



Escola de Camins

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports
UPC BARCELONATECH

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración de agua residual

Treball realitzat per:

Rubén Tijeras Martínez

Dirigit per:

**Enrica Uggetti,
Dulce María Arias**

Grau en:

Enginyeria d'Obres Públiques

Barcelona, Gener 2017

Departament d'Enginyeria Hidràulica, Marítima i Ambiental

TREBALL FINAL DE GRAU

AGRADECIMIENTOS

Con la finalización de la presente tesina pongo punto y final a una etapa muy importante en mi vida. Tras varias consultas con tutores de la escuela, ante las dudas de decantarme por la ingeniería o por el magisterio, finalmente me decanté por la opción correcta.

Tras varios años de esfuerzo he conseguido formarme como ingeniero de obras públicas gracias a los conocimientos que me ha otorgado la Universidad Politécnica de Catalunya.

Me gustaría dar las gracias primero de todo a Ivet Ferrer por aceptarme para la realización de la tesina y a Enrica Uggetti y Dulce Arias, quienes han estado supervisando el trabajo realizaba y resolviendo todas las dudas que surgían en su transcurso.

Agradecer también a Javier Carretero, responsable del laboratorio del DEHMA, por los conocimientos prácticos y teóricos en el laboratorio, así como su supervisión milimétrica velando por la seguridad durante los ensayos.

Por otro lado agradecer a Emilio Tijeras y Maribel Martínez, por enseñarme a no rendirme en momentos complicados durante esta fase de estudiante, y por permitirme económicamente acceder a la universidad. Sin olvidar al pequeño Iván Tijeras, quien ha sabido hacerme sonreír en los momentos de mayor estrés.

A Sonia Roch por el apoyo incondicional recibido durante todo este tiempo en la universidad.

Finalmente, agradecer a Alba Giró, Cristian Muñoz y Sergi Font, por haber demostrado ser amigos más allá de la universidad.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUCCIÓN	5
4. OBJETIVOS	7
5. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA	8
5.1. TIPOS DE BIOPLÁSTICOS.....	8
5.2. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA).....	11
5.3. POLIHIDROXIBUTIRATOS (PHB)	13
5.4. COSTES.....	14
5.5. TRATAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL.....	15
5.6. DEPURACIÓN DEL AGUA RESIDUAL A PARTIR DE MICROORGANISMOS	17
5.7. TRATAMIENTO MEDIANTE FOTOBIOREACTORES	19
6. MATERIALES Y MÉTODODOLOGIA DE LOS ANALISIS	24
6.1. EL FOTOBIOREACTOR (FBR).....	25
6.2. FUNCIONAMIENTO DEL FOTOBIOREACTOR	30
6.3. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS	33
6.4. ENSAYOS.....	35
7. RESULTADOS OBTENIDOS	46
7.1. SOLIDOS TOTALES	47
7.2. PHB.....	49
7.3. TURBIDEZ.....	51
7.4. AMONIO	52
7.5. ALCALINIDAD.....	53
7.6. DQO	55
7.7. ANIONES	56
7.8. OXÍGENO DISUELTO	58
7.9. PH	59
7.10. CLOROFILA.....	60
7.11. EVOLUCIÓN DEL CULTIVO MICROALGAL	61
8. CONCLUSIONES	75
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
10. ANNEXO	79

1. RESUMEN

Los bioplásticos son polímeros procedentes de materias primas de origen sintético o natural. Pueden ser moldeados o procesados en una gran variedad de formas, de la misma manera que los plásticos convencionales.

Los polihidroxicanoatos, son un tipo de bioplásticos, termoplásticos cristalinos, que son almacenados en el citoplasma de las cianobacterias, derivados mayoritariamente de situaciones de déficit de nutrientes. La forma más común de polihidroxicanoatos son los polihidroxi-butiratos, un tipo de polímeros pertenecientes a la clase de poliésteres. Éstos son producidos por ciertos microorganismos como un producto de asimilación de carbono, a partir de glucosa o almidón y son empleados por los microorganismos como una forma de almacenamiento de energía para ser metabolizada cuando exista un déficit de otras fuentes de energía.

Los fotobioreactores son sistemas que se pueden utilizar para la depuración de agua residual y generar bioplásticos a partir de la fotosíntesis realizada por las cianobacterias de su interior.

Los objetivos principales de la tesina son: 1) la cuantificación de bioplásticos a partir de un cultivo de algas-bacterias predominado por cianobacterias, alimentado con agua residual; 2) el mantenimiento e incremento de las colonias de cianobacterias y 3) la obtención de agua depurada como resultado de la interacción algas-bacterias en el fotobioreactor.

Para la cuantificación de los bioplásticos se realizan ensayos en las muestras de biomasa obtenidas del fotobioreactor cada 15 días. De la misma manera, se llevan a cabo análisis de calidad del agua de entrada y de salida del fotobioreactor durante 3 meses para evaluar la capacidad de tratamiento del fotobioreactor.

Como conclusiones se obtienen valores de polihidroxi-butiratos del 2,7% de medida respecto a su peso total, y una producción máxima de 3,3%. Los valores obtenidos son positivos si se comparan con cultivos especializados en la producción de los polihidroxi-butiratos. Se obtiene un valor de demanda química de oxígeno máximo de 105,67 mg/L. La ley establece un valor máximo de 125 mg/L para poder abocar el agua. Por tanto, el tratamiento de depuración de agua es apto para permitir abocarla de nuevo al medio.

2. ABSTRACT

Bioplastics are polymers from raw materials of synthetic or natural origin. They can be molded or processed in a variety of forms, in the same way as conventional plastics.

Polihidroxicanoatos, which are a type of crystalline thermoplastic bioplastics, are stored in the cytoplasm of cyanobacteria cells, mainly derived from nutrient deficiency situations. The most common form of polihidroxicanoatos are polihidroxicanoatos, a type of polymers which belong to the group of polyesters. These are produced by microorganisms as a product of carbon assimilation, a glucose or starch output and are employed by microorganisms as a form of storing energy to be metabolized when there is a deficit of other energy sources.

Photobioreactors are systems that can be used for the purification of residual water producing bioplastics, from the photosynthesis done by the cyanobacteria inside of them.

The main objectives of the thesis are: 1) To quantificate bioplastics from a group of algae-bacteria predominated by cyanobacteria, fed with residual water; 2) the maintenance and increase of cyanobacterial colonies and 3) the production of purified water as a result of the interaction of algae-bacteria in the photobioreactor.

For the quantification of the bioplastics tests are carried out on the biomass samples obtained from the photobioreactor every 15 days. In the same way, water quality analysis of the input and output of the photobioreactor is carried out for 3 months to evaluate the treatment capacity of the photobioreactor.

As results, values of 2.7% of polihidroxicanoatos from the total weight are obtained, and a maximum yield of 3.3%. The values obtained are positive after comparing them to cultures specialized in the production of polihidroxicanoatos. A maximum chemical oxygen demand value of 105.67 mg/L is obtained. The law establishes a maximum value of 125mg/L for it to be legal to throw it back into the environment. Therefore, the treatment of water purification is competent to allow it to be thrown back..

3. INTRODUCCIÓN

Para iniciar la presente tesina me gustaría hacer referencia a un estudio que apareció en el diario *El País* en el año 2015:

“El mundo tira ocho millones de toneladas de plástico al mar cada año” Si se colocara toda esa basura a lo largo de las costas de la Tierra, habría cinco bolsas de la compra llenas de plástico cada 30 centímetros (Jambeck et al, 2015).

La necesidad de un cambio en el consumo de plásticos o polímeros (uno de los materiales más importantes y polivalentes en el mundo actual) es necesaria. Con la idea de reducir el impacto negativo en la Tierra provocado por el uso de estos materiales, se inicia el estudio de la presente tesina para hallar formas que puedan reducir primeramente a las fuentes procedentes del petróleo, y en un futuro reemplazarlas ya que son prácticamente no degradables.

Aunque se piense que la biotecnología aplicada a las microalgas sea algo reciente, hay indicios que la producción masiva de microalgas para fines humanos, se inicio a finales del siglo XIX en Alemania, durante la II Guerra Mundial para producir lípidos a partir de algas. Fue en el año 1948, cuando un grupo de científicos de la *Carnegie Institution of Washington*, establecieron los principios para producir alimento, a gran escala a partir de las *Chlorellas*, una especie de alga dulce. A partir de ese momento apareció el gran interés por parte de grandes potencias mundiales por el desarrollo de la tecnología de producción microalgal de especies de agua dulce.

Los fotobioreactores son sistemas utilizados para la depuración de agua residual para generar, mediante la fotosíntesis de las cianobacterias, bioplásticos.

Los fotobioreactores cerrados tienen un valor añadido en la producción de microalgas. Se diferencian de otros sistemas principalmente porque son circuitos cerrados donde se optimiza la producción de la biomasa algal, se permite controlar y mantener constantes los parámetros que sean necesarios para permitir la producción suficiente de los microorganismos, ya sea para la producción de biocombustibles, bioplásticos u otros. Gracias a los fotobioreactores se intentará optimizar la obtención de bioplásticos.

Los bioplásticos son un tipo de plásticos que provienen de una fuente biológica, es decir, los polímeros que forman el bioplástico derivan de fuentes con vida propia, a diferencia del plástico convencional, cuyos polímeros provienen del petróleo, el cual es altamente contaminante. Algunos de ellos, son obtenidos de recursos vegetales (y renovables), lo cual permite que las bacterias puedan descomponer los polímeros de manera rápida. Este tipo de polímeros son polihidroxialcanoatos (PHA).

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son considerados fuertes candidatos para el reemplazo de los polímeros de origen petroquímico, ya que siendo sintetizados por microorganismos a partir de sustratos de bajo o nulo valor económico y en general de recursos renovables, tienen características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno (González *et al.*, 2013; Sudesh *et al.*, 2000), pero tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias.

Los polihidroxi-butiratos (PHB) son un tipo de polímeros pertenecientes a la clase de poliésteres. El PHB es producido por ciertos microorganismos como un producto de asimilación de carbono, a partir de glucosa o almidón, y es empleado por los microorganismos como una forma de almacenamiento de energía para ser metabolizada cuando exista un déficit de otras fuentes de energía.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal de la tesina es la cuantificación de los polihidroxibutiratos (PHB) en un cultivo predominado por cianobacterias y mantener e incrementar la biomasa de cianobacterias mediante un fotobio reactor cerrado, usando digestado y efluente secundario del tratamiento de agua residual como fuente de nutrientes. A más a más se pretende obtener una calidad de agua aceptable para poder ser abocada al medio receptor.

A continuación se especificarán los objetivos de la tesina:

- Cuantificar los PHB que se pueden obtener partir de un cultivo predominante de cianobacterias.
- Mantener una densa biomasa algal dominada por cianobacterias a partir de un alimentado con digestato diluido en agua residual terciaria.
- Comprobar la efectividad de este sistema en la obtención de bioplásticos a partir de cianobacterias como método para la depuración del agua residual y poder abocarla al medio receptor.

El estudio experimental de la presente tesina, se ha realizado en el Departamento de Ingeniería Ambiental de la Escuela de Caminos, Canales y Puertos de Barcelona. El fotobio reactor fue cedido para un uso académico por la empresa FCTecnics enmarcado en el proyecto MAR3 de la Generalitat de Cataluña.

5. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA

5.1. Tipos de Bioplásticos

En este capítulo se pretende explicar los diferentes tipos de bioplásticos, ya sean de origen vegetal o bien microbiano.

Hoy en día, resulta imposible pensar en un mundo sin plásticos, no solo por su utilidad sino también por la importancia económica que tienen estos materiales. Esto se refleja en los índices de crecimiento de esta industria que, desde principios del siglo pasado, supera a casi todas las demás actividades industriales y grupos de materiales. Los plásticos son baratos y tienen la capacidad de durar indefinidamente. Están presentes en los productos envasados, en el transporte, en los edificios, en el equipamiento deportivo y en la tecnología médica, etc..

Los polímeros procedentes del petróleo son los llamados petroquímicos y además de perdurar en la tierra por muchos años (Figura 5.1.1), las moléculas que los conforman no son capaces reintroducirse en el ciclo natural. Es por ese motivo que son considerados altamente contaminantes y dada su procedencia del petróleo, un recurso no renovable, cada vez más se están buscando alternativas para sustituir el uso de los polímeros procedentes del petróleo.

PROCESO DE DEGRADACIÓN					
Medio	Plásticos		Biodegradables		
	Polietileno	Unicel (poliestireno expandido)	Bambú y caña de azúcar	Fécula de maíz	Polímero de maíz
Relleno sanitario	500 años	1000 años	70 días	110 días	180 días
Mares, ríos y océanos	400 años	800 años	60 días	90 días	160 días
Tierra	600 años	1400 años	75 días	120 días	200 días

Figura 5.1.1 Degradación de plásticos convencionales y biodegradables.

Los bioplásticos en cambio, son sustancias orgánicas que se obtienen mediante reacciones químicas entre diferentes materias primas de origen sintético o natural y que pueden ser moldeados o procesados en una gran variedad de formas, aplicando calor y presión. En la actualidad se producen más de 700 tipos de plásticos, entre ellos, poliestireno, nylon, poliuretano, policloruro de vinilo (PVC), baquelita, siliconas, resinas epoxi, y poliamidas. Se dice que son polímeros (del latín “poli = muchas” y “meros = partes”) porque están formados por largas cadenas de moléculas (monómeros) unidas entre sí que contienen en su estructura principalmente carbono e hidrógeno. Los polímeros pueden ser naturales o sintéticos.

Origen vegetal

Los bioplásticos procedentes de origen vegetal son aquellos que proceden de plantas. Las plantas serían la alternativa ideal para la producción de biopolímeros, debido a la posibilidad de cultivarlas en grandes cantidades utilizando la fuente de energía más económica que existe: la luz solar. Se han logrado introducir y expresar los genes bacterianos necesarios para la síntesis de PHA en plantas de cultivo (Poirier *et al.*, 1995), lográndose obtener pequeñas cantidades de polímero.

Sin embargo, para la producción de PHA a partir de fuentes vegetales es necesario solucionar una serie de problemas. Por ejemplo, el metabolismo vegetal está altamente compartimentalizado, lo cual complica la tarea, ya que es necesario que:

- los genes *pha* se expresen en el compartimento celular que contiene la mayor concentración de acetil-CoA.
- impedir que se vea afectado el crecimiento de la planta.

El almidón es un ejemplo de polímero vegetal; se trata de un tipo de hidrato de carbono constituido por moléculas grandes que la planta sintetiza durante la fotosíntesis y le sirve como reserva de energía. Podemos encontrar almidón en multitud de cereales como por ejemplo el maíz, la patata, etc. El almidón se puede procesar y convertir en plástico.

Uno de los inconvenientes del almidón es su solubilidad, y por ese motivo, su uso está limitado para algunas aplicaciones. Esto se puede solucionar modificando químicamente el almidón a partir de microorganismos. Estos microorganismos, lo transforman en una molécula más pequeña (un monómero) conocido como ácido láctico. Posteriormente se puede tratar este ácido láctico químicamente y acabar obteniendo el poliláctido (PLA).

Origen microbiano

Por lo que se refiere al origen de los bioplásticos procedentes de bacterias o cianobacterias, se ha detectado que en muchas de ellas, bajo condiciones de estrés de nutrientes reaccionan generando este tipo de bioplásticos. En muchos casos, el porcentaje que acumulan es muy bajo, por lo cual son rechazadas ante la dificultad o imposibilidad de la industrialización del proceso (Ieczak *et al.*, 2013) En la figura 5.1.2 se muestran una serie de bacterias que son capaces de almacenar estos PHA en el citoplasma, como fuente de carbono y energía, dependiendo del nutriente limitado.

Microorganismo	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nitrógeno
<i>Ralstonia eutropha</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	Oxígeno
<i>Rhizobium ORS571</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	Fósforo
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

Figura 5.1.2. Microorganismos capaces de producir PHA en relación al nutriente limitante. Fuente: (Babel y Steinbüchel, 2001)

Dependiendo de factores como la habilidad celular para utilizar fuentes de carbono no costosas, la velocidad de crecimiento, de síntesis del biopolímero, la cantidad y calidad del PHA y el coste de los procesos de recuperación, se seleccionará un microorganismo u otro para la producción industrial (Lee y Choi, 2001).

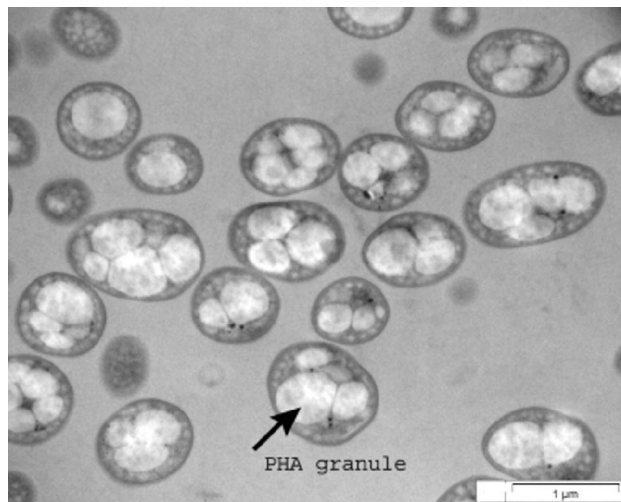


Figura 5.1.3. Gránulos de PHA contenidos en la bacteria *Pseudomonas sp. K.*

5.2. Polihidroxicanoatos (PHA)

Los polihidroxicanoatos son un material termoplástico cristalino con propiedades comparables al polipropileno. Se clasifican de acuerdo con la naturaleza de sus unidades monómeras, si el polímero está formado por solo un tipo de unidades se denomina homopolímero (Anderson y Dawes, 1990) y si está integrado por monómeros con distinta longitud de átomos de carbono en el mismo gránulo se conoce como un copolímero (Zhao y Chen, 2007)

Estos PHA tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias (Du *et al.*, 2001), en hábitats tan diversos como suelo, mar, aguas estancadas o aguas residuales (Barbosa *et al.*, 2005).

Estos, son polímeros de ácidos hidroxicanoicos que algunos microorganismos acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. La polimerización de los ácidos hidroxicanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxicanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster; de ahí que se han llamado biopolíesteres (Khanna, S. y Srivastava, A. K., 2005) (Figura 5.2.1).

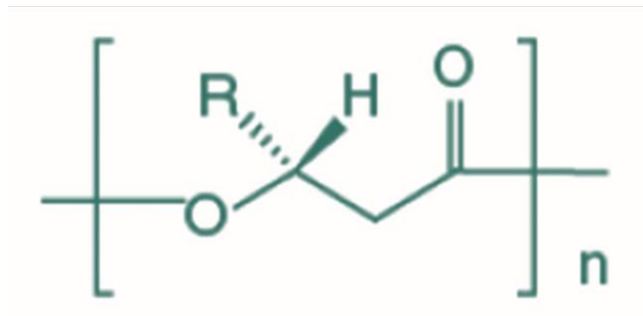


Figura 5.2.1.. Estructura química del PHA. Fuente: (Andler y Díaz, 2013)

El valor de n dependerá del grupo R y el microorganismo en el cual se produce el biopolímero, variando entre 100 y 30000 (Lee, 1996).

Se pueden diferenciar tres tipos de PHA dependiendo de la longitud de la cadena lateral R:

- scl-PHA: si R contiene entre 1-2 átomos de carbono se conocen como PHAs de cadena lateral corta, *short chain length*-PHA en inglés. Estos biopolímeros tienen la característica de ser demasiado rígidos y frágiles.
- mcl-PHA: si R contiene entre 3 - 13 átomos de carbono se conocen como PHAs de cadena lateral media, *medium chain length*-PHA en inglés. Estos PHAs son más elásticos que los anteriores pero disponen de menos fuerza mecánica (Ortiz, E. 2009)
- lcl-PHA: si R contiene más de 14 átomos de carbono se conocen como PHAs de cadena lateral larga, *long chain length*-PHA en inglés.

En la Figura 5.2.2 se indican las sustituciones más comunes del grupo radical y el nombre que recibe el polímero (Andler, R. y Díaz, A., 2013).

Grupo R	Nombre del Polímero	Abreviación
CH ₃	poli(3-hidroxibutirato)	PHB
CH ₂ CH ₃	poli(3-hidroxivalerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	poli(3-hidroxihexanoato)	PHHx

Figura 5.2.2. Sustituciones del grupo radical y algunos de los PHA más conocidos. Fuente: tomada de Lemos, A. y Mina, A. 2015.

A pesar de las ventajas a nivel ambiental que representa el uso de los PHA, el principal problema es su elevado coste frente a los polímeros petroquímicos (Andler, R. y Díaz, A., 2013). Se están investigando medidas para hacerlos más accesibles a la población, mejorando los procesos de fermentación y extracción.

5.3. Polihidroxi-butiratos (PHB)

Dentro de los PHAs, el poli(3-hidroxi-butirato) o PHB es uno de los más estudiados y es sintetizado por diferentes bacterias (Gumel et al., 2013) ya que este posee características muy similares al polipropileno, uno de los plásticos convencionales procedente del petróleo de mayor uso por sus propiedades físicas.

Los PHB son producidos por ciertos microorganismos como un producto de asimilación de carbono, a partir de glucosa o almidón y son empleados por los microorganismos como una forma de almacenamiento de energía para ser metabolizada cuando exista un déficit de otras fuentes de energía. son la forma más común de polihidroxi-alcanoatos y son solubles en cloroformo. Esta solubilidad es la que se empleará para cuantificar la cantidad de PHB presentes en el cultivo mediante el método del ácido crótomico.

A nivel mundial, la bacteria más estudiada ha sido la *R. eutropha* debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de PHB. Su porcentaje de acumulación está alrededor del 80% del peso seco de la bacteria. La producción y acumulación, se puede llevar a cabo mediante fuentes de carbono económicas tales como glucosa, fructosa, entre otras (Priyadarshi et al., 2014).

Como se puede ver en la figura siguiente (Figura 5.3.1) la obtención de PHB a partir de cianobacterias tiene valores teóricos del 80%, pero en la mayoría de los casos no se supera la productividad del 60%. Cabe mencionar que en muchos de estos estudios se ha incluido la adición de carbono orgánico para incrementar la productividad, acción que implica el incremento del coste. Mediante cultivos puros, aquellos que no incluyen adiciones de carbono, se obtienen productividades del 10% como valor máximo.

Species of cyanobacteria	Types of PHA	Carbon sources tested	PHA content (w/w)	References
<i>Chlorogloea fritschii</i>	P(3HB)	CO ₂	ND	Jensen and Sicko (1971)
<i>C. fritschii</i>	P(3HB)	Acetate	ND	Jensen and Sicko (1971)
<i>Spirulina platensis</i>	P(3HB)	CO ₂	6%	Campbell et al. (1982)
<i>S. maxima</i>	P(3HB)	CO ₂	0-70%	De Philippis et al. (1992)
<i>S. maxima</i>	P(3HB)	Acetate	2%	De Philippis et al. (1992)
<i>Gloeotheca</i> sp.	P(3HB)	CO ₂ /acetate	6%	Stal (1992)
<i>Oscillatoria limosa</i>	P(3HV)	CO ₂ /acetate	6%	Stal (1992)
<i>Trichodesmium thiebautii</i>	P(3HB)	Natural conditions	0-20%	Siddiqui et al. (1992)
<i>Gloeotheca</i> sp. PCC6909	P(3HB)	CO ₂	ND	Arino et al. (1995)
<i>Synechococcus</i> MA19	P(3HB)	CO ₂	7-50%	Miyake et al. (1997)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	P(3HB)	Acetate	10%	Hein et al. (1998)
<i>S. platensis</i>	P(3HB)	CO ₂ /acetate	10%	Jau et al. (2005)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	P(3HB)	Fructose/acetate	38%	Panda and Mallick (2007)
<i>Nostoc muscorum</i>	P(3HB)	Acetate/glucose	45-60%	Sharma et al. (2007)

Figura 5.3.1. Producción de PHB en función del tipo de cianobacterias y recursos de carbono utilizados. Fuente: R.M.M. Abed, 2008

5.4. Costes

El interés por los PHA se inicio a finales de los años 70, a raíz de la crisis mundial del petróleo. Dado que el precio del combustible fósil incrementó en gran manera, las investigaciones por encontrar nuevas fuentes de obtener plásticos empezaron a florecer. LA empresa ICI, desarrolló un proceso para producir a escala industrial un bioplástico que se comercializo con el nombre de "Biopol". Este PHA es un copolímero de monómeros de cuatro y cinco carbonos, denominados hidroxibutirato e hidrovivalerato, respectivamente. Este PHA se producía a partir de la bacteria *Ralstonia eutropha* la cual se cultivaba en un medio de glucosa y propionato como fuentes de carbono.

A finales del siglo XX el precio del barril de petróleo disminuyó y como consecuencia, el interés por los PHA. Últimamente, como si de una rueda se tratase, las reservas de petróleo se están agotando y parece ser que se está tomando más conciencia y se están retomando muchas investigaciones que se dejaron de lado cuando pareció volver todo a la normalidad.

Aunque los PHAs son biocompatibles con el medio ambiente, sus costes de producción son mucho mayor que el de los plásticos sintéticos, lo que presenta la principal desventaja de los polihidroxialcanoatos en los mercados globales (Dhangdhariya et al., 2015). En este sentido, en el análisis económico de la producción de PHAs, los costes de la fuente de carbono por sí sola representan aproximadamente el 50 % de los costos totales de la producción de PHAs. Con el fin de reducir los costos de producción, es esencial identificar microorganismos que utilicen fuentes de carbono más económicas y que sean eficientes para producir PHAs (Kim, 2000).

Dado que el precio de la glucosa es aproximadamente el doble del precio del almidón de maíz hidrolizado, el uso de almidón como fuente de carbono conllevaría una disminución del costo de producción de aproximadamente el 25 %.

Los altos costes involucrados en los procesos de extracción de los PHAs, sumados a la variación en los tiempos de máxima producción por parte de la mayoría de las cepas productoras de estos biopolímeros, exigen una búsqueda de nuevas técnicas de cuantificación que permitan una rápida determinación del momento óptimo de producción donde realizar el proceso de extracción.

5.5. Tratamiento del agua residual

Desafortunadamente, en la mayor parte del mundo, el agua residual se vierte de nuevo al medio sin cumplir con los requisitos mínimos de calidad del agua. Esta acción hace que se genere un riesgo para la salud de las personas. Se contaminan ríos, lagos, aguas freáticas y la mayor parte de esta contaminación acaba en el mar.

Cuando un agua esta contaminada o tratada bajo mínimos, pueden surgir problemas como la aparición de materia en suspensión (MES), formada en su mayoría por fangos y materia orgánica, dificulta la realización de la fotosíntesis, crecimiento descontrolado de algas, normalmente a causa de un exceso de nutrientes, reducción del contenido de oxígeno en el medio, este oxígeno es consumido por los microorganismos para reproducirse, entre otros. A más a más, el agua residual es una fuente de propagación de organismos patógenos, como virus, bacterias, etc causantes de muchas enfermedades (cólera, tífus, hepatitis A,...)

Es por estos motivos entre muchos otros, que existe la necesidad de depurar esta agua. En los países desarrollados se trata su mayor parte de vertidos antes de que lleguen a ríos o mares mediante las Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDARs).

El principal objetivo de estos tratamientos es reducir la carga de contaminantes del vertido y evitar los problemas mencionados anteriormente. Para llevar a cabo esta acción de depuración existen diferentes métodos en función de los contaminantes que arrastre el agua a tratar y diseños de planta dependiendo de muchos factores como por ejemplo; económicos, localización de la planta, afectación a ecosistemas cercanos, etc.

La composición del agua residual puede variar en función de las características del entorno, de la población, el uso del agua, etc. Los parámetros para caracterizar el agua y que se tendrán en cuenta para llevar a cabo los análisis se clasifican según dos tipos; parámetros físicos y parámetros químicos.

