UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

PRODUCCIÓ DE POLIHIDROXIBUTIRAT (PHB) I GLUCOGEN MITJANÇANT CIANOBACTERIS: OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Sofia Ruiz Martín

Tutor: Irma Roig Villanova

Tutor extern: María Jesús García Galán

Juliol de 2020

RESUM

Els plàstics són compostos molt avantatjosos com a polímers sintètics, ja que poden ser manipulats químicament i modelats gairebé en qualsevol forma desitjada. Durant aquests últims anys ha augmentat la preocupació pública sobre l'efecte nociu del plàstic i derivats petroquímics en el medi ambient. És per això que s'han començat a buscar alternatives sostenibles com la producció de plàstics biodegradables. Els polihidroxibutirats (PHB) són polímers amb propietats similars al polipropilè, utilitzats per a produir bioplàstic. El glucogen és polímer apte per a produir bioetanol. Ambdós són produïts per cianobacteris i altres microorganismes. Els cianobacteris tenen l'avantatge de poder sintetitzar i posteriorment acumular aquests metabòlits únicament utilitzant diòxid de carboni (CO_2) i energia solar.

Per dur a terme l'estudi s'ha realitzat una recerca bibliogràfica dels mecanismes de producció de glucogen i PHB en cianobacteris i dels processos metabòlics que intervenen en aquests. Els principals objectius del treball han estat l'optimització de les condicions de cultiu mitjançant l'ús model cinètic, per tal de maximitzar la producció de PHB i estudiar l'efecte de les condicions de cultiu trobades en el model en la producció de PHB i glucogen.

Mitjançant el model cinètic s'ha aconseguit trobar unes condicions òptimes de cultiu a una concentració de nutrients inicials de nitrogen (N) i fòsfor (P) de 26,11 mg $N \cdot L^{-1}$ i 5,67 mg $P \cdot L^{-1}$ on el contingut de PHB al final de l'experiment hauria de ser del 9,25 % pes cel·lular sec (dcw). Els resultats experimentals han permès obtenir unes concentracions màximes de glucogen d'entre 18,28% dcw i 35,85% dcw. La quantificació de PHB no s'ha pogut realitzar. Malgrat això, els resultats han permès concloure que la limitació de N té un efecte positiu en l'acumulació de glucogen. Finalment, com a conseqüència de la variabilitat dels resultats no s'ha pogut avaluar de manera concloent l'ajust del model, és per aquest motiu que s'haurien de realitzar més rèpliques de l'experiment, ja que permetrà aconseguir un model que descrigui amb més exactitud la producció de PHB i glucogen en cianobacteris. Malgrat això, els resultats suggereixen que el model cinètic descriu de forma correcte el creixement i el consum de nutrients en *Synechocystis* sp.

RESUMEN

Los plásticos son compuestos muy ventajosos como polímeros sintéticos, ya que pueden ser manipulados químicamente y modelados casi en cualquier forma que sea deseada. Durante estos últimos años ha aumentado la preocupación publica sobre el efecto nocivo de los plásticos y sus derivados petroquímicos en el medio ambiente. Es por eso que se han comenzado a buscar alternativas sostenibles, como la producción de plásticos biodegradables y biocombustibles. Los polihidroxibutiratos (PHB) son polímeros con propiedades similares al polipropileno, utilizados para producir bioplásticos. El glucógeno es un polímero apto para producir bioetanol. Los dos compuestos son producidos por cianobacterias y otros microorganismos. Las cianobacterias tienen la ventaja de poder acumular estos metabolitos únicamente utilizando dióxido de carbono (CO_2) y energía solar.

Para llevar a cabo este estudio se ha realizado una búsqueda bibliográfica sobre los mecanismos de producción de glucógeno y PHB en cianobacterias y de los procesos metabólicos que intervienen en estos. Los principales objetivos de trabajo ha estado la optimización de las condiciones de cultivo mediante el uso de un modelo cinético, con tal de maximizar la producción de PHB y estudiar el efecto de las condiciones de cultivo, encontradas en el objetivo anterior, en la producción de PHB y glucógeno.

Mediante el modelo cinético se ha conseguido encontrar unas condiciones óptimas de cultivo a una concentración de nutrientes iniciales de nitrógeno (N) i fósforo (P) de 26,11 mg $N \cdot L^{-1}$ i 5,67 mg $P \cdot L^{-1}$ donde el contenido de PHB al final del experimento habría de ser del 9,25% peso celular seco (dcw). Los resultados experimentales han permitido obtener unas concentraciones máximas de glucógeno de entre 18,28% dcw i 35,85% dcw. La cuantificación de PHB no se ha podido realizar. Pese a esto, los resultados han permitido concluir que la limitación de N tiene un efecto positivo en la acumulación de glucógeno. Finalmente, a consecuencia de la variabilidad de los resultados no se ha podido evaluar de manera concluyente el ajuste del modelo, es por ese motivo que se deberían realizar más réplicas de los experimentos, ja que permitirán conseguir un modelo que describa con mayor exactitud la producción de PHB i glucógeno en cianobacterias. No obstante, los resultados sugieren que el modelo cinético describe forma correcta el crecimiento y el consumo de nutrientes en *Synechocystis* sp.

ABSTRACT

Plastics are very advantageous compounds as synthetic polymers, as their structure can be chemically manipulated and mould into almost any desired shape. In the recent years, the public concern about the harmful effects of plastic and petrochemical products on the environment has increased. Therefore, sustainable alternatives such as the production of biodegradable plastics and biofuels, are being investigated. Polyhydroxybutyrates (PHB) are polymers with similar properties to polypropylene, used to produce bioplastic. On another hand, glycogen is a polymer suitable for bioethanol production. Both compounds are produced by cyanobacteria and other microorganisms. Cyanobacteria have the advantage of being able to accumulate these metabolites using only carbon dioxide (CO_2) and solar energy.

To carry out this study, bibliographic research has been performed related to the mechanisms of glycogen and PHB production in cyanobacteria and of the metabolic processes involved in these. The main objectives of this work have been the optimization of the culture conditions through a kinetic model, in order to maximize the production of PHB and the study of the effect on the production of PHB and glycogen of the culture conditions determined with the kinetic model.

Using a kinetic model, the optimal culture condition has been found at an initial concentration of nitrogen (N) and phosphorus (P) of 26,11 mg $N \cdot L^{-1}$ and 5,67 mg $P \cdot L^{-1}$ where the PHB content at the end of the experiment should be 9,25% dry cell weight (dcw). The experimental results have given maximum glycogen concentrations between 18,28% dcw and 35,85% dcw. We were not able to perform the PHB quantification, it could not be performed due to lack of time and technical problems with the chromatograph. Despite this, the results have concluded that the N limitation has a positive effect on the accumulation of glycogen. Finally, the experimental data variability has made that the fit of the kinetic model can't be evaluated precisely, for that carrying out more replicates of these experiments will allow us to achieve a model that more accurately describes more accurately the production of PHB and glycogen in cyanobacteria. Even so, the results suggest that the kinetic model describes correctly the growth and the nutrient uptake in *Synechocystis* sp.

SUMARI

ÍNDEX DE FIGURES **6**

ÍNDEX DE TAULES **8**

SÍMBOLS I ACRÒNIMS **9**

AGRAÏMENTS **11**

1. INTRODUCCIÓ **12**

1.1. CIANOBACTERIS 13

***1.1.1. Synechocystis* sp.** *16*

1.1.2. Via metabòlica del PHB i glucogen *17*

1.2. MODEL CINÈTIC PER A LA PRODUCCIÓ DE PHB I GLUCOGEN EN CIANOBACTERIS 20

2. OBJECTIUS DEL PROJECTE **24**

3. ÀMBIT DEL PROJECTE **25**

4. MATERIALS I MÈTODES **26**

4.1. MATERIAL 26

4.1.1. Obtenció de la biomassa *26*

4.1.2. Reactors *26*

4.1.3. Reactius *27*

4.2. MÈTODES ANALÍTICS 29

4.2.1. Terbolesa *29*

4.2.2. Oxigen dissolt (OD) *30*

4.2.3. Microscòpia òptica *31*

4.2.4. Sòlids suspesos totals i volàtils (SST, SSV) *31*

4.2.5. Alcalinitat *32*

4.2.6. Nitrats *33*

4.2.7. Fosfats *34*

4.2.8. Quantificació PHB *37*

4.2.9. Quantificació glucogen *38*

5. DISSENY EXPERIMENTAL.....39

5.1. OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU MITJANÇANT MODELITZACIÓ..... 39

5.2. ESTUDI DE L'EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN FOTOBIORREACTORS CILÍNDRICS VERTICALS DE 3 L INOCULATS AMB *SYNECHOCYSTIS* SP...... 39

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....42

6.1. OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU MITJANÇANT MODELITZACIÓ..... 42

6.2. ESTUDI DE L'EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN FOTOBIORREACTORS CILÍNDRICS VERTICALS DE 3 L INOCULATS AMB *SYNECHOCYSTIS* SP..... 44

6.2.1. Assaig març*.....*44

6.2.2. Assaig maig*.....*51

6.2.3. Avaluació model cinètic*.....*67

7. PERSPECTIVA D'AMPLIACIÓ DEL TREBALL 70

8. CONCLUSIONS.....72

9. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES 73

ANNEXOS 79

ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Arbre filogenètic dels cianobacteris, basat en les 31 seqüències de proteïnes conservades (Komárek et al., 2014). 14
Figura 2. *Synechocystis* sp. 16
Figura 3. Vies metabòliques simplificades de biosíntesis de polihidroxibutirat (PHB) i glucogen en cianobacteris (Kamravamanesh et al., 2018). Els gens proposats per l'estudi de l'expressió gènica han estat ressaltats en vermell. 18
Figura 4. Vies metabòliques de biosíntesi de polihidroxibutirat (PHB) i glucogen en el model cinètic (Rueda et al., 2020), descrites en l'ANNEX A. 22
Figura 5. Fotobiorreactors utilitzats. 27
Figura 6. Elèctrode de membrana galvànic (Fundamentals of environmental Measurements). 30
Figura 7. Formes del fòsfor al cultiu. 35
Figura 8. Disseny experimental. 40
Figura 9. Gràfics d'optimització de la producció de PHB en Synechocystis sp. enfront la concentració inicial de N i P a partir del model cinètic. a) Gràfic de contorn que representa a la interacció de dos factors, la concentració inicial de fosfats respecte a la concentració inicial de nitrats en la productivitat de PHB (mg PHB·L^{-1}·dia^{-1}). b) Gràfic de superfície de resposta que representa la interacció de dos factors, la concentració inicial de fosfats respecte a la concentració inicial de nitrats, per a conèixer la productivitat PHB (mg PHB·L^{-1}·dia^{-1}). 43
Figura 10. Evolució creixement cel·lular. 45
Figura 11. Imatges al microscopi òptic preses sota 400 augments a) Protozou en l'etapa de quist. b) Protozous formant un flòcul amb la biomassa dels cianobacteris. 47
Figura 12. Evolució concentració OD en els cultius. 48
Figura 13. Evolució a) N-NO_3. b) P-PO_4 dels cultius. 49
Figura 14. Formes del fòsfor el dia 1 de l'experiment. Abreviatures: P-PO_4: fòsfor inorgànic; FOD: fòsfor orgànic dissolt; PP: fòsfor particulat. 50
Figura 15. Evolució DIC dels cultius. 51
Figura 16. Evolució creixement cel·lular. 53
Figura 17. Imatges al microscopi òptic preses sota 400 augments. a) Protozou en l'etapa de quist. 54

Figura 18. Evolució a) N-NO3. b) P-PO4 dels cultius. 60
Figura 19. Fotografies reactors. D'esquerra a dreta: PBR1, PBR2, PBR3, PBR4. 62
Figura 20. Formes del fòsfor en el cultiu a) dia 1, b) dia 8 de l'experiment. Abreviatures: P-PO4: fòsfor inorgànic; FOD: fòsfor orgànic dissolt; PP: fòsfor particulat 63
Figura 21. Evolució DIC dels cultius. 64
Figura 22. Evolució glucogen en els cultius. 65

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Planificació setmanal proves analítiques..... 41
Taula 2. Condicions inicials..... 41
Taula 3. Temperatures mitjanes i concentracions mitjanes oxigen dissolt. 47
Taula 4. Taxa de creixement, temps de duplicació (DT), taxa d'absorció N (q_{N-NO3}), rendiments del cultiu ($Y_{X/N-NO3}$ i $Y_{X/P-PO4}$) i taxa d'absorció P (q_{P-PO4}). 50
Taula 5. Fotografies al microscopi òptic i de fluorescència sota 400 augments del PBR1 i PBR2. 55
Taula 6. Fotografies al microscopi òptic i de fluorescència sota 400 augments del PBR3 i PBR4. 57
Taula 7. Temperatures mitjanes i concentracions mitjanes oxigen dissolt. 59
Taula 8. Taxa de creixement, temps de duplicació (DT), taxa d'absorció N (q_{N-NO3}), rendiments del cultiu ($Y_{X/N-NO3}$ i $Y_{X/P-PO4}$) i taxa d'absorció P (q_{P-PO4}). 63
Taula 9. Coeficients de determinació entre el model i l'experiment de març. 68
Taula 10. Coeficients de determinació entre el model i l'experiment de maig. 68
Taula 11. Proposta de primers per l'experiment (Kamravamanesh et al.,2018). 71

SÍMBOLS I ACRÒNIMS

ABREVIATURA	SIGNIFICAT
Abs	Absorbància
C	Carboni
CO_2	Diòxid de carboni
CO_3^{2-}	Carbonat
dcw	Pes cel·lular sec
DF	Factor de dissolució
DIC	Carboni inorgànic dissolt
FOD	Fòsfor orgànic dissolt
GEMMA	Grup de recerca d'Enginyeria Ambiental i Microbiologia
H^+	Protons
HCl	Àcid clorhídric
HCO_3^-	Bicarbonat
H_2SO_4	Àcid sulfúric
IC	Carboni inorgànic
IPPC	Prevenció i Control Integrat de la Contaminació
N	Nitrogen
NH_4^+	Amoni
$N\text{-}NO_3$	Nitrats
NRMSE	Arrel de l'error quadràtic mitjà
NTU	*Nephelometric turbidity units*
O_2	Oxigen

OD	Oxigen dissolt
OH^-	Hidròxid
P	Fòsfor
PBR	Fotobiorreactor
PHB	Polihidroxibutirat
PP	Fòsfor particulat
$P\text{-}PO_4$	Fòsfor inorgànic
R^2	Coeficient de determinació
SSE	Suma dels errors al quadrat
SST	Sòlids suspesos totals
SST^1	Suma dels tractaments al quadrat
SSV	Sòlids suspesos volàtils
SUM	Sumatori
UPC	Universitat Politècnica de Catalunya
v/v	Volum solut/ volum dissolució
3-PGA	3-fosforgliceraldehid

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar les gràcies a tots els companys del GEMMA per donar-me l'oportunitat de poder treballar amb ells, especialment a l'Estel Rueda que m'ha guiat durant tot el projecte, m'ha ajudat i ha compartit amb mi tots els seus coneixements durant el seu doctorat. També vull mostrar el meu agraïment a l'Irma Roig com a tutora del treball, per tots els consells que realment m'han ajudat a elaborar aquest treball.

A la meva família i a totes les persones que ho han fet possible.

1. INTRODUCCIÓ

Els plàstics s'han convertit en un dels materials més utilitzats al món, ja que tenen aplicacions a gairebé totes les indústries, des de l'automobilística fins a la mèdica. A partir del petroli es produeixen més de 100 milions de tones de plàstic anualment en tot el món i a Europa se'n produeixen 40 kg per habitant. Un cop utilitzat, el 40% d'aquest plàstic és rebutjat en abocadors i altres centenars de milers de tones són rebutjades al fons marí, acumulant-se a les regions oceàniques, generant greus problemes ambientals (Reddy *et al.*, 2003). Per aquest motiu s'estan buscant fonts alternatives amb l'objectiu de reemplaçar el petroli com a base de milers de productes plàstics, i evitar així, tots els problemes ambientals relacionats. Un exemple d'alternatives al petroli són els biocombustibles, el biogàs o els bioplàstics (Arias *et al.*, 2018).

Segons la Directiva de Prevenció i Control Integrat de la Contaminació (IPPC), existeix una evidència científica per assenyalar el diòxid de carboni antropogènic (CO_2) com a principal motor del canvi climàtic. És per això, que s'han de dissenyar processos que permeten utilitzar el CO_2 com a matèria primera i transformar-ho en diferents productes (Troschl *et al.*,2018). Dins d'aquest context, s'està prestant especial atenció als cianobacteris, ja que presenten la capacitat de sintetitzar una gran varietat de components bioactius i altres metabòlits valuosos com productes farmacèutics, additius alimentaris, biopolímers, pigments, promotors de creixement, energia (biogàs) o biofertilitzants, entre d'altres, a partir dels nutrients presents en el medi de cultiu (Arias *et al.*, 2018).

Un dels productes d'interès que poden produir i emmagatzemar els cianobacteris és el polihidroxibutirat (PHB). El PHB ha guanyat especial interès com a alternativa sòlida als plàstics convencionals, ja que pot ser degradat i mineralitzat. A més, té característiques similars als plàstics tradicionals procedents de la indústria petroquímica (com el polipropilè), com ara una igual resposta a l'extrusió, modelat per injecció o filatura (Rueda *et al.*, 2020).

L'actual procés biotecnològic establert per a la producció de PHB es realitza amb cèl·lules heteròtrofes (Rueda *et al.*, 2020), mitjançant un procés fermentatiu (Arias, Uggetti, *et al.*, 2018) en el qual s'han observat les millors taxes de producció de PHB. Malgrat això, aquest procés té una gran demanda de carboni orgànic exogen i alts requeriments d'oxigen (O_2) relacionats amb el metabolisme aeròbic, els quals representen aproximadament entre el 30-50% dels costos de

biosíntesis del PHB, fent que el preu del PHB estigui lluny de ser competitiu (Rueda *et al.*, 2020). En aquest context, els cianobacteris poden ser una bona alternativa per a la producció de bioplàstics, ja que són capaços de produir-los de forma autotròfica, és a dir, utilitzant la llum solar i reciclant el CO_2 de l'atmosfera o dels efluents industrials. A més, tenen uns baixos requeriments nutritius, fent que els costos de producció decreixin de forma substancial (Rueda *et al.*, 2020). Tanmateix, els cianobacteris presenten unes baixes taxes de producció de PHB, amb una concentració normalment per sota del 10% en pes cel·lular sec (dcw) (Rueda *et al.*, 2020) en comparació amb els bacteris heterotròfics, que en produeixen amb una concentració que pot arribar al 70% dcw (Troschl and Meixner, 2018). Per la qual cosa, és essencial l'optimització de l'obtenció de PHB de forma autotròfica per incrementar la concentració intracel·lular de PHB i minimitzar els costos de producció, per donar lloc a una producció alternativa competitiva (Rueda *et al.*, 2020). A més, els cianobacteris tenen la capacitat d'acumular altres components interesants, com per exemple polisacàrids com el glucogen, que constitueix el principal i més adequat substrat per a la generació de biocombustibles via anaeròbia (Arias, Uggetti, *et al.*, 2018), ja que no requereixen pretractaments, ni cars processos d'extracció i conversió del producte (Arias, Uggetti, *et al.*, 2018).

1.1. CIANOBACTERIS

Els cianobacteris, també anomenades algues blauverdes, són microorganismes procariotes aeròbics, fotosintètics i pertanyen al grup dels bacteris gram negatiu (Carpine *et al.*, 2018). Poden presentar diferents morfologies, incloent-hi unicel·lulars, filamentoses, plàncton, colonial, etc. (Lau, Matsui and Abdullah, 2015). Són un grup d'organismes difícil de classificar, atès que durant tot el seu procés evolutiu no han presentat canvis representatius respecte a la morfologia, a més la transferència horitzontal de gens fa més difícil la distinció. Per aquest motiu, s'utilitzen altres caràcters morfològics per a definir els tàxons, com la forma, la polaritat, el tipus de ramificacions, d'on han sorgit i/ o si s'han perdut diverses vegades durant l'evolució de gèneres i espècies modernes (Komárek *et al.*, 2014). Un estudi recent proposa una taxonomia formada per quatre subclasses (*Gloebacteriophycidae*, Synechococcophycidae, *Oscillatoriophycidae* i *Nostochophycidae*) i vuit ordres (Figura 1) (Komárek *et al.*, 2014).

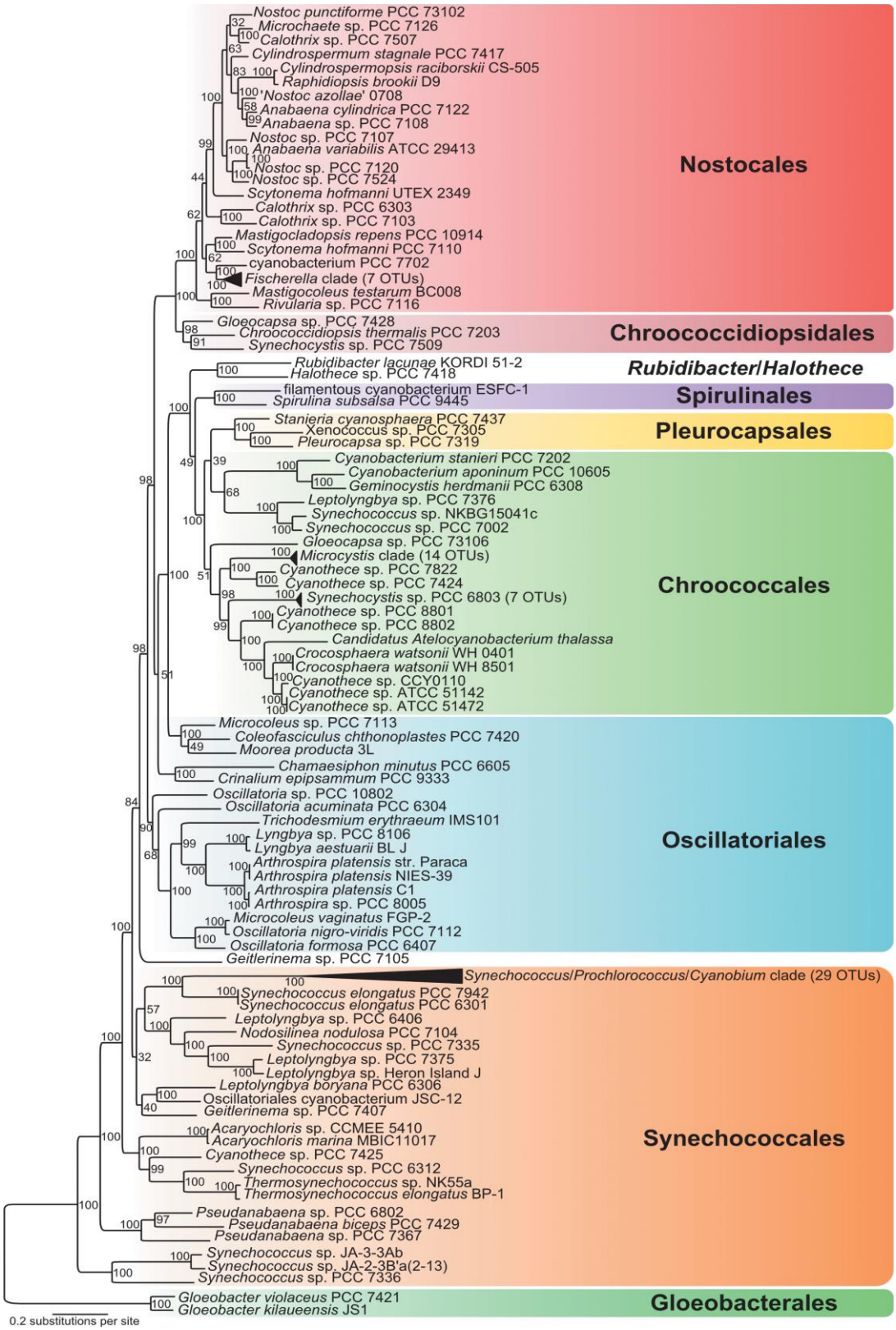


Figura 1. Arbre filogenètic dels cianobacteris, basat en les 31 seqüències de proteïnes conservades (Komárek *et al.*, 2014).

Igual que els bacteris, els cianobacteris tenen quatre fases diferenciades de creixement: fase de latència, fase exponencial (o logarítmica), fase estacionària i la fase de mort (Kamravamanesh, Slouka and Limbeck, 2019). La relació molar de creixement d'aquest fílum està composta per tres elements essencials, que es troben determinats per la relació de Redfield, que estableix una proporció molar de 106:16:1 carboni (C): Nitrogen (N): Fòsfor (P), la qual és necessària per al creixement òptim dels cianobacteris (García-Galán *et al.*, 2018). Tot i així, els cianobacteris poden viure en un ampli rang d'hàbitats, gràcies a la gran capacitat de realitzar canvis en el seu metabolisme de forma ràpida i fàcil per adaptar-se a diferents medis naturals (Lau, Matsui and Abdullah, 2015). Acostumen a créixer només sota condicions autotròfiques, però molts cianobacteris poden fer-ho també en situacions mixotròfiques i heterotròfiques, on s'ha observat que incrementen el seu rendiment de creixement (Singh *et al.*, 2017). Aquest fet possibilita la utilització del C procedent del CO_2 de les emissions d'indústries o de plantes energètiques (Balaji *et al.*, 2013). A més, poden créixer en aigües de baixa qualitat, com aigües residuals, ja que aquestes contenen grans quantitats de nutrients, en particular N i P, essencials per al cultiu d'aquests (García-Galán *et al.*, 2018). Aquests requeriments nutritius tan simples els ha potenciat a l'hora de crear sistemes de tractament d'aigua de baix cost, amb tecnologies *eco-friendly*. A més, poden produir subproductes de valor afegit a partir dels nutrients presents en aquestes aigües (Arias *et al.*, 2020). De fet, un cultiu microbià obtingut a partir d'aigües residuals està compost per una gran diversitat de cianobacteris, els quals podrien acumular bioproductes com el PHB i el glucogen (Arias *et al.*, 2018).

Actualment s'han reportat moltes espècies de cianobacteris capaces de produir PHB, en la majoria dels casos de forma fotosintètica (Panda *et al.*, 2007). Aquest PHB es produeix en condicions d'estrès ambiental i és per això que la seva màxima producció s'obtindrà durant la fase estacionària o de mort (Kamravamanesh *et al.*,2019). Un dels grans avantatges que presenten els cianobacteris és que produeixen el PHB de manera autòtrofa, fent que aquest procés sigui molt avantatjós, ja que permet la reducció d'emissions de CO_2, el desenvolupament de plàstics sostenible a un baix cost (Balaji *et al.*, 2013) i si es dugués a terme en aigües residuals, comportaria el tractament d'aquestes (Kamravamanesh *et al.*, 2019). Tot i això, tal com s'ha comentat les concentracions de PHB que produeixen són encara molt baixes i el procés metabòlic relacionat amb l'acumulació d'aquest metabòlit en cianobacteris no està encara totalment establert (Panda *et al.*, 2007). Actualment, l'estratègia més utilitzada per acumular

PHB amb cianobacteris és fer-los créixer sota condicions de limitació de nutrients, especialment de N (Panda *et al.*, 2007). La funció principal del PHB als cianobacteris és l'acumulació intracel·lular d'energia i carboni de reserva (Troschl *et al.*, 2018). A la vegada que produeixen PHB, els cianobacteris són capaços d'acumular glucogen. El glucogen que els cianobacteris produeixen alhora que el PHB té la funció de reserva de carboni. Recentment la producció de glucogen de forma fotosintètica ha guanyat importància, ja que pot ser convertit en compostos de valor afegit com bioetanol mitjançant un procés fermentatiu (Kamravamanesh *et al.*, 2019).

El repte principal per a la producció de PHB i glucogen a partir de cianobacteris rau en la capacitat d'establir les relacions dels macronutrients (N, P i C) per tal de millorar la relació de biomassa amb el producte desitjat (Kamravamanesh *et al.*, 2019).

1.1.1. *Synechocystis* sp.

Synechocystis sp. és un gènere de cianobacteris els quals es poden descriure morfològicament com a cèl·lules solitàries, esfèriques, les quals després de la seva bipartició, romanen juntes, però mai formant colònies. Sovint tenen un cromatoplasma visible, d'un dèbil color verdós o blau-verdós (Komárek *et al.*, 2013). El seu genoma sencer, inclosos els quatre plasmidis endògens, ha estat seqüenciat i consta de més de 3000 gens ja descrits (Yu *et al.*, 2013).

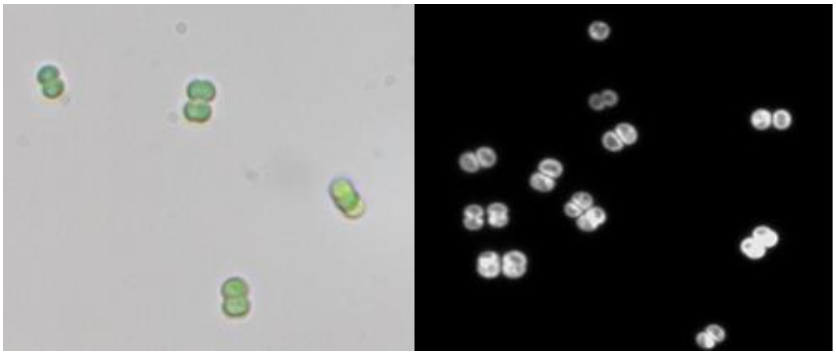


Figura 2. Synechocystis sp.

El seu cultiu òptim depèn tant de la disponibilitat de nutrients (C, N i P) com de les condicions de cultiu (llum irradiant, temperatura, pH, etc.) (Yu *et al.*, 2013). El fotobiorreactor (PBR) ideal pel seu creixement seria aquell que tingués una taxa de creixement específica entre 1,7-2,5 dia^{-1} i una taxa d'absorció de nitrat de 0,46 g $N \cdot dcw^{-1} \cdot dia^{-1}$, acostuma a cultivar-se a 30ºC i utilitzant el medi BG11 a un pH entre 7-8 (Yu *et al.*, 2013).

Synechocystis sp. en condicions d'estrès és capaç de sintetitzar PHB i glucogen, principalment induïts per la limitació de N i P (Kamravamanesh *et al.*,2018). Actualment existeixen diferents estratègies de cultiu de *Synechocystis* sp. per a la producció de PHB i glucogen. Per exemple, Troschl *,* et al (2018) proposa com a procés de producció òptim un cultiu en tres etapes on en l'última etapa es produeix l'acumulació de PHB, a partir de la conversió de glucogen a PHB, la qual es pot realitzar a la foscor. D'altra banda, Kamravamanesh *,* et al (2019) demostra que l'addició de petites dosis de P millora la producció de glucogen i estimula la producció de PHB. La producció de PHB està associada amb el creixement de biomassa i per tant, si la biomassa és màxima quan comença l'etapa de limitació de nutrients, el rendiment productiu millorarà i s'incrementarà la productivitat de PHB (Kamravamanesh *et al.*,2018). És per aquest motiu que és essencial optimitzar les condicions de cultiu inicials, per assolir la màxima productivitat de biomassa alhora que s'exhaureixen els nutrients del medi.

1.1.2. Via metabòlica del PHB i glucogen

Tot i que no hi ha un ampli consens sobre quines són les vies metabòliques i en quins moments s'expressen els gens relacionats amb la producció de PHB en cianobacteris, és conegut que durant la limitació de N i P els cianobacteris redirigeixen l'excés d'energia o la desproporció en la relació de carboni/nitrogen, o l'excés de NADPH (Kamravamanesh *et al.*,2018), regulant les vies catabòliques del sucre, i fent que l'ATP en excés sigui dirigit cap a reserves de carboni donant lloc a l'acumulació de polímers, com el glucogen i el PHB, Amb l'objectiu de seguir mantenint una taxa de creixement basal en condicions desfavorables (Kamravamanesh *et al.*,2019).

