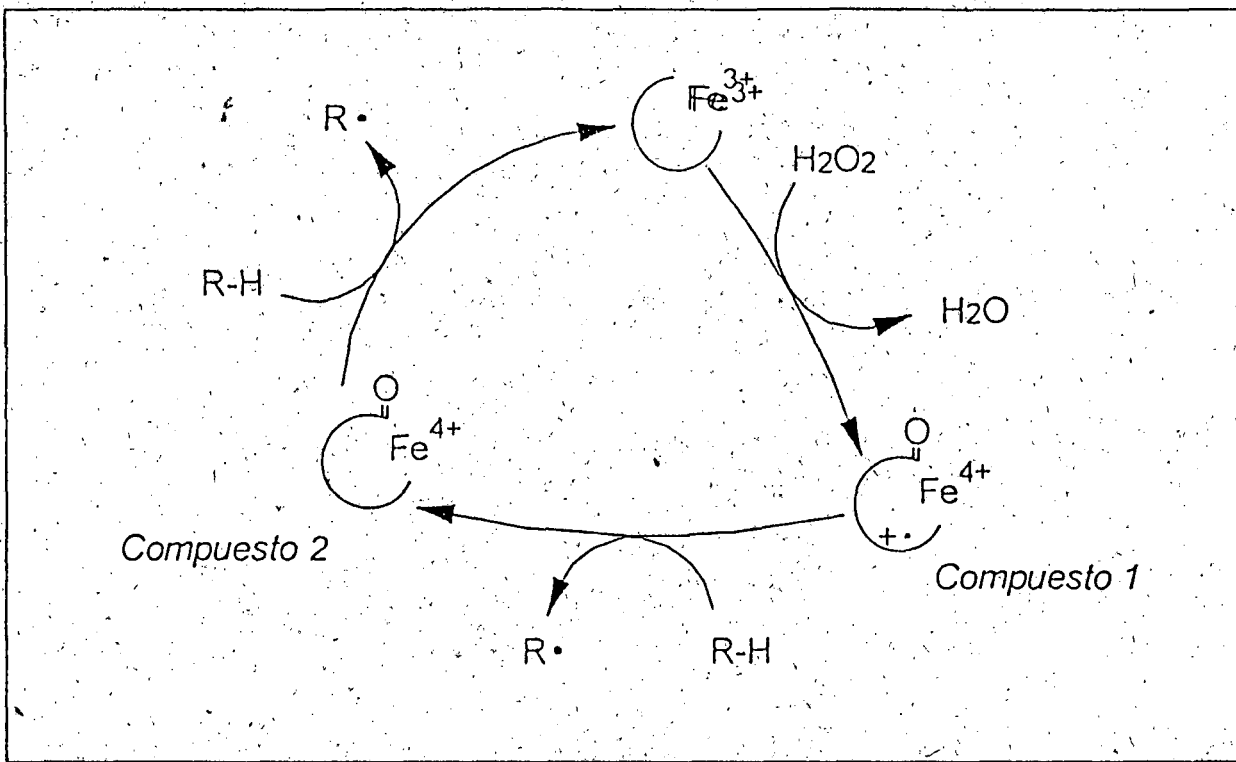
^d See Kuan and Tien, 1989.

* Not determined.

Taula i.10. Propietats físiques de les lignina peroxidases produïdes per *Phanerochaete chrysosporium* (Cai, 1993)

La LiP i MnP segueixen la mateixa ruta en catalitzar l'oxidació del substrat reduït per H_2O_2 i difereixen en la part final del cicle catalític (figures i.6 i i.7) (Meunier, 1994).

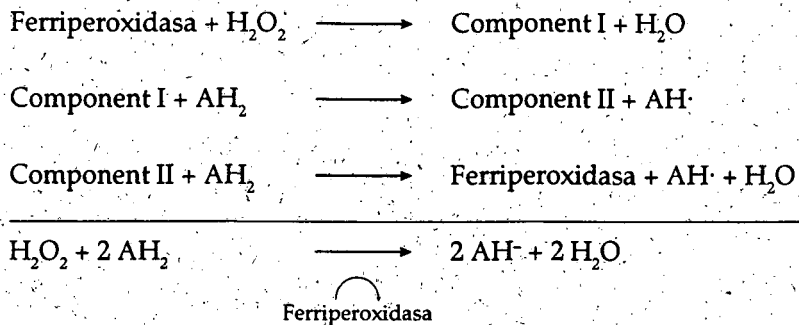
La LiP és primer oxidada pel H_2O_2 per formar



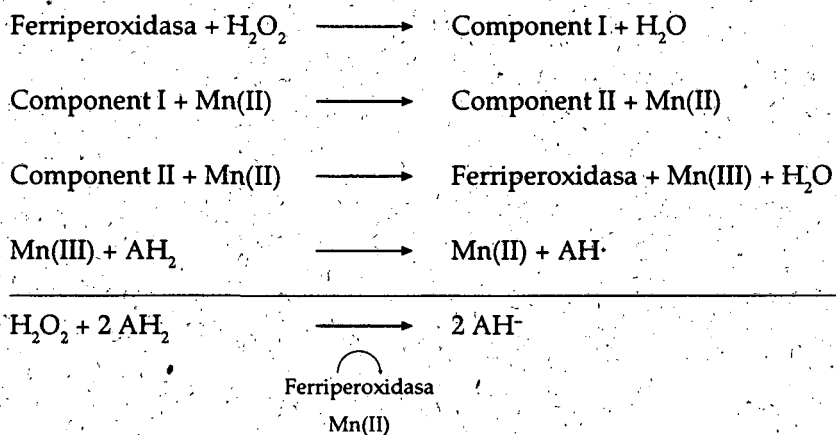
Ciclo catbólico de la LIP indicándose varios estados de reducción de su grupo hemo. La reacción de la enzima con H_2O_2 produce un compuesto intermedio, (compuesto I), que oxida el sustrato de carácter lignínico (RH) produciendo un compuesto oxidado, (compuesto II), y un sustrato radical. El compuesto II retorna a su forma original con segundo sustrato. Este radical R puede sufrir un variado grupo de reacciones (Tien M., 1987).

Figura i.7..cicle catalític de la MNP del *Phaneroclinete chrysosporium* (Boominathan, 1992)

un intermedi oxidat per dos electrons, anomenat component I. El component I és després reduït bescanviant un electró per formar el component II i un radical lliure. El component II, per tant, és un intermedi enzimàtic oxidat (per 1 electró). Aquest component II oxida una segona molècula de substrat per completar el cicle catalític. Així doncs, si observem la reacció total, l'aigua oxigenada oxida dos molècules de substrat per mitjà de la ferriperoxidasa -que és un isoenzim hemo dependent transportador d'electrons.



La MnP es comporta inicialment igual que la LiP, fins la formació del Component I. A partir de la segona reacció la MnP es comporta molt diferent ja que el seu component I no solament oxida els components fenòlics sinó que també el Mn_2^+ a Mn_3^+ , mentre que el seu component II predominantment oxida Mn (II). Aquest component en un excès d'aigua oxigenada pot originar un Compost 3 menys reactiu. (Ronald L Crawford 1981)



Els intermedis component I i II de LiP i MnP han estat detectats tant en la transició com en l'estat estacionari dels experiments realitzats per.....(Ronald L Crawford 1981). L'oxidació del substrat aromàtic per la LiP ha estat demostrada per Kersten i col. (1985) i Hammel i col. (1985).

Les propietats dels enzims de la LiP i els components I i II han estat estudiades per poder entendre i preveure l'estabilitat de l'enzim i la influència del pH. Les reaccions entre el component I i II amb substrats reduïts, com el ferrocianat i el

alcohol veratrílic, són catalitzades en medi àcid; la constant de velocitat a pH 3 és unes 1000 vegades superior que a pH 6.

Renganathan i col. (1987) havien explicat l'enllaç del clorur a la LiP. Tien trobà que el clorur enllaça en la forma protonada de la LiP i és un inhibidor competitiu de la LiP. Els resultats cinètics validen que en presència del Clorur la formació de component I de LiP és inhibida a pH baix mentre que en absència del Clorur, el pH no té efecte sobre el rang de pH estudiat.

La LiP és capaç de catalitzar l'oxidació de components aromàtics no fenòlics, mentre que la MnP catalitza l'oxidació de Mn^{2+} a Mn^{3+} i alhora l'oxidació de components fenòlics, el Mn^{3+} pot després oxidar altres components. (Ronald L Crawford 1981) En general, les peroxidases degradadores de lignina poden catalitzar l'oxidació d'altres substrats no propis de les peroxidases (tals com el p-cresol i el guaiacol). Aquests substrats específics per les peroxidases degradadores de lignina inclouen els components del model de la lignina i biopolímers de lignina. En les figures i.8 i i.9 hi ha representats els mecanismes de degradació proposats per

Figura i.8

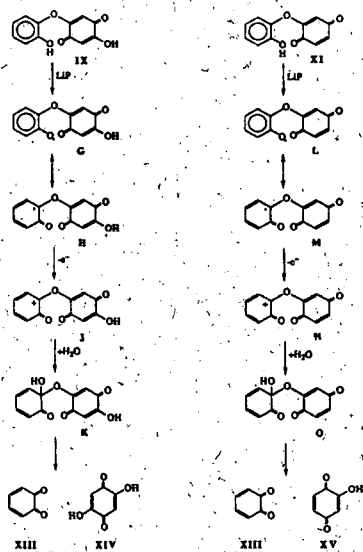


Figura i.8. Mecanisme proposat per la lignina peroxidasa en trencar l'enllaç C-O-C en les quinones IX i XI (Joshi, 1994)

Figura i.9

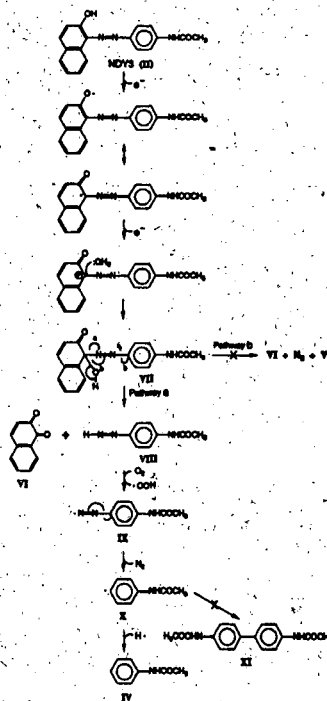


Figura i.9. Mecanisme proposat per la degradació del colorant NDY3

varis compostos Una de les seves propietats és que tenen un alt potencial redox (recordar que el potencial reductor del Mn³⁺ és de 1.5 V). (Ronald L Crawford 1981).

Durant algun temps les lignines peroxidases havien estat considerades com la clau per l'atac inicial a la lignina. Ara bé, el problema de com i qui produeix aquest atac inicial encara no està resolt del tot (Ronald L Crawford 1981).

Ha estat també descrit que alguns fongs degradadors de la lignina no sintetitzen LiP ni MnP (Ronald L Crawford 1981). Malgrat això, aquests estudis no contindrien evidències clares de la presència d'altres enzims degradadors de la lignina. Tampoc, la manca en la seva troballa es pot interpretar com l'existència d'altres mecanismes. En l'absència d'un control positiu, diversos factors podrien contribuir a obtenir uns resultats negatius. Després de tot, abans del seu descobriment, els investigadors havien buscat durant més de deu anys els enzims degradadors de la lignina amb poca sort. Per tant, no ens ha de sorprendre que ocasionalment troballes amb testos negatius siguin explicades en la bibliografia (Ronald L Crawford 1981).

Altres peroxidases

S'han trobat nous enzims, especialment produïts per *Phanerochaete chrysosporium*, altres fongs com la *Bjerkandena adusta*, i que caldrà determinar quin paper juguen en l'atac a la lignina. La taula de la taula i.10 resumeix els principals enzims

Taula i.10.

Enzyme	Localisation	Remarks	Organism	Reference
LiP	extracellular	15 isoenzymes known	<i>P. chrysosporium</i>	Tien and Kirk, 1983 Glenn et al., 1983
LiP	extracellular	cross-reaction with anti-bodies to <i>P. chrysosporium</i>	<i>B. adusta</i>	Muheim et al., 1990a Waldner et al., 1988
MnP		Mn(II)-dep. peroxidases 6 isoenzymes known	<i>P. chrysosporium</i>	Kuwahara et al., 1984
AAO	extracellular	H ₂ O ₂ -formation	<i>B. adusta</i>	Muheim et al., 1990a Muheim et al., 1990b
AAD (former AA-reductase)	intracellular		<i>P. chrysosporium</i>	Muheim et al., 1991 Muheim et al., 1990c
NADH : quinone Oxidoreductase	intracellular	different enzyme forms	<i>P. chrysosporium</i>	Constam et al., 1991

LiP, lignin-peroxidase; AAO, aryl alcohol oxidase; AAD, aryl-alcohol dehydrogenase.

Taula i.10. Enzims que podrien intervenir en la degradació de la lignina (Fiechter, 1993)

involucrats en la degradació de la lignina (Fiechter, 1993); i en especial ressaltem: l'aril alcohol oxidasa (AAO), l'aril alcohol deshidrogenasa (AAD) la quinona oxidoreductasa (NADH) i la glioxal oxidasa (Kirk, 1987).

Una possibilitat tinguda en compte és la capacitat que tindria la AAD de ser utilitzada com a font de H_2O_2 per les peroxidases. D'altra banda la AAD ha estat proposada per atacar sinèrgicament amb la LiP en la degradació de l'enllaç no fenòlic B-O-4 (Muheim i col., 1990 c). Però al mateix temps, la AAD es veu implicada en la darrera etapa de la síntesi del alcohol veratrílic. La taula i.11 resumeix algunes de les principals característiques de l'AAO.

Taula i.11

Reactions catalyzed	Aryl-alcohol + $O_2 \rightarrow$ Aryl-aldehyde + H_2O_2 No ring opening (mechanism different from LiP) FAD as prostetic group
Enzymes	2 enzymic forms
Properties	78 kDa; pI 4.25 and 4.35; pH_{opt} 5.7
Referencés	Muheim, Waldner, Leisola and Fiechter, 1990b

Taula i.11. Propietats de l'Aril alcohol oxidasa obtinguda a partir de *Bjerkandesa* (Fiechter, 1993)

Regulació pel carboni i el nitrogen

L'activitat ligninolítica en *Phanerochaete chrysosporium* és funció d'un metabolit secundari induït per la limitació d'un nutrient. Hi ha evidències que els isoenzims de LiP i MnP poden ser regulats de forma diferent pel nitrogen i el carboni. Així, per exemple els isoenzims H2 i H8 de LiP procedents de l'espècie BKM-F-1767 són induïts per la limitació del nitrogen, mentre que l'isoenzim H2 ho seria per la limitació del carboni (Reddy, 1994).

Alhora, Pease and Tien (142) han demostrat que en cultius de *Phanerochaete chrysosporium* limitats pel carboni l'isoenzim H4 de MnP apareix primer, amb posterior predomini del H3 després. I a més, en aquestes condicions no es produiria l'isoenzim H5; mentre que en condicions de limitació del nitrogen els tres isoenzims apareixerien ben aviat.

Els isoenzims estarien afectats no solament per les condicions nutricionals sinó també per l'agitació-no agitació, la composició del tampó, les concentracions de les traces de diversos metalls, com el ferro (Johnston, 1994),...

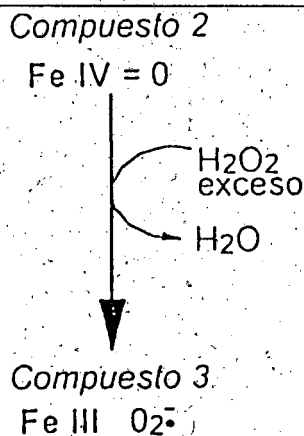
Les proteïnes de MnP són més estables quan limitem el cultiu amb carboni que quan el limitem amb el nitrogen, probablement perquè les proteases extracel·lulars serien sintetitzades de forma diferent (Reddy, 1994). També s'ha mesurat que la LiP podria ser menys estable que la MnP independentment de la limitació per carboni o nitrogen, i que la disminució més ràpida de LiP estaria altra vegada relacionada amb l'activitat de la proteasa extracel·lular.

Efecte de l'alcohol veratrílic

Els mecanismes pels quals la lignina és despolimeritzada per la LiP han estat molt estudiats i segueixen generant molta contravèrsia. Una part d'aquests estudis s'han centrat en determinar el mecanisme pel qual la LiP oxida l'alcohol veratrílic, per tal d'establir el paper de l'alcohol veratrílic en aquesta despolimerització. en general addicionar l'alcohol veratrílic en els cultius lignolítics augmenta l'activitat de LiP (Gold, 1993). L'alcohol veratrílic (3, 4-dimetoxibenzol) és un metabolit secundari també produït pels cultius ligninolítics de *Phanerochaete chrysosporium* (Jensen, 1994). Existirien bàsicament dues teories per explicar l'efecte de l'alcohol veratrílic en l'activitat lignolítica. D'una banda l'alcohol veratrílic havia estat proposat per activar l'intermedi redox per substrats que no podien ser oxidats directament per l'enzim (Ronald L Crawford 1981); alternativament, la seva activitat també ha estat atribuïda a la seva habilitat per protegir l'enzim enfront la desactivació pel H_2O_2 (Gold, 1993; Cancel, 1993).

Harvey i col. (1986) van ser els primers en proposar que l'alcohol veratrílic actuava com un mediador redox entre la LiP i la lignina. L'alcohol veratrílic seria oxidat per un sol electró per formar un radical catiònic. Aquest radical després es difondria, fins una distància desconeguda, i oxidaria un altre substrat com podria ser l'alcohol anisílic. (Figura i.10).

Figura i.10.



Rao S Koduri i Ming Tien van investigar el paper que jugava l'alcohol veratrílic en l'oxidació de l'alcohol anisílic per la LiP. Segons ells, la capacitat de l'alcohol veratrílic per estimular l'oxidació de l'alcohol anisil no seria degut a que protegeixi l'enzim sinó que l'estimulació cal atri-

buir-la a que l'alcohol anisil reacciona amb el component I, però no amb el component II. Per tant, la inclusió del alcohol veratrílic o un altre substrat, el qual reaccioni amb el component II, és essencial per completar el cicle catalític (Konduri, 1994).

Valli i col. (1990) van proposar un altre mecanisme pel qual l'alcohol veratrílic previndria la inactivitat de l'enzim. Però els estudis de Rao S Kodura i col. demostren que la protecció de l'enzim pel veratrol per no ser inactivat és solament una conseqüència secundària. Aquests autors explicaven que l'alcohol anisílic no pot reaccionar amb el component II, i solament ho faria amb el component I, ja que l'alcohol anisílic és un substrat molt pobre. La inclusió de l'alcohol veratrílic permetria l'enzim retornar a l'estat fèrric (ferriperoxidasa) i completar el cicle catalític (Valli, 1990).

Konduri i col. (1994) conclouen que és difícil generalitzar els resultats per ells obtinguts en els estudis amb l'alcohol anisílic in vitro, i extrapolar el paper del alcohol veratrílic in vivo en la despolimerització de la lignina pel fong. Amb substrats com l'alcohol anisílic, no van trobar que el alcohol veratrílic actués com un mediador. Ara bé, amb substrats fenòlics, tals com el guaiacol, van observar que el alcohol veratrílic pot actuar com a mediador. Conclouen que, subunitats fenòliques, però no subunitats més recalcitrants, de la lignina podrien ser oxidades pels radicals lliures de alcohol veratrílic. Es fa difícil generalitzar, sobretot en un medi no sintètic; hi ha més d'una via per arribar a un mateix efecte i moltes variables que influeixen en els resultats.

Regulació de la Manganès Peroxidasa pel Manganès

L'acumulació d'activitat de MnP en el medi extracel·lular en cultius limitats pel nitrogen depèn de la presència de Mn (II), el substrat de l'enzim. Alguns estudis demostren que la MnP està present en el medi solament sota condicions de limitació de nitrogen i en presència de Mn. S'ha provat altres metalls per substituir el manganès però aquests no induïen l'activitat de la MnP.

Altes concentracions de Mn induïen l'activitat de la MnP no solament en el *Phanerochaete chrysosporium* sinó també en altres fongs «white rot».

Producció de LiP i MnP

Alguns dels factors que intervenen en la producció i activitat dels enzims ligninolítics ja s'han citat anteriorment. La producció de lignina peroxidasa es dona

sota unes condicions ben específiques: limitació d'un nutrient en el medi, bona concentració d'oxigen en el medi i poca agitació. La lignina peroxidasa és induïda per l'alcohol veratrílic, que és un intermedi del metabolisme de la lignina (Haemerli, 1987).

Una agitació forta provoca la desaparició de l'activitat de la lignina peroxidasa, però el procés és reversible ja que l'agitació sembla no alterar la fisiologia del fong. Alguns autors proposen que la pèrdua d'activitat de la lignina peroxidasa es deu a la presència d'enzims proteolítics. Alguns detergents podrien protegir l'enzim perquè no fos destruït; aquest efecte s'explicaria per la modificació de la membrana cel·lular, o bé per la formació d'un complex enzim-detergent. Però a més a més, l'activitat enzimàtica també es perdria per la freqüent resembra del fong (figura i.11), i el medi utilitzat per la producció de les espores també afectaria (Fiechter, 1993; Moyson, 1993).

Jager i col (1985) van treballar en la producció de LiPs en fermentadors de tanc agitad utilitzant tensoactius no iònics com el Tween 80 o el Tween 20 obtenint altes produccions enzimàtiques.

Aster i col. van demostrar que treballar amb cultius estàtics augmenta la producció de LiP i el termini per assolir la màxima activitat es redueix quan

Figura i.11

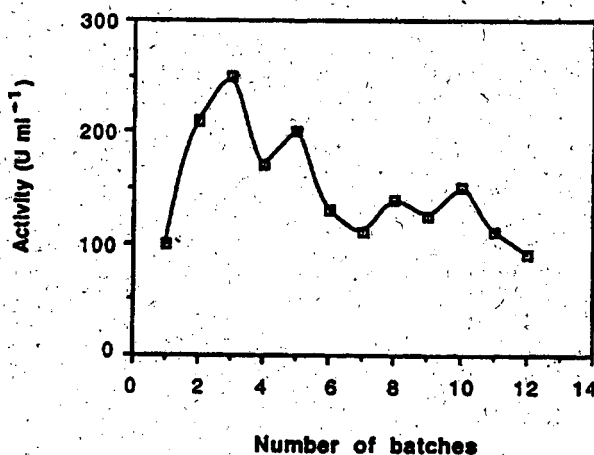


Fig. 1. Sequential batch cultivations of *P. chrysosporium* in 1-l shake flasks (80 ml medium C1, containing 0.5 g l⁻¹ glucose). Decreasing activity of LiP with increasing number of cultivations (Troller, 1990).

Figura i.11. Fiechter, 1993

s'utilitza tensioactius com l'àcid oleic, el Tween 80,... Al mateix temps van demostrar que s'assolia el mateix efecte afegint al medi diverses fonts de fosfolípids. També es coneix que per obtenir una bona síntesi de LiP és necessària una alta pressió parcial d'oxigen. Per tant, sembla obvi, que un bon tipus de reactor per produir LiP ha de ser capaç de donar una bona transferència d'oxigen en un medi amb una agitació suau, i poc trencant.

La immobilització del fong en diversos suports pot permetre unes altes produccions en cultius submergits. En la següent taula i.12 (Bonarme, Feijoo, 1993) de la figura i.24 es pot comparar les produccions de LiP o MnP descrites per diferents autors amb varis tipus de bioreactors. S'han utilitzat des de reactors de tanc agitad de 42 L (Janshenkar and Fiechter), reactor de 10 L amb el fong immobilitzat en niló, air lift de 5 l, diferents reactors amb agitació neumàtica (Bonarme, 1993), bioreactor de llit expandit amb «pellets» (Moreira, 1995), i diferents estratègies de procés, en discontinu, semi-continu i continu (Feijoo, 1994). Totes elles encaminades a trobar una bona seqüència que permetés passar a escala industrial la producció d'aquests enzims.

Figura i.12

Referencias	Bioreactor	Volumen Reactor (L)	Actividad global (U)	Eficiencia ^a
Leisola <i>et al.</i> (1986)	Discontinuo, AL ^b	1.5	25.5	2.83
Kirkpatrick and Palmer, (1987)	Semi-continuo.	0.4	38	17.3
Janshenkar and Fiechter (1988)	Discontinuo, TA	42	4284	20.4
Linko, S. (1988b)	Discontinuo o continuo, CB	7.6	5548	140
Michel <i>et al.</i> (1990)	Discontinuo, TA	0.5	87.5	29.2
Rogalski, <i>et al.</i> (1992)	Continuo, RLF	0.4	2004	83.5
Venkatadri and Irvine (1993)	Continuo, TA	2.5	185	14.8
	RMF	1.5	285	23.8
	RMS	1.5	345	28.2
Bonarme <i>et al.</i> (1993b)	Batch, TA	1.7	1135	103.2
	CB	2.2	6904	627.6
	AL	2.2	9900	900
Feijoo, G. (1994)	Continuo, RLF			
	A1 ^c	0.17	769	145
	A2	0.17	2362	446
	A3	0.17	484	92
	C1	0.17	3563	899
	C2	0.17	6163	1492

Importància dels fongs «white rot» en la degradació

En els darrers anys la possibilitat d'utilitzar els fongs «white rot» per les estratègies de biodepuració han centrat molts esforços en el camp acadèmic i industrial dels principals països del món. Aquest interès s'inicia a partir de l'habilitat d'aquests fongs de degradar un amplíssim rang de components tòxics i recalcitants (taula i.13) (Feijoo, 1994). Si pensem que són capaços de degradar la lignina, i recordem la complexitat, varietat i heterogeneïtat d'aquest polímer, només llavors podrem fer-nos una idea de les seves possibilitats per degradar altres compostos.

L'arma d'aquests microorganismes és la seva capacitat de produir enzims en resposta a un baix nivell dels nutrients de carboni, nitrogen o sulfur. En els apartats anteriors ja hem vist en quines condicions es poden produir aquests enzims. Aquestes condicions es coneixen com condicions ligninolítiques. Com hem explicat, aquests enzims coneguts com lignina peroxidases es produeixen en condicions no específiques de substrat i a més a més són extracel·lulars. D'aquesta forma el fong també pot degradar substrats insolubles o poc solubles.

Alguns contaminants en els residus són tòxics pels microorganismes utilitzats en els processos clàssics de depuració biològica com els bacteris que podrien ser utilitzats per la seva degradació. Per exemple, el cianur és conegut per ser un potent inhibidor dels enzims de la respiració; per tant, en arribar el cianur als bacteris inhibeix el seu creixement. És per això, que residus amb concentracions superiors a 4 ppm de cianurs difícilment podran ser tractats amb bacteris.

Ara bé, el sistema extracel·lular dels fongs «white rot» pot tolerar concentracions més altes de contaminants tòxics. Així, en el cas del cianur es va trobar que per les espores de *Phanerochaete chrysosporium* concentracions de 2.6 ppm inhibien el 50 % del metabolisme de la glucosa, en absència de LIP. Però al mateix temps, cultius ligninolítics de 6 dies podien tolerar concentracions molt més altes, i el 50 % de la inhibició del metabolisme de la glucosa es donava a 182 ppm, i la inhibició de la mineralització del cianur per acció del *Phanerochaete chrysosporium* no es faria evident fins concentracions de 260 ppm de cianur (Barr, 1994).