Parámetros físicos

Éstos parámetros son los relacionados con los sentidos de la vista, el gusto, el tacto, el olfato y el olor. Los parámetros físicos pueden considerarse como testigos de la variación de la calidad del agua, ya que estos parámetros están relacionados a características que definen la calidad del agua. Se analizarán los siguientes parámetros mediante sus ensayos pertinentes:

- Temperatura (T)
- Turbidez
- Sólidos en suspensión (SS)

Parámetros químicos

Los parámetros químicos en cambio hacen referencia a la composición del agua. Se determinarán los siguientes parámetros:

- Demanda Química de Oxígeno (DQO).
- pH.
- Cloruros.
- Alcalinidad
- Nutrientes (Nitrógeno y Fósforo).

La ley que se rige en España es la Directiva 91/271, que define los sistemas de recogida, tratamiento y vertido de las aguas residuales así como los valores límite de contaminación que éstas pueden asumir. Esta Directiva ha sido transpuesta a la normativa española por el R.D. Ley de 11/1995, el R.D. 509/1996 que lo desarrolla y el R.D. 2116/1998 que modifica el anterior.

En la siguiente tabla, se muestran los valores mínimos de concentración que deben darse para un vertido correcto al medio receptor y el porcentaje mínimo de reducción, el cual se refiere en relación con el caudal de entrada.

PARÁMETROS	CONCENTRACIÓN	PORCENTAJE MÍNIMO DE REDUCCIÓN
DBO ₅ a 20°C sin nitrificación	25 mg/L O ₂	70-90% para altitudes hasta 1500m
DQO	125 mg/L O ₂	75%
Total de sólidos	35 mg/L (> 10.000HE)	90% (> 10.000HE)
	60 mg/L (2.000<HE<10.000)	70% (2.000<HE<10.000)

Tabla 5.5.1 Concentraciones mínimas para un vertido correcto. Fuente: España. Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente (1991).

5.6. Depuración del agua residual a partir de microorganismos

Uno de los sistemas de mayor uso y conocido para llevar a cabo la depuración de las aguas residuales consiste en el uso de las lagunas de maduración. Estas lagunas se benefician de la luz solar y las microalgas conjuntamente. Dichas lagunas, requieren de una extensión de terreno muy elevada, unas condiciones climatológicas determinadas y un tiempo de retención hidráulico alto. Todos estos condicionantes, dificultan su uso en muchas de las situaciones.. Por otro lado, si las EDAR no precisan de tratamientos terciarios de desinfección, el medio receptor se ve afectado negativamente por una gran cantidad de microorganismos que debe tratar por sus propios métodos.

Los procesos convencionales de depuración mediante el uso de oxígeno, es decir, aeróbicos, tienen un coste energético que puede llegar a suponer la mitad del coste total solamente para proporcionar al sistema el oxígeno necesario para que las bacterias puedan llevar a cabo su función.

Sin embargo, los sistemas fundamentados en la asociación alga-bacteria se complementan mutuamente a través de la fotosíntesis de las algas que producen oxígeno (utilizado por las bacterias para su respiración) y las bacterias que producen CO₂ (utilizado como fuente de alimento por las microalgas).

Por tanto, se definen las microalgas como un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares que necesitan nutrientes como el carbono, el nitrógeno y el fósforo, además de la radiación solar para realizar la fotosíntesis.

Se pueden encontrar microalgas en ambientes tales como aguas marinas, dulces o residuales en condiciones muy diversas respecto a los nutrientes, temperatura, pH, etc. Hay una gran subespecie de microalgas que se adapta a cada una de las circunstancias anteriormente comentadas. De todas las subespecies, las más interesantes desde el punto de vista de la tesina son las cianobacterias. Éstas tienen un reciente interés debido a la acumulación de bioplásticos (Hu, Q. 2008). La composición de las microalgas corresponde mayoritariamente a proteínas (entre un 40-60%), carbohidratos (entre un 20-40%) y lípidos (entre un 5-20%) (Becker, E. 1994).

Por otro lado se pueden agrupar grandes grupos de microalgas dada la morfología y los ciclos de vida (Sheelan, J., 1998). Se diferencian entre los siguientes:

- Chlorophyta (algas verdes): se encuentran en aguas dulces y proliferan como células individuales o colonias.
- Bacillariophyta (Diatomeas): se encuentran principalmente en aguas oceánicas aunque también pueden existir en aguas dulces y residuales.
- Heterokontophyta: proliferan principalmente en agua dulce y existe una gran diversidad de especies.
- Cianobacteria: su estructura celular es muy similar a la de las bacterias. Éstas son organismos procariontes.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Además, se pueden definir las variables que intervienen en el sistema de depuración. La interacción y funcionamiento de los organismos, como microalgas y bacterias, como ya se ha comentado, y los elementos como el oxígeno, el dióxido de carbono, el nitrógeno, el fósforo y la luz solar. Las algas consumen CO_2 , nutrientes y mediante la luz solar producen O_2 . Por otro lado, las bacterias realizan un proceso inverso; consumen O_2 y materia orgánica produciendo de esta manera CO_2 , necesario para las algas. Como consecuencia a dicha complementación entre microalgas y bacterias, se obtiene una eliminación de la materia orgánica (DQO), una reducción de la DBO_5 , un aumento del porcentaje de oxígeno disuelto y un descenso de nutrientes.

Una posible problemática de dicha asociación entre microalgas y bacterias puede darse cuando no se controlan o bien no se determinan adecuadamente los parámetros de entrada. Por ejemplo, si se aumenta en exceso la cantidad de nutrientes, puede producirse un aumento descontrolado de algas, convertirse en predominantes y desplazar a las cianobacterias, el aumento descontrolado de las algas debido a un exceso de nutrientes se conoce como eutrofización.

5.7. Tratamiento mediante fotobioreactores

Un fotobioreactor (FBR) es un sistema utilizado para la depuración de agua residual, que permite realizar la fotosíntesis de las clorofilas existentes en los microorganismos de su interior, tales como las microalgas marinas, tanto para propósitos de investigación, como para la obtención de biocombustibles (como el biodiesel) o como la adquisición de bioplásticos, los cuales son de alto interés para la presente tesina.

Gracias a su utilización, se consigue un segundo efecto que es la depuración del agua residual mediante los procesos físico-químicos que se dan dentro de dicho fotobioreactor. Permiten ser utilizados como una herramienta reproductora del tratamiento terciario de las aguas residuales. Una de las características más importantes es que permiten controlar distintas variables que ayudan a determinar diferentes parámetros de control del agua residual.

La finalidad de estos sistemas es la creación de microorganismos que permitan obtener otro subproducto de origen natural, como es el caso del biodiesel o los bioplásticos, y que reemplacen a los plásticos petroquímicos utilizados en potencia

Es posible utilizar inóculos para activar la reproducción masiva de microalgas en los fotobioreactores permitiendo una alta compatibilidad de microorganismos con el medio y una gran velocidad de crecimiento. El factor más importante en cuanto al diseño reside en el aprovechamiento lumínico para la realización de la fotosíntesis, la dispersión de las microalgas a lo largo del fotobioreactor y la aireación del medio acuoso.

Como se ha comentado anteriormente, los fotobioreactores son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas. Para ello, tienen que mantener un medio estable (temperatura, pH, baja concentración de O₂), proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento e incluir la luz. Existen dos vías principales: los FBR abiertos, donde priman la economía aceptando un control pobre del entorno y los FBR cerrados, que consiguen unas condiciones estrechamente controladas permitiendo a las microalgas crecer a una velocidad óptima a cambio de un mayor coste.

Fotobioreactores abiertos

El cultivo se encuentra en contacto con la atmósfera. Son instalaciones con un bajo sote y como consecuencia una baja productividad dado el control prácticamente nulo del pH y la temperatura. Al estar abiertos son susceptibles a la invasión por otros microorganismos incluyendo microalgas, por lo que son especialmente adecuados para especies robustas y de rápido crecimiento. Sin embargo, pese a estos inconvenientes, la mayoría de las microalgas producidas en el mundo provienen de este tipo de sistemas debido, por un lado, a que el interés en los sistemas cerrados es más reciente y por otro lado, a que estos sistemas se asemejan más a las condiciones naturales. Su gran ventaja es que es fácil y económico construirlos en grandes volúmenes incluso de cientos de metros cúbicos. Existen dos tipos básicos de FBR abiertos.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- “*open ponds*”: como su nombre indican son simples receptáculos del tamaño y forma adecuados. Como se muestra en la Figura 5.7.1, son simples balsas de la forma y profundidad adecuada que se llenan del medio con los nutrientes adecuados y se dejan crecer. El proceso es, por tanto, muy económico y los costes de operación son muy bajos, pero la productividad por unidad de superficie y la concentración de biomasa son muy bajas. Las microalgas capaces de sobrevivir en condiciones extremas son las extremófilas.



Figura 5.7.1. Ejemplo de FBR abierto tipo “*open ponds*” (Fuente: Piñon Engranado Blogspot)

- “*raceways*” (Figura 5.7.2): facilita el intercambio de gases y permite controlar el pH en cierta medida. Son dispositivos más sofisticados ya que incluyen agitación y mezcla en el proceso. Además, se puede suministrar CO_2 al cultivo de forma relativamente eficiente y con pocas pérdidas, lo que permite un cierto control del pH. El dispositivo de impulsión más común es la rueda de paletas o “*paddle wheel*” y consigue mantener el cultivo en suspensión y mezclado con un bajo consumo de potencia por metro cúbico.



Figura 5.7.2. Ejemplo de FBR abierto tipo “*raceways*”. (Fuente: Spirulina algae)

Fotobioreactores cerrados

Estos fotobioreactores se encuentran completamente aislados al medio ambiente externo. Son los procesos que más pueden asemejarse a la fase fotosintética que se dan en las hojas de las plantas, pero no a las condiciones que tienen los microorganismos en un medio exterior. La mayoría de ellos están equipados con sistemas de agitación, aireación, control del pH, intercambio del calor, adición de medio y CO₂. Los FBR de este tipo son dispositivos muy especializados y a menudo diseñados específicamente para una especie concreta. Tienen la principal ventaja de aprovechar la radiación solar, los nutrientes y del dióxido de carbono de manera más eficiente. Existen varios tipos, entre ellos destacamos:

- FBR columna (Figura 5.7.3.): consisten en una columna de burbujeo de material transparente de diámetro “d” y altura “H”. Su capacidad es de mínimo unos 20 litros. La geometría cilíndrica de las columnas son fáciles de construir, además, ayuda a distribuir la luz y soporta bien la presión en la base. Son dispositivos sencillos ya que el burbujeo proporciona la mezcla del sistema, la retirada del O₂ y el aporte de CO₂. Se complica su construcción cuando se habla de grandes volúmenes, ya que al aumentar el diámetro, aumenta exponencialmente el volumen oscuro, disminuyendo la productividad. La altura también puede suponer un problema en el caso de ser muy elevados. Una de las principales desventajas viene dada por su posición vertical, siendo malas captadoras de luz en aquellas horas del día donde el sol se encuentra a su máxima altura.



Figura 5.7.3. Ejemplo de FBR cerrado tipo columna. (Fuente: Alga energy)

- FBR planos (Figura 5.7.4): son similares a los anteriores pero incorporan agitación e intercambio de materia en el mismo espacio donde se capta la luz. Los FBR planos, intentan resolver algunos de los problemas que representa los de columna; se pueden construir inclinados y es posible orientarlos hacia el sol, para maximizar así la captación de luz y con ello aumentar la productividad. Aunque, en la práctica, no es fácil construir FBR planos demasiado largos por la dificultad que tiene esta geometría para soportar la presión hidrostática (se necesita una estructura exterior que los soporte). Además, pese a que pueden inclinarse, siguen siendo dispositivos verticales, por tanto necesitan aireación y siguen siendo por lo tanto, pobres captadores de luz en muchos momentos del día.



Figura 5.7.4. Ejemplo de FBR cerrado tipo plano. (Fuente: Alga energy)

- FBR tubulares (Figura 5.7.5): los tubulares son los más sofisticados y los más especializados, por tanto, son los más caros de construir. Consisten en un conjunto de tubos que ofrecen una alta capacidad de explotación, creando un régimen turbulento y permiten una buena distribución frente a la radiación solar. Presentan mayor facilidad y funcionalidad cuando se requiere ampliar el sistema. Entre sus desventajas, se apunta al bajo caudal que pueden transportar así como el control de la temperatura.. En ellos se encuentran dos elementos característicos:
 - el desgasificador: es la parte donde se lleva a cabo el intercambio de materia, especialmente la desorción de O_2 ;
 - el lazo: es la parte donde se capta la energía solar, se denomina así porque es un tubo dispuesto de alguna manera que proporcione una forma compacta, lo que requiere codos y curvas, está específicamente diseñado para la captación de la luz, sin tener que preocuparnos por los intercambios de calor o materia, lo que permite optimizar la productividad maximizando la eficiencia fotosintética.



Figura 5.7.5. Ejemplo de FBR cerrado tipo "tubular". (Fuente: Alga energy)

6. MATERIALES Y MÉTODODOLOGIA DE LOS ANALISIS

En este capítulo se explicará el fotobioreactor utilizado para poder llevar a cabo todos los análisis, su funcionamiento y las partes que lo componen. Una vez explicado el FBR, se detallarán los parámetros que se analizaron con los diferentes ensayos y la metodología utilizada para obtener los valores correspondientes.

Para la realización del conjunto de experimentos y ensayos de la presente tesina, se han utilizado las instalaciones del Departamento de Ingeniería Hidráulica, Marítima y Ambiental (DEHMA), en la UPC Campus Nord de Barcelona (Escuela de Caminos, Canales y Puertos), concretamente en el subterráneo del edificio D1 del mismo recinto. Se presenta, a continuación, una ilustración de su emplazamiento (Figura 6.1).



Figura 6.1. Localización del centro de realización de los ensayos (Fuente: Google Maps)

6.1. El fotobioreactor (FBR)

El fotobioreactor (FBR) utilizado para la elaboración de la tesina consiste en un sistema cerrado tipo columna. Debido a su alta capacidad para crear cultivos selectivos y su fácil mantenimiento, es un sistema muy recomendado para investigaciones. Se dispone de una serie de componentes que permite su óptimo funcionamiento. Estos elementos tienen diversas funciones, desde la homogeneización del volumen de entrada, hasta la monitorización en continuo de varios de los parámetros que se requieren para extraer las conclusiones finales.

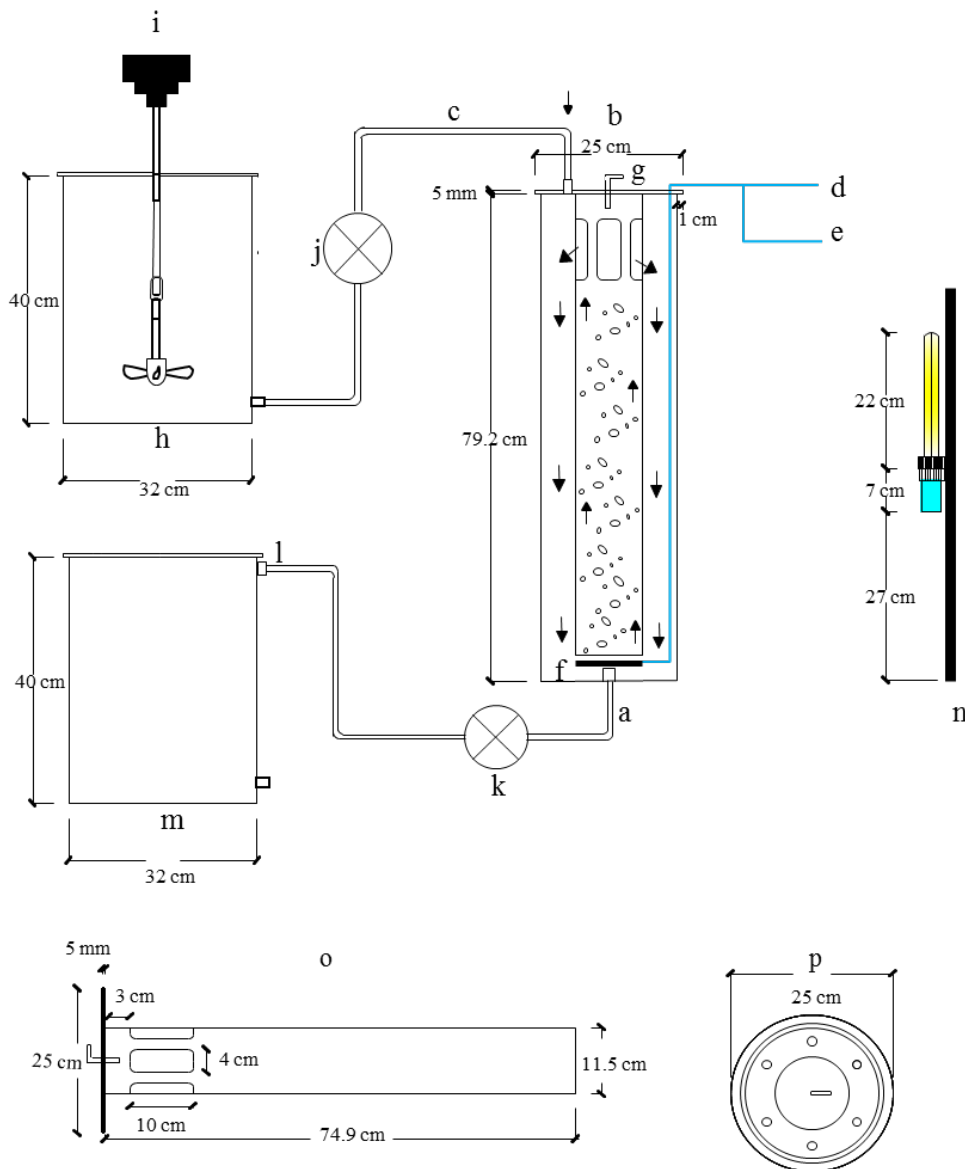


Figura 6.1.1. Diagrama esquemático del fotobioreactor utilizado. a) cuerpo del fotobioreactor con cilindro interno en su interior, b) cubierta del fotobioreactor, c) tubo de alimentación, d) tubo de aire, e) tubo de CO₂, f) rociador de aire, g) salida de gases, h) tanque de alimentación, i) turbina eléctrica, j,k) bombas, l) tubo de salida, m) depósito de salida, n) lámpara externa, o) detalle del cilindro interior, p) vista en planta del fotobioreactor. Las flechas indican el camino natural del fluido a través del circuito empezando por la esquina superior izquierda. (fuente: Arias et al., sometido)

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Se presenta mediante la Figura 6.1.1, las diferentes partes que constituyen el conjunto del FBR. Se observa que para el correcto funcionamiento y posterior análisis de los datos se precisa del depósito de alimentación (1), el agitador (2), el fotobioreactor columna (3), el cable inyector de CO₂ (4), el depósito de cosechado (5), la campana direccional de luz (6), la bombilla (7), el ordenador capaz de controlar los procesos a ejecutar y los parámetros (8) y finalmente el cuadro de mandos (9).

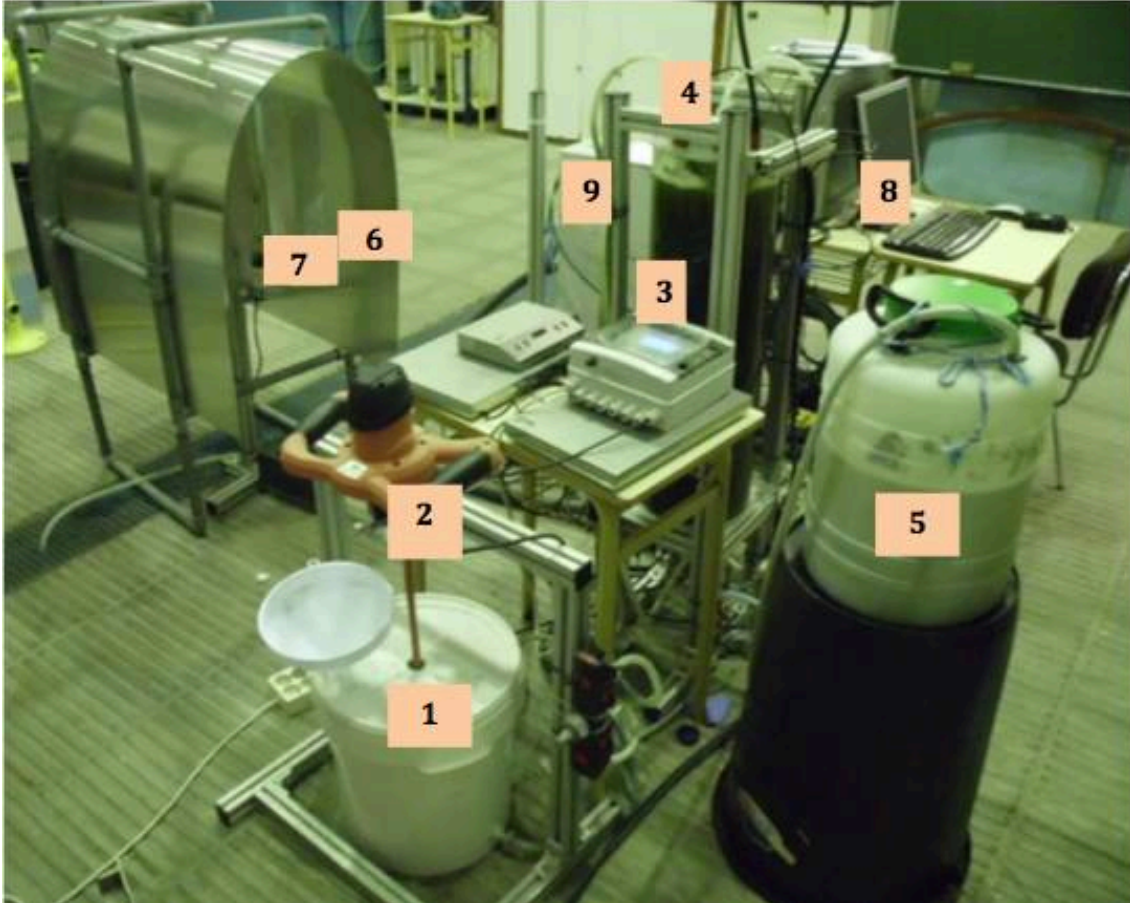


Figura 6.1.1. Partes del prototipo del FBR. Las funciones de cada uno de ellos se detallan por separado:

- Depósito de alimentación (1) y Agitador (2): en el primero se dispone el agua residual procedente de las lagunas de la terraza del edificio D1, que, junto con el digestato, tiene la finalidad de alimentar el FBR a través de vías de circulación donde se encuentran diferentes válvulas, para abrir y cerrar circuitos alternativos y una bomba. El segundo, como su nombre indica, agita la muestra para que al entrar en el FBR sea lo más homogénea posible y evitar la entrada del líquido solamente, sin los sólidos (algas).
- Fotobioreactor (3): se trata de un FBR tipo columna de una capacidad de 30 litros con una altura de 0,8 metros y de 25 centímetros de diámetro. El recipiente se compone de plástico totalmente transparente y está apoyado sobre una estructura formada por barras de aluminio (Figura 6.1.2).

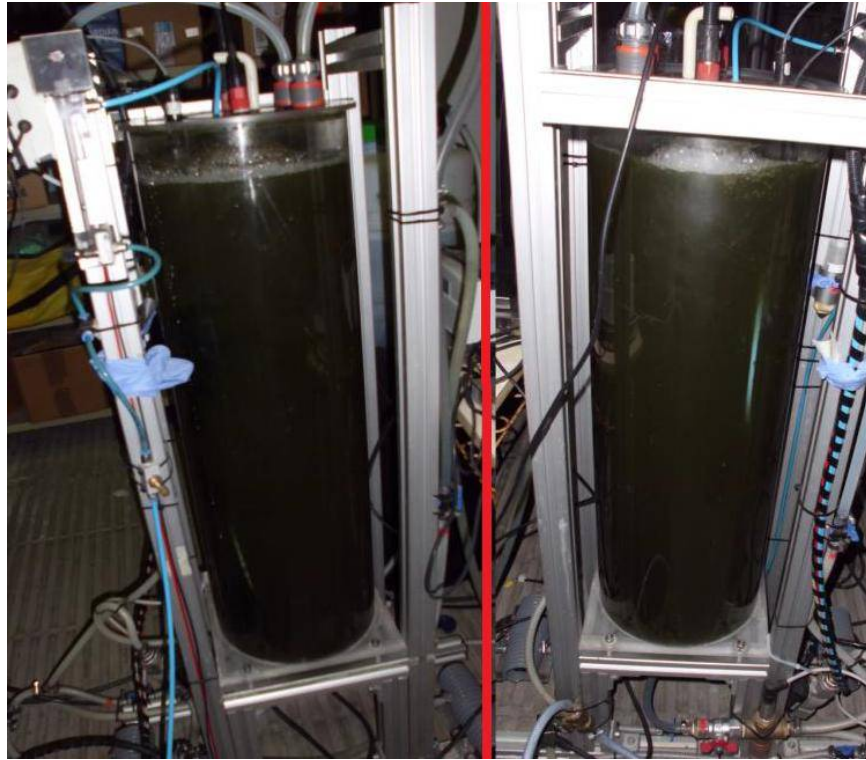


Figura 6.1.2. Vista frontal y posterior del FBR.

En la parte superior del FBR se disponen los sensores (Figura 6.1.3) que van conectados al sistema informático. Estos sensores leen los siguientes parámetros: el pH, el Oxígeno Disuelto, la Turbidez, el Volumen de agua, la irradiación lumínica y la Temperatura del reactor.

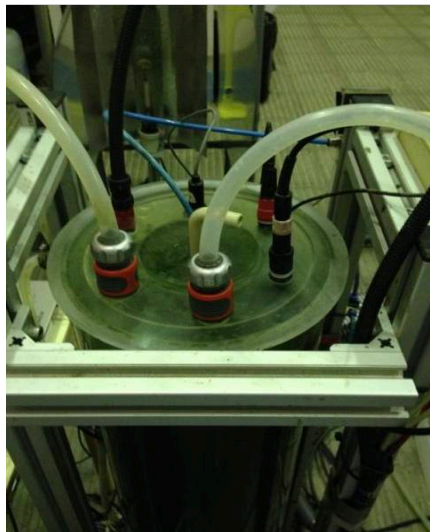


Figura 6.1.3. Vista superior del FBR, sensores.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- Inyector de CO₂ (4): mediante la recopilación de resultados anteriores al inicio de mi tesis se determinó que el pH para el cual el crecimiento de las cianobacterias era óptimo estaba entre el 8 y 9. Por ese motivo, a partir del lunes 8 de febrero de 2016 (, se configuró del programa informático MAR3 para que inyectará CO₂ de forma automática cuando el pH fuera menor a 8 y de esta forma contribuir al crecimiento óptimo de las cianobacterias.
- El Depósito de cosechado (5): tiene la función de captar el residuo que desecha el FBR una vez ha sido alimentado. La manguera situada en la parte superior es la encargada de extraer el líquido, el cual es recolectado en envases de cristal especiales para la toma de muestras y permitir su posterior análisis. El resto del líquido se queda en el recipiente, el cual se va llenando y aproximadamente una vez por semana se debe vaciar dicho depósito mediante el accionamiento de unas válvulas y bombas, se desecha a la red residual la cual tras un largo periodo, llegará de nuevo a las lagunas y acabará posteriormente en el FBR.
- Campana direccional de luz (6) y Bombilla (7): el sistema cuenta con un encendido y apagado automático cada doce horas (se enciende por la noche, de 20:00 a 8:00h), de una bombilla que proporciona una luz que pretende simular a la luz solar para que las algas puedan hacer la fotosíntesis. El sistema de irradiación lumínica cuenta de una bombilla de 20000 lx acoplada a un reflector de aluminio para enfocar la luz hacia el cultivo (Figura 6.1.4).

