

*Treballs de Recerca
Grup BioremUAB*

Biodegradació de contaminants industrials i valorització de residus

Dra. Teresa Vicent Huguet (teresa.vicent@uab.cat)

*Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental
Universitat Autònoma de Barcelona*

*Càtedra FACSA
Universitat Jaume I
Castelló de la Plana, abril 2017*

Línies de recerca:

- Tractament de depuració d'efluents
 - Fongs: biodegradació de microcontaminants
 - Colorants
 - Contaminants emergents
 - Microalgues
- Bioremediació aeròbia en sòls i llots
 - Fongs
 - Degradació de HAPs
 - Degradació de contaminants emergents
- Valorització de residus: metanització
- Bioremediació anaeròbia d'organoclorats en aqüífers
 - Bacteris dehalorespiradors

Tratamiento biológico de aguas residuales industriales

- **Antecedentes: Digestión Anaerobia de aguas residuales biodegradables**
- **Finals años 80: tratamiento biológico de efluentes industriales “tóxicos” ?**

HONGOS?



➤ **Que hongos ?**

➤ **Que sabíamos de ellos en 1990? Muy poco!**

Se estima que existen mas de 1,5 millones de especies de hongos y se han descrito menos de 100000.

Los hongos se han definido como eucariotas, heterótrofos, que típicamente desarrollan un cuerpo ramificado (hifas) con propiedades absorptivas, ... tubular que está adaptado para entornos heterogéneos.

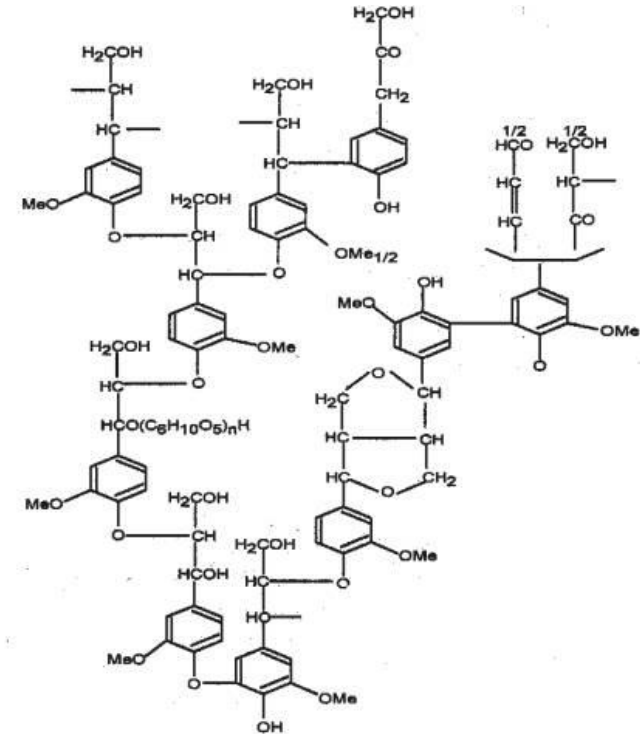
➤ Los hongos white-rot: crecen sobre la madera y degradan la lignina



Phanerochaete chrysosporium



Trametes versicolor



➤ Sistema enzimático no específico:

Extracelular {

- Lacasa
- Peroxidasas: LiP, MnP, VP

Intracelular → ▪ Citocromo P450

Biodegradar contaminantes xenobióticos y recalcitrantes



Irpex lacteus

Process for the decolorization of pulp mill bleach plant effluent

Patent number: 4420369

Filed: February 25, 1982

Issued: December 13, 1983

Assignee: The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture

Inventors: David C. Eaton, [Thomas K. Kirk](#), Hou-min Chang

Process of degrading chloro-organics by white-rot fungi US 4554075 A

Número de sol·licitud	US 06/614,980
Data de publicació	19 Nov. 1985
Data de presentació	29 Maig 1984
Data de prioritat	29 Maig 1984
Estat de la taxa	Pagades
Inventors	Hou-Min Chang , Thomas W. Joyce , Thomas K. Kirk , Van-Ba Huynh
Cessionari original	North Carolina State University

Efluentes líquidos: lejías negras de papelera y alpechin

Lejías negras : *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*

Antecedentes: Kirk, trabajos publicados y patentes

Efluentes: lejías negras de papelera (en esteril)



decoloración

detoxificación

contenido en fenoles



Seguimiento enzimático



OBJETIVO

Producción de biomasa fúngica: morfología en función de la aplicación-reactor

REACTORES



Tanque agitado: micelio,
crecimiento disperso



Problemas operacionales



Fotografía 2.6.1: Reactor LIFX amb el fong immobilitzat tractant medi amb lleixius negres.

Lecho fijo:
Hongo inmovilizado



Problemas operacionales



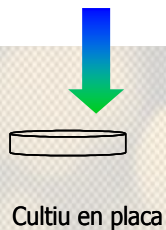
Lecho fluidizado:
Pellets



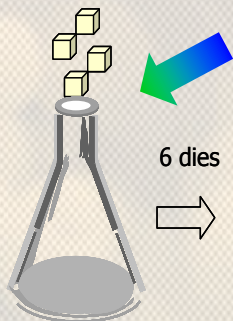
Todos los hongos
forman pellets?

PRODUCCIÓN DE PELETS (escala Erlenmeier)

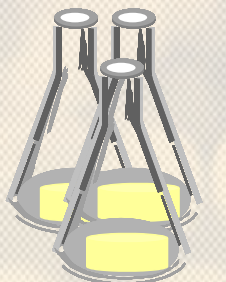
**Medio agar (15g/L)
Extracto de malta
(20 g/L).**



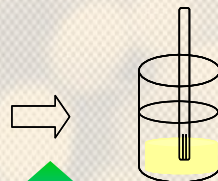
7 dies



6 dies



**150 mL de extracto de
malta de 20 g/L a pH
4,5.**



**Separar el
micelio**



**75 mL de
solució stock
de micelio**

inòcul

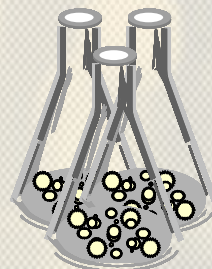
1 mL

5 dies



**250 mL de
extracto
de malta
de 20 g/L
a pH 4,5.**

**135 rpm
durante 5 dias
y a 25 °C.**



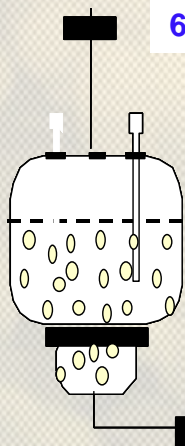
Solució stock de pèl·lets
NaCl 0.8% 1:1 (v/v)

**40 g pellets (peso
humedo)
Aprox
Peso humedo/peso
seco = 26**

Inoculació del reactor

**40 g pellets (peso
humedo)/L=1,5 g DCW/L**

**135 rpm durante
6 dias y a 25 °C.**



Morfología-crecimiento mas adecuado?

A partir de los resultados anteriores seleccionamos:
el hongo *Trametes versicolor* para el tratamiento de efluentes

- por su facilidad en formar pellets
- la agitación, en cultivos sumergidos, no afecta a la producción enzimática



Reactor con pellets de *T versicolor* fluidizados por pulsos de aire

Productor de enzimas extracelulares: **MnP** y **Lacasa**



1

2

3

- 1: Efluente inicial
- 2: Efluente final
- 3: Efluente + Pellets final

Eliminación de color (80%) de lejas negras de papelera con *Trametes versicolor*

➤ **Objetivo: demostrar la relación entre tratamiento (condiciones estériles) y producción enzimática**

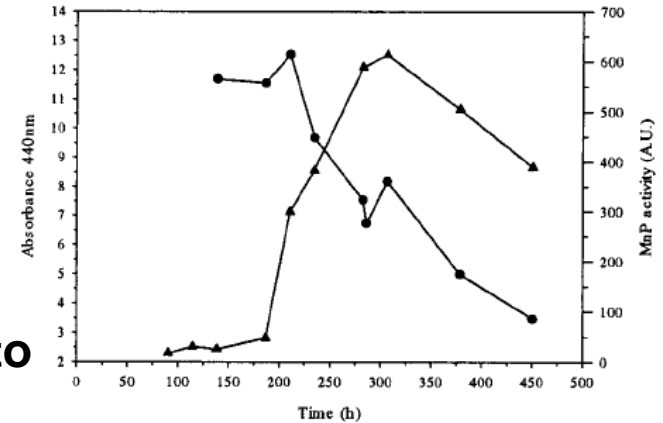


Figure 1. Evolution of color concentration (●) and MnP activity (▲).