Aquests mecanismes de degradació no específic permeten al fong degradar barreges de contaminants, tals com la creosota i l'Aroclor fins a CO₂ que per fer-ho

Taula i.13

Compuesto recalcitrante	Especies ^a	Referencias
Organofenólicos		
Pentaclorofenol	Pc, Ps, Po, Th, Cs	127,128,129,130,144,145,162
Triclorofenol	Pc	77, 98
Diclorofenol	Pc	25,206,220
Cloroguaiacoles	Pc	77
PCB^b		
Aroclor	Pc, Tv, Pb, Fg	49
Tetraclorobifenil	Pc	26
DDT^b	Pc	26,64,119
Dioxinas		
Diclorodibenzo-p-dioxin	Pc	207
Tetraclorodibenzo-p-dioxin	Pc	26
HPAb		
Tolueno, Benzeno	Pc	219
Fluoreno	Pc	73
Antraceno	Pc, Tv, Ba, Nc	59,67,79,84
Fenantreno	Pc, Tv, Cl	21,22,42,81,166,196
Pirreno	Pc	79,83
Benzo(a)pirreno	Pc, Tv, Ba, Nc	26,59,67,79,188
Criseno	Nc	59
HPA quinonas		
Antraquinona	Pc, Tv, Ba, Nc	59,67,79
Fenantrenoquinona	Pc, Tv, Ba, Nc	59,67,79
Fluorenona	Pc, Tv, Ba, Nc	59
Pirrenodioneas	Pc, Tv, Ba, Nc	59
Nitrotoluenos		
Trinitrotolueno	Pc	8,65,194,195
Dinitrotolueno	Pc	160,205
Cloroanilinas		
Dicloroanilina	Pc, Tv, Cl	5,34,166
Tintes		
Colorantes	Pc	38,177,193,218
Tintes poliméricos	Pc	74
Violeta cristal	Pc	24
Clorolignina	Pc	126

Taula i.13. Feijoo, 1994

amb bacteris seria necessari d'un conjunt de bacteris diferents que actuessin coordinadament. Per exemple, Abramowicz i col. (...) van trobar uns bacteris anaerobis que podrien deshalogenar els polibifenils clorats (PCBs) a les seves formes monoclorades. Després es necessitaria uns bacteris aerobis per degradar els monoclorats bifenils fins a CO₂.

Un altre avantatge d'aquests fongs és que no necessiten un preconditionament per un determinat contaminant. Perquè el sistema de degradació és induït per la limitació de la font de nutrients, i no per la presència del contaminant. És a dir, no depèn de la concentració dels contaminants, i d'aquesta forma pot degradar concentracions de contaminants molt baixes, fins i tot, de nivell quasibé indetectables. Si bé, en la realitat, la velocitat de degradació sí que depèn de la concentració del contaminant.

La capacitat per degradar contaminants d'aquests microorganismes no es limita a la presència de LiP i MnP. Els mecanismes utilitzats per la degradació d'alguns components, que ja es comencen a conèixer una mica, moltes vegades el seu primer pas s'inicia amb la formació d'intermedis de radicals lliures de molt alta reactivitat. Aquests radicals lliures serien molt reactius i desencadenarien una sèrie de reaccions en cadena, que a la vegada originarien nous radicals lliures. Aquest procés d'utilització de radicals lliures per atacar la lignina és molt lògic, ja que el polímer de lignina és sintetitzat també per un mecanisme de radicals lliures. Així, per exemple, la reducció del 2, 4, 6 -trinitrotoluen (TNT) no requereix dels enzims, sinó que la seva velocitat de degradació depèn del pH i de la biomassa del fong. Una vegada el TNT ha estat convertit a la seva forma amino el fong necessitaria les condicions de limitació d'alguns dels nutrients per induir la MnP i la LiP i continuar la degradació del TNT fins a CO₂. Un altre exemple semblant el tenim amb el 1, 1 -bis (4 -clorofenil)-2, 2, 2 -tricloretà (DDT) que podria ser degradat pel fong sota condicions no ligninolítiques, però amb les quals no s'arribaria a la mineralització del DDT (Barr, 1994). També l'alt potencial redox de les espècies formades pot originar reaccions de reducció-oxidació.

Finalment caldria assenyalar que malgrat els avantatges que representen els fongs «white rot» sobre els bacteris, una actuació combinada de fongs i bacteris pots ser moltes vegades la millor estratègia per poder degradar el creixent nombre de contaminants creats per l'home.

El paper

La contaminació causada per la indústria paperera a l'Estat espanyol correspondria a la d'una població equivalent d'uns deu milions d'habitants, superior de la causada per la indústria química. En els darrers anys aquest sector arreu d'Europa ha fet esforços per reduir els seus impactes ambientals.

Abans d'analitzar els punts de contaminació d'aquesta indústria farem una anàlisi dels diferents processos de fabricació en la indústria paperera:

- fàbriques de pasta o cel·lulosa (la matèria primera és el vegetal i el producte acabat la pasta seca)
- fàbriques de paper (la matèria primera la constitueixen les pastes i el producte final és el paper)
- fàbriques integrades de pasta i paper (la matèria primera és el vegetal i altres pastes, i el producte final és el paper). La figura i.12 mostra un procés típic de fabricació de paper, en el qual queden reflectides les diferents etapes del procés.

Figura i.12

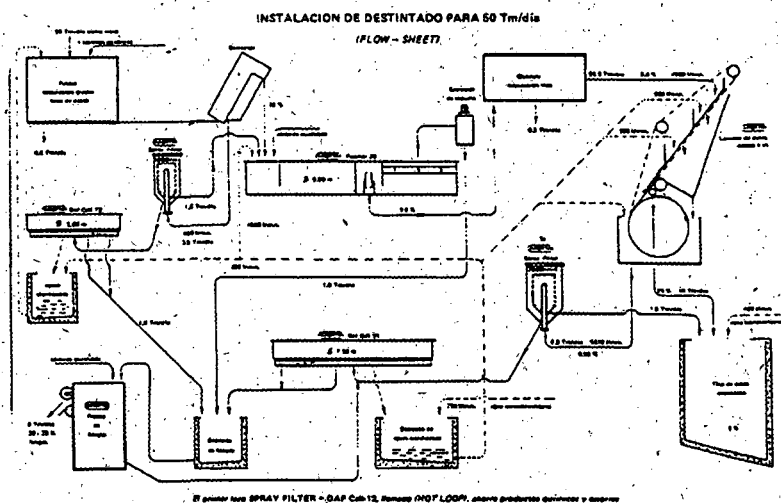


Figura i.12. Procés de fabricació de la pasta i el paper

La principal matèria primera utilitzada per la producció de pasta de paper és la fusta, si bé també s'utilitzen altres fonts, com la palla, el cànem, el sisal, deixalles de l'agricultura i vegetals tropicals. Les espècies de fusta més utilitzades són les coníferes (pins, avets) i altres com els faigs i els eucaliptus.

La principal característica d'aquesta fibra vegetal és que posseeix cel·lulosa. El teixit de la fibra vegetal està constituït per una paret amb varies subcapes de distinta estructura i composició. En la seva part externa posseeix un ciment que uneix les fibres entre elles, anomenada lignina, de la qual ja n'hem parlat. Contràriament a la cel·lulosa, la lignina és difícilment biodegradable.

Així, els components de la fibra, des del exterior cap el centre són: la lignina (20-30%), espesa, de color marró fosc (cafè) no filamentosa i resistent; l'hemicel·lulosa, no fibrosa i soluble en sosa; la cel·lulosa (60-70%), fibrosa, blanca, insoluble en aigua i solvents orgànics; i component d'infiltració com els tanins, les reïnes, gomes i colorants.

En la indústria paperera l'aigua té una importància cabdal, tanta com la pròpia fusta o el vegetal. Així, una fàbrica de pasta podia arribar a utilitzar uns anys endarrera -o en aquells casos que no s'ha produït la reconversió tecnològica adient-

entre 100 i 200 m³ d'aigua per tona de pasta fabricada, i una de paper entre 300 i 400 m³ d'aigua per tona, si bé en aquest darrer cas els residus són més tractables. Actualment aquestes xifres s'han reduït a la meitat tal com queda reflectit en la taula i.14. En la taula i.15 hem resumit les principals característiques de les aigües procedents de la fabricació del cartó a partir de palla o papers utilitzats, ja que la nostra aigua procedia d'un procés realitzat amb fibres de cànem i, per tant, és la més similar.

Taula i.14

Tipo de fábrica	Consumo actual	Consumo mínimo alcanzable	Consumo estimado para fábricas de nueva construcción	Reducción de consumo efectuado %
Fábrica pasta al sulfato, blanqueada no integrada	150-350	130-250	110-150	20-40
Fábrica pasta al sulfato cruda integrada	80-150	70-110	70-110	10-33
Fábrica pasta al sulfato blanqueada integrada	165-330	150-250	125-195	10-30
Fábrica no integrada de papales cruda	30-55			
Fábrica no integrada de papales blancas	32-210	18-60	18-60	20-80
Fábrica al bisulfito cruda	300-700			
Fábrica al bisulfito blanqueada	400-850			
Fábrica papel prensa	20-100		20-40	
Fábrica de cartón	30-250			
Fábrica de secos	25-35			
Fábrica de cartón				

Taula i.14. Consums específics d'aigua en les fàbriques de paper en metre cúbic d'aigua per tona de paper fabricat

Figura i.15

Proceso	Caudal m ³ /tm	DBO ₅		Sólidos en suspen.		pH	Color KgPt/tm
		Kg/tm	mg/l	Kg/tm	mg/l		
Fabricación de cartón	30-70	6-20	200-600	10-80	300-2500	6-8	< 40

Figura i.15. Característiques de les aigües residuals produïdes en la fabricació de cartó a partir de pasta de palla o de papers utilitzats

L'aigua en el procés de fabricació s'aplica amb diferents finalitats:

- com a vehicle de transport: substàncies sòlides flotants (estelles, fibres, etc.); substàncies en suspensió coloidal (colorants, midons,...); substàncies en suspensió disoltes (sals alcalines, sulfats,...)
- com a matèria primera del procés: extracció sòlid-líquid; rentat; reaccions d'hidròlisi, blanqueig.
- com agent de refrigeració i altres serveis auxiliars.

Tota l'aigua que intervé en el procés, excepte una petita part utilitzada en forma de vapor, acaba com a abocament a la claveguera, o es recircula.

El grau de reutilització de l'aigua dins d'una fàbrica ens indicarà el percentatge d'eliminació de la contaminació existent en les diferents unitats del procés: En els processos normals, es considera un bon rendiment en els llexius quan està al voltant del 85 %. En la fabricació del paper, pèrdues de fibra del 2% també estan considerades com a bones. Ara bé, aquest 15 % de llexius pendent de recuperar i el 2% de pèrdues en les fibres originen greus problemes de contaminació.

La transformació de la matèria primera en pasta pot realitzar-se de diverses maneres:

- procés mecànic: mitjançant d'energia mecànica. La pasta s'obté aportant energia mecànica i no utilitza reactius químics.
- procés químic: afegint reactius químics per dissoldre la lignina.
- procés semiquímic: combinació dels dos anteriors. Combinen un tractament químic suau amb un desfibrat mecànic.

D'aquests tres tipus de transformació de la matèria primera els més utilitzats són els tractaments químics. Els principals processos químics que s'utilitzen són els següents:

- processos àcids: amb bisulfit (ja sigui càlcic, de magnesi o amònic) i amb àcid nítric.
- processos neutres: amb sulfit sòdic neutre i una barreja de carbonat i bicarbonat sòdic.
- processos alcalins: amb sosa en (fred o calent); amb calç i al sulfat (amb sosa i sulfur sòdic), anomenat procés KRAFT. Aquests darrers són els majoritaris.

Figura 1.14. Procés a la sosa per a la fabricació de pasta de palla

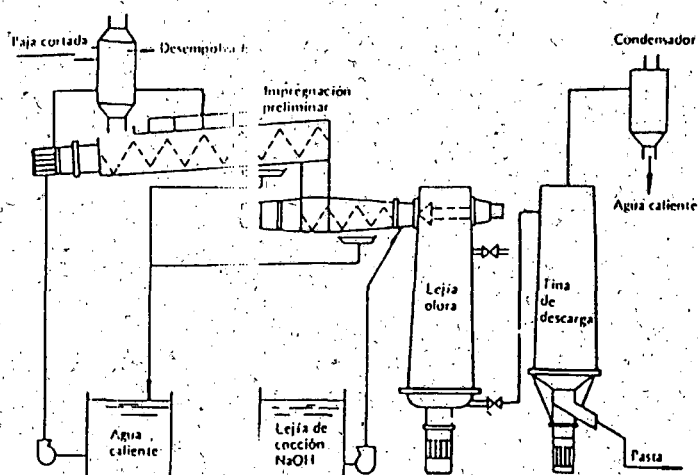


Figura 1.14. Diagrama del procés a la sosa per a la fabricació de pasta a partir de la palla

Fabricació de pasta i paper

En els processos de fabricació de la polpa es pretén separar les fibres de la cel·lulosa de la fusta o altres vegetals. S'assoleix per mitjà de processos mecànics i sobretot químics: es solubilitza la capa de lignina amb determinats reactius. Les fibres de cel·lulosa apareixen en suspensió (polpa) sobre els licors utilitzats (reactius exhaurits) que contenen en forma soluble els derivats de lignina, hemicel·lulosa i altres. Per separar aquests licors de la polpa cal efectuar uns rentats, les restes dels quals formaran l'efluent a recircular o a tractar.

La fabricació de la pasta pot resumir-se en les següents fases:

- preparació de la matèria primera: rentat dels troncs; tallat, i trituració
- transformació en pasta: desfibrat, (cocció amb incorporació de reactius); desfibrat posterior.
- rentat de les pastes: dilució i eliminació de substàncies dissoltes
- classificació i depuració: eliminació d'elements no cuïts i espesseïment de la suspensió de polpa.
- blanqueig (opcional): eliminació d'elements colorejats i lignina.

Figura i.13. Diagrama de blocs del procés de fabricació de pasta i paper

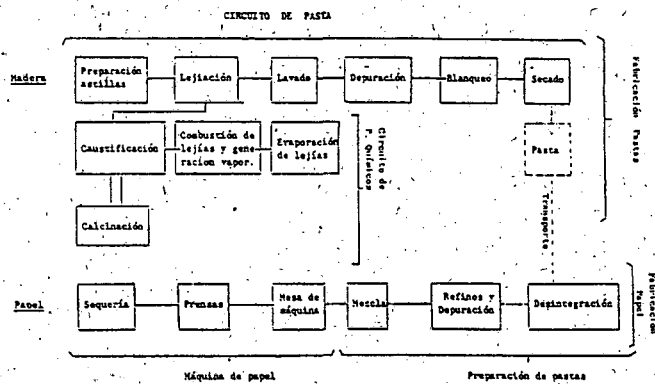


Figura i.13. Diagrama de blocs del procés de fabricació de pasta i paper

La transformació de la matèria primera en pasta pot realitzar-se de diverses maneres:

- procés mecànic: mitjançant d'energia mecànica. La pasta s'obté aportant energia mecànica i no utilitza reactius químics.
- procés químic: afegint reactius químics per dissoldre la lignina.
- procés semiquímic: combinació dels dos anteriors. Combinen un tractament químic suau amb un desfibrat mecànic.

D'aquests tres tipus de transformació de la matèria primera els més utilitzats són els tractaments químics. Els principals processos químics que s'utilitzen són els següents:

- procesos àcids: amb bisulfit (ja sigui càlcic, de magnesi o amònic) i amb àcid nítric.
- procesos neutres: amb sulfit sòdic neutre i una barreja de carbonat i bicarbonat sòdic.
- procesos alcalins: amb sosa en (fred o calent); amb calç i al sulfat (amb sosa i sulfur sòdic), anomenat procés KRAFT. Aquests darrers són els majoritaris.

Figura 1.14. Procés a la sosa per a la fabricació de pasta de palla.

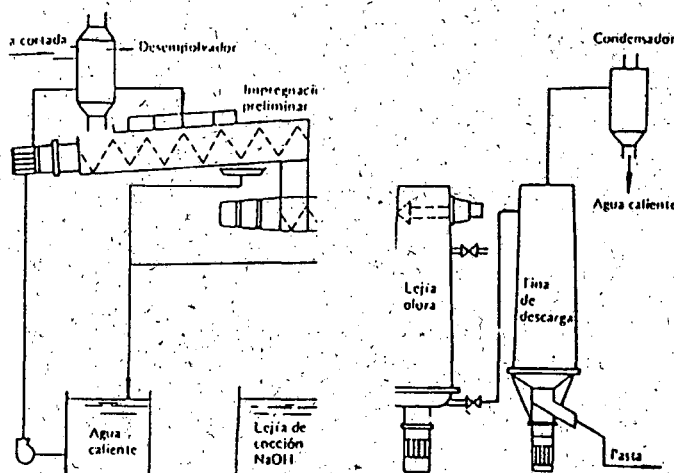


Figura 1.14. Diagrama del procés a la sosa per a la fabricació de pasta a partir de la palla

Independentment del procés de fabricació de pasta escollit pot existir una fase complementària de blanqueig per eliminar els excessos de lignina de la pasta, després de rentada i depurada.

Procés al sulfat Kraft

El procés al sulfat Kraft i les seves variants transforma la matèria primera en pasta de paper utilitzant reactius químics alcalins. Pot resumir-se en les següents etapes:

- trencament i trituració del vegetal
- cocció en digestors alimentats per vapor. Com a dissolvent de la lignina s'utilitza la sosa i el sulfur sòdic.
- la pasta formada i el llexiu negre es descarreguen en un tanc, del qual es desprenen gasos volàtils (aiguarràs) que després s'han de recuperar. La pasta en suspensió i el llexiu negre es dilueixen.
- es renta la pasta que passa a la secció de depuració i espesseïment. S'obté llexiu negre diluït (amb sulfat sòdic, carbonat sòdic i matèria orgànica, com líquid filtrat).
- la pasta rentada es depura i concentra en un espessidor i s'envia a la fase de blanqueig o a la fàbrica de paper. Es torna a produir més llexius negres
- es concentren els llexius negres en evaporadors fins arribar a concentracions del 60-70%.
- es recuperen els llexius negres.

Procés de fabricació del paper

Les pastes en solució aquosa se sotmeten a un tractament mecànic per tal de separar i hidratar les fibres per fer-les més flexibles. Es barregen i s'addicionen els productes químics, com coles, encolants, blanquejants,... en el reactor de barreja. Posteriorment la suspensió de pasta es fa passar pels depuradors, concentradors i reguladors fins arribar a la secció de premses. El paper passa del 30 al 93 % de sequetat a partir de la qual ja es manipula

La contaminació de la indústria del paper

La contaminació causada per la indústria de la pasta del paper és encara avui un problema pendent de resoldre. Com hem pogut veure en les taules anteriors (taules i.14 i i.15 i i.16) es deu tant al volum dels efluents com al tipus de procés utilitzat.

Aquests efluents produeixen 3 tipus d'impacte ambiental: a) càrrega orgànica (DQO-DBO), b) color, i c) toxicitat.

L'alta càrrega orgànica dels efluents ve ocasionada pels carbohidrats, alguns alcohols i àcids orgànics. Els derivats lignolítics d'alt pes molecular són els causants del color, i no contribueixen a la toxicitat, ja que la seva mida excessiva els impedeix que travessin les membranes dels microorganismes i, per tant, la seva assimilació. Per altra banda, la seva bioacumulació i la seva baixa velocitat de despolimerització pot suposar per llacs i rius, a llarg termini, una disminució de la lluminositat de les aigües, i, per tant, es produiria una disminució de la fotosíntesi reduint l'oxigen dissolt. A més a més, els tonins i les reïnes tenen un efecte tòxic sobre els peixos i altres microorganismes marins.

Taula i.16

Tipo de pasta	Caudal m ³ /tm	DBO ₅		Sòlides en susp.		pH	Color KgPt/tm
		Kg/tm	mg/l	Kg/tm	mg/l		
Mecànica	80	3-4	37,5-50	40-50	500-625	6-8	< 10
Sulfito	55	4-5	75-95	50-60	950-1100	6-8	< 10
Kraft cruda	35	6-8	170-230	20-30	580-850	7-8	< 10
Kraft blanqueada	30	5-6	160-200	15-20	500-660	7,1	< 10
Semi-química	40	6-8	150-200	35-40	875-1000	6-8	< 10
Sosa	25	12-15	480-600	30-40	1200-1600	5,7	< 10
Destintado	35	2-3	60-85	35-40	1000-1160	8,9	< 10

Taula i.16. Característiques de les aigües residuals produïdes en la fabricació de paper en funció de la pasta utilitzada

Els llexius negres

Els llexius negres són aigües residuals procedents d'indústries de pasta de paper que utilitzen un procés alcalí per a la cocció de la matèria primera vegetal destinada a la producció de polpa.

Són efluentes amb una elevada càrrega orgànica i amb característiques tòxiques i mutagèniques, degudes a compostos de baix pes molecular. La presència de polímers d'alt pes molecular (lignina) fa que la biodegradabilitat d'aquests efluentes sigui força baixa, a la vegada que els donen un color marró fosc.

El principal procés alcalí utilitzat actualment és el procés al sulfat kraft vist anteriorment. Ara bé, en l'Estat espanyol i països menys desenvolupats el polpeig amb sosa encara s'utilitza, sobretot en la producció de pasta a partir de matèria no llenyosa.

En el procés en sosa el llexiu utilitzat en la cocció és una dissolució de sosa càustica al 8-10 %. Durant la cocció es formen lignosulfonats sòdics, que són el principal constituent dels llexius negres, juntament amb productes de la degradació de la lignina, la cel·lulosa, sals sòdiques d'àcids orgànics complexos i l'excès de sosa.

La cocció en condicions alcalines dissol la major part del material no cel·lulòsic de la matèria primera (lignina, hemicel·lulosa, reïnes, etc). El procés es basa en una despolimerització dels fenilalqui-èters. El trencament dels enllaços èter contribueix essencialment a disminuir la mida de les molècules de lignina i al mateix temps es generen ions fenòxid, fent que la lignina sigui més soluble en medi alcalí. Com les reïnes i els àcids grassos són solubles en medi alcalí, s'extreuen també durant la cocció.

Els llexius negres són efluentes altament contaminants. En la taula i.17 (Sierra, 1991), podem veure la composició bàsica d'alguns llexius negres procedents del procés del polpeig amb sosa. Com es dedueix de la taula, el contingut en lignina suposa un poc menys de la meitat de la càrrega orgànica contaminant dels llexius negres. La matèria biodegradable, com els àcids grassos volàtils i sucres, suposen del 19 al 45 % de la DQO dels llexius negres. El seu contingut en sòlids varia entre el 14 i 18 %. El pH és elevat, entre 9 i 14 i la DQO (Demanda Química d'Oxigen) entre 25 i 200 g/l (Sierra, 1991; Velasco, 1985 i Zuxuan, 1983).

A aquestes característiques cal afegir la toxicitat de determinats compostos-derivats lignolítics de baix pes molecular, resines i greixos- i la poca biodegradabilitat dels derivats lignínics d'alt pes molecular.

Taula i.17

Component	P	A	B
	% DQO		
AGV	8	12	10
sucre	11	12	35
lignina	40	46	ND

P= fusta de pi, A= fusta d'avet, B= palla de blat

ND= no determinat

AGV= àcids grassos volàtils

Taula i.17. Composició bàsica d'alguns LN procedents del procés de polpeig amb NaOH.

Processos de tractament

S'han provat i proposat diferents processos pel tractament dels llexius negres en la indústria paperera. En general es poden englobar dins els següents grups:

- Tractament de precipitació: són efectius per eliminar els compostos reïnosos, que són les principals substàncies amb característiques inhibidores dels llexius negres. La precipitació es pot fer mitjançant àcids o sals di o trivalents i polielectrolits.

Per precipitació àcida (HCl) s'aconsegueix la completa eliminació de la toxicitat metanogènica dels llexius negres de pi (Field, 1988). La major part de la toxicitat dels llexius negres es troba en la fracció sòlida.

Així mateix per addició de CaCl_2 s'aconsegueix també la detoxificació completa dels llexius negres de pi (...). A més, l'addició de cations provoca una disminució en la coloració de l'efluent per precipitació dels derivats lignítics d'alt pes molecular.

La precipitació té l'inconvenient de generar un sòlid i eliminar-lo i incrementar els costos i no solventa el problema de la contaminació final.

- Incineració: es recuperen part dels reactius utilitzats durant el procés i s'obté energia. Consisteix en una etapa d'evaporació seguida d'una incineració. Cal tenir molta cura amb les emissions a l'atmosfera.

L'alt cost i els riscos ecològics de la incineració limita la seva utilització a empreses amb elevat volum de producció, fent impossible la seva aplicació a les petites empreses.

- Tractaments oxidatius: poden dividir-se en oxidacions que polimeritzen els compostos aromàtics i oxidacions que destrueixen l'estructura aromàtica. Tractaments amb O_3 o H_2O_2 poden utilitzar-se per destruir l'estructura aromàtica de compostos aromàtics recalcitrants convertint-los en àcids carboxílics simples. Així, en estudis realitzats amb aquests oxidants s'elimina parcialment el color.

Per altra banda els tractaments oxidatius que causen polimerització poden convertir els tanins, per exemple, en compostos húmics d'alt pes molecular (Field, 1990), que tot i ser recalcitrants donat el seu elevat tamany molecular, no són tòxics.

Malauradament l'elevat cost dels oxidants químics fa que aquest procés no pugui ser aplicat a escala industrial d'una manera econòmicament viable.

Processos biològics

- Tractaments biològics: els llexius negres no es poden tractar directament mitjançant tractaments biològics convencionals degut a la presència de compostos tòxics, tant pels bacteris anaerobis com pel aerobis, com reïnes, greixos o tanins. Cal doncs, diluir el llexiu negre fins a concentracions sub-tòxiques amb altres efluent poc contaminants del procés, o bé diluir-lo amb l'efluent d'un tractament biològic anterior.

L'alt contingut en lignina fa que la biodegradabilitat anaeròbia dels llexius negres sigui baixa. La propietat recalcitrant dels compostos de lignina d'alt pes molecular en ambients anaerobis ha estat estudiada en diverses ocasions (Sierra, 1990).

Per augmentar la biodegradabilitat anaeròbia dels llexius negres pot fer-se un tractament previ a la digestió anaeròbia. L'oxidació dels compostos aromàtics i xenobòtics per fongs ligninolítics sembla una alternativa viable als processos de pretractament com oxidació i precipitació.

Detoxificació biològica

Enzims i microorganismes poden ser potencialment utilitzats per reduir la toxicitat dels LN i augmentar el rendiment d'un posterior tractament anaeròbi, però malauradament aquests tipus de pretractaments encara no s'han provat suficientment amb el LN com per treure'n conclusions.

Fins el moment un dels mètodes de detoxificació biològica de LN més utilitzat és diluir l'influent anaeròbi amb l'efluent del tractament aeròbi (Habets i col., 1991) així s'aconsegueix la degradació de compostos tòxics (resines) que no podrien ser degradats directament pels bacteris anaerobis.