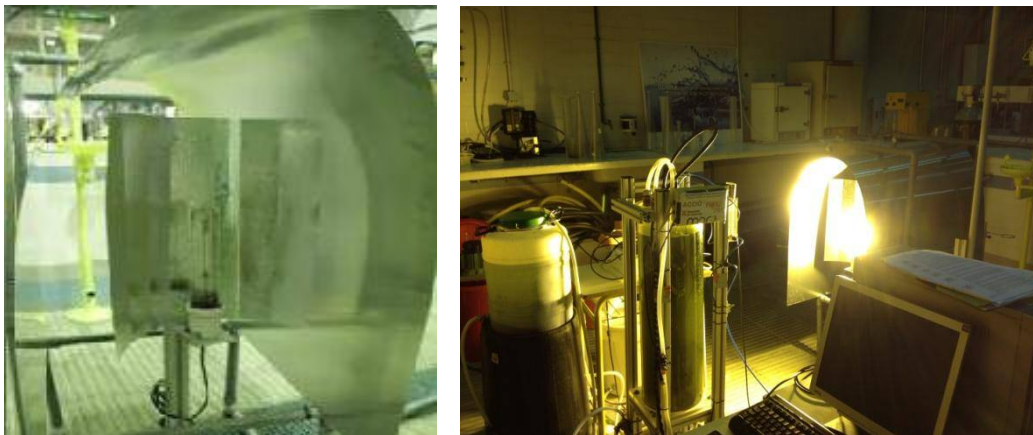


Figura 6.1.4. Bombilla con reflector y campana.

- Ordenador capaz de controlar los procesos a ejecutar y los parámetros (8): todo el sistema está conectado informáticamente al ordenador que mediante los sensores es capaz de medir varios parámetros, comentados anteriormente. El ordenador es capaz, mediante un programa informático desarrollado por FCTecnicos (MARE), controlar las diferentes variables del sistema, haciendo posible el cosechado y alimentación automática. Los datos recogidos se toman cada cuatro segundos, de forma que posteriormente se puede extraer los datos y estudiarlos mediante gráficas.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- Cuadro de mandos (9): es el encargado de controlar eléctricamente los diferentes aparatos por los que está formado todo el sistema: ordenador, bombas, electroválvula, luz, agitador, aireador, etc. (Figura 6.1.5)

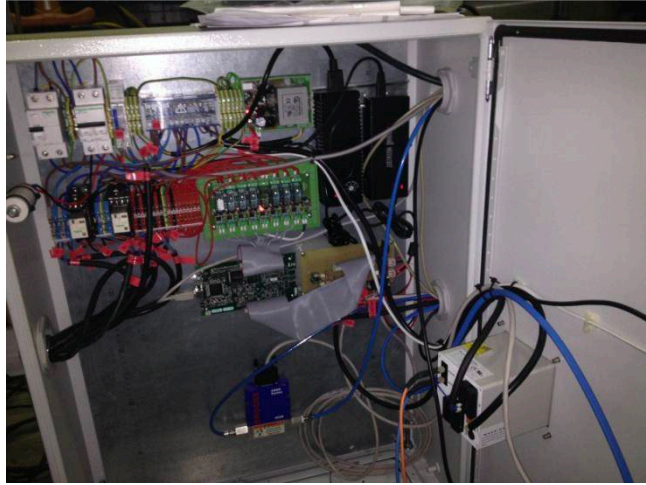


Figura 6.1.5. Vista interior del Cuadro de mandos.

- Otro elemento destacable es el Compresor (Figura 6.1.6): que inyecta aire dentro del FBR para que a la cosecha no le falta oxígeno. Al inyectar oxígeno facilitamos la reproducción de los microorganismos, ya que cuando la cosecha es abundante no es suficiente el oxígeno creado en la fase de la fotosíntesis. Además, su inyección propicia que el medio de cultivo no sedimente en el fondo del FBR y como consecuencia todos los microorganismos del interior sufren una exposición similar a la luz.

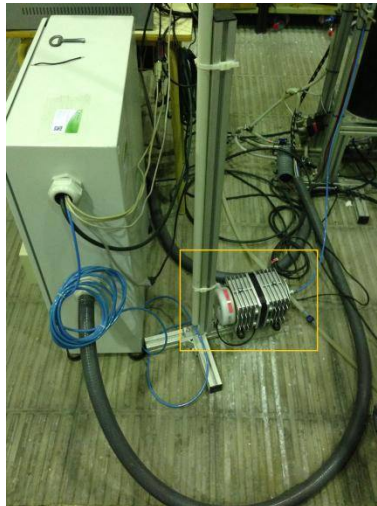


Figura 6.1.6. Compresor del FBR.

6.2. Funcionamiento del fotobioreactor

Para que el FBR funcione como un sistema cerrado semi-continuo hay que realizar una serie de procesos los cuales se explican a continuación del concepto de digestato, y de las lagunas, necesarios para entender su función en el FBR.

El *digestato* es un producto de textura viscosa y color negro, resultante del tratamiento de los lodos en los digestores, y que tiene un uso potencial como fertilizante orgánico. Éste tipo de abono permite que las cianobacterias extraigan de él los nutrientes, en déficit en el agua residual, necesarios para su reproducción y crecimiento.

El *agua residual* se obtiene de las lagunas de alta carga situadas en la terraza del edificio D1. Esta agua recibe primero de todo un tratamiento primario para evitar la entrada de grandes partículas de materia orgánica y a continuación se lleva el agua a las lagunas donde se inicia el tratamiento secundario (Figura 6.2.1).



Figura 6.2.1. Lagunas para la obtención del agua de la muestra de entrada.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- Preparación de la mezcla o alimento del FBR formado por el agua residual procedente de las lagunas de alta carga (a la derecha de la Figura 6.2.2) y del digestato procedente de los digestores anaeróbicos (a la izquierda de la Figura 6.2.2). Se vierte en el depósito de alimentación mediante un embudo.



Figura 6.2.2. A la izquierda el subproducto del digestato. A la derecha el agua residual procedente de la laguna.

- Una vez la muestra está en el depósito de alimentación, le damos al botón START (Figura 6.2.3), para que automáticamente el agitador se ponga en marcha y empiece a desechar la muestra del FBR gracias a una bomba que manda el agua al depósito de cosechado.
- Una vez el sistema ha arrojado los litros que le hemos impuesto (lunes y viernes 6 litros para compensar la falta de alimentación de sábado y domingo, y martes, miércoles y jueves 3 litros), se empieza a verter la mezcla, mediante otra bomba, hasta llegar a su máxima capacidad; la barra azul del programa se llena indicando que el proceso se ha completado.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

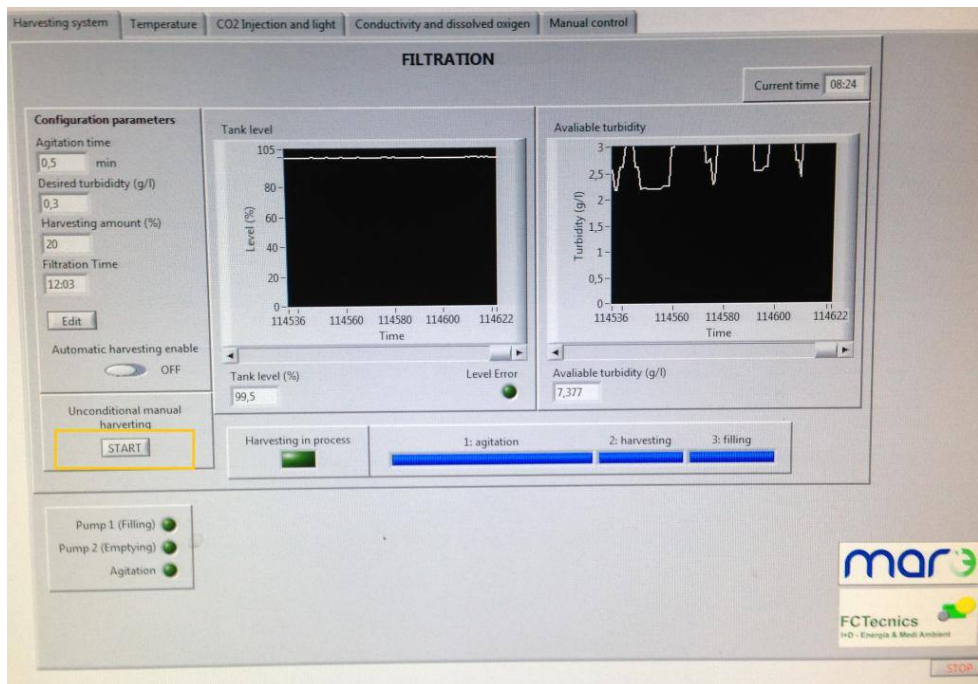


Figura 6.2.3. Pantalla del programa MAR3 después de realizar la función *harvesting*.

6.3. Descripción de los ensayos realizados

El objetivo principal de los ensayos realizados fue la cuantificación de PHB en un cultivo predominante de cianobacterias en el interior del FBR mediante la alimentación con efluente secundario, donde, para ello, fue necesario un control diario de los parámetros como el Oxígeno Disuelto, el pH, etc. La justificación viene dada a la importancia de este tipo de organismo, el cual nos permitirá, no solo tratar el agua residual que alimenta al fotobioreactor, sino que al mismo tiempo, se obtiene un subproducto procedente de éste tratamiento. Dicho subproducto son los bioplásticos, importantes por su procedencia y sustitutos de los plásticos convencionales los cuales son derivados del petróleo y a su vez mucho más contaminantes que los primeros.

Así nos interesa un cultivo con un mayor número de cianobacterias que nos genere la máxima cantidad de bioplásticos, pero a su vez, buscamos un rendimiento óptimo, ya que hay un momento en que la productividad de bioplásticos decrece y no viene dada por el número de cianobacterias, es decir, no se cumple la correlación de a más cantidad de cianobacterias, más bioplásticos se generarán, ya que su producción baja después del punto óptimo de productividad.

Durante un periodo de 94 días, se cuantificó la cantidad de PHB producidos por las cianobacterias y se procuró por el mantenimiento de dicho cultivo.. Para este estudio, se ha precisado de una serie de análisis que permiten controlar la evolución de las mismas. El estudio se empezó el pasado día 2 de febrero de 2016 y se finalizó el día 5 de mayo del mismo año. Durante este tiempo se alimento un cultivo dominado por cianobacterias en un fotobioreactor, alimentándose diariamente con digestato diluido junto a un efluente secundario.

Cabe mencionar que las microalgas consumen fósforo (P), carbono (C), hidrógeno (H) y nitrógeno (N), soltando glucosa y oxígeno (O₂) par poder reproducirse y seguir creciendo. Este mismo oxígeno es empleado por las bacterias, que junto con el nitrógeno y la materia orgánica producen amonio (NH₄) y CO₂, que utilizan las microalgas. El digestato proporcionó nitrógeno en forma de nitratos y amonio y, mediante el producto obtenido por las lagunas (efluente secundario), se consiguieron la materia orgánica y nitratos (fuente de nitrógeno) necesarios.

Se utilizó un Tiempo de Retención Hidráulico (TRH) del FBR de 10 días, es decir, que para un tanque de 30 litros supone que cada día se debía cosechar y alimentar un total de 3 litros. En la práctica, esto quiere decir que, estos 3 litros saldrán pasado unos 10 días. Estos litros que necesitamos para alimentar cada día se obtienen de la mezcla formada por el agua recogida de las lagunas junto con el digestato.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Cabe destacar que al inicio de mi tesina se instauró un sistema continuo mediante dos bombas automáticas para aplicar al fotobioreactor, condiciones más reales ya que en los fotobioreactores reales, no existe el sistema semi-continuo. Este sistema, tras dos semanas presento varios problemas que obligaron a establecer nuevamente las condiciones anteriores. Los problemas fueron los siguientes:

- Se formaron muchas algas en el depósito de alimentación. Este problema afectó en gran medida al volumen del FBR ya que en 24 horas el depósito se había vaciado a la mitad sin alimentar con el mismo volumen dado que los conductos de entrada estaban obstruidos por la gran cantidad de algas. Dado que las algas estaban en contacto con la luz, realizaban la fotosíntesis y se reproducían mucho más rápido que en el PBR.
- La muestra de salida no era representativa. Al obtener la muestra de salida mediante la bomba automática por goteo y sin dificultades (el conducto de entrada tenía que salvar un desnivel positivo de la altura del depósito) solamente se obtenían microorganismos y algas, con un contenido muy escaso de agua.

Principalmente por el segundo problema que se ha comentado, se descartó la posibilidad de realizar todos los ensayos en el laboratorio (que se explicarán en el siguiente capítulo), ya que para realizar dichos ensayos es necesaria la toma de muestras representativas y mediante ese sistema no se obtenían muestras con dichas características.

6.4. Ensayos

En este capítulo se explican los parámetros sobre los cuales se realizaron los ensayos pertinentes y el método analítico a seguir para obtener los resultados. Estos ensayos nos permiten cuantificar la calidad del agua que tratamos así como la cantidad de cianobacterias producidas.

Algunos de los parámetros son medidos directamente por unas sondas situadas en el FBR y otros se miden periódicamente en el laboratorio.

Los cultivos microalgales tienen la particularidad de ser sensibles a una serie de parámetros como la temperatura, la exposición a la luz solar, la aireación, la composición, la contaminación, etc. Es por eso que las muestras se tomaron siempre con sumo cuidado, entre las 11:30 y las 12h de la mañana y siempre utilizando el mismo tipo de recipiente para no alterar los resultados de los ensayos. La toma de muestras es, por tanto, una de las etapas más importantes para la obtención de buenos resultados tras la realización de los ensayos.

A continuación se presentan los parámetros medidos y los ensayos respectivos extraídos del “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”:

Turbidez

Es una propiedad óptica del agua y medida indirecta del grado de saturación de la materia en suspensión que contiene la muestra analizada. La turbidez está generada por la materia insoluble en suspensión y es un parámetro considerado como una buena medida de la calidad del agua (a menor turbidez, mayor calidad tendrá el agua). Este parámetro afecta a la penetración de la luz, lo que redundaría en una menor productividad primaria.

- *Metodología:* consiste en hacer pasar un rayo de luz incidente a 90 grados en la muestra y medir la intensidad de la luz que se dispersa a través de una muestra del FBR. El instrumento utilizado para su medida es el nefelómetro o turbidímetro (Figura 6.4.1). Se mide en Unidades Nefelométricas de Turbidez (UNT).



Figura 6.4.1. Turbidímetro utilizado en el laboratorio.

Oxígeno Disuelto (OD)

Como su nombre indica, se trata de un parámetro que indica la cantidad de oxígeno que está disuelto en el agua y es el indicador principal de la actividad algal. Este oxígeno proviene del aire que se ha disuelto en el agua y del resultado de la fotosíntesis realizada por las microalgas. Como ya se ha comentado, las bacterias requieren oxígeno para descomponer desechos orgánicos y, por lo tanto, una mayor cantidad de bacterias, implica una disminución del oxígeno presente en el agua.

- *Metodología:* Dado que el oxígeno disuelto varía mucho en función de la temperatura y el tiempo, este ensayo se realizaba antes de cualquier otro para la obtención de resultados en igualdad de condiciones. Se vierten aproximadamente 100ml de muestra del FBR en un vaso de precipitados y se introduce la sonda con su caracterizada membrana sensible que conforma el medidor de oxígeno disuelto (Figura 6.4.2) y se espera a que converja a un número. La unidad utilizada en este caso fue el ppm (partes por millón) de OD respecto a la cantidad máxima que puede contener un litro de cualquier líquido.



Figura 6.4.2. Medidor de OD utilizado en el laboratorio.

pH

El pH es la unidad de medida que sirve para establecer el nivel de acidez o alcalinidad de una sustancia. Es un número que está comprendido entre 0 y 14 e indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en el líquido. Su valor nos indica de forma indirecta la actividad microalgal de manera que a mayor acidez, es decir, menor pH, se reduce la actividad microalgal. Por tanto, una de las tareas previas fue la de fijar el valor óptimo de pH para evitar la muerte de toda actividad cianobacteriana. Los valores de pH fueron obtenidos mediante el programa informático MAR3, el cual recopila los valores del pH en intervalos de 1 minuto.

Amonio (NH₄)

El amonio presente en un cultivo, es una medida de la cantidad de materia orgánica con carácter proteico, que en consecuencia significa nitrógeno disponible para que las microalgas puedan ejercer la función de sintetizar las proteínas. El amonio presente en el FBR procede del digestato y de las bacterias, tras su desechado, después de ingerir la MO y el O₂.

- *Metodología:* para obtener los valores de amonio presentes en el FBR se utilizó el método de Salorzano o de indofenol. Con la muestra, tanto de la entrada como del FBR, filtradas (Figura 6.4.3). Primero preparamos las tres muestras: en un Erlenmeyer, 50 ml de agua destilada para realizar la muestra llamada “blanco”, (utilizada para tarar el espectrofotómetro antes de medir a una longitud de onda de 640), en otro Erlenmeyer se añadirán 50ml de la muestra del FBR y en el último, 5ml de muestra de entrada junto con 45ml de agua destilada. Posteriormente se añadirá a cada Erlenmeyer 2ml de solución de nitroprusiato (para intensificar el color), 2ml de solución fenol y finalmente 5ml de solución oxidante (preparada mediante la mezcla de 40ml de solución alcalina y 10 ml de lejía de uso doméstico) Dejándolo reaccionar durante 90 minutos, se obtienen las muestras ya coloridas (Figura 6.3.4). La intensidad del azul es proporcional a la presencia de nitrógeno amoniacal en la muestra. Posteriormente, se mide en el Espectrofotómetro (Figura 6.3.5), proyectando un haz de luz monocromática a través de la muestra y se mide la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra con una longitud de onda de 640 nanómetros.



Figura 6.4.3. Filtrado de muestras. Figura 6.4.4. Muestras de amonio pasado los 90 minutos.



Figura 6.4.5. Espectrofotómetro utilizado en laboratorio.

Alcalinidad

Es la capacidad del agua para neutralizar ácidos, es decir, para amortizar los cambios de pH al añadir un elemento más ácido o básico. Dicha capacidad de amortiguación viene determinada por los equilibrios químicos del sistema carbonato- bicarbonato. Tiene un papel esencial en el hábitat del medio microalgal ya que mide la cantidad de carbono disponible para el medio.

- *Metodología:* para medir este parámetro se utiliza un vaso de precipitados para cada muestra junto con un agitador. Para la muestra del FBR se necesitan 100ml mientras que para la de la entrada tan solo se necesitan 50ml. La alcalinidad se determina con una solución estándar de un ácido mineral fuerte a los puntos sucesivos de equivalencia del bicarbonato y el ácido carbónico, para ello se ha utilizado el ácido clorhídrico (HCl)., Antes de añadir el HCL, se mide el pH mediante un pH-metro, y se va añadiendo HCL lentamente mediante una bureta una cantidad de HCL hasta

conseguir que el valor del pH baje a 4,5 (Figura 6.4.6), Una vez llegamos al valor de pH de 4,5, anotamos la cantidad de HCl necesaria para cada muestra.

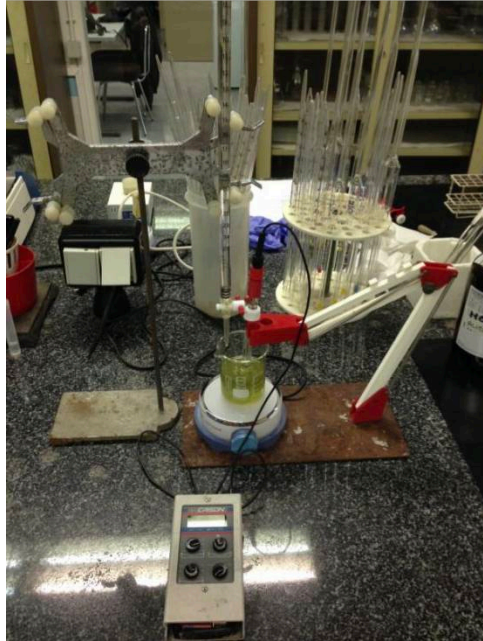


Figura 6.4.6. pH-metro, soportes, vaso de precipitados y agitador para el ensayo.

Sólidos en suspensión (SS)

En este ensayo, se pretende cuantificar los sólidos sedimentables y no sedimentables, que pueden ser retenidos en un filtro. Estos sólidos pueden tener una procedencia tanto orgánica como inorgánica. Se diferencia la fracción de sólidos en suspensión totales (SST), las partículas que incluyen sólidos disueltos, suspendidos y sedimentables los cuales tras la evaporación y secado de la muestra siguen presentes en el filtro, dando una idea de la fracción de sólidos presente en la muestra tomada. Por otro lado encontramos los sólidos en suspensión volátiles (SSV) que corresponden con la porción de materia orgánica que se pierde tras calentar la muestra en la mufla a 550°C y por tanto, es una medida indirecta de la fracción de MO biológica contenida en la misma muestra y se calcula como la diferencia entre los sólidos totales y los volátiles.

- *Metodología:* Se necesitan tres días consecutivos para realizar el ensayo en su totalidad. El primer día se cogen seis filtros de papel (Figura 6.4.7) y se numeran para su posterior pesado (tres se destinarán para la entrada y tres para la muestra del FBR) y se pasan por un filtrado de agua destilada. Una vez las muestras son mojadas, se introducen en la mufla (Figura 6.4.8), la cual esta a una temperatura de 550°C, y tras 20 minutos, se retiran de la mufla y se introducen en la estufa a 100°C durante 24 horas para que las condiciones de humedad no afecten en el peso. Al día siguiente, se retiran de la estufa y una vez alcanzan la temperatura ambiente, se pesan. Una vez pesados, se filtra un total 15ml a través de cada filtro de la muestra de entrada y 25ml en los filtros del FBR. Una vez realizada esta tarea, se vuelven a introducir de nuevo a la estufa durante 24 horas (Figura 6.4.9). El tercer y último día, tras dejar que se enfríen, se pesan, se introducen en la mufla a 550 °C durante 20

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

minutos y pasado este tiempo se dejan enfriar a temperatura ambiente y se vuelven a pesar.(Figura 6.4.10)



Figuras 6.4.7. y 6.4.8. Filtros con muestra seca y Mufla empleada en laboratorio.



Figuras 6.4.9 y 6.4.10. Estufa utilizada en laboratorio y Balanza utilizada en el laboratorio.

Clorofila

La clorofila son los pigmentos de color verde que se encuentran presentes en la microalgas, por tanto, su existencia nos revela la existencia de estos microorganismos en el interior del FBR y que tienen la característica de realizar la fotosíntesis. La finalidad de este ensayo es la de estimar la biomasa algal que se encuentran en suspensión en la muestra.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- **Metodología:** se necesitan dos días consecutivos para realizar este ensayo. Para empezar necesitamos tomar de la muestra del FBR 10 ml para cada tubo de clorofila; para hacerlo lo más equitativo posible se vierten 5ml en el primer tubo y en el segundo y después otros 5ml en las dos. Una vez están las dos muestras preparadas se centrifugan durante 10 minutos a 4.200 revoluciones por minuto. (Figura 6.4.11), de esta manera todos los sólidos de la muestra decantarán en el fondo de cada tubo respectivamente y se pueda separar el líquido sobrenadante sobrante.. Se añaden 3 ml de acetona alcalinizada, se mezcla y se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 500 r.p.m. y pasado este tiempo se añaden 5 ml más de acetona alcalinizada, se tapan con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz y la realización de la fotosíntesis en el interior de los tubos y se guardan en la nevera durante 24 horas. El segundo día, se centrifugan las dos muestras durante 20 minutos a 2.000 r.p.m. y transcurrido este tiempo se separa el sobrenadante de nuevo, pero esta vez se conserva, ya que habrá que medirlo a distintas longitudes de onda (750, 664, 647 y 630nm) en el espectrofotómetro para determinar los valores de la clorofila (Figura 6.4.12),

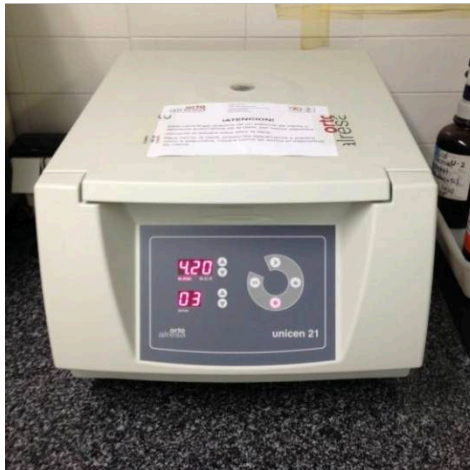


Figura 6.4.11. Centrifugadora

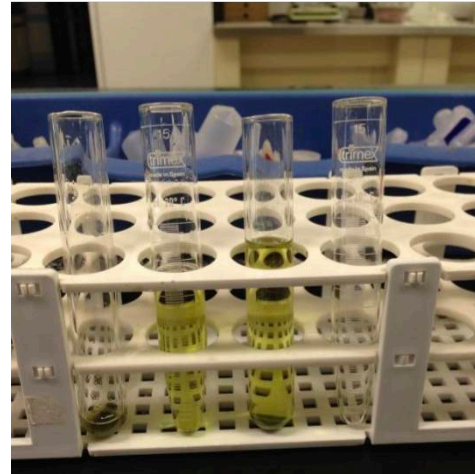


Figura 6.4.12. Muestras para la clorofila.

DQO (Demanda Química de Oxígeno)

Este parámetro mide la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas al estar en contacto con un agente químico que esté disuelto o en suspensión en una muestra líquida,. Es una medida indirecta de la cantidad de MO de la muestra y uno de los parámetros que caracteriza la correcta depuración del agua residual.

- **Metodología:** para este parámetro se realiza la DQO soluble, es decir, tanto la muestra de entrada como del FBR, han de ser filtradas previamente.. Se preparan 3 tubos de cada muestra (blanco, entrada y FBR) para evitar tomar valores erróneos. En cada uno de ellos se añadirán 2,5ml de agua destilada, 2,5ml de la muestra filtrada de entrada y 2,5ml de la muestra filtrada del FBR. A continuación se añadirá a todos los tubos 1,5ml de solución digestora (dicromático potásico) y 3,5ml de ácido sulfúrico. Posteriormente se dejan reaccionar durante 2 horas en una digestora (termoreactor) a 150°C (Figura 6.4.13). Transcurrido el tiempo de 2 horas se dejan enfriar a temperatura ambiente y se hace una lectura de los tubos con la ayuda de

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

un espectrofotómetro (Figura 6.4.14). Se expresa en miligramos de oxígeno diatómico por litro ($\text{mg O}_2/\text{L}$).



Figura 6.4.13. Termoreactor utilizado para la DQO en el laboratorio.

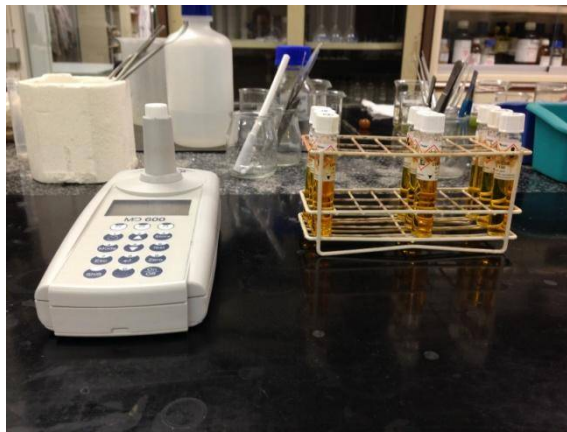


Figura 6.4.14 Lectura de los tubos utilizando el Espectrofotómetro de DQO.

Aniones:

En este análisis se cuantifica los nutrientes que existen en el medio cultivo, esto nos permite saber hacia dónde evolucionará dicho medio, es decir, si no hay nutrientes sabemos que los microorganismos no sobrevivirán y, por tanto, hemos de incentivar su crecimiento alimentándolo. Los nutrientes correspondientes que se analizan son los nitritos (NO_2), nitratos (NO_3), ortofosfatos (PO_4^{3-}) y sulfatos (SO_4^{2-}) que son los necesarios para el crecimiento.

- Metodología: se determinan dichos parámetros mediante 25 ml de muestra filtrada, tanto de entrada como del FBR, por cromatografía iónica en el cromatógrafo del mismo laboratorio. Este parámetro lo determina el Sr. Javi, el responsable del laboratorio.