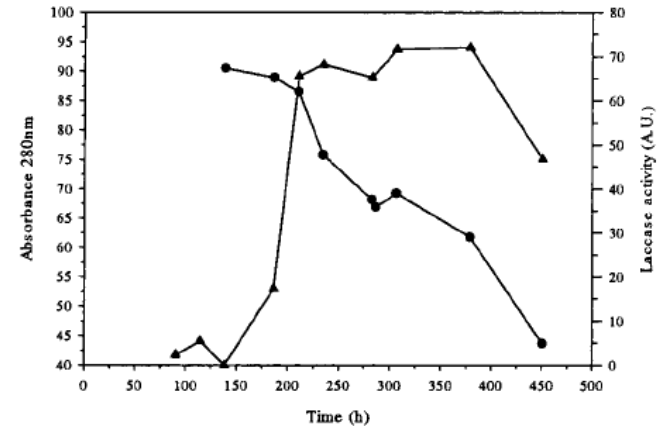


Figure 2. Evolution of aromatic compounds concentration (●) and Laccase activity (▲).

6Environmental Technology, Vol. 14, pp 681-687
© Publications Division Selper Ltd., 1993

DETOXIFICATION PRETREATMENT OF BLACK LIQUOR DERIVED FROM NON-WOOD FEEDSTOCK WITH WHITE-ROT FUNGI

FONT SEGURA, GABARRELL DURANY, RAMOS LOZANO AND VICENT HUGUET

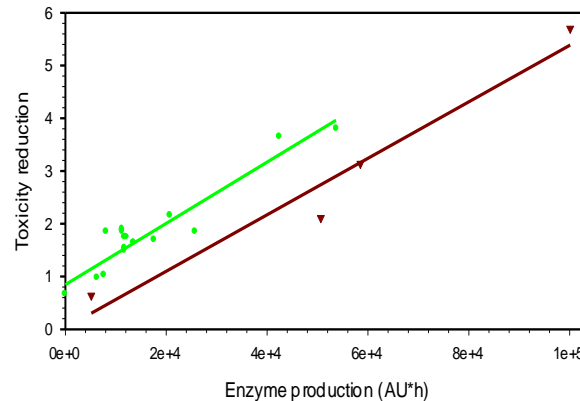
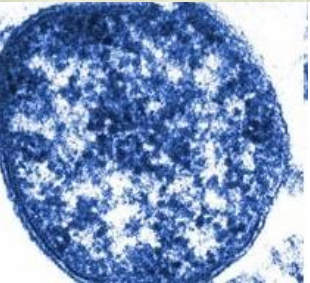
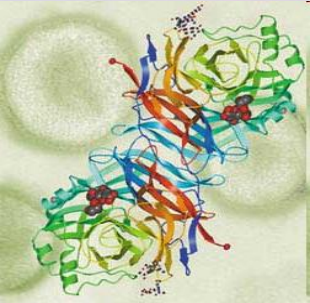
660

Biotechnol. Prog. 2002, 18, 660-662

Olive Oil Mill Waste Waters Decoloration and Detoxification in a Bioreactor by the White Rot Fungus *Phanerochaete flavidio-alba*

P. Blánquez,^{*,†} G. Caminal[‡], M. Sarrà[†], M. T. Vicent[†], and X. Gabarrell[†]

Detoxificación de lejías negras por *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado y pellets de *Trametes versicolor*



Correlación entre enzima extracelular y detoxificación

$$\text{Detoxification} = A_{\text{MnP}} * 6\text{E-}05 + 0.8475$$

$$\text{Detoxification} = A_{\text{laccase}} * 5.35\text{E-}5 + 0.0278$$

A_{enzyme} denotes the amount of enzyme produced (AU*h) at the time when detoxification was calculated.

Ph chrysosporium:

Relación C/N para producción de MnP

T versicolor:

Relación C/N para producción de Lacasa

Pero NO correlación entre eliminación de color y producción enzimática



➤ Enzimas extracelulares

- **En que tipo de reacciones intervienen?**

Oxidación, hidroxilación, etc

- **Como atacan a las moléculas?**

Polimerización, despolimerización, rotura de enlaces, rotura de anillos aromáticos, etc...

➤ **Objetivo: Estudio de la degradación de moléculas y enzimas que intervienen**

- **Estudios de degradación de colorantes textiles**

- **Estudios de degradación de disolventes clorados**

- **Estudios de degradación de HAP**

- **Estudios de degradación de contaminantes emergentes**

Las aguas procedentes de la industria textil se caracterizan:

- Variedad de colorantes utilizados
- Los colorantes son estructuras complejas poco biodegradables y muy estables

Hoy en día, aún no se ha desarrollado un tratamiento biológico universal de depuración de aguas residuales textiles.

En las EDAR los colorantes se adsorben sobre la biomasa causando problemas.

El estudio de nuevos tratamientos biológicos para estos efluentes es una opción interesante.



Pelets de *T versicolor* + colorante Gris Lanaset G

Tratamiento en discontinuo

En los experimentos realizados se han conseguido rendimientos de eliminación del color de hasta el 90%:



t inicial

t final

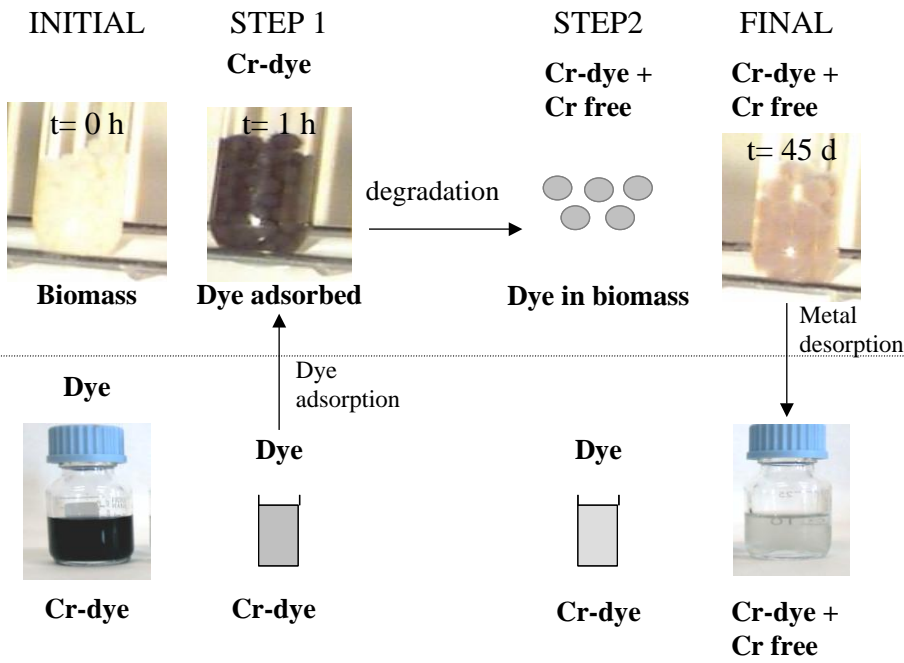
¿Cual es el mecanismo de eliminación del colorante?:

- bioadsorción
- biotransformación

MECANISMO DE DEGRADACIÓN DEL COLOR

S
O
L
I
D
P
H
A
S
E

L
I
Q
U
I
D
P
H
A
S
E



Se ha determinado la capacidad del hongo ligninolítico para degradar el colorante Gris Lanaset G (Mezcla de colorantes metálicos de estructura y composición no disponible)



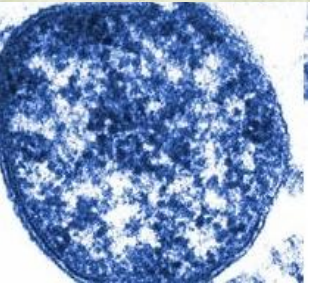
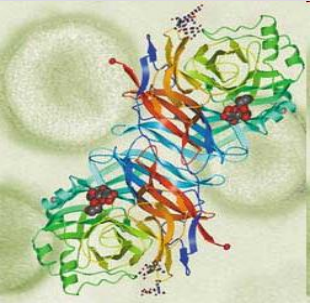
Water Research 38 (2004) 2166–2172



Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*

P. Blánquez^a, N. Casas^a, X. Font^c, X. Gabarrell^a, M. Sarrà^a, G. Caminal^b, T. Vicent^{a,*}





➤ **Mecanismo de degradación de colorantes por los hongos ligninolíticos:**

- ✓ 1ra etapa: adsorción en la biomasa del hongo
- ✓ 2ª etapa: degradación intracelular

En este caso gracias al metal podemos demostrar que la degradación tiene lugar en el interior del hongo , o al menos parte de ella.