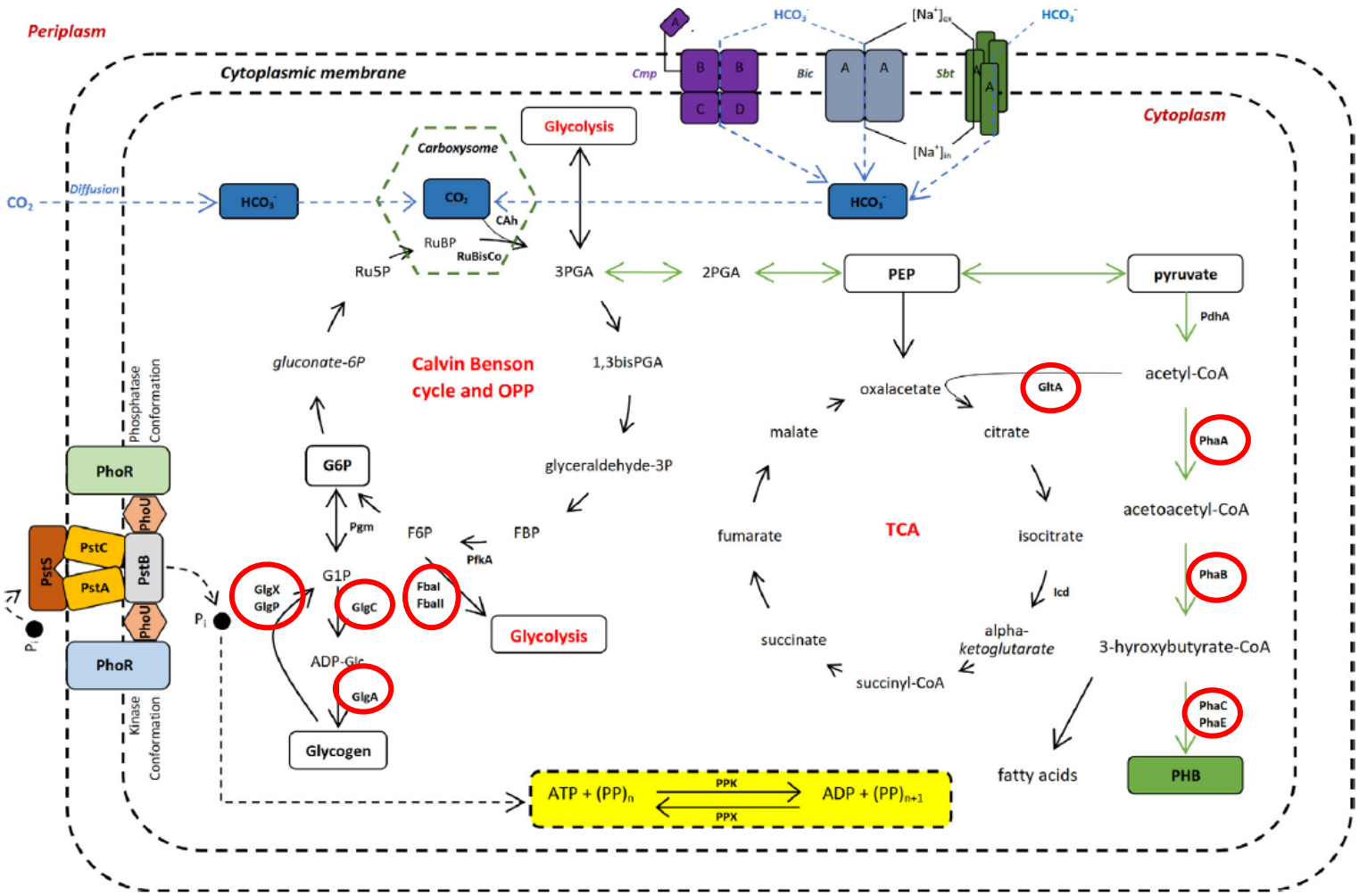


Figura 3. Vies metabòliques simplificades de biosíntesis de polihidroxibutirat (PHB) i glucogen en cianobacteris (Kamravamanesh et al., 2018). *Els gens proposats per l'estudi de l'expressió gènica han estat ressaltats en vermell.*

La ruta metabòlica dels cianobacteris per produir PHB (Figura 3) comença amb la fixació del CO_2 atmosfèric gràcies a l'activitat fotosintètica. Aquest C va a parar al Cicle de Calvin, on es fixa com a 3-fosforgliceraldehid (3-PGA). A partir d'aquestes molècules es produeixen metabòlits com el glucogen i el PHB (Kamravamanesh *et al.*,2018). Pel que fa al PHB, a partir del 3-PGA se sintetitza el piruvat i posteriorment a acetil-CoA. En aquest punt la síntesi del PHB es realitza en tres passos; (1) Dues molècules d'acetil-CoA reaccionen per formar l'acetoacetil-CoA, mitjançant l'enzim β-cetotiolasa (codificada per *phaA*); (2) L'enzim PhaB (codificat per *phaB*) redueix l'acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA, utilitzant NADPH com a donador d'electrons; (3) Polimerització de D-3-hidrobxibutiril-CoA a PHB mitjançant PHA sintetasa (codificada per *PhaC* i *PhaE*) (Kamravamanesh, Kovacs and Pflügl, 2018). Per una altra banda, el glucogen és un polisacàrid format per unitats de glucosa (Lanham *et al.*,2012) que serveix de forma transitòria com a ruta metabòlica preferent per a la fixació de CO_2 durant la limitació de N de manera ràpida (Koch *et al.*, 2019). La conversió de glucogen a glucosa i aquest a piruvat és reversible i es du a terme mitjançant la glucòlisi i la gluconeogènesi (Lanham *et al.*, 2012). Aquest metabolisme catabòlic del glucogen és el causant de l'enrogiment de les cèl·lules cloròtiques davant la limitació de N (Koch *et al.*, 2019).

Estudis recents sobre el metabolisme del PHB en cianobacteris han demostrat que la interrupció de la síntesi de PHB produeix una major producció de glucogen; tanmateix, una interrupció de la síntesi de glucogen no comporta majors quantitats de PHB. Aquestes observacions fomenten la hipòtesi que la major part del PHB sintetitzat pels cianobacteris podria derivar del glucogen, i que davant de la limitació prolongada de nutrients el glucogen es degradaria, per anar acumulant-se en forma de PHB lentament (Koch *et al.*, 2019). És a dir, que el flux més gran de carboni per a la biosíntesi de PHB prové del Cicle de Calvin i la glucòlisi, on de piruvat passa a acetil-CoA i aquest a PHB (Singh *et al.*, 2017). Aquesta conversió es du a terme ja que permet a la cèl·lula l'obtenció d'energia i poder reductor (ATP i NADH) requerits per el manteniment cel·lular (Kamravamanesh *et al.*,2019). Per tant, el procés de producció de PHB està comprès per dues fases, una fase de creixement del cultiu, seguit d'una fase de limitació de nutrients, on la biomassa acumula PHB, principalment a partir de la degradació del glucogen prèviament acumulat (Kamravamanesh *et al.*, 2019).

1.2. MODEL CINÈTIC PER A LA PRODUCCIÓ DE PHB I GLUCOGEN EN CIANOBACTERIS

Un model cinètic és aquell model en el qual es descriu una xarxa metabòlica amb l'objectiu d'investigar les propietats cinètiques i estequiomètriques d'una comunitat microbiana (Jiang *et al.*, 2011). Aquests models matemàtics permeten estudiar l'efecte simultani de múltiples factors que afecten els cianobacteris per tal de fer prediccions sobre la producció de biomassa, PHB i glucogen, que contribueixen a l'optimització del disseny, l'operació i el control del procés biològic (Solimeno *et al.*,2017). La majoria de models que descriuen el creixement de microalgues i cianobacteris s'han desenvolupat a partir d'experiments relacionats amb el creixement en relació amb la concentració de substrat en el medi de cultiu (Solimeno, 2017). En aquests models es descriu la fotosíntesi dels cianobacteris i la cinètica de creixement, considerant la influència de diversos factors com la llum, el pH, la temperatura i la disponibilitat de nutrients (Solimeno *et al.*, 2017).

Existeixen diversos models cinètics de microorganismes desenvolupats a partir del model de Monod i del model logístic, però la majoria són incapaços de simular totes les etapes del creixement dels cianobacteris. Per exemple, el model de Monod no pot simular la fase de decreixement en cianobacteris i el model logístic assumeix que el creixement dels bacteris depèn només de la concentració de biomassa, fent que sigui impossible valorar la influència de la limitació de nutrients en el creixement bacterià, allunyant-se dels valors experimentals (Zhang *et al.*, 2015). Per tal de donar un nou enfocament a la modelització biològica, Droop (1968) proposa una estructura variable per a descriure la biomassa, donant lloc al model de Droop (Lemesle *et al.*, 2008). Aquest model s'utilitza clàssicament per a la simulació de processos de fermentació (Zhang *et al.*, 2015). Si es compara amb altres models cinètics, el model de Droop assumeix que els microorganismes estan afectats no només per la limitació de nutrients presents en el cultiu, sinó també pels nutrients que hi ha dins de les cèl·lules. Per tant, aquest model permet simular la segona fase de creixement on els bacteris continuen creixent consumint els nutrients a nivell intracel·lular. Aquest model ha sigut àmpliament utilitzat per simular el creixement de microalgues en condicions d'estrès, ja que permet reproduir la capacitat que tenen de les microalgues per separar l'adquisició de nutrients i el creixement. En el model de Droop es consideren les quotes internes de nutrients, que es defineixen com la

concentració de nutrients interns dels cianobacteris per la concentració de biomassa. Respecte a la taxa de producció de bioproductes, el model de Droop considera que és proporcional a la taxa de creixement dels microorganismes (Zhang *et al.*, 2015), la qual cosa entra en contradicció amb el fet que el glucogen i el PHB només es produeixen en condicions de limitacions de N i P. És per aquest motiu que en el model fet servir en aquest treball s'han realitzat algunes modificacions respecte al model de Droop original per tal d'incloure la producció de PHB i glucogen en cianobacteris.

Per optimitzar el cultiu, el grup de recerca d'Enginyeria Ambiental i Microbiologia (GEMMA) Universitat Politècnica de Catalunya (UPC) ha dissenyat un model cinètic que descriu el metabolisme dels cianobacteris per a la producció de PHB i glucogen, basat en el model de Droop (Rueda *et al.*, 2020). Aquest model cinètic té com a objectiu simular les diferents fases del creixement dels cianobacteris per a la producció de PHB i glucogen, per estudiar la capacitat dels diferents processos fotoproductius.

A la Figura 4 es pot veure la representació esquemàtica general del model que descriu totes les interaccions considerades. Aquests processos permeten predir la síntesi de PHB i glucogen i totes les reaccions paral·leles, necessàries per al creixement cel·lular i la producció d'aquests metabòlits.

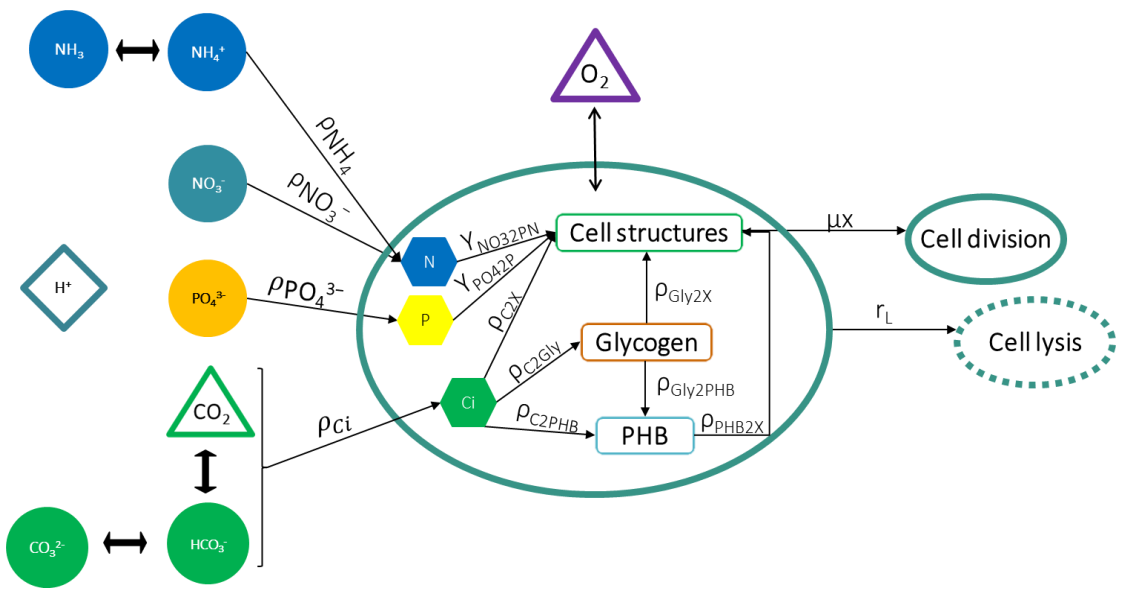


Figura 4. Vies metabòliques de biosíntesi de polihidroxibutirat (PHB) i glucogen en el model cinètic (Rueda et al., *2020*), *descrites en l'ANNEX A.*

Aquest model cinètic està format per un total de 14 processos (ANNEX A) que permeten descriure el comportament del cianobacteri pel que fa a l'absorció de nutrients, el creixement, la lisi cel·lular, la respiració endògena, la producció de PHB, la producció de glucogen, la conversió de glucogen a PHB i la transferència de gasos a l'atmosfera.

El model que es presenta en aquest treball assumeix que els cianobacteris poden créixer a partir de tres substrats: el carboni inorgànic dissolt (DIC), el glucogen i el PHB. Pel creixement cel·lular a partir del DIC present en el cultiu és necessari certa quantitat de llum. D'altra banda, no es necessita llum pel creixement cel·lular a partir del glucogen o el PHB. Tot i això, aquests dos últims processos estan inhibits per la presència de DIC, ja que s'utilitzen com a fonts de reserva de C. El model també inclou dos processos que afecten negativament a la biomassa: la mort cel·lular, que és proporcional a una constant de lisi cel·lular i a la concentració de biomassa al quadrat i la respiració endògena pròpia del cianobacteri, que és proporcional a una costant de respiració cel·lular i està limitada per la concentració d'oxigen dissolt (OD). Durant la lisi cel·lular es degraden les cèl·lules, així com tot el seu contingut, mentre que durant la respiració endògena només es degrada les substàncies acumulades a dins de la cèl·lula, però aquestes no arriben a lisar. Quan es produeixen aquests processos s'alliberen al medi CO_2, P, amoni (NH_4^+), on una part

de la cèl·lula es transforma en una fracció particulada i inerta, que no podrà ser consumida un altre cop pels cianobacteris.

A més de la font de C, els cianobacteris també necessiten absorbir nutrients (N i P) per créixer. L'adquisició d'aquests nutrients està basada en el model de Monod i està limitada pel model de Droop. Si la quota de nutrients arriba a la quota màxima, els processos d'adquisició de nutrients es pararan fins que aquesta quota disminueixi. Un cop els nutrients estan a l'interior de la cèl·lula, aquests podran fer-se servir per al creixement cel·lular. Com més propera sigui la concentració intracel·lular de nutrients de la quota màxima, més ràpid serà el creixement de les cèl·lules. Cal esmentar que l'NH_4^+ és la font de N preferent pels cianobacteris. Per tant, en presència d'NH_4^+ s'inhibirà el consum de nitrats ($N\text{-}NO_3$) (Markou *et al.*, 2014).

Finalment, si les cèl·lules disposen d'un excés de carboni inorgànic (IC), aquest és emmagatzemat en forma de glucogen i PHB, que estarà fàcilment disponible quan hi hagi limitació de C. La síntesi fotosintètica de PHB i glucogen només es pot produir quan hi ha un desequilibri del contingut cel·lular intern de N i P. Per a la producció d'aquests metabòlits es consideren tres processos: la producció fotosintètica de glucogen on l'IC es transforma i s'emmagatzema en forma de glucogen, la producció fotosintètica de PHB on s'utilitza IC per formar PHB i finalment la conversió de glucogen a PHB.

Com a resultat de l'activitat metabòlica dels cianobacteris es disminueix la presència de protons (H^+) en el medi, augmentant el pH. Aquest augment de pH produeix un desplaçament dels equilibris químics. A més, tots els processos del model estan influenciats pel pH i temperatura, per tant, com més propers al punt òptim més altes seran les taxes de reacció. Finalment, el model també considera les equacions de transferència de gasos, a causa de l'intercanvi de l'O_2 i el CO_2 amb l'atmosfera.

2. OBJECTIUS DEL PROJECTE

Els objectius establers en aquest projecte són els següents:

1. Optimitzar les condicions de cultiu mitjançant l'ús d'un model cinètic.
2. Estudiar l'efecte de les condicions de cultiu establertes a partir del model cinètic de l'objectiu anterior en la producció de PHB i glucogen.

3. ÀMBIT DEL PROJECTE

La finalitat d'aquest projecte és optimitzar les condicions en les quals un monocultiu no asèptic del cianobacteri *Synechocystis* sp. pot incrementar la seva producció de PHB i glucogen, per tal de facilitar la transició cap a un procés industrialitzat. Habitualment, la producció de PHB amb cianobacteris es realitza en dues etapes: una primera etapa on es fan créixer els cianobacteris amb abundància de nutrients, i una segona etapa on es reemplaça el medi de cultiu per un medi sense nutrients (principalment N i P), per tal d'induir la limitació de nutrients. Per dur a terme aquest procés es necessari realitzar un procés de separació de la biomassa (sedimentació o centrifugació) entre les dues etapes, que sol augmentar considerablement els costos de producció. Per aquest motiu, per tal d'assolir l'objectiu principal d'aquest projecte, s'estudiaran diferents condicions inicials de cultiu, en un procés d'una etapa, on el mateix cultiu s'autolimiti. Per aconseguir-ho, s'ha utilitzat el model cinètic dissenyat pel grup de recerca GEMMA de la UPC, per tal d'optimitzar la concentració de nutrients inicials necessària per assolir el procés en una etapa: maximitzar la producció de biomassa en l'etapa de creixement i incrementar el percentatge de PHB i glucogen obtinguts fins al moment. Amb l'aplicació d'aquest model s'espera trobar les condicions de cultiu òptimes que permetin maximitzar la productivitat de PHB.

A continuació, s'aplicaran les condicions de cultiu òptimes trobades amb el model a fotobiorreactors de 3 L. En aquests bioreactors s'estudiarà l'habilitat del model per predir les cinètiques de creixement, consum de nutrients i producció de bioproductes en aquest sistema. Finalment, s'avaluarà l'efecte sobre la producció de PHB de diferents concentracions del IC durant l'etapa d'acumulació.

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. MATERIAL

En aquesta secció es presentaran els reactors utilitzats per desenvolupar el projecte així com, els mètodes analítics i els reactius necessaris per a realitzar els experiments.

4.1.1. Obtenció de la biomassa

El monocultiu no asèptic de *Synechocystis* sp. es va obtenir a partir del seu aïllament provinent d'una comunitat microbiana complexa que contenia cianobacteris i microalgues cultivades utilitzant aigües residuals com a matèria primera en un PBR horitzontal tubular híbrid a gran escala situat en el campus experimental de l'Agrópolis de la UPC.

4.1.2. Reactors

Per tal de facilitar unes condicions bones per a la producció de PHB i glucogen en l'experiment s'han utilitzat quatre fotobiorreactors cilíndrics de vidre (PBR1, PBR2, PBR3, PBR4), amb un diàmetre d'11 cm i un volum total una mica superior als 3 L, per així evitar els desbordaments en agregar l'àcid per a controlar el pH. El pH s'ha controlat mitjançant un sensor de pH (HI 1001, HANNA instruments) monitoritat per un controlador electrònic (HI 8711, HANNA instruments). Aquest està programat perquè a pH per sobre de 8 activi una bomba peristàtica que alliberi àcid clorhídric (HCl) per tal de reduir el pH, quan aquest torna a ser inferior de 8, l'addició s'atura. Els reactors estan en contínua agitació, gràcies a un agitador magnètic, assegurant la mescla completa. Estan sotmesos a cicles de 15:9 h fase lluminosa: obscura, il·luminats amb quatre fluorescents LEDs freds de 14 W, i de manera individual cada fotobiorreactor està envoltat per una tira de LEDs càlids. D'aquesta manera la llum mitjana que arriba a la superfície dels reactors és de 102 µmols de fotons PAR·$(m^2 \cdot s)^{-1}$, mesurada amb un luxímetre (HI 97500, HANNA instruments). A la part superior del reactor, hi ha un filtre que permet l'intercanvi de gasos amb

l'exterior i una vàlvula que permet extreure mostra, mantenint així les condicions d'esterilitat. A la Figura 5 es pot veure la disposició dels fotobiorreactors:

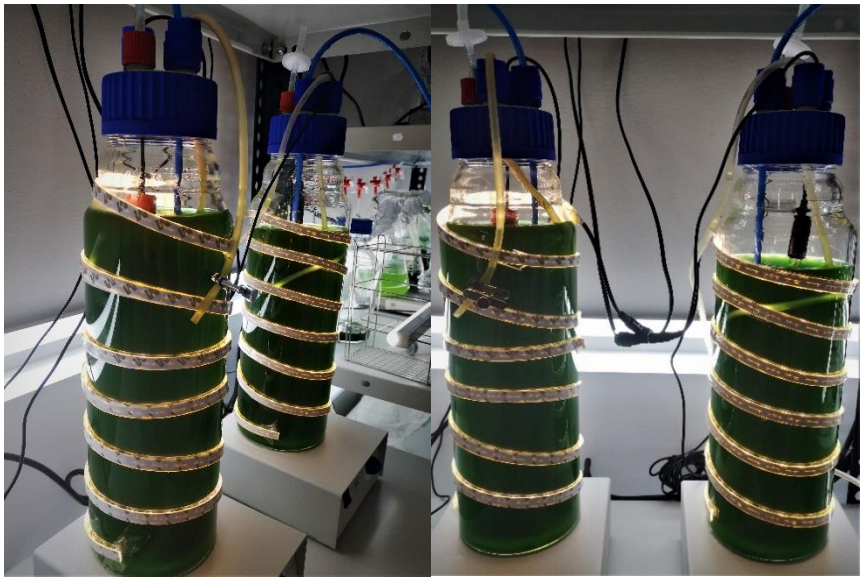


Figura 5. Fotobiorreactors utilitzats.

4.1.3. Reactius

En aquest apartat s'explicaran els reactius necessaris per a realitzar l'experiment i tots els anàlisis:

- **Medi de cultiu BG11**: és el medi de cultiu de creixement de *Synechocystis* sp., Stanier, et al (1971) descriu la seva composició. Per tal d'induir la limitació de nutrients, s'ha modificat la concentració de nutrients presents en el medi de cadascun dels fotobiorreactors. A l'ANNEX B es troben especificades les concentracions d'aquest.

- **Alcalinitat**
    - Alka-M-Photometer 51321BT, Lovibond water testing.
    - Alka-P-Photometer 513230BT, Lovibond water testing.

- **Nitrats**
  - Solució patró nitrats.
  - Àcid clorhídric, HCL 1N.

- **Fosfats**
  - Àcid Sulfúric, H_2SO_4 5 N.
  - Solució de tartrat antimònic de potassi: 1,3715 g $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ en 400 mL d'aigua destil·lada.
  - Solució de molibdat d'amoni: 20g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ en 500 mL d'aigua destil·lada.
  - Àcid ascòrbic, 1M.
  - Reactiu combinant: barrejar els reactius anteriors en les proporcions següents per 100 mL: 50 mL H_2SO_4, 5mL solució de tartrat antimònic de potassi, 15 mL Solució de molibdat d'amoni i 30 mL d'àcid ascòrbic.
  - Solució aquosa indicadora de fenolftaleïna.
  - Persulfat d'amoni, $(NH4)_2S_2O_8$ o potassi persulfat $K_2S_2O_8$.
  - Hidròxid de sodi NaOH.
  - Solució patró fosfats.

- **PHB**
  - Metanol, CH_3OH.
  - Cloroform, $CHCl_3$.
  - Àcid Sulfúric, H_2SO_4.
  - Heptadecà, $C_{17}H_{36}$.
  - PHB-PHV (86:14% en pes (wt), CAS 80181-31-3).

- **Glucogen**
  - Àcid clorhídric, HCl 1N.
  - Fenol, 5% aquós pes/volum (w/v).
  - Àcid Sulfúric , H_2SO_4 concentrat.

4.2. MÈTODES ANALÍTICS

4.2.1. Terbolesa

La terbolesa en l'aigua és causada per les partícules suspeses i col·loïdals. La mesura de la terbolesa expressa la propietat òptica que fa que la llum es dispersi i s'absorbeixi en lloc de transmetre's sense canvis de direcció o de quantitat de flux a través de la mostra.

La terbolesa està directament relacionada amb la quantitat de matèria en suspensió. És una manera fàcil i ràpida de mesurar la biomassa que hi ha dins del bioreactor. Per mesurar la terbolesa es fa servir un nefelòmetre electrònic (HI 9370, HANNA instruments).

Les mesures del nefelòmetre es basen en mesurar la llum dispersada de la mostra i comparar-la amb una referència estàndard. El nefelòmetre consisteix en una font de llum que il·lumina la mostra i uns detectors fotoelèctrics amb uns dispositius de lectura que detecten la intensitat de llum dispersada a 90º respecte a la direcció de la llum incident. Les unitats de mesura són el *nephelometric turbidity units* (NTU).

Les mesures de terbolesa han de fer-se just després d'extreure's les mostres per evitar les floculacions o els canvis de temperatura.

El procediment que cal seguir per a mesurar la terbolesa és el següent:

1. Agitar suaument la mostra i esperar fins que desapareguin les bombolles.
2. Abocar la mostra dins de la cel·la. Assecar la cel·la amb un paper.
3. Introduir la cel·la dins del dispositiu i mesurar.

Aquestes mesures es poden correlacionar amb la concentració de biomassa present a la mostra mitjançant una recta de calibrat:

$$Sòlids\ suspesos\ volàtils\ (SSV)\left[\frac{mg}{L}\right] = 0{,}6649 \cdot NTU + 144 \qquad \textit{(Eq. 1)}$$

4.2.2. Oxigen dissolt (OD)

L'oxigen dissolt és la mesura que fa referència a l'oxigen present a la mostra. És una mesura ràpida i fàcil de fer, que permet saber l'activitat fotosintètica del cultiu.

La mesura d'oxigen s'ha fet amb un sensor de membrana (HI9142, HANNA instruments). Els sensors d'oxigen dissolt estan formats per una membrana selectiva, sensible a l'oxigen, i dos elèctrodes metàl·lics en contacte amb un altre electròlit, que estan separats de la mostra per la membrana.

En la següent imatge es pot veure un esquema del seu funcionament:

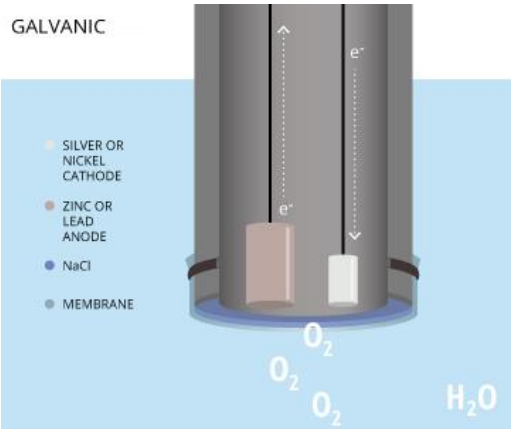


Figura 6. Elèctrode de membrana galvànic (Fundamentals of environmental Measurements, s.d.).

És preferible fer la mesura de l'OD *in situ*. Malgrat això, la mida dels reactors i les condicions de cultiu estèrils, ho han impossibilitat. El que s'ha fet és extreure una mostra i fer la mesura de l'oxigen dissolt en el mateix instant en què s'extreu la mostra. Per fer-ho s'han agitat les mostres i s'ha intentat evitar que estiguin en contacte amb l'aire, ja que aquest pot modificar la concentració d'OD.

4.2.3. Microscòpia òptica

L'objectiu de la microscòpia òptica és permetre veure característiques d'interès que puguin ser descrites i caracteritzades en detalls visibles a una escala menor que la de l'ull humà i augmentar el contrast entre els elements estructurals dels materials i el fons. Per tal de poder caracteritzar el cultiu s'ha utilitzat un microscopi òptic (Eclipse E200, Nikon) i un accessori d'epifluorescència amb una font de llum LED. La microscòpia d'epifluorescència ha sigut utilitzada, pel fet que aquesta il·luminació és capaç de penetrar en tota la profunditat de la mostra i causen l'excitació de les molècules que emeten fluorescència (*ONI,* s.d.).

4.2.4. Sòlids suspesos totals i volàtils (SST, SSV)

Els SST són la proporció de sòlids retinguts en un filtre amb una grandària nominal de porus d'1-3 µm. Es consideren SSV aquella part de pes que es perd després del procés d'ignició (550 ºC) dels sòlids retinguts al filtre i són un indicador de la quantitat de matèria orgànica present en la mostra. No obstant la seva precisió és limitada, ja que el procés d'ignició no es limita només a la matèria orgànica, sinó que també s'inclouen les descomposicions o volatilitzacions d'algunes sals minerals, com el bicarbonat (HCO_3^-).

El procediment per analitzar els SST i els SSV és el següent:

1. Preparar els filtres mitjançant una numeració i filtrant aproximadament 25 mL d'aigua destil·lada. Després introduir-los a una mufla a 550 ºC durant 20 minuts. S'han de deixar refredar i seguidament s'han de pesar. Els filtres es poden guardar en una estufa a 100 ºC.
2. Filtrar una quantitat suficient de mostra per tenir suficient deposició de sòlids en el filtre utilitzant un matràs Kitasato.
3. Deixar assecar els filtres entre 103-105 ºC durant 24 hores i pesar.
4. Introduir les mostres en un forn de mufla a 550 ºC durant 20 minuts i després tornar a pesar els filtres.

Els sòlids suspesos totals i els sòlids suspesos volàtils poden ser calculats mitjançant aquestes fórmules:

$$SST\ \left[\frac{mg}{L}\right] = \frac{(Pes\ filtre\ a\ 100\ ºC - Tara\ del\ filtre) \cdot 1000}{Volum\ filtrat\ [L]} \qquad (Eq.\ 2)$$

$$SSV\ \left[\frac{mg}{L}\right] = \frac{(Pes\ filtre\ a\ 100\ ºC - Pes\ filtre\ a\ 500\ ºC) \cdot 1000}{Volum\ filtrat\ [L]} \qquad (Eq.\ 3)$$

4.2.5. Alcalinitat

L'alcalinitat de l'aigua és la seva capacitat neutralitzadora d'àcid. I és utilitzada com indicador de la concentració de carbonat (CO_3^{2-}), bicarbonat (HCO_3^-) i hidròxid (OH^-) present en la mostra. En aquest cas s'ha utilitzat la mesura de l'alcalinitat P i M (alcalinitat total), a partir de la qual es pot estimar el DIC present en el cultiu (Aqion*, s.d.*).

L'alcalinitat P (Eq. 4) c és l'alcalinitat de la mostra fent una valoració fins a arribar a un pH de 8,3 i utilitza un indicador de base de fenolftaleïna, aquesta prova indica l'alcalinitat respecte dels OH^- més la meitat de l'alcalinitat respecte als carbonats. Mentre que l'alcalinitat M (Eq. 5) (*Aqion, s.d.*) és la mesura de l'alcalinitat de la mostra fent una valoració fins a arribar a un pH de 4,5 i utilitza un indicador de base d'heliantina. L'alcalinitat M indica la combinació de bicarbonats, carbonats i hidròxids.

Per a mesurar l'alcalinitat s'ha utilitzat un fotocolorímetre (MD 600, Lovibond), mesurant l'absorbància i comparant el color amb un patró d'una substància coneguda i la mostra a determinar. Per tal de mesurar l'alcalinitat M i P s'ha fet servir un kit de Lovibond.