L'oxidació destructiva de compostos recalcitrants i xenobiòtics per l'activitat de fongs lignolítics podria ser una alternativa biològica a la destrucció per compostos químics del tipus O_3 i H_2O_2 . L'activitat lignolítica és una activitat metabòlica secundària. Això significa que, malgrat que l'activitat lignolítica no està associada al creixement, es necessita un substrat biodegradable (és a dir, un co-substrat). El co-substrat es necessita per a la producció de radicals oxigenats que destrueixen les estructures aromàtiques. En aquest sentit es pot considerar el co-substrat com una alternativa barata als oxidants químics cars. Perquè l'aplicació de fongs lignolítics sigui econòmicament interessant, és necessari que el co-substrat sigui una part de l'aigua residual o un abocament sense valor econòmic.

Els fongs lignolítics han estat aplicats amb anterioritat per a la decoloració d'efluents de blanqueig a escala laboratori i semi-pilot. Aquests fongs han estat immobilitzats en diferents reactors, com filtres de percolació i discs biològics rotatius. Els fongs immobilitzats també s'han utilitzat en reactors continus per a decolorar efluents que no han estat esterilitzats i han treballat durant períodes llargs (mesos) sense problemes de contaminació ni pèrdua d'activitat (Eaton i col., 1980; Eaton i col., 1982; Livernocle i col., 1983; Messner i col., 1989). Les condicions estèrils només són necessàries per al creixement dels fongs i per a l'atrapament a materials suport. Com co-substrat per a aquests sistemes s'han utilitzat llots de paper que són productes residuals de la indústria del paper.

És important assenyalar que durant la decoloració no hi ha depuració completa en el sentit convencional d'eliminació de fraccions biodegradables de l'aigua residual. En els millors casos s'ha eliminat fins a un 45% de la DQO biodegradable i en altres casos més DQO després d'aplicar el tractament amb fongs lignolítics no poden ser considerats com un sistema complet de depuració, sinó com un pretractament.

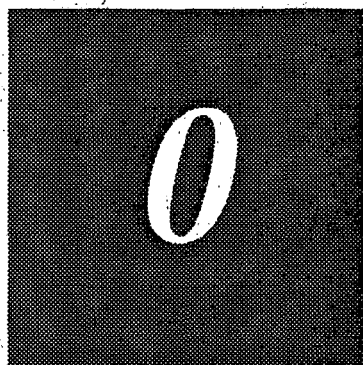
L'atac de la lignina per fongs lignolítics no porta a la seva destrucció completa però sí que ocasiona la destrucció parcial i la despolimerització (Sundman i col., 1981). L'objectiu dels estudis citats anteriorment era la decoloració d'efluents de paperera, però s'ha investigat molt poc en l'efecte que poden tenir aquests tractaments amb fongs lignolítics per a augmentar la biodegradabilitat de les lignines per bacteris en els sistemes de tractament anaerobi. Degut a que l'alt pes molecular de la lignina és la raó més important de que sigui recalcitrant per als bacteris (Field, 1989; Kirk i col., 1987) s'espera que la lignina pot ser més biodegradable després de la seva decoloració per fongs lignolítics. Si fos així, la combinació de tractaments amb fongs i bacteris en sistemes de depuració pot produir un augment important de la biodegradabilitat de la lignina.

Bibliografia

- Barr, D. P. i Aust, S. D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci, Technol.* Vol 28. n. 2: 78A-87 A.
- Bonnaime, P., Delattre, M., Drouet, H., Corrieu, G., Asther, M. (1993). Toward a control of lignin and manganese peroxidase hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactor on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 41: 440-450.
- Cai, D. i Tien, M. (1993). Lignin-degrading peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 30: 79-90.
- Cancel, A. M., Orth, A. B., Tien M. (1993). Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol. Sep.*: 2.909-2.913.
- Crawford, R. L. (1981)a. Lignin biodegradation and transformation. Cap. 1 Lignin: ecological and industrial importance. pàg. 1-6.
- Crawford, R. L. (1981)b. Lignin biodegradation and transformation. Cap 4. Lignin-degrading microorganisms. Pàg.: 38-60.
- Feijoo E., Dosoretz, C., Lema, J. M. (1994). Production of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in a packed bed bioreactor with recycling. *Biotechnology techniques.* Vol. 8 núm. 5: 363-368.
- Feijoo, G. O. (1994). Postratamiento de efluentes de la industria de la madera. Xarxa de la lignina. Tenerife.
- Fiechter, A. (1993). Function and synthesis of enzymes involved in lignin degradation. *Journal of biotechnology*, 30: 49-55.
- Field, J. A. Leyendeckers, J. H., Sierra-Álvarez, R., Lettingo, G., i Habets, L. H. A. (1988). The methanogenic toxicity of bark tannins and the anaerobic-biodegradability of water soluble bark matter. *Wat. Sc. Tech.* 20 (1): 219-240.
- Field, J. A., Lettingo, G., Habets, L. H. A. (1990). Oxidative detoxification of aqueous bark extracts. Part I: autoxidation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 49: 15-33.
- Gasbell, J. i Cullen, D. (1993). Recent advances in the organization and regulation of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of biotechnology*, 30: 109-114.
- Gold, M. H. i Alic, M. (1993). Molecular biology of the Lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological reviews.* Sept.: 605-622.
- Haemmerli, S. D., Schoemaker, H. E., Schmidt, H. W. H. i Leisola, M. S. A. (1987). Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS lett.* Vol 220 núm. 1: 149-154.

- Harvey, P. J., Schoemaker, H. E., i Palmer, J. M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS lett. 195: 242-246.
- Jensen, K. A. Jr., Kathryn, M. C. E., Kirk, T. K., Hammel, K. E. (1994). Biosynthetic pathways for veratryl alcohol in the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environm. Microbiol. Febr.: 709-714.
- Joshi i gold (1994). Biochemistry. Vol. 33, núm. 36:10.974.
- Johnston, C. G., i Aust, S. D. (1994). Transcription of ligninase H8 by *Phanerochaete chrysosporium* under nutrient nitrogen sufficient conditions. Biochemical and biophysical. Research communications. Vol. 200: 108-112.
- Kirk, T. K., i Kersten, P. J. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. J. Bacteriol. 135:790-797.
- Kirk, T. K., i Farrel, R. L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.
- Koduri, R. S., Tien, M. (1994). Kinetic analysis of lignin peroxidase: explanation for the mediation phenomenon by veratryl alcohol. Biochemistry, vol. 33 núm. 14: 4.225-4.230.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS lett., 169: 247.
- Leisola, M. S. A. i Fiechter, A. (1985). New trends in lignin biodegradation. Advances in biotechnological processes: 5: 59-89.
- Meunier, B. (1994). Metalloporphyrins in catalytic oxidation. Ligninase and related model system. Editat per Sheldon, R. A. The Netherlands. Cap. 5: 133-155.
- Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. H. (1995). Production of manganese peroxidase by free pellets of *Phanerochaete chrysosporium* in an expanded-bed bioreactor. Biotechnology techniques. Vol. 9, núm. 5: 371-376.
- Moyson, E., Verachtert, H. (1993). Factors influencing the lignin-peroxidase-producing ability of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 391-394.
- Ramos, L. (1991). Selecció del tipus de fong i condicions òptimes en el pretractament de depuració biològica d'aigües residuals fenòliques. UAB, pàg.: 6-10.
- Reddy, C. A., d'Souza, T. M. (1994). Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Reviews. 13: 137-152.
- Sierra-Álvarez, R. Letting, G. (1990). The methanogenic toxicity of wastewaters lignins and lignin related compounds. J. Chem. Technol. Biotechnol.
- Sierra-Álvarez, R., Kortekaas, S., Ekert, M. i Lettinga, E. (1991). The anaerobic biodegradability and methanogenic toxicity of pulping wastewater. Water Sci, Tech.

-
- Tier, M., i Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science 221: 661-663.
- Valli, K. Wariishi, H., Gold, M. H. (1990). Biochemistry 29, 8.535-8.539.
- Velasco, A. A., Frostell, B., Greene, M. (1985). Full scale anaerobic-aerobic biological treatment of a semichemical pulping wastewater. Proc. 40th industrial Waste Conf. Purdue University: 297-304.
- Zuxuan, W. i Lixon, Y. 1983. Disposat of paper black liquid and furturaldehyde sewage through anaerobic digestion process. Proc. of the anaerobic wastewater treatment symposium. Noordwijberhout: 369-382.



**L'efluent:
els lleixius negres**

L'efluent: els lleixius negres

L'efluent utilitzat en aquest estudi han estat lleixius negres de cànem obtinguts d'una planta de pasta de paper, Celesa S.A., situada a la localitat de Tortosa al Delta de l'Ebre.

Els lleixius negres són aigües residuals altament concentrades descarregades durant la producció de pasta química en les indústries del paper que no utilitzen tecnologies netes per la recuperació dels productes químics. Aquests lleixius són de color marró fosc, amb pH bàsic al voltant de 12, i estan principalment compostos de materials orgànics, tals com la lignina i altres components fenòlics. Els polímers derivats de la lignina tenen propietats tòxiques (Sierra, 1991), i el color marronós de l'efluent pot augmentar la disminució de la fotosíntesis. Aquest efecte a més, provoca una disminució en la concentració d'oxigen dissolt i altera l'equilibri ecològic; per tant, la descàrrega de grans quantitats d'aquestes aigües residuals en els corrents i oceans podria ocasionar greus problemes en el medi ambient.

En aquest capítol es presenten les característiques dels lleixius negres utilitzats durant tot el treball. Havíem observat que els lleixius negres a pH àcid precipitaven alguns compostos i en filtrar-los aquests compostos quedaven retinguts en el paper de filtre. Justament la precipitació per l'acidificació del lleixius negres és una de les formes per destoxificar-los, com ja s'ha comentat en l'apartat anterior; sabíem també, (J.Field, comunicació personal) que el pH tenia major influència en el color que en els compostos aromàtics.

Per tant, analitzem en aquest apartat la influència del pH en els diferents mètodes analítics emprats, com el color, els compostos aromàtics i la distribució de tamanys moleculars. Finalment fem una proposta de correcció en la mesura del color i dels compostos aromàtics, i de cara al propers treballs un canvi en el mètode analític.

Mètodes analítics

L'absorbància de la mostra a l'espectre de l'ultraviolat a 280 nm en cubetes de quarz d'1 cm va ser utilitzada com indicador de la concentració total de compostos aromàtics. Les mostres de l'aigua residual filtrades eren diluïdes amb el tampó tetraborat 0.02 M a pH=9.1; generalment, es feia aquesta dilució, per tenir absorbàncies inferiors a 0.8 unitats, corresponia a 0.030 µl de mostra amb 2 ml de tampó.

L'absorbància en l'espectre del visible a 440 nm en cubetes de vidre de 1 cm va ser utilitzada com indicador del color. Les mostres de l'aigua residual filtrades eren diluïdes amb el tampó tetraborat 0.02 M a pH=9.1 per tal que tinguessin absorbàncies inferiors a 0.8 unitats; generalment amb una dilució de 100 µl de mostra i 2 ml de tampó ja era suficient.

La demanda química d'oxigen (DQO) va ser determinada d'acord amb els mètodes proposats pel Standard Methods (Standard Method, 1985). En les dades de la DQO d'aquest treball s'ha descomptat l'aport de DQO deguda a la glucosa en el medi.

La distribució de tamanyes moleculars va ser estudiada per cromatografia de gel filtració, utilitzant el sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Cromatografia) de Pharmacia LKB, equipat amb el programa FPLC Manager, i un detector UV (280 nm); 50 µl de mostra (filtrada amb un filtre Millipore de 0.2 µm) eren eluïdes amb una solució de formamida al 20 %, a un cabal de 0.5 ml per minut. Es va utilitzar 3 columnes amb el rebliment Superdex: la Superdex 75 HR 10/30 que diferencia pesos moleculars fins 75 kDa amb un volum 25 ml; la Superdex 30 HR 10/30 que diferencia pesos moleculars fins a 10 kDa, i finalment la Superdex 200 HR 16/60 que diferencia pesos moleculars fins a 200 kDa i té un volum, aquesta darrera, de 120 ml. En l'annex s'adjunta un calibrat per les diferents columnes.

La toxicitat va ser determinada amb l'aparell Microtox System de Microbics Corporation, basat en el percentatge de pèrdua de la llum emesa per un bacteri bioluminiscent (*Photobacterium phosphoreum*) en posar-lo en una mostra a pH 7. El valor de la EC₅₀ (t,T) a 5 minuts i 15°C representa la concentració efectiva de mostra que causa un 50% de disminució en la llum emesa sota unes condicions determinades de temps i temperatura. Es va utilitzar aquest mètode, enfront d'altres com la *Daphnia magna*, perquè està igualment reconegut per la legislació catalana i europea, és més reproducible, té un temps d'anàlisi molt més curt i és viable.

analitzar un gran nombre de mostres. A més a més, d'altres grups científics d'investigació de tractaments d'aigües residuals de paperera (Lema..., Bergbauer) també el començaven a utilitzar.

Les reduccions de EC50 les expressem com $(EC50_{\text{final}} - EC50_{\text{inicial}}) / EC50_{\text{inicial}}$. Donat que en aquest treball ens referirem sobretot a reduccions, volem remarcar - només perquè serveixi com a exemple indicatiu - que una reducció de 2, equival a dir, que una aigua el 10% de la seva concentració produïa una inhibició del 50% (EC50), després de tractar-la per causar aquesta mateixa inhibició hauria d'estar concentrada al 30 %.

Les mesures d'absorbància (mètodes del color, aromàtics, DQO i més endavant assaig enzimàtic) es realitzaren amb un espectrofotòmetre Cary 13 UV/VIS, de Variant, amb celdes termostatitzades i control de temperatura, i un software programable per cada mètode. La precisió de l'aparell era fins.....unitats d'absorbància.

Característiques mitjanes dels lleixius negres

Les característiques mitjanes d'aquests lleixius negres eren:

DQOtotal	181 g/l
DQOsoluble	176 g/l
Components aromàtics	927.8
Color	65.1
pH	12.66
EC50	0.3 %

En els experiments que es presentaran en els propers capítols, abans d'utilitzar, els lleixius negres eren tractats de la següent forma: 70 g de l'efluent eren afegits en una solució que contenia 930 ml d'aigua destil·lada i 1.6 ml de HCl concentrat i emmagatzemat a 4°C. Sempre que ens referirem als lleixius negres, ens estarem referint a aquests lleixius acidificats. En aquells casos que volguem referir-nos als lleixius sense acidificar ni diluir, els anomenarem lleixius negres concentrats.

Aquests lleixius negres no contenien suficient font de carboni i nitrogen assimilable per permetre el creixement, per tant, era necessari afegir una font de carboni i nitrogen addicional. Es va utilitzar glucosa a diferents concentracions finals i NH₄Cl per obtenir una concentració final de nitrogen de 75 i 550 ppm. Una alíquota de 26.25 ml d'un medi (18) amb micro i macronutrients eren afegits a 1 l de lleixius negres.

La composició dels macronutrients (Kirk i col., 1978) era la següent: 20 g/l de KH_2PO_4 , 5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, i 1 g/l de CaCl_2 . La composició dels micronutrients (Kirk i col., 1978) era la següent: 1.5 g/l de nitriloacetat, 3.0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/l de NaCl , 0.1 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l de CoSO_4 , 0.1 g/l de ZnSO_4 , 0.082 g/l de CaCl_2 , 0.01 g/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/l de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, 0.01 g/l de H_3BO_3 i 0.01 g/l de NaMoO_4 .

En els cultius que es tamponava el medi s'utilitzà com a tampó l'àcid 2-2 dimetil succínic (DMS) 0.1 M, és a dir, 7.7 g/l.

Resultats

Influència del pH en la distribució de mides moleculars

Per tal de veure si el pH modificava la composició de la part soluble dels lleixius negres es van fer anàlisis per cromatografia FPLC en una columna Superdex200. Vam agafar una mostra de lleixius negres sense tractar a tres pH diferents 3.88, 4.7 i 12.9. Les figures 0.1, 0.2 i 0.3 corresponen als cromatogrames (500µl) de la mostra a pH 3.88, 4.7 i 12.9, filtrades i eluïdes amb formamida. Les diferències entre les dues primeres figures i la figura 0.3 són prou evidents. A resaltar que a pH bàsic l'àrea anterior als 110 primer ml representa 10.7 AU·ml, i a pH àcid només representa 1 AU·ml. En general en acidificar i filtrar posteriorment, hem perdut -o hem deixat en el filtre- bona part dels compostos d'alt pes molecular, en una proporció aproximada de 1 a 10. Si comparem ara els cromatogrames de les dues primeres figures -figura 0.1 i 0.2- les formes dels cromatogrames són la mateixa, i en la primera figura en els primers 113 ml hauríem mesurat 2.3AU·ml, és a dir, aproximadament el mateix.

La figura 0.4 mostra el cromatograma de la mostra inicial a pH àcid obtingut en una columna Superdex 75. Les figures següents 0.5, 0.6 i 0.8 es refereixen a la mostra inicial eluïda a diferents condicions en la columna Superdex 30, totes filtrades i eluïdes amb formamida.

Taula 0.1

Cromatograma	Columna	pH de la mostra abans de filtrar-la	Altres
Figura 0.1	Superdex 200	3.88	No esterilitzada
Figura 0.2	Superdex 200	4.7	No esterilitzada
Figura 0.3	Superdex 200	12.9	No esterilitzada
Figura 0.4	Superdex 75	4.5	esterilitzada
Figura 0.5	Superdex 30	4.5	No esterilitzada
Figura 0.6	Superdex 30	4.5	esterilitzada
Figura 0.7	Superdex 30	12	esterilitzada

Taula 0.1. Resum dels cromatogrames presentats en les figures 0.1-0.7

En les figures 0.5 -pH àcid no esterilitzat- i 0.6 -pH àcid èsteril- podem observar l'efecte que sobre la mostra té esterilitzar-la o mantenir-la sense esterilitzar. En esterilitzar l'àrea total se'ns redueix en un 40%.

Influència del pH en la mesura dels compostos aromàtics

El pH té una influència en la mesura dels compostos aromàtics perquè:

- En acidificar, $\text{pH} < 6$, precipita lignina (alcalilignines), per tant, en filtrar abans d'addicionar el tampó ($\text{pH} = 9$) estem eliminant matèria orgànica, en forma de compostos aromàtics; a partir de pH superiors a 6 unitats el valor dels aromàtics no varia gaire.
- Ara bé, si primer addicionem el tampó i després filtrem què passa? Si la mostra no és suficientment gran, tampoc agafaríem les partícules sòlides de la lignina, i, hauria servit de ben poc afegir el tampó abans.

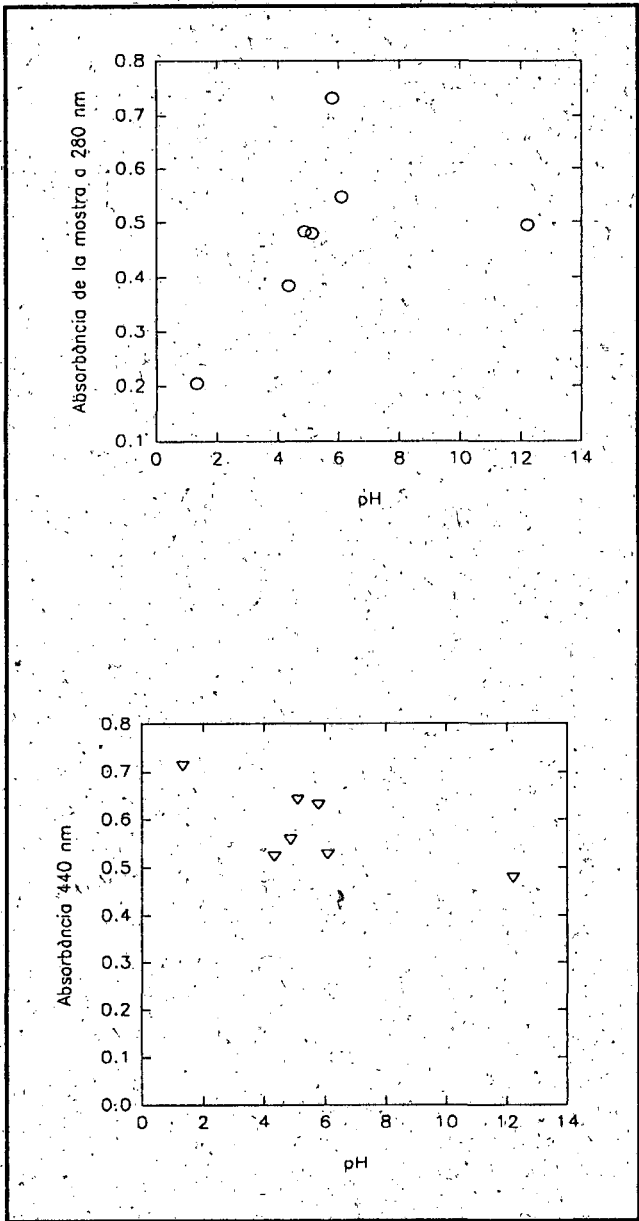
Per tal de determinar la influència del pH en la mesura dels compostos aromàtics vam realitzar els experiment 0.1 i 0.2.

En l'experiment 0.1 mesurarem els compostos aromàtics dels lleixius negres a set pH diferents en el rang de 2 a 12. La mesura dels compostos aromàtics la vam fer tal com s'ha descrit en l'apartat de mètodes. Es a dir, teníem set solucions de lleixius negres a pH diferents. Vam agafar una mostra de cada solució, la vam filtrar; i després del filtrat en prenguérem 0.03 ml que es barrejaren amb 2 ml de tampó tetraborat a pH 9.2. Es mesurava l'absorbància d'aquesta solució a la longitud d'ona de 280 nm.

En l'experiment 0.2 partiem dels mateixos lleixius negres a diferents graus d'acidesa que en l'apartat anterior. Ara bé, vam mesurar els compostos aromàtics de forma diferent: prenguérem una mostra de 0.03 ml d'aquests lleixius negres, li barrejàrem 2 ml de tampó tetraborat, i la solució resultant la vam filtrar; a la solució filtrada li mesurarem l'absorbància a 280 nm.

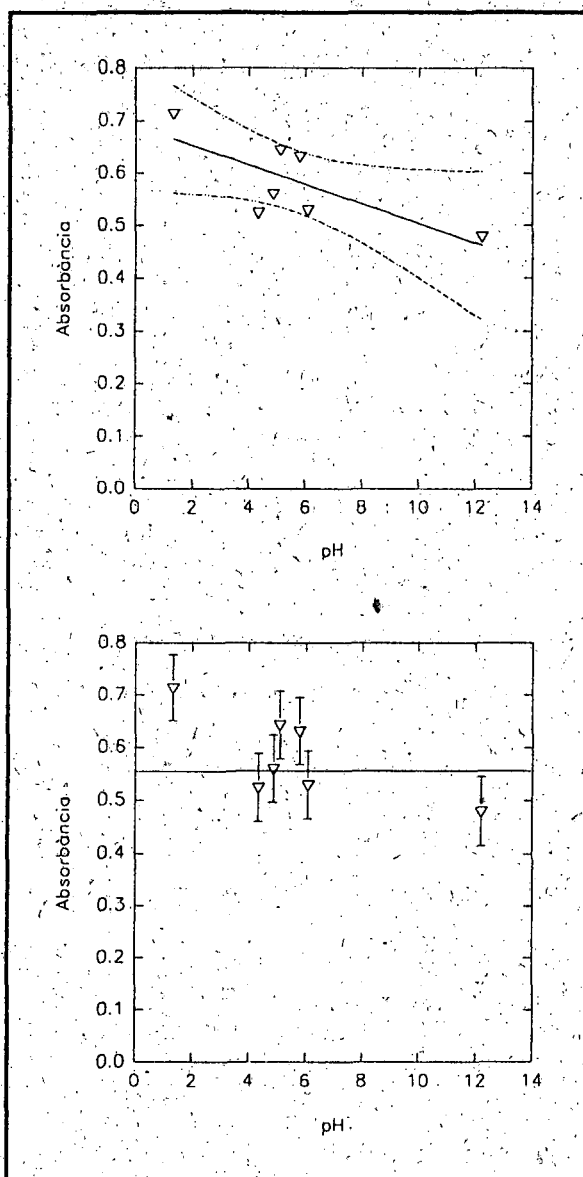
En la gràfica 0.1a presentem els resultats de l'experiment 0.1 enfront la mesura de l'absorbància, i en la gràfica 0.1b els resultats de l'experiment 0.2 també front la mesura de l'absorbància.

L'anàlisi de les dades de l'experiment 0.2 l'hem fet des de dos punts de vista diferents: a) acceptem que la mesura dels compostos aromàtics podrien variar amb



Gràfica 0.1a: variació dels compostos aromàtics de l'aliment amb el pH.

Gràfica 0.1b: variació dels compostos aromàtics de l'aliment amb el pH, afegint el tampó abans de filtrar.



Gràfica 0.2a: variació dels compostos aromàtics de l'aliment amb el pH; recta de regressió, i marge de confiança del 95 %.

Gràfica 0.2b: Variació dels compostos aromàtics de l'aliment amb el pH; valor mig; les barres verticals indiquen la desviació estandard.

el pH, i, per tant, intentem trobar una correlació lineal entre la mesura de l'absorbància i el pH -gràfica 0.2a-; i b) la variació dels compostos aromàtics amb el pH és mínima -gràfica 0.2b- i, per tant, a diferents pH el valor de l'absorbància hauria de ser el mateix.

En la gràfica 0.2a hem representat la recta de regressió, que relacionaria l'absorbància amb el pH. Aquesta recta de pendent negatiu, igual a -0.0186 , és a dir, per pH bàsic els compostos aromàtics disminuirien, tindria un coeficient de regressió R^2 de 0.54 . Evidentment la correlació de les dades no és gens bona. D'altra banda, hem dibuixat en la mateixa gràfica 0.2a els marges que definirien un rang de confiança entre la mesura experimental i la prevista del 95 %.

En el supòsit que el resultat previst hagués hagut de ser una constant, el valor mitjà d'aquesta sèrie de 7 mesures seria 0.583 unitats d'absorbància. La desviació estàndard representaria un error del 14 % en l'absorbància. Ara bé, si menyspreem el primer d'aquests punts, (pH = 1.33), perquè considerem que ha pogut haver algun error en l'anàlisi, i a més a més, tampoc treballarem a aquest pH, llavors l'absorbància mitjana seria 0.5642 amb una desviació estàndard de 0.064 unitats, és a dir, del 11 %. En la gràfica 0.2b hem dibuixat els mateixos punts experimentals i hi hem afegit la desviació estàndard de 0.056 unitats d'absorbància; la ratlla horitzontal correspon a la mitjana.