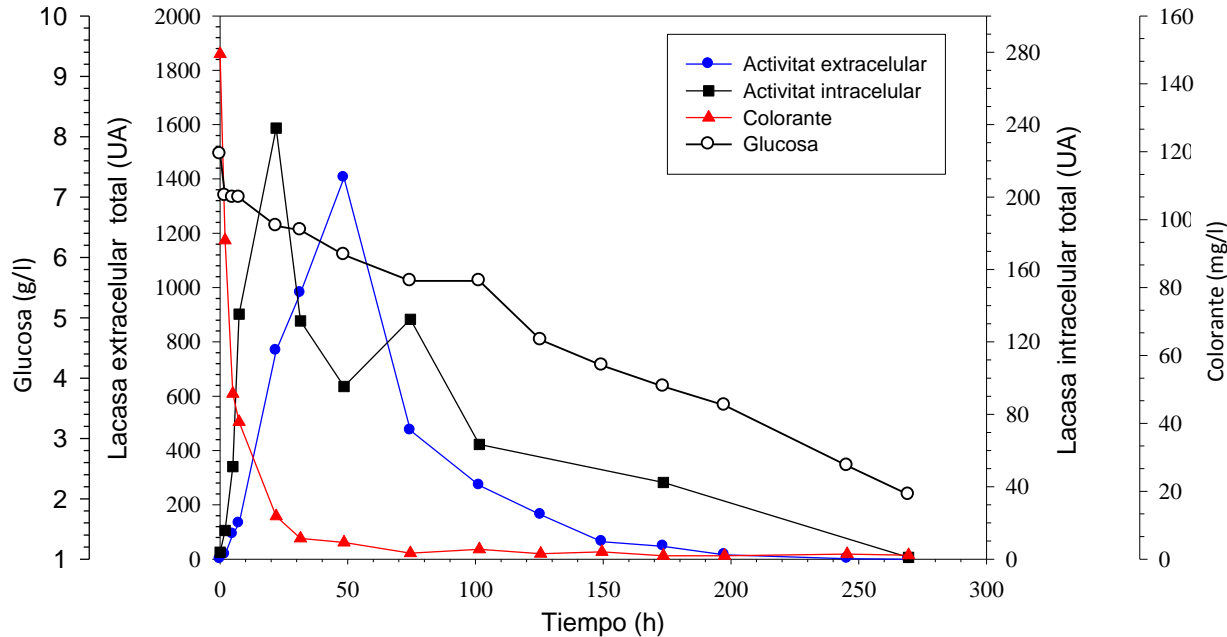
Cual es el papel del enzima extracelular?

es la enzima extracelular que estamos midiendo (lacasa) la responsable de la degradación?

DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES

DEGRADACIÓN DEL COLORANTE GRIS LANASET G CON *TRAMETES VERSICOLOR*

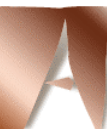
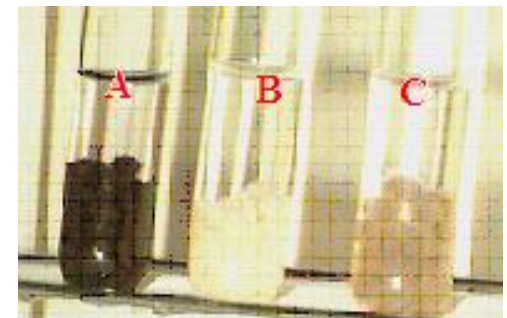
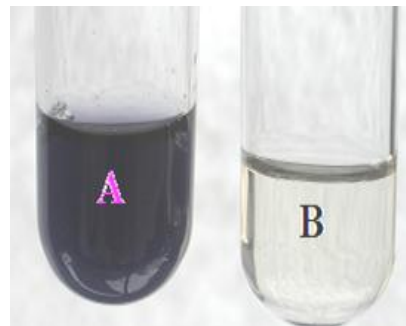
Medida de la enzima lacasa intracelular y extracelular



- **Antes de las 24h detección de lacasa intracelular**
- **98% de eliminación de color a las 75 h**
- **(57% debido a la adsorción Killed control)**

Pélets antes (B) y después del tratamiento (C) y pélets teñidos con colorante a t=1h (A)

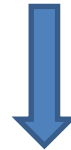
Medio inicial (A) y final (B) del tratamiento



➤ Si la enzima lacasa es la responsable de la degradación...

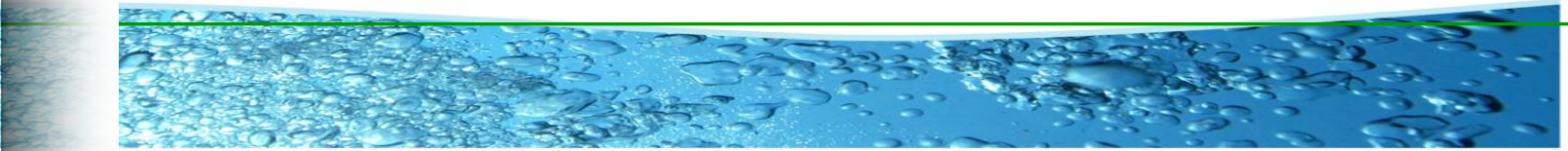
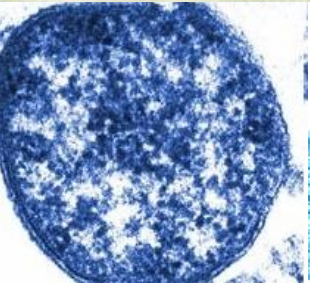
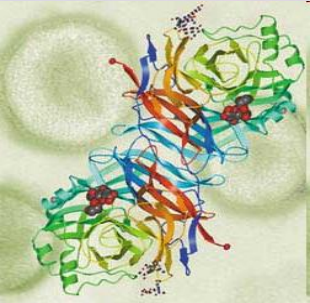
➤ **Porque utilizar microorganismos y no enzimas ?**

- ✓ Es más fácil trabajar con enzimas que con microorganismos
- ✓ Se puede utilizar la dosis de enzima necesaria



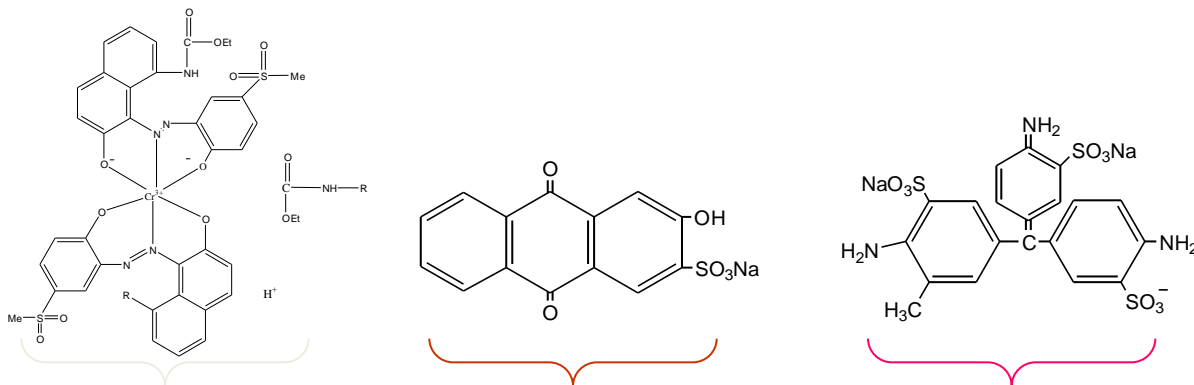
Pero...