A partir de les concentracions d'alcalinitat M i P obtingudes amb el fotocolorímetre, es pot fer una estimació del DIC (Eq. 6) (*Aqion, s.d.*).

$$Alcalinitat\ P\ \left[\frac{mg\ CaCO_3}{L}\right] = ([OH^-] - [H^+]) + [CO_3^{-2}] - [H_2CO_3] \quad \text{(Eq. 4)}$$

$$Alcalinitat\ M\ [\frac{mg\ CaCO_3}{L}] = ([OH^-] - [H^+]) + [HCO_3^-] + 2[CO_3^{-2}] \quad \text{(Eq. 5)}$$

$$DIC\ [\frac{mg\ CaCO_3}{L}] = Alcalinitat\ M - Alcalinitat\ P \quad \text{(Eq. 6)}$$

El càlcul de DIC dona els resultats en mg $CaCO_3 \cdot L^{-1}$, per tal d'obtenir la concentració de C de la mostra en mg $C \cdot L^{-1}$ es duu a terme el següent factor de conversió:

$$\frac{mg\ CaCO3}{L} \cdot \frac{1g\ CaCO_3}{1000\ mg\ CaCO_3} \cdot \frac{1\ mol\ CaCO_3}{100\ g\ CaCO_3} \cdot \frac{2\ mol\ C}{1\ mol\ CaCO_3} \cdot \frac{12\ g\ C}{1\ mol\ C} \cdot \frac{1000\ mg\ C}{1\ g\ C}$$

4.2.6. Nitrats

Els nitrats han estat determinats mitjançant espectrofotometria. Aquesta tècnica s'utilitza per analitzar mostres que tenen poc contingut de matèria orgànica.

L'espectrofotòmetre mesura la quantitat d'intensitat de llum absorbida a 220nm després de passar a través d'una mostra. La mesura a 220 nm, permet la determinació de $N\text{-}NO_3$, però també de la matèria orgànica dissolta. És per això que cal corregir l'absorbància obtinguda a 220nm, restant la quantitat de llum que ha sigut absorbida per la matèria orgànica. Per fer això, també es mesura l'absorbància a 275 nm on només absorbeix la matèria orgànica, però no el $N\text{-}NO_3$.

Per aplicar aquest mètode de quantificació, es necessita un procediment previ de filtració per eliminar les partícules majors de 2 µm. A més, aquest mètode requereix una corba de calibració, preparada a partir de diferents solucions de diferent concentració de nitrats.

Un cop la mostra està filtrada el procediment per analitzar els $N\text{-}NO_3$ és el següent:

1. Afegir a 50mL de mostra filtrada 1 mL d'HCl i homogeneïtzar. Si la mostra a analitzar s'espera que tingui una concentració superior a 7mg·L^{-1} caldrà fer una dilució.
2. Paral·lelament, s'ha de fer una corba de calibració entre els rangs de 0 a 7 mg de N-NO_3.
3. Llegir l'absorbància, considerant l'aigua destil·lada com a 0 d'absorbància. Utilitzant una longitud d'ona de 220 nm i després a 275 nm per a determinar la interferència deguda a la matèria orgànica dissolta. L'absorbància a 220 nm es corregeix restant-li dues vegades l'absorbància a 275 nm.

La concentració de N-NO_3 es pot calcular substituint l'absorbància en la corba de calibració prèviament calculada:

$$N - NO_3 \left[\frac{mg}{L}\right] = \frac{A + 0{,}0021}{0{,}2364} \qquad \textit{(Eq. 7)}$$

On, A és l'absorbància mesurada per l'espectrofotòmetre.

4.2.7. Fosfats

Els fosfats han estat determinats mitjançant dues proves: una que determina el fòsfor inorgànic (P-PO_4) i l'altra que determina el fòsfor total (orgànic + inorgànic) present en la mostra. Es considera fòsfor orgànic aquell fòsfor que està unit a una cadena de carbonis i que pot ser oxidat convertint-se en ortofosfat. El fòsfor es pot trobar dissolt o en suspensió. Per tal de dividir aquestes dues formes de fòsfor s'han realitzat mesures filtrant i sense filtrar les mostres.

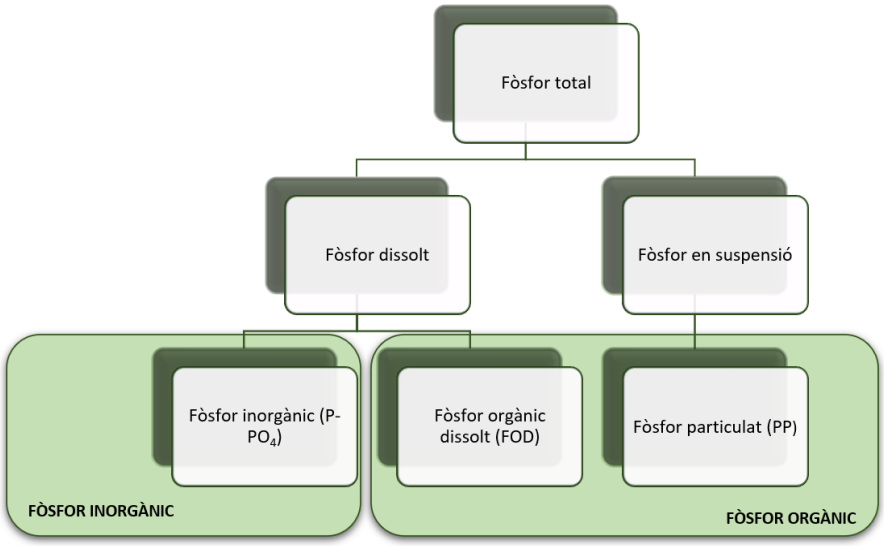


Figura 7. Formes del fòsfor al cultiu.

Per a determinar el P-PO_4 s'utilitza el mètode de l'àcid ascòrbic i l'espectrofotometria. Aquest mètode es basa en el fet que els ortofosfats reacciona, en medi àcid, amb el molibdat d'amoni i el tartrat d'antimoni i potàssic, per donar lloc l'àcid fosfomolíbdic, aquest es redueix a blau de molibdè donant un color blau a la mostra que pot ser quantificat mitjançant espectrofotometria visible. Per tal de mesurar les formes solubles de fòsfor inorgànic es necessita un procediment previ de filtració per eliminar les partícules majors de 2 µm. A més, aquest mètode requereix una corba de calibració, preparada a partir de diferents solucions de concentració de fosfat.

Un cop la mostra està filtrada el procediment per analitzar el fòsfor és el següent:

1. Afegir 50 mL de mostra a un Erlenmeyer.
2. Afegir 8 mL de reactiu combinat.
3. Llegir l'absorbància, considerant el reactiu amb l'aigua destil·lada com a 0 d'absorbància. Utilitzant una longitud d'ona de 880 nm.

La concentració de P-PO_4 es pot calcular substituint l'absorbància en la corba de calibració prèviament calculada:

$$P - PO_4 \left[\frac{mg}{L}\right] = \frac{A - 0{,}05}{0{,}466} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

On A és l'absorbància mesurada per l'espectrofotòmetre.

Per a determinar el fòsfor total (orgànic + inorgànic), s'utilitza el mateix mètode que pel fòsfor inorgànic però amb una digestió prèvia de persulfat d'amoni entre els passos 1 i 2, per tal d'oxidar la matèria orgànica i així alliberar tot el fòsfor com ortofosfats i poder quantificar-ho. Un cop s'ha realitzat la digestió es mesuren els ortofosfats alliberats utilitzant el mètode anterior. Cal destacar que el fòsfor total s'ha mesurat tant com a fòsfor soluble, com la suma del fòsfor soluble i el fòsfor particulat (PP). Per mesurar el fòsfor total soluble és necessari realitzar un procés previ de filtració per eliminar les partícules majors de 2 µm.

La concentració de fòsfor total es pot calcular substituint l'absorbància en la corba de calibració prèviament calculada:

$$Fòsfor\ total \left[\frac{mg}{L}\right] = \frac{A - (5 \cdot 10^{-5})}{0{,}3177} \qquad \text{(Eq. 9)}$$

On, A és l'absorbància mesurada per l'espectrofotòmetre.

A partir d'aquestes mesures es poden determinar les diferents fraccions de fòsfor que hi ha en el cultiu. El fòsfor orgànic dissolt (FOD) (Eq. 10) serà aquell fòsfor que han alliberat les cèl·lules a l'exterior mentre que el PP (Eq. 11) serà el P que hi ha a dins de la biomassa o que ha precipitat.

$$FOD \left[\frac{mg}{L}\right] = Fòsfor\ total\ dissolt - (P - PO_4) \qquad \text{(Eq. 10)}$$

$$PP \left[\frac{mg}{L}\right] = Fòsfor\ total - FOD - (P - PO_4) \qquad \text{(Eq. 11)}$$

4.2.8. Quantificació PHB

La metodologia emprada per a la mesura de la concentració de PHB és una adaptació del mètode descrit per Lanham (2013), quantificant amb cromatografia de gasos. Per tal d'analitzar la quantitat de PHB present en la mostra es prenen les mostres al principi del cicle de llum de 15 h i abans de l'addició de C, a continuació, s'han d'ultracongelar i liofilitzar. A més, aquest mètode requereix una corba de calibració, la qual s'ha de preparar cada cop que es du a terme l'anàlisi, a partir de solucions de diferents concentracions de PHB.

Un cop les mostres estan preparades, la quantificació es duu a terme a partir dels següents passos:

1. Pesar 2-3 mg de biomassa liofilitzada.
2. Afegir 1 mL de $CHCl_3$, que conté àcid benzoic. S'ha de condicionar la xeringa un mínim de tres vegades amb la solució.
3. Afegir 1 mL de metanol acidificat amb H_2SO_4 20 % volum solut/volum dissolució (v/v).
4. Digerir durant 5 hores a 100 ºC.
5. Després, ràpidament deixar refredar durant 30 minuts en aigua gelada (aprox. 0 ºC) i a continuació afegir 0,5 mL d'aigua desionitzada en cada tub.
6. Barrejar amb el vòrtex les mostres durant 1 minut per separar els diferents dissolvents per densitat.
7. Retirar el $CHCl_3$ amb la pipeta Pasteur i col·locar la mostra en un vial amb tamís molecular, que permet absorbir l'aigua que hagi quedat a les mostres.
8. Mesurar amb una cromatografia de gasos les mostres, per a quantificar la concentració de PHB.

Per a dur a terme la cromatografia de gasos al cromatògraf s'ha d'acoblar un detector de ionització de flama (GCFID Varian CP-3800), el qual s'ha d'equipar amb una columna Stalbiwax (Resek, Estats Units). S'utilitza heli com a gas portador amb un cabal d'1 $ml \cdot min^{-1}$.

4.2.9. Quantificació glucogen

El mètode emprat per a mesurar la concentració de carbohidrats va ser descrit per Dubois (1956), a partir del mètode fenol-sulfúric i l'espectrofotometria. Aquesta prova es basa en el fet que els sucres i els seus derivats adquireixen un color groc-taronja quan son tractats amb fenol i H_2SO_4 concentrat (Do *et al.*, 2009). El cianobacteris sintetitzen carbohidrats en forma de glucogen, per tant, es pot considerar que els carbohidrats mesurats amb aquest mètode són principalment glucogen. Tanmateix, la metodologia analítica no només mesura el glucogen, sinó que també mesura tots els polisacàrids formats per monòmers de glucosa, com els polisacàrids de la paret cel·lular o els exopolisacàrids (Rueda *et al.*, 2020).

Per tal de poder quantificar els carbohidrats es necessita realitzar un procediment previ on s'extreuen les mostres a l'inici del cicle de llum de 15 h i abans de l'addició de C, s'ultracongelen i es liofilitzen. A més, aquest mètode requereix una corba de calibració, preparada a partir de diferents solucions de concentració de glucosa.

Un cop les mostres estan preparades, la quantificació es duu a terme a partir dels següents passos:

1. Pesar entre 1-2 mg de biomassa liofilitzada.
2. Afegir 2 mL d'HCl i fer una digestió a 100 ºC durant 2 hores.
3. Diluïm amb un factor 1:10 la mostra.
4. Afegir 0,5 mL de fenol i 2,5 mL H_2SO_4 concentrat, agitar amb el vòrtex i deixar a temperar 10 minuts.
5. Posar a bany a 35 ºC durant 15 minuts.
6. Mesurar l'absorbància a 492 nm, per tal de quantificar la concentració de carbohidrats.

La concentració de glucogen es pot calcular substituint l'absorbància en la corba de calibració prèviament calculada:

$$Glucogen\ \% = \frac{(73{,}51 \cdot A - 2{,}098) \cdot 5 \cdot 0{,}002}{Pes\ biomassa\ liofilitzada} \qquad \textit{(Eq. 12)}$$

On A és l'absorbància mesurada per l'espectrofotòmetre.

5. DISSENY EXPERIMENTAL

En aquest apartat s'explicarà el procediment experimental desenvolupat, per tal d'obtenir els objectius proposats. L'experiment està dividit en dues parts, la primera que fa referència a l'optimització de les condicions de cultiu a partir del model cinètic i la segona part on s'explica els experiments realitzats en els fotobiorreactors cilíndrics verticals de 3 L, per tal d'aconseguir els objectius establerts.

5.1. OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU MITJANÇANT MODELITZACIÓ

El model cinètic del cianobacteri *Synechocystis* sp. s'ha utilitzat per descriure els efectes dels nutrients en la taxa de creixement dels cianobacteris, l'absorció de nutrients i la producció de PHB per així poder entendre, predir i optimitzar la producció d'aquest metabòlit. Per la qual cosa, en aquesta part de l'experiment s'ha utilitzat el model desenvolupat pel grup d'investigació GEMMA, amb l'objectiu de trobar les condicions inicials òptimes de nutrients (N i P) que donen lloc a la màxima productivitat de PHB. Un cop es tenen aquests valors, s'ha determinat la quantitat de C òptim, perquè s'acabi alhora que la resta de nutrients i conèixer quan s'acaba la primera etapa de cultiu numèricament. El model utilitzat s'ha implementat en el software COMSOL Multiphysics®, utilitzant el mòdul d'enginyeria de reaccions i zero dimensions.

5.2. ESTUDI DE L'EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN FOTOBIORREACTORS CILÍNDRICS VERTICALS DE 3 L INOCULATS AMB *SYNECHOCYSTIS* SP.

Aquests reactors cilíndrics han estat utilitzats per aconseguir el segon objectiu plantejat a l'inici del treball: estudiar l'efecte de les condicions de cultiu en la producció de glucogen i PHB en *Synechocystis* sp., per veure quines són les millors condicions de cultiu.

Els experiments realitzats consten de dues fases principals: (1) fase de creixement i (2) fase d'acumulació dels metabòlits. Aquestes dues fases es duran a terme en un mateix reactor. La planificació dels experiments realitzats és la següent:

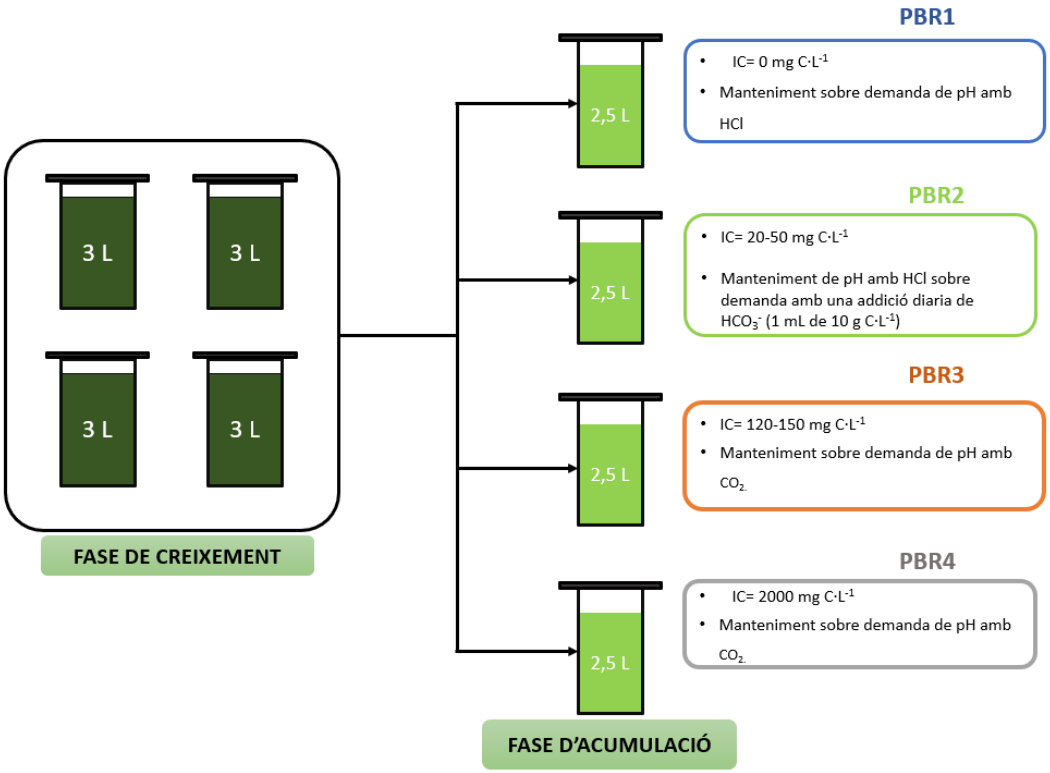


Figura 8. Disseny experimental.

La fase de creixement consisteix en quatre fotobiorreactors a un volum de 3 L amb les mateixes condicions de cultiu: cicles de llum 15:9 h lluminosa:fosca, limitació de N i P i HCl per controlar el pH del medi. Durant aquest període s'ha mesurat la velocitat de creixement mitjançant l'anàlisi de SSV, terbolesa i consum de nutrients (N i P). Un cop consumits tots els nutrients presents en el medi, s'inicia la fase d'acumulació, en aquesta fase s'aplicaran diferents concentracions d'IC (Figura 8). A més, en aquesta etapa per dur a terme el control de pH s'utilitza una alimentació de CO_2, per intentar d'aquesta manera aconseguir que l'IC es mantingui constant (excepte en el PBR 1 i PBR 2 on el control de pH es realitza mitjançant l'addició d'àcid clorhídric, per tal d'evitar introduir un excés d'IC als reactors). L'experiment dura aproximadament 30 dies, uns 15 dies cada fase, en els quals diàriament, durant la fase de creixement, s'han realitzat determinades proves analítiques (Taula 1) per a veure l'evolució del cultiu i així, poder comprendre el que està succeint al sistema.

Taula 1. Planificació setmanal proves analítiques.

Dilluns	*Dimarts*	*Dimecres*	*Dijous*	*Divendres*
• Terbolesa *(3 rèpliques)* • OD • Temperatura • Alcalinitat • SST/SSV *(3 rèpliques)* • Nitrats • Fosfats • Microscòpia òptica	• *Terbolesa (3 rèpliques)* • OD • Temperatura • Alcalinitat • *SST/SSV (3 rèpliques)* • Nitrats • Fosfats • Fòsfor Total • Microscòpia òptica • PHB • Glucogen	• *Terbolesa (3 rèpliques)* • OD • Temperatura • Alcalinitat • *SST/SSV (3 rèpliques)* • Nitrats • Fosfats • Microscòpia òptica	• *Terbolesa (3 rèpliques)* • OD • Temperatura • Alcalinitat • *SST/SSV (3 rèpliques)* • Nitrats • Fosfats • Microscòpia òptica	• *Terbolesa (3 rèpliques)* • OD • Temperatura • Alcalinitat • *SST/SSV (3 rèpliques)* • Nitrats • Fosfats • Microscòpia òptica

Durant la fase d'acumulació, un cop a la setmana, s'han dut a terme totes les anàlisis (dimarts, Taula 1) i dos cops a la setmana (dimarts i dijous) s'han analitzat: PHB, glucogen i alcalinitat.

Per a conèixer les condicions òptimes de cultiu s'ha dut a terme dos experiments amb les següents condicions inicials:

Taula 2. Condicions inicials.

	CONDICIONS INICIALS		
	N inicial (mg N·L^{-1})	**P inicial (mg P·L^{-1})**	**C inicial (mg C·L^{-1})**
Assaig març	125	7	456
Assaig maig	Model Cinètic*	Model Cinètic*	Model Cinètic*

*Les condicions inicials de l'assaig de Maig són aquelles que s'obtindran a partir del model cinètic d'optimització.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquesta part s'inclouen els resultats principals del projecte. La primera part mostra els resultats realitzats a partir del model cinètic per trobar les millors concentracions de nutrients per acumular PHB i glucogen. En la segona els resultats experimentals en aplicar les diferents condicions de cultiu esmentades en la Taula 2.

6.1. OPTIMITZACIÓ DE LES CONDICIONS DE CULTIU MITJANÇANT MODELITZACIÓ

Com s'ha dit, el primer objectiu plantejat en aquest estudi és l'optimització d'un procés en una etapa, simple i optimitzat, per així poder facilitar la transició de producció de PHB cap a un procés industrialitzat. El model cinètic té com a objectiu reproduir les dades experimentals a partir de diferents condicions inicials, per a poder identificar aquelles condicions òptimes que permeten maximitzar la producció de PHB. L'optimització de la producció de PHB no és un tema fàcil de resoldre, ja que la seva producció a partir de microorganismes combina diferents vies metabòliques. És per aquest motiu que té gran importància l'optimització de les dosis inicials de macronutrients per assolir una alta productivitat de PHB (Kamravamanesh *et al.*, 2019). En aquest treball s'han estudiat diferents combinacions de concentracions inicials de nutrients per determinar les condicions òptimes de cultiu en un reactor. Per fer-ho, s'ha fet córrer el model implementat en el software COMSOL Multiphysics® imposant diferents concentracions de N i P inicials. Amb els resultats proporcionats pel model en cada una de les condicions inicials de nutrients, s'ha calculat la productivitat de PHB cada dia i s'ha seleccionat el dia amb la productivitat més elevada.

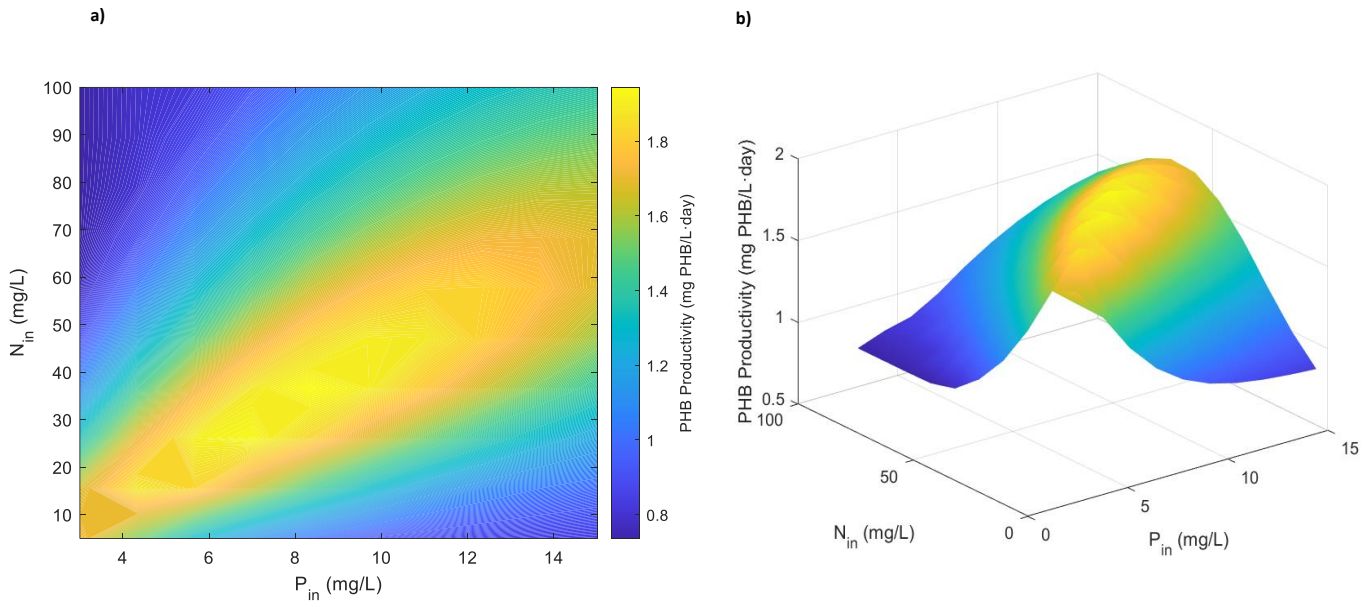


Figura 9. Gràfics d'optimització de la producció de PHB en Synechocystis sp. enfront la concentració inicial de N i P a partir del model cinètic. a) Gràfic de contorn que representa a la interacció de dos factors, la concentració inicial de fosfats respecte a la concentració inicial de nitrats en la productivitat de PHB (mg PHB·L^{-1}·dia^{-1}). b) Gràfic de superfície de resposta que representa la interacció de dos factors, la concentració inicial de fosfats respecte a la concentració inicial de nitrats, per a conèixer la productivitat PHB (mg PHB·L^{-1}·dia^{-1}).

La Figura 9 mostra la productivitat de PHB obtinguda a partir de les concentracions inicials de N i P. Es pot observar que la productivitat òptima es va obtenir a una baixa concentració de N (entre 20 i 50 mg N·L^{-1}) i a una concentració relativament alta de P (entre 6 i 12 mg P·L^{-1}). La relació optima de N:P està entre 9 i 11 (base molar), la qual és moderadament més baixa que la relació de Redfield (relació N:P=16) (Redfield, 1958). Aquests resultats indiquen que una lleugera limitació de N i un excés de P estimulen la producció de PHB. Aquests resultats coincideixen amb el que s'ha trobat en estudis previs (Dutt and Srivastava, 2018; Kamravamanesh *et al.*, 2019). Per exemple, Dutt i Srivastava (2018) van observar que el metabolisme es reorganitza i es comença a acumular PHB, que permetrà mantenir els nivells essencials de proteïnes quan hi ha una limitació de N. D'altra banda, Kamravamanesh, et al (2019) van observar que una petita quantitat de P estimula la síntesi de glucogen. Van plantejar la hipòtesi que l'addició de P, en el metabolisme cel·lular s'utilitza en gran part en la síntesi de glucogen, on una vegada el P s'acaba, es produirà PHB a partir del glucogen generat per a subministrar energia i NADPH.

Com s'observa en la Figura 9b, no existeix un màxim absolut de productivitat de PHB en el gràfic de superfície, sinó que l'òptim és una superfície de valors, els quals es poden obtenir a partir de diferents condicions inicials. La productivitat màxima (1,91 mg PHB·L^{-1}·dia^{-1}) es va obtenir a una concentració inicial de N i P de 26,11 mg N·L^{-1} i 5,67 mg P·L^{-1}. Aquesta productivitat màxima s'assoliria després de 57 dies d'experiment i el contingut de PHB seria de 9,25 % dcw. Encara que el contingut de PHB que es podria assolir és relativament alt, el temps necessari per assolir-lo encara és massa llarg. Per la qual cosa, la investigació futura hauria d'enfocar-se en millorar la tassa de producció de PHB. A causa d'aquest fet, s'ha dut a terme un segon plantejament de l'experiment, ja que s'ha demostrat que la limitació de nutrients junt amb un excés de C són factors determinant per l'augment de l'acumulació de polímers (Arias *et al.*, 2018). En aquest nou plantejament s'ha buscat la concentració d'IC inicial necessària perquè el C duri fins al final de la fase de creixement i que s'acabi alhora que la resta de nutrients. Per tal d'incrementar la producció de glucogen durant la fase de creixement i que aquest glucogen passi a ser PHB en la fase d'acumulació. Els resultats de l'optimització mostren que a una concentració inicial de 336 mg IC·L^{-1}, els tres nutrients s'acaben alhora aproximadament al cap de 21 dies de començar l'experiment i per tant, marcaria l'inici de la fase d'acumulació.

6.2. ESTUDI DE L'EFECTE DE LES CONDICIONS DE CULTIU EN FOTOBIORREACTORS CILÍNDRICS VERTICALS DE 3 L INOCULATS AMB *SYNECHOCYSTIS* SP.

Per tal d'assolir el segon objectiu d'aquest treball, s'han estudiat diferents condicions de cultiu per tal de veure l'efecte en la producció de PHB i glucogen.

6.2.1. Assaig març

A causa de l'inici de l'estat d'alarma aquest experiment es va veure interromput. És per aquest motiu que només s'han pogut obtenir resultats de la primera part de l'experiment, és a dir, el creixement de la biomassa i l'absorció de nutrients.

6.2.1.1. Taxa de creixement de la biomassa

La biomassa es va mesurar en SSV, on la concentració inicial en els quatre reactors va estar al voltant de 170 mg SSV·L^{-1} (Figura 10) i van arribar a una concentració màxima superior als 800 mg SSV·L^{-1} en tots els reactors al final de l'experiment. Rueda , et al (2020) van obtenir resultats similars amb valors lleugerament superiors al final de la fase de creixement. Aquests resultats indiquen la idoneïtat d'aquestes condicions inicials de creixement pel desenvolupament dels cianobacteris al reactor. Malgrat això, Kamravamnesh , et al (2018) va obtenir resultats força millors, on la velocitat de creixement és molt més ràpida, comportant així una concentració final de biomassa més elevada.

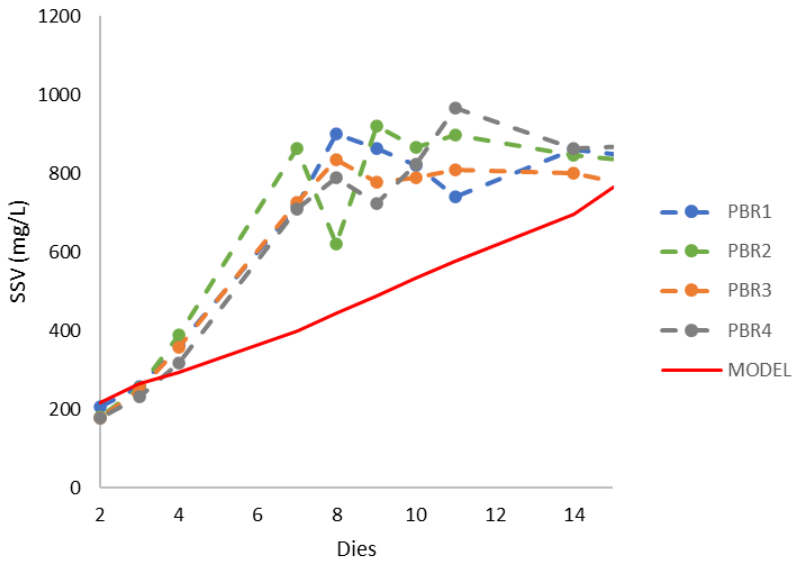


Figura 10. Evolució creixement cel·lular.

El percentatge respecte a la relació SSV/SST al final de l'experiment en els reactors va ser del: 86,31% en el PBR1, 93,80 en el PBR2, 92,21% en el PBR3 i 86,63% en el PBR4. Aquests valors indiquen que els SST són majoritàriament SSV, deduint que la biomassa ha crescut correctament i els compostos inorgànics precipitats presents en el medi són pràcticament menyspreables. La productivitat de biomassa dels quatre reactors va ser de 36,82 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR1, 46,84 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR2, 46,72 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR3 i 56,60 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR4. Aquesta productivitat es veu molt influenciada per diferents factors, com la concentració de nutrients al medi, la irradiació solar, el tipus de reactor, etc. Per exemple, Rueda, et al (2020)

obté una productivitat màxima de biomassa durant l'estiu (86 mg SST·L^{-1}·d^{-1}) força superior a la del nostre projecte. Això és degut al fet que van treballa amb fotorreactors horitzontals tubulars semitancats amb llum solar, que tenen una irradiació molt més elevada que els reactors de laboratori (102 µmol·s^{-1}·m^{-2}, respecte als 1000 µmol·s^{-1}·m^{-2} en un dia solejat) augmentant considerablement el rendiment de treball. Malgrat això, durant la tardor van obtenir una mitjana de productivitat de 35 mg SST·L^{-1}·d^{-1}, lleugerament inferior als obtinguts en el nostre projecte. Per la qual cosa, es podria considerar que els nostres resultats són força bons, donades les nostres condicions de cultiu, on la irradiació és baixa i actua com a limitant durant el procés fotosintètic.