Cuantificación de Bioplásticos

Este es el parámetro a evaluar más importante de toda la tesina ya que el objetivo principal, consiste en la obtención de una gran cantidad de PHB. En este análisis se cuantifica el porcentaje de bioplásticos que se encuentran en el cultivo del fotobioreactor realizándolo una vez cada 15 días. La extracción y cuantificación de bioplásticos se ha realizado mediante el método de la extracción con cloroformo o método del ácido crotómico. El ensayo se realizaba siempre por duplicado para corroborar resultados ya que un pequeño fallo en el procedimiento puede hacer variar mucho el resultado.

- *Metodología:* la cuantificación de bioplásticos se obtiene primero de todo realizando un ensayo similar al de los sólidos, pero esta vez introduciendo una muestra de 25ml en el interior de crisoles. Estos crisoles se tararán, se introducirán los 25 ml de muestra y se pesará el total de muestra introducida en el crisol. Se dejará evaporar en la estufa a 100°C durante 24 horas y al día siguiente se pesarán antes y después de introducirlos en la mufla durante 20 minutos, dejándolos enfriar previamente a pesarlos.

Una vez finalizado el proceso anterior, se realiza la centrifugación de la parte más densa del cultivo microalgal de la muestra de 1,5 litros. Dicha muestra se deja secar durante 24 horas a una temperatura de 40 °C para que evapore el agua pero no queme materia. Pasadas las 24 horas se procede a su trituración hasta obtener partículas homogéneas.

Al día siguiente se pesan 10 gramos de la muestra y se introducen en un tubo de la DQO y se realiza otra replica añadiendo también 10mg de muestra. A estos tubos hay que adicionar 3ml de hipoclorito de sodio al 15% w/v., añadir 5 gotas de NaOH al 50% y añadir 3ml de cloroformo en este mismo orden. Se cierran los tubos y se introducen en un baño de agua destilada a 70°C(Figura 6.4.15) durante una hora y media y se agita la muestra mediante el vórtex durante 1 minuto cada 15 minutos aproximadamente. Pasado este tiempo se centrifugan a 4.200r.p.m. durante 5 minutos y se retira el hipoclorito de sodio, la lejía con pipeta Pasteur (una por muestra). Se incorporan 3ml de agua desionizada y se agitan en el vórtex durante dos minutos. A continuación de vuelven a centrifugar durante 3 minutos a 4.200r.p.m. y se retira el agua destilada. Hay que dejar cierto volumen de agua para distinguir los sólidos de las diferentes fases. Se añaden 3ml de cloroformo y se ponen al baño durante 1 minuto a 100°. Pasado este tiempo se centrifugan otra vez a 4.200r.p.m. durante 3 minutos. Se toma una pipeta Pasteur nueva por muestra y se retira el cloroformo sin tomar sólidos ni agua y se vierte en un matraz aforado de 10ml. Se adicionan otros 2ml de cloroformo en el tubo, se calienta durante 1 minuto a 100°C y posteriormente se agita con el vórtex durante 3 minutos. Se toma el cloroformo y se vierte en el matraz. Se enrasa con cloroformo hasta llegar al volumen de 10ml (Figura 6.4.16). Tomamos una alícuota de 1ml y se vierte en un tubo para su secado y cuantificación pasadas 24 horas.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Al segundo día se introducen los tubos durante 10 minutos en un vaso de precipitados con agua desionizada a 100°C una vez han sido llenados con 10ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Se dejan enfriar, se agitan bien y una vez desaparecen las burbujas ya podemos medir a una longitud de onda de $\lambda=235$.



Figura 6.4.15 Muestras en agua destilada a 70°C.



Figura 6.4.16. Cloroformo contenido en matraz de 10ml.

Especies microalgales

La identificación de las especies presentes en esta tesina han sido realizados mediante el microscopio óptico Nikon Optiphot (Figura 6.4.17) y con la ayuda del libro “Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce: La vida en una gota de agua”.



Figura 6.7.17. Microscopio Nikon Optiphot.

7. RESULTADOS OBTENIDOS

En este apartado se van a incluir todos los resultados que se han obtenido de los análisis explicados en el apartado anterior. Al inicio del estudio se diferenciaron únicamente las muestras de entrada, obtenida del interior del depósito de alimentación, una vez encendido el agitador para intentar que dicha muestra fuera lo más homogénea posible. Recordemos que la muestra de entrada es la suma del agua procedente de unas lagunas que tratan agua residual decantada y del digestato (efluente de un digestor anaeróbico alimentado con la biomasa producida en las lagunas) y la muestra de salida, procedente del interior del fotobioreactor tras su vaciado diario.

Así mismo, de todos los valores numéricos que se han obtenido durante todos los análisis y los cuales se han recopilado en un Excel, se han extraído unas gráficas para poder comparar fácilmente los valores a la entrada y a la salida del fotobioreactor para los parámetros que se indican a continuación:

- Sólidos: una vez por semana.
- Amonio: dos veces por semana. Alcalinidad: dos veces por semana
- DQO: una vez por semana.
- Aniones: dos veces por semana.

Por otro lado, una vez realizadas las interpretaciones de los resultados obtenidos a partir de los ensayos y de las gráficas de los parámetros anteriores, se incluirán las gráficas e interpretaciones de los valores obtenidos para los parámetros analizados únicamente a la salida del fotobioreactor:

- Turbidez: diariamente.
- Oxígeno disuelto: diariamente.
- pH: diariamente.
- Clorofila: dos veces por semana.
- Cuantificación de bioplásticos una vez cada 15 días
- Evolución del cultivo microalgal: 1 vez por semana mediante el uso del microscopio.

Se incluirán en el anexo 1 las tablas que contienen todos los datos recopilados durante el periodo de estudio y mediante las cuales se representaron las gráficas del siguiente capítulo.

7.1. Sólidos totales

El análisis de sólidos totales es un indicativo de la biomasa existente en nuestro cultivo, por tanto, un mayor o menor número indica que la biomasa ha aumentado o disminuido, respectivamente. Por otro lado, los volátiles representan la cantidad de materia inorgánica que pertenece a los mismos sólidos totales. Así pues, la diferencia entre los sólidos totales y los volátiles nos indicará la materia orgánica existente en la muestra.

Para este análisis se han ensayado tres filtros de cada muestra y se ha calculado un promedio para cada caso. En la siguiente gráfica (Figura 7.1.1), se distinguen los sólidos totales (SST) y los sólidos volátiles (SSV) de la entrada, mientras que en la gráfica 7.1.2, los valores del FBR, ambas gráficas en g/L, a fin de poder comparar las muestras de la entrada y la salida. Se obtiene a través de la gráfica, mediante la diferencia entre los puntos de SST y SSV del mismo día, la materia orgánica (MO) perdida durante la mufla.

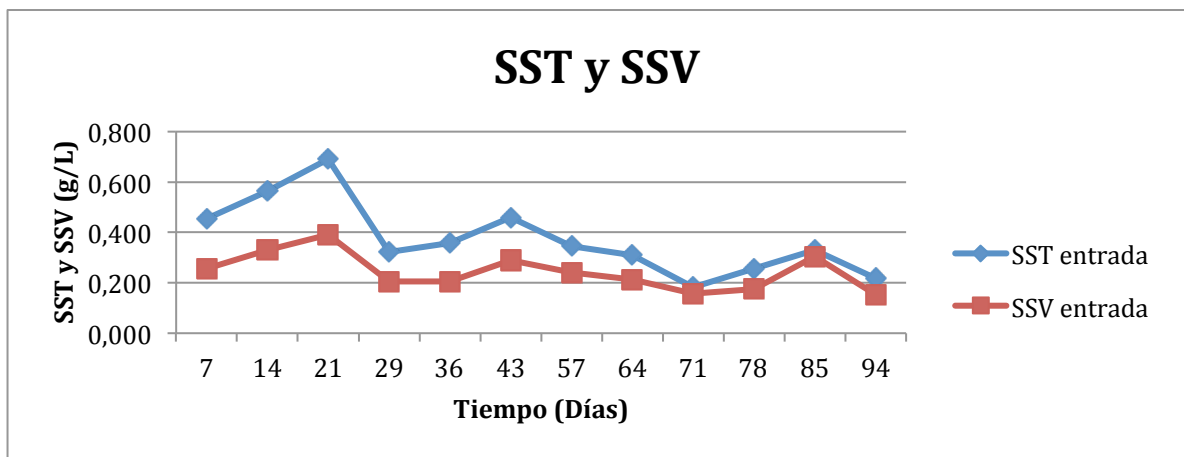


Figura 7.1.1. Sólidos totales y volátiles a la entrada.

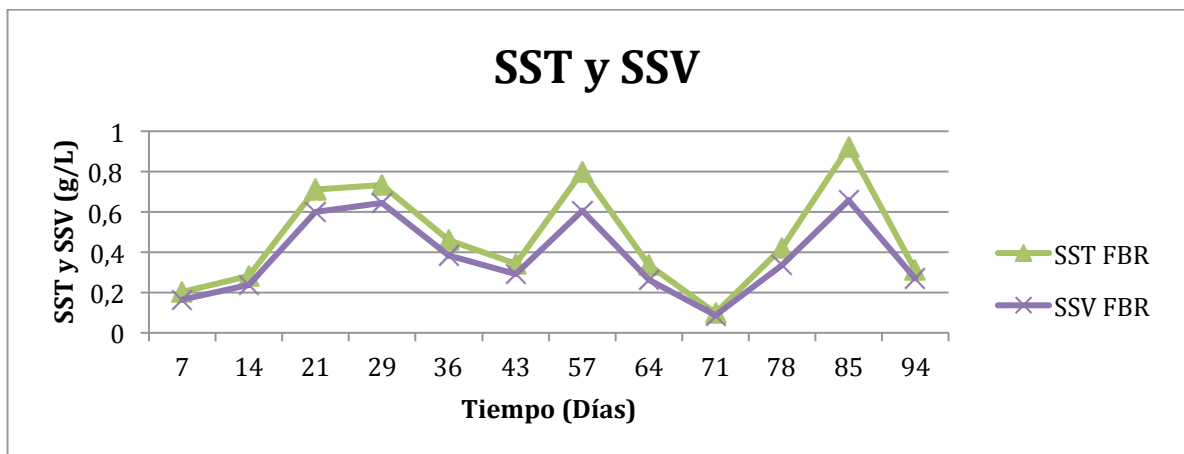


Figura 7.1.2. Sólidos totales y volátiles en el FBR.

Según los datos que nos proporciona el gráfico podemos ver que la muestra de entrada siempre se mueve en valores comprendidos entre 0,6 y 0,2 g/l mientras que los volátiles están en torno a 0,3 g/l siendo siempre inferiores a los totales.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

En cuanto al crecimiento de los sólidos a la salida del fotobioreactor se observan varios picos, siendo el mayor valor obtenido un total de 0,92 g/l. Los volátiles se han mantenido proporcionales al crecimiento de los totales durante todo el ensayo, por tanto, esto indica que el agua residual junto con el digestato contenía siempre una composición muy similar de microorganismos, materia inorgánica, etc.

Otros estudios similares (Wang, B., 2010) obtuvo valores de sólidos totales a la salida del fotobioreactor de 4,00 g/l o el de (Pérez V., 2012), que obtiene valores de hasta 6,00 g/l con tiempos de retención hidráulicos de 5 días y aumentando la concentración de nutrientes, lo que llamamos el digestato. Viendo estos datos nos damos cuenta que todavía hay aspectos que mejorar para poder llegar a esos resultados (aumentar la concentración de nutrientes, por ejemplo).

Cabe mencionar que dado al sistema continuo se consiguió un aumento de la biomasa al principio pero no era representativo del interior del fotobioreactor como se ha comentado anteriormente. Aun y así, fue en los últimos días del ensayo cuando se obtuvieron los valores más elevados y exceptuando el valor del día 71, el resto son superiores al inicio, por tanto, la biomasa fue en crecimiento.

7.2. PHB

Los polihidroxiбутиратос son polímeros capaces de acumular hasta un 80% de su peso seco en algunas de sus bacterias, como es el caso de la *Ralstonia eutropha*. La presencia de PHB es un indicativo de los polímeros de origen vegetal presentes en el cultivo. La cantidad de PHB es un indicativo indirecto de la cantidad de cianobacterias. A continuación se muestran las Figura 7.2.1 y 7.2.2 representando los valores en mg de PHB por cada gramo de muestra y el porcentaje de PHB por cada gramo de muestra respectivamente.

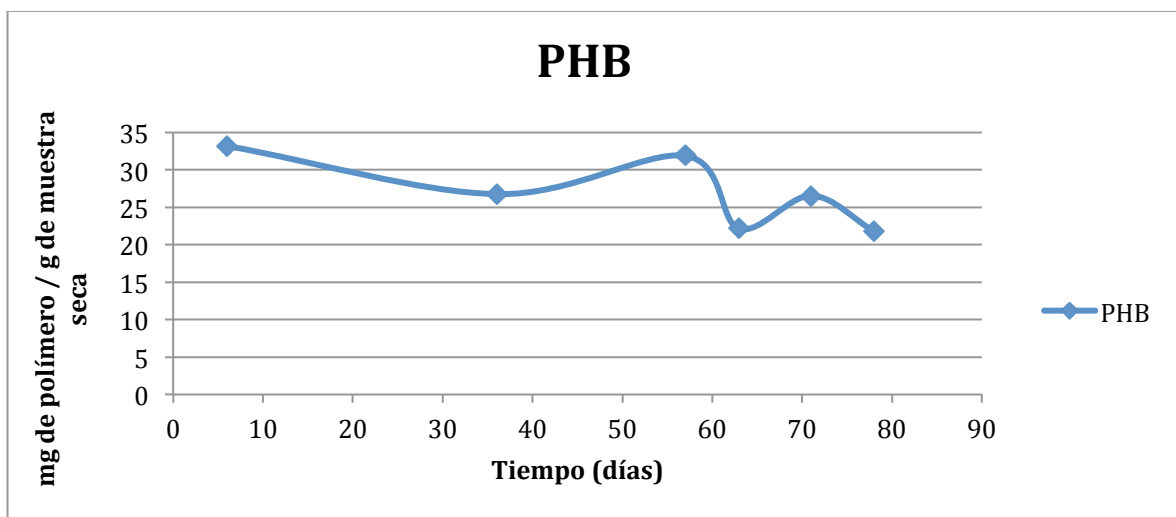


Figura 7.2.1. Miligramos de PHB por cada gramo de muestra seca del FBR.

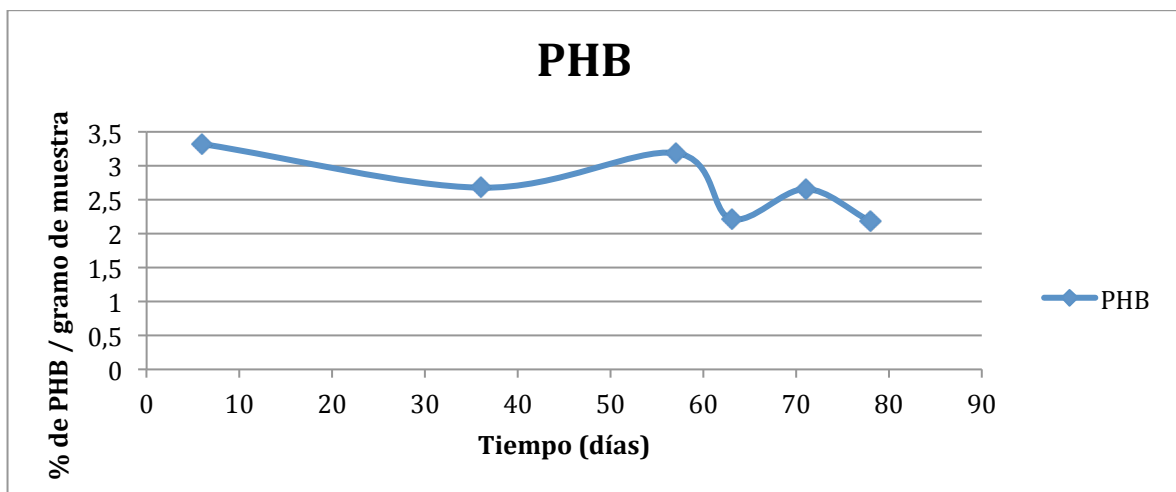


Figura 7.2.2. Porcentaje de PHB por cada gramo de muestra seca del FBR.

En el caso de la presente tesina, se obtuvo un valor máximo de 33,21mg de polímero por gramo de muestra seca frente a un mínimo no muy alejado de éste, 21,81mg/g. Se obtuvo por tanto una media del 2,7% de media de producción de PHBs por cada gramo de muestra, según nos muestra la figura 7.2.1.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Estos datos fueron muy satisfactorios teniendo en cuenta la falta de aplicación de métodos más costosos para aumentar la productividad, mediante sistemas de adición de carbono, la principal fuente de crecimiento de las cianobacterias para producir bioplásticos en su interior. Dada la falta de nitrógeno en la entrada, las bacterias sufrieron una situación de estrés nutricional y fueron capaces de almacenar más polihidroxibutiratos (PHB), así como polihidroxialcanoatos (PHA). Otros estudios han obtenido resultados de alrededor del 6% (Campbell, et al. 1982) y del 7% (Sudesh et.al 2002). Por tanto, se han obtenido resultados muy positivos mediante la aplicación del método del cloroformo.

7.3. Turbidez

La turbidez se trata de una medida indirecta de la cantidad de biomasa presente en el FBR. La unidad de medida es la Unidad Nefelométrica de Turbidez (UNT). A mayor cantidad de biomasa, mayor será la turbidez. A continuación se muestra en la Figura 7.3.1 los valores de la turbidez obtenidos durante el periodo de estudio.

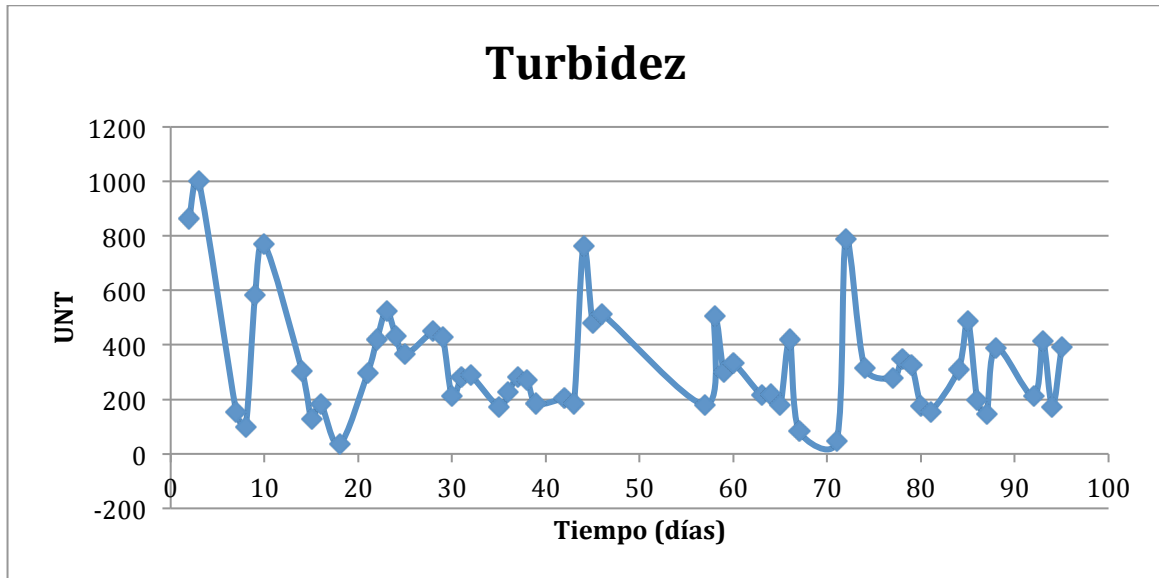


Figura 7.3.1. Turbidez en el interior del FBR medida en UNT.

Otra vez más, comparando la gráfica de la turbidez junto con la de los sólidos en el FBR, se puede apreciar la misma tendencia de crecimiento, con los valores pico en los días 2, 45 y 72, de la misma manera que los valores mínimos. El máximo valor que se obtiene es de 1000 UNT y dada la falta de nutrientes comentados anteriormente, se puede apreciar la disminución del cultivo microalgal hasta valores de turbidez de 300 UNT aproximadamente.

7.4. Amonio

El amonio (NH_4) es la fuente de nitrógeno importante para las microalgas ya que lo necesitan para sintetizar las proteínas. La presencia de amonio es indicativa de materia orgánica de carácter proteico, que como consecuente significa nitrógeno disponible para las microalgas.

Parte del nitrógeno presente en el agua residual se encuentra disponible para el cultivo microalgal en forma de amonio. La siguiente gráfica (Figura 7.4.1) expresa los resultados obtenidos en el análisis pertinente en mg/L de amonio.

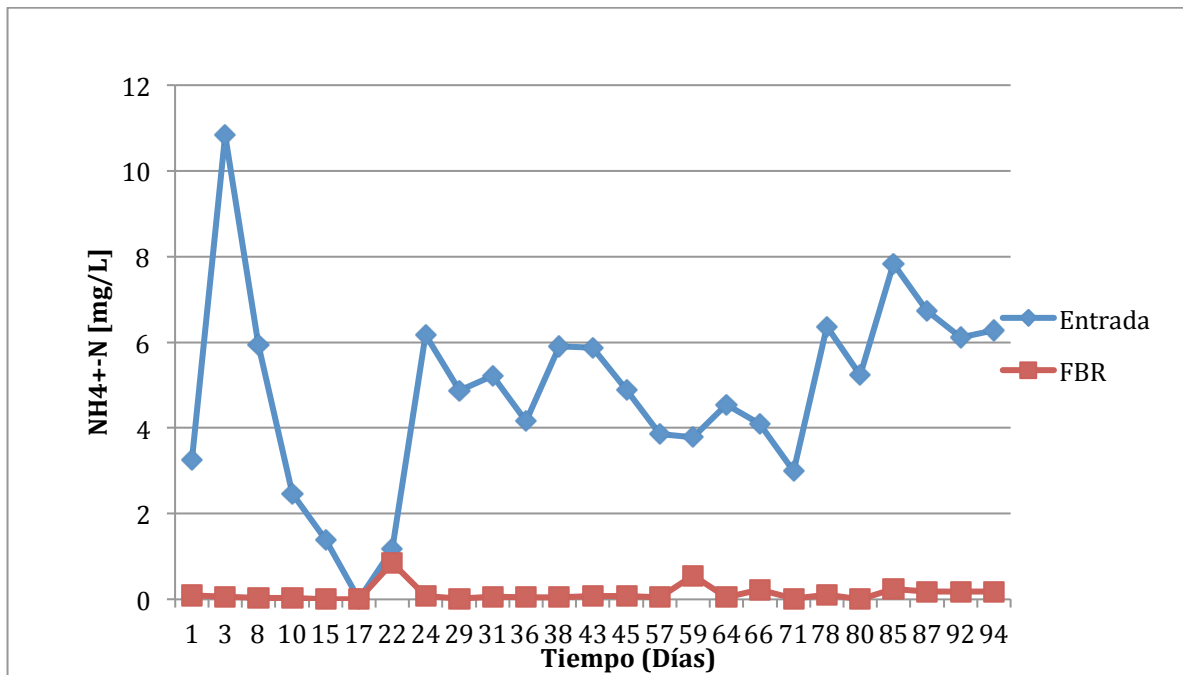


Figura 7.4.1. Amonio en la entrada y FBR.

Como se puede observar en el gráfico, la muestra de entrada al fotobioreactor contiene una cantidad de amonio mucho mayor que la de la salida. Este valor de aproximadamente cero en todos los días de análisis se debe al consumo de amonio en el interior del FBR por las microalgas.

Dado que el pH estuvo durante todo el período en un valor entorno a 8, puede ser un indicativo de que dicho consumo de nitrógeno fuera debido al proceso conocido como la volatilización del amonio, proceso muy importante en situaciones de pH altos. Ambos parámetros están relacionados entre sí de tal manera que cuanto mayor es el pH, mayor es la volatilización del amonio (García, 2000). Cabe mencionar que dado que el pH fue regulado automáticamente mediante la inyección de CO_2 , no se ha podido comprobar que la correlación existente entre pH y volatilización sea aplicable en todos los casos.

Por lo que se refiere al tratamiento de eliminación de nutrientes mediante el FBR, se puede afirmar que es un tratamiento muy efectivo para reducir casi por completo el nitrógeno amoniacal.

7.5. Alcalinidad

La alcalinidad es un parámetro que nos proporciona una medida indirecta de la cantidad de carbono que está presente en el medio de cultivo. Cuanto más alcalino es un medio, mayor concentración de carbono tiene. Como se ha comentado anteriormente, es muy importante para el crecimiento de las cianobacterias un elevado contenido de carbono. La alcalinidad se mide como indicador de la capacidad tampón del pH.

A continuación se puede diferenciar en una gráfica (Figura 7.5.1), los valores de la alcalinidad obtenidos del FBR, en mg/L de CaCO_3 :

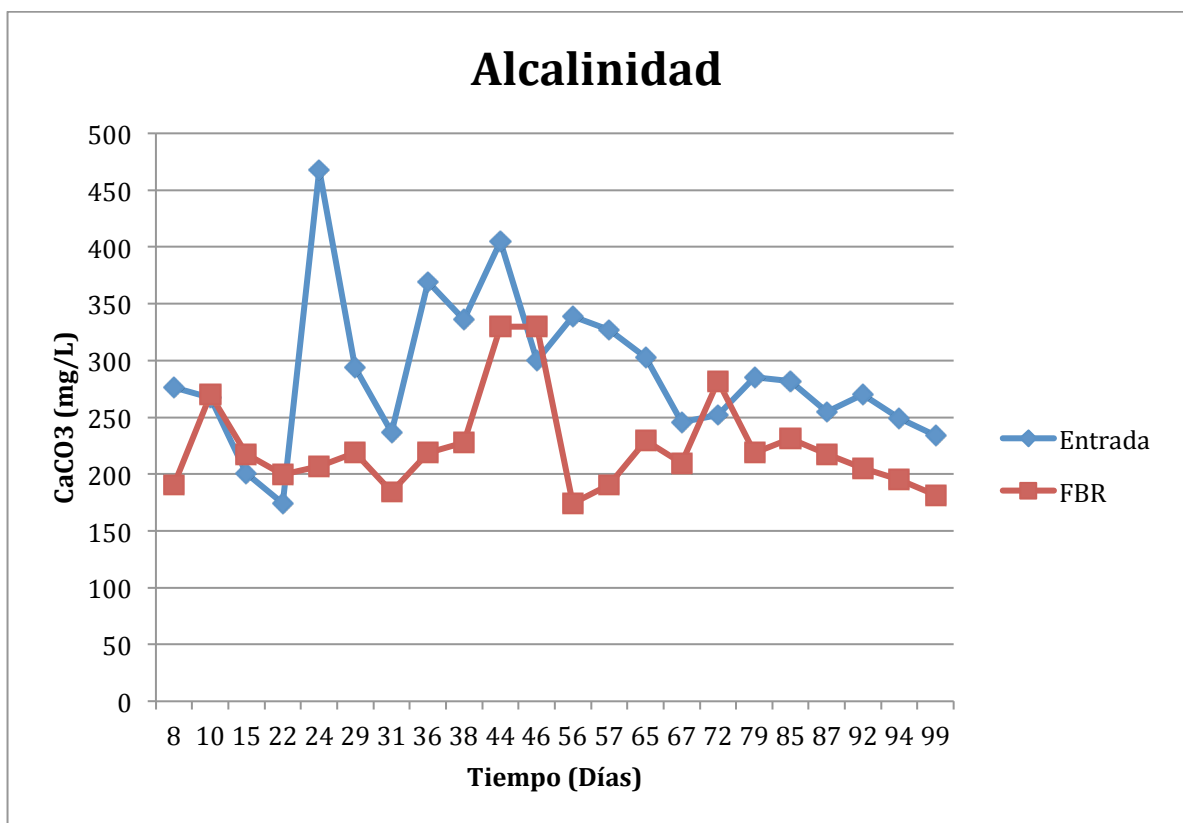


Figura 7.5.1.. Alcalinidad a la entrada y FBR.