- ✓ Un único enzima puede degradar todos los colorantes en un efluente?
- ✓ Los enzimas hasta donde llegan? Degradan/transforman/mineralizan
- ✓ Un único enzima puede hacer lo mismo que un microorganismo que es multienzimático?

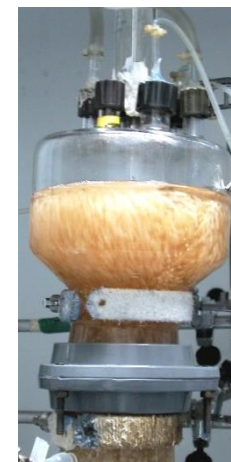
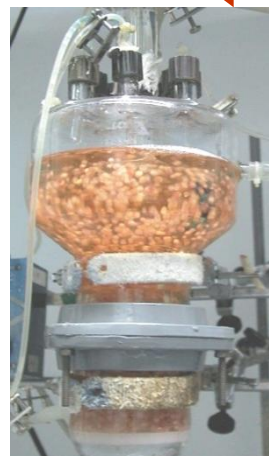
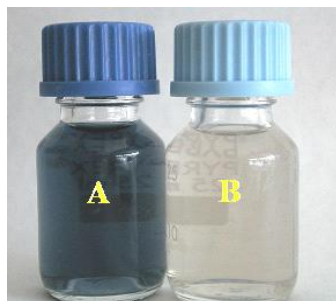


DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES

RESULTADOS DE DEGRADACIÓN DE LOS COLORANTES ÁCIDOS



Colorante	Lanasyn Grey (Azo complejo metálico)	Alizarin Red S (Antraquinónico)	Acid Fuchsin (Triarilmetano)
% Decoloración	79,6	93,8	99,98
Reducción Toxicidad	1,2	12	19




APLICACIÓN DEL PROCESO DE DECOLORACIÓN A DIFERENTES COLORANTES



DEGRADACIÓ DE COLORANTS: comparació fong vs enzim lacasa

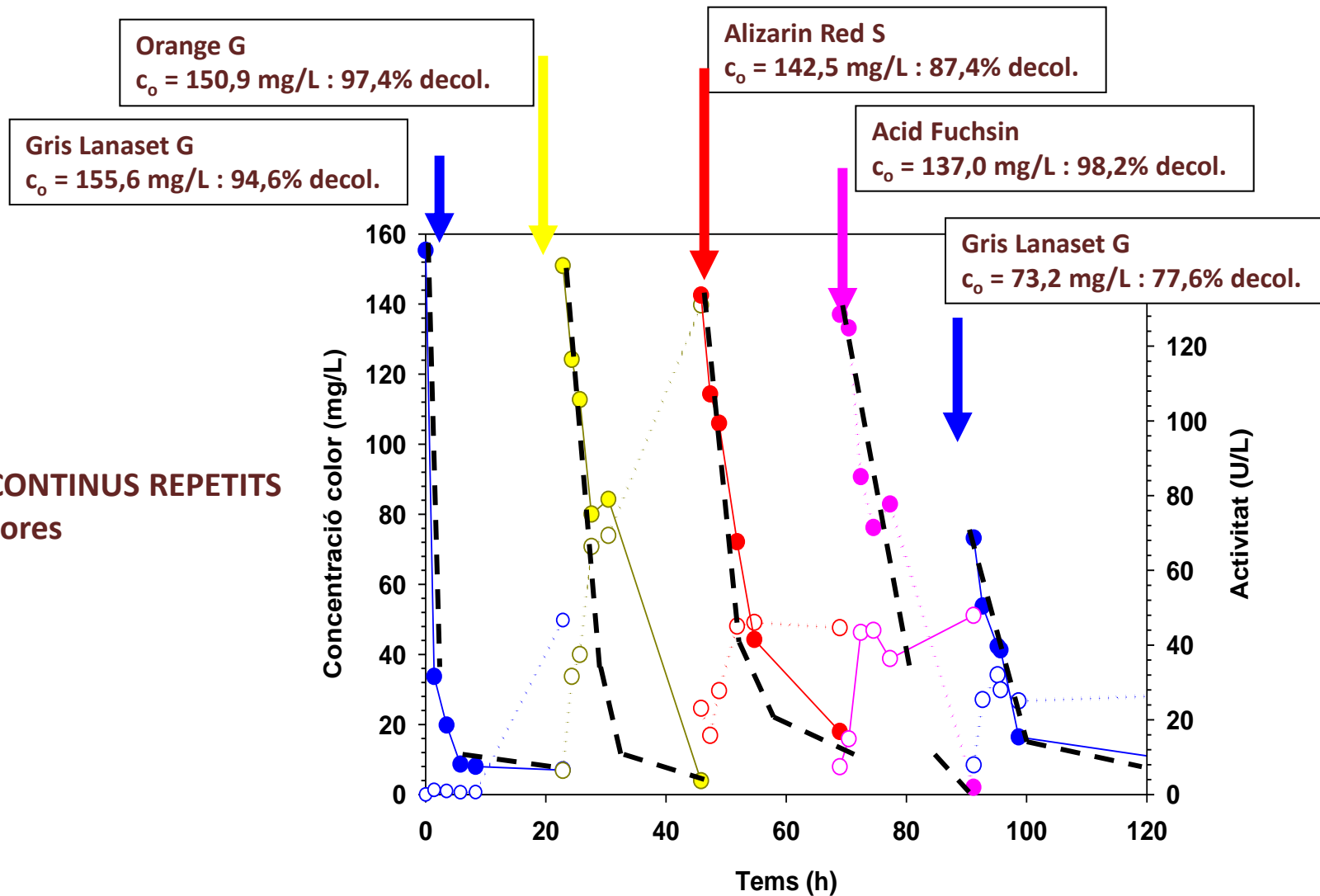
COLORANT		<i>Trametes versicolor</i>	ENZIM 1210 U/L
Nom comú	Classificació química	% Decoloració 24 i 100 h	% Decoloració 24h
Acid Fuchsin	Trifenilmetà	98-99	28
Acid Green 16	Trifenilmetà	90-99	60 > 24h
Alizarin Red S	Antraquinònic	92-94	84
Amino Black 10	Diazo	96-99	93
Azocarmine B	Quinoneimine	90-99	84
Basic Fuchsin	Trifenilmetà	12-40	18
Brilliant Green 1	Trifenilmetà	55-93	90
Brilliant Green 20	Trifenilmetà	76-78	90
Burdeos Lanaset B	(mescla)	83-88	67
Gris Lanaset G	(mescla)	92-98	35
Pardo Lanaset B	(mescla)	64-81	60
Lanasyn Grey G	Metàl·lic azoic	72-87	49
Methylene Blue	Tiazina	14-28	37
Naphtol Yellow S	Nitro	8-50-92 (240h)	0
Orange G	Azo	97-99	87