S'ha de tenir en compte la presència d'altres comunitats microbianes en la composició del cultiu que poden afectar el creixement de la biomassa, a causa de la competència interespecífica que s'estableix. Durant l'etapa inicial de cultiu s'han observat protozous en forma de petits quists (Figura 11a). Rueda , et al (2020) van observar que durant el transcurs de l'experiment, alguns protozous van evolucionar a la seva forma activa, envoltant les petites cèl·lules de *Synechococcus* sp. La presència de protozous a la mostra va generar una agregació clara de la biomassa. Aquesta agregació és utilitzada com a estratègia defensiva dels cianobacteris per evitar la depredació dels protozous. Durant el transcurs de l'experiment s'han observat biomasses formades per cèl·lules i protozous (Figura 11b) i protozous en forma activa. La presència de comunitats microbianes, afecten el desenvolupament dels experiments, tant en creixement com en la producció de PHB i glucogen. Tot i això, és pràcticament inevitable la presència d'aquestes comunitats en aquests processos si s'amplien a escala indústria, especialment quan s'utilitzen generes petits de cianobacteris (Rueda *et al.*, 2020).

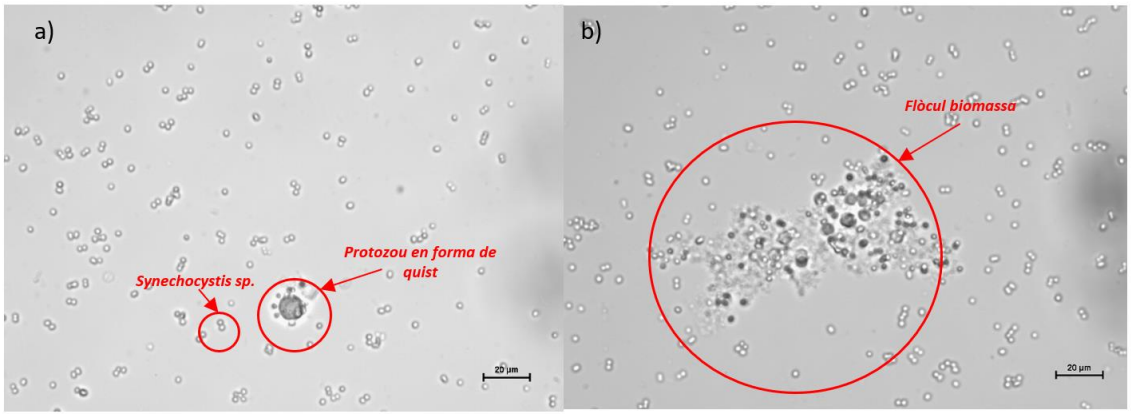


Figura 11. Imatges al microscopi òptic preses sota 400 augments a) Protozou en l'etapa de quist. b) Protozous formant un flòcul amb la biomassa dels cianobacteris.

Taula 3. Temperatures mitjanes i concentracions mitjanes oxigen dissolt.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Temperatura Mitjana (ºC)	25,5±0,6	25,4±0,4	25,8±0,6	25,4±0,7
OD (mg $O_2 \cdot L^{-1}$)	10,3±3,4	11,1±2,9	15,5±4,8	9,9±2,9

L'oxigen dissolt és un indicador de l'activitat fotosintètica dels microorganismes presents en el cultiu. Tots els cultius han estat en condicions aeròbies durant tot l'experiment, obtenint els valors mitjans de la Taula 3. Els resultats (Figura 12) mostren que al principi de l'experiment la concentració d'OD en els cultius era major i que a mesura que avançava aquesta concentració disminuïa, a causa de la limitació de nutrients del cultiu, ja que la falta de nutrients afecta negativament a l'activitat fotosintètica dels cianobacteris. Estudis similars (Arias *et al.*, 2018), mostren una concentració mitjana d'OD al llarg de l'experiment menor que l'obtinguda en aquest estudi. Troschl , et al (2018) va observar que la concentració mitjana d'OD en el cultiu decreixia a mesura que el cultiu es quedi sense N (Troschl *et al.*, 2018). Considerant aquesta hipòtesi, la concentració mitjana d'OD s'hauria d'haver reduït si l'experiment hagués continuat. Durant l'experiment s'ha anat controlant la temperatura dels reactors, ja que aquesta afecta el creixement dels cianobacteris (Taula 3). Els resultats mostren que els quatre reactors han estat a una temperatura gairebé constant d'aproximadament 25 ºC. Aquesta temperatura està força per sota de l'empleada en altres estudis i reculls bibliogràfics (Yu *et al.*, 2013), (Kamravamanesh *et al.*, 2018). Yu , et al (2013) recull com a òptim de cultiu pel creixement de *Synechocystis* sp.

una temperatura de 30 ºC, de la mateixa manera Kamravamanesh , et al (2018) obté els millors resultats de producció de PHB amb un rang de temperatures entre 28-30 ºC. És per aquest motiu, que es pot suposar que la temperatura ha limitat lleugerament el creixement del cultiu.

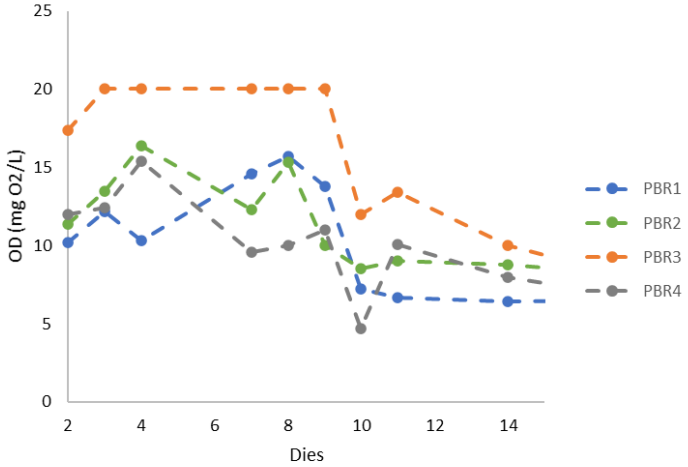


Figura 12. Evolució concentració OD en els cultius.

6.2.1.2. Absorció de nutrients

L'absorció de nutrients s'ha mesurat per tal de monitorar l'evolució de cultiu en el reactor i veure com en veu afectat el creixement cel·lular en funció de la concentració de nutrients presents en el medi. A més, aquestes proves són indicadores, ja que permet saber quan es passa de la fase de creixement a la fase d'acumulació de PHB i glucogen.

6.2.1.2.1. Absorció de nitrogen i fòsfor

L'evolució de les concentracions de nutrients es mostren a la Figura 13. Les millors taxes d'absorció de N i P (8,68 mg N·g SSV^{-1}·d^{-1} i 0,17 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1}) han estat en ambdós casos en el reactor PBR4, mentre que el PBR1 presenta les taxes d'absorció més baixes, amb força diferència respecte als altres. Tot i això, el cultiu més eficient assimilant N-NO_3 i P-PO_4 per a créixer ha estat el PBR1 (Taula 4). No es van detectar canvis de color en els reactors d'ençà que es va iniciar el cultiu, això indica que durant la fase de creixement el cultiu va tenir en tot moment una concentració de N-NO_3 suficient per a no presentar clorosis en les cèl·lules.

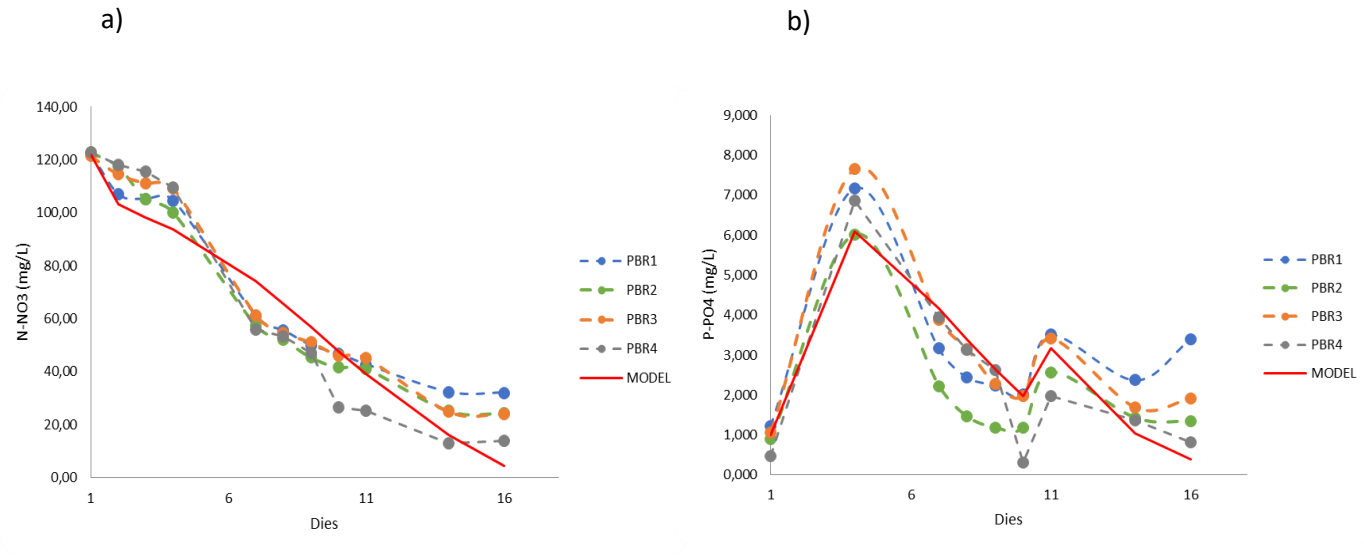


Figura 13. Evolució a) N-NO_3. b) P-PO_4 dels cultius.

La concentració de P-PO_4 va augmentar durant els quatre primers dies de l'experiment en els quatre reactors, tal com es pot veure en la Figura 13b. Això és pel fet que es va calcular malament la quantitat inicial i es van haver d'afegir 20 mL de P a una concentració de 0,7 g P·L^{-1}, per arribar a aconseguir la concentració inicial estipulada. A més, també es van alliberar P-PO_4 durant els primers dies, ja que en la Figura 14 es pot veure que majoritàriament en tots els reactors, exceptuant el PBR2, el P estava principalment en forma de PP a causa de la precipitació d'aquest nutrient. Rueda , et al (2020) relacionen aquest fet directament amb el pH, ja que l'augment d'aquest per sobre de valors de 10 pot causar la precipitació del P-PO_4 dissolt en el medi (Rueda *et al.*, 2020). Aquesta hipòtesi podria concordar amb els resultats obtinguts, ja que l'inòcul utilitzat no tenia cap control de pH, en canvi a mesura que el pH s'ha anat regulant, les formes precipitades del P s'han dissolt. Al final de l'experiment encara quedava N i P, per la qual cosa encara no s'havia induït la limitació de nutrients i per tant, no s'havia passat a la fase d'acumulació de PHB i glucogen.

Taula 4. Taxa de creixement, temps de duplicació (DT), taxa d'absorció N (q_{N-NO3}), rendiments del cultiu ($Y_{X/N-NO3}$ i $Y_{X/P-PO4}$) i taxa d'absorció P (q_{P-PO4}).

Reactor	Taxa de creixement (d^{-1})	DT (d)	q_{N-NO3} (mg N·g SSV^{-1}·d^{-1})	$Y_{X/N-NO3}$	q_{P-PO4} (mg P·g SSV^{-1}·d^{-1})	$Y_{X/P-PO4}$
PBR1	0,091	7,62	5,71	8,88	0,039	99,35
PBR2	0,11	6,30	6,50	8,42	0,11	90,41
PBR3	0,11	6,30	7,34	7,63	0,14	75,69
PBR4	0,12	5,78	8,68	7,00	0,17	85,7

Si es comparen les taxes de consum específic amb les d'altres autors, es pot observar que en fotobiorreactors plans verticals de 16 L les taxes d'absorció eren molt més elevades, de fins a 460 mg N·g SSV-1·d^{-1} en el cas del N (Kim *et al.*, 2011). Contràriament, en fotobioreactors cilíndrics de 3 L les taxes d'absorció han estat força similars a les obtingudes en aquest experiment (5,89 mg N·g SSV-1·d^{-1} i 0,43 mg P·g SSV-1·d^{-1}) (Rueda *et al.*, 2020). La comparativa dels diferents resultats permet relacionar el creixement lent amb la limitació de llum en el cultiu, ja que els reactors plans tenen un pas de llum molt més estret, en concret 2 cm de diàmetre, amb un rang d'irradiància d'entre 44-370 W·m^{-2} (Kim *et al.*, 2011), comportant l'arribada de més intensitat de llum a tot el reactor. En canvi, en els reactors cilíndrics de 3 L, en tenir un diàmetre superior (11,5 cm), la irradiància al cultiu és molt inferior: 21,8 W·m^{-2} (Rueda *et al.*, 2020).

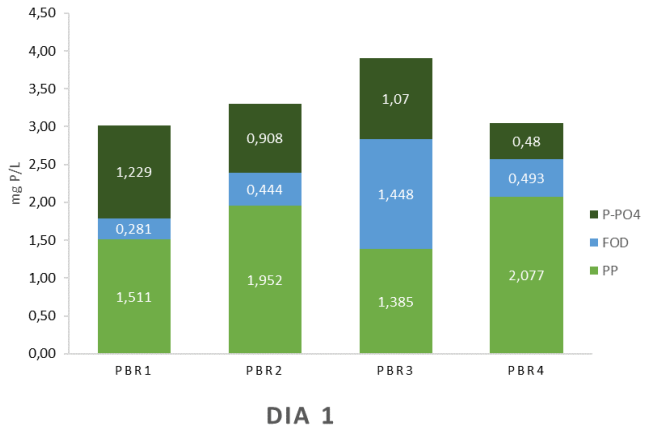


Figura 14. Formes del fòsfor el dia 1 de l'experiment. Abreviatures: P-PO_4: fòsfor inorgànic; FOD: fòsfor orgànic dissolt; PP: fòsfor particulat.

6.2.1.2.2. Absorció de carboni

L'IC és un nutrient imprescindible per a la producció de PHB i glucogen, ja que és necessari per a la seva síntesi. Per aquest motiu, és molt important controlar la quantitat d'IC present en el cultiu i agregar-lo quan sigui necessari. La concentració inicial d'IC en els reactors era aproximadament de 300 mg IC·L^{-1}. L'addició d'HCl, pel control del pH, és el principal causant de la disminució de l'IC, ja que afavorint que els cianobacteris absorbeixin l'IC de forma més eficient i en major quantitat. L'evolució de DIC durant la fase de creixement és mostrada en la Figura 15. El pic observat correspon a l'addició d'IC, quan aquest es va detectar a un nivell massa baix. Aquest procediment es va dur a terme el dia 11 de l'experiment.

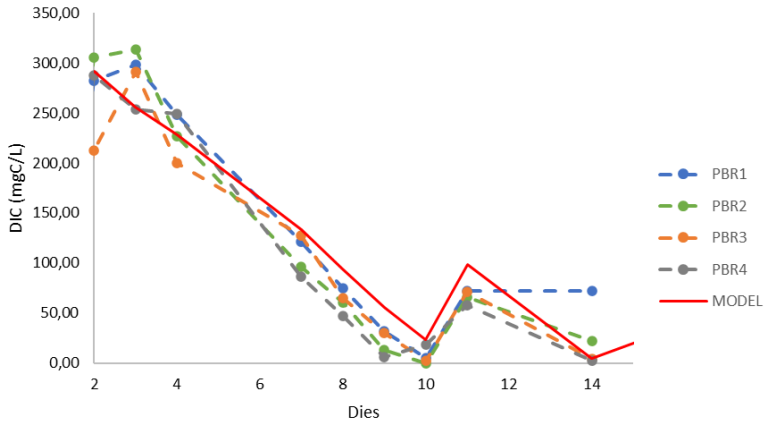


Figura 15. Evolució DIC dels cultius.

6.2.2. Assaig maig

En aquest assaig s'han utilitzat les condicions òptimes de cultiu obtingudes en l'apartat 5.1 (26,11 mg N·L^{-1}, 5,67 mg P·L^{-1} i 336 mg IC·L^{-1}) com a condicions inicials de cultiu, per tal de reproduir el model i veure si les prediccions que ha fet són acurades.

6.2.2.1. Taxa de creixement de la biomassa

Els fotobiorreactors van començar amb una concentració de biomassa inicial al voltant de 140 mg SSV·L^{-1} (Figura 16). La concentració de biomassa màxima obtinguda en els quatre reactors es produeixen en dies molt diferents. El dia 15 en el PBR1 (302,82mg SSV·L^{-1}), el dia 3 en el PBR2 (257,37 mg SSV·L^{-1}), el dia 4 en el PBR3 (307,302 mg SSV·L^{-1}) i el dia 4 en el PBR4 (380,61 mg SSV·L^{-1}). En el gràfic (Figura 16) es pot observar que tots els reactors es troben en fase estacionària o en fase de mort cel·lular després de 15 dies d'experiment. És en aquesta etapa on els reactors comencen acumular metabòlits com el PHB i el glucogen. Els resultats difereixen amb els obtinguts en l'apartat 6.2.1.1 i amb estudis d'altres autors (Kamravamanesh *et al.*, 2018; Rueda *et al.*, 2020). Ambdós autors aconsegueixen biomasses robustes, de concentracions molt superiors. Els resultats obtinguts no només varien respecte a altres estudis previs, sinó que tampoc concorden amb les prediccions fetes pel model cinètic. Aquests resultats suggereixen que l'inòcul utilitzat en aquest cas probablement no estava en condicions de creixement exponencial, si no en fase de mort cel·lular, el que ha provocat que el cultiu no assolís les concentracions de biomassa esperades. Aquest fet remarca la necessitat d'utilitzar un inòcul que estigui creixent de forma exponencial, així com de tenir en compte les concentracions internes de N i P a les cèl·lules a l'hora de fer l'optimització amb el model. Com el cultiu no va assolir les condicions de biomassa previstes es va desestimar seguir endavant amb la fase d'acumulació amb aquesta biomassa i es va tornar a posar en marxa l'experiment, assegurant que l'inòcul estigués creixent de forma exponencial. Tanmateix, aquests resultats no s'han pogut incloure en aquest treball.

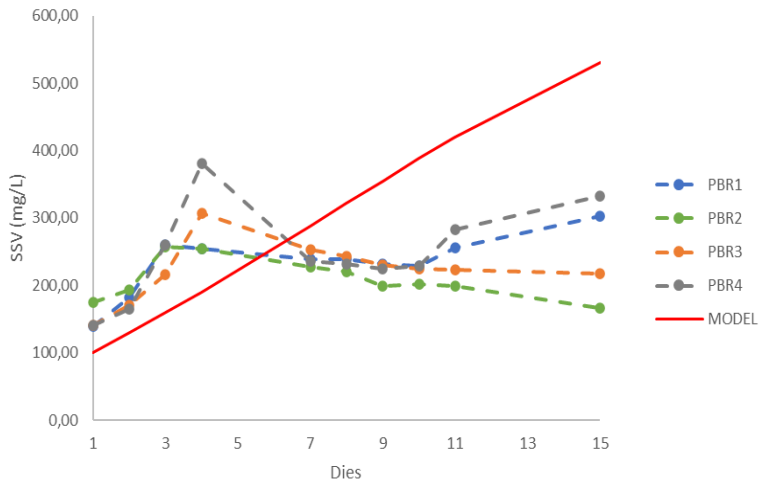


Figura 16. Evolució creixement cel·lular.

El percentatge respecte a la relació SSV/SST al final de l'experiment en els reactors va ser del: 73,85% en el PBR1, 96,10% en el PBR2, 98,43% en el PBR3 i aproximadament del 100% en el PBR4. Aquests resultats indiquen que els SST són majoritàriament SSV en tots els reactors. Deduint que la biomassa ha crescut correctament i els compostos inorgànics són pràcticament menyspreables en tots els reactors. La productivitat de la biomassa va ser considerablement baixa en els quatre reactors (3,20 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR1, 1,23 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR2, 2,16 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR3 i 3,27 mg SST·L^{-1}·d^{-1} en el PBR3). Si aquests resultats es comparen amb l'assaig anterior (apartat 6.2.1.1), aquesta productivitat és considerablement baixa, possiblement a conseqüència de la baixa concentració de nutrients en el medi i per l'estat de l'inòcul. Kamravamanesh, et al (2018) conclouen que la producció de PHB està associada al creixement de la biomassa i per tant, si la productivitat de biomassa és màxima, el rendiment productiu de PHB augmentarà (Kamravamanesh *et al.*, 2018). En aquest experiment, el contingut de biomassa ha estat bastant baix i és per aquest motiu que molt probablement s'ha vist afectat la producció de PHB.

En aquest assaig s'han observat la presència de comunitats microbianes, que han pogut afectar en el creixement dels cianobacteris, a causa de la competència interespecífica que s'estableix. En tots els reactors s'han observat durant els primers dies de cultiu protozous en forma de quists i bacteris (Figura 17a). A mesura que ha avançat l'experiment, els protozous han passat a la seva forma activa (Figura 17c) i la quantitat de bacteris ha augmentat considerablement. També s'han

observat agregacions de biomassa amb protozous en forma activa (Figura 17b). Com s'ha comentat anteriorment, aquestes agregacions són una estratègia defensiva dels cianobacteris per evitar la depredació (Rueda *et al.*, 2020).

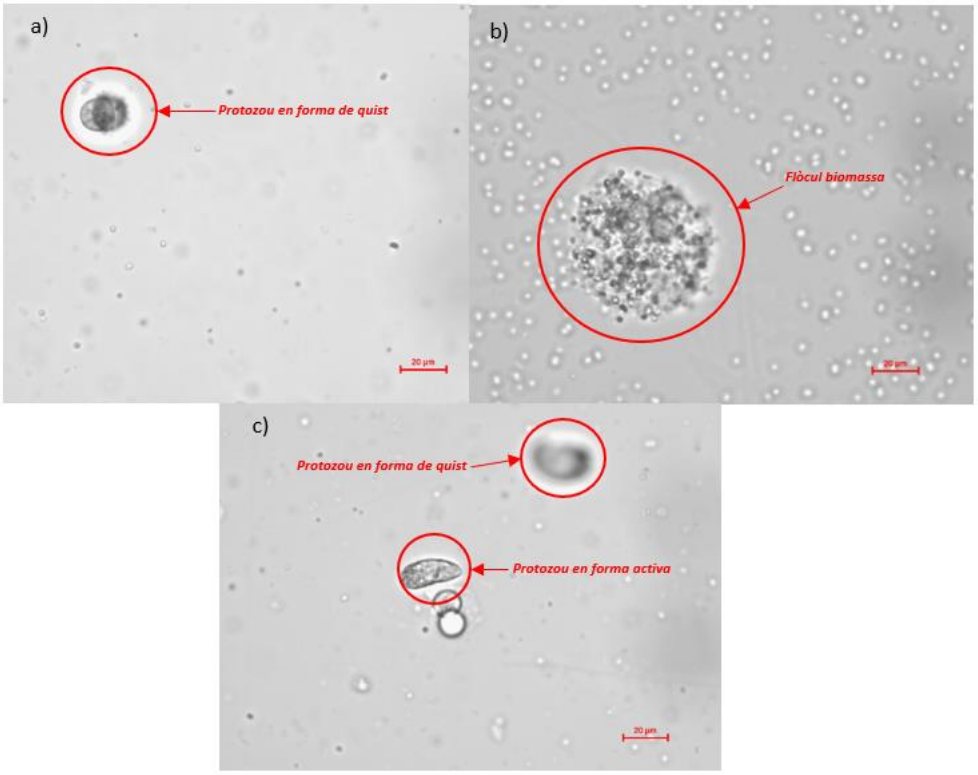
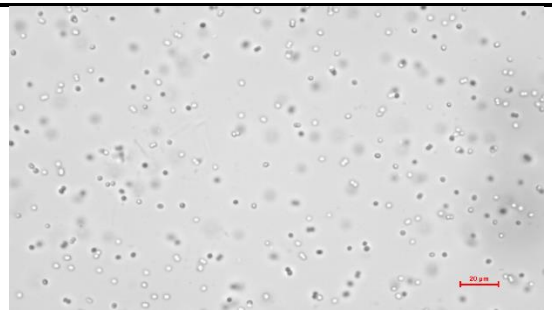
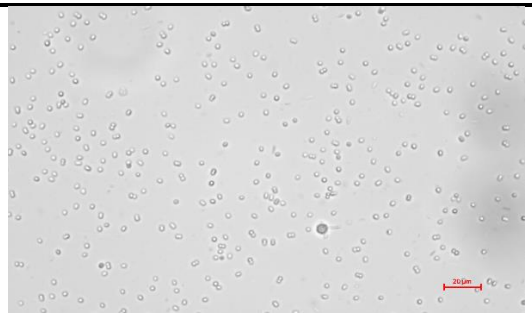
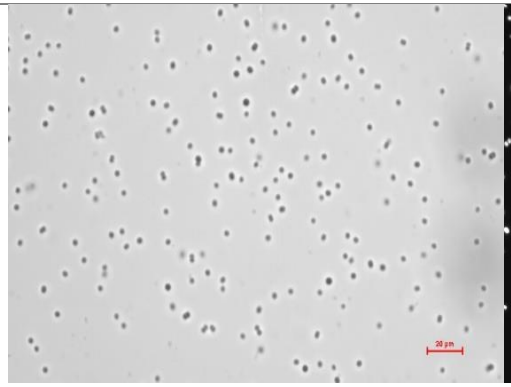
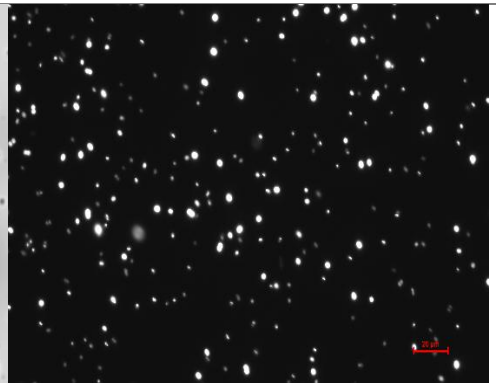
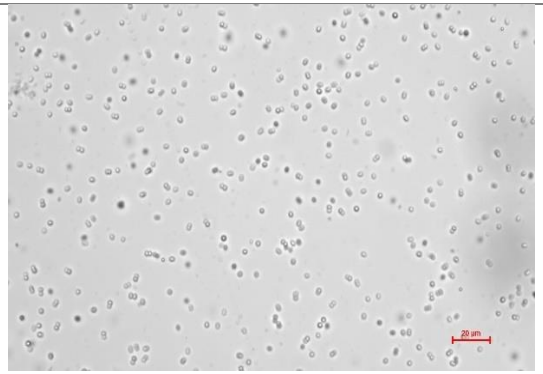


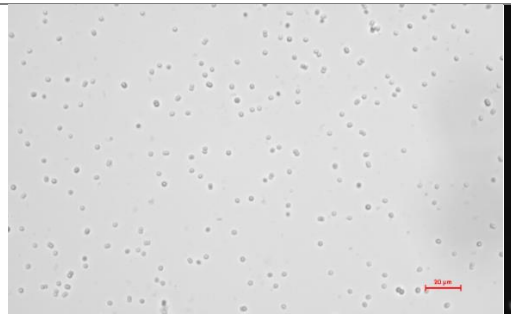
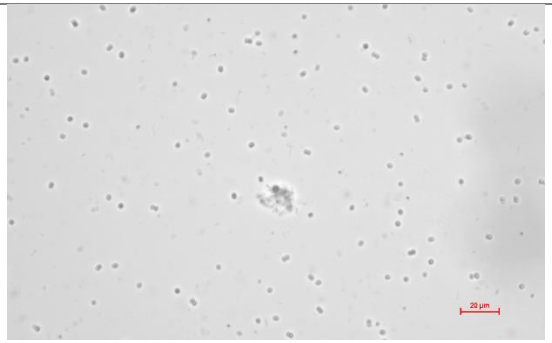
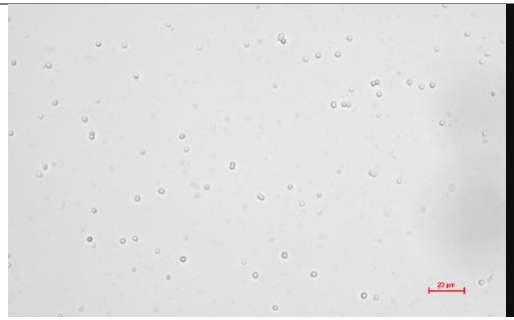
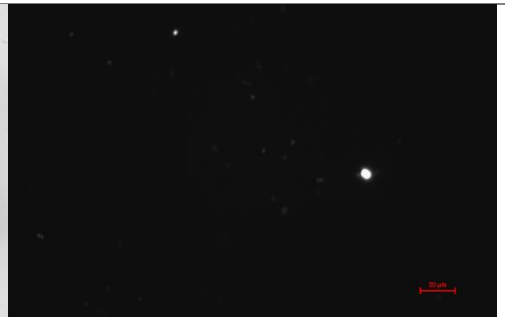
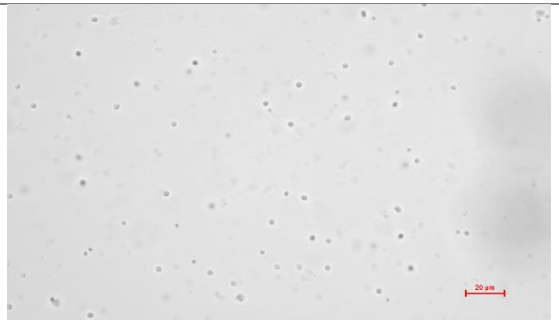
Figura 17. Imatges al microscopi òptic preses sota 400 augments. a) Protozou en l'etapa de quist. b) Protozous format part d'un floc i c) Protozou en forma activa i protozou en forma de quist.

Durant el desenvolupament de l'experiment les cèl·lules s'han vist força afectades per les condicions de cultiu. A la Taula 5 i Taula 6 es mostren fotografies de l'evolució del cultiu presses amb el microscopi òptic. En aquestes imatges es pot observar que a mesura que avança l'experiment els cianobacteris han disminuït la seva mida i han perdut fluorescència, això és degut a la desaparició de la ficocianina, , pigments presents als cianobacteris amb capacitat d'emetre fluorescència sota una longitud d'ona determinada. La desaparició d'aquests pigments es deguda a la falta de nitrogen (clorosi). El reactor que més s'ha vist afectat ha estat el PBR2, ja que les cèl·lules són molt més petites, més transparents i amb una paret cel·lular molt més prima. A més a partir del dia 7, no s'observa fluorescència en cap cèl·lula.

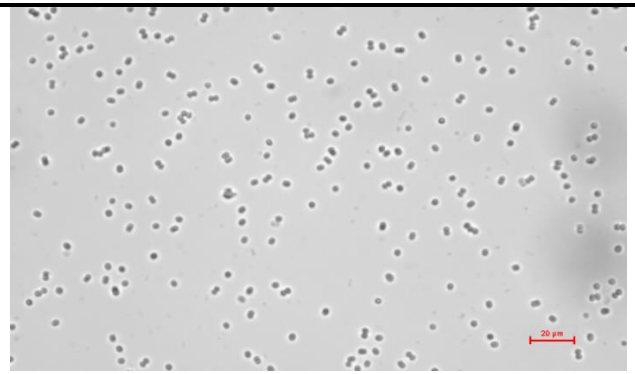
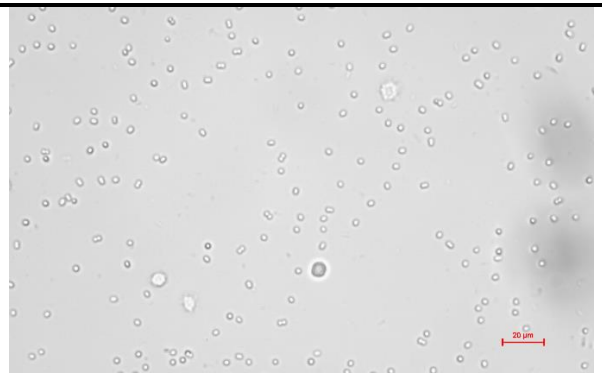
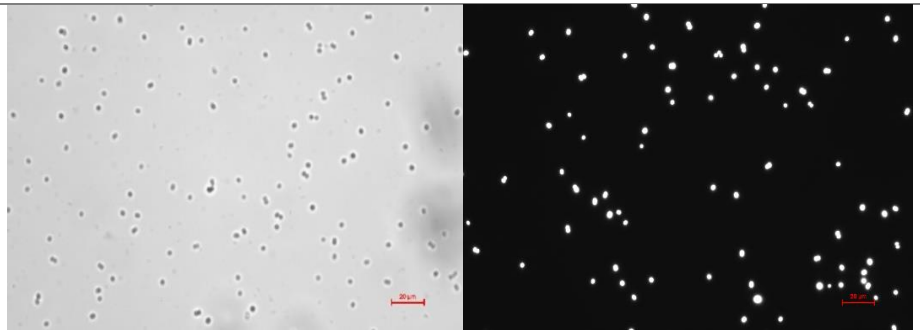
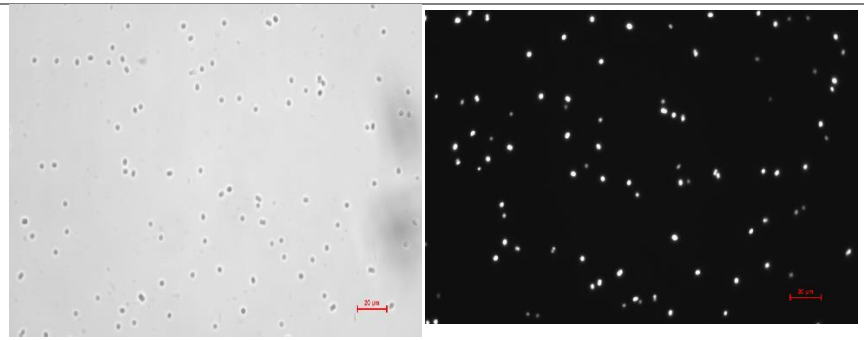
Taula 5. Fotografies al microscopi òptic i de fluorescència sota 400 augments del PBR1 i PBR2.