Como se puede observar en la gráfica, en el interior del fotobioreactor se produce un consumo del carbonato cálcico procedente del agua residual junto con el digestato. Al principio del estudio se observan valores muy altos a la entrada y la mayor parte de dicho carbono es consumido por las cianobacterias del interior.

Esta gráfica además indica la presencia de carbono inorgánico lo cual es bueno para el favorecimiento del crecimiento celular de las cianobacterias ya que éstas, se abastecen de dicho carbono para producir bioplásticos.

En el período final del estudio, se puede ver que la cantidad de carbonato a la entrada era mucho menor, afectando así a la cantidad disponible y de forma indirecta a la reproducción del cultivo. Se puede correlacionar la alcalinidad con los sólidos totales de tal manera que a mayores cantidades de carbono, nitrógeno, nitratos y amonio, se produce un crecimiento mayor del cultivo microalgal.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Comparando los valores obtenidos a la salida del fotobioreactor con los valores medios que se encuentran en el agua potable, se observa que durante la mayor parte del proceso, este agua no está dentro de los valores medios de potabilidad (10-250mg CaCO₃/L).

7.6. DQO

Se ha realizado la cuantificación de la DQO disponible (mg/L) tanto en la muestra de entrada como en el FBR para determinar la cantidad de materia orgánica. Como ya se ha comentado, es un valor importante para la depuración de aguas, pues de ella depende la calidad del agua y, además, se controla en su salida para que ésta cumpla con los requisitos establecidos por ley.

A continuación se presenta la gráfica de los valores de la DQO de ambas muestras (Figura 7.6.1):

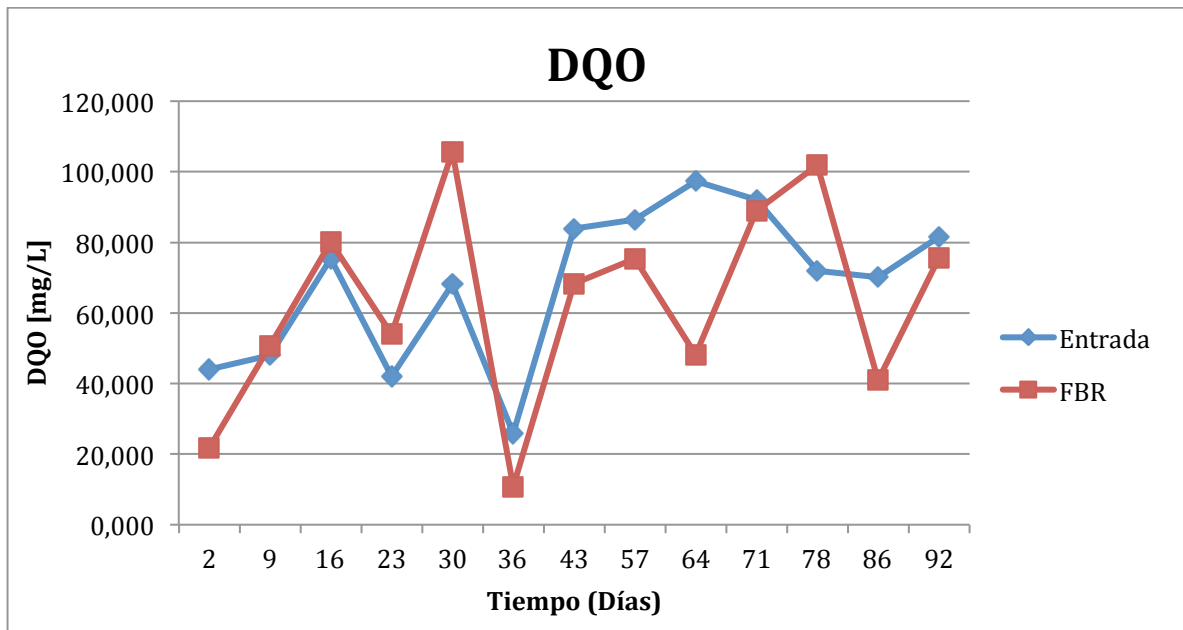


Figura 7..6.1. DQO a la entrada y FBR.

Según la gráfica podemos detectar algunos valores anómalos ya que la DQO en la entrada del fotobioreactor debería encontrarse siempre por encima de la muestra de salida. Esto se debe a la depuración de el agua y por tanto la reducción de materia orgánica. Los días en los que se aprecian estos valores erróneos reflejan la mala realización del ensayo o bien la mala calibración del blanco. Los valores de la DQO del interior del fotobioreactor se encuentran comprendidos entre 100 y 40 mg/L, siendo los valores superiores a 60 los más comunes.

Según se ha comentado anteriormente, el valor que está estipulado por ley para poder verter el agua a un medio receptor ha de ser con un contenido menor a 125mg/L, por tanto, sí se podría verter dicha agua una vez tratada por el fotobioreactor.

7.7. Aniones

Los nutrientes son de gran importancia como factor limitante del crecimiento de las microalgas. Ya se ha visto la cantidad de carbono y de nitrógeno que tenemos en nuestro FBR, pero no son los únicos nutrientes importantes para la proliferación de un cultivo. A continuación se presenta el número de nitratos (NO_3), que proporciona nitrógeno (N), y de ortofosfatos (PO_4^{3-}), que proporcionan fósforo (P) mediante la entrada al FBR, y la cantidad disponible de los mismos elementos en el reactor.

En la primera gráfica (Figura 7.7.1), se presentan los valores de Nitrógeno a la entrada y en el FBR que aporta al sistema. En la gráfica siguiente (Figura 7.7.2), se presentan los valores de Fósforo a la entrada y en el FBR. En la última gráfica (Figura 7.7.3) se disponen los valores de Nitratos y Ortofosfatos presentes a la entrada y salida del FBR:

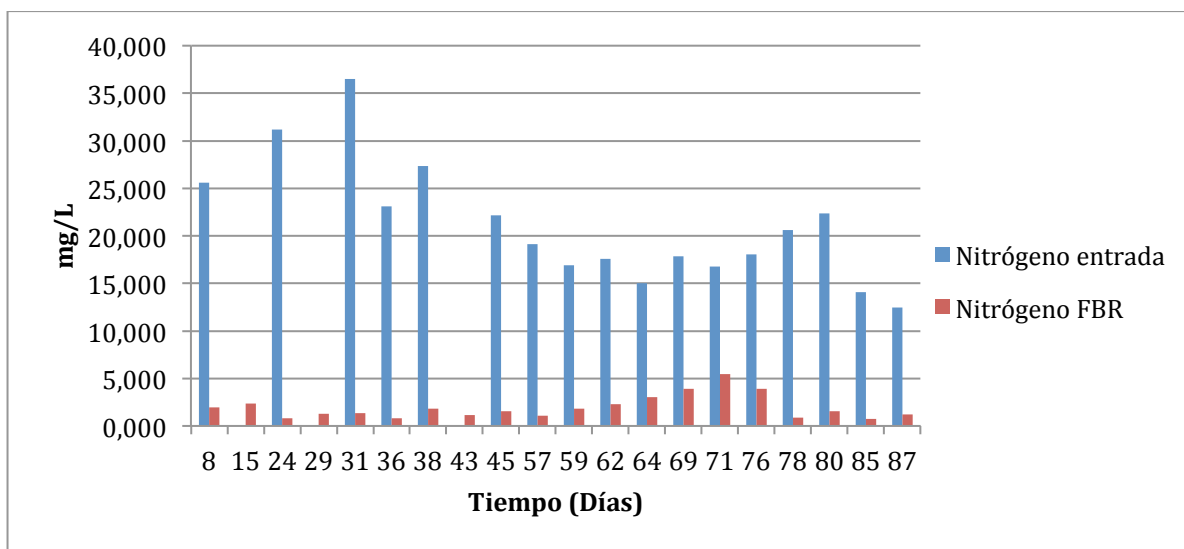


Figura 7.7.1. Nitrógeno (N) a la entrada y FBR.

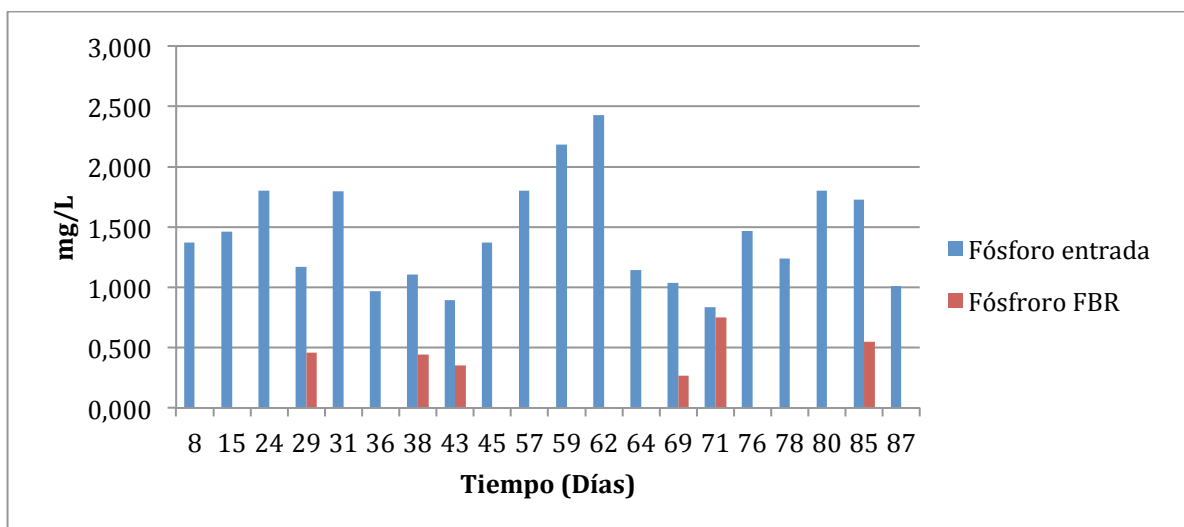


Figura 7.7.2. Fósforo (P) a la entrada y FBR.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

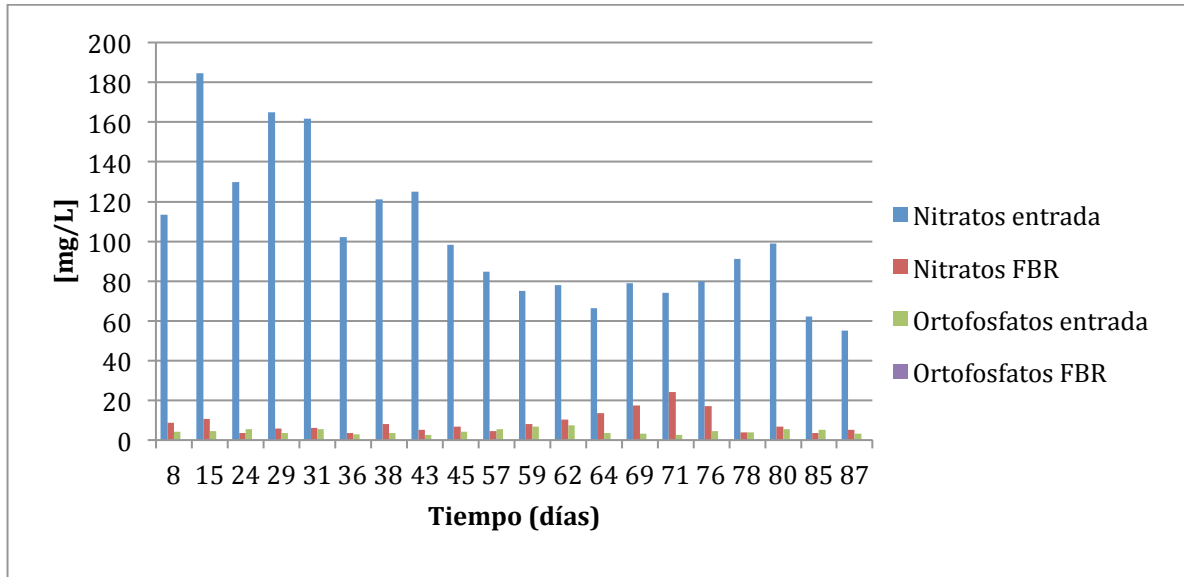


Figura 7.7.3. Nitratos (NO_3) y Ortofosfatos (PO_4^{3-}) a la entrada y FBR.

Como se puede apreciar en las gráficas, hay una baja cantidad de fósforo y nitrógeno a la entrada del fotobioreactor y a su salida. La menor cantidad de fósforo que de nitrógeno hizo que las cianobacterias consumieran el nitrógeno a mayor velocidad que de no haber tenido ese déficit. Este valor de prácticamente cero a la salida es debido al déficit de nutrientes para la reproducción de las cianobacterias y por tanto, consumen mucho más nitrógeno que fósforo para poder alimentarse y seguir reproduciéndose. Si superponemos la gráfica de los nutrientes junto con la de sólidos totales, se puede apreciar que el crecimiento de las algas está muy ligado a la cantidad de nutrientes. Dada la baja cantidad de nutrientes de la entrada, se ha mantenido el cultivo pero no ha aumentado la concentración de bacterias.

Los ortofosfatos a la entrada tienen una concentración baja y son consumidos completamente por los microorganismos de manera similar a los nitratos.

El motivo de la baja cantidad de fósforo y nitrógeno es seguramente debido al agotamiento por parte de las algas y otros organismos en las lagunas, en vez de ser absorbido en el interior del FBR tanto por las algas como las cianobacterias.

7.8. Oxígeno disuelto

Mediante la aireación interior del FBR, se facilita la presencia de oxígeno para los microorganismos. Estos microorganismos, son aerobios y por tanto necesitan el oxígeno para poder llevar a cabo las funciones de reproducción y supervivencia.

En la figura 7.8.1 se puede ver la fluctuación del oxígeno disuelto en el FBR

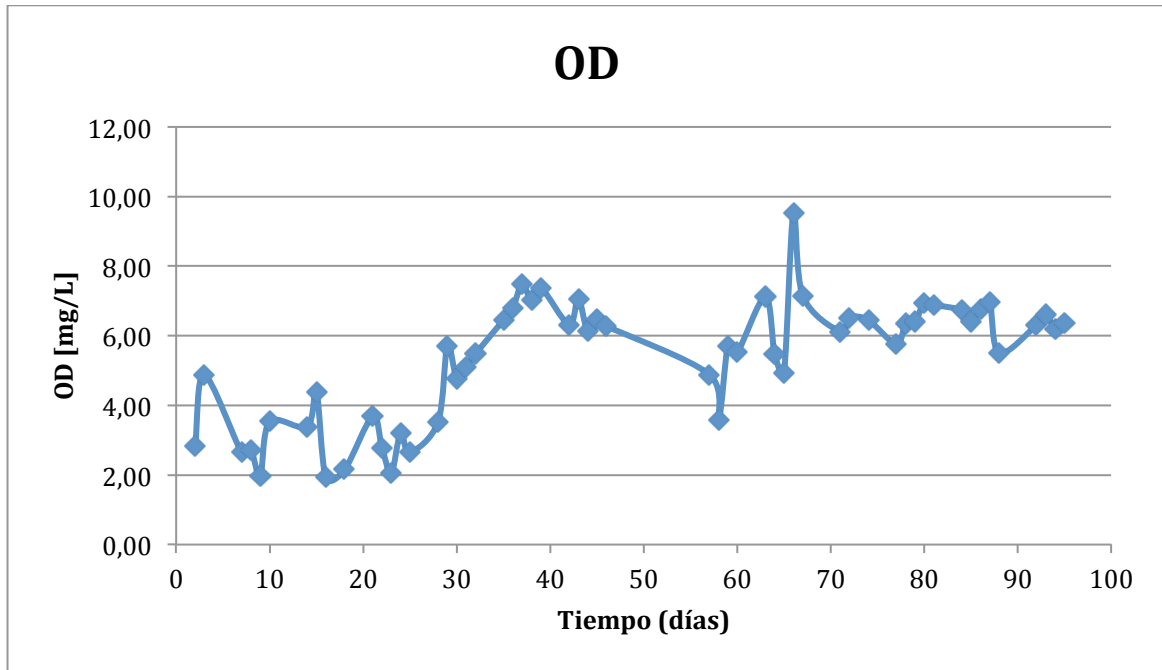


Figura 7.8.1. Oxígeno disuelto en le interior del FBR.

Analizando los valores de la tabla, junto con los sólidos totales, se observa una correlación entre ambas de a mayor cantidad de biomasa, menor cantidad de OD, puesto que hay más microorganismos que lo consumen. A medida que el periodo de estudio fue avanzando, el número de cianobacterias se redujo y como consecuencia aumentó el valor del OD. El rango del OD siempre ha estado comprendido en valores de 2 y 8mg/L.

A mayor cantidad de OD, implica una menor actividad microalgal en el FBR. Otro de los factores que afecta a la cantidad del OD es la temperatura del agua. Cuanto mayor sea la temperatura de ésta, menor es la cantidad que puede disolverse. La temperatura media del agua durante el estudio fue de aproximadamente unos 25 °C, un valor fijado como optimo mediante los estudios realizados anteriormente a la presten tesina.

7.9. pH

A partir de estudios realizados anteriormente, se concluyo que el pH optimo para la producción de cianobacterias era de 8, un pH básico y que se mantuvo contante durante el periodo de estudio mediante la adición de CO₂. El CO₂ reacciona con el agua liberando mas iones y por tanto el pH aumenta. Este CO₂ se inyectaba automáticamente cuando el pH bajaba por debajo del límite de 8 mediante una función de condición creada en el programa Mar3. Las tomas del pH son automáticas mediante el sistema informático y en la Figura 7.9.1 se ha incluido la media del valor de pH durante el periodo de estudio.

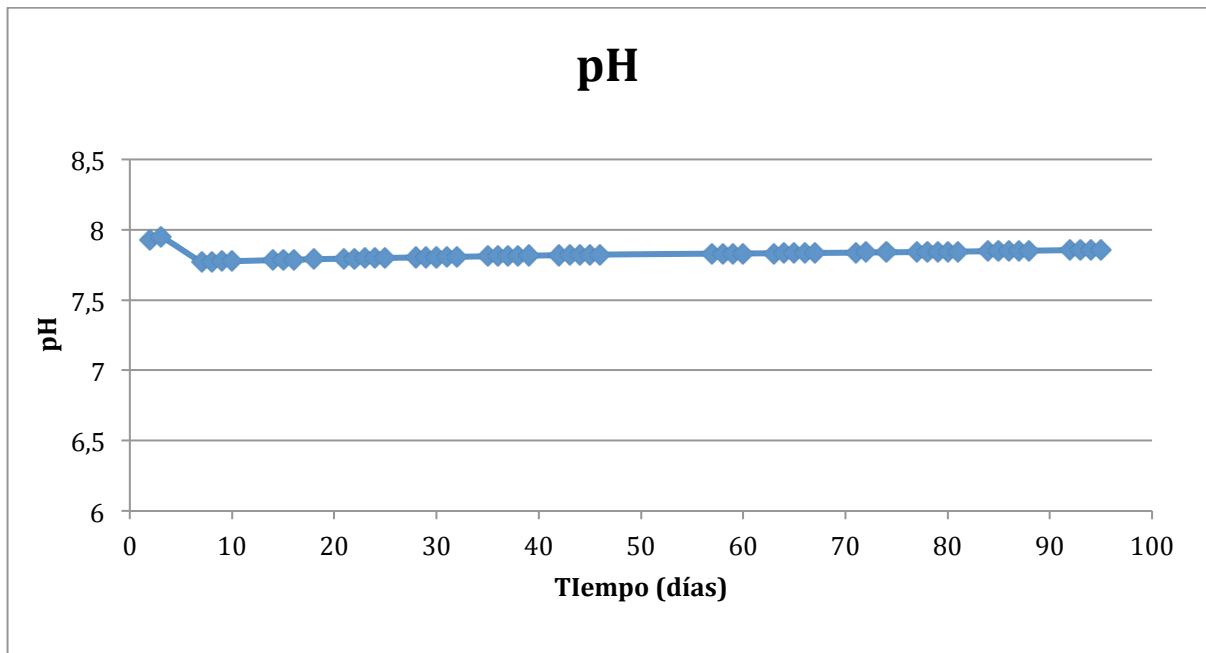


Figura 7.9.1. Valores de pH en el interior del FBR.

Como se puede apreciar en el gráfica, no es hasta partir del séptimo día, momento en el cual se empezó a inyectar el CO₂ que el pH se mantiene prácticamente constante,

7.10. Clorofila

Finalmente la clorofila, es otro de los parámetros que nos permite apreciar la cantidad de biomasa algal presente en el cultivo mediante los pigmentos característicos procedentes de las algas verdes y responsables de realizar la fotosíntesis en el interior del cultivo. En la siguiente gráfica (Figura 7.10.1) se muestran los valores de clorofila obtenidos

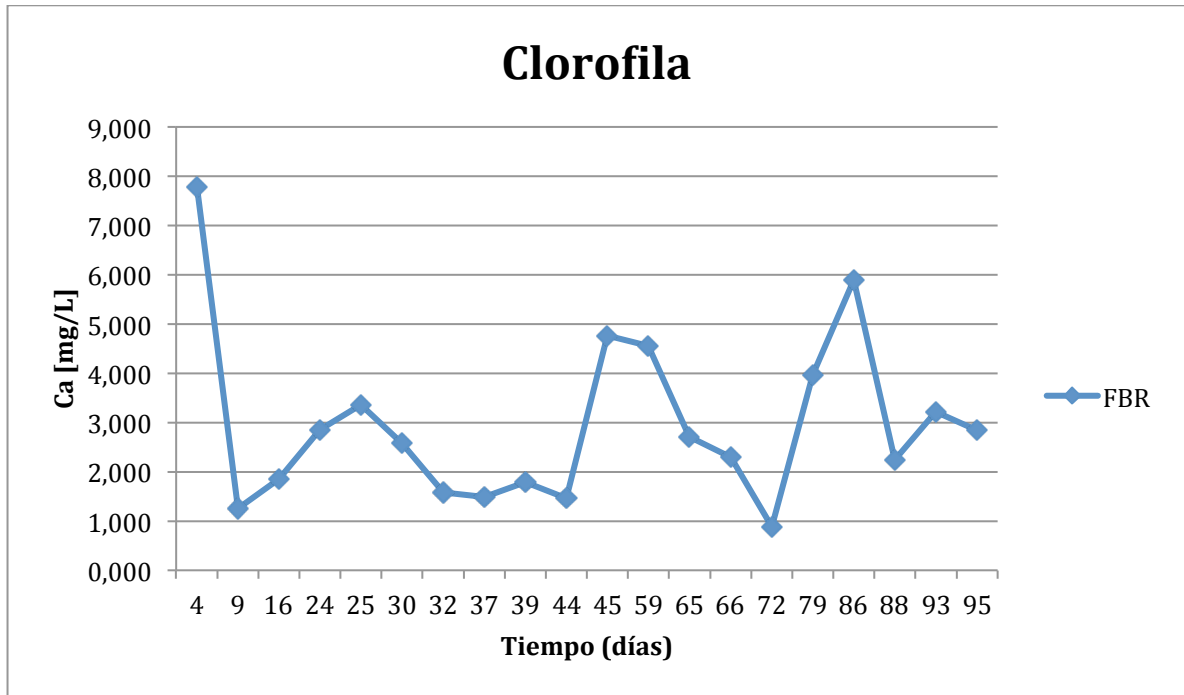


Figura 7.10.1 Clorofila en el interior del FBR.

De la misma manera que existía una correlación entre la turbidez y los SST y SSV, existe también una relación entre la turbidez y la clorofila e indirectamente de los sólidos totales. Una mayor cantidad de clorofila indica una mayor concentración de biomasa algal.

7.11. Evolución del cultivo microalgal

En este apartado se insertarán las fotografías tomadas con el microscopio más representativas de la evolución del cultivo de cianobacterias y algas en el interior del FBR. Primero de todo se describirán brevemente los tipos de microorganismos que se pueden apreciar en las muestras tomadas junto con una imagen tomada del FBR.

- *Chlorellas*: estos microorganismos son un tipo de algas verdes microscópicas, unicelulares, de forma circular de agua dulce. Son de un color verde claro brillante. Constituye la mayor fuente de clorofila que se puede encontrar en un vegetal. Dado su rápido crecimiento mediante la fotosíntesis, contienen una gran concentración y variedad de nutrientes, especialmente proteínas, vitaminas y minerales

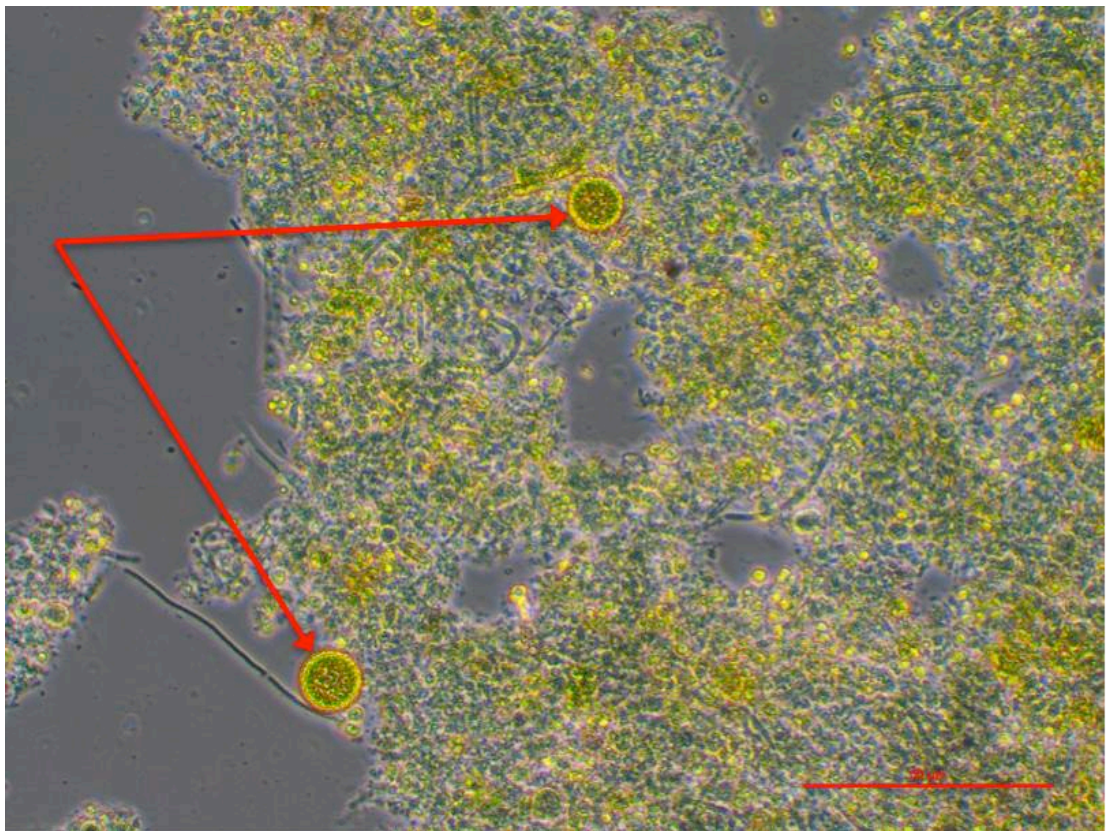


Figura 7.11.1. Muestra del FBR donde se aprecian chlorellas.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- *Algas verdes*: a diferencia de las chlorellas, es posible encontrar algas verdes en ambientes marinos. La diferencia principal con las anteriores es la menor velocidad de crecimiento y el color. Las algas verdes se pueden ver a través del microscopio en color verde oscuro, o marrón claro.