 Desactivació enzimàtica



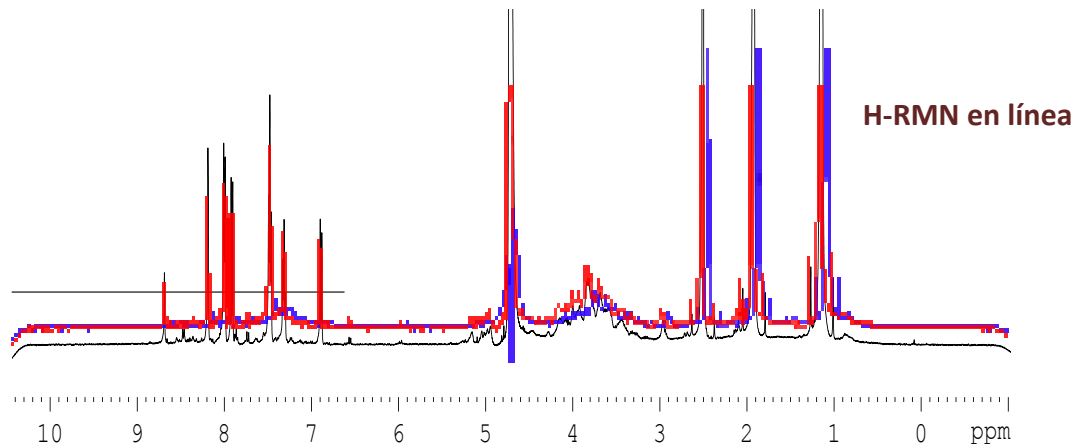
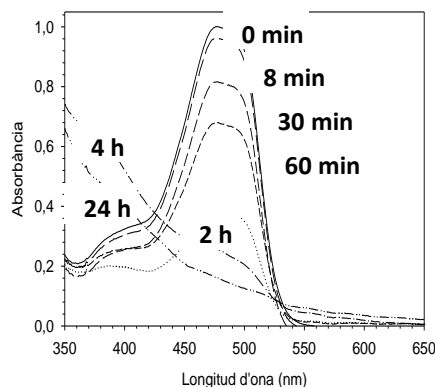
Biodegradació d'altres famílies de colorants

DISCONTINUS REPETITS
24 hores



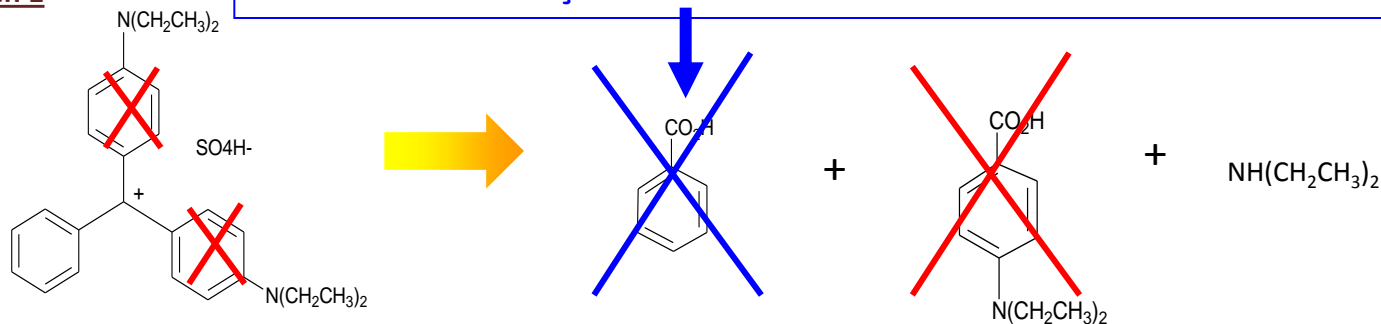
Productes de degradació del metabolisme del fong per diferents famílies de colorants

Orange G

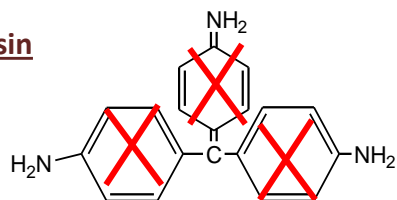


Brilliant Green 1

EL FONG ÉS CAPAÇ DE DEGRADAR ÀCID BENZOIC en 24 hores



Acid Fuchsin



No subproductes

Trametes versicolor



Enzimas extracelulares

Enzimas intracelulares

Enzimas modificadoras de lignina

Lignina peroxidasa

MnP

Peroxidasa versátil

1. Peroxidasas

2. Lacasas

Desmetilación

Ruptura C-C

Oxidación alcoholes

Hidroxilación

Di/polimerización fenoles

Citocromo P450

Hidroxilación

Oxigenación

Reducción

Desalquilación

Epoxidación

Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation

CE Cerniglia

Division of Microbiology, National Center for Toxicological Research, US Food & Drug Administration, Jefferson, Arkansas 72079, USA

326

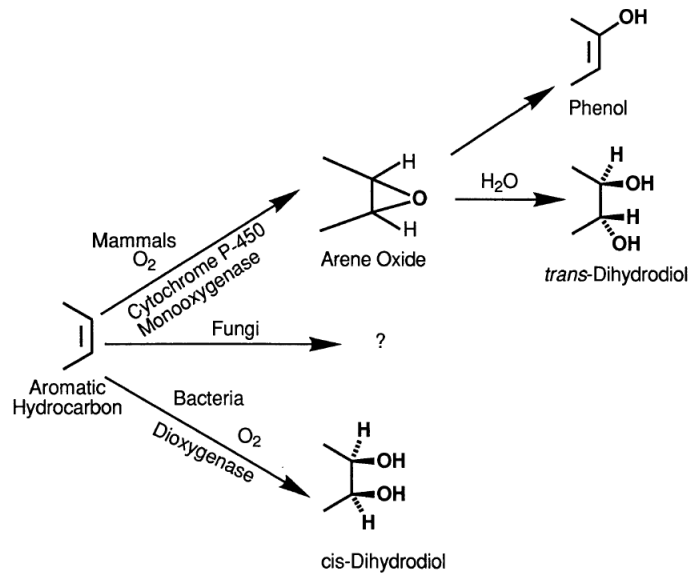


Figure 3 Different pathways used by bacteria and mammals in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons.

El mecanismo de degradación de algunos contaminantes no está ligado a la producción de los enzimas extracelulares sino al sistema intracelular Citocromo P450 monooxigenasa