Si ara retornem a l'experiment 0.1 i hi representem la desviació estàndard obtinguda de les mesures de l'apartat anterior, obtenim la gràfica 0.2c. Amb aquestes dades es fa difícil intentar establir una correlació lògica, però hi podem intuir una tendència. El punt a pH 5.79 sortiria d'aquesta tendència marcada per la resta de dades; si l'eliminem el comportament ja és més lògic. Hi ha una primera fase en la que el pH té una gran influència, (aproximadament fins pH al voltant de 6), i, després aquesta influència desapareix completament. Aquesta hipòtesis quedaria també validada a partir dels valors obtinguts a pH 6.09 i 12.21 en els experiments 0.1 i 0.2. Així, a pH 6.09 l'absorbància en l'experiment 0.1 és de 0.5465 i en l'experiment 0.2 de 0.5294 ; si aquests dos valors han de coincidir, l'error comés seria inferior al 5 %, i el mateix succeiria a pH 12.21 , on tenim 0.4938 unitats d'absorbància en l'experiment 0.1 i 0.4798 unitats en l'experiment 0.2. Aquest error inferior al 5 % estaria més d'acord amb el calculat per XF. (...) que el xifrava en el 5 % pel mateix mètode i la mateixa aigua. Si considerem aquestes darreres quatre dades, en les que l'absorbància hauria de ser la mateixa, la mitjana valdria 0.51238 , i la desviació estàndard 0.03088 que equivaldria al 6.02 % d'error en la desviació estàndard. D'altra banda, hem dit que hi hauria un interval en el que l'absorbància dels compostos aromàtics no dependria del pH; a partir de les dades de l'experiment 0.1 -que correspon al mètode analític emprat en tot el treball- podem suposar

que aquest interval fos el delimitat per les darreres quatre dades -de pH 4.86 fins pH bàsic, sense comptabilitzar el punt de pH 5.79-; llavors, la mitjana seria de 0.50058 unitats d'absorbància, amb una desviació estàndard de 0.03124 unitats, que tornaria a representar un error del 6.2 %. Aquesta nova desviació estàndard l'apliquem als punts de l'experiment 0.1 en la gràfica 0.2d. En aquesta mateixa gràfica 0.2d hi ajustarem una corba, que tindrà la següent forma:

Equació 1:

$$A_{280}(\text{pH}) = \frac{\text{Absorbància}_{\text{màxima}} \times \text{pH}}{(\text{pH} + K1) - K2}$$

$$A_{280}(\text{pH}) = \frac{0.851605 \times \text{pH}}{(\text{pH} + 2.25298)} - 0.17$$

on A representa l'absorbància

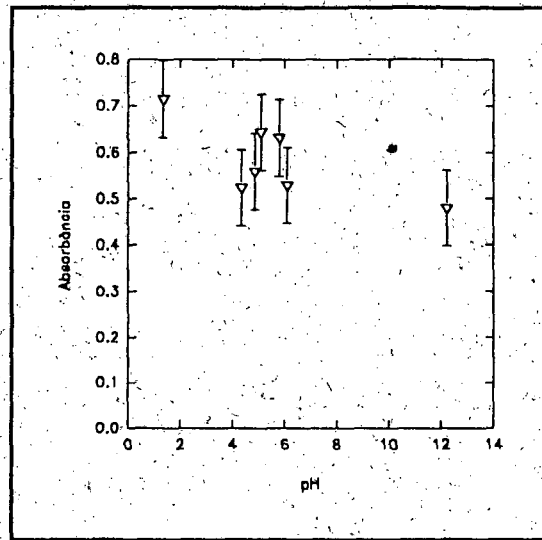
Aquesta corba ens indica com varia l'absorbància a 280 nm -utilitzada per mesurar els compostos aromàtics- a mesura que varia el pH dels lleixius negres sense tractar. Prendrem com a valor màxim de l'absorbància 0.54699, el corresponent a pH 12; és a dir, suposem que aquest seria el valor real de l'absorbància a 280 nm de la mostra inicial.

Per tant de l'anàlisi d'aquests resultats podem concloure que l'error en la mesura dels compostos aromàtics amb el mètode utilitzat és al voltant del 5 %, i per pH inferiors a 6 l'acidesa del medi precipita alguns compostos aromàtics que queden retinguts en el paper de filtre.

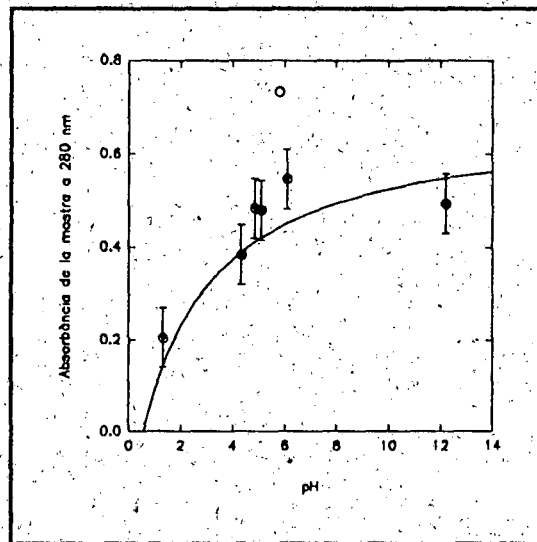
Influència del pH en la mesura del color

Per tal de determinar la influència del pH en la mesura del color vam realitzar els experiments 0.3 i 0.4. Aquests experiments es van realitzar perquè havíem observat que els lleixius negres a pH àcid precipitaven alguns compostos i en filtrar-los aquests compostos quedaven retinguts en el paper de filtre.

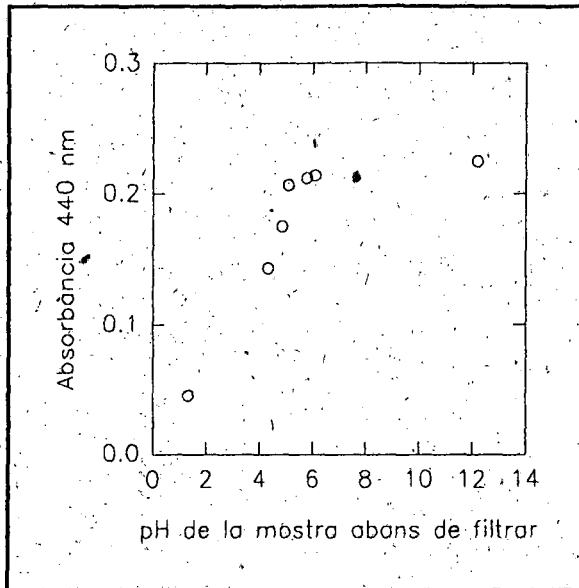
En l'experiment 0.3 mesurarem el color dels lleixius negres a set pH diferents en el rang de 2 a 12. La determinació del color la vam fer tal com s'ha descrit en l'apartat de mètodes. Vam agafar una mostra de cada solució, la vam filtrar; i després de la part filtrada en prengueren 0.1 ml que es barrejaren amb 2 ml de tampó tetraborat a pH 9.2. Es mesurava l'absorbància d'aquesta solució a la longitud d'ona de 440 nm.



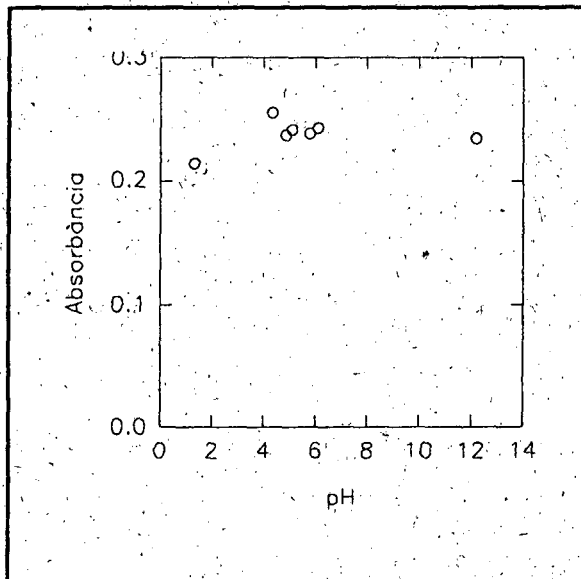
Gràfica 0.2c: variació dels compostos aromàtics de l'aliment amb el pH; filtrat a pH del tampó. Les barres verticals indiquen la desviació estàndard.



Gràfica 0.2d: corba de la dependència de l'absorbància dels compostos aromàtics de l'aliment amb el pH



Gràfica 0.3a: variació de l'absorbància de la mostra aliment amb el pH, segons el pH abans de filtrar-la.



Gràfica 0.3b: variació de l'absorbància del color de la mostra amb el pH; filtrada a pH del tampó.

En l'experiment 0.4 partiem dels mateixos lleixius negres a diferents graus d'acidesa que en l'apartat anterior. Ara bé, vam determinar el color de forma diferent: prenguérem una mostra de 0.1 ml d'aquests lleixius negres a diferent pH, li barrejàrem 2 ml de tampó tetraborat, i la solució resultant la vam filtrar; la solució filtrada li mesuràrem l'absorbància a 440 nm.

En la gràfica 0.3a presentem els resultats de l'experiment 0.3 en la mesura de l'absorbància, i en la gràfica 0.3b els resultats de l'experiment 0.4 també en la mesura de l'absorbància.

De la sèrie de set mesures fetes en l'experiment 0.4 podem calcular-ne la mitjana i la seva desviació estandard: 0.23704 unitats d'absorbància per la mitjana i 0.0123 unitats d'absorbància per la desviació estandard. Es a dir, la desviació estandard representaria un error del 5 % solament. Aquest és un error acceptable.

En la gràfica 0.4a hem representat els valors de l'experiment 0.3, i hem marcat el valor mig obtingut de l'absorbància en l'experiment 0.4, amb la seva desviació estandard. A més a més, hem fet la regressió de la recta que correlacionaria els sis primers punts experimentals corresponents als pH més àcids. La recta representada, amb un coeficient de regressió R^2 de 0.967, tindria de pendent 0.03743, i es podria escriure com segueix:

$$A_{440}(\text{pH}) = -0.00564 + 0.03743 \text{ pH}$$

En aquest cas, el pendent positiu indica que l'absorbància mesurada en les mostres filtrades és inferior a la real i, per tant, es correspondria amb el fenomen observat que a pH àcids, després de filtrar la mostra, aquesta perdia bona part del color. Abans de filtrar aquesta pèrdua no sempre era apreciable.

Aquesta recta seria aplicable des de pH àcids fins pH de 6.15. A aquest darrer pH el valor mesurat ja entraria dins el valor previst per la desviació estandard del valor mitjà utilitzat coma referència i considerat com a real. Aquesta hipòtesis es veu reafirmada pel fet experimental que a partir d'aquest pH, aquest ja no influeix en la mesura del color.

Principalment en els experiments que es presentaran en els següents capítols el pH de partida dels lleixius negres era de 4.5, i s'alcalinitza fins 5-6, i en els processos en continu fins 7-8. Per tant, vam considerar interessant intentar establir algun tipus de correcció de la mesura del color i dels compostos aromàtics amb el pH per poder avaluar la variació d'aquest paràmetre durant el procés de degradació ja que malauradament es van fer les mesures filtrant

abans d'afegir el tampó. A continuació presentem el mètode de càlcul de la correcció del color amb el pH; el mètode de la correcció dels compostos aromàtics amb el pH és totalment anàleg, a excepció que es partiria de l'equació 1, enlloc de l'equació 2, i com ja s'ha explicat, s'agafa com a valor real de l'absorbància d'una mostra de lleixius negres sense tractar el valor obtingut de l'equació 1 a pH 12; així doncs, a partir d'aquest pH no tindria sentit aplicar la correcció pels compostos aromàtics.

Procés de càlcul per la correcció del color en funció del pH

Hem determinat que en mesurar el color d'una mostra de lleixius negres amb el mètode utilitzat és comet un error que el podem quantificar per cada pH. Aquest error el podem expressar com a percentatge de l'absorbància mesurada, i aplicar aquest percentatge a noves mesures de les quals desconeixem el valor real.

El mètode de càlcul seria el següent:

* Per una mostra de lleixius negres aliment concreta hem arribat a la conclusió que la seva absorbància era de 0.23704.

* Hem establert una relació entre l'absorbància mesurada i el pH de la mostra

Equació 2:

$$A_{480}(\text{pH}) = -0.00564 + 0.03743 \text{ pH}$$

Expressió vàlida per $\text{pH} < 6.15$

* Definim l'error com la distància que hi ha entre l'absorbància real i l'absorbància predita per la correlació anterior (eq. 2) per cada pH, i calculem el percentatge d'aquest error, que l'anomenem E, referit a l'absorbància calculada $A_{480}(\text{pH})$ per l'equació 2.

* L'absorbància corregida amb el pH serà:

Equació 3:

$$A_c = \text{Absorbància}_{\text{corregida}} = A_{\text{mesurada}} + A_{\text{mesurada}} \cdot E$$

Expressió vàlida per $\text{pH} < 6.15$

* El color corregit amb el pH serà igual a l'absorbància corregida (A_c) multiplicada per les dilucions realitzades per mesurar aquesta absorbància, és a dir,

Equació 4:

$$\text{Color}_{\text{corregit amb el pH}} = \text{Absorbància}_{\text{corregida}} \cdot 21$$

Expressió vàlida per pH < 6.15

* De forma anàloga la reducció del color corregit amb el pH seguirà la següent expressió

Equació 5:

$$\% \text{ reducció del color}_{\text{corregit amb el pH}} = \frac{(\text{color inicial}_{\text{corregit amb el pH}} - \text{color}_{\text{corregit amb el pH}})}{\text{color inicial}_{\text{corregit amb el pH}}} \cdot 100$$

Expressió vàlida per pH < 6.15

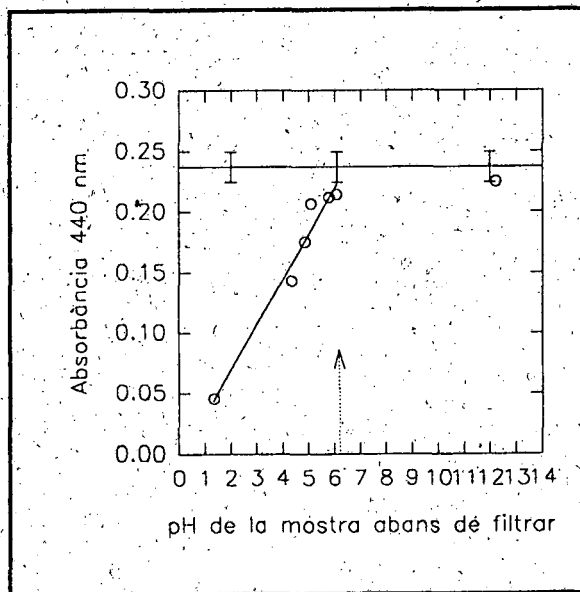
Ara bé, l'expressió del color corregit amb el pH (eq. 4) només és estrictament vàlida per mostres de lleixius negres sense tractar. Igual succeeix per l'expressió (eq. 5) dels compostos aromàtics corregits. Extendre la seva validesa a les mostres de lleixius negres tractades suposa acceptar que l'atac que es produeix durant el tractament als lleixius negres, i en especial a la lignina, afecta a tots els compostos per igual i en el mateix percentatge. És a dir, equival a suposar que totes les molècules causants del color i els compostos aromàtics en els lleixius negres són atacades per igual, i aquest atac té uns efectes equivalents entre si en la mesura del color i dels compostos aromàtics.

Per tant, en els experiments que presentarem en els propers capítols podrem comparar el color i els compostos aromàtics entre:

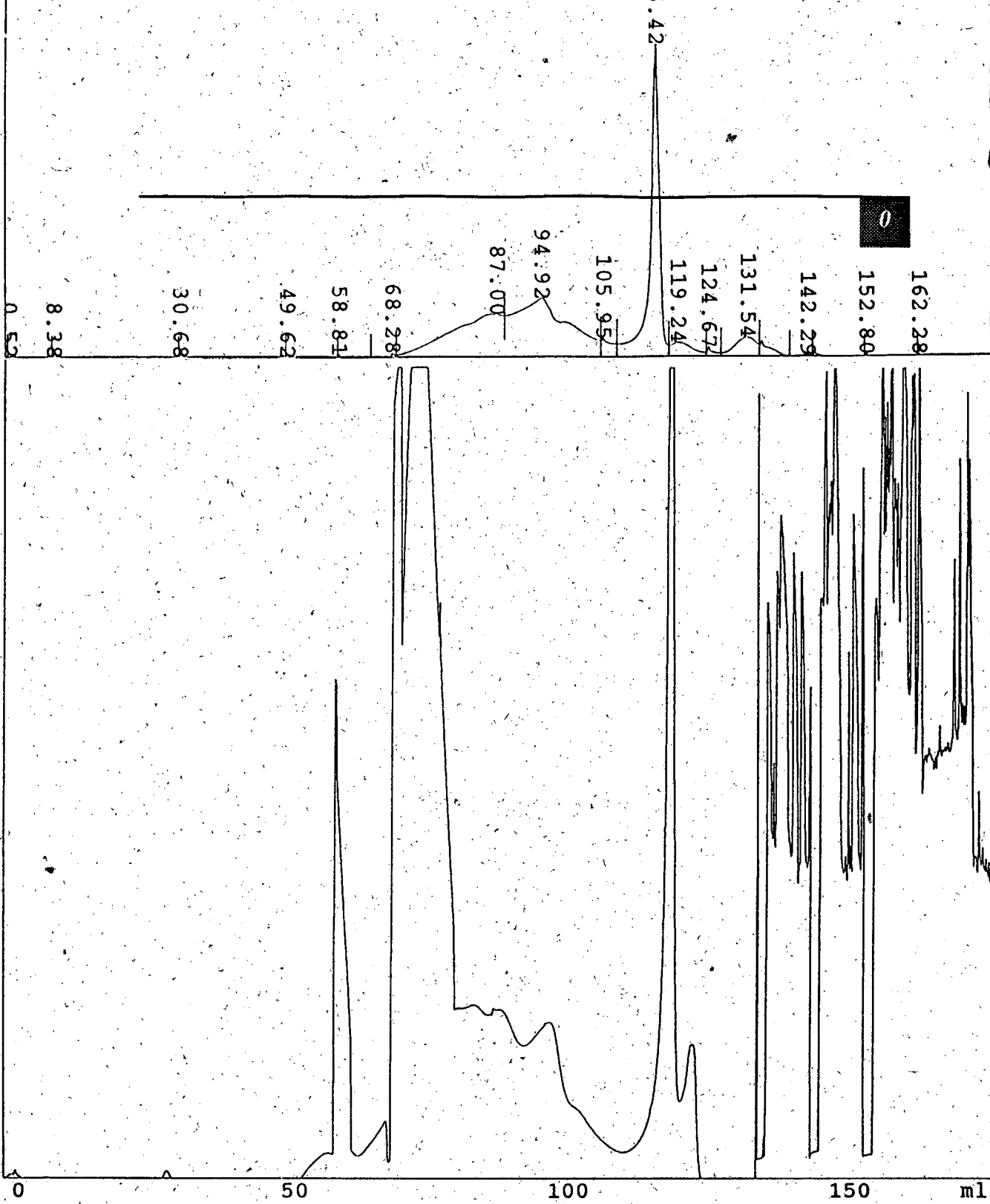
* les mostres inicials de lleixius negres, en les que podem corregir el valor mesurat del color i dels compostos aromàtics en funció del pH;

* les mostres finals o intermitges que tinguin un pH superior a 6.15 que no necessiten correcció pel pH en el color i de pH superior a 6 pels compostos aromàtics.

D'altra banda, malgrat que la correcció del color i dels compostos aromàtics calculada tingui una aplicació estricta molt limitada, som conscients -perquè ho hem observat, i ho hem comprovat experimentalment amb una mostra inicial- de la gran influència que el pH en la zona àcida té sobre el color i els compostos aromàtics. És per això, que en alguns casos especificarem que estem donant valors del color i els compostos aromàtics amb la correcció del pH, només com un intent d'apropar-nos al màxim a la realitat, per tal de donar una interpretació física al color i els compostos aromàtics calculats.



Gràfica 0.4a: Recta de regressió de la variació de l'absorbància del color amb el pH de l'aliment, vàlida per pH àcid



Figures 0.1, 0.2 i 0.3. Cromatogrames de la mostra inicial de lleixius negres a diferents pH: 3.88, 4.7 i 12.9. Obtinguts en la columna Superdex 200, a partir d'eluir una mostra de 500 μ l en formamida al 20%.

Totes aquestes correccions no serien necessàries si introduïssim una modificació en els mètodes de mesura del color i dels compostos aromàtics utilitzats en el present treball: filtrar la mostra o centrifugar-la després d'haver-la mesclat amb el tampó tetraborat. Aquesta ha estat una deducció a la que s'ha arribat quan el treball d'aquesta tesis ja s'estava finalitzant i per això, no s'ha pogut aplicar en aquest treball. Som conscients de les limitacions que això comporta i, per tant, ens fixarem més en les tendències de l'evolució del color i dels compostos aromàtics que en els valors absoluts.

Si ens fixem en la bibliografia sobre aigües residuals de paperera no es dona importància a aquest tema. Bergbauer i col. (Bergbauer, ... Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. 1991. *Appl. and Microbiol. Biotechnol.*, vol 35:105-109) que treballaven en el tractament d'una aigua de blanqueig procedent d'una indústria del paper en realitzar la mesura del color ajustaven el pH de la mostra a 7.6 amb sosa, però no acabaven d'especificar si la mostra era filtrada i si ho feien quan. Aquests mateixos investigadors utilitzaven també l'absorbància a 280 nm com un dels mètodes per determinar els compostos aromàtics, però en aquest cas no explicaven si ajustaven el pH de la mostra.

En l'article de Roger i col. (Roger, G. i col... Continuous decolorization of bleached kraft effluents by *Coriolus versicolor* in the form of pellets. 1991. *Journal of Industrial Microbiology*, 7: 269-278) també treballant en un efluent amb derivats del clor procedent de la fabricació de paper plantejava una correcció del pH per mesurar el color i proposava un relació entre l'absorbància a pH 7.6 i l'absorbància mesurada a pH inicial de la mostra. En el seu mètode per mesurar el color, primer filtra la solució a través d'un filtre de membrana Milipore (0.8 µm), mesura el pH i l'absorbància del filtrat a 465 nm; i després calcula l'absorbància a pH 7.6 a partir de la seva correlació trobada empíricament.

El mètode que proposem per la mesura del color i dels compostos aromàtics és el següent: prendre una mostra significativa d'aquests lleixius negres; diluir-la amb tampó tetraborat; la solució resultant hauria de ser filtrada; a la solució filtrada li mesurariem l'absorbància a 440 nm i 280 nm per calcular el color i els compostos aromàtics respectivament; al valor mesurat de l'absorbància aplicariem el factor de dilució, i ja obtindriem el valor final del color a pH 9.2 i dels compostos aromàtics a pH 9.2.

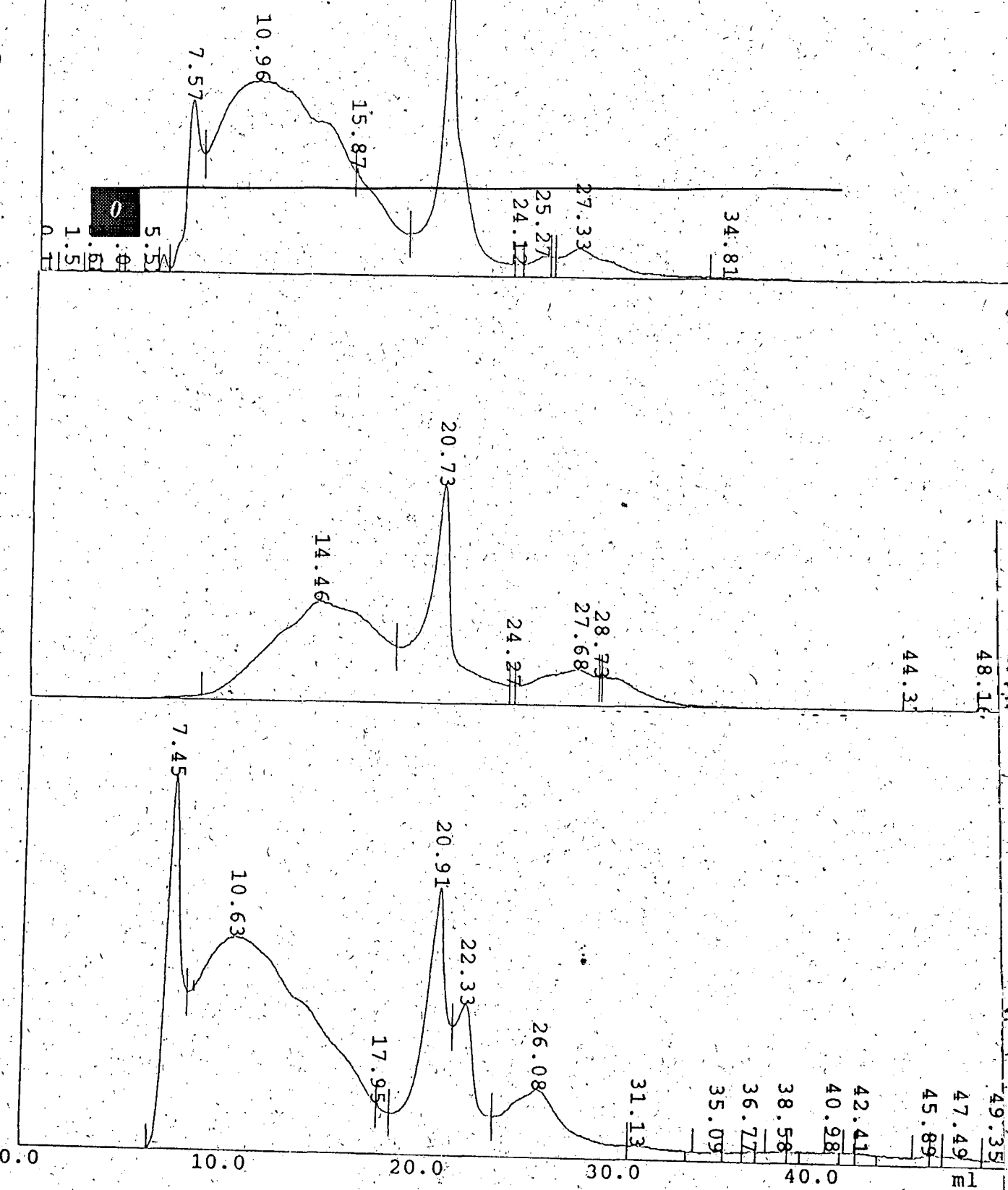


Figura 0.5. Medi inicial no esterilitzat a pH 4.5. Figura 0.6: Medi inicial esterilitzat a pH àcid. Figura 0.8. Medi inicial esterilitzat a pH bàsic. Cromatogrames de la mostra inicial obtinguts en la columna Superdex 30, a partir d'eluir una mostra de 50 il en formamida al 20%.

1

**Pretractament
de destoxicació
de lleixius negres
procedents de la pasta
de cànem amb fongs
«white rot»**

Pretractament de destoxificació de llexius negres procedents de la pasta de cànem amb fongs white-rot.

Aquest capítol se centrarà en les condicions òptimes de temperatura de tractament i concentracions de carboni i nitrogen afegides inicialment al medi de *Phanerochaete chrysosporium* per reduir el color, la demanda química d'oxigen, els components aromàtics i la toxicitat dels llexius negres procedents de la indústria de la pasta de paper.

Aquest estudi es realitzà a petita escala amb Erlenmeyer de 500 ml de capacitat i amb 50 ml de medi. En la figura 1.1 es pot seguir l'organització de l'estudi que va constar de 4 fases: a) efecte de la temperatura, b) efecte de l'agitació, c) efecte de l'addició de tensoactius en el medi com el Tween i d) condicions de glucosa i nitrogen.

Els resultats demosten que el tractament amb aquest fong és adequat per destoxificar aquests tipus d'efluent i podria esdevenir un pretractament abans de ser utilitzat amb altres processos biològics. (Font i col. 1993. Environmental Technology. 1983).

Mots clau: *Phanerochaete chrysosporium*, test de toxicitat, distribució de tamanys moleculars, degradació de la lignina.