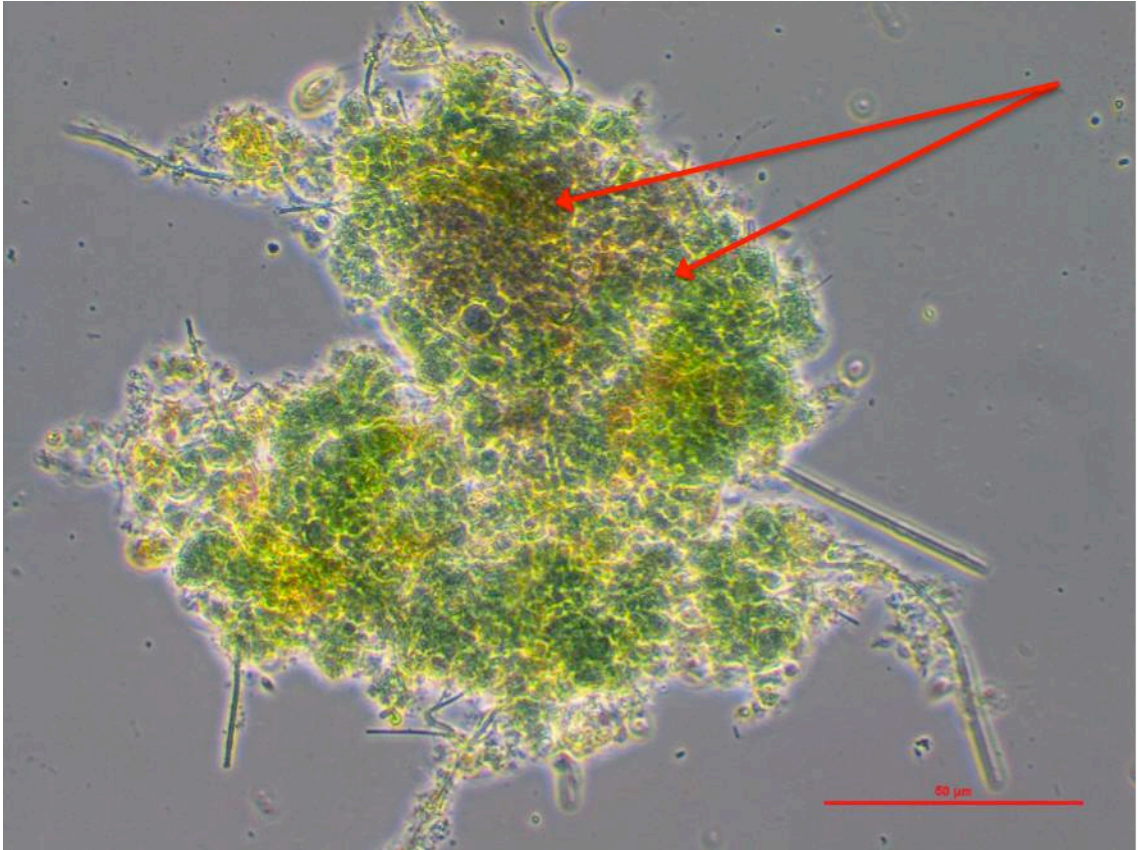


Figura 7.11.2. Muestra del FBR donde se aprecian algas verdes.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- *Diatomea*: este tipo de microorganismos son las algas unicelulares más comunes en el fitoplancton. Su principal característica distintiva es la forma elipsoidal acabada en vértices puntiagudos y la formación de una pared en el exterior de la célula de sílice, llamada frústula.

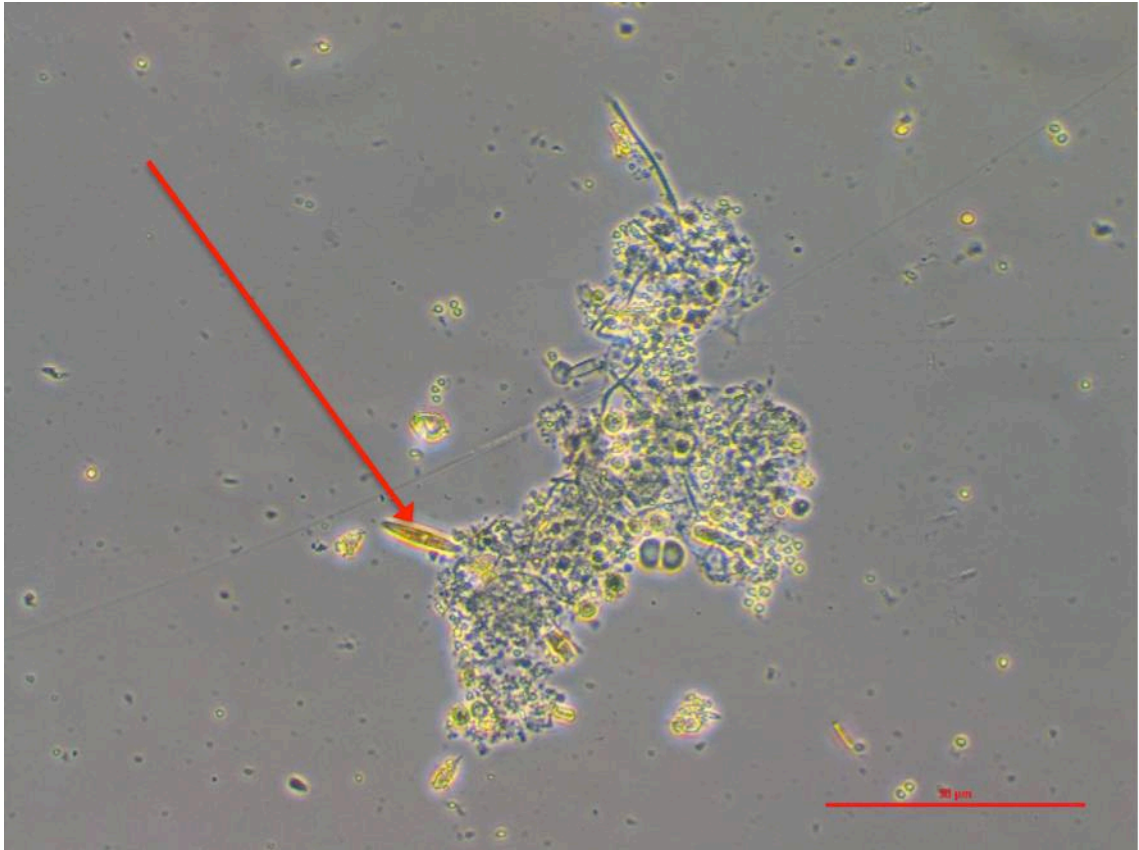


Figura 7.11.3. Muestra del FBR donde se aprecia una diatomea.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- *Chroococcus*: se trata de un tipo de cianobacterias las cuales en la mayoría de los casos forman colonias microscópicas, normalmente formadas por 2,4,6 u 8 núcleos. Raramente se encuentran formadas por una única célula ya que se reproducen mediante la división de su célula en dos partes. Estas se encuentran rodeadas por una capa llamada vaina, incolora, y esta se desarrolla cada vez que hay una división. Son de color verde claro.

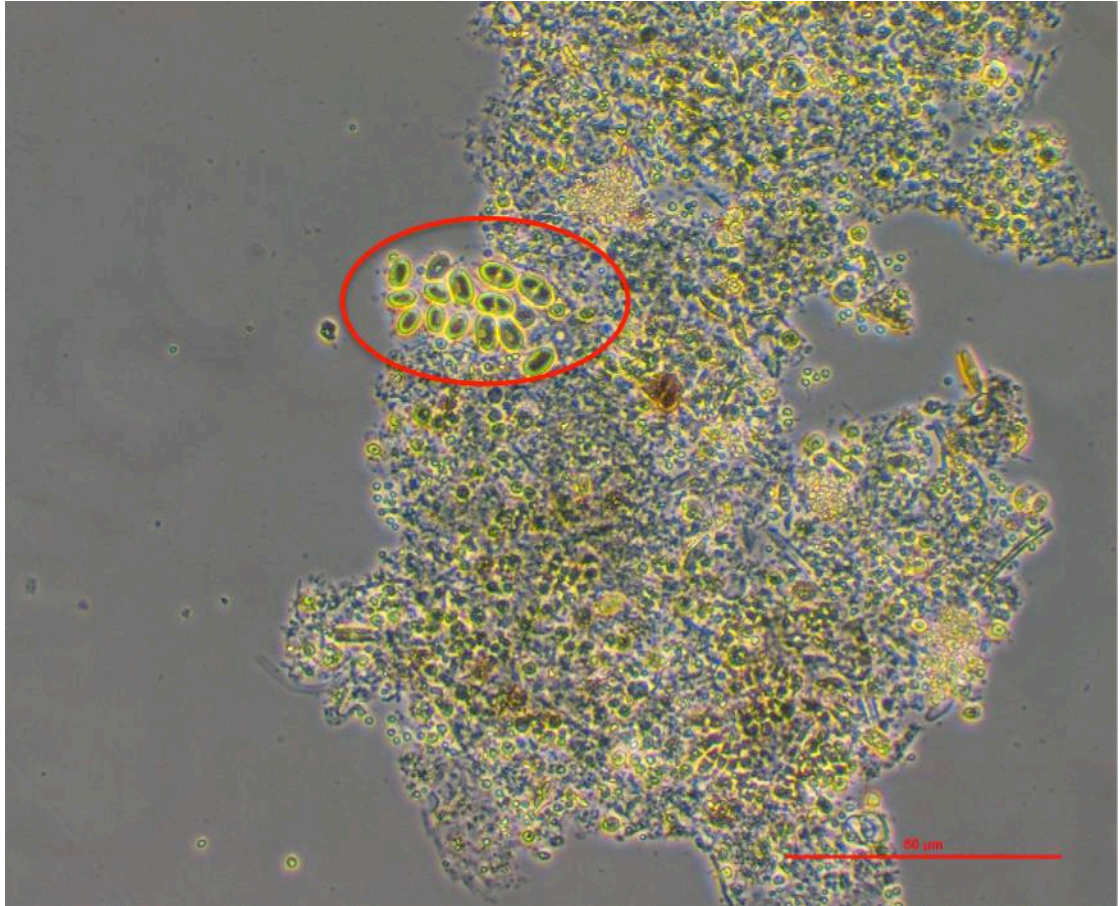


Figura 7.11.4. Muestra del FBR donde se aprecian chroococcus.

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- *Oscillatoria*: también conocidas como cianobacterias péndulo dado su movimiento particual similar al péndulo de un reloj. Estas cianobacterias, son filamentosas y en realidad la unidad que se aprecia en el microscopio está formada por un conjunto de bacterias. Estas bacterias son las que se reproducen más rápido para la obtención de PHBs y por tanto las de mayor interés para cumplir con los objetivos iniciales de la tesina. Se caracterizan por tener un color azulado

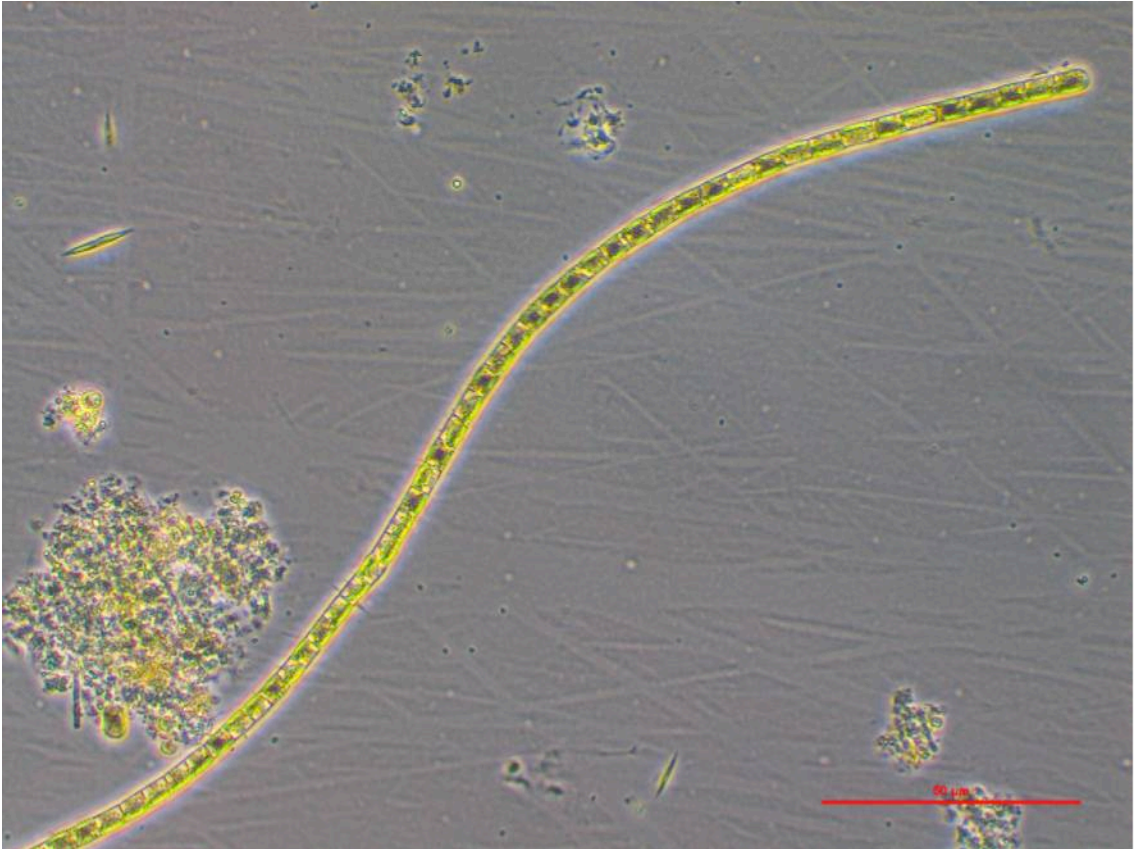


Figura 7.11.5. Muestra del FBR donde se aprecia una gran oscillatoria.

2 de febrero de 2016

Se inició el estudio con el siguiente cultivo presente en el FBR, el cual era predominante en cianobacterias, especialmente oscillatorias (características por su color azul y su composición alargada) como se muestra en la siguiente fotografía (Figura 7.11.6.). A partir de este inicio, se observó una vez por semana en el microscopio para poder evaluar las posibles fluctuaciones de cianobacterias en el interior del FBR y poder obtener resultados a tiempo real de lo que sucedía en el cultivo.

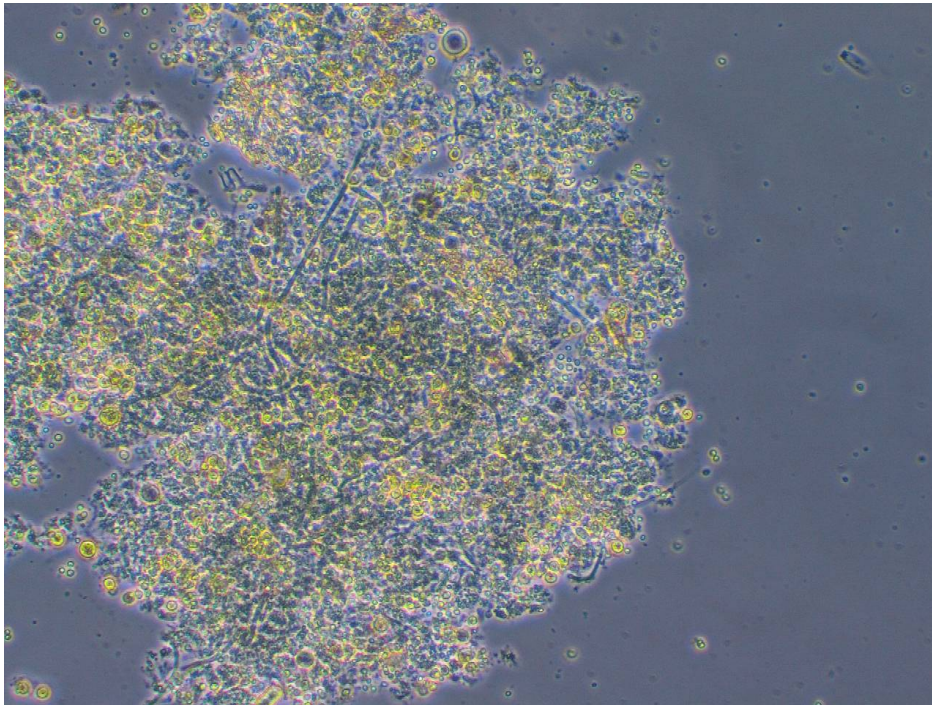


Figura 7.11.6. Muestra del FBR. 29/01/2016.

8 de febrero

Se aprecian grandes grupos de cianobacterias, pero algunos de ellos se encuentran rodeados por algas verdes. Se aprecian oscillatorias en los alrededores de los grandes grupos de biomasa.

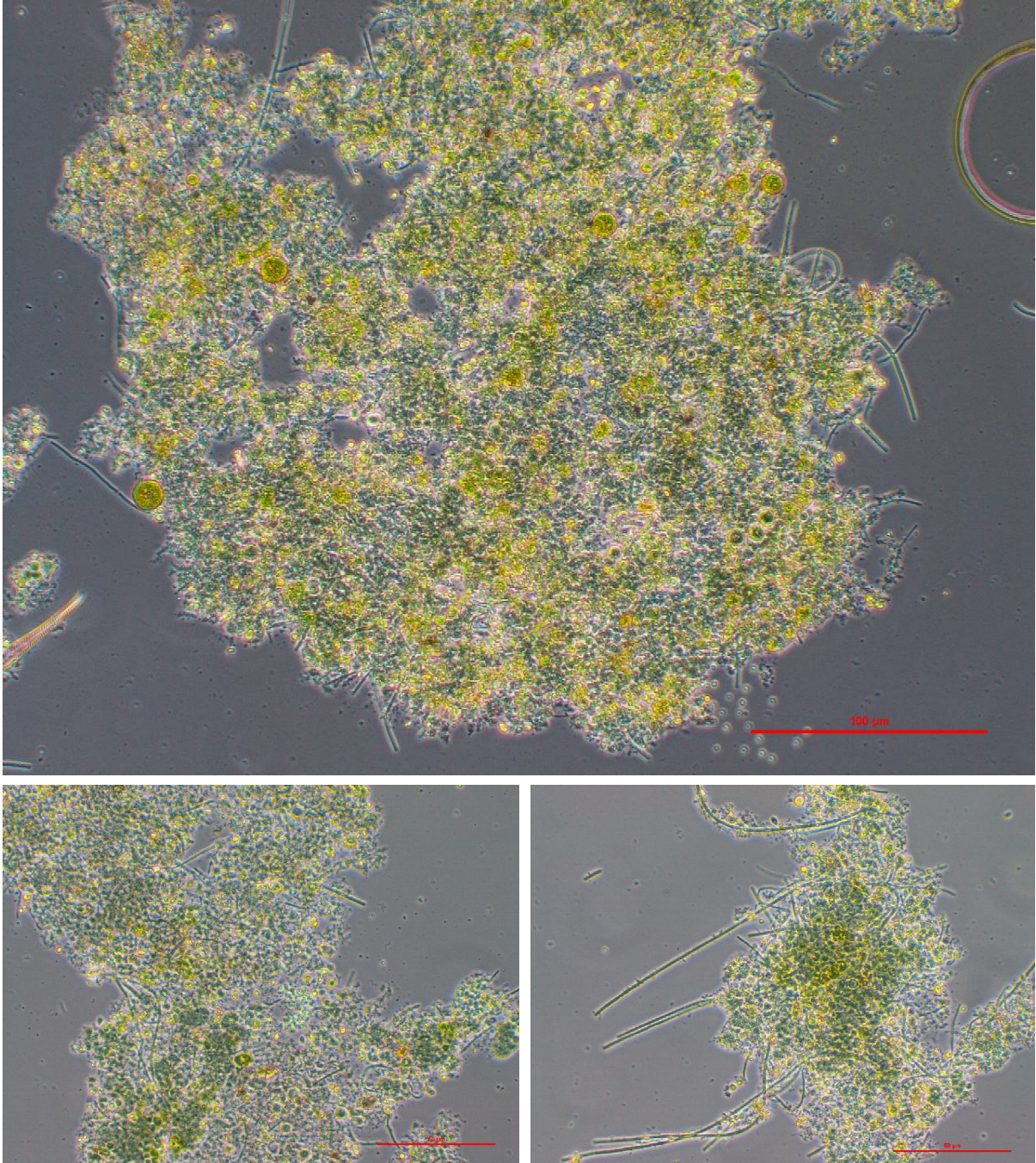


Figura 7.11.7. Muestra del FBR. 08/02/2016.

17 de febrero

Se puede ver una plaga de algas verdes la cual pudo ser debida por las lluvias. El predominio de cianobacterias es menor aunque la cantidad de sólidos es mayor, comparándolo con las respectivas gráficas.

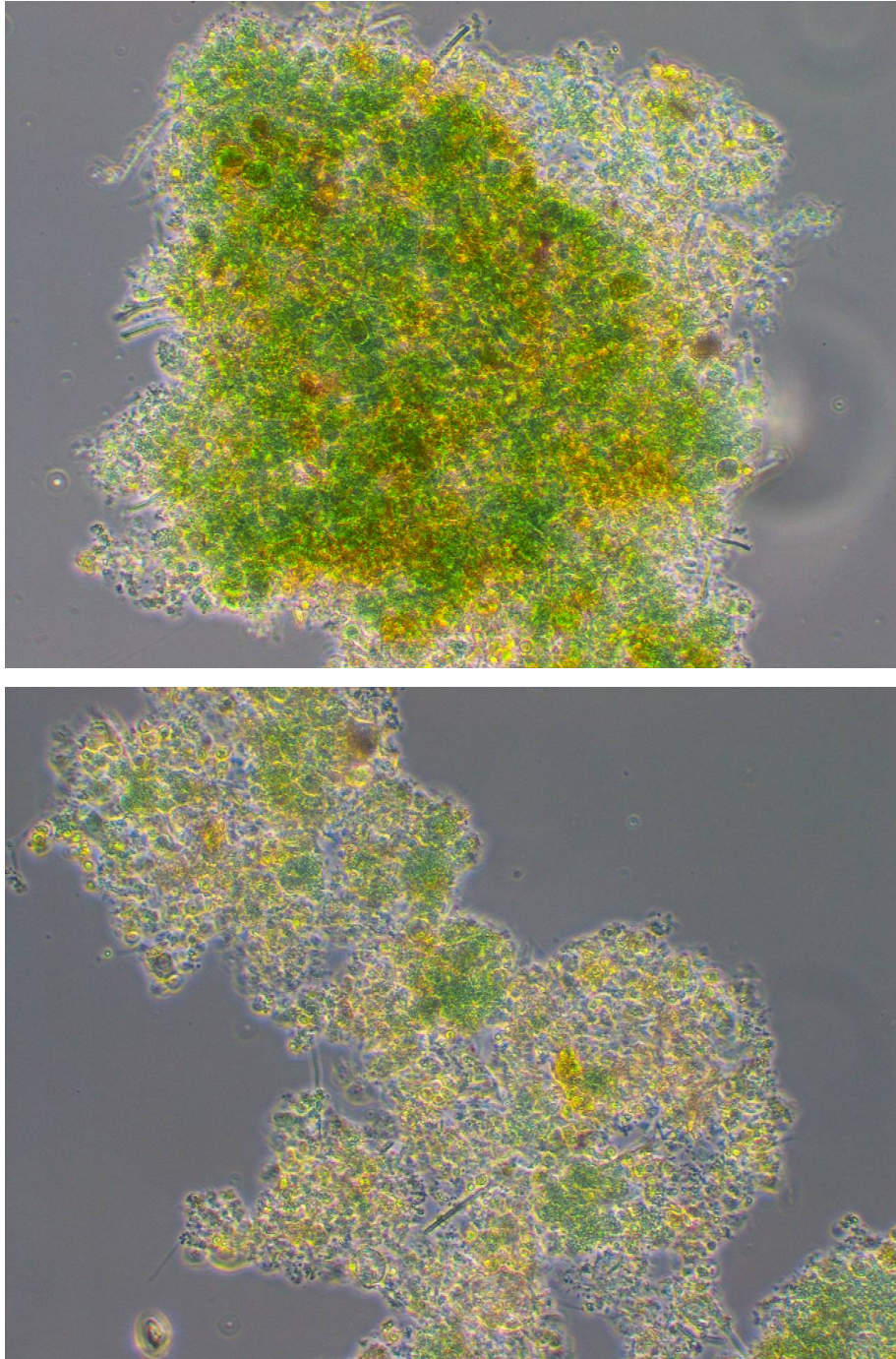


Figura 7.11.8. Muestra del FBR. 17/02/2016.

24 de febrero

Se aprecian colores más verdosos debido a la presencia de chlorellas y algas verdes. Las cianobacterias se encuentran en menor cantidad que al inicio del estudio. Las cianobacterias siguen agrupándose alrededor de las algas, sin la posibilidad de formar flóculos independientes.

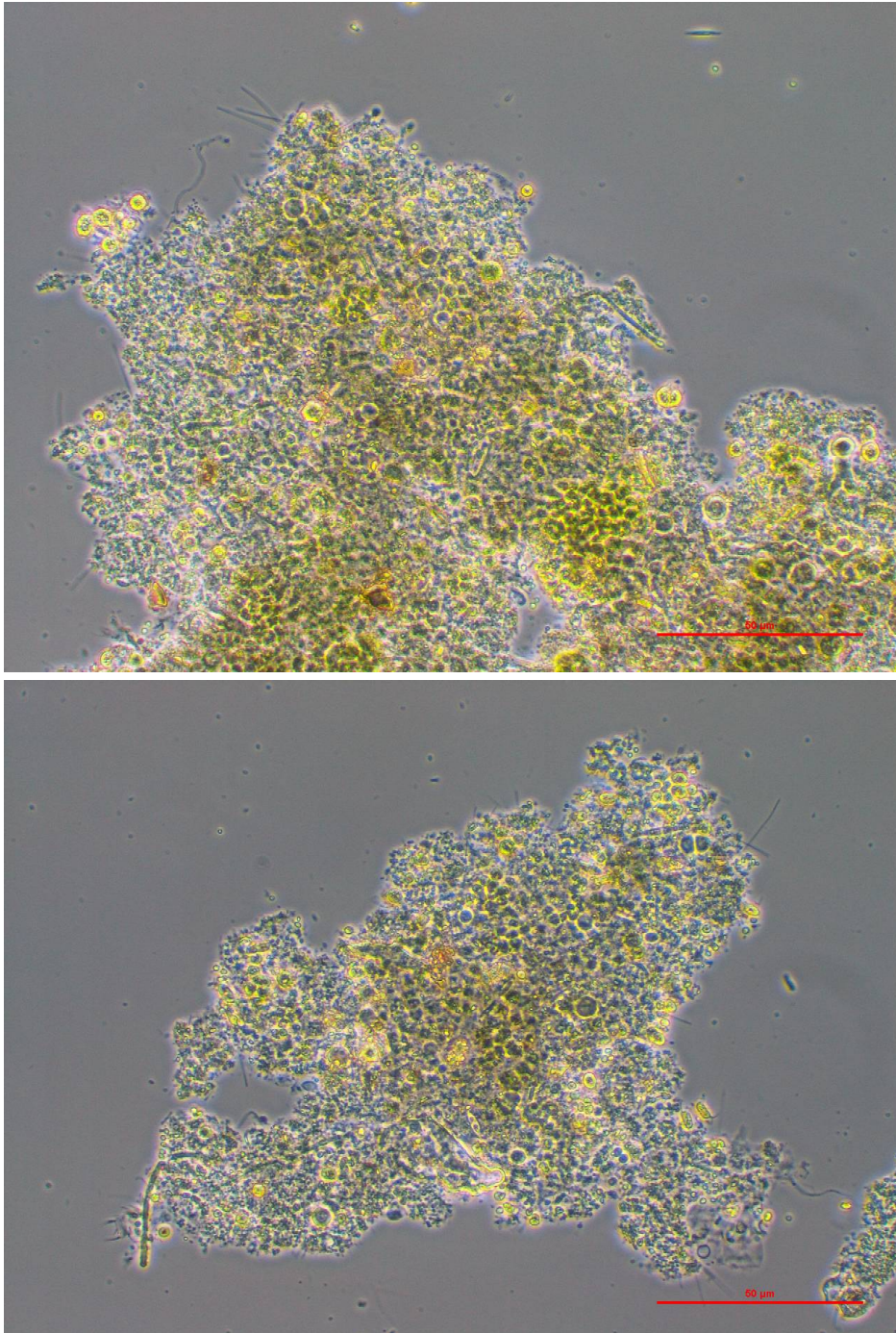


Figura 7.11.9. Muestra del FBR. 24/02/2016.