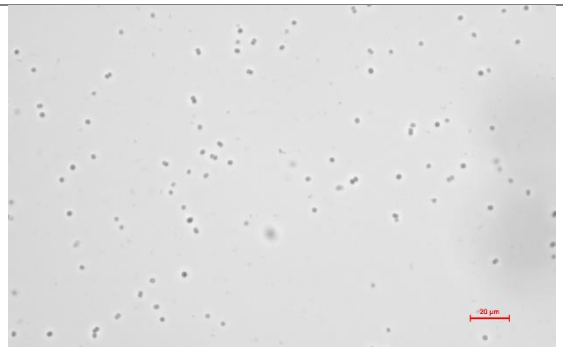
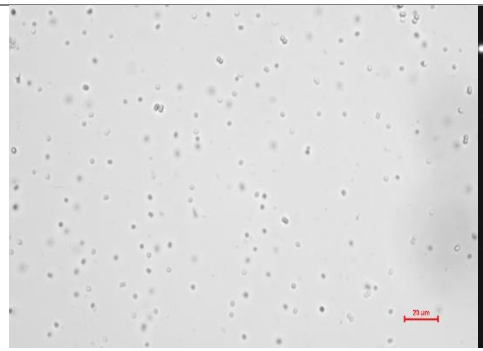
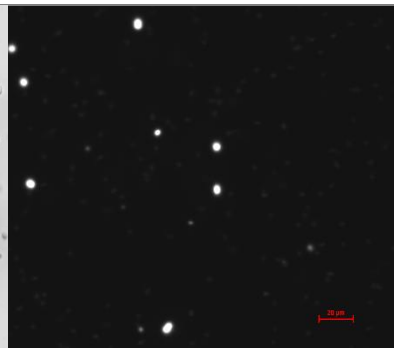
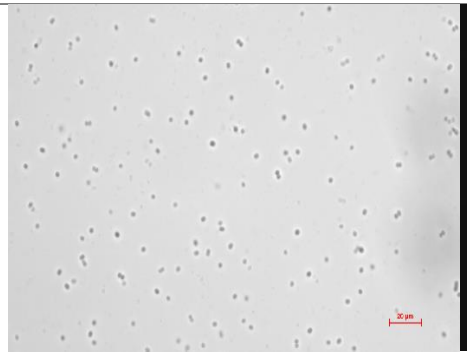
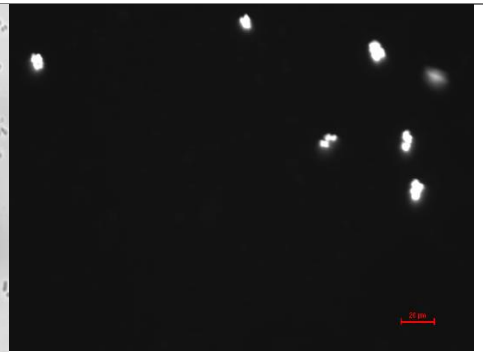
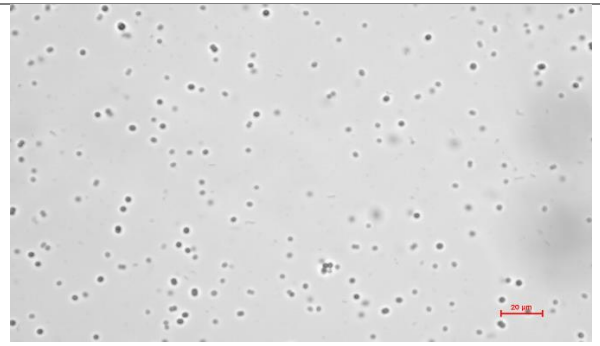
.

DIA	PBR1	PBR2
4		
7	 	

10			
15			

Taula 6. Fotografies al microscopi òptic i de fluorescència sota 400 augments del PBR3 i PBR4.

DIA	PBR3	PBR4
4		
7		

10				
15				

De la mateixa manera que en l'experiment anterior, en aquest experiment tots els cultius han estat en condicions aeròbies, on s'han obtingut els valors mitjans de la Taula 7. Com es pot observar hi ha una diferència destacable entre les concentracions d'OD dels reactors: PBR1, PBR3 i PBR4, amb el PBR2, que presenta una concentració força més baixa. Aquesta menor activitat concorda amb el que s'ha observat al microscopi. També cal destacar les grans desviacions que presenten els reactors. Aquest fet implica que durant l'experiment hi ha hagut fluctuacions en l'activitat fotosintètica en els cultius. Els resultats són menors que els obtinguts en l'experiment anterior (Taula 3), el qual concorda amb la menor producció de biomassa trobada en aquest experiment. Els resultats del PBR1, PBR3 i PBR4 coincideixen amb els d'altres autors com Troschl , et al (2018), que justifiquen les fluctuacions d'OD a conseqüència de la forta disminució d'activitat fotosintètica al final de l'experiment.

Taula 7. Temperatures mitjanes i concentracions mitjanes oxigen dissolt.

	PBR1	**PBR2**	**PBR3**	**PBR4**
Temperatura Mitjana (ºC)	30,2±1,2	31,7±1,5	29,8±1,0	29,7±1,0
OD (mg $O_2 \cdot L^{-1}$)	10,1±6,0	7,6±5,3	10,1±6,7	9,6±5,0

Durant l'experiment s'ha anat controlant la temperatura dels reactors, ja que aquesta afecta el creixement dels cianobacteris. Els resultats mostren que els quatre reactors han estat a una temperatura gairebé constant, aproximadament 30 ºC. Aquesta temperatura està en l'òptim de cultiu *Synechocystis* sp. (Yu *et al.*, 2013). Tanmateix, Kamravamanesh , et al (2018) obtenen millors resultats de creixement amb el mateix rang de temperatures. Considerant aquest fet es pot pressuposar que la temperatura ha estat la correcta per al bon desenvolupament de l'experiment i que han estat altres paràmetres (llum o nutrients) els que han limitat el creixement.

6.2.2.2. Absorció de nutrients

6.2.2.2.1. Absorció de nitrogen i fòsfor

Les concentracions inicials de N i P (26,11 mg N·L^{-1} i 5,67 mg P·L^{-1}) en els cultius van ser escollides a partir de l'optimització de les condicions de cultiu realitzada amb el model cinètic. L'evolució de les concentracions de N i P es mostra en la Figura 18. En el gràfic es pot observar que els N-NO_3 s'acaben aproximadament els tres primers dies de l'experiment, quan encara no s'ha consumit bona part dels P-PO_4, causant l'estabilització de P durant la resta de l'experiment. El pic que es veu en el gràfic dels N-NO_3 és a causa de l'addició d'1,4 mL de N d'una dissolució de 9,10 g N·L^{-1}, per tal d'accelerar el procés i que la biomassa consumís els nutrients restants en el reactor. Les taxes d'absorció de nutrients, han estat força diferent entre els reactors, cal destacar la baixa taxa d'absorció de PBR2 tant pel N com pel P. La millor taxa d'absorció de N (1,82 mg N·g SSV^{-1}·d^{-1}) s'ha produït en el PBR3, mentre que la millor taxa d'aborció de P (0,20 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1}) és la del PBR1. Els millors rendiments són els del PBR4 (Taula 8) en ambdós casos. Aquests resultats són força baixos en comparació amb els obtinguts anteriorment (Taula 4), on els pitjors rendiments de N i P (7,63 mg N·g SSV^{-1}·d^{-1} i 75,69 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1} del PBR2) van ser molt superiors als millors resultats obtinguts en aquest experiment (3,46 mg N·g SSV^{-1}·d^{-1} i 43,42 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1}). Aquests baixos rendiments es poden justificar numèricament a partir de l'equació de Monod, ja que la taxa de creixement específica dels microorganismes ve determinada per la concentració del substrat limitant pel creixement. Si la concentració de substrat és baixa, aquesta taxa de creixement es veurà reduïda com ha estat el cas del nostre experiment, on el N ha sigut limitant durant bona part de l'experiment.

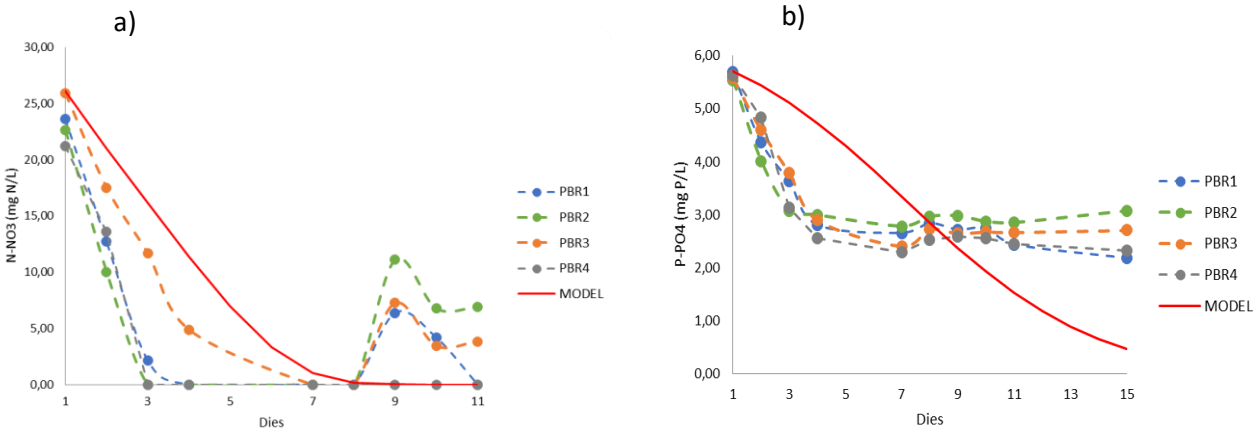
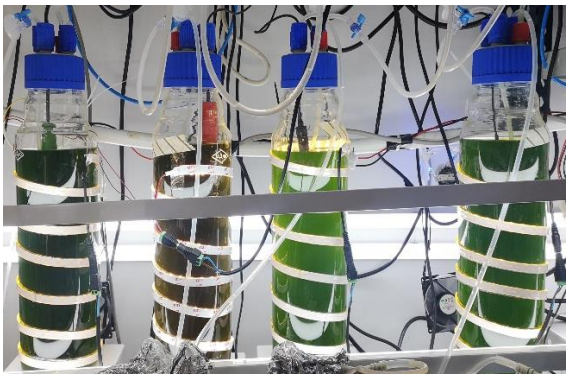


Figura 18. Evolució a) N-NO3. b) P-PO4 dels cultius.

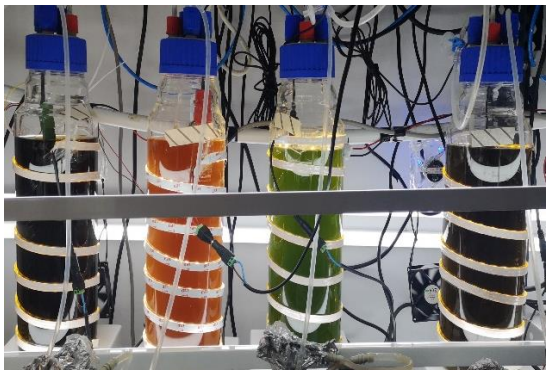
Durant l'evolució de l'experiment, es van detectar canvis en el color del cultiu tal com es pot veure en la Figura 19. Els rectors PBR1 i PBR2 són els que van tenir un canvi de color més notable. El PBR2 que va ser el primer en el qual es va detectar un canvi de color en el medi, cap al dia 3 de l'experiment, on va passar de verd a vermell i posteriorment, de vermell va canviar a groc translúcid. El PBR1 va presentar un canvi de color cap al dia 4 de l'experiment, passant de verd a vermell i es va mantenir amb aquest color la resta de l'experiment. De la mateixa manera que la resta de cianobacteris, *Synechocystis* sp. quan és privat d'un nutrient essencial com el N, l'organisme desenvolupa canvis morfològics i fisiològics (és a dir, hi ha una resposta a la limitació de nutrients) (Collier *et al.*, 1992). Tenint en compte aquest fet, Troschl , et al (2018) conclou que la limitació de N causa un fort canvi de color del cultiu. En el seu cas es va observar un canvi gradual de verd a groc, com a causa l'augment de carotenoides i la disminució de la ficocianina (pigment característic dels cianobacteris que els atorga el color blavós) (Troschl *et al.*,2018). Aquests pigments actuen com accessoris en la fotosíntesi i com agents protectors davant d'estrès cel·lular (Menin *et al.*, 2019). La limitació de N explica l'augment de carotenoides i conseqüentment, el canvi de color dels cultius a vermell i groc. Per tant, aquests canvis indiquen que durant una part de l'experiment el cultiu no va tenir una concentració suficient de N-NO_3, per a evitar la degradació de la clorofil·la i la ficocianina. Explicant la pèrdua de color de les cèl·lules durant l'experiment, a causa de la baixa activitat fotosintètica (Taula 5 i Taula 6).

Dia 1

Dia 2



Dia 3



Dia 4

Dia 7

Figura 19. Fotografies reactors. D'esquerra a dreta: PBR1, PBR2, PBR3, PBR4.

Els P-PO_4 es van consumir a una velocitat elevada durant els primers dies de l'experiment. La forma predominant del P el dia 1 de l'experiment era la de P-PO_4 (Figura 20a). A mesura que l'experiment es va desenvolupar, el consum de P-PO_4 va disminuir molt dràsticament. Les taxes d'absorció de P van ser de 0,20 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1} en el PBR1, 0,12 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1} en el PBR2, 0,18 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1} en el PBR3 i 0,19 mg P·g SSV^{-1}·d^{-1} en el PBR4. Aquestes taxes van ser més elevades, tot i tenir un creixement limitat, que en les de la Taula 4. Aquesta diferència entre les taxes d'absorció del P és causada pel fet que en l'experiment anterior no es va afegir una

concentració de P suficient i quan es va afegir ja havia crescut la major part de biomassa i per tant, la velocitat d'acumulació no va ser tan ràpida com la d'aquest experiment. Per la qual cosa, aquestes taxes han sigut menors que les observades en altres autors (Rueda *et al.*, 2020). Aquest baix rendiment d'assimilació de P (Taula 8) pot estar relacionat amb la limitació de N, ja que aquesta limitació és la causant de la baixa producció de biomassa i per tant, del menor consum de P. Collier i Grossman (1992) conclouen que davant de la limitació de N, l'acumulació de clorofil·la és interrompuda immediatament, comportant una disminució de la velocitat de divisió cel·lular, explicant la baixa taxa de creixement, i empitjorant els rendiments de cultiu.

Taula 8. Taxa de creixement, temps de duplicació (DT), taxa d'absorció N ($q_{N\text{-}NO3}$), rendiments del cultiu ($Y_{X/N\text{-}NO3}$ i $Y_{X/P\text{-}PO4}$) i taxa d'absorció P ($q_{P\text{-}PO4}$).

Reactor	Taxa de creixement (d^{-1})	DT (d)	$q_{N\text{-}NO3}$ (mg N·g $SSV^{-1}\cdot d^{-1}$)	$Y_{X/N\text{-}NO3}$	$q_{P\text{-}PO4}$ (mg N·g $SSV^{-1}\cdot d^{-1}$)	$Y_{X/P\text{-}PO4}$
PBR1	0,08	8,66	1,33	3,04	0,20	36,65
PBR2	0,034	20,39	0,59	2,32	0,12	15,90
PBR3	0,07	9,9	1,82	2,82	0,18	33,41
PBR4	0,079	8,77	1,51	3,46	0,19	43,42

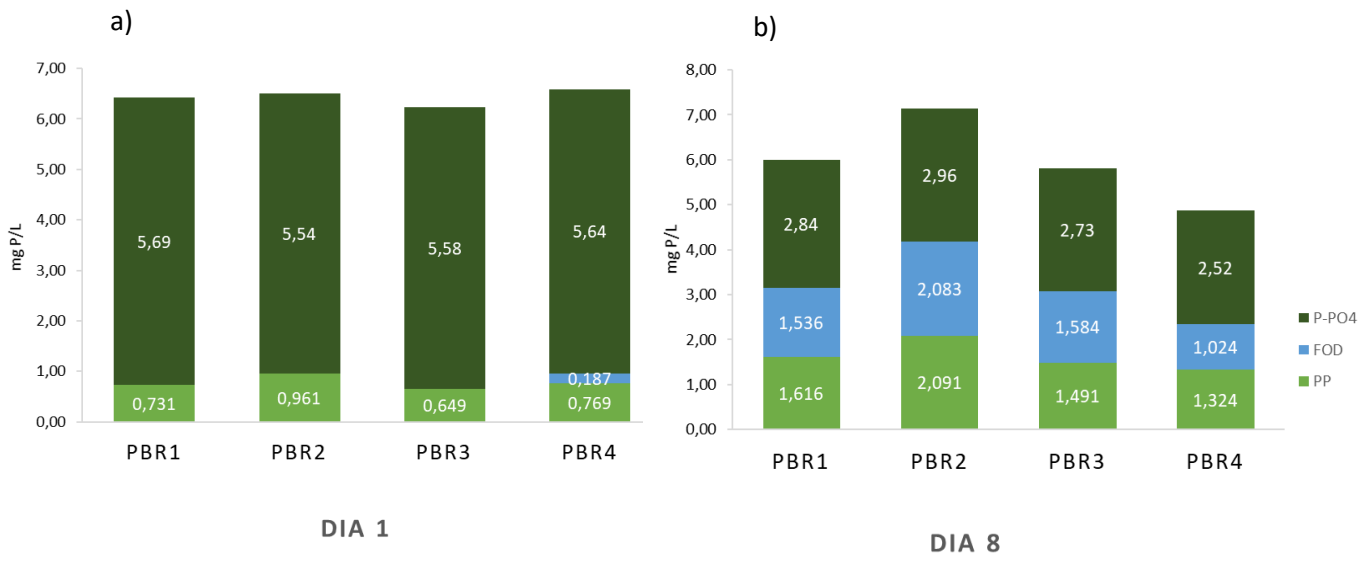


Figura 20. Formes del fòsfor en el cultiu a) dia 1, b) dia 8 de l'experiment. Abreviatures: P-PO4: fòsfor inorgànic; FOD: fòsfor orgànic dissolt; PP: fòsfor particulat

Aquests resultats fan qüestionar que concentració de nutrients (N i P) triades hagin sigut les correctes per dur a terme un creixement de *Synechocystis* sp. sota condicions de limitació de nutrients, ja que no s'ha generat una gran biomassa per a poder iniciar la segona fase de cultiu i a més el N s'ha consumit molt més ràpidament que el P. Per millorar els resultats obtinguts amb el model, s'hauria de tenir en compte l'estat de l'inòcul. Per fer-ho es podria analitzar el contingut de N i P de la biomassa i corregir els *inputs* del model en funció de les observacions experimentals. Aquesta correcció permetria tenir una predicció més acurada i les condicions òptimes obtingudes concordarien millor amb la realitat experimental.

6.2.2.2.2. Absorció carboni

La concentració inicial d'IC es va determinar a partir dels resultats del model cinètic a l'apartat 6.1 (336 mg IC·L^{-1}). L'evolució de DIC es mostra en la Figura 21. El consum d'IC durant tot l'experiment es va mantenir, els pics dels primers dies de cultiu corresponen a la dissolució de les formes precipitades de l'IC degut a l'adició d'HCl durant la regulació de pH i de petites addicions d'IC per tal d'estimular el creixement de biomassa. Al final de l'experiment encara quedava IC en el medi, en alta concentració en el PBR2 i en baixes concentracions en la resta de reactors. La causa de que al final de l'experiment encara quedés IC en el cultiu és principalment la limitació de N durant tot l'experiment, ja que l'IC s'utilitza durant la fotosíntesi, per incorporar-se en les estructures cel·lulars, però necessita la presència de N per dur-la a terme. La falta de N en el cultiu ha comportat que aquest procés es doni molt més lentament del que es va predir amb el model.

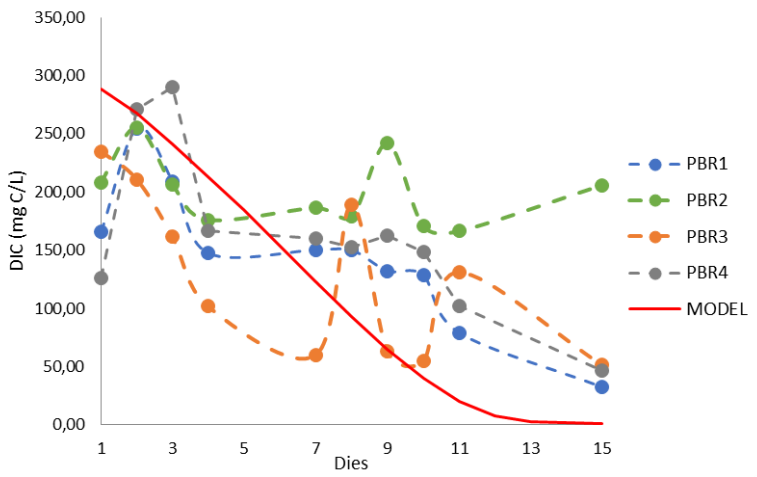


Figura 21. Evolució DIC dels cultius.

6.2.2.2.3. Quantificació PHB i glucogen

L'evolució de la bioacumulació de glucogen en els cultius és mostra en la Figura 22. L'acumulació de glucogen augmenta a mesura que evoluciona l'experiment. El reactor PBR4 és el que obté una major producció (35% dcw), seguit del PBR2 (33% dcw) el dia 17 d'experiment. Des del primer dia de l'experiment, en l'inòcul introduït en els reactors ja s'observa la presència de glucogen a les cèl·lules (5,97 % dcw). Aquest fet confirma que, a diferència del PHB, el glucogen pot acumular-se inclús sense limitació de N i P (Dutt and Srivastava, 2018). Tot i això, aquesta concentració es manté més o menys constant fins que el cultiu no té limitació de N. A partir d'aquest punt s'observa un augment de la quantitat de glucogen més ràpid, la qual cosa indica que tot i que hi ha una concentració basal de glucogen a les cèl·lules, aquesta s'incentiva si el N és limitant. Al final de l'experiment, en el PBR4 la producció de glucogen decreix considerablement a valors de 113, 91 mg glucogen·L^{-1}, en canvi en els PBR1 i 3 es troben en els seus màxims productius: 182,80 mg glucogen·L^{-1} i 183,15 mg glucogen·L^{-1} respectivament. Els resultats són molt similars als obtinguts per Rueda, et al (2020) al final de la fase de creixement. També s'observa que durant la limitació prolongada de nutrients, el percentatge de glucogen disminueix. Aquest fet suggereix que quan el percentatge de glucogen decreix es pot estar produint la conversió de glucogen a PHB. Aquesta conversió ha estat observada prèviament per diversos autors (Kamravamanesh *et al.*, 2018), (Rueda *et al.*, 2020), (Troschl *et al.*, 2018). A més, també cal destacar que sota limitació de N, els aminoàcids no es poden sintetitzar i la fixació de C en el cicle de Calvin es converteix en lípids i carbohidrats, augmentant el rendiment de producció de PHB i glucogen (Markou *et al.*,2014), (Singh *et al.*, 2017).

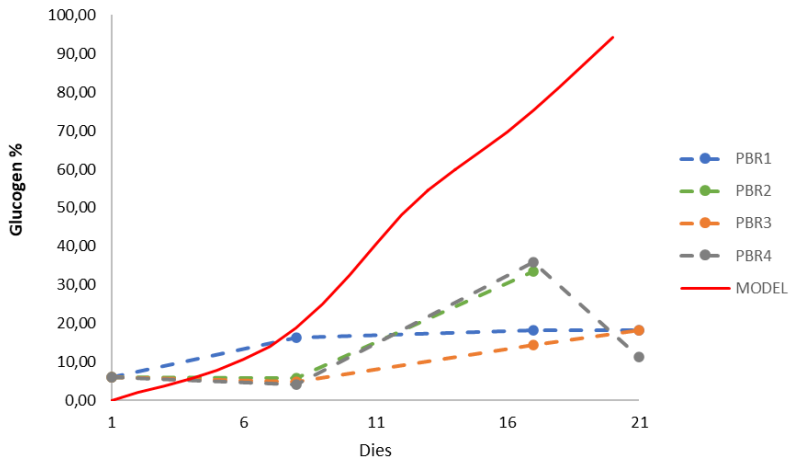


Figura 22. Evolució glucogen en els cultius.

Com es pot observar en els resultats d'aquest segon assaig (maig), hi ha diferencies existents entre la predicció feta pel model i els resultats experimentals de l'acumulació de glucogen. Aquesta diferència és probablement conseqüència de la falta d'ajust dels altres factors del model respecte dels resultats experimentals. Tot i això, durant els primers dies l'experiment s'ajusta al model.

A conseqüència de l'endarreriment de l'experiment, les limitacions als accessos dels laboratoris durant la pandèmia i problemes tècnics amb el cromatògraf, els resultats de quantificació de PHB no s'han pogut incloure en aquest treball. Hagués estat interessant poder fer-la per tal de veure si s'ha assolit l'objectiu d'augmentar la producció de PHB en *Synechocystis* sp. i també per veure l'ajust del model respecte a aquest factor.

6.2.3. Avaluació model cinètic

El model cinètic tenia com a objectiu la predicció del comportament del cultiu dins del reactor, per tal de maximitzar la producció de PHB. A partir d'aquí s'han estudiat les condicions inicials de l'experiment de març (125 mg N·L^{-1} i 7 mg P·L^{-1} i 456 mg IC·L^{-1}) i condicions inicials proposades com a òptimes de cultiu de l'experiment de maig (26,11 mg N·L^{-1} i 5,67 mg P·L^{-1} i 336 mg IC·L^{-1}). Tal com s'ha comentat en els resultats dels apartats anteriors existeix un desajust entre els valors obtinguts entre el model cinètic i els resultats experimentals. La Taula 9 mostra els coeficients de determinació (R^2) entre el model i l'experiment de març, mentre que la Taula 10 respecte a l'experiment de maig. Tot i que el model només s'ha utilitzat per maximitzar la producció de PHB en l'experiment de maig, també s'ha utilitzat el model en l'experiment de març per veure l'ajust davant altres condicions inicials i comprovar l'ajust del model. Lanham, et al (2012) consideren que els models estan correctament ajustats quan el R^2 és major de 0,90 i acceptable quan és major de 0,70. Els R^2 de l'experiment de març (Taula 10) són força elevats, exceptuant el creixement de la biomassa del PBR2 i PBR4 (0,25 i 0,44) i el consum de P del PBR2 (0,44) que no s'ajusten del tot bé al model. La diferència observada en el consum de P del PBR2 pot ser causat per un error experimental, ja que la concentració inicial introduïda va ser incorrecta i posteriorment es va afegir més. Experimentalment el comportament dels quatre reactors és força similar, per tant es podria suposar que l'inòcul inicial en aquest experiment era força homogeni. Tot i la falta d'ajust del creixement de la biomassa, es podria considerar que és un bon model per a predir l'absorció de nutrients. L'experiment de maig presenta uns coeficients de determinació molt diferents entre els reactors (Taula 10), tot i partir de les mateixes condicions inicials. Es podria considerar que l'estat de l'inòcul ha comportat que l'evolució dels cultius experimentals no s'hagi aproximat a la predicció feta pel model en aquests casos. L'heterogeneïtat de les mostres també pot haver donat lloc a errors en les rèpliques. Cal destacar que els baixos R^2 del PBR2 podrien ser causats per problemes tècnics dels sensors propis del reactor, ja que s'ha observat en experiments anteriors i posteriors que en aquest reactor els cultius obtenen els pitjors resultats i gran part de la biomassa acaba morint. Tot i això, el model està correctament ajustat respecte a l'absorció de N, ja que s'obtenen R^2 molt elevades. Els resultats experimentals mostren una resposta asimètrica, respecte al consum de N i P, on el N és consumit molt més ràpidament. Els models enfocats al creixement de fitoplàncton tenen com a base una formulació simètrica, per la qual cosa no poden descriure tota l'asimetria observada experimentalment (Bougaran *et al.*, 2010). En el nostre model cinètic es podria considerar que el model no ha considerat suficientment la resposta asimètrica i les variacions

que presenten els cultius, ja que el model no ha predit l'efecte de la limitació de N en el consum la resta de nutrients. El model de Droop considera que després de la limitació de nutrients en el cultiu, les cèl·lules poden seguir utilitzant la quota interna de nutrients, per la qual cosa les cèl·lules continuen creixent inclús després de la limitació d'algun nutrient essencial (Bougaran *et al.*, 2010). En canvi, experimentalment el consum de N ha comportat que el P no es consumís i que es limités el creixement cel·lular, fent conseqüentment que la biomassa fos insuficient com per poder iniciar la fase d'acumulació de PHB i glucogen. Aquesta observació indica que probablement és necessari introduir alguna limitació en el model de Droop, per tal de predir el comportament pel que fa al consum de P. Per una altra banda, també es podria millorar l'ajust del model tenint en compte l'estat de l'inòcul (fase de creixement, quantitat de N i P a la biomassa, etc.) per fer les simulacions.

Taula 9. Coeficients de determinació entre el model i l'experiment de març.

	R^2			
	PBR1	**PBR2**	**PBR3**	**PBR4**
Creixement biomassa	0,62	0,25	0,60	0,45
Consum N	0,99	0,99	0,99	0,99
Consum P	0,85	0,44	0,90	0,83
Consum IC	0,91	0,92	0,86	0,92

Taula 10. Coeficients de determinació entre el model i l'experiment de maig.

	R^2			
	PBR1	**PBR2**	**PBR3**	**PBR4**
Creixement biomassa	-0,33	-2,61	-0,66	-0,17
Consum N	0,91	0,86	0,96	0,88
Consum P	-0,16	-1,93	-0,38	-0,22
Consum IC	-0,218	-15,16	-0,21	-0,41
Producció glucogen	-79,61	-1,86	-74,62	-12,50

Tal com es pot observar els dos experiments (març i maig) tenen comportaments molt diferents entre ells, la qual cosa es veu reflectida en comparar els R^2 dels diferents experiments, exceptuant el consum de N que es manté. Com s'ha esmentat anteriorment els rendiments de cultiu i les taxes d'absorció (Taula 8) d'aquest experiment són molt baixos i l'estat inicial de l'inòcul en l'experiment de maig no era el correcte, donant conseqüentment aquestes diferències entre els resultats dels dos experiments. És per aquest motiu que s'haurien de fer més rèpliques dels experiments per tal de discutir i concloure l'ajust del model i veure si és necessari tornar-ho a calibrar de manera més acurada per així poder representar millor la variabilitat dels cultius. Tot i això, a partir dels resultats de març es podria considerar que el model cinètic és correcte per ajudar a predir el creixement i el consum de nutrients en *Synechocystis* sp.