Introducció

La lignina és un biopolímer complex, aromàtic i heterogeni, el qual dóna a la fusta estructura i la protegeix dels atacs microbians. Hi ha un petit nombre de microorganismes amb capacitat per degradar la lignina (Field, 1993); en la natura els fongs white rot, la majoria Basidiomicets i alguns Ascomicets, són els més efectius.

Els llexius negres són aigües residuals altament concentrades descarregades durant la producció de pasta de paper química. Aquests llexius són de color marró fosc, amb un alt pH, i estan principalment compostats de materials orgànics, tals com la lignina i altres components fenòlics. Els polímers derivats de la lignina tenen propietats tòxiques (Sierra, 1991).

La biodegradabilitat anaeròbia dels llexius negres és baixa, de l'ordre del 45-65 % de la DQO. Aquesta baixa biodegradabilitat és atribuïda a la presència de lignina i derivats de la lignina en aquestes aigües (10). Els fongs degradadors de la fusta white rot semblen ser els més prometedors microorganismes per la destoxificació d'aquests efluents els compostos fenòlics de baix pes molecular, mentre s'incrementa la biodegradabilitat a causa del fraccionament dels compostos d'alt pes molecular.

Des de 1970 diversos estudis han demostrat que els efluents de la indústria de la pasta del paper poden ser decoloritzats per cultius de fongs white rot. La majoria dels treballs han estat realitzats amb el *Phanerochaete chrysosporium* (11,12) i més darrerament s'han utilitzat altres fongs white rot com *Trametes versicolor* (13, 14), *Stagonospora gigaspora* (15), *Pleurotus ostreatus* (16) i la *Berjkandela*.

Malgrat que la lignina és una font potencial de carboni important, el *Phanerochaete chrysosporium* és un microorganisme que necessita una font de carboni pel seu creixement. Kirk i Farrell (1987) plantegen que l'atac del *Phanerochaete chrysosporium* a la fusta tindria dues fases: primer es degradarien els polisacàrids que permeten l'accés a la glucosa, i, després, en condicions de limitació, durant el metabolisme secundari es degradaria la lignina. Al mateix temps, els sucres són necessaris per la producció del peròxid d'hidrogen.

A partir d'estudis realitzats a escala de laboratori, Jeffries explica que per cada mg de biomassa de *Phanerochaete chrysosporium* es requereixen 2.2 mg de carbohidrats, 54 ug de nitrogen i 0.5 ug de sulfur. La relació C:N pel creixement

és de 40.7 g de glucosa per gr de nitrogen. Per tant, si utilitzem com a font de carboni la glucosa, i com a font de nitrogen el clorur d'amoni, la relació es convertirà en 10.7 gr de glucosa per gr de clorur d'amoni; és a dir, la relació C:N pel creixement serà de 3.17 M (mols de glucosa/mols NH_4Cl).

D'altra banda, la limitació de nitrogen és un dels factors que determinen el metabolisme secundari, per tant, serà important conèixer en tot moment en quines condicions de limitació dels nutrients ens trobem.

Així doncs, si estem treballant a unes condicions inicials de 2.5 g/l de glucosa (13.5 mM de glucosa) i 550 ppm de nitrogen amoniacal (34.5 mM de NH_4Cl), estem limitats per la glucosa. I si les condicions inicials fossin de 5 g/l de glucosa (27 mM de glucosa) per 75 ppm de nitrogen amoniacal (5.34 mM de NH_4Cl), estem limitats pel nitrogen. També estem limitats pel nitrogen si partim de 10 g/l de glucosa (54 mM de glucosa) i 75 ppm de nitrogen amoniacal (5.34 mM NH_4Cl).

També estudis realitzats a escala laboratori demostren que la biodegradació de la lignina pel *Phanerochaete chrysosporium* està fortament influenciada pel pH. L'òptim de la biodegradació de la lignina s'assoleix a pH 5.5 i decreix fortament a pH inferior a 3.5. La màxima activitat ligninolítica, s'ha observat per cultius que s'iniciaren a pH del medi tamponat a 4.5.

L'efecte de l'agitació en els cultius de *Phanerochaete chrysosporium* també ha estat àmpliament estudiat: l'agitació suposa una forta repressió de la mineralització de la lignina en atmosfera d'aire; en atmosfera d'oxigen no es detecta activitat ligninolítica quan hi ha agitació. Ara bé, l'addició de diversos tensoactius, com el Tween 80, el Tween 20 permet produir LiP en cultius agitats de *Phanerochaete chrysosporium*. Aquests detergents impediria la formació de grans agregats de miceli que altrament dificulten la transferència de matèria. Una altra explicació aportada per Venkatachi sobre l'efecte d'aquests tensoactius es basaria en la interpretació que la pèrdua d'activitat en els cultius agitats es deuria a una inhibició mecànica dels enzims, i, per tant, els detergents

enllaçarien els seus monòmers al voltant de la proteïna evitant així la desnaturalització mecànica.

Els experiments presentats en aquest capítol corresponent als experiments inicials de tot el treball presentat en aquesta memòria, i representaven una primera presa de contacte amb el fong Ph ch. Es pretenia trobar unes condicions de temperatura, nutrients, additius en el medi, per aplicar posteriorment en el tractament dels lleixius negres amb el fong immobilitzat (capítol 2). Aquestes condicions no havien de ser definitives en tots els casos, però sí que haurien de marcar cap a on dirigir els esforços dels següents experiments, sense perdre de vista que l'objectiu final era aconseguir un tractament dels lleixius negres per tal de destoxificar-los en continu.

Materials i mètodes

Microorganisme i condicions de cultiu: es va treballar amb dues soques de *Phanerochaete chrysosporium*: Ph ch 24725 ATCC i Ph ch ATCC 32629. Havien estat mantingudes a 23°C en plaques de Petri en medi d'agar amb 2% d'extracte de malta i resembrades periòdiques.

Producció d'espores: els cultius de *Phanerochaete chrysosporium* creixien durant dues setmanes en medi d'agar malta a 23°C en Erlenmeyer. La solució d'espores es preparava afegint aigua destil·lada esterilitzada i tres boles de vidre en l'Erlenmeyer, el qual era agitat per extraure'n les espores de l'agar, i posteriorment filtrat a través de cotó per eliminar-ne les partícules de fong i agar.

El recompte d'espores consistia en un recompte visual-manual al microscopi òptic per mitjà de l'enreixat de recompte. S'utilitzava com enreixat de recompte un porta Bürke de la casa Brand, el qual tenia marcat un engrallat de cel·les de volum perfectament conegut. Comptàvem les espores que hi havia en cada requadre interior delimitat per una banda de ratlles als costats de dos o tres línies, que responia a $4e^{-9}l$, és a dir, el costat del quadrat feia 0.2 mm, i tenia 0.1

mm de profunditat. Es prenia sempre el mateix volum de mostra, una gota de la punta de les micropipetes de 100 μ l, i es dipositava sobre el porta. Es recubria amb un cubre especial de forma que la pressió fos sempre la mateixa, i es realitzava el recompte amb l'ajuda del microscopi òptic a 20 augments. Es comptaven les espores de 24 quadrats i es feia la mitjana. Anteriorment s'havien practicat les dilucions adequades perquè el nombre d'espores per quadrat fos l'adequat entre 10 i 20.

Producció de l'inòcul: s'utilitzaren dos tipus diferents d'inòcul: a) solució d'espores i b) suspensió de miceli.

a) La solució d'espores, preparada segons s'ha descrit, de concentració coneguda era inoculada en cada Erlenmeyer fins obtenir una concentració final d'espores en l'Erlenmeyer de 6.8×10^9 espores de *Phanerochaete chrysosporium* per litre de medi de lleixius negres.

b) També es va utilitzar com inòcul una suspensió de miceli del Ph ch obtinguda a partir de la inoculació d'espores en un medi ric de carboni i nitrogen, tal com es descriu a continuació: un matràs de 1 l amb 350 ml de medi sense aigua residual, amb 10 g/l de glucosa i 500 ppm de nitrogen amoniacal, era inoculat amb espores de Ph ch fins obtenir una concentració de 6.8×10^9 espores/litre de medi. Aquest medi era incubat a 37 °C durant sis dies amb una agitació de 100 rpm. El fong que hi havia crescut s'escorria, es pesava, i servia d'inòcul per posteriors experiments.

Efluent: L'efluent descrit en el capítol 0 no contenia suficient font de carboni i nitrogen assimilable per permetre el creixement, per tant, era necessari afegir una font de carboni i nitrogen addicional. Es va utilitzar glucosa a diferents concentracions finals i NH_4Cl per obtenir una concentració final de nitrogen de 550 ppm. Una alíquota de 1.05 ml d'un medi (18) amb micro i macronutrients i 5 ml del tampó 2,2-dimetilsuccinat eren afegits a 40 ml de lleixius negres diluïts. La solució era acidificada fins pH 4.5 i s'afegia aigua destil·lada fins un volum de 50 ml; després s'esterelitzava a 120°C durant 20 minuts.

Mètodes analítics: Les concentracions de biomassa i DQO van ser determinat d'acord amb els mètodes proposats pel Standard Methods (17). El nitrogen amoniacal es mesurava amb un electrode selectiu per nitrogen amoniacal de l'empresa Orion.

El color, els compostos aromàtics i la toxicitat van ser mesurats com s'ha descrit prèviament en el capítol 0.

La glucosa de la mostra va ser mesurada per mitjà de l'analitzador de glucosa YSI model 2000, de la Yellow Springs Instruments CO., Inc. Aquest aparell podia realitzar una mesura en menys d'un minut de temps real, i treballava en el rang de glucosa de 0 - 20 g/l; la seva precisió segons especificacions del fabricant era de +- 2% o 0.04 g/l. L'anàlisi es basava en la reacció enzimàtica d'oxidació de la glucosa a peròxid per mitjà de la glucosa oxidasa immobilitzada en la membrana; i la posterior reducció del peròxid en l'ànode de platí. La glucosa es mesurava de les mostres després d'estar filtrades; es feia al mateix moment d'esser extretes del medi o, altrament, es congelava la mostra fins que se li mesurés la glucosa.

La distribució de tamanyes moleculars va ser estudiada per cromatografia de gel filtració, utilitzant el sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatografia) de Pharmacia LKB, equipat amb el FPLC Manager, una columna Superdex 75 HR 10/30 i un detector UV (280 nm); 50 ul de mostra (filtrada amb un filtre Millipore de 0.2 u) eren eluides amb una solució de 750 mM NaCl, pH 7.2, que contenia 10 % (v/v) de metanol (15), a un cabal de 0.7 ml per minut.

Per tal de tenir en compte l'efecte de la temperatura i l'agitació amb el temps en l'aigua residual, i els possibles canvis causat per l'evaporació del medi, les reduccions de DQO, color i components aromàtics es calcularen respecte a un control a idèntiques condicions però sense inocular, com segueix:

Reducció (%): $(C-S)/Ci \cdot 100$

on:

C: mostra del control no inoculat al temps t

S: mostra inoculada al temps t.

Ci: mostra inicial del control no inoculat.

Mostres i control es feien per duplicat.

Resultats i discussió

Amb l'objectiu de decidir les millors condicions d'operació el Ph ch era incubat durant sis dies, en un Erlenmeyer de 500 ml amb 50 ml de lleixius negres diluïts, utilitzant diferents condicions de temperatura, agitació i concentració inicial de font de carboni.

Temperatura i agitació

S'estudià en primer lloc quina era la temperatura que afavoria la decolorització i destoxificació dels lleixius negres pel Phanerochaete. Es realitzà l'estudi a dues temperatures diferents: 23°C perquè corresponia aproximadament a la temperatura ambient del laboratori i era una temperatura referenciada en alguns treballs per altres fongs whit rot, i 37°C perquè era la més referenciada en la bibliografia.

Les concentracions de nutrients a les que es dugueren a terme els experiments foren les següents: 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de N inicials.

Al mateix temps s'estudià l'efecte de l'agitació, realitzant-se els mateixos experiments abans esmentats a 23°C i 37°C sense agitació (experiment 1.1 i experiment 1.3) i amb agitació (experiment 1.2 i experiment 1.4).

La taula 1.1 presenta els resultats obtinguts als 6 dies (144 hores) de tractament en la reducció de la DQO, la reducció del color, la reducció dels compostos aromàtics, el consum de nitrogen i el pH.

Temperatura	23°C	23°C	37°C	37°C
Agitació	Sense	100 rpm	Sense	100 rpm /
Reducció DQO %	-5.8	16	29.6	30.8
Reducció del color %	4	-25	6.7	11
Reducció dels components aromàtics %	0.2	3.3	3	18.28
Consum de nitrogen en els tres primers dies	69 ppm/3 dies	125.9 ppm N/3 dies	86 ppm N/3 dies	125 ppm N/3 dies
Consum de nitrogen en els 6 primers dies			102 ppm N/6 dies	130 ppm de N/6 dies
pH al tercer dia	4.41	4.43	4.37	4.38
pH al sisè dia			4.75	4.85

Taula 1.1. Valors obtinguts en els experiments 1.1, 1.2, 1.3 i 1.4 amb 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de N inicials, sense Tween en el medi i inòculat a partir d'espores per les variables estudiades als 6 dies i del consum de nitrogen i pH també als 3 dies.

En els erlenmeyer a 37°C als 3 dies ja s'havien consumit 125 ppm de nitrogen. A falta de dades fiables de la glucosa en aquests experiments, podem comprovar que estàvem treballant en condicions de limitació de la font de carboni, a partir de les dades teòriques. Si prenem la relació de glucosa-nitrogen (Jeffries) com a 40.7 per la fase de creixement, podem calcular que pels 125 ppm de N consumits als 3 dies es consumirien 5 g/l de glucosa, i recordem que només partiem de la concentració inicial de 2.5 g/l de glucosa; d'altra banda tres dies després el consum de nitrogen no es veuria augmentat significativament de forma que ha de ser la glucosa el nutrient limitant.

El pH als 3 i 6 dies, en treballar en medi tamponat, va variar molt poc, per això no creiem necessari realitzar la correcció del pH pel color i els compostos aromàtics. Es va trobar que *Phanerochaete chrysosporium* creixent a 37°C s'obtenien reduccions de DQO (30%), de color (11 %) i components aromàtics (18 %) majors que quan creixia a 23°C; a més a més, l'agitació millorava aquests resultats (Fig 2). Es per això que l'estudi de la resta de variables realitzat en els altres apartats es dugué a terme a 37°C i amb agitació.

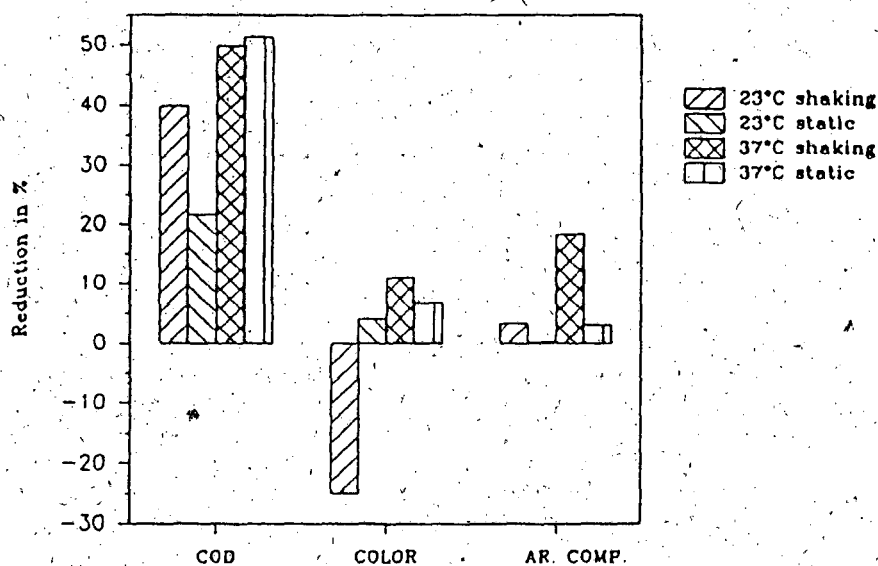


Figure 1.

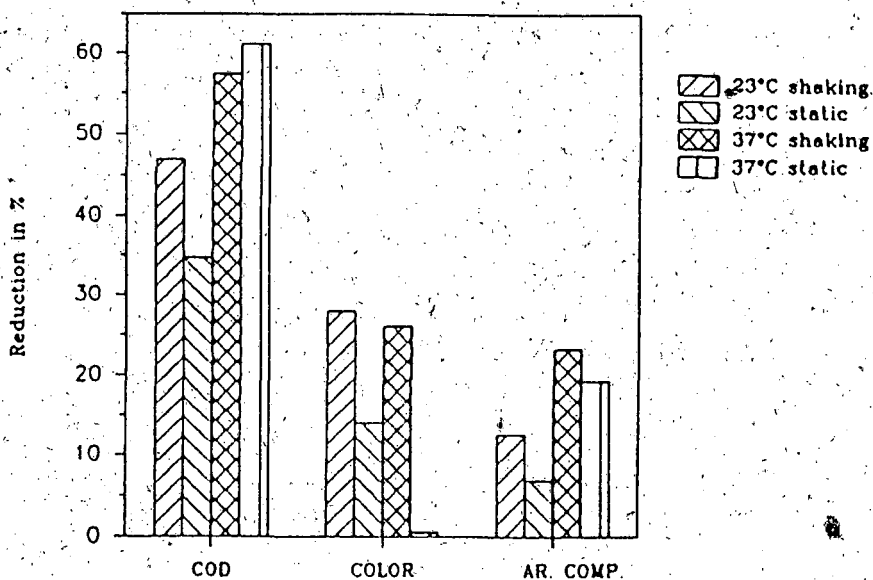


Figura 1.2. Reducció de DQO, color i components aromàtics, a diferents condicions de temperatura i agitació pels experiments 1.1, 1.2, 1.3 i 1.4.

Efecte dels tensoactius

L'estudi de l'efecte que tenia sobre els fongs l'addició de tensoactius en el medi el vam fer amb Tween.

Les condicions inicials en les que es dugué a terme l'experiment -experiment 1.5- amb Tween foren les determinades en l'apartat anterior, afegint el surfactant: 2.5 g/l de glucosa, 550 ppm de N, 37°C amb agitació i 0.5 % de Tween inicial.

En la taula 1.2 presentem els resultats obtinguts als sis dies amb 0.5 % de Tween en el medi. Aquests resultats comparats amb els de la taula 1.1 no ofereixen millores substancials, i, en un principi, per si sols creiem que no justifiquen continuar afegint Tween al medi. En afegir el Tween en el medi inicial milloràvem les reduccions del color, però la resta de paràmetre no experimentaven millores considerables.

Reducció de la DQO	33.8%
Reducció del color	33.01 %
Reducció dels compostos aromàtics	17.3 %
Pes sec	102.6 mg
Pes sec(residu) del blanc	46.8 mg
Consum de glucosa	100 mg
Consum de nitrogen	80 mg
pH	5.25

Taula 1.2. Resultats de l'experiment 1.5 , amb 2.5 g/l de glucosa, 550 ppm de N, 37 °C, agitació, i 0.5 % de Tween en el medi, al sisè dia de tractament. No es realitza cap correcció pel pH, ja que aquest no varia gaire durant els sis primers dies d'experiment.

Nutrient limitant

Com és ben conegut, el sistema ligninolític del *Phanerochaete chrysosporium* és sintetitzat durant el metabolisme secundari (Jeffries, T., i col., 1981, Nutritional Regulation of Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., vol 42, 2:290-296; Bonnarme, P. i col., 1993. Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on lignin peroxidase activity, Journal of Biotechnol, 30:271-282;), per tant, mentre està creixent

la producció de ligninasa està relativament inactiva. L'activitat creix quan s'inicia la limitació d'un dels nutrients. En aquest treball s'han analitzat les limitacions per la font de carboni (glucosa) i la font de nitrogen (clorur d'amoni).

Font de carboni

Per tal de decidir quina era la millor concentració inicial de glucosa, el fong es va incubar a diferents concentracions inicials de font de carboni: 0 g/l, 2.5 g/l i 4 g/l de glucosa, i 500 ppm de nitrogen amoniacal. Tal com es pot veure en la figura 1.3, *Phanerochaete chrysosporium* donava la millor reducció a concentració inicial de 2.5 g glucosa per litre. En tres dies la concentració de glucosa era propera a zero, quan era incubat en condicions de limitació de la glucosa. Possiblement, les concentracions més baixes de glucosa no permetrien un adequat creixement del microorganisme, i, per tant, hi hauria menor producció de ligninasa i les reduccions serien més petites. A concentracions inicials més elevades que 2.5 g/l, el tractament necessita ser allargat per tal d'arribar a les òptimes condicions de limitació per la glucosa.

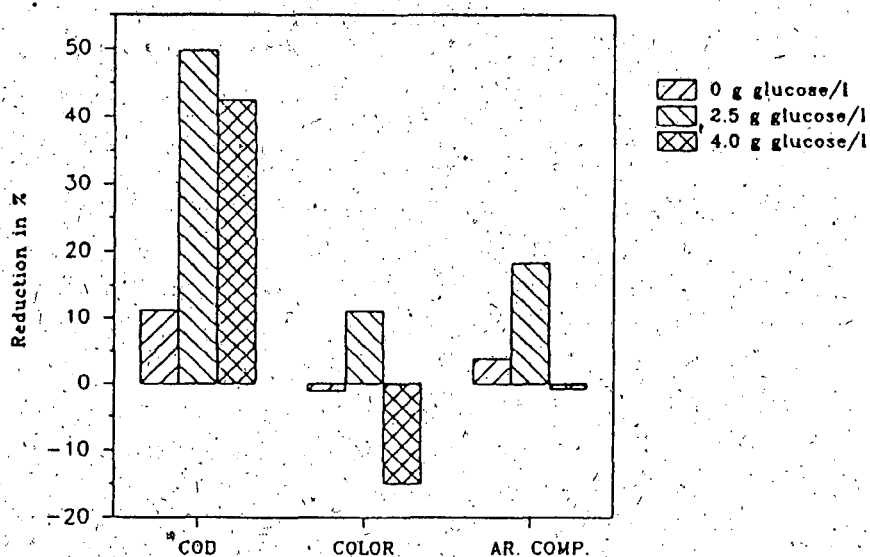


Figure 3.

Figura 1.3 Reduccions de la DQO, color, i compostos aromàtics, a diferents concentracions de glucosa.

Aquests resultat estaven d'acord amb el test de la toxicitat. Ph ch treballant a 37°C amb agitació i concentració inicial de 2.5 g/l de glucosa donava una reducció del 61 % en la toxicitat (Taula 1.3).

	EC ₅₀ control	EC ₅₀ de la mostra al sisè dia	Disminució de la toxicitat
Experiment 1.4	2.4 %	6.1 %	2.5

Taula 1.3 Toxicitat expressada com EC₅₀ (temperatura 15°C, temps d'exposició 15 minuts).

Reducció en la toxicitat, color i components aromàtics combinen amb els canvis en la distribució de tamanys moleculars. L'anàlisi per FPLC del control no inoculat i de la mostra a sis dies de tractament mostraven una significant despolimerització i degradació en els compostos de la lignina de major pes molecular. Ph ch reduïa l'àrea del cromatograma en un 29.2 % (Figura 1.4).

Les reduccions en el color i els components aromàtics es produeixen quan hi ha una despolimerització de les fraccions de major pes molecular. La reducció de la toxicitat es produiria, en haver reduccions en el cromatograma en la part de pesos moleculars inferiors a 3000.

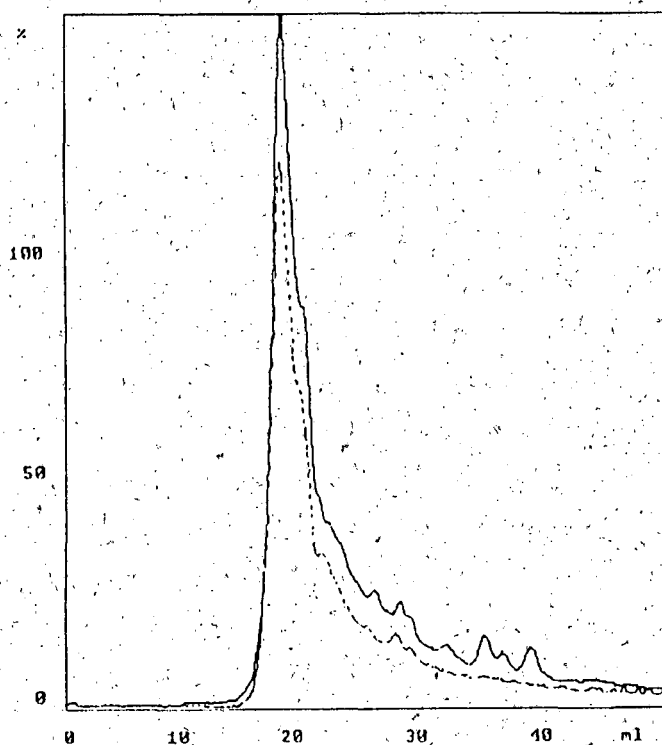


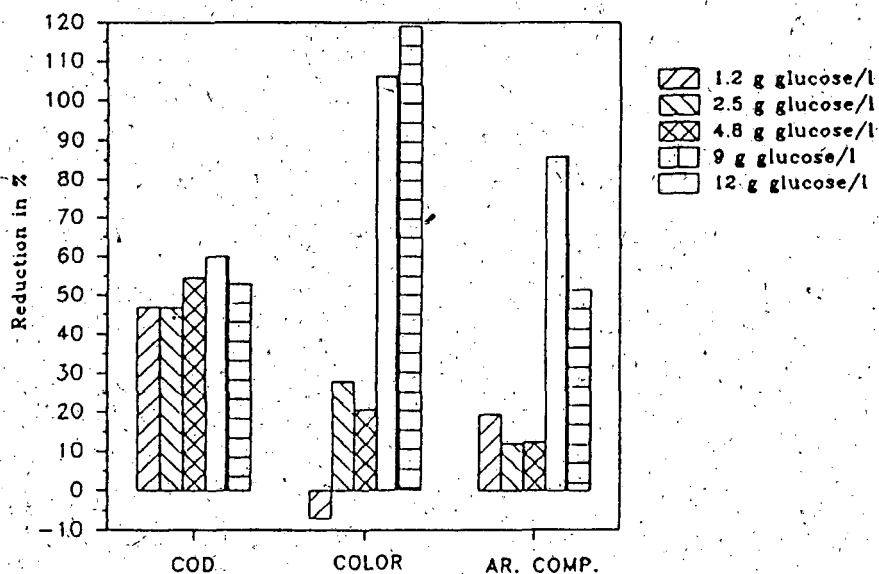
Figura 1.4. FPLC cromatograma del control no inoculat (-) i de la mostra a sis dies de tractament (---).

Donada la importància de la relació carboni/nitrogen, i el treball que posteriorment es realitzaria amb el fong immobilitzat, s'amplià l'estudi d'aquesta relació en uns experiments inoculats a partir de fong crescut en medi ric, enlloc d'inocular directament amb les espores. En aquestes condicions s'estudiaren les següents concentracions de glucosa en g/l: 0, 5, i 10. Per cada concentració inicial de glucosa s'assajaren diferents concentracions inicials de nitrogen- 0, 10, 75, i 550 ppm de N- de forma que es treballà en condicions de: a) baixa concentració de nutrients, b) limitació de la glucosa i c) limitació del nitrogen. La taula 1.4 presenta un resum dels resultats obtinguts en aquests experiments (1.8, 1.9, 1.10, 1.11, 1.12, 1.13, 1.14, 1.15, 1.16, 1.17, 1.18, 1.19, 1.20, 1.21, 1.22, 1.23). Recordem que en aquests experiments l'indòcul eren 3 g de fong humit escorgut per cada 50 ml de lleixius negres.