2 de marzo

Se observa en la mayoría de la muestra pequeños flóculos de cianobacterias indicativos de su posible crecimiento frente a las algas verdes, las cuales eran predominantes. En los alrededores de los flóculos se aprecian oscillatorias y también se pueden ver chroococcus, con menor cantidad, pero positivas para el estudio ya que también forman parte de las bacterias productoras de PHBs.

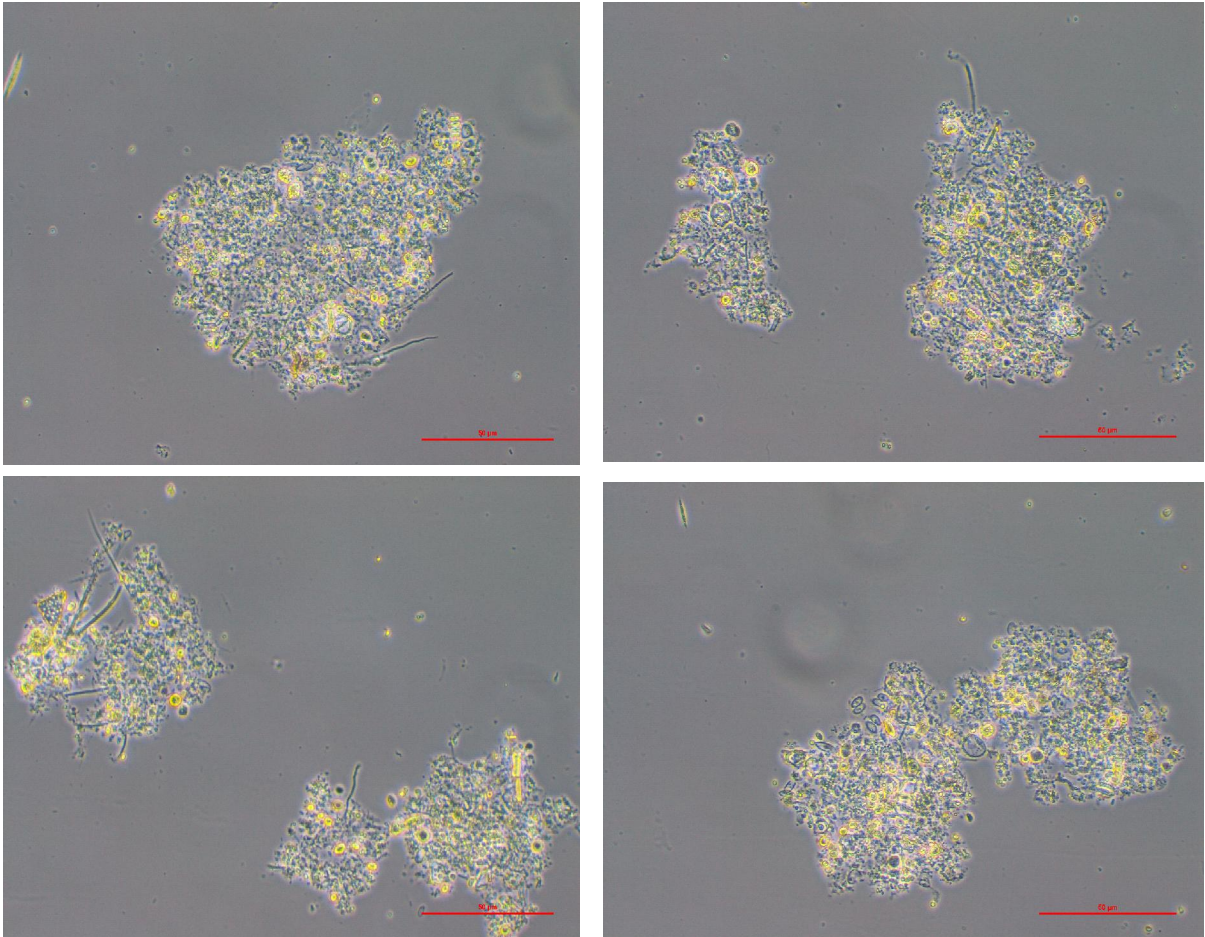


Figura 7.11.10. Muestra del FBR. 02/03/2016.

11 de marzo

La muestra sigue dominada por las algas verdes. Las cianobacterias no están extinguidas pero no pueden hacer frente a las grandes colonias de algas verdes. Se aprecian oscillatorias bastante grandes pero en flóculos pequeños de bacterias. En los flóculos donde abundan las algas verdes encontramos una pequeña cantidad de oscillatorias de menor tamaño que las de los flóculos aislados y por el momento, no se podría afirmar su capacidad para predominar en el medio interior del FBR.

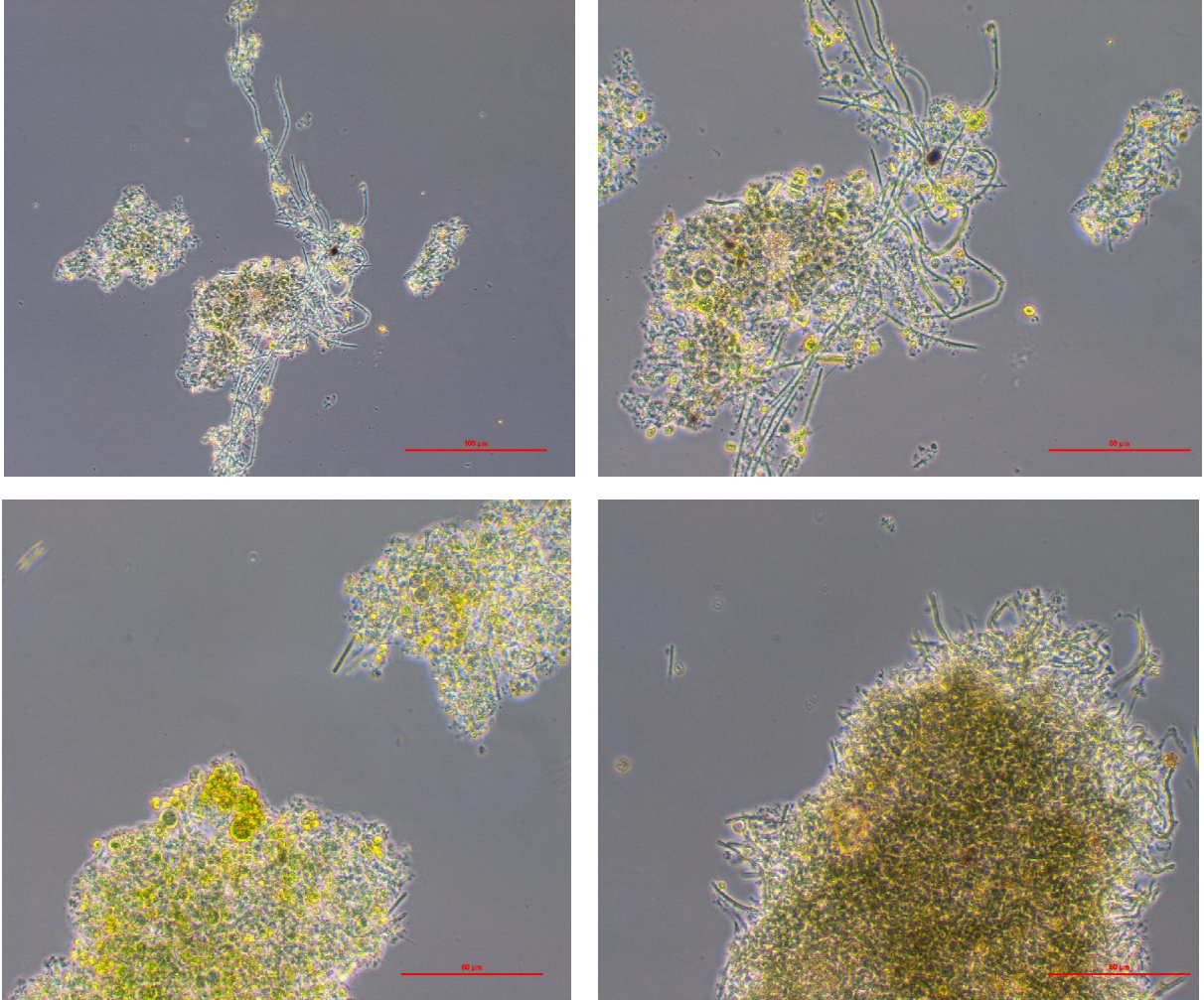


Figura 7.11.11. Muestra del FBR. 11/03/2016

4 de abril

En el periodo final del estudio se puede ver como el cultivo sigue manteniéndose con flóculos muy pequeños de cianobacterias incapaces de crecer debido a la falta de nutrientes. Las grandes masas de biomasa algal ya no están presente pero por consecuente los distintos flóculos se muestran muy dispersos entre si. A partir de este punto, donde las algas no eran predominantes, interesaba ver si el cultivo era capaz de crecer y formar grandes colonias rodeadas de oscillatorias.

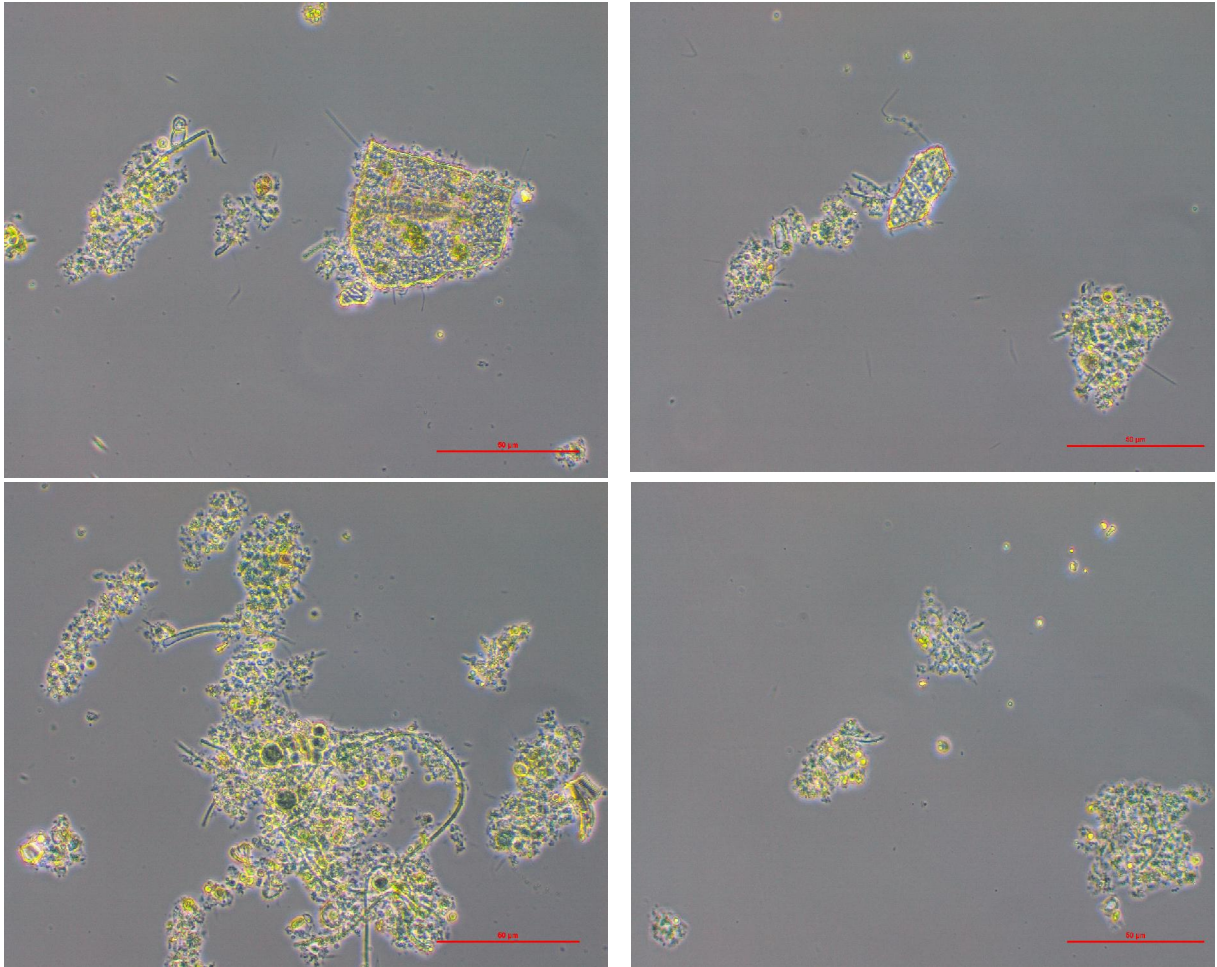


Figura 7.11.12. Muestra del FBR. 04/04/2016

13 de abril

El cultivo evoluciona según lo esperado. Se forman colonias de cianobacterias de mayor tamaño. No obstante, algunos de estos flóculos predominado por cianobacterias, se ven rodeados por algas verdes. Si se comparan las muestras obtenidas con la gráfica de sólidos totales, se puede ver que estamos en el punto de la recta donde la biomasa empieza a crecer nuevamente hacia su valor máximo.

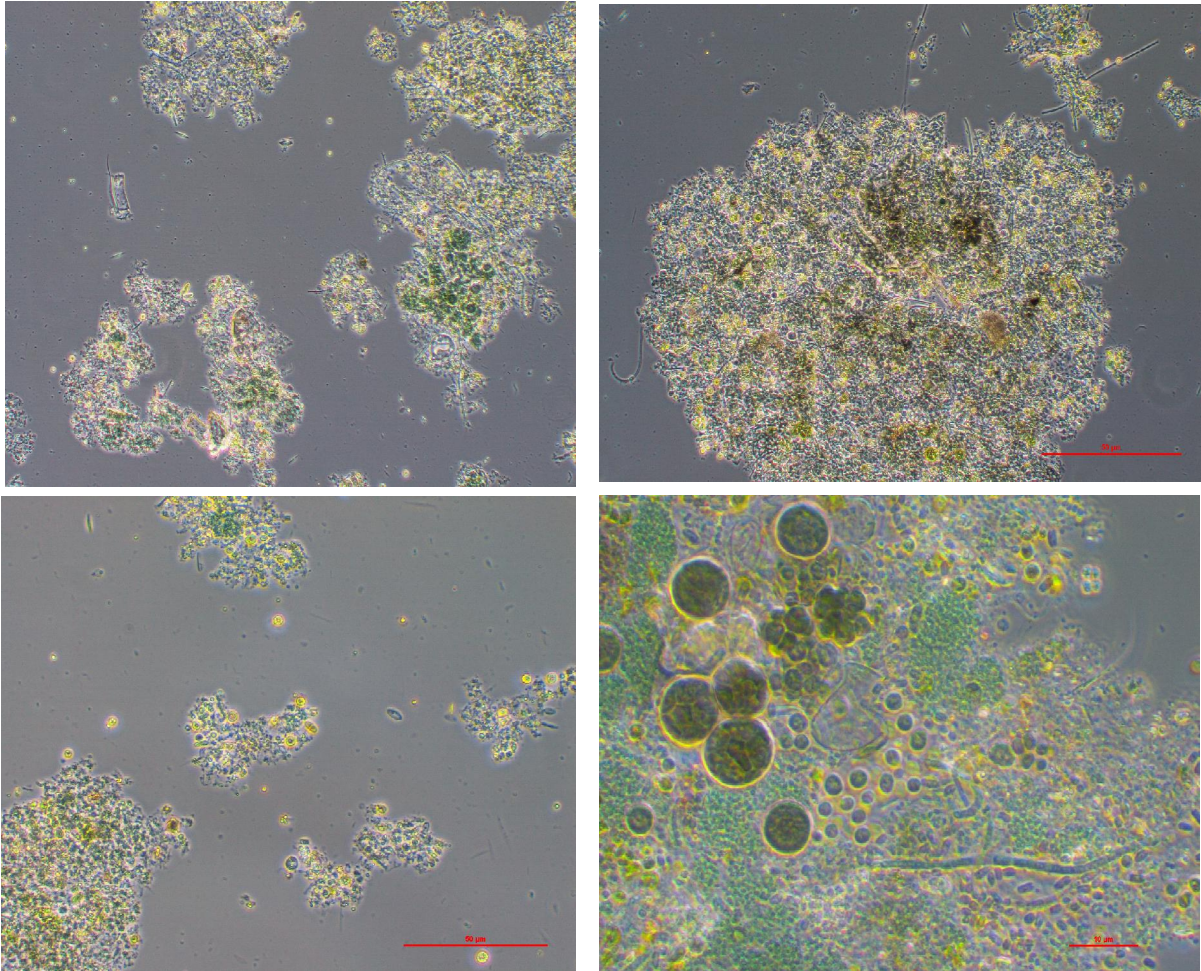


Figura 7.11.13. Muestra del FBR. 11/04/2016

19 de abril

La última vez que observo el cultivo en el microscopio se observaron flóculos formados mayormente por cianobacterias, pero nuevamente se trataba de flóculos no lo suficientemente grandes para poder decir que en el cultivo disponible en el fotobioreactor, predominaban las cianobacterias.

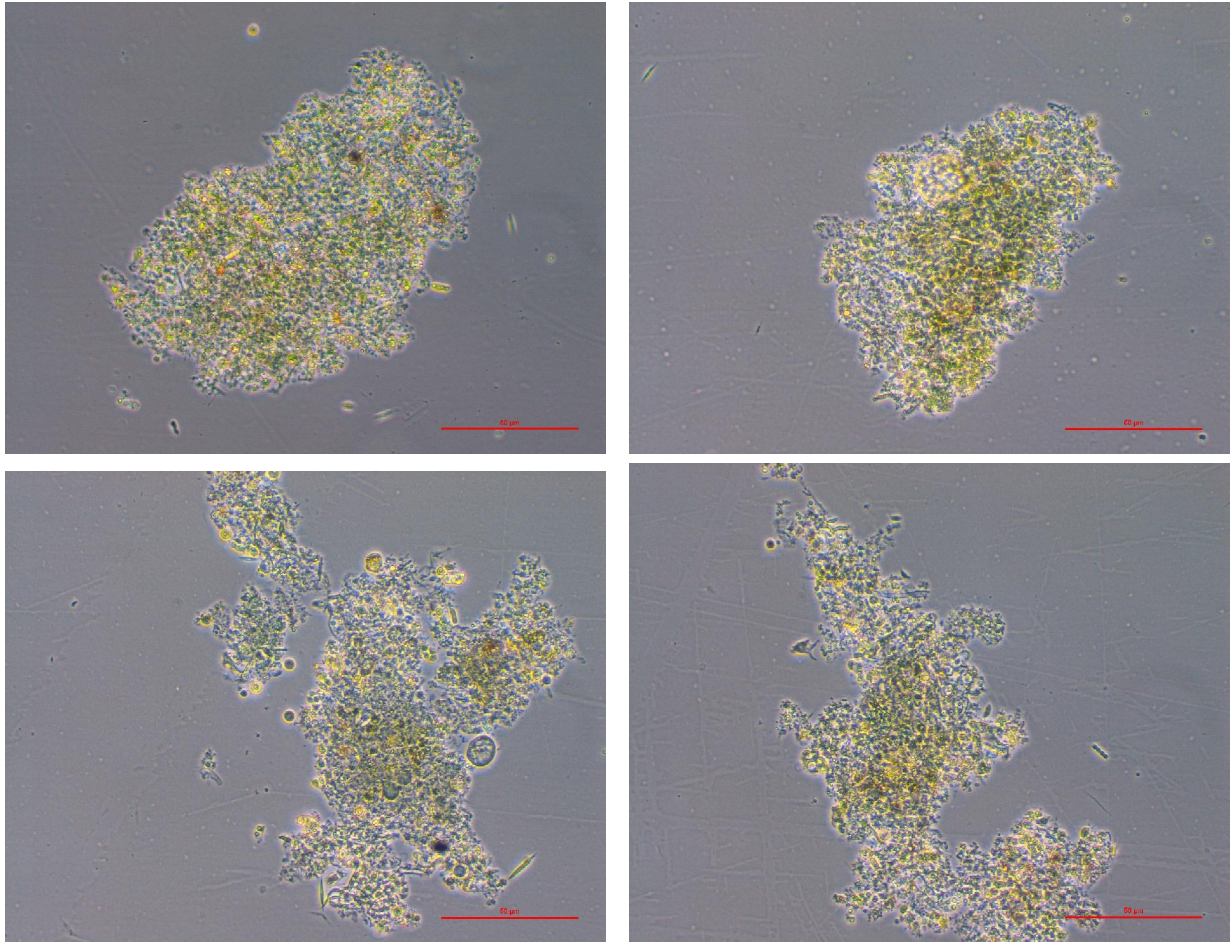


Figura 7.11.14. Muestra del FBR. 19/04/2016

Sin embargo, a la hora de analizar los resultados de los PHBs obtenidos y compararlos con las gráficas de sólidos, turbidez, clorofila y aniones, se puede afirmar que los valores de productividad son satisfactorios dada la baja cantidad de cianobacterias en comparación con estudios realizados anteriormente en base al mismo FBR.

Lamentablemente, después de analizar la evolución del cultivo, se observa que no fue posible conseguir un mayor número de cianobacterias en el interior del FBR que el que se hallaba al inicio de la tesina. No obstante, se ha concluido gracias al déficit de nitrógeno y fósforo, que las cianobacterias dependen mucho de estos dos nutrientes básicos para su crecimiento.

8. CONCLUSIONES

Finalmente, una vez realizado todo el estudio de los datos, gráficas y experiencias del fotobioreactor, he llegado a las siguientes conclusiones, las cuales son muy satisfactorias después de todo el trabajo realizado:

- Primeramente, he podido comprobar que se ha llegado a una productividad de PHBs de un 3% aproximadamente de media. A simple vista puede parecer un valor bajo, pero sin embargo, dada la falta de procesos complementarios, lo cual garantiza un coste muy bajo, como podría ser el caso de la adición de carbono, o la limitación de alguno de los nutrientes para obtener un mayor crecimiento, se han obtenido valores muy gratificantes. Estos valores pueden ser comparados al mismo nivel con estudios de autores mencionados anteriormente. Estos resultados demuestran que mediante la depuración del agua residual, se pueden obtener bioplásticos procedentes de bacterias y de esta manera reducir el uso de todos aquellos polímeros procedentes del petróleo, los cuales son mucho más contaminantes.
- Durante el periodo de estudio, la productividad de cianobacterias disminuyó en las primeras semanas y seguidamente se estancó. Esto fue debido a la baja cantidad de fósforo y nitrógeno contenida en el agua de entrada al FBR. Comparando con otras investigaciones, se puede ver que el crecimiento óptimo de las cianobacterias reside en concentraciones de nutrientes baja pero, dado el déficit de fósforo y nitrógeno, dos de los nutrientes básicos para su reproducción, la densa masa microalgal que se pretendía mantener y a ser posible ampliar, finalmente solamente se pudo mantener.
- Se ha conseguido tratar el agua residual de tal manera que cumple con los requisitos mínimos para poder ser avocada al medio receptor.
- Los resultados obtenidos mediante los análisis en el laboratorio, reflejan de forma muy similar, el comportamiento de la biomasa algal y las cianobacterias en el interior del FBR. Es importante comentar, que en el caso de haber dispuesto de las mismas condiciones en un ámbito mayor, como podría ser el caso de una planta de depuración de aguas, y se hubiese llevado un control de los parámetros automatizada y controlada diariamente, se podrían haber obtenido resultados de productividad mejores que los obtenidos en esta tesina. Es decir, todavía hay mucho que mejorar en el ámbito de la producción de las cianobacterias pero si no se empieza por entender lo que sucede a pequeña escala, difícilmente lograremos obtener resultados o beneficios a una escala mayor

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, A. J. y Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472.
- Andler, R. y Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias Technological and market aspects of microbial bioplastics production. *Ingenerare* 27- 29. Chile.
- Babel W. y Steinbüchel A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in *Biochemistry. Engineering. Biotechnology*. 1, 342.
- Barbosa, M.; Espinosa, A.; Malagón, D. y Moreno N. (2005). Producción de Poli-B-Hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*. 10(1), 45-54.
- Becker, E (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Univ. Press 293.
- Campbell, L.; Stevens, S. E.; JR and Balwill, D. L. (1982). Accumulation of poly-P-hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. *Journal of Bacteriology* 149, 361-363.
- Dhangdhariya, J. H., Dubey, S., Trivedi, H. B., Pancha, I., Bhatt, J. K., Dave, B. P., Mishra, S. (2015) Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium. *Int. J. Biol. Macromol.*, 76:254- 261
- Du, G.; Jian, C.; Jian, Y. y Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology* 88, 59-65.
- España.Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente (1991). Directiva 91/271/CEE. Sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Manual de interpretación y elaboración de informes.
http://www.magrama.gob.es/es/agua/publicaciones/03_manual_directiva_91_271_cee_tcm7-28959.pdf
- García, J. M. (2000). *High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal*. *Journal of Applied Phycology*, 331–339.
- González, Y.; Meza, J.C.; González, O. y Córdova, J.A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1), 77-115.
- Gumel, A. M.; Anuar M. S. M. y Chisti Y. (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment* 21,580–605 DOI 10.1007/s10924-012-0527-1
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M.,Darzins, A. (2008) *Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances*. *Plant J*. 54: 621-639.

- Ieczak, J.L.; Schmidell, W. y Falcao de Aragao A.M. (2013). Highcell Highcell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 40, 275-286.
- Jambeck, J.R.; Geyer, R.; Wilcox, C; Siegler, T.R.; Perryman, M; Andrady, A.; Narayan, R. y Lavender, K (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 768.
- Khanna, S. and Srivastava A.K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 40, 2173-2182.
- Kim, B. (2000) Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzym. Microb. Technol.*, 27:774–777
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 1-14.
- Lee, S.Y. and Choi, J. (2001). Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. T. Scheper. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 71, 183– 207.
- Ortiz, E. (2009). *Obtención, aislamiento e identificación de cepas bacterianas presuntas productoras de poli-β-hidroxialcanoatos (PHA's)*. (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana. México.
- Pérez V., (2012), *Novedoso fotobiorreactor para el cultivo masivo de microalgas*. Procesado y pirolisis de polímeros. Universidad de Alicante. <http://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-1302-fotobiorreactor.pdf>
- Poirier Y, Nawrath C, Somerville C (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol.* 13: 142-150.
- Priyadarshi, S.; Borse, B.B. and Shukla, A. (2014). Polyhydroxyalkanoates: Role of *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biomedical And Advance Research* 05 (02).
- Raeid M. M. Abed (2008): Applications of cyanobacteria in biotechnology. Biology Department, College of Science, Sultan Qaboos University.
- Sheelan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. (1998) *A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program-biodiesel from algae*. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p. www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf
- Sudesh, K.; Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25 (10), 1503-1555.

- Villa, M. (2011) Pasado, actualidad y futuro de la biotecnología de microalgas (<http://www.ainia.es/insights/pasado-actualidad-y-futuro-de-la-biotecnologia-de-microalgas/>)
- Wang B., Lan C., Horsman M. (2010) *Closed photobioreactors for production of microalgal biomasse*. Journal of Biotechnology Advanced, 904-912.
- Zhao W. and Chen G.Q. (2007). Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes PHA-AB. *Process Biochemistry*. 42, 1342-134.

10. ANNEXO

En el presente anexo se incluyen las tablas utilizadas para la obtención de todos los datos numéricos representados anteriormente en las gráficas del capítulo.