7. PERSPECTIVA D'AMPLIACIÓ DEL TREBALL

A causa de la pandèmia de coronavirus SARS-COV-2/COVID-19 que s'ha viscut al llarg de la segona meitat del curs, la part experimental del treball s'ha vist afectada i conseqüentment reduïda. En concret, no s'ha pogut realitzar un estudi d'expressió gènica de les vies metabòliques relacionada amb la producció de PHB i glucogen. Era una feina programada i on he fet recerca bibliogràfica. Aquesta part tenia l'objectiu de caracteritzar els gens implicats en aquestes vies, per tal d'investigar i estudiar els efectes de les condicions de cultiu amb els gens relacionats i correlacionar la sobreexpressió d'una via metabòlica amb les condicions de cultiu i així poder establir noves estratègies de producció d'aquest bioproductes.

Com s'ha comentat en punts anteriors, la ruta metabòlica de producció de PHB en *Synechocystis* sp. no està del tot compresa (Kamravamanesh *et al.*, 2018). La biosíntesi de PHB s'inicia a partir de l'Acetil-CoA, en aquest punt el metabolisme té dues vies: el Cicle de Krebs on l'Acetil-CoA és oxidat en citrat, gràcies a l'enzim citrat sintasa regulat pel gen *gltA*, i per tant no produirà PHB. I una segona via, on intervenen dos gens principalment: *phA* i *phB*, els quals estan identificats i seqüenciats, que permeten la polimerització dels polihidroxialcanoats (PHA) (Khetkorn *et al.*, 2016). Per a produir finalment PHB mitjançant la intervenció de dos gens *phC* i *phE* (Kamravamanesh *et al.*, 2018).

Tal com es pot veure en la Figura 3 els gens *glgA* i *glgC* regulen la síntesi de glucogen, m'entre que els gens encarregats de la degradació d'aquest metabòlit són *glgX* i *glgP*. Considerant aquests gens com els reguladors d'aquestes vies metabòliques, un estudi de l'expressió gènica d'aquest gens és un bon disseny experimental per intentar correlacionar l'expressió gènica amb la producció de PHB i la producció i degradació de glucogen segons les diferents condicions de cultiu. L'estudi de l'expressió gènica el faríem mitjançant una qRT-PCR, ja que permet identificar en temps real la quantitat d'amplicó, considerant-la com la tècnica de preferència a l'hora de la quantificació tant absoluta com relativa dels nivells transcripcionals d'un gen (Rojas Amadó, 2007). Kamravamanesh , et al (2018) va realitzar un experiment similar amb *Synechocystis* sp., és per aquest motiu que els *primers* proposats serien els mateixos que es van utilitzar en aquest experiment i es troben especificats en la Taula 11.

Taula 11. Proposta de primers per l'experiment (Kamravamanesh *et al.,*2018).

Protein	Gene	NCBI Accession number in the reference genome of *Synechocystis* sp. PCC 6714 (Kopf et al., 2014)	Forward 5' – 3'	Reverse
Acetyl-CoA acetyltranferase	*phaA*	D082_14410	CCCGGTGGGAAAGGTAAAAA	AATACAGTGGACGGTTACGC
Acetyl-CoA reductase	*phaB*	D082_14400	TGTGTCAATGAAACCCGGAG	GCGGTACTCAATGTCAACCT
Citrate synthase	*gltA*	D082_32700	AACTGCTCCGCTAAATCCTG	CCACTCTGACGGATCCCTAT
Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	*glgC*	D082_11490	TTTTTCCGAGAAACCCCAGG	GGCCGAGTCAGGAATGATTT
Glycogene synthase	*glgA*	D082_29730	TTTTCGACCGGGATTACGAC	CTTCCACATACTTGAGGCCC
Glycogen phosphorylase	*glgP*	D082_00830	GCTAGATAGGCCATACGCAC	AATGGTCATTGCCCCTGTTT
Glycogen debranching enzyme	*glgX*	D082_11150	GTTTCTGGATGGTAACGGCT	CCTTCCTCTGGGGTAAAGGA
PHA polymerase	*phaE*	D082_28620	ATAGCCCTGGAGATCTGCTT	TGGTTAGAGTCCAGCAGTCA
Polyhydroxyalkanoic acid synthase	*phaC*	D082_28610	TCACTGTCTTTCTTGGAGCC	GACCATGCCCATTTTGAACC
Cytochrome b6-f complex subunit	*petA*	D082_26420	CGAGGAACTTAATCCGGGTG	CGAGGAACTTAATCCGGGTG
Protein subunit of Ribonuclease P	*rnpA*	D082_01070	CGCTTTGGCATCACCGTTAG	AGGTGGTTTCTCGAATGCCC
Small Subunit Ribosomal RNA	*ssurRNA*	D082_r01	GTGGGGAATTTTCCGCAATG	ATTCCGGATAACGCTTGCAT

Per tal que l'experiment sigui el més precís possible i que la quantificació dels gens sigui el més exacte possible és fonamental utilitzar un control intern confiable, per tal de normalitzar els nivells d'expressió. Típicament s'utilitzen gens *Housekeeping* (o gens constitutius), ja que s'expressen aproximadament sempre al mateix nivell, com a control endogen de referència. L'objectiu d'aquest és la normalització de les reaccions (Mathew, 2012). Kamravamanesh , et al (2018) proposa l'ús de tres gens constitutius: *petA* que codifica una unitat del citocrom b_6f (Šarkovskii, 1972), *rnpA* que codifica una subunitat de la ribonucleasa P (Pascual and Vioque, 1996) i *ssurRNA* que codifica la subunitat petita del ribosoma (Apprill *et al.*, 2015).

Partir d'aquesta proposta d'ampliació del treball, la qual no s'ha pogut realitzar, seria interessant per a futurs treballs. A més i com ja s'ha comentat, fer noves rèpliques dels experiments en les quals es fes la quantificació de PHB permetrien una millor discussió sobre l'ajust del model cinètic utilitzat. Els meus resultats del TFG juntament amb aquests experiments proposats en un futur contribuirien a l'optimització del disseny i el control d'aquest procés biològic, incrementant la producció de PHB i glucogen i facilitant la transició cap a un procés industrialitzat.

8. CONCLUSIONS

A partir del desenvolupament experimental dels objectius establerts a l'inici d'aquest projecte, s'estableixen les següents conclusions principals:

- Els resultats de la simulació mostren la capacitat que té el model per optimitzar les condicions de cultiu i optimitzar la producció de PHB en *Synechocystis* sp., la qual s'ha demostrat que està molt lligada a les condicions inicials de cultiu. També ha permès visualitzar que no existeix un màxim de producció, sinó una superfície de valors màxims.

- Estudiar l'efecte de les condicions de cultiu establertes amb el model ha permès analitzar la sensibilitat que presenten els cultius de *Synechocystis* sp. per a créixer sota limitacions de nutrients. Es conclou que es poden obtenir altes concentracions de biomassa de *Synechocystis* sp. quan no hi ha limitació de nutrients, mentre que davant de la limitació de N el creixement cel·lular es veu afectat considerablement i la resta de nutrients no es consumeixen. Aquesta limitació va afavorir la producció de glucogen. Malgrat això, la concentració màxima del cultiu ha sigut relativament baixa en els quatre reactors. Al no poder quantificar la concentració de PHB no s'ha pogut avaluar la seva producció.

- Els resultats experimentals presenten una gran variabilitat entre els dos experiments. És per aquest motiu que per tal d'avaluar la bondat de l'ajust del model s'haurien de realitzar noves rèpliques amb l'objectiu de poder predir de forma més acurada els resultats. Malgrat aquest fet, els resultats de març ens podrien suggerir que el model cinètic pot predir de forma correcte el creixement i el consum de nutrients en *Synechocystis* sp.

9. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Apprill, A., Mcnally, S., Parson, R. and Weber, L. (2015) 'Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton', *Aquatic Microbial Ecology*, 75, pp. 129–137. doi: 10.3354/ame01753.

- Arias, D. M., Fradinho, J. C., Uggetti, E., García, J., Oehmen, A., Reis, M.A.M. (2018) 'Polymer accumulation in mixed cyanobacterial cultures selected under the feast and famine strategy', *Alga Research*. Elsevier, 33, pp. 99–108. doi: 10.1016/j.algal.2018.04.027.

- Arias, D. M., Uggetti, E., García-Galán, M.J, García, J. (2018) 'Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture: Effect of nutrients limitation and photoperiods', *New Biotechnology*, 42, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.nbt.2018.01.001.

- Arias, D. M., García, J. and Uggetti, E. (2020) 'Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: Current status, challenges and future perspectives', *New Biotechnology*. Elsevier, 55, pp. 46–57. doi: 10.1016/j.nbt.2019.09.001.

- Balaji, S., Gopi, K. and Muthuvelan, B. (2013) 'A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics', *Algal Research*. Elsevier, 2, pp. 278–285. doi: 10.1016/j.algal.2013.03.002.

- Bougaran, G., Bernard, O. and Sciandra, A. (2010) 'Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus', *Journal of Theoretical Biology*, 265, pp. 443–454. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.04.018.

- Carpine, R., Raganati, F., Olivieri, G., Hellingwerf, K.J., Pollio, A., Salatino, P., Marzocchella, A. (2018) 'Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production by Synechocystis PCC6803 from CO2: Model development', *Algal Research*. Elsevier, 29, pp.49-60. doi: 10.1016/j.algal.2017.11.011.

- Collier, J. L. and Grossman, A. R. (1992) 'Chlorosis induced by nutrient deprivation in Synechococcus sp. strain PCC 7942: Not all bleaching is the same', *Journal of Bacteriology*, 174, pp. 4718–4726. doi: 10.1128/jb.174.14.4718-4726.1992.

- Do, B. C., Dang, T. T. and Jean-Guy, B., Dietmar, H., To, K., Jean-Claude, S., Montarop Y. (2009) 'Cloning, expression in Pichia pastoris, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-beta-mannosidase from Aspergillus niger BK01.', *Microbial cell factories*, 8, p. 59. doi: 10.1021/ac60111a017.

- Dutt, V. and Srivastava, S. (2018) 'Novel quantitative insights into carbon sources for synthesis of poly hydroxybutyrate in Synechocystis PCC 6803', *Photosynthesis Research*, 136, pp. 303–314. doi: 10.1007/s11120-017-0464-x.

- *ONI (s.d.) 'Epifluorescence microscopy a basic overviwew'*. Available at: https://oni.bio/epifluorescence-microscopy#:~:text=Epifluorescence%20microscopy%20is%20a%20mode,intensity%20light%20source%20is%20used. Consultat 30-04-2020.

- Fundamentals of environmental Measurements (s.d.) 'Measuring Dissolved Oxygen'. Available at: https://www.fondriest.com/environmental-measurements/measurements/measuring-water-quality/dissolved-oxygen-sensors-and-methods/#DOE1. Consultat 20-03-2020.

- García-Galán, M. J., Gutiérrez, R., Uggetti, E., Matamoros, V., García, J., Ferrer, I. (2018) 'Use of full-scale hybrid horizontal tubular photobioreactors to process agricultural runoff', *Biosystems Engineering*. Elsevier, 166, pp. 138–149. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2017.11.016.

- Jiang, Y., Hebly, M., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M. (2011) 'Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production', *Water Research*. Elsevier, 45, pp. 1309–1321. doi: 10.1016/j.watres.2010.10.009.

- Kamravamanesh, D., Kovacs, T. and Pflügl, S., Druzhinina, I., Kroll, P., Lackner, M., Herwing, C. (2018) 'Increased poly-B-hydroxybutyrate production from carbon dioxide in randomly mutated cells of cyanobacterial strain Synechocystis sp. PCC 6714: Mutant generation and characterization', *Bioresource Technology*. Elsevier, 266, pp. 34–44. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.057.

- Kamravamanesh, D., Lackner, M. and Herwig, C. (2018) 'Bioprocess engineering aspects of sustainable polyhydroxyalkanoate production in cyanobacteria', *Bioengineering*, 5, pp. 1–18. doi: 10.3390/BIOENGINEERING5040111.

- Kamravamanesh, D., Slouka, C., Limbeck, A., Hewig, C. (2019) 'Increased carbohydrate production from carbon dioxide in randomly mutated cells of cyanobacterial strain Synechocystis sp. PCC 6714: Bioprocess understanding and evaluation of productivities', *Bioresource Technology*. Elsevier, 273, pp. 277–287. doi: 10.1016/j.biortech.2018.11.025.

- Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Jantaro, S. (2016) 'Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in Synechocystis sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes', *Bioresource Technology*. Elsevier, 214, pp. 761–768. doi: 10.1016/j.biortech.2016.05.014.

- Kim, H. W., Vannela, R., Zhou, C., Rittmann, B.E. (2011) 'Nutrient acquisition and limitation for the photoautotrophic growth of Synechocystis sp. PCC6803 as a renewable biomass source', *Biotechnology and Bioengineering*, 108, pp. 277–285. doi: 10.1002/bit.22928.

- Koch, M., Doello, S., Gutekunst, K., Forchhammer, K. (2019) 'PHB is produced from Glycogen turn-over during nitrogen starvation in Synechocystis sp. PCC 6803', *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1942. doi: 10.3390/ijms20081942.

- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J.R. (2014) 'Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach', *Preslia*, 86, pp. 295–335.

- Komárek J. & Hauer T (2013). '*CyanoDB*, *Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR*'. Available at: http://www.cyanodb.cz/#/synechocystis. Consultat 25-02-2020.

- Lanham, A. B., Ricardo, A. R. and Coma, M., Fradinho, J., Carvalheira, M., Carvalho, G., Reis, M.A.M (2012) 'Optimisation of glycogen quantification in mixed microbial cultures', *Bioresource Technology*. Elsevier, 118, pp. 518–525. doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.087.

- Lau, N. S., Matsui, M. and Abdullah, A. A. A. (2015) 'Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products', *BioMed Research International*, 2015. doi: 10.1155/2015/754934.

- Lemesle, V. and Mailleret, L. (2008) 'A mechanistic investigation of the algae growth "droop" model', *Acta Biotheoretica*, 56, pp. 87–102. doi: 10.1007/s10441-008-9031-3.

- Aqion (s.d.) '*M Alkalinity and P Alkalinity'*.Available at: https://www.aqion.de/site/148. Consultat 25-03-2020.

- Markou, G., Vandamme, D. and Muylaert, K. (2014) 'Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients', *Water Research*. Elsevier, 65, pp. 186–202. doi: 10.1016/j.watres.2014.07.025

- Mathew, A. G. (2012) 'Real-Time PCR handbook', Thermo Fisher Scientific. Available at: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf. Consultat 13-06-2020.

- Menin, B., Santabarbara, S., Lami, A., Musazzi, S., Villafiorita-Monteleone, F., Casazza, A. (2019) 'Non-endogenous ketocarotenoid accumulation in engineered Synechocystis sp. PCC 6803', *Physiologia Plantarum*, 166, pp. 403–412. doi: 10.1111/ppl.12900.

- Panda, B. and Mallick, N. (2007) 'Enhanced poly-β-hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, Synechocystis sp. PCC 6803', *Letters in Applied Microbiology*, 44, pp. 194–198. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02048.x.

- Pascual, A. and Vioque, A. (1996) 'Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium Synechocystic sp. PCC 6803', *European Journal of Biochemistry*, 241, pp. 17–24. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0017t.x.

- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Kalia, V. C. (2003) 'Polyhydroxyalkanoates: An overview', *Bioresource Technology*, 87, pp. 137–146. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2.

- Redfield, A. C. (1958) 'The biological control of chemical factors in the environment'*, Sigma Xi , The Scientific Research Society*, *American Scientist*, 46, pp. 205–221.

- Rojas Amadó, M. (2007) '*Efectes de fàrmacs intercalants del dna en l'expressió gènica a', Universitat de Barcelona*. Available at: http://hdl.handle.net/2445/36169. Consultat 13-06-2020.

- Rueda, E. , García-Galán, M.J., Díez-Montero, R., Vila, J., Grifoll, M., Garcia J. (2020) 'Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures', *Bioresource Technology*. Elsevier, 295, p. 122233. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122233.

- Rueda, E., García-Galán, M.J. and García, J. (in preparation) 'Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) and glycogen production with cyanobacteria'.

- Šarkovskii, A. N. (1972) 'Characterization of the cosine', *Aequationes Mathematicae*, 8, p. 312. doi: 10.1007/BF01844508.

- Singh, A. K. and Mallick, N. (2017) 'Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production', *FEMS Microbiology Letters*, 364. doi: 10.1093/femsle/fnx189.

- Solimeno, A. (2017) 'Numerical Modelling of Microalgae Systems for Wastewater Treatment', *Universitat Politècnica de Cataluña* . Available at: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/109353/TAS1de1.pdf. Consultat 17-05-2020.

- Solimeno, A. and García, J. (2017) 'Microalgae-bacteria models evolution: From microalgae steady-state to integrated microalgae-bacteria wastewater treatment models – A comparative review', *Science of the Total Environment*. Elsevier, 607–608, pp. 1136–1150. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.114.

- Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G. (1971) 'BG11 (Blue-Green Medium)', *Culture Collection of Algae and Protozoa*, 11, p. 559001.

- Troschl, C. and Meixner, K. (2018) 'Pilot-scale production of poly-β-hydroxybutyrate with the cyanobacterium Synechocytis sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor', *Algal Research*. Elsevier, 34, pp. 116–125. doi: 10.1016/j.algal.2018.07.011.

- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y.J., Zhang, F. (2013) 'Development of synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory', *Marine Drugs*, 11, pp. 2894–2916. doi: 10.3390/md11082894.

- Zhang, D., Dechatiwongse, P., Del-Rio-Chanona, E.A., Hellgardt, K., Maitland, G.C., Vassiliadis, V.S. (2015) 'Analysis of the cyanobacterial hydrogen photoproduction process via model identification and process simulation', *Chemical Engineering Science*. Elsevier, 128, pp. 130–146. doi: 10.1016/j.ces.2015.01.059.

ANNEXOS

SUMARI

ÍNDEX DE TAULES **2**

ANNEX A. EQUACIONS MODEL CINÈTIC **4**

ANNEX B. MEDI BG-11 ..... **13**

ANNEX C. RESULTATS NUMÈTICS **15**

ANNEX C.I. OPTIMITZACIÓ CONDICIONS DE CULTIU 15

ANNEX C. II. ASSAIG MARÇ 19

ANNEX C.III. ASSAIG MAIG 26

ANNEX C. IV. RESULTATS AVALUACIÓ MODEL CINÈTIC 33

ANNEX C. IV. I. Assaig març *33*

ANNEX C. IV. II. Assaig maig *41*

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Processos model cinètic (Rueda et al., (in preparation)). 4
Taula 2. Paràmetres model cinètic (Rueda et al., (in preparation)). 5
Taula 3. Rangs de temperatura y pH del model cinètic en Synechocystis sp. (Rueda et al., (in preparation)). 7
Taula 4. Paràmetres model cinètic (Rueda et al., (in preparation)). 8
Taula 5. Coeficients estequiomètrics que intervenen en cada procés del model cinètic (Rueda et al., (in preparation)). 9
Taula 6. Coeficients estequiomètrics model cinètic (Rueda et al., (in preparation)). 10
Taula 7. Components del model cinètic (Rueda et al., (in preparation)). 11
Taula 8. Medi BG11 modificat utilitzat de l'assaig de març. 13
Taula 9. Medi BG11 modificat utilitzat de l'assaig de Maig. 14
Taula 10. Resultats numèrics de l'optimització de N i P per a determinar la productivitat de PHB. 15
Taula 11. Resultats terbolesa. Abreviatura: Factor de dissolució (DF). 19
Taula 12. Resultats SST i SSV. 20
Taula 13. Resultats N-NO3. Abreviatures: Absorbància (Abs). 21
Taula 14. Resultats P-PO4. 22
Taula 15. Resultats fòsfor soluble total. 22
Taula 16. Resultats fòsfor total. 23
Taula 17. Resultats fòsfor orgànic dissolt. 23
Taula 18. Resultats fòsfor particulat. 23
Taula 19. Resultats alcalinitat. 24
Taula 20. Resultats Temperatura. 25
Taula 21. Resultats oxigen dissolt. 25
Taula 22. Resultats terbolesa. Abreviatura: Factor de dissolució (DF). 26
Taula 23. Resultats SST i SSV. 27
Taula 24. Resultats N-NO3. Abreviatures: Absorbància (Abs). 28
Taula 25. Resultats P-PO4. 29
Taula 26. Resultats fòsfor soluble total. 29

Taula 27. Resultats fòsfor total. 30
Taula 28. Resultats fòsfor orgànic dissolt. 30
Taula 29. Resultats fòsfor particulat. 30
Taula 30. Resultats alcalinitat. 31
Taula 31. Resultats Temperatura. 32
Taula 32. Resultats oxigen dissolt. 32
Taula 33. Càlculs estadístics dels SSV dels PBR1 i PBR2. Abreviatures: suma dels erros al quadrat (SSE); suma dels tractaments al quadrat (SST[1]); arrel de l'error quadràtic mitjà (NRMSE); sumatori (SUM). 33
Taula 34. Càlculs estadístics dels SSV dels PBR3 i PBR4. 34
Taula 35. Càlculs estadístics N-NO3 dels PBR1 i PBR2. 35
Taula 36. Càlculs estadístics dels N-NO3 dels PBR3 i PBR4. 36
Taula 37. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR1 i PBR2. 37
Taula 38. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR3 i PBR4. 38
Taula 39. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR1 i PBR2. 39
Taula 40. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR3 i PBR4. 40
Taula 41.Càlculs estadístics dels SSV dels PBR1 i PBR2. 41
Taula 42. Càlculs estadístics dels SSV dels PBR3 i PBR4. 42
Taula 43. Càlculs estadístics dels N-NO3 dels PBR1 i PBR2. 43
Taula 44. Càlculs estadístics dels N-NO3 dels PBR3 i PBR4. 44
Taula 45. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR1 i PBR2. 45
Taula 46. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR3 i PBR4. 46
Taula 47. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR1 i PBR2. 47
Taula 48. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR3 i PBR4. 48
Taula 49. Càlculs estadístics glucogen dels PBR1 I PBR2. 49
Taula 50. Càlculs estadístics glucogen dels PBR3 I PBR4. 50

ANNEX A. EQUACIONS MODEL CINÈTIC

Taula 1. Processos model cinètic (Rueda et al., (in preparation)).

Process	Nº	Rate
		Cyanobacterial growth
Cyanobacterial growth on Ci	1	$\rho_1 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot \mu_{xm} \cdot \left(\frac{Q_N}{q_{N,max}}\right) \cdot \left(\frac{Q_P}{q_{P,max}}\right) \cdot \left(\frac{Q_{Ci}}{q_{Ci,max}}\right) \cdot \frac{Iav}{K_{SI} + Iav} \cdot X$
Cyanobacterial growth on glycogen	2	$\rho_2 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot \mu_{xm} \cdot \left(1 - \frac{Q_{Ci}}{q_{Ci,max}}\right) \cdot \left(\frac{Q_N}{q_{N,max}}\right) \cdot \left(\frac{Q_P}{q_{P,max}}\right) \cdot \frac{gly}{K_{gly} + gly} \cdot X$
Cyanobacterial growth on PHB	3	$\rho_3 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot \mu_{xm} \cdot \left(1 - \frac{Q_{Ci}}{q_{Ci,max}}\right) \cdot \left(\frac{Q_N}{q_{N,max}}\right) \cdot \left(\frac{Q_P}{q_{P,max}}\right) \cdot \frac{PHB}{K_{PHB} + PHB} \cdot X$
Cellular lysis	4	$\rho_4 = k_{lysis} \cdot X$
Endogenous respiration	5	$\rho_5 = k_{resp} \cdot \frac{S_{O2}}{S_{O2} + K_{O2}} \cdot X$
		Nutrients uptake
Ammonia uptake	6	$\rho_6 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{NH4} \cdot \frac{S_{NH4}}{K_N + S_{NH4}} \cdot \left(1 - \frac{Q_N}{q_{N,max}}\right) \cdot X$
Nitrate uptake	7	$\rho_7 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{NO3} \cdot \frac{NO_3^-}{NO_3^- + K_N} \cdot \frac{K_{iN}}{K_{iN} + S_{NH4}} \cdot \left(1 - \frac{Q_N}{q_{N,max}}\right) \cdot X$
Phosphate uptake	8	$\rho_8 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{PO4} \cdot \frac{PO_4^{3-}}{PO_4^{3-} + K_{PO_4^{3-}}} \cdot \left(1 - \frac{Q_P}{q_{P,max}}\right) \cdot X$
IC uptake	9	$\rho_9 = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{IC} \cdot \frac{CO_2 + HCO_3^-}{CO_2 + HCO_3^- + K_{Ci}} \cdot \left(1 - \frac{Q_{Ci}}{q_{Ci,max}}\right) \cdot X$
		PHB and glycogen accumulation
Photosynthetic glycogen production	10	$\rho_{10} = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{C2Gly,} \cdot \frac{K_{IN}^{Gly}}{Q_N + K_{IN}^{Gly}} \cdot \frac{K_{IP}^{Gly}}{Q_P + K_{IP}^{Gly}} \cdot \left(\frac{Q_{Ci}}{q_{Ci,max}}\right) \cdot \left(1 - \frac{gly}{gly_{max}}\right) \cdot X$
Photosynthetic PHB production	11	$\rho_{11} = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{C2PHB,} \cdot \frac{K_{IN}^{PHB}}{Q_N + K_{IN}^{PHB}} \cdot \frac{K_{IP}^{PHB}}{Q_P + K_{IP}^{PHB}} \cdot \left(\frac{Q_{Ci}}{q_{Ci,max}}\right) \cdot \left(1 - \frac{PHB}{PHB_{max}}\right) \cdot X$
Glycogen conversion to PHB	12	$\rho_{12} = \varphi(pH) \cdot \varphi(T) \cdot k_{Gly2PHB,} \cdot \frac{K_{IN}^{PHB}}{Q_N + K_{IN}^{Gly}} \cdot \frac{K_{IP}^{PHB}}{Q_P + K_{IP}^{Gly}} \cdot \frac{gly}{K_{gly} + gly} \cdot X$
		Chemical equilibrium and transference
CO_2 transfer to the atmosphere	13	$\rho_{20} = K_a^{CO2} \cdot (S_{CO2}^{WAT} - S_{CO2})$
O_2 transfer to the atmosphere	14	$\rho_{21} = K_a^{O2} \cdot (S_{O2}^{WAT} - S_{O2})$

Taula 2. Paràmetres model cinètic (Rueda et al., (in preparation)).

Parameter	Description	Value	Unit	Reference
		Cyanobacterial growth on Ci		
μ_{xm}	Maximum growth rate	5	d^{-1}	This study
$q_{N,max}$	Maximum internal nitrogen quota	0.13	$gN \cdot gVSS^{-1}$	This study
$q_{P,max}$	Maximum internal phosphorus quota	0.03	$gP \cdot gVSS^{-1}$	This study
$q_{C,max}$	Maximum internal carbon quota	0.65	$gC \cdot gVSS^{-1}$	This study
K_{SI}	Half saturation constant for irradiance	50	$\mu mol\ photons \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	This study
Iav	$I_{av} = \frac{I_0}{\sigma \cdot L \cdot X} \cdot (1 - e^{-\sigma \cdot L \cdot X})$	----	$\mu mol\ photons \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	This study
σ	extinction coefficient	0.37	$m^2 \cdot g^{-1}$	(Carpine, Olivieri and Hellingwerf, 2015)
L	Depth of the culture	5.75	cm	This study
		Cyanobacterial growth on glycogen		
K_{gly}	Half saturation constant for glycogen	0.15	$g\ Gly \cdot gVSS^{-1} m^{-3}$	This study
		Cyanobacterial growth on PHB		
K_{PHB}	Half saturation constant for PHB	0.05	$g\ PHB \cdot gVSS^{-1} m^{-3}$	This study
		Cellular lysis		
k_{lysis}	Specific velocity of cell lysis	0.015	d^{-1}	This study
f_l	Production of Xi by algae decay and endogenous respiration	0.1	$gXi \cdot gX^{-1}$	(Sah *et al.*, 2011)
		Endogenous respiration		
k_{resp}	Specific velocity of cell respiration	0.01	d^{-1}	This study
K_{O2}	Half saturation constant for O2 oxidation	0.2	$gO_2 \cdot m^{-3}$	(Reichert *et al.*, 2001)
		Ammonia uptake		
k_{NH4}	Uptake rate of ammonia	0.8	d^{-1}	This study
K_N	Half saturation constant for nitrogen uptake	40	$g\ N \cdot m^{-3}$	This study
		Nitrate uptake		
k_{NO3}	Uptake rate of nitrate	0.8	d^{-1}	This study
K_{iN}	Ammonia inhibition constant	5	$gN\text{-}NH_4^+ \cdot m^{-3}$	This study
		Phosphate uptake		
k_{PO4}	Uptake rate of phosphate	0.006	d^{-1}	This study

$K_{PO_4^{3-}}$	Half saturation constant for phosphorus uptake	5	g P·m^{-3}	This study
		IC uptake		
k_{IC}	Uptake rate of inorganic carbon	1	d^{-1}	This study
K_{Ci}	Half saturation constant for IC uptake	50	gC·m^{-3}	This study
		Photosynthetic glycogen production		
k_{C2Gly}	Photosynthetic glycogen production rate	0.12	d^{-1}	This study
K_{IN}^{Gly}	Nitrogen inhibition constant for glycogen formation	0.04	g N·gX^{-1}	This study
K_{IP}^{Gly}	Phosphorus inhibition constant for glycogen formation	0.008	g P·gX^{-1}	This study
gly_{max}	Maximum % glycogen in the cell	0.8	g gly·gVSS^{-1}	This study
		Photosynthetic PHB production		
k_{C2PHB}	Photosynthetic PHB production rate	0.01	d^{-1}	This study
K_{IN}^{PHB}	Nitrogen inhibition constant for PHB formation	0.02	g N·gX^{-1}	This study
K_{IP}^{PHB}	Phosphorus inhibition constant for PHB formation	0.005	g P·gX^{-1}	This study
PHB_{max}	Maximum % PHB in the cell	0.8	g PHB·gVSS^{-1}	This study
		Glycogen conversion to PHB		
$k_{Gly2PHB}$	Glycogen conversion to PHB rate	0.02	d^{-1}	This study
		Chemical equilibrium and transference		
		Equilibrium constants		
$K_{eq,HCO3}$	Equilibrium constant CO_2 → HCO_3^-	$10^{-6.35}$	g·m^{-3}	(Concas *et al.*, 2012)
$K_{eq,CO3}$	Equilibrium constant HCO_3^- → CO_3^{2-}	$10^{-10.33}$	g·m^{-3}	(Concas *et al.*, 2012)
$K_{eq,NH3}$	Equilibrium constant NH_4^+ → NH_3	$10^{-9.252}$	g·m^{-3}	(Serralta *et al.*, 2004)
$K_{eq,H2PO4-}$	Equilibrium constant H_3PO_4 → $H_2PO_4^-$	$10^{-2.16}$	g·m^{-3}	(Concas *et al.*, 2012)
$K_{eq,HPO42-}$	Equilibrium constant $H_2PO_4^-$ → HPO_4^{2-}	$10^{-7.20}$	g·m^{-3}	(Concas *et al.*, 2012)
$K_{eq,PO43-}$	Equilibrium constant HPO_4^{2-} → P-PO4	$10^{-12.32}$	g·m^{-3}	(Concas *et al.*, 2012)

$K_{eq,w}$	Equilibrium constant $H_2O \rightarrow OH^- + H^+$	10^{-14}	$g^2 \cdot m^{-6}$	(Concas *et al.*, 2012)
		Transfer of gases to the atmosphere		
K_a^{CO2}	Mass transfer coefficient for CO_2	0.7	d^{-1}	(Solimeno *et al.*, 2015)
S_{CO2}^{WAT}	Saturation concentration of CO_2	38.3 $mol \cdot m^{-3} \cdot atm^{-1} \cdot 0.0003$ $atm \cdot 12g \cdot mol^{-1}$	$g \cdot m^{-3}$	[2]
K_a^{O2}	Mass transfer coefficient for O_2	4		(Solimeno *et al.*, 2015)
S_{O2}^{WAT}	Saturation concentration of O_2	1.07 $mol \cdot m^{-3} \cdot atm^{-1} \cdot 0.21$ $atm \cdot 32g \cdot mol^{-1}$	$g \cdot m^{-3}$	[2]
		Cardinal functions		
$\varphi(pH)$	pH cardinal function	$= \frac{\varphi(pH)}{(pH_{i,opt} - pH_{i,min})[(pH_{i,opt} - pH}$	-	(Solimeno, Gómez-Serrano and Acién, 2019)
$\varphi(T)$	T cardinal function	$= \frac{\varphi(T)}{(T_{i,opt} - T_{i,min})[(T_{i,opt} - T_{i,min})(T -}$	-	(Solimeno, Gómez-Serrano and Acién, 2019)

*The saturation concentration can be calculated as the Henry's law equilibrium constant and the partial pressure of the gas in the atmosphere as shown in (Kalyuzhnyi *et al.*, 2018)

Taula 3. Rangs de temperatura y pH del model cinètic en Synechocystis sp. (Rueda et al., (in preparation)).