Fixem-nos que:

- Malgrat estar tamponat el medi, el pH final és sempre superior a 5, excepte en els experiments 1.22 i 1.23 que s'iniciaven amb 10 g/l de glucosa.
- En els experiments 1.20 i 1.21 (5 g/l de glucosa i 550 ppm N inicials) als 4 dies el fong ja havia consumit tota la glucosa, mentre que només havia consumit 163 ppm de N. és a dir, la relació C/N seria 31, per tant, limitats per la glucosa.
- En els experiments 1.18 i 1.19 de 5 g/l de glucosa i 75 ppm de N estem limitats pel nitrogen.
- En les dades del color hi ha una gran influència del pH (com ja s'havia demostrat en l'apartat de caracterització dels lleixius negres).
- Les condicions ambientals inicials de 0 g/l de glucosa i 550 ppm de N -limitació de la glucosa-, 5 g/l de glucosa i 75 ppm de N -limitació del nitrogen- i 10 g/l de glucosa i 0 ppm de N -limitació del nitrogen- comparats en la figura 1.5 donen tots tres resultats força bons i acceptables.

Finalment, si comparem els resultats obtinguts en les condicions de l'apartat e) (fig 1.5) i els obtinguts inoculant directament amb espores (2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de N) de la taula 1.1 veiem que les reduccions són del mateix ordre.



Glucosa g/l	0		0g	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	10	10
Nitrogen ppm	0	0	10	550	550	75	75	10	75	75	75	550	550	550	0	0
Temps(dies)	4	6	4	4	6	7	7	4	7	4	4	7	4	7	4	6
% reducció de la DQO	10.4	-4.2	-0.3	-3.7	19.3	25	18.96	15.7	7.6	7.9	17.6	42	11.2	26	-0.7	-36
% reducció del color	32.3	23.3	7.8	-10.3	12.4	-23	62.1	44.5	6.6	-13.7	0.3	-11	20.9	-17.2	59	38
% reducció del color(amb correcció del pH)	40.7	30.7	52.8	30.35	54.4	26.4	67	50.6	35	27.15	29.35	22.7	48.7	30.4	39.3	12.3
% reducció dels compostos aromàtics	5	-19.2		-0.1		-5.8	-0.5	25.4		2		11		-2.4	15.4	37.4
% reducció del compostos aromàtics(amb correcció pH)	8.3	-14		17.5		11	2.8	28.3		16		22		14	5.8	27.1
Nitrogen ppm			<30	<30	81	87	482	482	3.1	23.3	8	30.1	387	404		
Glucosa g/l			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.99	0.41
pH	5.76	5.89	7.57	8.28	8.12	7.95	5.66	5.95	6.5	7.44	6.45	6.94	6.83	7.97	4.37	4.08

Taula 1.4. Resultats dels experiments 1.8- 1.23. (*) En referir el color al blanc, cal fer la correcció del pH, ja que el pH del blanc resta constant.

2

*Phanerochaete
chrysosporium*
immobilitzat en espuma
de poliuretà i niló en
diferents tipus de
reactors treballant en
discontinu i en continu

Phanerochaete chrysosporium immobilitzat en espuma de poliuretà i niló en diferents tipus de reactors treballant en discontinu i en continu.

Phanerochaete chrysosporium immobilitzat en diferents suports va ser utilitzat per tractar els lleixius negres a 37°C. Aquest capítol es centra en les condicions per dur a terme el tractament en discontinu i en continu en diferents tipus de reactors amb el fong immobilitzat i valorant especialment l'efecte sobre la toxicitat. Prèviament s'assajaren diferents suports d'immobilització. S'analitzà en especial la influència de l'aeració i el seu comportament segons el tipus de bioreactor de tanc agitat, operant en discontinu i en continu, i air-lift i filtre percolador també en continu.

Mots clau: Phanerochaete chrysosporium immobilitzat, air-lift, filtre percolador, toxicitat, degradació de la lignina, FPLC, aigües residuals de la indústria del paper.

Introducció

S'han fet alguns treballs amb Phanerochaete chrysosporium immobilitzat en diferents suports -tubs de silicona (Willerishi, 1992), espuma de poliuretà (Ritter, 1990; Kirkpatrick, 1987), vidre triturat (Jäger, 1990) o cubs de niló (Linko, 1988)- per la producció d'enzims i amb diferents tipus de reactors (Rajagopalan, 1993). La immobilització permet reduir les forces d'estressament, produïdes per l'agitació mecànica, i augmentar la superfície del miceli. A més a més, permet un procés de fàcil aïllament dels enzims i alhora treballar en continu, al mateix temps que reté les cel.lules immobilitzades.

Kirk i col. (1978) van observar que solament un 1% del carboni marcat en una lignina sintètica es mineralitzava a CO₂ en atmosfera del 5% d'oxigen en cultius de Phanerochaete chrysosporium, mentre que quan el creixement del fong es

realitzava en atmosferes del 21 i del 100 % d'oxigen s'obtenia percentatges de mineralització del 47% i 57 % respectivament.

A més a més, Lev i Kirk (1981) assenyalaven que una concentració prèvia d'oxigen durant la fase de creixement determinava l'extensió de l'atac ligninolític. Dosoretz i col. (1991), per medis sintètics també, van establir que a mesura que augmentava la concentració d'oxigen es produïa un augment progressiu de l'activitat de LiP, si bé, també augmentava la velocitat amb la que decreixia; paral·lelament a aquest increment de l'activitat ligninolítica es produiria una disminució de la concentració de polisacàrids i un augment de l'activitat proteolítica en el medi extracel·lular. El primer d'aquests factors suposa una millora en la transferència de l'oxigen, mentre que el segon està directament implicat en el descens de l'estabilitat de la LiP.

També s'ha utilitzat el fong immobilitzat per tractar efluent de la indústria del paper. Dos sistemes per al tractament en continu de compostos organoclorats d'efluent de blanqueig amb el *Phanerochaete chrysosporium* han estat patentats: FPL/NCSU MyCoR (Forest Products Lab/North Carolina State University Mycelial Color Removal) i el MyCoPoR (Mycelial Color removal in porous carrier).

El sistema MyCoR consisteix en un reactor biològic de contacte rotacional (RBC), amb el *Phanerochaete chrysosporium* immobilitzat tal com mostra la figura 2.1. Aquest reactor treballaria en dues etapes (H. Guil, H. Chang, T.W. Joyce.); en la primera que duraria uns quatre dies el miceli del fong quedaria immobilitzat en els discos rotatoris formant una pel·lícula; en la segona etapa es manifestaria l'activitat ligninolítica. Aquest RBC tindria 2l de medi i una superfície total dels discos de 4.59 m², treballaria a 40 °C girant a 1 rpm, i en atmosfera amb alta concentració d'oxigen.

El sistema MyCoPOR consisteix en un filtre percolador (figura 2.2) en el que el fong *Phanerochaete chrysosporium* està immobilitzat en un suport porós, com l'espuma de poliuretà, i en el que se li aplicaria una aeració per la part inferior;

per evitar les pèrdues per evaporació s'acoplaria un condensador en el filtre.

En el treball que es presenta a continuació *Phanerochaete chrysosporium* estava immobilitzat en cubs d'espuma de poliuretà i niló, en un procés en discontinu i en continu, per tal de degradar la lignina present en un efluent de lleixius negres. L'objectiu final d'aquest treball era avaluar la possibilitat de tractar en continu aquest tipus d'efluent amb *Phanerochaete chrysosporium* immobilitzat en unes condicions fàcilment reproduïbles a escala industrial. Es realitzaren uns primers estudis a escala Erlenmeyer per decidir quines havien de ser les condicions inicials, i posteriorment es concentraren els esforços en el tractament dels lleixius negres amb diferents bioreactors: tancs agitats, air-lift i filtre percolador. Durant el treball es descartaren algunes alternatives viables per si mateixes, però que es valorava podien ser de difícil implementació per assolir l'objectiu final o augmentaven el seu cost.

Materials i mètodes

Microorganisme i condicions de cultiu: l'espècie de fong utilitzada en aquest treball va ser *Phanerochaete chrysosporium* (soques 32629 i 24725 de la col·lecció ATCC). Era emmagatzemada en Plaques de Petri amb medi d'agar al 2% de malta a 23°C i resembrada mensualment.

La producció d'espores, i el seu recompte es va fer tal com s'ha descrit en l'apartat de materials i mètodes del capítol primer.

Medi: L'efluent solament no contenia suficient font de carboni i nitrogen assimilable per permetre el creixement, per tant, era necessari afegir una font de carboni i nitrogen addicional. Es va utilitzar glucosa a diferents concentracions finals i NH_4Cl per obtenir una concentració final de nitrogen de 75 i 550 ppm. Una alíquota de 1.05 ml d'un medi amb micro i macronutrients (Kirk, 1978; Jeffries, 1981) eren afegits a 40 ml de lleixius negres diluïts. El pH de la solució era acidificat fins pH 4.5. La toxicitat d'aquest medi, mesurada

com EC50 era sobre el 2%.

Immobilització del *Phanerochaete chrysosporium*: van ser utilitzats com a suport anells de plàstic corrugat de PVC, espuma de poliuretà i niló -3M Scotch Brite- (Linko, 1988).

Els anells de plàstic corrugat tenien un diàmetre intern de 13 mm i una longitud de 17 mm. Les seves principals característiques eren: resistent a l'envelliment, elevada porositat, inert i de fàcil disponibilitat. Se seleccionà perquè anteriorment aquest suport havia estat utilitzat en el tractament anaerobi de diferents efluent i, per tant, ja havia estat estudiat (Bonastre).

El suport en el cas de l'espuma de poliuretà i el niló es preparava de la següent manera: cubs d'un cm d'aresta eren rentats dos o tres vegades amb aigua destil·lada. 45 cubs eren afegits en un Erlenmeyer d'un litre que contenia 600 ml d'aigua destil·lada i eren autoclavats per tal de netejar-los de les seves impureses. Després de refredar, es treia l'aigua de rentat i s'hi afegia el medi líquid, fins a obtenir un volum final després d'inocular de 600 ml. Tots els Erlenmeyers eren autoclavats durant 20 minuts a 15 psi abans d'inocular. Es van realitzar dues formes d'immobilització del *Phanerochaete chrysosporium*: a) immobilització en medi de lleixius negres, inoculat a partir d'espores i, b) immobilització en un medi ric sense lleixius negres, inoculat amb espores.

Cada Erlenmeyer contenint el suport era inoculat amb *Phanerochaete chrysosporium* fins a obtenir una concentració final de $2.5 \cdot 10^5$ espores/ml. En el protocol a) s'utilitzava 600 ml de medi lleixius negres per a immobilitzar les espores en els cubs que eren incubats a 37°C a 100 rpm durant els dies que durés el tractament; i pel protocol b) amb aigua destil·lada (enloc del lleixiu negre) i els cubs eren incubats a 37°C a 90 rpm durant 6 dies abans de la seva utilització per inocular el bioreactor.

Cultius en bioreactor en discontinu: Pels experiments en discontinu amb matràs s'utilitzà Erlenmeyers de 1 l amb 550 ml de medi, i 45 cubs, incubats a

37°C, a una agitació de 100 rpm. Es realitzaren per duplicat, amb un blanc inicial i un blanc de control obtingut al mateix temps de la mostra (els blancs també estaven duplicats). D'aquesta forma l'efecte de l'evaporació quedava reflectit en el blanc puntual, i l'efecte del pH sobre el color i els components aromàtics caldria corregir-lo.

El tractament dels lleixius negres en bioreactors de més capacitat i de tanc agitat es realitzà en un bioreactor Biostat M.

El fermentador Braun model Biostat M estava compost per una unitat bàsica amb un vas de forma cilíndrica de fons pla. Aquest vas tenia un volum útil de 1.5 l i un volum total de 2 l. Portava incorporat els sistemes d'agitació, termostatització, mòdul de mesura i control de pH, control d'espuma, mesura de l'oxigen dissolt, i dues bombes peristàltiques per addicionar l'àcid i l'antiespumant. L'agitació era propulsada per un motor dins la carcassa del fermentador, en la part superior del darrera, i una corretja feia la transmissió a l'eix central. L'agitador era de pales i la capacitat màxima de treball era de 1200 rpm i la mínima estant en funcionament de 100 rpm. L'agitador tenia tres conjunts de quatre pales planes cada un d'altura regulable. El mesurador de temperatura consistia en un termoparell Pt-100, que anava connectat a un mòdul de control PID. L'aire estèril era introduït al medi per mitjà d'un anell difusor i controlat per la vàlvula d'un mesurador de cabal, amb un cabal màxim de 1.6 l/min. L'oxigen dissolt en el medi es mesurava amb un electrode Ingold esterilitzable. La mesura del pH es realitzava amb un electrode Ingold esterilitzable, que utilitzava KCl com electrolit; podia treballar en el rang de pH 2-12, i estava connectat a un mòdul de control PI. El fermentador duia connectat un registrador Spidomax (model 400 de Leeds i Nortthrup) que feia el seguiment de les següents variables: pH i oxigen dissolt en el medi.

Aquest Biostat M anava equipat amb un condensador a la sortida del reactor; en alguns casos se suplementà aquest condensador amb un segon condensador per tal de disminuir al màxim les possibles pèrdues per evaporació. L'agitació mecànica es fixà entre 150 i 300 rpm. 150 cubs amb el fong immobilitzat eren

inoculats en 1.1 l de medi a l'inici de cada experiment.

Cultius en bioreactor en continu: en els cultius en continu s'estudià el tractament dels lleixius negres en un bioreactor de tanc agitat Biostat M, un bioreactor amb agitació per aire Air-lift, i un filtre percolador en les següents condicions: cubs de niló, la concentració inicial de glucosa era de 5 g/l, i la concentració inicial de nitrogen era de 75 ppm.

Les característiques del Biostat M eren les mateixes que l'utilitzat en els processos en discontinu. Se li aplicava una agitació mecànica de 150 rpm. El medi era airejat amb aire, i se li afegia oxigen en els casos que es volia aconseguir més altes concentracions d'oxigen. El tractament en continu dels lleixius negres s'iniciava a les 94 hores després d'haver inoculat i no finalitzava fins després de les 335 hores. L'aliment d'entrada no contenia ni nitrogen ni glucosa addicional. S'utilitzava una mateixa bomba EYELA pel flux d'entrada que pel flux de sortida de lleixius tractats; ara bé, en el bioreactor la sortida estava situada en la part superior del nivell del medi (a una altura fixa), de forma que el volum de medi en el bioreactor restava constant. La figura 2.3 correspon a un tractament en continu amb un reactor de tanc agitat.

El bioreactor air-lift consistia en un fermentador Biostat MD de l'empresa Braun, equipat amb un vas dissenyat per treballar com un air-lift -subministrat per la mateixa empresa- i una unitat de control DCU. El vas air-lift permetia treballar fins un volum de medi de 2 litres. La unitat DCU del Biostat MD permetia mesurar i controlar: la temperatura, el pH, i l'oxigen dissolt en el medi -amb diferents entrades pels gassos-. La figura 2.4 correspon a una fotografia del muntatge experimental de l'air lift treballant en continu.

El filtre percolador utilitzat estava format per un vas o dipòsit cilíndric dissenyat per aquesta finalitat de 20 cm de diàmetre en el que el suport de cubs de niló amb el fong immobilitzat ocupava 10 cm d'altura, i un altre dipòsit de recollida de l'efluent. Tenia un eix central pel qual circulava el corrent de

recirculació que era expulsat per la part superior a través dels forats d'un tub perpendicular. La velocitat que impulsava l'aliment feia girar i gotejar el tub foradat sobre el filtre. En la fotografia de la figura 2.5 podem observar millor aquest filtre percolador. L'aliment era impulsat per una bomba. A més a més, comptàvem amb una bomba peristàltica EYELA MP-3 que subministrava el medi fresc al dipòsit de recollida, i n'extreia la mateixa quantitat quan estava funcionant en continu.

Aquest filtre percolador es diferenciava del sistema MyCoPOR descrit en la introducció en que el nostre filtre percolador no restava tancat. A més, aquest filtre no duia condensador a la sortida dels gasos, i tampoc se li afegia oxigen al fong.

Mètodes analítics: la DQO, el color, els compostos aromàtics, la glucosa i la toxicitat es van determinar tal com s'ha descrit en els capítols 0 i primer.

Resultats.

Suport d'immobilització

Els tres suports utilitzats foren anells de plàstic corrugat, cubs d'espuma de poliuretà, i cubs de niló. Els assatjos es dugueren a terme treballant en discontinu, en un reactor Erlenmeyer de 1 litre i 550 ml de medi ric sense lleixius negres, a 100 rpm d'agitació i 37°C.

Es realitzava un seguiment visual de l'evolució de cada bioreactor. Després dels primers dies d'immobilització els anells de plàstic es descartaren ja que el fong no s'hi quedava ben adherit; el *Phanerochaete chrysosporium* en la seva major part restava dispers en el medi i, sobretot, en la capa més superficial d'aquest medi.

Els cubs d'espuma de poliuretà i els cubs de niló donaren un bon resultat com

a suport. Es podia observar com el fong s'hi adheria i aprofitava els espais interiors del cub per créixer. En realitzar un tall del cub es podia observar com els cubs de niló en tenir els porus dels cubs una mica més grans permetien un millor desenvolupament del fong. Alhora, utilitzant qualsevol d'aquests dos suports el fong no quedava dispers en el medi.

Fou a partir d'aquestes observacions que es concloué que no es continuaria treballant amb el plàstic corrugat com a suport, i que tant l'espuma de poliuretà com el niló podien servir com a suports en la immobilització del *Phanerochaete chrysosporium*.

Estudi de la immobilització.

Donada la poca informació amb la que es comptava s'estudià el mètode d'immobilització del fong en el suport. Els treballs consultats es referien a la producció d'enzim amb el *Phanerochaete chrysosporium* immobilitzat però en medis sintètics; la utilització del fong immobilitzat sobre lleixius negres encara no havia estat estudiada, i només s'havia trobat les patents de RBC Mycopor per al tractament d'efluents de la indústria del paper. Per tant, es dissenyaren dues estratègies per la immobilització del fong: a) el fong s'immobilitzaria en el mateix medi de lleixius negres a partir d'espores; i b) el fong s'immobilitzaria en un medi sense lleixius negres per tal de garantir un òptim creixement i una bona immobilització, després els cubs amb el fong immobilitzat s'utilitzarien per inocular el bioreactor amb els lleixius a tractar. Cadascuna d'aquestes dues metodologies tenia, d'entrada, els seus avantatges i inconvenients. La primera d'elles, immobilització en medi de lleixius negres, podria semblar més idònia i senzilla per un tractament en un reactor de tanc agitat; ara bé, aquests mateixos factors podrien ser inconvenients pel treball amb d'altres tipus de bioreactors com el filtre percolador. Al mateix temps, amb l'opció a) no podíem garantir que la toxicitat dels lleixius negres no hagués afectat la immobilització del fong en la seva primera fase de creixement. Finalment, la segona opció presentava com a principal avantatge que podíem diferenciar clarament la fase

d'immobilització, de l'etapa de tractament, i, per tant, també podiem diferenciar els seus efectes.

Els assatjos d'immobilització es dugueren a terme en un reactor de 1 l Erlenmeyer amb espuma de poliuretà. S'aprofitaren els experiments per estudiar també l'efecte dels tensoactius (Tween) en el medi: 2.5 g/l de glucosa, 550 ppm de nitrogen, 0.5 % Tween, inòcul d'espores sobre medi amb lleixius negres. Alguns investigadors afegeixen algun detergent en el medi per tal d'estimular la producció dels enzims ligninolítics i/o per protegir-los per tal que no s'inactivin; l'efecte del Tween ja s'havia estudiat en el capítol primer, però ara es volia veure l'efecte quant teníem el fong immobilitzat.

La taula 2.1 compara els resultats obtinguts utilitzant el Tween (experiment 2.1) i sense Tween en el medi (experiment 2.2). Si bé d'aquesta taula se'n desprén que treballant amb Tween en el medi es podria assolir una reducció en el color del 100 %, volem significar que aquesta dada pot ser enganyosa: així, si ens fixem en el pH podem veure com en aquest cas el pH del medi s'ha acidificat i, com ja s'ha assenyalat en el capítol de caracterització dels lleixius, aquesta variació del pH provoca grans variacions en el color.

	Tween	Twenn			
Temps (dies)	5	17	6	15	25
%Reducció de la DQO	12	15	25.5	41.4	30.3
% Reducció del color corregit amb el pH	23.68	18	25.28	13.66	0.22
% Reducció dels compostos aromàtics amb correcció del pH		11.77	13.65	2.76	-3.16
Nitrogen ppm	269	339	311.9	363.65	
Glucosa g/l	<1.4		0	0	0
pH	4.48	4.33	5.21	5.92	5.96

Taula 2.1. Resultats dels experiments 2.1 i 2.1.

L'efecte més sorprenent del Tween és en el pH, ja que aquest no varia, i no s'alcalinitza en haver el tensoactiu en el medi. En la resta de variables analitzades el Tween no aporta avantatges substancials. Es per això que vam decidir no continuar addicionant tensoactius en el tractament dels lleixius negres.

Si ens fixem en les dades de la glucosa de la taula 2.1 veurem que la relació C/N està limitada pel carboni. Es a dir, a l'igual com en el tema anterior, amb 2.5 g/l de glucosa el fong consumia uns 200 ppm de N. Efectivament, les dades de la taula 2.1 corroboren aquells resultats: al sisè dia de tractament, en

l'experiment 2.2 que partíem de 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de nitrogen, ja només restava en el medi 300 ppm de nitrogen amoniacal, de forma que s'haven consumit els 2.5 g/l de glucosa i 200 ppm de nitrogen amoniacal.

Per altra banda, de la resta de variables presentades en la taula 2.1 veiem que períodes superiors a partir de sis dies no originen millores notables en el tractament. El futurs experiments es realitzaran als sis dies, ja que es considera que aquest ja representa el suficient temps per desenvolupar-se el fong i començar l'atac ligninolític amb el fong immobilitzat en aquestes condicions.

Per acabar de completar l'estudi de la relació C/N en Erlenmeyer i aplicant els resultats obtinguts anteriorment es dissenyaren els experiemnts 2.3 i 2.4: immobilització prèvia del fong en un medi ric sense lleixius negres, i posterior tractament dels lleixius negres amb el fong immobilitzat en un medi amb 10 g/l de glucosa i 75 ppm de N (experiment 2.3), i 10 g/l glucosa i 550 ppm de N (experiment 2.4), sense tampó en el medi, ajustat a pH 4 i sense esterilitzar els lleixius negres concentrats. En treballar sense tampó en el medi, i esterilitzant només la part de nutrients i micronutrients del medi, ens estàvem acostant a les futures condicions de treball en altres bioreactors. L'estratègia era anar avançant i apropar-nos a les condicions adequades per a un sistema de tractament d'aigües residuals. Donat que encara no havíem determinat unes condicions de relació carboni-nitrogen definitives, perquè no havíem trobat unes diferències significatives que ens fessin decidir per una relació de limitació pel carboni o pel nitrogen, vam seleccionar unes condicions més extremes amb 10 g/l de glucosa.

	Exp. 2.3	Exp 2.3	Exp 2.4	2.4
Glucosa g/l	10	10	10	10
Nitrogen ppm	75	75	550	550
Temps, dies	2	6	2	6
% Reducció de la	22.9	-45	-1	-54
% Reducció del color	17	26	30	22
% Reducció dels compostos aromàtics	19	12		
Nitrogen, ppm	68	0	419	386.8
Glucosa, g/l	8.54	0.41	7.88	1.4
pH	3.9	3.78	3.79	3.67

Taula 2.2. Resultats de l'experiment 2.3, medi limitat pel nitrogen, i l'experiment 2.4, medi ric limitat per la glucosa. No es realitza la correcció del color en funció del pH perquè el pH no augmenta, i perquè excepcionalment el color va ser mesurat abans de filtrar la mostra.

En la taula 2.2 presentem els resultats obtinguts en els experiment 2.3 i 2.4 després de 2 i 6 dies de tractament dels lleixius negres. La millor reducció de compostos aromàtics -de color és semblant en els dos experiments- s'obté en un medi ric limitat per la glucosa. Els valors dels compostos aromàtics als 2 i 6 dies en l'experiment 2.4 no s'han inclòs en la taula 2.2 perquè hi hagueren problemes en la seva mesura.

Els resultats de les taules 2.1 i 2.2 no són directament comparables entre ells. Ara bé, amb aquests resultats que es refereixen a un medi pobre limitat per la glucosa ($C/N = 4.54$), un medi limitat pel nitrogen ($C/N = 133$) i un medi ric limitat per la glucosa ($C/N = 18.18$) podem concloure que no hem determinat cap relació de condicions inicials que permeti descartar la resta en el tractament de

lleixius negres pel *Phanerochaete chrysosporium* immobilitzat. De fet el *Phanerochaete chrysosporium* podria treballar en qualsevol d'aquestes 3 condicions ambientals, obtenint-se bones reduccions del color, dels compostos aromàtics i de la DQO. Les millors condicions previsiblement s'obtidrien si haguéssim partit d'un inòcul en les mateixes condicions amb el medi ric limitat per la glucosa -fet molt normal ja que a més glucosa hi ha més biomassa i més capacitat de producció enzimàtica i radicals lliures-. Si bé no podem concloure quines són les millors condicions, valorem que no compensa treballar a altes concentracions de glucosa en un medi limitat pel nitrogen perquè la millora dels resultats no justificaria l'esforç inicial de les altes concentracions de glucosa.

A partir d'aquest moment centrarem el tractament dels lleixius negres en l'estudi dels bioreactors per dur a terme aquest tractament a partir de dues relacions diferents de carboni-nitrogen: medi limitat pel carboni -2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de nitrogen-, i medi limitat pel nitrogen -5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen-, totes dues amb immobilització del fong en cubs d'espuma de poliuretà i niló en un medi ric, per ser aplicades en bioreactors de més volum, i en el que es controlaran més variables, i es tindrà especial cura de l'efecte de l'aeració.

Tractament en discontinu

Reactor discontinu de tanc agitat

Tal com ja s'ha explicat en l'apartat de materials, l'estudi del tractament dels lleixius negres en un reactor discontinu de tanc agitat amb el fong immobilitzat es realitzà en un bioreactor de 1.5 l Biostat M, a baixa agitació. S'utilitzaren dos suports diferents: espuma de poliuretà i niló. En aquests experiments es comprovà la viabilitat del tractament amb les dues relacions de carboni-nitrogen, amb els dos suports, i s'estudià l'efecte de l'aeració per tal d'aplicar-ho en el següent apartat en el tractament en continu.