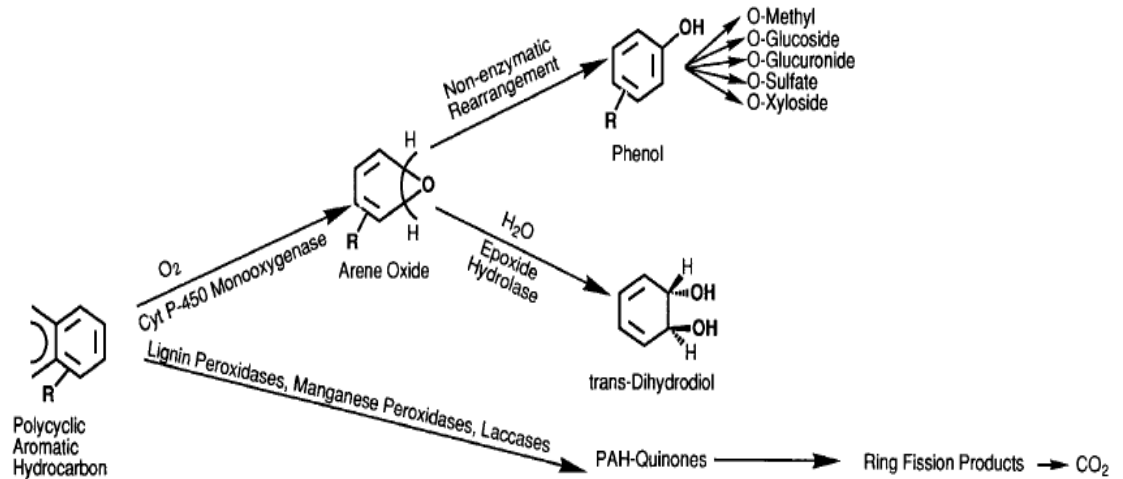
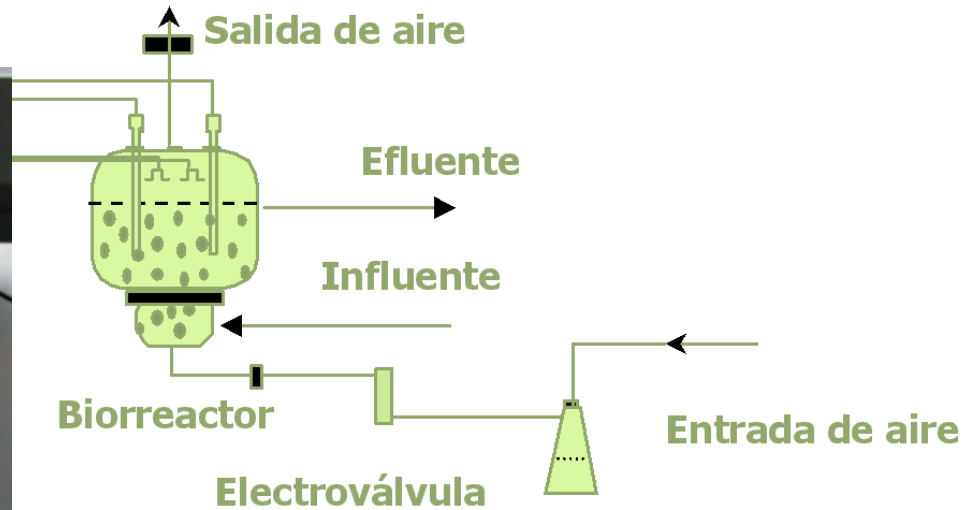
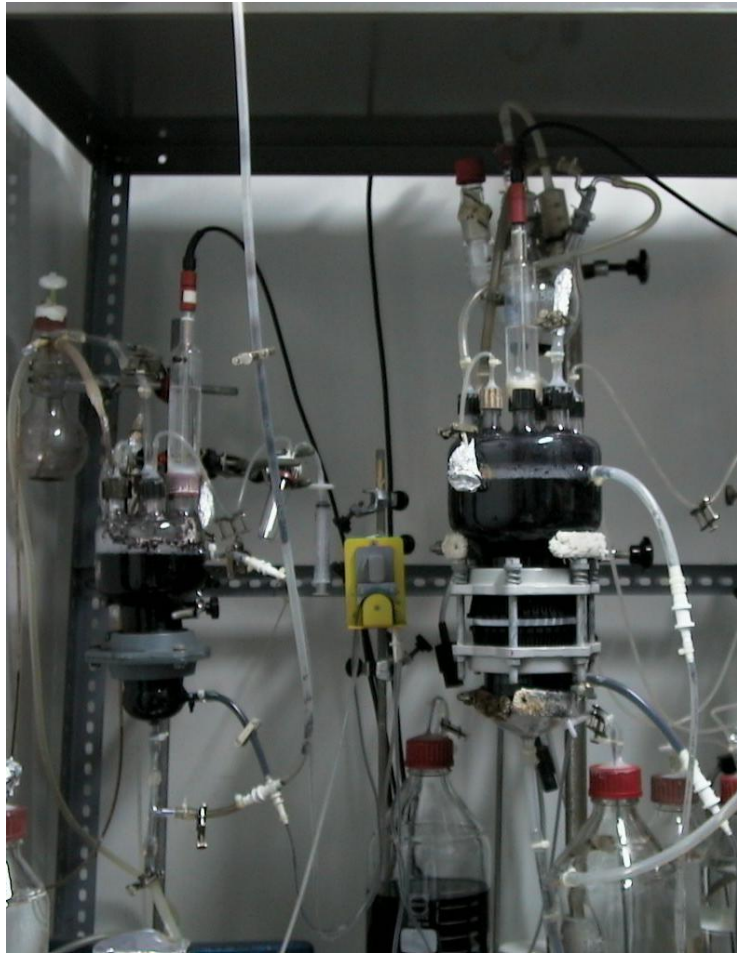


Figure 4 Pathways for the fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Identificación gen cyt P450 en *P. chrysosporium* 1997 y en *T. versicolor* 2002

Objetivo: desarrollo de proceso

Reactor fluidizado por pulsos de aire



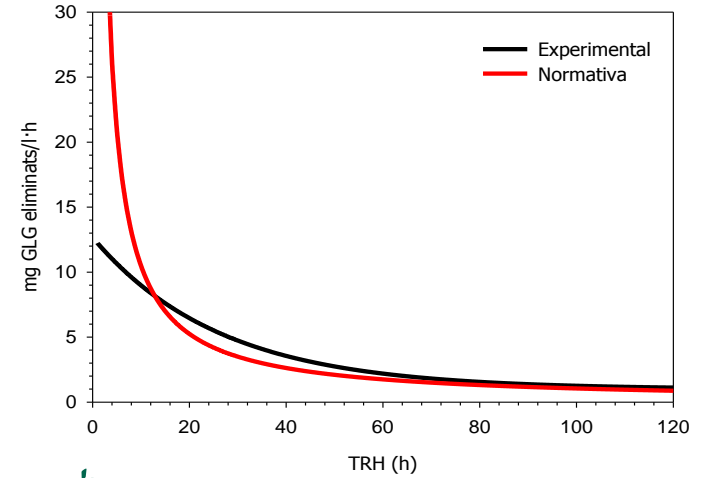
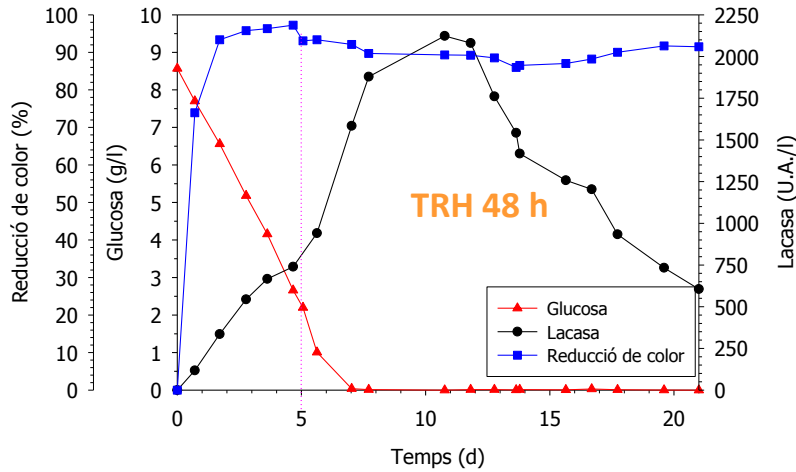
masa

- Fong en forma de pèl·lets
- Biomassa fluïditzada per polsos d'aire
- T^a òptima fong 25°C
- pH òptim fong 4.5
- Nutrients (C,N) y micronutrients
- Avaluació activitat fúngica: enzim lacasa
- Condicions esterils