Species	Parameter	Value	Species	Parameter	Value	Unit
Synechocystis sp. PCC 6803	pH_{max}	13.08	*Synechocystis sp. PCC 6803*	T_{max}	60.42	°C
	pH_{min}	3.9		T_{min}	15.57	°C
	pH_{opt}	8.52		T_{opt}	38	°C

Taula 4. Paràmetres model cinètic (Rueda et al., (in preparation)).

Parameter	Description	Value	Unit	Reference
	Cyanobacterial biomass composition			
α_C	Fraction of carbon in cyanobacteria	0.36	$gC \cdot g^{-1}X$	(Reichert *et al.*, 2001)
α_N	Fraction of nitrogen in cyanobacteria	0.063	$gN \cdot g^{-1}X$	(Reichert *et al.*, 2001)
α_P	Fraction of phosphorus in cyanobacteria	0.009	$gP \cdot g^{-1}X$	(Reichert *et al.*, 2001)
α_O	Fraction of oxygen in cyanobacteria	0.50	$gO \cdot g^{-1}X$	(Reichert *et al.*, 2001)
	Inert particulate organic matter composition			
$\alpha_{C,Xi}$	Fraction of carbon in Inert particulate organic matter	0.61	$gC \cdot g^{-1}Xi$	(Reichert *et al.*, 2001)
$\alpha_{N,Xi}$	Fraction of nitrogen in Inert particulate organic matter	0.03	$gN \cdot g^{-1}Xi$	(Reichert *et al.*, 2001)
$\alpha_{P,Xi}$	Fraction of phosphorus in Inert particulate organic matter	0.01	$gP \cdot g^{-1}Xi$	(Reichert *et al.*, 2001)
$\alpha_{O,Xi}$	Fraction of oxygen in Inert particulate organic matter	0.28	$gO \cdot g^{-1}Xi$	(Reichert *et al.*, 2001)

* Calculated considering algal biomass composition of $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$ (Xin *et al.*, 2010).

Taula 5. Coeficients estequiomètrics que intervenen en cada procés del model cinètic (Rueda et al., (in preparation)).

Process		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		X	S_{NH4}	S_{NO3}	S_{Ptot}	S_{Ctot}	S_{O2}	Q_N	Q_P	Q_{Ci}	Gly	PHB	X_I
Cyanobacterial growth on Ci	1	$V_{1,1}$					$V_{6,1}$	$V_{7,1}$	$V_{8,1}$	$V_{9,1}$			
Cyanobacterial growth on glycogen	2	$V_{1,2}$					$V_{6,2}$	$V_{7,2}$	$V_{8,2}$		$V_{10,2}$		
Cyanobacterial growth on PHB	3	$V_{1,3}$					$V_{6,3}$	$V_{7,3}$	$V_{8,3}$			$V_{11,3}$	
Cellular lysis	4	$V_{1,4}$	$V_{2,4}$		$V_{4,4}$	$V_{5,4}$	$V_{6,4}$	$V_{7,4}$	$V_{8,4}$	$V_{9,4}$	$V_{10,4}$	$V_{11,4}$	$V_{12,4}$
Endogenous respiration	5		$V_{2,5}$			$V_{5,5}$	$V_{6,5}$	$V_{7,5}$	$V_{8,5}$	$V_{9,5}$	$V_{10,5}$	$V_{11,5}$	$V_{12,5}$
Ammonia uptake	6		$V_{2,6}$					$V_{7,6}$					
Nitrate uptake	7			$V_{3,7}$			$V_{6,7}$	$V_{7,7}$					
Phosphate uptake	8				$V_{4,8}$		$V_{6,8}$		$V_{8,8}$				
IC uptake	9					$V_{5,9}$	$V_{6,9}$			$V_{9,9}$			
Photosynthetic glycogen production	10						$V_{6,10}$			$V_{9,10}$	$V_{10,10}$		
Photosynthetic PHB production	11						$V_{6,11}$			$V_{9,11}$		$V_{11,11}$	
Glycogen conversion to PHB	12						$V_{6,12}$				$V_{10,12}$	$V_{11,12}$	
CO_2 transfer to the atmosphere	13					$V_{5,13}$							
O2 transfer to the atmosphere	14						$V_{6,14}$						

Taula 6. Coeficients estequiomètrics model cinètic (Rueda et al., (in preparation)).

Stoichiometric coefficients	Unit
Cyanobacterial growth on Ci	
$V_{1,1} = 1$	$gX \cdot gX^{-1}$
$V_{6,1} = -\alpha_O$	$gO \cdot gX^{-1}$
$V_{7,1} = -\alpha_N$	$gN \cdot gX^{-1}$
$V_{8,1} = -\alpha_P$	$gP \cdot gX^{1}$
$V_{9,1} = -\alpha_C$	$gC \cdot gX^{-1}$
Cyanobacterial growth on glycogen	
$V_{1,2} = 1$	$gX \cdot gX^{-1}$
$V_{6,2} = -\alpha_O + \frac{4}{3} \cdot \alpha_C$	$gO \cdot gX^{-1}$
$V_{7,2} = -\alpha_N$	$gN \cdot gX^{-1}$
$V_{8,2} = -\alpha_P$	$gP \cdot gX^{-1}$
$V_{10,2} = -\frac{5}{2}\alpha_C$	$gGlu \cdot gX^{-1}$
Cyanobacterial growth on PHB	
$V_{1,3} = 1$	$gX \cdot gX^{-1}$
$V_{6,3} = -\alpha_O + \frac{2}{3} \cdot \alpha_C$	$gO \cdot gX^{-1}$
$V_{7,3} = -\alpha_N$	$gN \cdot gX^{-1}$
$V_{8,3} = -\alpha_P$	$gP \cdot gX^{-1}$
$V_{11,3} = -\alpha_C \cdot \frac{43}{24}$	$gPHB \cdot gX^{-1}$
Cellular lysis	
$V_{1,4} = -1$	$gX \cdot gX^{-1}$
$V_{2,4} = Q_N - f_I \cdot \alpha_{N,XI}$	$gN \cdot gX^{-1}$
$V_{4,4} = Q_P - f_I \cdot \alpha_{P,XI}$	$gP \cdot gX^{-1}$
$V_{5,4} = Q_C + \frac{2}{5} \cdot Gly \cdot \frac{VSS}{X} + \frac{24}{43} \cdot PHB \cdot \frac{VSS}{X} - f_I \cdot \alpha_{C,XI}$	$gC \cdot gX^{-1}$
$V_{6,4} = \alpha_O - \frac{27}{7} \cdot (Q_N - f_I \cdot \alpha_{N,XI}) - \frac{32}{7} \cdot (Q_P - fI \cdot \alpha_{P,XI}) - fI \cdot \alpha_{O,XI} - 4 \cdot v_{5,4} + \frac{8}{15} \cdot Gly \cdot \frac{VSS}{X} + \frac{16}{43} \cdot PHB \cdot \frac{VSS}{X}$	$gO \cdot gX^{-1}$
$V_{7,4} = -Q_N$	$gN \cdot gX^{-1}$
$V_{8,4} = -Q_P$	$gP \cdot gX^{-1}$
$V_{9,4} = -Q_C$	$gC \cdot gX^{-1}$
$V_{10,4} = -Gly \cdot \frac{VSS}{X}$	$gGly \cdot gX^{-1}$
$V_{11,4} = -PHB \cdot \frac{VSS}{X}$	$gPHB \cdot gX^{-1}$
$V_{12,4} = f_I$	$gXi \cdot gX^{-1}$

Taula 7. Components del model cinètic (Rueda et al., (in preparation)).

Component	Unit	N (g N)	P (gP)	C (g C)	O (g O)	PHB (gPHB)
X_{alg}	g X	α_N	α_P	α_C	α_O	
X_I	g X	$\alpha_{N,XI}$	$\alpha_{P,XI}$	$\alpha_{C,XI}$	$\alpha_{O,XI}$	
$\mathbf{S_{NH4}}$	g N	1				
$\mathbf{S_{NO3}}$	g N	1			27/7	
$\mathbf{S_{Ptot}}$	g P		1		32/7	
$\mathbf{S_C}$	g C			1	4	
$\mathbf{S_{O2}}$	g O				1	
$\mathbf{Q_N}$	g N	1				
$\mathbf{Q_P}$	g P		1			
$\mathbf{Q_{Ci}}$	g C			1		
Gly	g Glu			2/5	8/15	43/60
PHB	g PHB			24/43	16/43	

Carpine, R., Olivieri, G. and Hellingwerf, K. (2015) 'The Cyanobacterial Route to Produce Poly- β -hydroxybutyrate', *Chemical Engineering Transactions*, 43, pp. 289–294.

Concas, A. Lutzu, G.A., Pisu, M., Cao, G. (2012) 'Experimental analysis and novel modeling of semi-batch photobioreactors operated with Chlorella vulgaris and fed with 100% (v/v) CO2', *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., 213, pp. 203–213. doi: 10.1016/j.cej.2012.09.119.

Kalyuzhnyi, S. V., Batstone, D.J., Vavilin, V.A., Pavlostathis, S.G. (2018) 'The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1)', *Water Science and Technology*, 45, pp. 65–73. doi: 10.2166/wst.2002.0292.

Reichert, P, Borchardt, D., Henze, M., Rauch, W., Shanahan, P., Somlyódy, L., Vanrolleghem, P. (2001) 'River Water Quality Model no. 1 (RWQM1): II. Biochemical process equations', *Water Science and Technology*, pp. 11–30.

Sah, L., Rousseau, D.P.L., Hooijmans, C.M., Lens, P.N.L. (2011) '3D model for a secondary facultative pond', *Ecological Modelling*. Elsevier B.V., 222, pp. 1592–1603. doi:

10.1016/j.ecolmodel.2011.02.021.

Serralta, J., Ferrer, J., Borrás, L., Seco, A. (2004) 'An extension of ASM2d including pH calculation', *Water Research*, 38, pp. 4029–4038. doi: 10.1016/j.watres.2004.07.009.

Solimeno, A., Samsó, R., Uggetti, E., Sialve, B., Steyer, J.P., Gabarró, A., García, J. (2015)' *New mechanistic model to simulate microalgae growth'*, *Algal Research*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.algal.2015.09.008.

Solimeno, A., Gómez-Serrano, C. and Acién, F. G. (2019) 'BIO_ALGAE 2: improved model of microalgae and bacteria consortia for wastewater treatment', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, pp. 25855–25868. doi: 10.1007/s11356-019-05824-5.

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S. (2010) 'Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth , nutrient uptake , and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp .', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101, pp. 5494–5500. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.016.

ANNEX B. MEDI BG-11

Taula 8. Medi BG11 modificat utilitzat de l'assaig de març.

Solució	Concentració ($g \cdot L^{-1}$)	Quantitat afegida al medi ($mL \cdot L^{-1}$)	Concentració al reactor ($g \cdot L^{-1}$)
$NaNO_3$	150	5,37	0,81
K_2PO_4	4	11,38	0,046
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60	10	0,036
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,50	10	0,075
Citrat fèrric d'amoni	0,60	10	$6{,}00 \cdot 10^{-3}$
$EDTANa_2$	0,010	10	$1{,}00 \cdot 10^{-4}$
$NaHCO_3$	70	46,94	3,29
Àcid cítric	0,6	10	$6{,}00 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	2,86	1	$2{,}86 \cdot 10^{-3}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81	1	$1{,}81 \cdot 10^{-3}$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22	1	$2{,}20 \cdot 10^{-4}$
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,39	1	$3{,}90 \cdot 10^{-4}$
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08	1	$8{,}00 \cdot 10^{-5}$
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,05	1	$5{,}00 \cdot 10^{-5}$

Taula 9. Medi BG11 modificat utilitzat de l'assaig de Maig.

Solució	Concentració ($g \cdot L^{-1}$)	Quantitat afegida al medi (mL)	Concentració al reactor ($g \cdot L^{-1}$)
$NaNO_3$	150	1,46	0,219
K_2PO_4	4	10,85	0,043
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60	10	0,036
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,50	10	0,075
Citrat fèrric d'amoni	0,60	10	$6{,}00 \cdot 10^{-3}$
$EDTANa_2$	0,010	10	$1{,}00 \cdot 10^{-4}$
$NaHCO_3$	70	16,24	1,14
Àcid cítric	0,6	10	0,04
H_3BO_3	2,86	1	0,075
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,81	1	$6{,}00 \cdot 10^{-3}$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22	1	$1{,}00 \cdot 10^{-4}$
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,39	1	$6{,}00 \cdot 10^{-3}$
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08	1	$2{,}86 \cdot 10^{-3}$
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,05	1	$1{,}81 \cdot 10^{-3}$

ANNEX C. RESULTATS NUMÈTICS

ANNEX C.I. OPTIMITZACIÓ CONDICIONS DE CULTIU

Taula 10. Resultats numèrics de l'optimització de N i P per a determinar la productivitat de PHB.

N_{in} (mg/L)	P_{in} (mg/L)	Productivitat PHB (mg PHB/L·dia)	t (dies)	SSV(t) (g/L)	N(t) (mg/L)	P(t) (mg/L)	IC(t) (mg/L)	PHB(t) (mg)	Glucogen(t) (mg)
5,00	3,00	1,73	60	0,91	2,0E-125	6,83E-03	122,13	102,21	510,23
5,00	4,33	1,53	60	0,89	5,3E-137	3,83E-02	122,11	90,19	488,64
5,00	5,67	1,30	55	0,83	2,8E-129	9,86E-02	122,06	70,04	435,79
5,00	7,00	1,13	49	0,77	1,3E-115	2,08E-01	121,98	54,01	385,48
5,00	8,33	1,01	45	0,73	4,7E-106	4,23E-01	121,82	44,44	350,21
5,00	9,67	0,94	42	0,70	1,7E-98	8,69E-01	121,49	38,46	325,60
5,00	11,00	0,89	40	0,68	2,1E-93	1,61E+00	120,95	34,89	309,73
5,00	12,33	0,87	39	0,67	5,6E-91	2,57E+00	120,25	33,00	300,70
5,00	13,67	0,85	39	0,67	2,6E-91	3,64E+00	119,46	32,36	297,26
5,00	15,00	0,84	39	0,67	1,5E-91	4,80E+00	118,61	31,92	294,87
15,56	3,00	1,67	51	0,91	6,6E-99	-5,53E-03	122,16	83,27	502,93
15,56	4,33	1,88	58	1,05	1,5E-140	2,18E-03	122,14	107,17	586,14
15,56	5,67	1,83	62	1,10	1,1E-168	2,10E-02	122,12	111,34	604,59
15,56	7,00	1,64	59	1,06	2,0E-169	6,05E-02	122,09	95,40	569,15
15,56	8,33	1,46	55	1,01	7,8E-162	1,22E-01	122,05	78,86	524,10
15,56	9,67	1,31	52	0,97	8,6E-155	2,14E-01	121,98	66,70	485,34
15,56	11,00	1,19	49	0,93	1,7E-146	3,57E-01	121,87	57,06	451,27
15,56	12,33	1,10	47	0,90	9,0E-141	5,93E-01	121,70	50,60	425,81

15,56	13,67	1,04	45	0,88	1,1E-134	1,00E+00	121,40	45,66	405,21
15,56	15,00	1,00	44	0,87	8,0E-132	1,64E+00	120,93	42,84	392,36
26,11	3,00	1,35	45	0,85	3,8E-69	-8,37E-03	123,10	59,43	443,49
26,11	4,33	1,71	51	1,03	7,9E-111	-6,38E-03	122,78	85,32	556,92
26,11	5,67	1,91	57	1,15	5,7E-152	-1,94E-04	122,22	106,82	634,97
26,11	7,00	1,93	62	1,22	1,7E-187	1,27E-02	122,14	118,01	671,12
26,11	8,33	1,83	62	1,22	3,8E-201	4,00E-02	122,11	111,63	660,51
26,11	9,67	1,68	59	1,19	1,7E-199	8,54E-02	122,08	97,16	625,38
26,11	11,00	1,52	56	1,15	2,0E-193	1,50E-01	122,06	83,84	587,41
26,11	12,33	1,39	53	1,11	5,4E-185	2,41E-01	122,03	72,44	551,15
26,11	13,67	1,28	51	1,08	4,4E-179	3,69E-01	122,36	64,19	521,28
26,11	15,00	1,20	49	1,05	1,0E-172	5,62E-01	122,78	57,36	494,87
36,67	3,00	1,09	41	0,78	5,2E-44	-9,39E-03	125,18	43,80	387,41
36,67	4,33	1,44	46	0,97	1,3E-81	-9,35E-03	126,76	64,78	502,64
36,67	5,67	1,71	51	1,12	1,5E-120	-6,94E-03	127,03	85,52	597,52
36,67	7,00	1,88	56	1,23	1,4E-159	-1,26E-03	126,29	103,67	667,64
36,67	8,33	1,95	60	1,30	8,1E-194	9,89E-03	124,67	114,87	707,27
36,67	9,67	1,90	62	1,32	6,0E-219	3,01E-02	123,88	116,07	714,59
36,67	11,00	1,79	61	1,31	1,2E-226	6,49E-02	124,68	107,36	694,31
36,67	12,33	1,65	57	1,28	1,2E-217	1,20E-01	125,49	92,63	657,06
36,67	13,67	1,52	54	1,24	9,2E-213	1,93E-01	127,24	80,77	621,06
36,67	15,00	1,41	52	1,21	1,9E-205	2,90E-01	129,76	71,79	589,37
47,22	3,00	0,91	39	0,74	5,3E-24	-9,96E-03	128,20	34,52	344,10
47,22	4,33	1,21	43	0,92	3,2E-57	-1,09E-02	131,62	50,94	452,16
47,22	5,67	1,48	47	1,07	3,4E-92	-1,02E-02	134,00	67,91	547,73
47,22	7,00	1,68	50	1,20	1,3E-125	-6,63E-03	132,14	82,54	624,53
47,22	8,33	1,83	54	1,29	2,5E-161	-5,95E-04	132,33	96,92	685,97
47,22	9,67	1,90	58	1,36	1,3E-196	9,41E-03	133,19	108,18	726,69
47,22	11,00	1,89	60	1,39	1,7E-221	2,75E-02	133,10	111,40	740,82

47,22	12,33	1,81	59	1,39	-2,5E-234	5,91E-02	133,26	105,01	728,36
47,22	13,67	1,70	57	1,37	1,4E-234	1,05E-01	135,89	95,06	701,66
47,22	15,00	1,58	54	1,34	1,4E-227	1,69E-01	137,09	83,69	668,35
57,78	3,00	0,78	39	0,70	3,3E-08	-1,03E-02	133,77	29,62	315,84
57,78	4,33	1,04	41	0,87	2,1E-36	-1,18E-02	136,28	41,46	409,09
57,78	5,67	1,28	44	1,02	1,9E-67	-1,19E-02	139,42	54,84	499,73
57,78	7,00	1,48	47	1,15	3,0E-99	-1,03E-02	141,05	67,98	579,33
57,78	8,33	1,64	50	1,26	2,1E-131	-6,51E-03	141,75	80,27	646,07
57,78	9,67	1,75	53	1,35	1,8E-163	1,57E-04	142,10	91,15	698,72
57,78	11,00	1,82	56	1,41	8,4E-196	1,06E-02	143,66	99,88	735,47
57,78	12,33	1,82	58	1,44	-2,5E-227	2,76E-02	145,50	103,77	752,54
57,78	13,67	1,77	58	1,45	-9,6E-240	5,57E-02	147,31	100,76	748,06
57,78	15,00	1,68	56	1,44	3,1E-242	9,84E-02	147,55	92,38	727,30
68,33	3,00	0,74	42	0,69	5,6E-01	-1,01E-02	145,06	30,31	314,94
68,33	4,33	0,90	40	0,83	7,9E-19	-1,24E-02	141,92	35,14	374,76
68,33	5,67	1,11	42	0,98	1,9E-46	-1,31E-02	144,60	45,61	457,82
68,33	7,00	1,30	45	1,11	3,8E-76	-1,27E-02	150,22	57,12	536,21
68,33	8,33	1,45	48	1,22	8,4E-107	-1,08E-02	154,87	68,29	604,72
68,33	9,67	1,58	50	1,32	1,8E-135	-6,01E-03	153,55	77,28	660,79
68,33	11,00	1,67	53	1,39	3,6E-167	5,38E-04	157,59	86,67	707,41
68,33	12,33	1,72	55	1,44	5,7E-199	1,18E-02	158,08	92,79	739,40
68,33	13,67	1,73	56	1,48	1,3E-220	2,96E-02	157,76	94,93	755,26
68,33	15,00	1,69	57	1,49	2,5E-238	5,47E-02	163,61	94,65	756,58
78,89	3,00	0,74	42	0,69	7,1E+00	-1,01E-02	148,22	30,19	314,05
78,89	4,33	0,82	41	0,80	8,0E-06	-1,27E-02	152,00	32,61	356,58
78,89	5,67	0,98	41	0,94	1,8E-28	-1,40E-02	151,51	39,29	423,25
78,89	7,00	1,15	43	1,07	6,5E-55	-1,41E-02	155,43	48,29	495,90
78,89	8,33	1,29	46	1,18	1,8E-83	-1,33E-02	164,14	58,21	563,83
78,89	9,67	1,41	48	1,28	4,1E-111	-1,03E-02	165,82	66,44	621,40

78,89	11,00	1,51	50	1,36	5,9E-139	-5,10E-03	167,22	73,86	670,09
78,89	12,33	1,58	53	1,42	1,9E-170	1,38E-03	175,25	81,95	711,20
78,89	13,67	1,61	54	1,48	3,1E-198	1,39E-02	172,61	85,58	738,43
78,89	15,00	1,62	56	1,51	-3,0E-223	2,96E-02	179,57	89,23	755,79
89,44	3,00	0,74	42	0,69	1,6E+01	-1,01E-02	149,37	30,18	313,88
89,44	4,33	0,80	43	0,79	8,7E-01	-1,25E-02	164,17	33,46	357,08
89,44	5,67	0,88	41	0,91	2,4E-13	-1,47E-02	161,28	35,29	397,32
89,44	7,00	1,03	42	1,04	9,7E-37	-1,53E-02	163,11	42,14	461,92
89,44	8,33	1,16	44	1,15	4,6E-62	-1,47E-02	168,89	49,83	525,33
89,44	9,67	1,27	46	1,24	5,7E-88	-1,28E-02	173,52	57,15	582,42
89,44	11,00	1,36	49	1,32	2,5E-116	-1,03E-02	185,62	65,34	634,10
89,44	12,33	1,43	51	1,39	5,0E-143	-5,01E-03	189,80	71,63	676,57
89,44	13,67	1,48	53	1,45	4,2E-170	2,72E-03	194,43	77,12	711,04
89,44	15,00	1,51	54	1,50	-1,5E-193	1,52E-02	193,27	80,16	735,84
100,00	3,00	0,74	42	0,69	2,6E+01	-1,00E-02	149,97	30,18	313,81
100,00	4,33	0,80	43	0,79	7,2E+00	-1,25E-02	167,38	33,41	356,55
100,00	5,67	0,84	43	0,89	1,2E-03	-1,49E-02	177,48	35,12	389,84
100,00	7,00	0,93	42	1,00	7,4E-21	-1,63E-02	175,29	38,08	434,77
100,00	8,33	1,05	43	1,11	9,6E-44	-1,61E-02	177,07	43,93	492,30
100,00	9,67	1,15	45	1,21	4,5E-68	-1,51E-02	185,06	50,51	547,65
100,00	11,00	1,23	47	1,29	4,3E-93	-1,29E-02	192,46	56,73	597,30
100,00	12,33	1,30	49	1,36	2,1E-118	-9,07E-03	199,36	62,52	640,88
100,00	13,67	1,36	51	1,43	3,7E-144	-3,44E-03	206,50	67,78	677,96
100,00	15,00	1,39	53	1,47	5,1E-171	4,46E-03	214,29	72,39	708,20

ANNEX C. II. ASSAIG MARÇ

Taula 11. Resultats terbolesa. Abreviatura: Factor de dissolució (DF).

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)
1		60	139,29		102,67	174,67		62,33	141,22		62	140,94
2		110,8	181,41		125	193,19		97,4	170,30		91,6	165,49
3		206	260,36		202,4	257,38		153,2	216,58		205,2	259,70
4		198,6	254,23		198	253,73		262,6	307,30		351	380,61
7		179,2	238,14		165,83	227,05		197,8	253,56		176,4	235,82
8		179,8	238,64		157,6	220,23		185	242,95		171,2	231,50
9		170,8	231,17		132,6	199,49		169	229,68		163	224,70
10		168,2	229,02		134,83	201,35		163,6	225,20		168,6	229,35
11		200,2	255,55		131,2	198,33		160,4	222,55		233	282,75
15		257,2	302,82		93	166,65		154	217,24		292,6	332,18

Taula 12. Resultats SST i SSV.

	PBR1		PBR2		PBR3		PBR4	
Dia	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)
1	0,20	0,17	0,23	0,22	0,21	0,22	0,20	0,25
3	0,32	0,31	0,30	0,27	0,31	0,29	0,30	0,27
4	0,40	0,40	0,44	0,39	0,39	0,30	0,28	0,24
7	0,47	0,45	0,67	0,61	0,57	0,55	0,62	0,58
8	0,63	0,61	0,77	0,73	0,60	0,59	0,71	0,67
9	0,65	0,61	0,84	0,79	0,71	0,68	0,75	0,72
10	0,57	0,55	0,79	0,76	0,77	0,71	0,85	0,80
11	0,72	0,68	0,77	0,78	0,80	0,75	0,86	0,79
14	0,68	0,59	0,84	0,79	0,82	0,76	0,94	0,87

Taula 13. Resultats N-NO3. Abreviatures: Absorbància (Abs).

	PBR1				PBR2				PBR3				PBR4			
Dia	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)
1	1,17	0	25	122,48	1,171	0,009	25	122,80	1,154	0,007	25	121,41	1,169	0,008	25	122,80
2	1,027	0,011	25	106,94	1,13	0,013	25	117,55	1,098	0,011	25	114,55	1,135	0,013	25	118,09
3	0,999	0,005	25	105,22	0,998	0,005	25	105,11	1,052	0,004	25	111,12	1,099	0,007	25	115,51
4	1,023	0,02	25	104,58	0,976	0,017	25	100,18	1,064	0,019	25	109,19	1,06	0,015	25	109,62
7	1	0	10	60,87	1,417	0,034	10	57,53	1,486	0,024	10	61,34	1,502	0,094	10	56,02
8	1,361	0,029	10	55,55	1,297	0,037	10	52,12	1,487	0,103	10	54,61	1,423	0,084	10	53,49
9	1,214	0,021	10	49,94	1,16	0,047	10	45,39	1,350	0,076	10	51,05	1,326	0,111	10	47,02
10	1,286	0,094	10	46,76	1,126	0,074	10	41,62	1,340	0,128	10	46,16	0,861	0,117	10	26,57
11	1,194	0,095	10	42,73	1,103	0,068	10	41,14	1,292	0,115	10	45,22	0,861	0,131	10	25,36
14	1,791	0,138	5	32,32	1,731	0,275	5	25,16	1,707	0,269	5	24,90	1,117	0,254	5	12,90
16	1,792	0,144	5	32,09	1,631	0,246	5	24,26	1,699	0,285	5	24,05	1,052	0,198	5	13,90

Taula 14. Resultats P-PO4.

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)
1	0,11	10,00	1,23	0,09	10,00	0,91	0,10	10,00	1,07	0,07	10,00	0,48
4	0,44	10,00	7,18	0,38	10,00	6,02	0,47	10,00	7,66	0,43	10,00	6,87
7	0,40	5,00	3,17	0,29	5,00	2,23	0,48	5,00	3,88	0,48	5,00	3,94
8	0,45	3,33	2,45	0,29	3,33	1,47	0,57	3,33	3,16	0,57	3,33	3,13
9	0,49	2,78	2,25	0,37	2,00	1,19	0,68	2,00	2,27	0,63	2,50	2,63
10	0,38	3,33	2,02	0,37	1,67	1,19	0,71	1,67	1,98	0,12	2,00	0,30
11	0,43	5,00	3,51	0,33	5,00	2,57	0,42	5,00	3,41	0,26	5,00	1,98
14	1,11	1,25	2,37	0,68	1,25	1,43	0,80	1,25	1,69	0,50	1,67	1,37
16	1,19	1,67	3,40	0,49	1,67	1,34	0,68	1,67	1,91	0,32	1,67	0,82

Taula 15. Resultats fòsfor soluble total.

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)
1	0,048	10	1,51	0,043	10	1,35	0,08	10	2,52	0,031	10	0,97

Taula 16. Resultats fòsfor total.

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)
1	0,096	10	3,02	0,105	10	3,30	0,124	10	3,90	0,097	10	3,05

Taula 17. Resultats fòsfor orgànic dissolt.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)
1	0,28	0,44	1,45	0,49

Taula 18. Resultats fòsfor particulat.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)
1	1,51	1,95	1,39	2,10

Taula 19. Resultats alcalinitat.

	PBR1				PBR2				PBR3				PBR4			
Dia	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mg CaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mgCaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mgCa CO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mgC/L]	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mg CaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]
2	1200,00	23	1177,00	282,48	1300,00	25	1275,00	306,00	900,00	16	884,00	212,16	1200,00	0	1200,00	288,00
3	1250,00	6	1244,00	298,56	1330,00	24	1306,00	313,44	1240,00	26	1214,00	291,36	1080,00	23	1057,00	253,68
4	1040,00	6	1034,00	248,16	970,00	24	946,00	227,04	860,00	26	834,00	200,16	1060,00	23	1037,00	248,88
7	530,00	24	506,00	121,44	425,00	25	400,00	96,00	555,00	22	533,00	127,92	380,00	22	358,00	85,92
8	336,67	24	312,67	75,04	276,67	25	251,67	60,40	293,33	22	271,33	65,12	216,67	22	194,67	46,72
9	158,00	24	134,00	32,16	78,00	25	53,00	12,72	146,00	22	124,00	29,76	46,00	22	24,00	5,76
10	43,00	23	20,00	4,80	12,00	23	-11,00	0,00	32,00	23	9,00	2,16	101,00	23	78,00	18,72
11	320,00	20	300,00	72,00	295,00	20	275,00	66,00	315,00	20	295,00	70,80	260,00	20	240,00	57,60
14	1200,00	23	1177,00	282,48	1300,00	25	1275,00	306,00	900,00	16	884,00	212,16	1200,00	0	1200,00	288,00

Taula 20. Resultats Temperatura.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	T (ºC)	T (ºC)	T (ºC)	T (ºC)
3	24,2	25,5	26,2	24,8
7	26,1	25,1	26,1	27
8	26,1	26	26,1	-
9	25	25,1	25,3	25,1
10	25,1	25,3	26,1	25
11	26,3	26	26,3	25,3
14	25,4	25,2	26	25,7
16	24,9	24,8	25,2	25
18	25,6	25	24,5	25,2
Mitjana T (ºC)	25,5	25,4	25,8	25,4
Desviació	0,6	0,4	0,6	0,7

Taula 21. Resultats oxigen dissolt.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	OD (mg O_2/L)	OD (mg O_2/L)	OD (mgO_2/L)	OD (mg O_2/L)
2	10,2	11,4	17,4	12,0
3	12,2	13,5	20,0	12,4
4	10,3	16,4	20,0	15,4
7	14,6	12,3	20,0	9,6
8	15,7	15,3	20,0	10,0
9	13,8	10,0	20,0	11,0
10	7,2	8,5	12,0	4,7
11	6,7	9,0	13,4	10,1
14	6,4	8,8	10,0	8,0
16	6,5	8,4	8,8	7,2
18	10,0	8,4	9,3	8,2
Mitjana OD (mgO_2/L)	10,3	11,1	15,5	9,9
Desviació	3,4	2,9	4,8	2,9

ANNEX C.III. ASSAIG MAIG

Taula 22. Resultats terbolesa. Abreviatura: Factor de dissolució (DF).