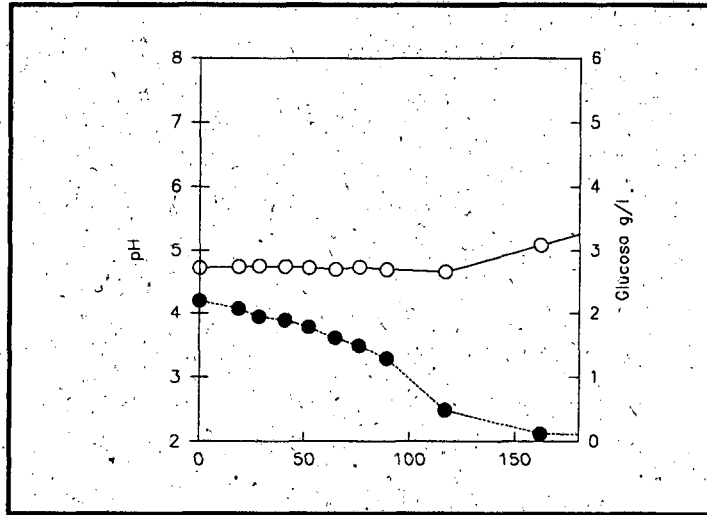
Malgrat que el bioreactor utilitzat duia incorporat un condensador a la sortida dels gasos, a mesura que augmentava l'edat del cultiu, s'observava una pèrdua de volum. Per tal de disminuir aquestes pèrdues per evaporació en algunes fermentacions s'acoplà un segon condensador a la sortida del primer. En cap cas s'aconseguí eliminar aquestes pèrdues de volum. Tampoc comptem amb dades suficients i fiables per tal de poder-lo quantificar. Per tant, els valors de les reduccions del color, compostos aromàtics i DQO -sobretot en aquells casos que hi hagi increments en aquests paràmetres- caldrà considerar-los com indicatius, i en realitat les reduccions sempre hauran estat superiors a les aquí expressades pel fet de no comptabilitzar aquest efecte de concentració del medi.

a) Espuma de poliuretà (exp 21 i 52)

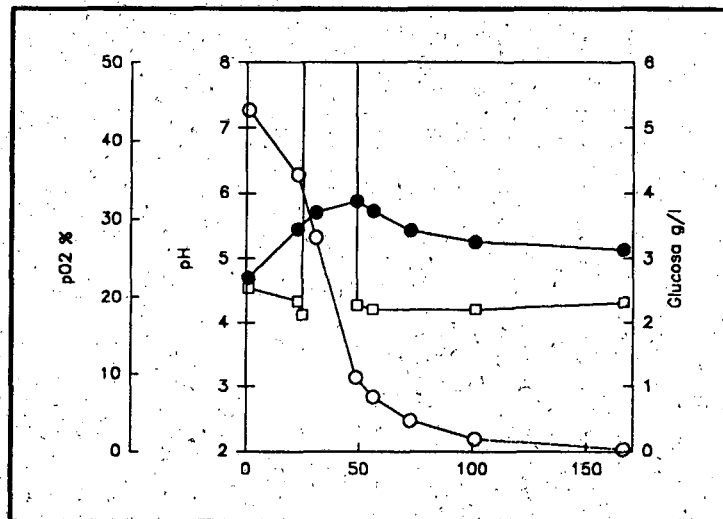
L'experiment 2.5 es realitzà en un fermentador Biostat M de 1.5 litres de capacitat, a baixa agitació, amb el fong immobilitzat en espuma de poliuretà i 2.5 g/l de glucosa i 550 ppm de nitrogen inicials, alimentat solament amb aire. Les variables mesurades foren el pH, l'oxigen dissolt en el medi, la glucosa, el nitrogen, DQO, color, i compostos aromàtics. En la taula 2.3 presentem l'evolució de les variables més significatives, glucosa en el medi, pH, reducció del color amb la correcció del pH, reducció dels components aromàtics i reducció de la DQO, al cinquè i setè dia. Aquest experiment el podem comparar

amb l'experiment 2.6 que es realitzà també en un Biostat M, amb fong immobilitzat en espuma de poliuretà, 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen inicials que se li afegí oxigen pur des de les 25 fins les 49 hores. El bioreactor treballava amb doble condensador a la sortida per minimitzar les pèrdues per evaporació. Es controlaren les mateixes variables i els resultats d'aquest experiment 2.6 es presenten en la taula 2.4 als dos, quatre, i set dies de tractament.

En l'experiment 2.5 estàvem limitats per la glucosa i en el 2.6 la limitació era pel nitrogen. Fixem-nos en la taula 2.4 com abans de les 48 hores de tractament el fong ja havia consumit tot el nitrogen del medi, i encara restava més de 1 g/l de glucosa. Al mateix temps, en l'experiment 2.6 -gràfica 2.1a- el pH resta durant les primeres 100 hores al voltant de 4.7 i després s'alcalinitza, coincidint també amb la manca de glucosa en el medi. En l'experiment 2.6 -gràfica 2.1b-, durant les primeres hores el pH augmenta coincidint també amb la fase de màxim consum de la glucosa. Quan el consum de la glucosa decreix, després d'haver consumit uns 3 g/l, el pH del medi torna a acidificar-se per establir-se a pH aproximadament 5.



Gràfica 2.1a: Experiment 2.5. Evolució del pH i la glucosa



Gràfica 2.1b: Experiment 2.6. evolució del pH, la glucosa i l'oxigen dissolt.

Temps (hores)	Glucosa g/l	pH	Reducció del color, %	Reducció del color corregit el pH, %	Reducció dels compostos aromàtics, %	Reducció la DQO, %
0	2.2	4.72				
116	0.49	4.66	22	21	29	19
162	0	5.08	-28	-18.8	-5	9

Taula 2.3 (experiment 21)

Temps, hores	Glucosa, g/l	pH	Nitrogen, ppm	Reducció del color, %	Red. del color amb correcció del pH, %	Red. dels compostos aromàtics, %	Red. de la DQO, %
0	5.28	4.71	70				
48	1.15	5.88	0	-22		2.1	-9.8
101	0	5.26	0	-17.8		7.2	3.6
166	0	5.14	0	-10.3		6.4	3.39

Taula 2.4 (experiment 52)

b) niló

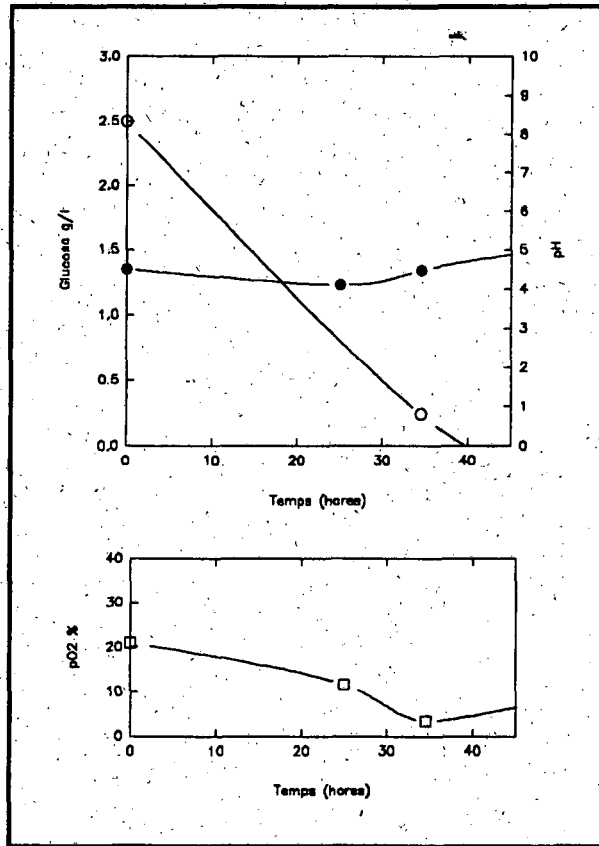
Els experiment 2.7 i 2.10 serviren per comprovar la viabilitat del procés en discontinu utilitzant cubs de niló com a suport d'immobilització en les dues relacions de carboni-nitrogen. A més a més l'experiment 2.10 serví per acabar de posar a punt el mètode de mesura de la toxicitat, tal com s'ha descrit en l'apart de materials i mètodes. Per tant, a partir de l'experiment 2.10 es donarà una gran importància a aquest paràmetre de control, i s'analitzarà de forma sistemàtica en tots els experiments que el segueixen. De fet serà el paràmetre de control que més es seguirà i el paràmetre clau per avaluar el tractament.

Les condicions de l'experiment 2.7 foren les següent: 2.5 g de glucosa/l i 550 ppm de N. I per l'experiment 2.10 (realitzat amb doble condensador a la sortida dels gasos del bioreactor): 5 g de glucosa/l i 75 ppm de nitrogen. En la gràfica 2.2 i 2.3 presentem l'evolució de la glucosa, el pH i l'oxigen dissolt en el medi pels experiments 2.7 i 2.10 respectivament. Com es pot veure en la taula 2.5 i 2.6, els millors resultats van ser obtinguts a concentració inicial de glucosa de 5 g/l i 75 ppm de nitrogen.

L'experiment 2.7 fou aerat solament amb aire. Fixem-nos en la gràfica 2.2 com l'oxigen dissolt en el medi a les 35 hores és aproximadament zero, de forma que estem en la zona de màxim consum, coincidint també quan ja no quedava pràcticament glucosa en el medi. Si comparem el consum de glucosa d'aquest experiment, amb el consum en l'experiment 2.5 realitzat en les mateixes condicions però amb diferent suport, notem que en l'experiment 2.7 aquest consum és inferior, bastant inferior. Encara que no sigui concluent, això ens podria indicar que el diferent comportament no es deu a la limitació de la relació carboni-nitrogen -que en els experiments 2.5 i 2.7 és la mateixa- sinó a un altre factor que de moment encara no hem pogut determinar.

En l'experiment 2.10, un corrent d'oxigen 100% va ser injectat al cultiu durant 24 hores, des de les 25 h fins les 49 hores i després el tractament va continuar amb una barreja d'oxigen i aire; a les 74 hores -taula 2.6- la reducció de DQO

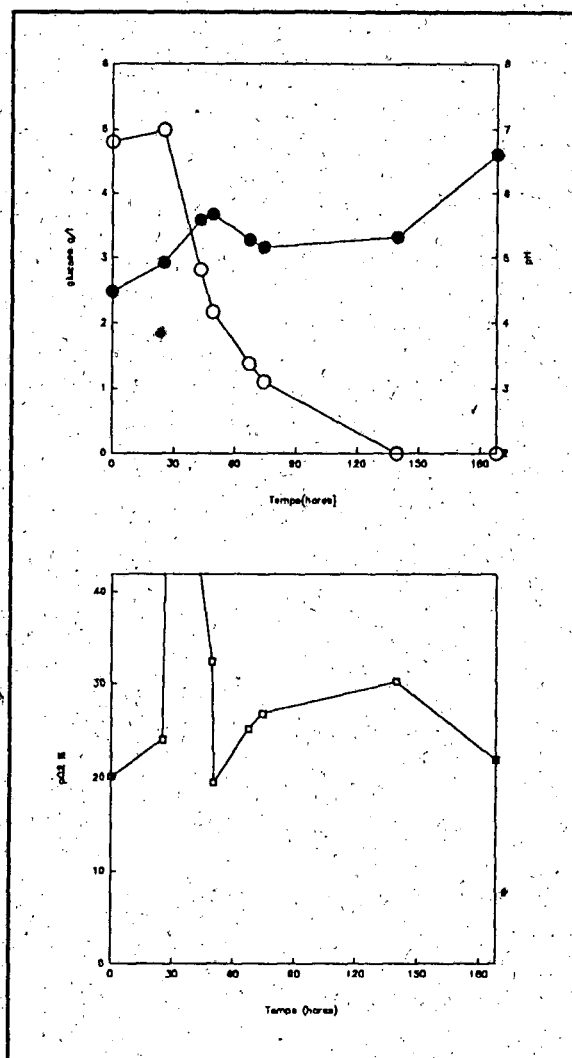
era del 31 %, i hi havia un increment del color (16%). La taula 2.6 mostra el comportament de la reducció de la DQO, el color i els components aromàtics, i la figura 2.3 el pH, la glucosa en el medi i la pO_2 d'aquests experiments. Afegirem l'oxigen per estimular l'activitat enzimàtica, en el moment a partir del qual calculem que ja s'hauria acabat la font de nitrogen. A partir d'aquell moment mantenim amb una barreja d'oxigen i aire la concentració d'oxigen dissolt entre el 20 i el 30 %. Si ens fixem en l'evolució del pH i de la glucosa - gràfica 2.3- hi notem una primera fase de nul consum de glucosa en la que el pH augmenta, seguida per una fase de molt consum de la font de carboni en la que el medi s'acidifica, per finalitzar amb una darrera etapa en la que ja s'hauria consumit més de 3g/l de glucosa i, per tant, la font de nitrogen estaria exhaurida, en la que el pH resta estable tendint a basificar-se quan ja no queda glucosa.



Gràfica 2.2: experiment 2.7,, evolució de la glucosa, el pH • , i l'oxigen dissolt.

Experiment 2.7	% Reducció del color corregit amb el pH	%Reducció dels compostos aromàtics	Reducció de la DQO
25 h	41.31	6	8.66
31.5 h	29.47	11.21	-15.3
48 h	15.36	-9.8	5.16

Taula 2.5. Valors de la reducció del color (corregit amb el pH), la reducció dels compostos aromàtics i la reducció de la DQO, pels experiments 2.7. A les 48 hores les pèrdues de volum per l'evaporació del medi eren del 50 % del volum inicial aproximadament.

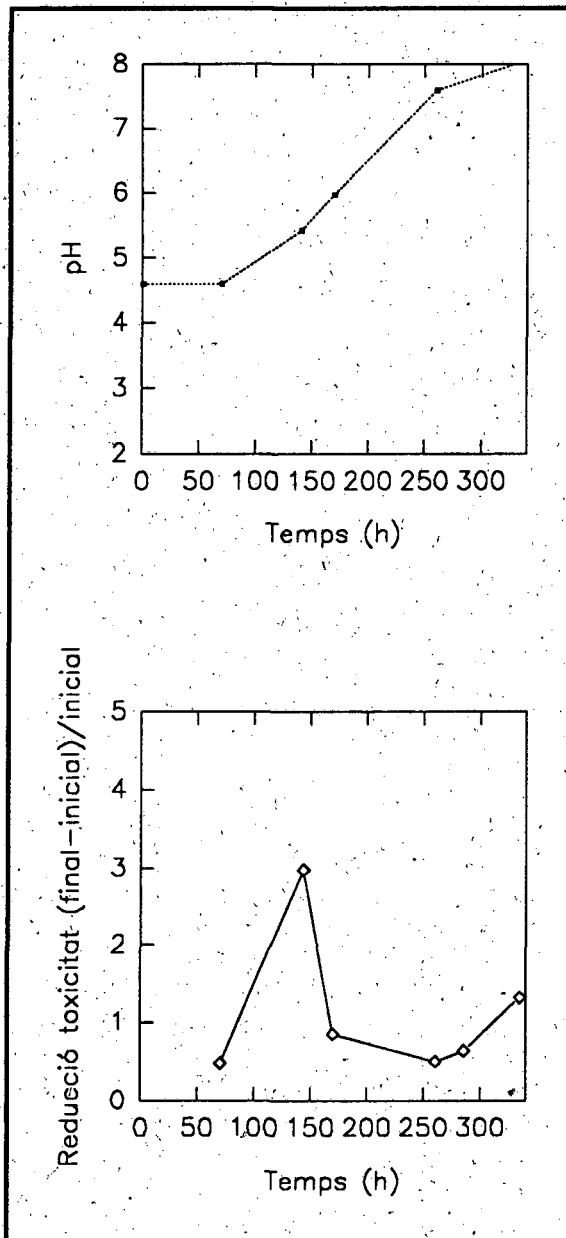


Gràfica 2.3: evolució de la glucosa, el pH i l'oxigen dissolt per l'experiment 2.10

Experiment 2.10	Percentatge de reducció del color corregit amb el pH	Reducció dels compostos aromàtics corregit amb el pH	Reducció de la DQO
0h			
25 h	-28	-2.4	23.04
43 h	-7	-9.3	52.25
49h	-72	-9.14	14
67h	-27	-6.7	21.91
74h	-15.3	-38.12	30.95
139h	-60	0.28	5.29
188 h	-96	-10.9	-31

Taula 2.6. Experiment 2.10. Reducció de la toxicitat a les 74 h era de 3.23 i a les 188 h de 11.54.

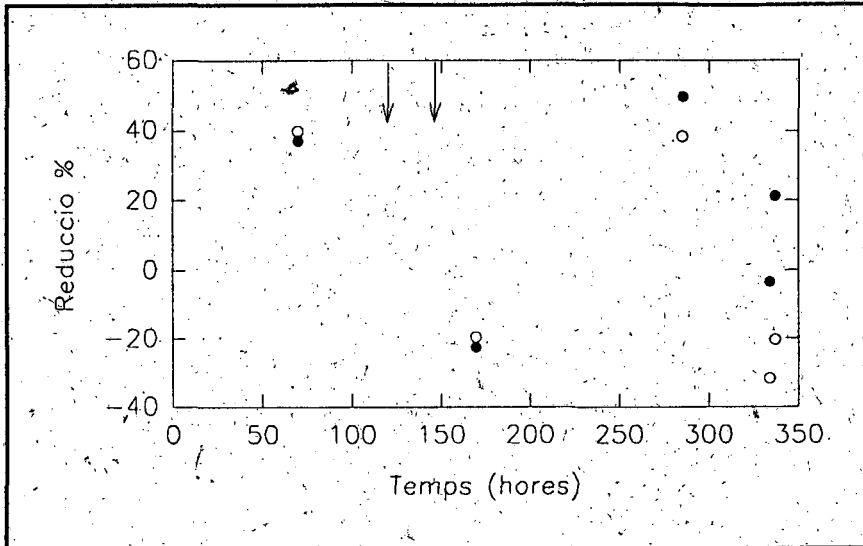
En l'experiment 2.11 el cultiu va ser aerat amb oxigen pur, des de les 21.6 hores fins a les 71 hores, i després, el tractament va continuar amb aire atmosfèric a la mateixa concentració inicial de nutrients que l'experiment 2.10: 5 g de glucosa /l i 75 ppm de N. La gràfica 2.4 presenta l'evolució del pH, la glucosa i l'oxigen dissolt en el medi de l'experiment 2.11. Les figures 2.3 i 2.4 (experiments 2.10 i 2.11) poden ser comparades, i hi podem observar un comportament similar durant les primeres 100 hores. Però quan en l'experiment 2.11, l'oxigen va ser canviat per l'aire, hi hagué una reducció de DQO superior. Al mateix temps, la reducció de la toxicitat és millor amb oxigen que amb aire (veure taula 2.7b). A les 74 hores, la reducció de la toxicitat era similar en els dos experiments (3.23 i 2.58) però és a partir d'aquest punt que s'incrementa perquè també incrementa la pO_2 (experiment 2.10).



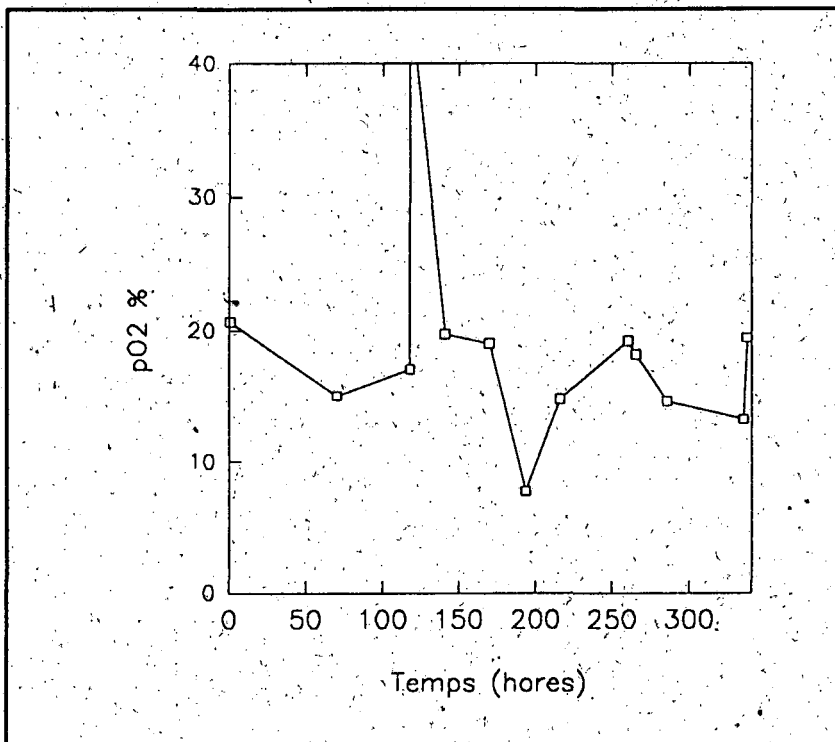
Gràfica 2.5: experiment 2.12, procés en continu.

a) variació del pH

b) evolució de la reducció de la toxicitat.



Gràfica 2.5: experiment 2.12, reduccions de color • i els compostos aromàtics. Les fletxes indiquen els xocs de càrrega.



Gràfica 2.5: experiment 2.12, seguiment de l'oxigen dissolt en el medi.

Experiment 2.11: Temps (hores)	% de reducció del color corregit el pH	% de reducció dels compostos aromàtics corregit amb el pH	% de reducció de la DQO	% reducció de la toxicitat
16.25	-10	-1.8		
21.63	-42.5	-19		
40.25				
71	-16.11	2.89		
119	-29.17	3.34		
147.25	-47.72	11.57		
183.75	-52	2.33		

Taula 2.7a

	Experiment 2.10	Experiment 2.11
Reducció de la toxicitat a les 74 hores	3.23	2.58
Reducció de la toxicitat a les 188 hores en l'experiment 2.10 i 147 hores en l'experiment 2.11	11.54	1.67
% Reducció de toxicitat entre les 74 hores i, les 188 hores i 147 hores.	43 %	-34 %

Taula 2.7b. Reduccions de la toxicitat en els experiments 2.10 i 2.11.

Procés en continu

Per l'estudi dels diferents tipus de bioreactors operant en continu vam partir de les millors condicions -5 g de glucosa/l i 75 ppm de nitrogen- dels anteriors experiments en discontinu i les vam aplicar a un reactor de tanc agitat, un reactor air-lift i un filtre percolador.

- Reactor de tanc agitat

El processos en continu s'iniciaven després de mantenir el cultiu unes hores operant en discontinu. Es partia del mateix medi inicial que en els experiments en discontinu en condicions de limitació del nitrogen, és a dir, 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal. Transcorregut un primer període en el que el fong consumia tot el nitrogen i la glucosa, s'activava l'activitat del fong afegint-li oxigen pur. A continuació s'iniciava el procés en continu; el medi fresc que s'alimentava al cultiu no contenia cap font de carboni ni nitrogen addicionals.

En els experiment 2.12 i 2.13 s'utilitzà un biostat M en les mateixes condicions: 150 rpm d'agitació, 5 g/l de glucosa inicial i 75 ppm de nitrogen amoniacal inicial, pH de partida 4.5, sense tampó en el medi i amb unes gotes d'antiespumant en el medi inicial.

En l'experiment 2.12 se subministrà al sistema durant una hora oxigen, des de les 118 hores fins les 119 hores, i la resta del tractament s'afegia aire; el tractament en continu s'inicià a les 119 hores quan la glucosa en el medi ja havia estat totalment exhaurida. En la taula 2.8 presentem el desenvolupament de l'experiment.

Experiment 2.12

Temps

(hores)

- 0 Inoculem el bioreactor amb el fong *Phanerochaete chrysosporium* 24725 immobilitzat en cubs de niló.
- 5 Acidifiquem el medi, de pH 5.08 fins 4.83 unitats de pH.
- 118 La glucosa en el medi ha estat totalment consumida.
Injectem un flux d'oxigen pur durant 1 hora.
- 119 Iniciem el procés en continu amb un cabal d'entrada de 26.8 ml/h.
Afegim a més a més, 100 ml de medi de lleixius negres en el RCTA per compensar les pèrdues de volum per evaporació.
- 140 Afegim al RCTA 150 ml més de medi de lleixius negres per compensar les pèrdues per evaporació.
- 337 Finalitza el tractament en continu.

Volum total tractat en les 216 hores: 5.78 litres.

Temps de residència: 41 hores.

Taula 2.8. Programació de l'experiment 2.12.

La gràfica 2.5 correspon a l'evolució de les principals variables mesurades: pH, oxigen dissolt en el medi i reducció de la toxicitat per l'experiment 2.12.

En l'experiment 2.12 partíem d'un medi de lleixius negres a pH 4.5. En inocular amb el fong immobilitzat el pH del medi puja fins 5.08 i, per tant, hem d'afegir àcid per retornar-lo a 4.83 unitats. Tal com podem veure en la gràfica 2.5a, el pH no varia fins les 70 hores (aprox.), llavors comença a augmentar de forma lenta però constant. Malgrat afegir a les 119 i a les 150 hores 100 i 150 ml de medi fresc a pH 4.5 en el bioreactor el pH continua la seva tendència a l'alça. D'altra banda, de les mesures realitzades sabem que a les 118 hores -taula 2.8-, tota la glucosa ja havia estat consumida; no tenim mesures de la glucosa a temps anteriors, però podem suposar a partir de l'evolució estudiada en els experiments realitzats en discontinu, que el pH va començar a augmentar en consumir-se tota la glucosa.

El tractament en continu en l'experiment 2.12 s'inicià a les 119 hores. S'alimentava 27 ml/hora de medi fresc de lleixius negres a pH 4.5. El procés durà 5 temps de residència (Un temps de residència equival a 41 hores).

Les reduccions de la toxicitat en l'experiment 2.12 -gràfica 2.5b- són primer molt bones, si bé després del primer temps de residència i fins el quart, són inferiors a 1. Hem de tenir en compte que en aquest interval hem fet dues addicions de medi fresc, a les 119 i 141 hores, per compensar les pèrdues de volum del medi; aquests xocs de càrrega veiem que afecten considerablement l'activitat del microorganisme, i li costa recuperar-se'n. Les reduccions del color i els compostos aromàtics van paral·leles, tenen el mateix comportament, però els seus valors oscil·len molt. La primera oscil·lació està justificada pels dos xocs que ha sofert en sistema en afegir-li el medi fresc a les 119 i 140 hores; però la segona oscil·lació es fa difícil d'interpretar. Puntualment veiem que s'obtenen bones reduccions, però no aconseguim estabilitzar-les, per tant, és possible obtenir bones reduccions amb aquestes condicions i potser caldria disminuir la càrrega.

Per intentar assolir millors reduccions de la toxicitat en tot el tractament, el color i els compostos aromàtics i estabilitzar els valors es plantejà l'experiment 2.13. En aquest experiment 2.13 se subministrava al medi una barreja d'aire i oxigen. El tractament en continu dels lleixius negres s'iniciava a les 102 hores després d'haver inoculat i no finalitzava fins després de les 335 hores. La càrrega orgànica aplicada era de 3.1 g DQO/l; l'aliment d'entrada no contenia ni nitrogen ni glucosa addicional. La taula 2.9 presenta el desenvolupament d'aquest experiment.

Experiment 2.13

**Temps
(hores)**

0 Inoculem el bioreactor amb el fong *Phanerochaete chrysosporium* 32629 immobilitzat en cubs de niló.

Mantenim una concentració mínima d'oxigen dissolt en el medi del 15 %.