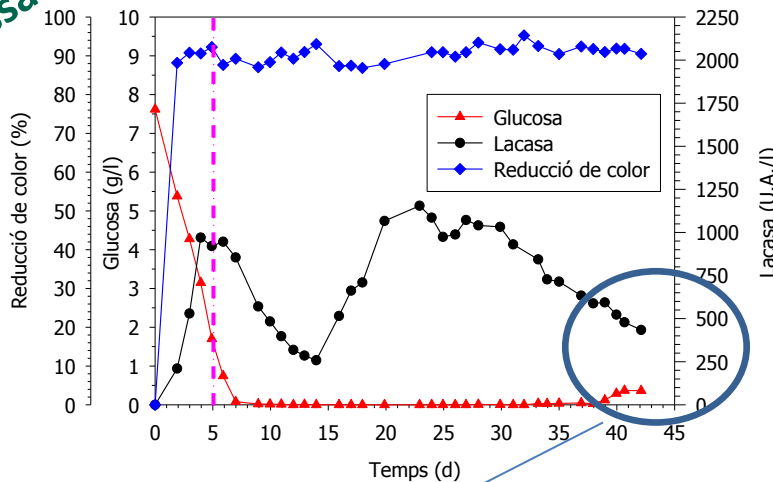


Condicions d'operació

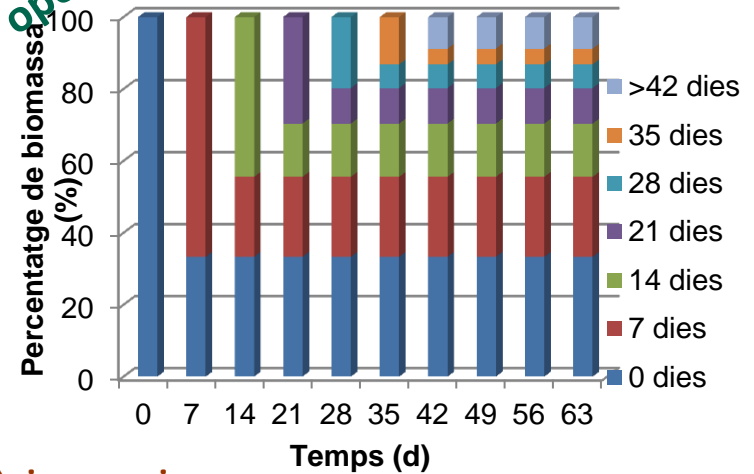
Efecte del TRH



Temps màxim biomassa activa



TRC operació



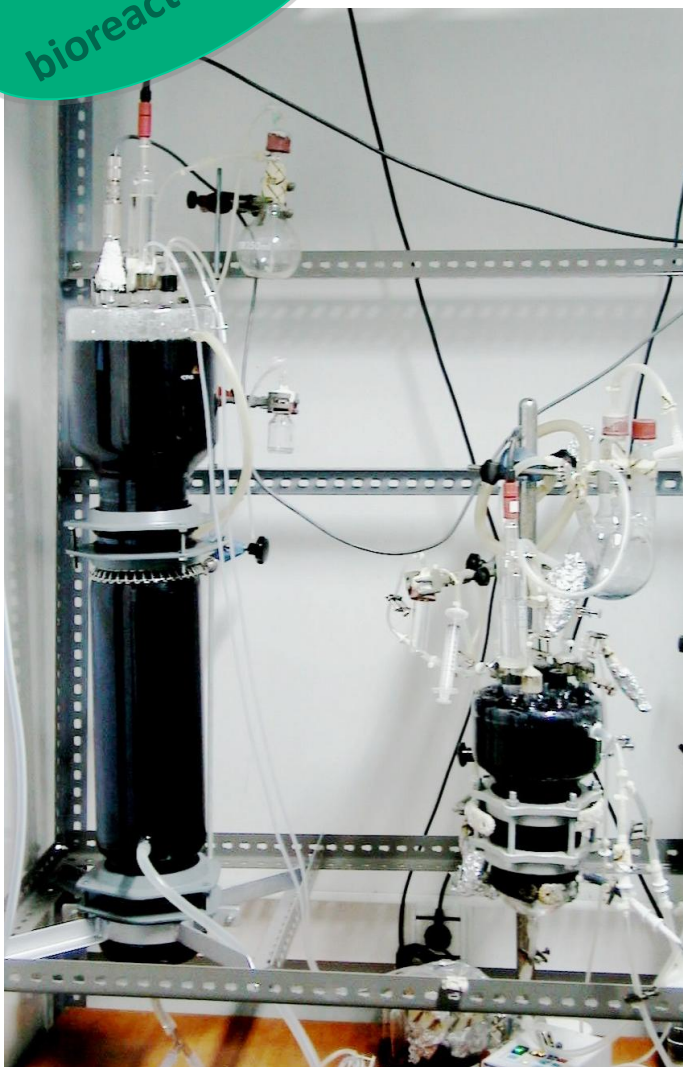
Pèrdua morfologia dels pèl·lets lisis cel·lular

Estratègia purga i renovació 1/3 de la biomassa cada 7 dies

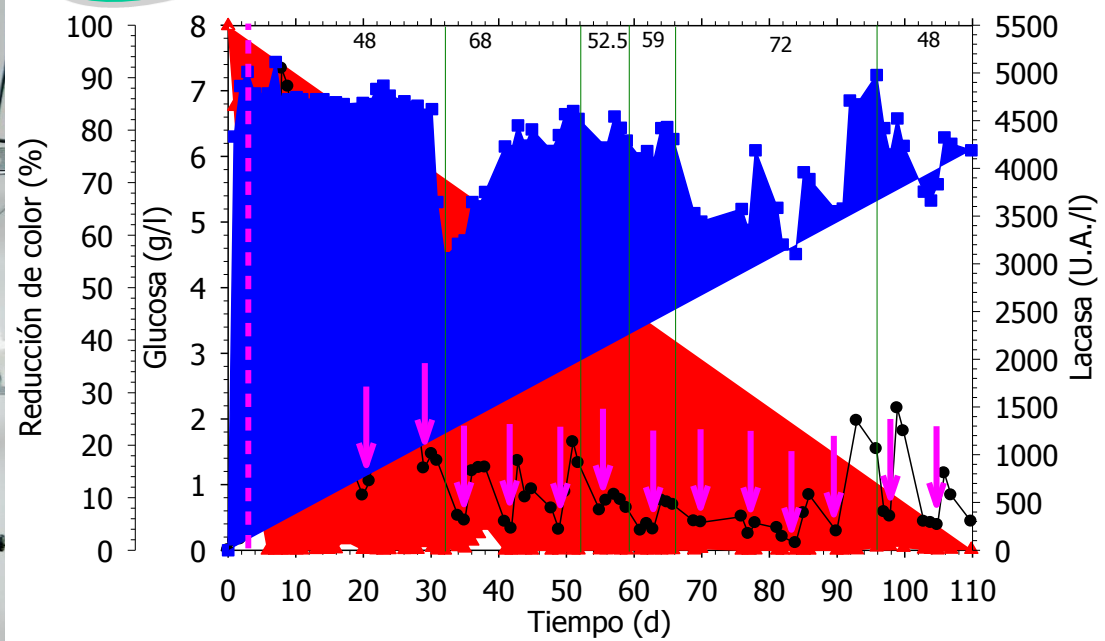
TRC: 21 dies

- ✓ decoloracions > 90 %
- ✓ distribució d'edats constant
- ✓ 82% biomassa amb <28 dies

Disseny d'un bioreactor pilot



Adaptació a condicions industrials

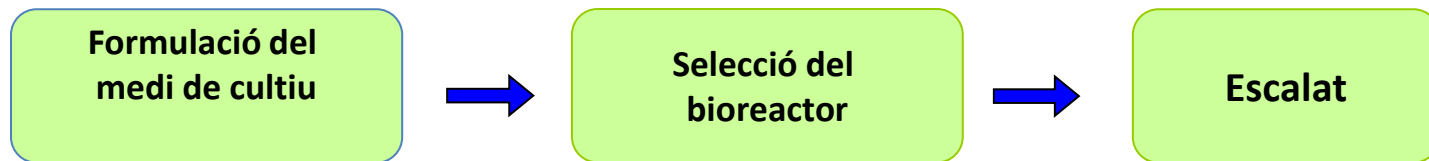
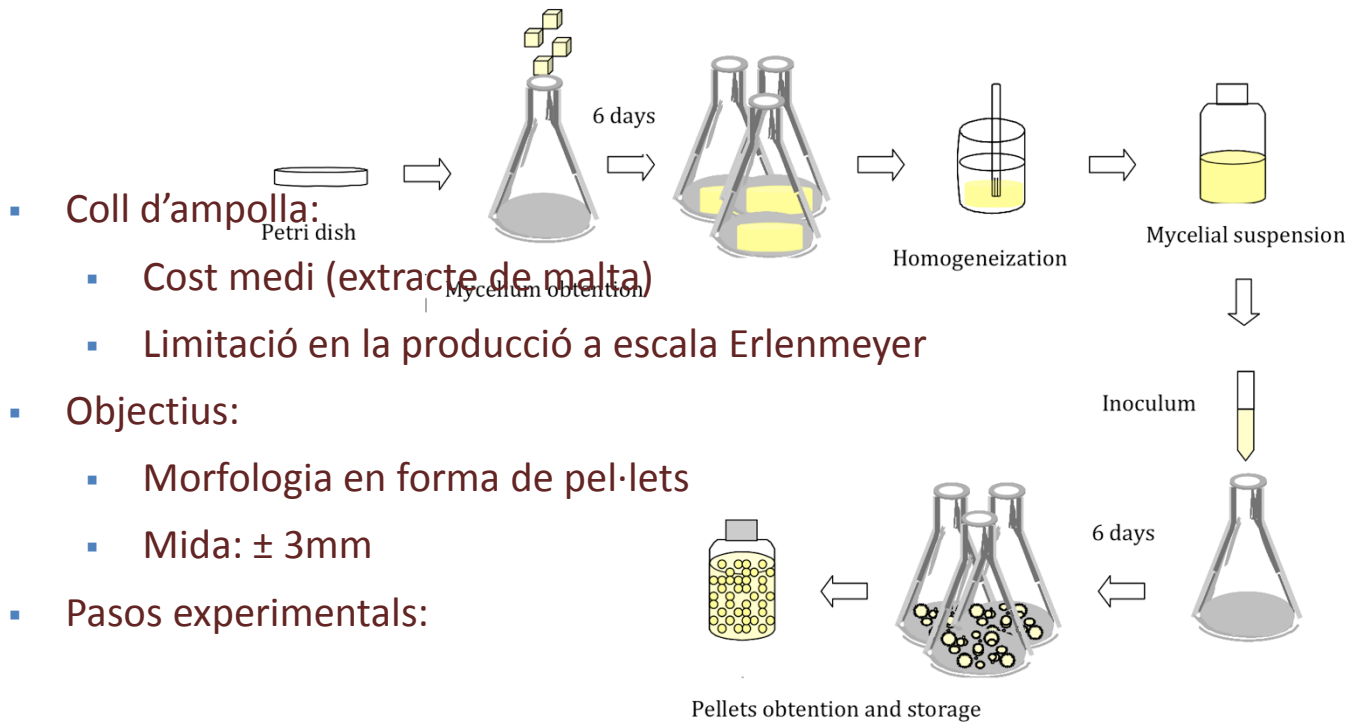