Dia	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)	DF	Terbolesa	SSV (mg SSV/L)
1		60	139,29		102,67	174,67		62,33	141,22		62	140,94
2		110,8	181,41		125	193,19		97,4	170,30		91,6	165,49
3		206	260,36		202,4	257,38		153,2	216,58		205,2	259,70
4		198,6	254,23		198	253,73		262,6	307,30		351	380,61
7		179,2	238,14		165,83	227,05		197,8	253,56		176,4	235,82
8		179,8	238,64		157,6	220,23		185	242,95		171,2	231,50
9		170,8	231,17		132,6	199,49		169	229,68		163	224,70
10		168,2	229,02		134,83	201,35		163,6	225,20		168,6	229,35
11		200,2	255,55		131,2	198,33		160,4	222,55		233	282,75
15		257,2	302,82		93	166,65		154	217,24		292,6	332,18

Taula 23. Resultats SST i SSV.

	PBR1		PBR2		PBR3		PBR4	
Dia	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)	SST (g SST/L)	SSV (g SSV/L)
1	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,09
2	0,31	0,31	0,32	0,30	0,30	0,28	0,32	0,30
3	0,30	0,30	0,31	0,29	0,41	0,41	0,35	0,34
4	0,27	0,27	0,28	0,28	0,30	0,32	0,25	0,24
7	0,27	0,26	0,29	0,28	0,30	0,30	0,20	0,20
8	0,30	0,32	0,24	0,22	0,29	0,30	0,26	0,26
9	0,38	0,33	0,22	0,20	0,29	0,29	0,29	0,29
10	0,40	0,30	0,20	0,19	0,29	0,28	0,41	0,41

Taula 24. Resultats N-NO3. Abreviatures: Absorbància (Abs).

	PBR1				PBR2				PBR3				PBR4			
Dia	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)	Abs 220 (nm)	Abs 275 (nm)	DF	Concentració (mg N/L)
1	0,60	0,02	10	23,65	0,57	0,02	10	22,62	0,65	0,02	10	25,92	0,55	0,02	10	21,25
2	0,35	0,02	10	12,71	0,29	0,03	10	10,01	0,47	0,03	10	17,52	0,37	0,02	10	13,61
3	0,21	0,05	5	2,13	0,34	0,24	5	0	0,72	0,09	5	11,67	0,13	0,08	5	0
4	2,74	2,32	1	0	2,49	2,13	1	0	2,01	0,43	1	4,89	1,74	1,28	1	0
7	2,45	2,13	1	0	1,94	1,59	1	0	3,00	2,49	1	0	3,00	3,00	1	0
8	2,57	2,56	1	0	2,11	1,98	1	0	3,00	2,95	1	0	3,00	3,00	1	0
9	1,03	0,36	5	6,38	1,01	0,24	5	11,10	1,25	0,45	5	7,26	1,22	0,69	5	0
10	1,29	0,50	3,33	4,17	1,30	0,41	3,33	6,81	1,42	0,58	3,33	3,47	1,63	0,95	3,33	0
11	0,89	0,52	3,33	0	1,31	0,41	3,33	6,91	1,39	0,56	3,33	3,84	1,05	0,91	3,33	0

Taula 25. Resultats P-PO4.

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880 (nm)	FD	Concentració (mg P/L)
1	0,68	5	5,69	0,66	5	5,54	0,67	5	5,58	0,67	5	5,64
2	0,53	5	4,37	0,49	5	4,02	0,56	5	4,59	0,58	5	4,83
3	0,65	3,33	3,63	0,56	3,33	3,08	0,68	3,33	3,79	0,57	3,33	3,13
4	0,67	2,50	2,81	0,71	2,50	2,99	0,69	2,50	2,90	0,61	2,50	2,56
7	0,79	2	2,66	0,82	2	2,78	0,72	2	2,41	0,69	2	2,30
8	0,84	2	2,84	0,87	2	2,96	0,81	2	2,73	0,75	2	2,52
9	0,80	2	2,72	0,87	2	2,97	0,78	2	2,65	0,77	2	2,60
10	0,81	2	2,75	0,85	2	2,87	0,79	2	2,68	0,76	2	2,56
11	0,72	2	2,44	0,84	2	2,85	0,79	2	2,67	0,73	2	2,45
15	0,65	2	2,18	0,90	2	3,07	0,80	2	2,71	0,69	2	2,32

Taula 26. Resultats fòsfor soluble total.

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)
1	0,35	5	5,51	0,33	5	5,22	0,35	5	5,48	0,37	5	5,82
8	0,42	3,33	4,37	0,48	3,33	5,05	0,41	3,33	4,31	0,34	3,33	3,55

Taula 27. Resultats fòsfor total.

	PBR1			PBR2			PBR3			PBR4		
Dia	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)	Abs 880	FD	Concentració (mg P/L)
1	0,408	5	6,42	0,413	5	6,50	0,396	5	6,23	0,407	5	6,40
8	0,571	3,33	5,99	0,582	3,33	6,11	0,58	3,33	6,08	0,587	3,33	6,16

Taula 28. Resultats fòsfor orgànic dissolt.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)
1	0,000	0,000	0,000	0,187
8	1,536	2,083	1,584	1,024

Taula 29. Resultats fòsfor particulat.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)	Concentració (mg P/L)
1	0,731	0,961	0,649	0,769
8	1,616	2,091	1,491	1,324

Taula 30. Resultats alcalinitat.

	PBR1				PBR2				PBR3				PBR4			
Dia	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mg CaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mg CaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mg CaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]	Alcalinitat-M [mg CaCO3/L]	Alcalinitat-P [mg CaCO3/L]	DIC [mg CaCO3/L]	DIC [mg C/L]
1	710	20	690	165,60	890	23	867	208,08	1000	22	978	234,72	550	23	527	126,48
2	1080	19	1061	254,64	1090	25	1065	255,60	900	21	879	210,96	11500	20	1130	271,20
3	890	20	870	208,80	880	20	860	206,40	695	21	674	161,76	1230	22	1208	289,92
4	635	21	614	147,36	755	21	734	176,16	445	21	424	101,76	715	22	693	166,32
7	650	24	626	150,24	800	24	776	186,24	275	24	251	60,24	690	24	666	159,84
8	650	25	625	150,00	765	20	745	178,80	805	16	789	189,36	660	23	637	152,88
9	570	19	551	132,24	1030	22	1008	241,92	285	21	264	63,36	695	18	677	162,48
10	555	20	535	128,40	735	24	711	170,64	250	22	228	54,72	640	22	618	148,32
11	350	20	330	79,20	715	22	693	166,32	572	26	546	131,04	445	21	424	101,76
15	155	20	135	32,40	880	22	858	205,92	240	26	214	51,36	215	21	194	46,56

Taula 31. Resultats Temperatura.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	T (ºC)	T (ºC)	T (ºC)	T (ºC)
2	28,0	29,6	28,1	27,3
3	28,3	29,8	28,9	28,3
4	33,3	35,1	31,7	31,8
7	30,9	32,2	30,0	29,9
8	31,0	32,5	30,4	30,8
9	30,5	32,0	30,6	30,7
10	30,3	31,3	29,0	29,2
11	30,4	32,4	30,7	30,2
15	29,0	30,1	28,6	29,4
Mitjana T (ºC)	30,2	31,7	29,8	29,7
Desviació	1,2	1,5	1,0	1,0

Taula 32. Resultats oxigen dissolt.

	PBR1	PBR2	PBR3	PBR4
Dia	OD (mg O_2/L)	OD (mg O_2/L)	OD (mg O_2/L)	OD (mg O_2/L)
2	15,30	20,00	19,70	17,30
3	20,00	12,90	17,00	11,20
4	5,10	5,10	20,00	4,30
7	6,40	5,20	6,30	5,10
8	6,50	5,30	5,40	5,60
9	5,40	4,40	4,50	6,00
10	7,10	5,00	5,60	10,90
11	18,00	5,20	5,50	17,40
15	6,30	5,10	7,10	8,50
Mitjana OD (mg O_2/L)	10,01	7,58	10,1	9,59
Desviació	6,0	5,3	6,7	5,04

ANNEX C. IV. RESULTATS AVALUACIÓ MODEL CINÈTIC

ANNEX C. IV. I. Assaig març

Taula 33. Càlculs estadístics dels SSV dels PBR1 i PBR2. Abreviatures: suma dels erros al quadrat (SSE); suma dels tractaments al quadrat (SST[1]); arrel de l'error quadràtic mitjà (NRMSE); sumatori (SUM).

SSV										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	0,17	0,22	0,00	0,10	0,26	0,22	0,22	0,00	0,14	0,03
3	0,31	0,26	0,00	0,03	0,16	0,27	0,26	0,00	0,10	0,03
4	0,40	0,29	0,01	0,01	0,26	0,39	0,29	0,01	0,04	0,25
7	0,45	0,40	0,00	0,00	0,12	0,61	0,40	0,04	0,00	0,34
8	0,61	0,44	0,03	0,01	0,27	0,73	0,44	0,08	0,02	0,39
9	0,61	0,49	0,01	0,02	0,20	0,79	0,49	0,09	0,04	0,39
10	0,55	0,53	0,00	0,00	0,03	0,76	0,53	0,05	0,03	0,30
11	0,68	0,57	0,01	0,04	0,15	0,78	0,57	0,04	0,03	0,26
14	0,59	0,70	0,01	0,01	0,19	0,79	0,70	0,01	0,04	0,12
		SUM	0,08	0,22			SUM	0,33	0,44	
				R^2	0,62				R^2	0,25
				NRMSE	0,20				NRMSE	0,32
				Mitjana de l'error relatiu	0,18				Mitjana de l'error relatiu	0,23
				Desviació de la mitjana	0,08				Desviació de la mitjana	0,14

Taula 34. Càlculs estadístics dels SSV dels PBR3 i PBR4.

SSV										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	0,22	0,22	0,00	0,10	0,03	0,25	0,22	0,00	0,11	0,13
3	0,29	0,26	0,00	0,06	0,11	0,27	0,26	0,00	0,10	0,01
4	0,30	0,29	0,00	0,06	0,02	0,24	0,29	0,00	0,11	0,20
7	0,55	0,40	0,02	0,00	0,27	0,58	0,40	0,03	0,00	0,31
8	0,59	0,44	0,02	0,00	0,24	0,67	0,44	0,05	0,01	0,34
9	0,68	0,49	0,04	0,02	0,28	0,72	0,49	0,05	0,02	0,32
10	0,71	0,53	0,03	0,03	0,25	0,80	0,53	0,07	0,05	0,34
11	0,75	0,57	0,03	0,04	0,23	0,79	0,57	0,05	0,05	0,27
14	0,76	0,70	0,00	0,05	0,08	0,87	0,70	0,03	0,08	0,19
		SUM	0,14	0,36			SUM	0,29	0,52	
				R^2	0,60				R^2	0,45
				NRMSE	0,24				NRMSE	0,31
				Mitjana de l'error relatiu	0,17				Mitjana de l'error relatiu	0,23
				Desviació de la mitjana	0,11				Desviació de la mitjana	0,11

Taula 35. Càlculs estadístics N-NO3 dels PBR1 i PBR2.

N-NO3										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	122,48	121,99	0,24	2047,64	0,00	122,80	121,99	0,66	2196,20	0,01
2	106,94	103,13	3,81	882,46	0,04	117,55	103,13	14,42	1731,45	0,12
3	105,22	98,35	6,87	783,50	0,07	105,11	98,35	6,77	851,18	0,06
4	104,58	93,88	10,70	747,90	0,10	100,18	93,88	6,30	587,75	0,06
7	60,87	74,14	13,27	267,63	0,22	57,53	74,14	16,62	339,03	0,29
8	55,55	65,56	10,01	469,88	0,18	52,12	65,56	13,44	567,20	0,26
9	49,94	56,72	6,78	744,97	0,14	45,39	56,72	11,33	933,21	0,25
10	46,76	47,83	0,04	928,26	0,02	41,62	47,83	0,05	1178,00	0,15
11	42,73	39,17	0,04	1190,13	0,08	41,14	39,17	0,06	1210,60	0,05
		SUM	51,76	8062,37			SUM	69,64	9594,63	
				R^2	0,99				R^2	0,99
				NRMSE	0,03				NRMSE	0,04
				Mitjana de l'error relatiu	0,09				Mitjana de l'error relatiu	0,14
				Desviació de la mitjana	0,07				Desviació de la mitjana	0,10

Taula 36. Càlculs estadístics dels N-NO3 dels PBR3 i PBR4.

N-NO3										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	121,41	121,99	0,34	1764,32	0,00	122,80	121,99	0,66	2290,53	0,01
2	114,55	103,13	11,42	1235,01	0,10	118,09	103,13	14,96	1861,28	0,13
3	111,12	98,35	12,77	1005,66	0,11	115,51	98,35	17,16	1645,89	0,15
4	109,19	93,88	15,31	887,00	0,14	109,62	93,88	15,74	1202,24	0,14
7	61,34	74,14	12,80	326,26	0,21	56,02	74,14	18,12	357,89	0,32
8	54,61	65,56	10,95	614,80	0,20	53,49	65,56	12,07	460,02	0,23
9	51,05	56,72	5,67	803,97	0,11	47,02	56,72	9,70	779,70	0,21
10	46,16	47,83	0,05	1105,08	0,04	26,57	47,83	0,07	2340,40	0,80
11	45,22	39,17	0,06	1168,70	0,13	25,36	39,17	0,08	2458,01	0,54
		SUM	69,36	8910,79			SUM	88,54	13395,96	
				R^2	0,99				R^2	0,99
				NRMSE	0,03				NRMSE	0,04
				Mitjana de l'error relatiu	0,12				Mitjana de l'error relatiu	0,28
				Desviació de la mitjana	0,07				Desviació de la mitjana	0,25

Taula 37. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR1 i PBR2.

P-PO4										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (g P-PO4/L)	Model (g P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	1,23	1,00	0,05	3,55	0,19	0,91	1,00	0,01	1,73	0,10
4	7,18	6,08	1,19	16,50	0,15	6,02	6,08	0,00	14,39	0,01
7	3,17	4,16	0,99	0,00	0,31	2,23	4,16	3,76	0,00	0,87
8	2,45	3,39	0,88	0,44	0,38	1,47	3,39	3,71	0,58	1,31
9	2,25	2,65	0,17	0,75	0,18	1,19	2,65	2,14	1,07	1,23
10	2,02	1,98	0,00	1,20	0,02	1,19	1,98	0,61	1,06	0,66
11	3,51	3,18	0,11	0,16	0,09	2,57	3,18	0,36	0,12	0,23
		SUM	3,40	22,61			SUM	10,60	18,96	
				R^2	0,85				R^2	0,44
				NRMSE	0,22				NRMSE	0,55
				Mitjana de l'error relatiu	0,19				Mitjana de l'error relatiu	0,63
				Desviació de la mitjana	0,12				Desviació de la mitjana	0,53

Taula 38. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR3 i PBR4.

P-PO4										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	1,07	1,00	0,00	5,19	0,06	0,48	1,00	0,27	5,20	1,08
4	7,66	6,08	2,47	18,58	0,21	6,87	6,08	0,62	16,92	0,11
7	3,88	4,16	0,08	0,29	0,07	3,94	4,16	0,05	1,38	0,06
8	3,16	3,39	0,05	0,04	0,07	3,13	3,39	0,07	0,14	0,08
9	2,27	2,65	0,14	1,15	0,17	2,63	2,65	0,00	0,02	0,01
10	1,98	1,98	0,00	1,87	0,00	0,30	1,98	2,80	6,04	5,53
11	3,41	3,18	0,05	0,00	0,07	1,98	3,18	1,44	0,61	0,61
		SUM	2,81	27,12			SUM	5,26	30,30	
				R^2	0,90				R^2	0,83
				NRMSE	0,19				NRMSE	0,31
				Mitjana de l'error relatiu	0,09				Mitjana de l'error relatiu	1,07
				Desviació de la mitjana	0,07				Desviació de la mitjana	2,01

Taula 39. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR1 i PBR2.

Alcalinitat										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
2	282,48	291,90	88,74	22025,20	0,03	306,00	291,90	198,81	33751,41	0,05
3	298,56	256,36	1780,84	27056,59	0,14	313,44	256,36	3258,13	36540,45	0,18
4	248,16	228,63	381,42	13016,27	0,08	227,04	228,63	2,53	10973,73	0,01
7	121,44	132,95	132,48	159,54	0,09	96,00	132,95	1365,30	690,87	0,38
8	75,04	93,68	347,56	3484,67	0,25	60,40	93,68	1107,76	3829,68	0,55
9	32,16	55,35	537,73	10385,87	0,72	12,72	55,35	1817,23	12004,37	3,35
10	4,80	23,52	350,48	16711,02	3,90	-2,64	23,52	684,40	15606,12	9,91
11	72,00	98,02	676,99	3852,82	0,36	66,00	98,02	1025,22	3167,94	0,49
14	72,00	4,47	4560,40	3852,82	0,94	21,60	4,47	293,46	10137,36	0,79
		SUM	8856,63	100544,82			SUM	9752,83	126701,92	
				R^2	0,91				R^2	0,92
				NRMSE	0,23				NRMSE	0,27
				Mitjana de l'error relatiu	0,72				Mitjana de l'error relatiu	1,75
				Desviació de la mitjana	1,23				Desviació de la mitjana	3,23

Taula 40. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR3 i PBR4.

Alcalinitat										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
2	212,16	291,90	6358,47	10137,36	0,38	288	291,90	15,21	30988,52	0,01
3	291,36	256,36	1225,00	32358,41	0,12	253,68	256,36	7,18	20083,30	0,01
4	200,16	228,63	810,54	7864,93	0,14	248,88	228,63	410,06	18745,87	0,08
7	127,92	132,95	25,30	270,42	0,04	85,92	132,95	2211,82	678,31	0,55
8	65,12	93,68	815,84	2148,84	0,44	46,72	93,68	2205,52	4256,84	1,01
9	29,76	55,35	654,80	6677,43	0,86	5,76	55,35	2459,07	11279,38	8,61
10	2,16	23,52	456,29	11949,89	9,89	18,72	23,52	23,05	8694,53	0,26
11	70,80	98,02	740,87	1654,50	0,38	57,6	98,02	1633,70	2955,49	0,70
14	3,84	4,47	0,40	11585,41	0,16	2,4	4,47	4,28	12004,37	0,86
		SUM	11087,51	84647,20			SUM	8969,90	109686,61	
				R^2	0,87				R^2	0,92
				NRMSE	0,31				NRMSE	0,28
				Mitjana de l'error relatiu	1,38				Mitjana de l'error relatiu	1,34
				Desviació de la mitjana	3,20				Desviació de la mitjana	2,75

ANNEX C. IV. II. Assaig maig

Taula 41.Càlculs estadístics dels SSV dels PBR1 i PBR2.

SSV										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (g SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	0,09	0,10	0,00	0,04	0,17	0,08	0,10	0,00	0,02	0,20
3	0,31	0,16	0,02	0,00	0,49	0,30	0,16	0,02	0,00	0,47
4	0,30	0,19	0,01	0,00	0,36	0,29	0,19	0,01	0,00	0,35
7	0,27	0,29	0,00	0,00	0,05	0,28	0,29	0,00	0,00	0,02
8	0,26	0,32	0,00	0,00	0,22	0,28	0,32	0,00	0,00	0,13
9	0,32	0,36	0,00	0,00	0,11	0,22	0,36	0,02	0,00	0,64
10	0,33	0,39	0,00	0,00	0,17	0,20	0,39	0,03	0,00	0,91
11	0,30	0,42	0,01	0,00	0,41	0,19	0,42	0,05	0,00	1,19
		SUM	0,06	0,04			SUM	0,14	0,04	
				R^2	-0,33				R^2	-2,61
				NRMSE	0,31				NRMSE	0,57
				Mitjana de l'error relatiu	0,25				Mitjana de l'error relatiu	0,49
				Desviació de la mitjana	0,15				Desviació de la mitjana	0,40

Taula 42. Càlculs estadístics dels SSV dels PBR3 i PBR4.

SSV										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (g SSV/L)	Model (mg SSV/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	0,08	0,10	0,00	0,04	0,20	0,09	0,10	0,00	0,03	0,17
3	0,28	0,16	0,02	0,00	0,44	0,30	0,16	0,02	0,00	0,47
4	0,41	0,19	0,05	0,01	0,54	0,34	0,19	0,02	0,01	0,44
7	0,32	0,29	0,00	0,00	0,10	0,24	0,29	0,00	0,00	0,21
8	0,30	0,32	0,00	0,00	0,06	0,20	0,32	0,02	0,00	0,62
9	0,30	0,36	0,00	0,00	0,17	0,26	0,36	0,01	0,00	0,38
10	0,29	0,39	0,01	0,00	0,33	0,29	0,39	0,01	0,00	0,33
11	0,28	0,42	0,02	0,00	0,48	0,41	0,42	0,00	0,02	0,02
		SUM	0,10	0,06			SUM	0,08	0,07	
				R^2	-0,66				R^2	-0,17
				NRMSE	0,38				NRMSE	0,37
				Mitjana de l'error relatiu	0,29				Mitjana de l'error relatiu	0,33
				Desviació de la mitjana	0,18				Desviació de la mitjana	0,19

Taula 43. Càlculs estadístics dels N-NO3 dels PBR1 i PBR2.

N-NO3										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	23,65	26,10	6,00	331,24	0,10	22,62	26,10	12,11	263,63	0,15
2	12,71	21,04	8,32	52,78	0,65	10,01	21,04	11,02	13,17	1,10
3	2,13	16,15	14,02	10,99	6,57	0,00	16,15	16,15	40,75	-
4	0,00	11,40	11,40	29,69	-	0,00	11,40	11,40	40,75	-
7	0,00	1,01	1,01	29,69	-	0,00	1,01	1,01	40,75	-
8	0,00	0,16	0,16	29,69	-	0,00	0,16	0,16	40,75	-
9	6,38	0,01	6,37	0,86	1,00	11,10	0,01	11,08	22,20	1,00
10	4,17	0,00	0,29	1,64	1,00	6,81	0,00	0,39	0,18	1,00
11	0,00	0,00	0,39	29,69	-	6,91	0,00	0,48	0,28	1,00
		SUM	47,96	516,30			SUM	63,80	462,46	
				R^2	0,91				R^2	0,86
				NRMSE	0,42				NRMSE	0,42
				Mitjana de l'error relatiu	1,87				Mitjana de l'error relatiu	0,85
				Desviació de la mitjana	2,66				Desviació de la mitjana	188,45

Taula 44. Càlculs estadístics dels N-NO3 dels PBR3 i PBR4.

N-NO3										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg N-NO3/L)	Model (mg N-NO3/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	25,92	26,10	0,03	311,07	0,01	21,25	26,10	23,54	301,86	0,23
2	17,52	21,04	3,52	85,24	0,20	13,61	21,04	7,42	94,89	0,55
3	11,67	16,15	4,47	11,49	0,38	0	16,15	16,15	15,01	-
4	4,89	11,40	6,51	11,55	1,33	0	11,40	11,40	15,01	-
7	0,00	1,01	1,01	68,64	-	0	1,01	1,01	15,01	-
8	0,00	0,16	0,16	68,64	-	0	0,16	0,16	15,01	-
9	7,26	0,01	7,25	1,05	1,00	0	0,01	0,01	15,01	-
10	3,47	0,00	0,14	23,22	1,00	0	0,00	0,37	15,01	-
11	3,84	0,00	0,22	19,77	1,00	0	0,00	0,34	15,01	-
		SUM	23,31	600,67			SUM	60,40	501,79	
				R^2	0,96				R^2	0,88
				NRMSE	0,19				NRMSE	0,67
				Mitjana de l'error relatiu	0,70				Mitjana de l'error relatiu	0,39
				Desviació de la mitjana	212,12				Desviació de la mitjana	0,22

Taula 45. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR1 i PBR2.

P-PO4										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	5,69	5,70	0,00	6,15	0,00	5,54	5,70	0,03	4,95	0,03
2	4,37	5,44	1,14	1,35	0,24	4,02	5,44	2,03	0,49	0,36
3	3,63	5,12	2,20	0,18	0,41	3,08	5,12	4,14	0,05	0,66
4	2,81	4,73	3,70	0,16	0,68	2,99	4,73	3,03	0,10	0,58
7	2,66	3,35	0,47	0,30	0,26	2,78	3,35	0,32	0,28	0,20
8	2,84	2,85	0,00	0,14	0,01	2,96	2,85	0,01	0,12	0,04
9	2,72	2,38	0,12	0,24	0,13	2,97	2,38	0,36	0,12	0,20
10	2,75	1,93	0,67	0,21	0,30	2,87	1,93	0,88	0,20	0,33
11	2,44	1,53	0,82	0,59	0,37	2,85	1,53	1,74	0,22	0,46
15	2,18	0,47	2,93	1,06	0,79	3,07	0,47	6,77	0,06	0,85
		SUM	12,05	10,39			SUM	19,30	6,59	
				R^2	-0,16				R^2	-1,93
				NRMSE	0,34				NRMSE	0,42
				Mitjana de l'error relatiu	0,32				Mitjana de l'error relatiu	0,37
				Desviació de la mitjana	0,26				Desviació de la mitjana	0,27

Taula 46. Càlculs estadístics dels P-PO4 dels PBR3 i PBR4.

P-PO4										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg P-PO4/L)	Model (mg P-PO4/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	5,58	5,70	0,01	5,34	0,02	5,64	5,70	0,00	6,47	0,01
2	4,59	5,44	0,72	1,75	0,18	4,83	5,44	0,37	3,04	0,13
3	3,79	5,12	1,75	0,27	0,35	3,13	5,12	3,93	0,00	0,63
4	2,90	4,73	3,35	0,14	0,63	2,56	4,73	4,72	0,28	0,85
7	2,41	3,35	0,87	0,74	0,39	2,30	3,35	1,09	0,63	0,45
8	2,73	2,85	0,02	0,30	0,05	2,52	2,85	0,11	0,33	0,13
9	2,65	2,38	0,08	0,38	0,10	2,60	2,38	0,05	0,25	0,08
10	2,68	1,93	0,56	0,35	0,28	2,56	1,93	0,40	0,28	0,25
11	2,67	1,53	1,30	0,36	0,43	2,45	1,53	0,84	0,41	0,37
15	2,71	0,47	5,03	0,32	0,83	2,32	0,47	3,44	0,59	0,80
		SUM	13,67	9,94			SUM	14,95	12,27	
				R^2	-0,38				R^2	-0,22
				NRMSE	0,36				NRMSE	0,40
				Mitjana de l'error relatiu	0,33				Mitjana de l'error relatiu	0,37
				Desviació de la mitjana	0,26				Desviació de la mitjana	0,30

Taula 47. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR1 i PBR2.

Alcalinitat										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	165,60	288,00	14981,50	428,99	0,74	208,08	288,00	6387,04	71,77	0,38
2	254,64	267,33	160,92	12045,50	0,05	255,60	267,33	137,48	3135,10	0,05
3	208,80	241,23	1051,64	4084,74	0,16	206,40	241,23	1213,06	46,13	0,17
4	147,36	213,18	4331,65	6,11	0,45	176,16	213,18	1370,13	549,81	0,21
7	150,24	122,65	761,33	28,64	0,18	186,24	122,65	4043,98	178,70	0,34
8	150,00	92,68	3285,13	26,13	0,38	178,80	92,68	7415,98	432,97	0,48
9	132,24	64,65	4568,90	159,97	0,51	241,92	64,65	31425,94	1790,31	0,73
10	128,40	39,78	7852,71	271,85	0,69	170,64	39,78	17123,16	839,15	0,77
11	79,20	20,00	3504,65	4314,91	0,75	166,32	20,00	21409,57	1108,09	0,88
15	32,40	1,33	965,28	12653,55	0,96	205,92	1,33	41856,66	39,84	0,99
		SUM	41463,72	34020,41			SUM	132383,00	8191,88	
				R^2	-0,22				R^2	-15,16
				NRMSE	0,44				NRMSE	0,58
				Mitjana de l'error relatiu	0,49				Mitjana de l'error relatiu	0,50
				Desviació de la mitjana	0,30				Desviació de la mitjana	0,33

Taula 48. Càlculs estadístics alcalinitat dels PBR3 i PBR4.

Alcalinitat										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg C/L)	Model (mg C/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
2	234,72	288,00	2838,65	11835,70	0,23	126,48	288,00	26088,37	1302,92	1,28
3	210,96	267,33	3177,06	7230,44	0,27	271,20	267,33	15,01	11799,17	0,01
4	161,76	241,23	6315,32	1283,93	0,49	289,92	241,23	2370,81	16216,49	0,17
7	101,76	213,18	12413,36	584,09	1,09	166,32	213,18	2195,42	14,02	0,28
8	60,24	122,65	3894,73	4314,91	1,04	159,84	122,65	1383,26	7,49	0,23
9	189,36	92,68	9346,26	4023,62	0,51	152,88	92,68	3623,57	94,01	0,39
10	63,36	64,65	1,65	3914,75	0,02	162,48	64,65	9571,42	0,01	0,60
11	54,72	39,78	223,07	5070,58	0,27	148,32	39,78	11779,96	203,23	0,73
14	131,04	20,00	12329,90	26,13	0,85	101,76	20,00	6684,71	3698,59	0,80
		SUM	53042,90	43844,55			SUM	65758,19	46795,65	
				R^2	-0,21				R^2	-0,41
				NRMSE	0,58				NRMSE	0,50
				Mitjana de l'error relatiu	0,57				Mitjana de l'error relatiu	0,55
				Desviació de la mitjana	0,39				Desviació de la mitjana	0,40

Taula 49. Càlculs estadístics glucogen dels PBR1 I PBR2.

Glucogen										
	PBR1					PBR2				
Dia	Experimental (mg glucogen/L)	Model (mg glucogen/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg glucogen/L)	Model (mg glucogen/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	7,26	0,00	52,67	22,26	1,00	5,97	0,00	35,64	87,97	1,00
8	5,97	18,86	166,25	36,06	2,16	4,22	18,86	214,31	123,76	3,47
17	16,40	75,32	3472,47	19,53	3,59	35,85	75,32	1557,87	420,40	1,10
20	18,28	94,36	5787,59	39,74	4,16	-	-	-	-	-
		SUM	9478,98	117,59			SUM	1807,82	632,13	
				R^2	-79,61				R^2	-1,86
				NRMSE	4,06				NRMSE	1,60
				Mitjana de l'error relatiu	2,73				Mitjana de l'error relatiu	1,86
				Desviació de la mitjana	1,43				Desviació de la mitjana	1,40

Taula 50. Càlculs estadístics glucogen dels PBR3 I PBR4.

Glucogen										
	PBR3					PBR4				
Dia	Experimental (mg glucogen/L)	Model (mg glucogen/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu	Experimental (mg glucogen/L)	Model (mg glucogen/L)	SSE	SST[1]	Error relatiu
1	5,97	0,00	35,64	24,31	1,00	5,97	0,00	35,64	70,39	1,00
8	4,85	18,86	196,26	36,55	2,89	4,22	18,86	214,31	102,72	3,47
17	14,46	75,32	3704,09	12,68	4,21	35,85	75,32	1557,87	461,95	1,10
20	18,31	94,36	5782,21	54,97	4,15	11,39	94,36	6882,97	8,81	7,28
		SUM	9718,19	128,51			SUM	8690,78	643,87	
				R^2	-74,62				R^2	-12,50
				NRMSE	4,52				NRMSE	3,25
				Mitjana de l'error relatiu	3,06				Mitjana de l'error relatiu	3,21
				Desviació de la mitjana	1,50				Desviació de la mitjana	2,94