5 Acidifiquem el pH fins 4.8

75.75 Glucosa en el medi 0.24 g/l.

95 Afegim 100 ml de medi de lleixius negres al bioreactor per compensar les pèrdues per evaporació.

102 Iniciem el procés en continu amb un cabal d'entrada de lleixius negres de 10.4 ml/h.

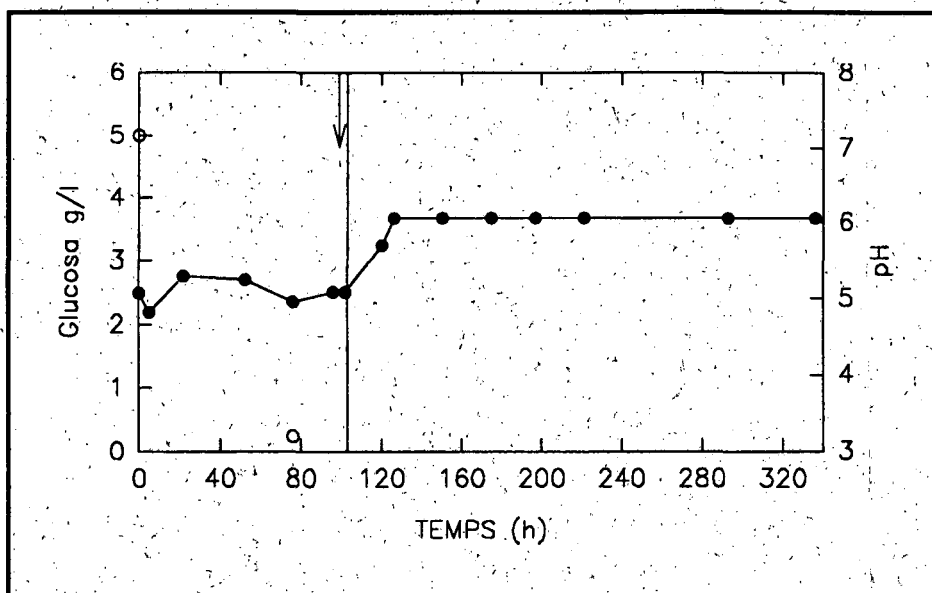
150 Activem el control de pH per mantenir-lo per sota de 6 unitats.

340 Finalitzem el tractament en continu.

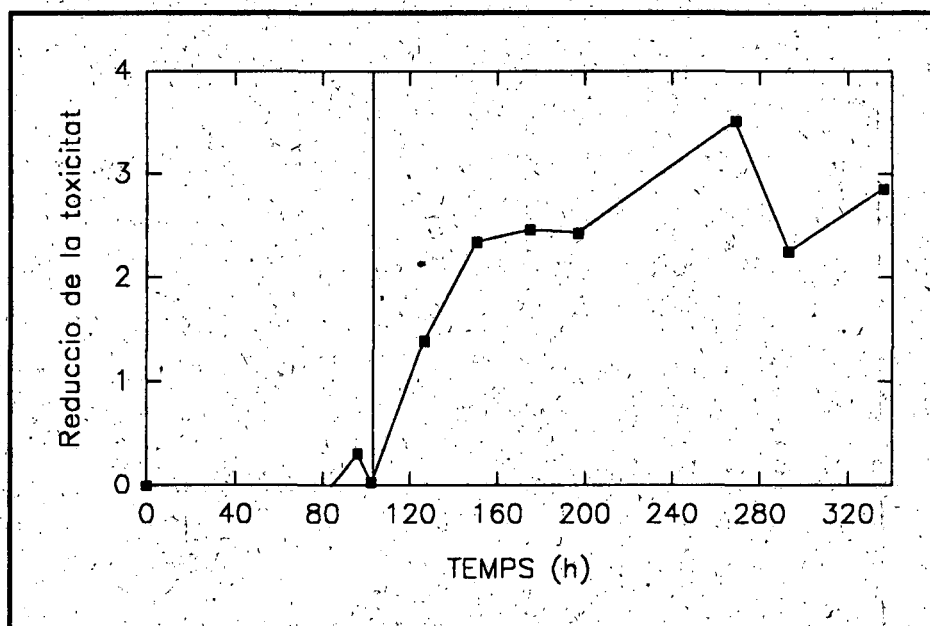
Volum total tractat en les 234 hores: 2.43 litres.

Temps de residència: 105 hores.

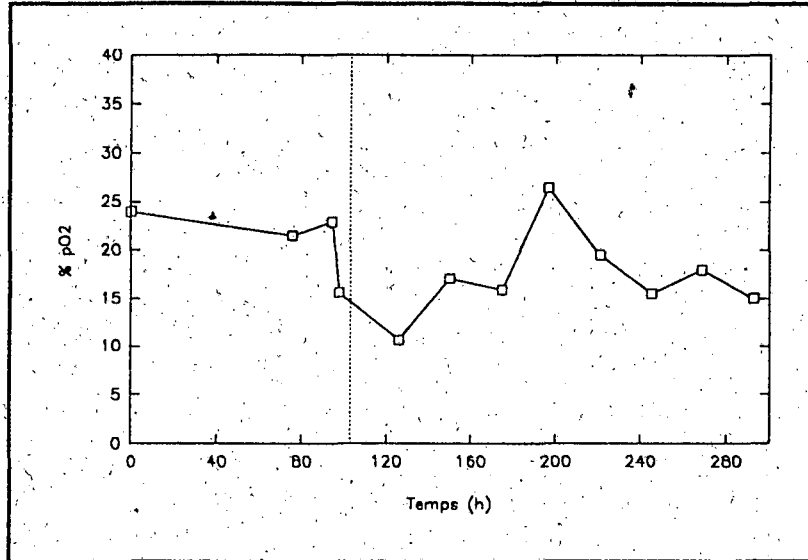
Taula 2.9. Programació de l'experiment 2.13.



Gràfica 2.6a: experiment 2.13, procés en continu. Variació del pH amb el temps



Gràfica 2.6b: experiment 2.13. Reducció de la toxicitat.



Gràfica 2.6c: mesura de l'oxigen dissolt en l'experiment 2.13

Respecte l'experiment 2.12, en l'experiment 2.13 es treballà a temps de residència superior, de més del doble; a més a més, es controlà que el pH -gràfica 2.6a- restés sempre inferior a les 6 unitats, i l'oxigen dissolt es mantingués per sobre del 15 % amb una barreja d'aire i oxigen pur.

La gràfica 2.6b presenta l'evolució de la reducció de la toxicitat en l'experiment 2.13. Es van assolir reduccions de la toxicitat superiors a 2; aquest valor s'estabilitza (o és superior) al voltant de 2,3 a partir de les 150 hores de tractament. En aquest experiment el procés en continu s'havia iniciat a les 102 hores, és a dir, s'havia avançat respecte l'experiment 2.12, ja que a les 75 hores -taula 2.9- només quedava en el medi 0.34 g/l de glucosa, i a les 95 hores s'havia exhaurit totalment. Vam considerar que a les 332 hores es podia donar per finalitzat l'experiment perquè els valors obtinguts de la toxicitat eren suficientment estables.

En l'experiment 2.13 s'assoliren també bones reduccions dels compostos aromàtics -gràfica 2.6c-. Fins a pH inferior a 5.75 unitats aquestes reduccions eren superiors al 50 %. El valor dels compostos aromàtics a les 100 hores podia estar afectat pel xoc de càrrega produït en haver-se reomplert anteriorment el fermentador amb 100 ml de medi fresc per compensar les pèrdues per evaporació. Quan el pH resta constant a 6 unitats perquè s'addicionava àcid al sistema, les reduccions dels compostos aromàtics s'estabilitzen per sobre del 25 %. En el mateix període s'havien registrat increments considerables del color. Recordem que el nivell de sortida de l'efluent tractat estava situat en la part superior del medi, per tant, estàvem compensant les pèrdues de volum per evaporació del medi, amb l'aliment que entrava al sistema que era major que el de sortida. Per això, hipotèticament els valors que presentem seran sempre pitjors -reduccions inferiors- que els reals.

En els dos experiments hi ha poca reducció de la DQO.

- Air-lift

Idèntiques condicions aplicades a l'experiment 2.13 serviren pel tractament dels lleixius negres en un bioreactor air-lift; també es mantingué el mateix control del pH que tan havia millorat els resultats en l'experiment 2.13. Es va seleccionar treballar amb aquest tipus de bioreactor per l'especial disseny de l'agitació. En aquest tractament amb l'air lift, experiment 2.14. L'agitació del medi es mantingué amb una barreja d'aire i oxigen. Ara bé, malgrat presentar una bona agitació el medi, els cubs amb el fong immobilitzat no fluiditzaven; per tant, el fong és com si estigués en un llit fix en el que el medi restava ben agitat però el suport restava quasibé immòbil. En la gràfica 2.7 mostrem a) l'evolució del pH, b) la reducció de la toxicitat, i c) les reduccions del color i els compostos aromàtics.

Exp 2.14

Temps
(hores)

Tractament en discontinu

- 0 Inoculem el bioreactor amb el fong *Phanerochaete chrysosporium* 32629 immobilitzat en cubs de niló.
 Volum inicial del bioreactor 1.8 l.
- 5 Ajustem el pH del medi després d'inocular a 4.78 unitats.
- 76 Glucosa en el medi: 1.83 g/l.
- 94 Glucosa en el medi: 1.5 g/l.
- 95 Afegim al bioreactor 300 ml de medi fresc per compensar les pèrdues per evaporació.

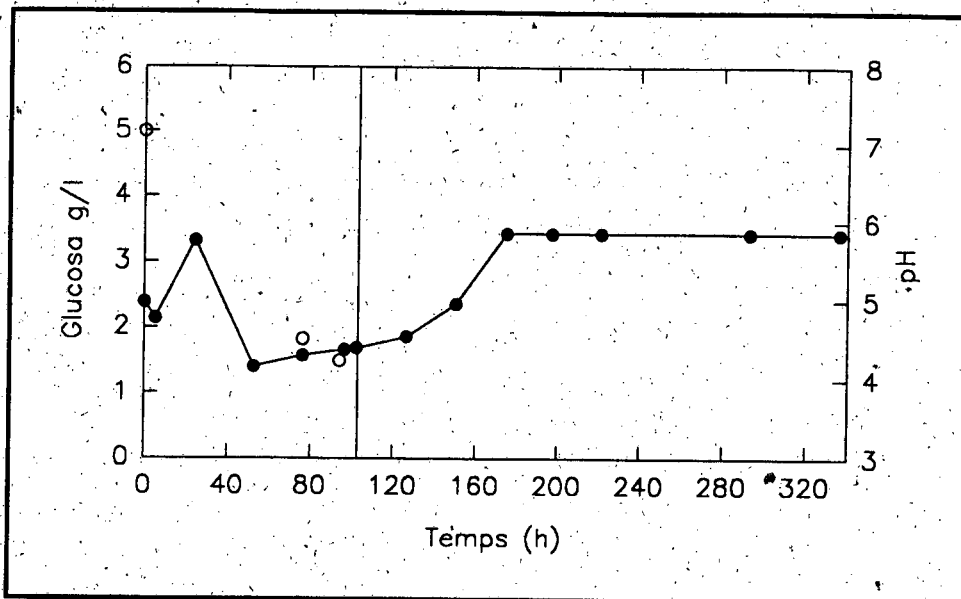
Tractament en continu

- 102 S'inicia el procés en continu.
 Mantenim la concentració d'oxigen dissolt en el medi superior al 25%.
- 175 Activem el control del pH per mantenir-lo inferior a 5.9 unitats.
- 221 Afegim 100 ml de medi fresc al bioreactor per compensar les pèrdues per l'evaporació. (*)
- 340 Finalitza el procés en continu.

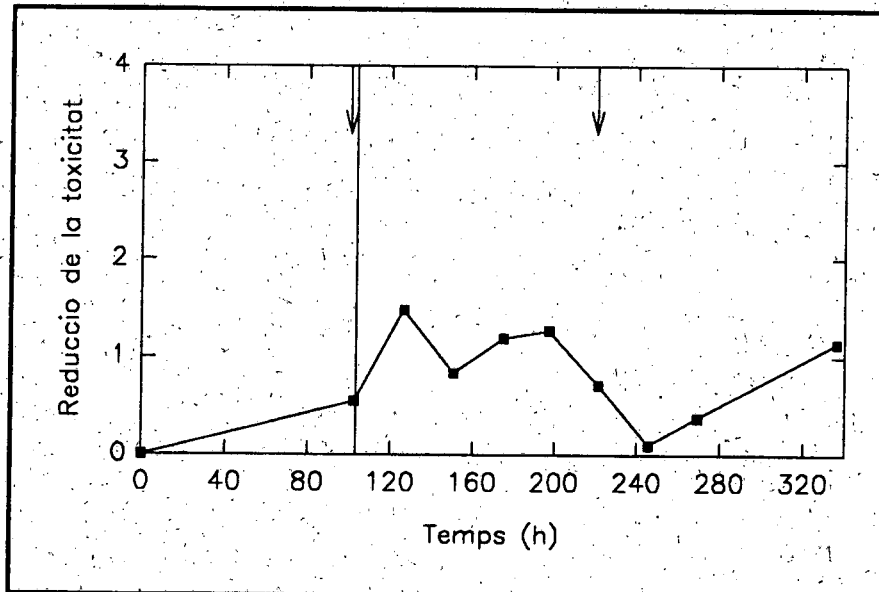
Volum total tractat en les 234 hores: 3.55 litres.

Temps de residència: 119 hores.

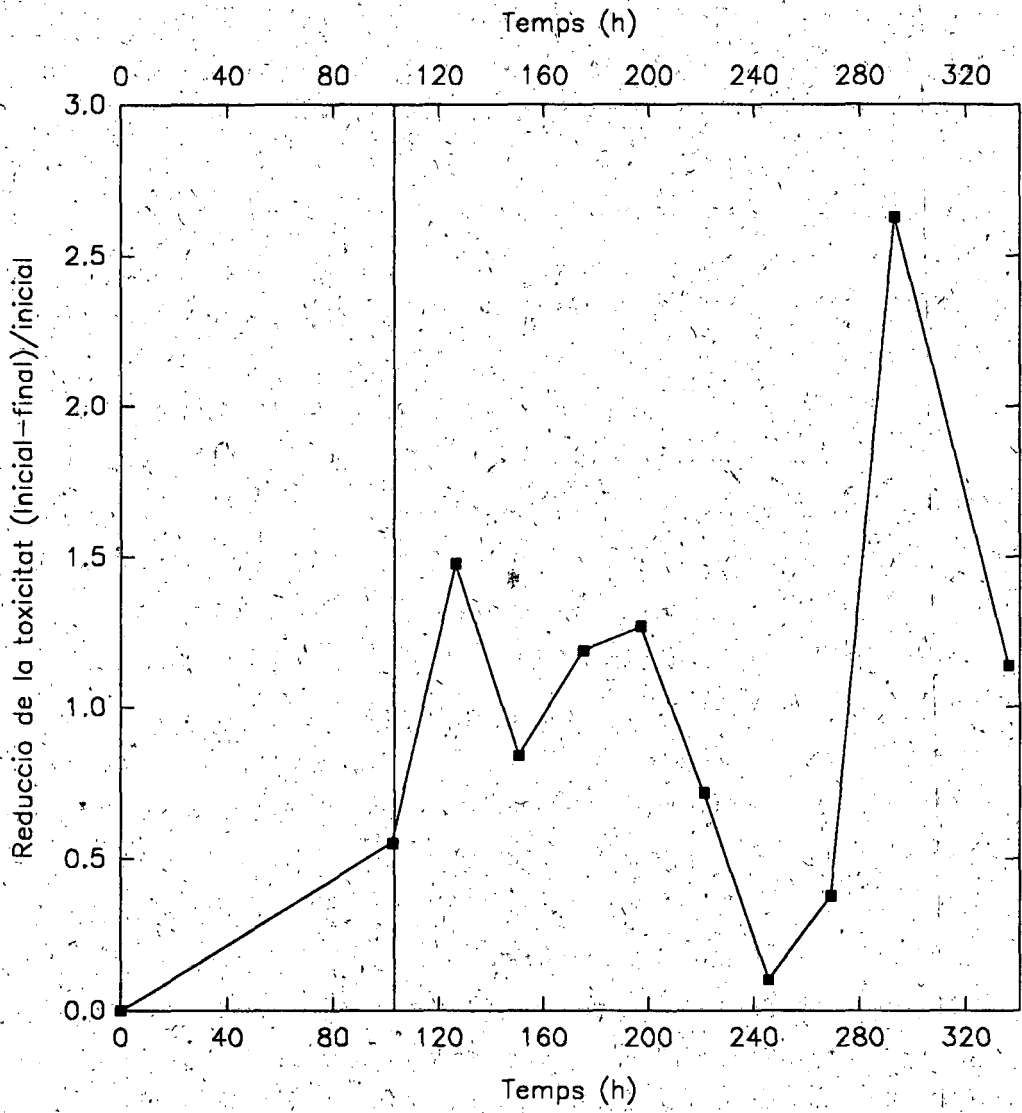
Taüla 2.10. Programació de l'experiment 2.14. (*) En el reactor air-lift no podia haver control de nivell del volum de medi i, per tant, no es compensaven les pèrdues de volum per l'evaporació diàriament. Per això se li afegí a les 221 hores aquests 100 ml de medi de lleixius negres.



Gràfica 2.7a



Gràfica 2.7b



En la gràfica 2.7a hi ha representat el pH del medi. Si la comparem amb la mateixa representació gràfica de l'experiment 2.13 -gràfica 2.6a- ens adonem que l'alcalinització del medi va ser més lenta i no s'accentuà fins les 140 hores. Resulta significatiu també que a les 94 hores encara restaven en el medi 1.5 g/l de glucosa -taula 2.10-. Es a dir, el consum de glucosa havia estat menor en l'air lift que en el reactor de tanc agitat. Si la velocitat de consum de la glucosa en l'air-lift s'hagués mantingut, s'hauria exhaurit la glucosa a les 135 hores, i coincidiria pràcticament amb l'increment més gran del pH. El motiu d'aquest comportament sembla ser que en no fluiditzar adequadament existirien problemes de transferència de matèria, i, per això, aniria més lent el consum de la glucosa.

Amb el bioreactor air-lift s'assoliren reduccions de la toxicitat de 1.3; podem veure clarament -gràfica 2.7b- com el sistema acusa els xocs de càrrega que li suposava compensar les pèrdues de volum per l'evaporació amb medi fresc de lleixius negres a les 95 i 221 hores. Després però, el sistema es recupera, i les reduccions de la toxicitat retornen al seu valor de 1.3. Aquestes reduccions de la toxicitat eren inferiors a les assolides amb el reactor de tanc agitat.

En la gràfica 2.7c veiem com les reduccions dels compostos aromàtics estan per sobre del 20%. Igual com hem dit en l'apartat anterior, les reduccions reals serien superiors, ja que tenim l'efecte de la concentració del medi. Al mateix temps, a mesura que avança l'edat del cultiu les reduccions del color decreixen. Aquests resultats comparats amb els obtinguts en l'experiment 2.13 (gràfica 2.6) evidencien que el bioreactor air-lift no és l'adequat per tractar aquest efluent en aquestes condicions en continu perquè no fluiditza bé i tindriem menor transferència d'oxigen.

- Filtre percolador

Tal com s'ha descrit en l'apartat de materials i mètodes es dissenyà un filtre percolador per tractar els lleixius negres. El seu funcionament havia de ser senzill, per tant, es renunciava als controls de pH i oxigen. Unicament es mantenia el control de la temperatura, 37 °C. Com ja s'ha explicat una sola bomba seria suficient per mantenir la recirculació, la velocitat que impulsaria l'aliment al filtre i el mantindria mullat en tota la seva superfície, i el seu pas pel bany termostatitzat. S'alimentà al filtre amb un cabal de 66 ml/dia de lleixius negres sense diluir a pH 4.5, que representava una càrrega orgànica de 3 Kg DQO/(m³*d) de bioreactor.

L'experiment 2.15 es plantejà com una continuació dels anteriors i, per tant, es partia de les mateixes condicions inicials del medi: 5 g/l de glucosa, 75 ppm de nitrogen amoniacal i pH 4.5. Inicialment es carregà el reactor amb cubs amb el fong prèviament immobilitzat que ocupaven un volum de 20 cm de diàmetre per 10 cm d'altura. S'afegí 4.5 l de medi el dipòsit de recirculació, i es deixà que funcionés en discontinu durant 48 hores; a aquest temps havia consumit 2 g/l de glucosaa. Es reemplaçà el medi per medi fresc també amb 5 g/l de glucosa i 75 ppm de nitrogen amoniacal. Restà funcionant en discontinu durant 75 hores més; en aquest període tota la glucosa ja havia estat consumida i el pH del medi havia passat a ser de 7.42 unitats. Es substituí altra vegada el medi per medi fresc amb glucosa i nitrogen amoniacal. El vam deixar funcionant en discontinu unes altres 50 hores, fins que la glucosa havia estat totalment consumida. Llavors s'inicià el tractament en continu. El cabal d'entrada i sortida era de 66 ml/dia.

Ben aviat vam constatar dos fets: a) el filtre percolador com a bioreactor tenia unes bones condicions fluido-dinàmiques i b) les pèrdues per evaporació eren molt elevades.

Vam instal·lar una balança en la part inferior del dipòsit de recollida del medi

per tal de poder avaluar amb més precisió les pèrdues per evaporació diàriament. Vam poder constatar que aquestes pèrdues eren efectivament de 700 ml de medi diaris, que equivaldrien al 16 % del volum inicial per dia. Per tant, cada hora s'estaria perdent el 0.7 % del volum inicial. En una primera fase que durà 21 dies aquestes pèrdues van ser compensades afegint xocs de càrrega diàriament equivalents al volum de medi evaporat. Es tractava d'afegir diàriament 700 ml de medi de lleixius negres d'una sola vegada sense ni glucosa ni nitrogen amoniacal a pH àcid. Posteriorment, en una segona fase de 10 dies aquestes pèrdues foren compensades amb aigua destil·lada afegida de forma continua durant les vint-i-quatre hores del dia; havíem suposat que les pèrdues per l'evaporació correspondrien a l'aigua, i que en restituir aigua destil·lada aquest efecte quedaria minimitzar i podríem avaluar l'efecte del microorganisme sobre l'aigua residual. En aquest període calgué incrementar la quantitat d'aigua afegida per dia fins 1 litre per poder compensar totalment les pèrdues de volum mesurades amb la balança.

Els resultats obtinguts en la toxicitat, el color i els compostos aromàtics es fan difícils d'avaluar des del punt de vista quantitatiu i qualitatiu degut a la gran distorsió que suposa aquest gran percentatge d'evaporació diària. De fet, aquestes grans pèrdues de volum invaliden d'entrada el tractament dels lleixius negres amb un filtre percolador a 37°C i obert. Fins i tot, en compensar les pèrdues amb l'aigua destil·lada els resultats obtinguts no acabaven de ser lògics i no es podia considerar un tractament d'aigües residual. L'experiment realitzat haurà servit solament per posar a punt el funcionament del filtre percolador, i poder-lo utilitzar en el tractament d'altres efluent sense treballar a temperatures tan elevades.

Vam desestimar des d'un principi dissenyar un filtre percolador tancat -sistema MyCoPOR- amb un condensador perquè, si bé podria ser molt útil a escala laboratori, sembla de difícil implementació dins un procés industrial.

Conclusions

El principal objectiu del tractament biològic d'unes aigües residuals d'origen industrial és reduir la toxicitat, augmentar la biodegradabilitat, i eliminar el color si n'hi ha. En els lleixius negres és conegut que el principal problema d'aquesta aigua residual és la seva toxicitat i poca biodegradabilitat.

En aquest capítol hem estudiat tres tipus de bioreactors amb el fong immobilitzat en dos suports diferents: bioreactor de tanc agitat, bioreactor air-lift i filtre percolador. Hem iniciat l'estudi amb el tractament en discontinu solament amb els bioreactors de tanc agitat, i hem aplicat els tres tipus de bioreactors en un tractament en continu. Al mateix temps, durant tot el treball necessitàvem disposar d'un test ràpid i fiable que ens quantifiqués i ens permetés avaluar la viabilitat del sistema proposat per tractar el lleixius negres. Es desestimà realitzar el test de la biodegradabilitat de l'aigua perquè es tracta d'un assaig que dura aproximadament uns 15 dies, alhora que es feia inviable realitzar-lo en les mostres més representatives que generaven els nostres experiments pel seu gran nombre. En canvi, per mesurar els canvis en la toxicitat sí que podíem disposar d'un test (Microtox) que ens era útil per la finalitat que perseguíem -poder seguir amb precisió els canvis ocasionats pel fong en els lleixius negres-, (amb l'únic problema del seu elevat cost per anàlisis), encara que es tractés de mesurar la toxicitat respecte a un microorganisme determinat. És per això, que vam decidir prendre que el paràmetre decisiu seria la toxicitat.

Des del punt de vista del suport d'immobilització a utilitzar tant l'espuma de poliuretà com el niló són bons suports i permeten treballar en diferents bioreactors. La millor estratègia d'immobilització és: primer immobilització prèvia del fong en un medi ric sense lleixius negres; i segon, tractament dels lleixius negres amb el fong prèviament immobilitzat.

Utilitzant un bioreactor de tanc agitat s'han obtingut bons resultats en les reduccions de la toxicitat i els compostos aromàtics. Amb el procés en continu

obtenim millors resultats que amb el procés en discontinu. Ara bé, el procés en continu té la capacitat de poder tractar més volum de lleixius negres.

S'ha aconseguit treballar en continu amb el fong immobilitzat durant aproximadament quinze dies aplicant, després d'un curt període inicial en discontinu, una càrrega orgànica de 3.1 g GQO/l de lleixius negres sense aportar ni font de carboni ni font de nitrogen addicionals i sense esterelitzar. Els millors resultats s'obtenen en mantenir el pH del medi i aportant més quantitat d'oxigen (barreja aire-oxigen). Malgrat aquests bons resultats no aconseguim reduir la DQO.

En el reactor air-lift hem vist en la fase inicial d'arrencada que el consum de glucosa és més lent, per tant, deduem que podria haver problemes de transferència de matèria que justificarien no obtenir tan bones reduccions com amb el reactor de tanc agitat. Aquests problemes de transferència podrien tenir l'origen en el disseny del bioreactor ja que el nostre suport -cubs de niló- era de gran tamany i no hi fluiditzava.

S'ha aconseguit treballar en continu amb el fong immobilitzat durant aproximadament quinze dies

En el desenvolupament d'aquest capítol hem anat introduint millores en el sistema per augmentar la reducció de la toxicitat i poder-la mantenir en el procés en continu. Aquestes millores es proposaven a partir dels treballs realitzats per altres investigadors i que creiem podien donar un bon resultat en el nostre cas, i a partir dels propis experiments. Hem aconseguit bones reduccions de la toxicitat i dels compostos aromàtics i bones reduccions puntuals del color, però no sabem com millorar per tal de poder treballar amb els lleixius negres menys diluïts.

Ens adonem que no és suficient l'estudi dels paràmetres finals, com la toxicitat, color, compostos aromàtics, DQO. Per actuar sobre aquests paràmetres, ens cal tenir un coneixement del fong més ampli i que ens permeti determinar quina

és la interrelació entre el microorganisme i el seu medi. En aquest sentit ens plantegem estudiar les activitats enzimàtiques del fong i veure la seva relació amb les reduccions de toxicitat, color i compostos aromàtics dels lleixius negres. Una vegada tinguem relacionat què o qui realment és el causant de cadascuna d'aquestes reduccions podrem interpretar millor els resultats obtinguts en aquest capítol, i podrem centrar-nos altre cop en l'estudi del tipus de bioreactor necessari per optimitzar aquestes reduccions en els lleixius negres que seran objecte de futurs treballs.