- **Amonio**

Amonio 640 nm							
Día	Fecha	Entrada digestado+clarificado			Fotobioreactor		
		abs	F. D.	Amonio	abs	F. D.	Amonio
[-]	[-]	[-]	[-]	[mg/L]	[-]	[-]	[mg/L]
1	2/2/16	0,061	50	3,24475	0,078	1	0,085
3	4/2/16	0,188	50	10,833	0,055	1	0,058
8	9/2/16	0,106	50	5,934	0,028	1	0,025
10	11/2/16	0,048	50	2,468	0,031	1	0,029
15	16/2/16	0,03	50	1,3925	0,013	1	0,008
17	18/2/16	0	0	0,000	0	0	0,000
22	23/2/16	0,202	5	1,167	0,717	1	0,849
24	25/2/16	1,040	5	6,174	0,068	1	0,073
29	1/3/16	0,414	10	4,867	0,022	1	0,018
31	3/3/16	0,443	10	5,214	0,056	1	0,059
36	8/3/16	0,355	10	4,162	0,052	1	0,054
38	10/3/16	0,501	10	5,907	0,046	1	0,047
43	15/3/16	0,498	10	5,8711	0,075	1	0,082
45	17/3/16	0,416	10	4,891	0,074	1	0,080
57	29/3/16	0,329	10	3,852	0,052	1	0,054
59	31/3/16	0,323	10	3,780	0,467	1	0,550
64	5/4/16	0,387	10	4,545	0,045	1	0,046
66	7/4/16	0,349	10	4,091	0,196	1	0,226
71	12/4/16	0,257	10	2,991	0,022	1	0,018
78	19/4/16	0,54	10	6,373	0,102	1	0,114
80	21/4/16	0,444	10	5,226	0,015	1	0,010
85	26/4/16	0,662	10	7,831	0,211	1	0,244
87	28/4/16	0,571	10	6,743	0,165	1	0,189
92	3/5/16	0,518	10	6,110	0,154	1	0,176
94	5/5/16	0,532	10	6,277	0,16	1	0,183

Quantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

- Turbidez, Oxígeno Disuelto (OD) y pH

pH, Turbidez y Oxígeno disuelto				
Día	Fecha	Fotobioreactor		
		Turbidez	OD	pH
[-]	[-]	[UNT]	[mg/L]	[-]
2	3/2/16	863	2,83	7,923805419
3	4/2/16	1000	4,87	7,95044335
7	8/2/16	152	2,65	7,769963168
8	9/2/16	99	2,71	7,771823204
9	10/2/16	583,0	1,98	7,773683241
10	11/2/16	769	3,53	7,775488029
14	15/2/16	304	3,38	7,782596685
15	16/2/16	128	4,38	7,784327808
16	17/2/16	183	1,94	7,786022099
18	19/2/16	35	2,15	7,789355433
21	22/2/16	297	3,68	7,793701657
22	23/2/16	420	2,79	7,794935543
23	24/2/16	526	2,05	7,796151013
24	25/2/16	434	3,20	7,797384899
25	26/2/16	365	2,65	7,798581952
28	29/2/16	450	3,52	7,802062615
29	1/3/16	429	5,71	7,80320442
30	2/3/16	210	4,78	7,804364641
31	3/3/16	281	5,1	7,805506446
32	4/3/16	288	5,48	7,80664825
35	7/3/16	173	6,45	7,810055249
36	8/3/16	227	6,8	7,811197053
37	9/3/16	284	7,48	7,812320442
38	10/3/16	272	7,02	7,813425414
39	11/3/16	185	7,38	7,814548803
42	14/3/16	203	6,32	7,817937385
43	15/3/16	186	7,06	7,819042357
44	16/3/16	763	6,13	7,820165746
45	17/3/16	482	6,48	7,821289134
46	18/3/16	513	6,28	7,822412523
57	29/3/16	180	4,89	7,829152855
58	30/3/16	504	3,58	7,829539595
59	31/3/16	299	5,71	7,829944751
60	1/4/16	332	5,52	7,830349908
63	4/4/16	215	7,12	7,83174954
64	5/4/16	219	5,47	7,832246777
65	6/4/16	180	4,94	7,832780847
66	7/4/16	420	9,54	7,833333333
67	8/4/16	84	7,15	7,833904236
71	12/4/16	45,5	6,12	7,836279926
72	13/4/16	789	6,52	7,836924494

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

74	15/4/16	317	6,45	7,838268877
77	18/4/16	279	5,76	7,840349908
78	19/4/16	347	6,35	7,841123389
79	20/4/16	326	6,4	7,841878453
80	21/4/16	176	6,95	7,842762431
81	22/4/16	153	6,89	7,843627993
84	25/4/16	310	6,73	7,846316759
85	26/4/16	488	6,4	7,847237569
86	27/4/16	200	6,77	7,848176796
87	28/4/16	147	6,96	7,849134438
88	29/4/16	390	5,5	7,850092081
92	3/5/16	210	6,31	7,854014733
93	4/5/16	413	6,61	7,855027624
94	5/5/16	173	6,19	7,856058932
95	6/5/16	391	6,37	7,857071823

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

• Clorofila

Clorofila								
Día	Fecha	Fotobioreactor						
		I 750	I 664	I 647	I 630	Volumen	Ca	Ca media
[-]	[-]	[nm]	[nm]	[nm]	[nm]	[mL]	[mg/L]	[mg/L]
4	5/2/16	0,013	0,673	0,207	0,148	7	7,515	7,775
		0,014	0,72	0,224	0,158	7,1	8,035	
9	10/2/16	0,003	0,117	0,035	0,023	7	1,300	1,250
		0,004	0,109	0,032	0,022	7,1	1,200	
16	17/2/16	0,005	0,167	0,048	0,034	7	1,852	1,852
		0,006	0,168	0,049	0,036	7,2	1,852	
24	25/2/16	0,009	0,238	0,069	0,049	7	2,619	2,857
		0,008	0,279	0,082	0,056	7,2	3,095	
25	26/2/16	0,009	0,279	0,083	0,057	6,8	3,083	3,358
		0,012	0,33	0,097	0,067	6	3,634	
30	2/3/16	0,009	0,238	0,07	0,049	7,2	2,617	2,583
		0,009	0,232	0,069	0,048	7,4	2,548	
32	4/3/16	0,006	0,146	0,044	0,03	7,2	1,599	1,577
		0,007	0,143	0,043	0,03	7,4	1,555	
37	9/3/16	0,008	0,139	0,045	0,034	7,3	1,494	1,485
		0,005	0,134	0,039	0,027	7,2	1,475	
39	11/3/16	0,006	0,161	0,047	0,031	7,1	1,772	1,789
		0,005	0,163	0,047	0,033	7,2	1,806	
44	16/3/16	0,008	0,137	0,044	0,031	7,1	1,472	1,465
		0,005	0,133	0,042	0,028	7,2	1,459	
45	17/3/16	0,011	0,428	0,13	0,088	7,1	4,754	4,763
		0,01	0,429	0,132	0,09	7	4,773	
59	31/3/16	0,004	0,395	0,133	0,069	7	4,431	4,558
		0,004	0,401	0,0136	0,07	6,6	4,686	
65	6/4/16	0,004	0,242	0,082	0,044	6,9	2,698	2,708
		0,004	0,244	0,084	0,044	7	2,719	
66	7/4/16	0,004	0,204	0,07	0,037	6,5	2,266	2,289
		0,006	0,21	0,074	0,041	7	2,311	
72	13/4/16	0,004	0,081	0,033	0,019	7,4	0,867	0,884
		0,004	0,084	0,034	0,017	7,4	0,901	
79	20/4/16	0,006	0,358	0,128	0,067	6,9	3,980	3,967
		0,005	0,355	0,128	0,066	6,8	3,954	
86	27/4/16	0,011	0,552	0,188	0,113	6,9	6,132	5,891
		0,009	0,508	0,176	0,104	7	5,651	
88	29/4/16	0,005	0,188	0,065	0,039	6,9	2,074	2,248
		0,006	0,22	0,078	0,046	6,6	2,423	
93	4/5/16	0,003	0,279	0,089	0,052	6,6	3,135	3,223
		0,003	0,295	0,098	0,056	6,6	3,311	
95	6/5/16	0,008	0,254	0,086	0,054	7,1	2,792	2,837
		0,007	0,261	0,089	0,054	6,8	2,881	

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

• **Sólidos Totales y Sólidos Volátiles**

SST y SSV										
Día	Fecha	Entrada								
		Num. Filtro	Volume Muestra	P1	P2	P3	SST	SST media	SSV	SSV media
[-]	[-]	[-]	[mL]	[g]	[g]	[g]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]
7	9/2/16	1	15	0,1223	0,129	0,1251	0,446666667	0,456	0,26	0,256
		2	15	0,1246	0,1313	0,1275	0,446666667		0,253333333	
		3	15	0,1246	0,1317	0,1279	0,473333333		0,253333333	
14	16/2/16	1	15	0,1201	0,1284	0,1232	0,553333333	0,564	0,346666667	0,331
		2	15	0,1196	0,1279	0,1229	0,553333333		0,333333333	
		3	15	0,1296	0,1384	0,1337	0,586666667		0,313333333	
21	23/2/16	1	15	0,1245	0,134	0,1288	0,633333333	0,691	0,346666667	0,391
		2	15	0,1263	0,1369	0,1304	0,706666667		0,433333333	
		3	15	0,1295	0,1405	0,1346	0,733333333		0,393333333	
29	1/3/16	1	15	0,1325	0,1375	0,1342	0,333333333	0,322	0,22	0,207
		2	15	0,1343	0,1391	0,1361	0,32		0,2	
		3	15	0,1319	0,1366	0,1336	0,313333333		0,2	
36	8/3/16	1	15	0,131	0,1368	0,1331	0,386666667	0,358	0,246666667	0,204
		2	15	0,142	0,1468	0,1442	0,32		0,173333333	
		3	15	0,1346	0,1401	0,1372	0,366666667		0,193333333	
43	15/3/16	1	15	0,137	0,1438	0,1397	0,453333333	0,460	0,273333333	0,289
		2	15	0,1284	0,1355	0,1311	0,473333333		0,293333333	
		3	15	0,1308	0,1376	0,1331	0,453333333		0,3	
57	29/3/16	1	15	0,1403	0,1457	0,1423	0,36	0,344	0,226666667	0,242
		2	15	0,1428	0,1474	0,1438	0,306666667		0,24	
		3	15	0,1365	0,142	0,1381	0,366666667		0,26	
64	5/4/16	1	15	0,1259	0,1311	0,1274	0,346666667	0,309	0,246666667	0,213
		2	15	0,1284	0,1324	0,1294	0,266666667		0,2	
		3	15	0,12	0,1247	0,1218	0,313333333		0,193333333	
71	12/4/16	1	15	0,1398	0,1427	0,1402	0,193333333	0,182	0,166666667	0,158

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

		2	15	0,1389	0,1418	0,1393	0,1933333333		0,166666667	
		3	15	0,1377	0,1401	0,138	0,16		0,14	
78	19/4/16	1	15	0,1362	0,1396	0,137	0,226666667	0,256	0,1733333333	0,176
		2	15	0,1425	0,1467	0,144	0,28		0,18	
		3	15	0,1378	0,1417	0,1391	0,26		0,1733333333	
85	26/4/16	1	15	0,1413	0,1455	0,1419	0,28	0,331	0,24	0,304
		2	15	0,1379	0,1434	0,1382	0,366666667		0,346666667	
		3	15	0,1386	0,1438	0,1389	0,346666667		0,326666667	
94	5/5/16	1	15	0,136	0,1393	0,1368	0,22	0,218	0,166666667	0,153
		2	15	0,1354	0,1386	0,1364	0,2133333333		0,146666667	
		3	15	0,1377	0,141	0,1388	0,22		0,146666667	

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

SST y SSV										
Día	Fecha	Fotobioreactor								
		Num. Filtro	Volumen Muestra	P1	P2	P3	SST	SST media	SSV	SSV media
[-]	[-]	[-]	[mL]	[g]	[g]	[g]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]
7	9/2/16	4	25	0,1225	0,1279	0,1239	0,216	0,204	0,16	0,16533333
		5	25	0,1218	0,1267	0,1227	0,196		0,16	
		6	25	0,1273	0,1323	0,1279	0,2		0,176	
14	16/2/16	4	25	0,1281	0,1353	0,1293	0,288	0,283	0,24	0,23866667
		5	25	0,1204	0,1274	0,1214	0,28		0,24	
		6	25	0,1257	0,1327	0,1268	0,28		0,236	
21	23/2/16	4	25	0,1272	0,1439	0,1299	0,668	0,712	0,56	0,601
		5	25	0,1276	0,1458	0,1304	0,728		0,616	
		6	25	0,124	0,1425	0,1268	0,74		0,628	
29	1/3/16	4	25	0,1345	0,152	0,1368	0,7	0,735	0,608	0,644
		5	25	0,1326	0,1517	0,1353	0,764		0,656	
		6	25	0,1398	0,1583	0,1416	0,74		0,668	
36	8/3/16	4	25	0,132	0,144	0,1345	0,48	0,461	0,38	0,384
		5	25	0,136	0,1475	0,1379	0,46		0,384	
		6	25	0,1331	0,1442	0,1345	0,444		0,388	
43	15/3/16	4	25	0,133	0,1419	0,1342	0,356	0,341	0,308	0,292
		5	25	0,1352	0,1434	0,1365	0,328		0,276	
		6	25	0,137	0,1455	0,1382	0,34		0,292	
57	29/3/16	4	25	0,1338	0,1533	0,1385	0,78	0,799	0,592	0,605
		5	25	0,1339	0,1526	0,138	0,748		0,584	
		6	25	0,1332	0,1549	0,1389	0,868		0,64	
64	5/4/16	4	25	0,1242	0,1328	0,1264	0,344	0,336	0,256	0,264
		5	25	0,1256	0,1338	0,1274	0,328		0,256	
		6	25	0,1266	0,135	0,128	0,336		0,28	
71	12/4/16	4	25	0,1354	0,1378	0,1358	0,096	0,097	0,08	0,087
		5	25	0,1367	0,1391	0,1369	0,096		0,088	
		6	25	0,1354	0,1379	0,1356	0,1		0,092	

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

78	19/4/16	4	25	0,1376	0,1481	0,1397	0,42	0,423	0,336	0,335
		5	25	0,1345	0,1454	0,1369	0,436		0,34	
		6	25	0,1380	0,1483	0,1401	0,412		0,328	
85	26/4/16	4	25	0,1342	0	0	0	0,920	0	0,658
		5	25	0,1359	0,1583	0,1422	0,896		0,644	
		6	25	0,1365	0,1601	0,1433	0,944		0,672	
94	5/5/16	4	25	0,1343	0,1413	0,1351	0	0,312	0,248	0,270
		5	25	0,1386	0,1468	0,1397	0,328		0,284	
		6	25	0,1343	0,1417	0,1353	0,296		0,256	

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

• **PHB**

Día	Fecha	Nº muestra	Peso Crisol	P muestra	P 2	P 3	ST	SV	□ sv	% SV	promedio	P extrac (mg)	P.e.real(mg)	P.e.real(mg)* %sv	Abs	Vol Cloroformo(mL)	micro g en tubo	Micro g en matraz	mg/g	%dcw	mg/L	□ mg/g	□ mg/L	□ %DCW
6	7/2/16	1	23,7253	24,6727	23,7655	23,7565	1,629331204	0,364775643	0,35601691	22,3880597	22,1046829	10	10,3	2,276782341	0,134	1	7,725464	77,25464	33,93	3,39	93,0202	33,21	91,03	3,32
		2	18,7851	24,9275	18,8256	18,8162	1,624711664	0,377093571		23,20987654		10	9,8	3,2773062	0,187	1	10,645552	106,45552	32,48	3,25	89,0482			
		3	23,8699	24,8328	23,909	23,9009	1,57453046	0,326181502		20,71611253														
36	8/3/16	1	26,3432	24,7302	26,4225	26,3845	3,206605689	1,536582802	1,50815127	47,91929382	46,8196646	10	10,1	4,728786126	0,139	1	8,000944	80,00944	16,92	1,69	11,0112	16,77	10,91	1,68
		2	33,1893	24,8576	33,269	33,2315	3,206262873	1,508592945		47,05144291		10	9,9	3,1580703	0,089	1	5,246144	52,46144	16,61	1,66	10,8109			
		3	33,4212	24,877	33,5021	33,4653	3,251999839	1,479278048		45,48825711														
57	29/3/16	1	28,8405	24,9267	28,8831	28,8719	1,70901082	0,449317399	0,46201989	26,29107981	26,928764	10	10,2	2,746733923	0,177	1	10,094592	100,94592	36,75	3,68	81,7935	31,88	70,95	3,19
		2	34,4333	24,8473	34,4758	34,4645	1,710447413	0,454777783		26,58823529		10	9,8	3,1261706	0,147	1	8,441712	84,41712	27,00	2,70	60,0986			
		3	33,4222	24,8981	33,4652	33,4532	1,727039413	0,481964487		27,90697674														
63	4/4/16	1	28,8409	24,8586	28,8828	28,8716	1,685533377	0,450548301	0,47809042	26,73031026	27,7471353	10	9,9	2,746966398	0,115	1	6,67864	66,7864	24,31	2,43	50,4452	22,17	47,44	2,22
		2	34,434	24,8985	34,477	34,465	1,727011667	0,481956744		27,90697674		10	10,2	3,2537694	0,112	1	6,513352	65,13352	20,02	2,00	44,4300			
		3	33,4225	24,912	33,4662	33,4537	1,754174695	0,501766217		28,60411899														
71	12/4/16	1	32,0392	24,8814	32,0799	32,0692	1,635760046	0,43004011	0,43351817	26,28992629	26,3412138	10	9,9	2,60778017	0,129	1	7,449984	74,49984	28,57	2,86	56,9355	26,57	57,03	2,66
		2	34,4343	24,9397	34,4753	34,4645	1,643965244	0,433044503		26,34146341		10	10	3,18997	0,136	1	7,835656	78,35656	24,56	2,46	57,1189			
		3	33,1054	24,916	33,1467	33,1358	1,657569433	0,437469899		26,39225182														
78	19/4/16	1	32,0405	24,9328	32,0943	32,0738	2,157800167	0,822210101	0,79144593	38,10408922	36,6774136	10	9,9	3,631063949	0,134	1	7,725464	77,25464	21,28	2,13	25,8766	21,81	26,52	2,18
		2	34,4342	24,9302	34,4881	34,468	2,162036406	0,806251053		37,29128015		10	9,9	3,3107481	0,128	1	7,394888	73,94888	22,34	2,23	27,1658			
		3	28,8413	24,9371	28,895	28,8764	2,153418	0,745876626		34,63687151														

• ANIONES

Día	Fecha	Entrada							
		Nitritos [NO ₂]	Nitrógeno [N]	Nitratos [NO ₃]	Nitrógeno [N]	Ortofosfatos [PO ₄ ³⁻]	Ortofosfatos [PO ₄ ³⁻]	Fósforo [P]	Sulfatos [SO ₄ ²⁻]
[-]	[-]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	0,000	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]
8	2/2/16	1,594	0,485	113	25,588	0,000	4,200	1,370	70,32
15	4/2/16	3,213	0,978	184,440	0,000	0,000	4,475	1,459	98,898
24	25/2/16	4,311	1,312	130	31,196	0,000	5,530	1,803	0,000
29	1/3/16	1,877	0,571	165	0,000	11,000	3,587	1,170	0,000
31	3/3/16	2,636	0,802	162	36,535	0,000	5,500	1,794	0,000
36	8/3/16	3,609	1,098	102	23,075	9,100	2,968	0,968	0,000
38	10/3/16	2,814	0,856	121	27,325	39,462	3,400	1,109	0,000
43	15/3/16	12,504	3,806	125	0,000	8,400	2,739	0,893	0,000
45	17/3/16	8,527	2,595	98	22,184	0,000	4,200	1,370	0,000
57	29/3/16	6,558	1,996	85	19,150	0,000	5,530	1,803	0,000
59	31/3/16	5,420	1,650	75	16,928	0,000	6,700	2,185	0,000
62	3/4/16	1,473	0,448	78	17,579	0,000	7,450	2,429	0,000
64	5/4/16	2,476	0,754	66,422	14,999	0,000	3,500	1,141	0,000
69	10/4/16	2,341	0,712	79	17,859	0,000	3,180	1,037	0,000
71	12/4/16	1,655	0,504	74	16,753	0,000	2,570	0,838	0,000
76	17/4/16	1,946	0,592	80	18,073	0,000	4,500	1,467	0,000
78	19/4/16	2,581	0,786	91	20,615	0,000	3,800	1,239	0,000
80	21/4/16	3,530	1,074	99	22,360	0,000	5,530	1,803	0,000
85	26/4/16	4,431	1,349	62	14,050	0,000	5,300	1,728	0,000
87	28/4/16	3,195	0,972	55	12,467	0,000	3,100	1,011	0,000

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Día	Fecha	Fotobioreactor						
		Nitritos [NO ₂]	Nitrógeno [N]	Nitratos [NO ₃]	Nitrógeno [N]	Ortofosfatos [PO ₄ ³⁻]	Fósforo [P]	Sulfatos [SO ₄ ²⁻]
[-]	[-]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]
8	2/2/16	-	0,000	9	1,971	0,000	0,000	77,033
15	4/2/16	-	0,000	11	2,374	0,000	0,000	113,436
24	25/2/16	-	0,000	4	0,800	0,000	0,000	0,000
29	1/3/16	0,000	0,000	5,793	1,308	0,000	0,457	0,000
31	3/3/16	0,000	0,000	6	1,357	0,000	0,000	0,000
36	8/3/16	0,000	0,000	3	0,785	0,000	0,000	0,000
38	10/3/16	0,481	0,146	8	1,826	0,000	0,440	0,000
43	15/3/16	0,000	0,000	5	1,167	0,000	0,354	0,000
45	17/3/16	0,555	0,169	7	1,518	0,000	0,000	0,000
57	29/3/16	0,341	0,104	5	1,050	0,000	0,000	0,000
59	31/3/16	0,000	0,000	8	1,804	0,000	0,000	0,000
62	3/4/16	0	0,000	10	2,308	0,000	0,000	0,000
64	5/4/16	0	0,000	13	3,046	0,000	0,000	0,000
69	10/4/16	0	0,000	17	3,913	0,000	0,269	0,000
71	12/4/16	0,000	0,000	24,155	5,454	0,000	0,750	0,000
76	17/4/16	0,300	0,091	17	3,885	0,000	0,000	0,000
78	19/4/16	0,362	0,110	4	0,844	0,000	0,000	0,000
80	21/4/16	0,000		7	1,517	0,000	0,000	0,000
85	26/4/16	0,632	0,192	3	0,771	0,000	0,551	0,000
87	28/4/16	0,282	0,086	5	1,195	0,000	0,000	0,000

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

• DQO

DQO									
Día	Fecha	Entrada				Fotobioreactor			
		DQO	F.D.	DQO soluble	DQO soluble media	DQO	F.D.	DQO soluble	DQO soluble media
[-]	[-]	[mg/L]	[-]	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]	[-]	[mg/L]	[mg/L]
2	3/2/16	40,4	1	40,4	44,033	24	1	24	21,67
		48,2	1	48,2		10,5	1	10,5	
		43,5	1	43,5		30,5	1	30,5	
9	10/2/16	37,2	1	37,2	48,03333333	41,6	1	41,6	50,7
		58,4	1	58,4		35,2	1	35,2	
		48,5	1	48,5		75,3	1	75,3	
16	17/2/16	70	1	70	75,467	91,2	1	91,2	80,167
		74,3	1	74,3		73,7	1	73,7	
		82,1	1	82,1		75,6	1	75,6	
23	24/2/16	44,9	1	44,9	42,033	66,5	1	66,5	53,933
		45,4	1	45,4		46,7	1	46,7	
		35,8	1	35,8		48,6	1	48,6	
30	2/3/16	69,1	1	69,1	68,200	107	1	107	105,667
		70,3	1	70,3		100	1	100	
		65,2	1	65,2		110	1	110	

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

36	8/3/16	10,7	1	10,7	25,867	11	1	11	10,812
		44,9	1	44,9		11,8	1	11,8	
		22	1	22		9,635	1	9,635	
43	15/3/16	60,9	1	60,9	84,000	81,6	1	81,6	68,367
		95,3	1	95,3		60,3	1	60,3	
		95,8	1	95,8		63,2	1	63,2	
57	29/3/16	86	1	86	86,367	77,3	1	77,3	75,467
		84,4	1	84,4		84,5	1	84,5	
		88,7	1	88,7		64,6	1	64,6	
64	5/4/16	81,4	1	81,4	97,300	49,9	1	49,9	48,200
		97,5	1	97,5		60,1	1	60,1	
		113	1	113		34,6	1	34,6	
71	12/4/16	111	1	111	92,167	89,4	1	89,4	88,933
		95,5	1	95,5		90,8	1	90,8	
		70	1	70		86,6	1	86,6	
78	19/4/16	108	1	108	71,900	107	1	107	101,933
		11	1	11		97,8	1	97,8	
		96,7	1	96,7		101	1	101	
86	27/4/16	66,5	1	66,5	70,067	31,6	1	31,6	40,833
		70,2	1	70,2		49,3	1	49,3	

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

		73,5	1	73,5		41,6	1	41,6	
92	3/5/16	89	1	89	81,567	81,4	1	81,4	75,567
		81,7	1	81,7		72,3	1	72,3	
		74	1	74		73	1	73	

- Alcalinidad

Día	Fecha	Entrada				
		Volume HCl	pH	Normalidad	Volume Muestra	Alcalinidad total
[-]	[-]	[mL]	[-]	[-]	[mL]	[mg/L]
8	9/2/16	9,2	7,57	0,03	50	276
10	11/2/16	8,9	7,72	0,03	50	267
15	16/2/16	6,7	7,47	0,03	50	201
22	23/2/16	5,8	5,76	0,03	50	174
24	25/2/16	15,6	8,05	0,03	50	468
29	1/3/16	9,8	7,68	0,03	50	294
31	3/3/16	7,9	8,28	0,03	50	237
36	8/3/16	12,3	8,95	0,03	50	369
38	10/3/16	11,2	8,31	0,03	50	336
44	16/3/16	13,5	8,02	0,03	50	405
46	18/3/16	10	8,16	0,03	50	300
56	30/3/16	11,3	9,16	0,03	50	339
57	31/3/16	10,9	8,74	0,03	50	327
65	6/4/16	10,1	8,34	0,03	50	303
67	8/4/16	8,2	8,28	0,03	50	246
72	13/4/16	8,4	8,24	0,03	50	252
79	20/4/16	9,5	8,69	0,03	50	285
85	26/4/16	9,4	8,89	0,03	50	282
87	28/4/16	8,5	8,03	0,03	50	255
92	3/5/16	9	8,38	0,03	50	270
94	5/5/16	8,3	8,35	0,03	50	249
99	10/5/16	7,8	8,03	0,03	50	234

Cuantificación de bioplásticos en cianobacterias cultivadas en un sistema de depuración

Día	Fecha	Fotobioreactor				
		Volume HCl	pH	Normalidad	Volume Muestra	Alcalinidad total
[-]	[-]	[mL]	[-]	[-]	[mL]	[mg/L]
8	9/2/16	12,7	8,11	0,03	100	190,5
10	11/2/16	18	7,92	0,03	100	270
15	16/2/16	14,5	8,08	0,03	100	217,5
22	23/2/16	13,3	7,74	0,03	100	199,5
24	25/2/16	13,8	7,98	0,03	100	207
29	1/3/16	14,6	7,95	0,03	100	219
31	3/3/16	12,3	8,1	0,03	100	184,5
36	8/3/16	14,6	7,96	0,03	100	219
38	10/3/16	15,2	8,12	0,03	100	228
44	16/3/16	22	7,79	0,03	100	330
46	18/3/16	22	8,04	0,03	100	330
56	30/3/16	11,6	7,7	0,03	100	174
57	31/3/16	12,7	7,98	0,03	100	190,5
65	6/4/16	15,3	8,09	0,03	100	229,5
67	8/4/16	14	8,13	0,03	100	210
72	13/4/16	18,8	7,97	0,03	100	282
79	20/4/16	14,6	7,92	0,03	100	219
85	26/4/16	15,4	7,89	0,03	100	231
87	28/4/16	14,5	8,11	0,03	100	217,5
92	3/5/16	13,7	8,1	0,03	100	205,5
94	5/5/16	13	8,02	0,03	100	195
99	10/5/16	12,1	8,08	0,03	100	181,5