- Renovar la biomassa
- Ni macro ni micronutrients
- Glucosa qualitat industrial
- Colorant no estèril

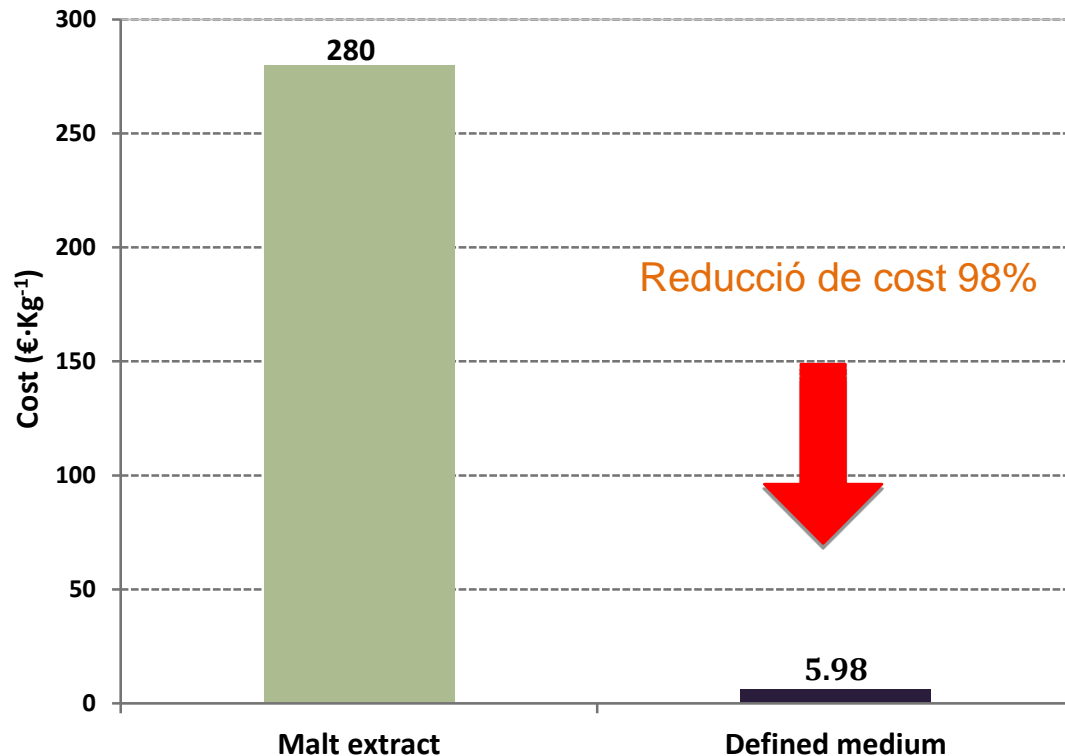


Escalat de la producció de biomassa

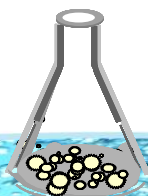
- Producció de pèl·lets clàssica



Escalat de la producció de biomassa



40 x

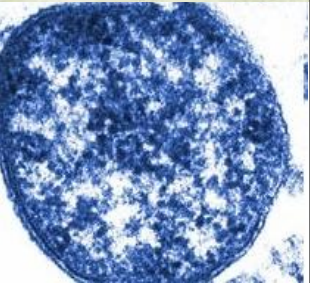
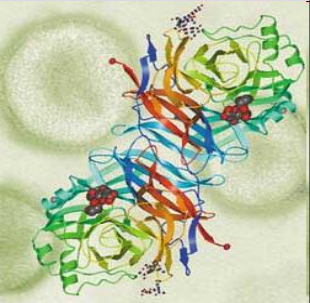


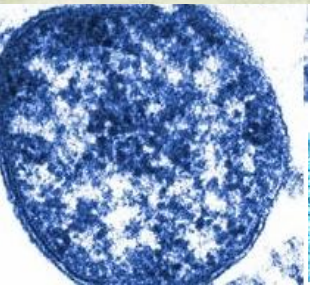
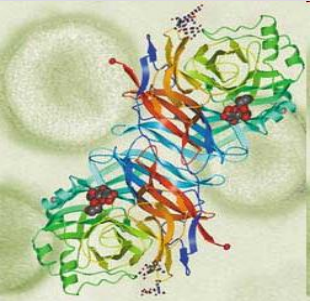
- Biomassa > 3 g DCW·l⁻¹
- Morfologia adequada

Time (days)	Size (mm)
3	2.80 ± 0.22
4	3.31 ± 0.30
6	3.09 ± 0.20

Algunas conclusiones:

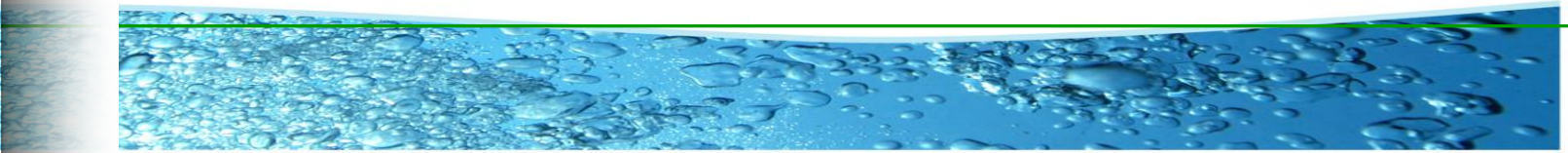
- ➔ El hongo degrada casi todos los colorantes (algunos si estan en concentraciones subtóxicas).
- ➔ La **enzima lacasa** es uno de los principales catalizadores de la **biodegradación** pero **no el único responsable**.
- ➔ El hongo puede degradar metabolitos resultantes de la degradación, que el enzima lacasa no puede degradar
- ➔ La monitorización de la **producción enzimática y consumo de glucosa** son **buenos indicadores de la actividad metabólica del hongo**: hay que suministrar nutrientes para mantener la actividad enzimática



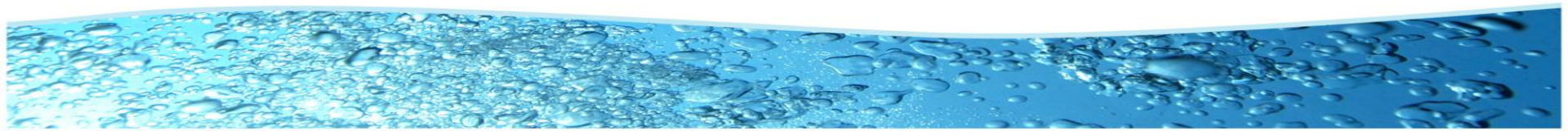
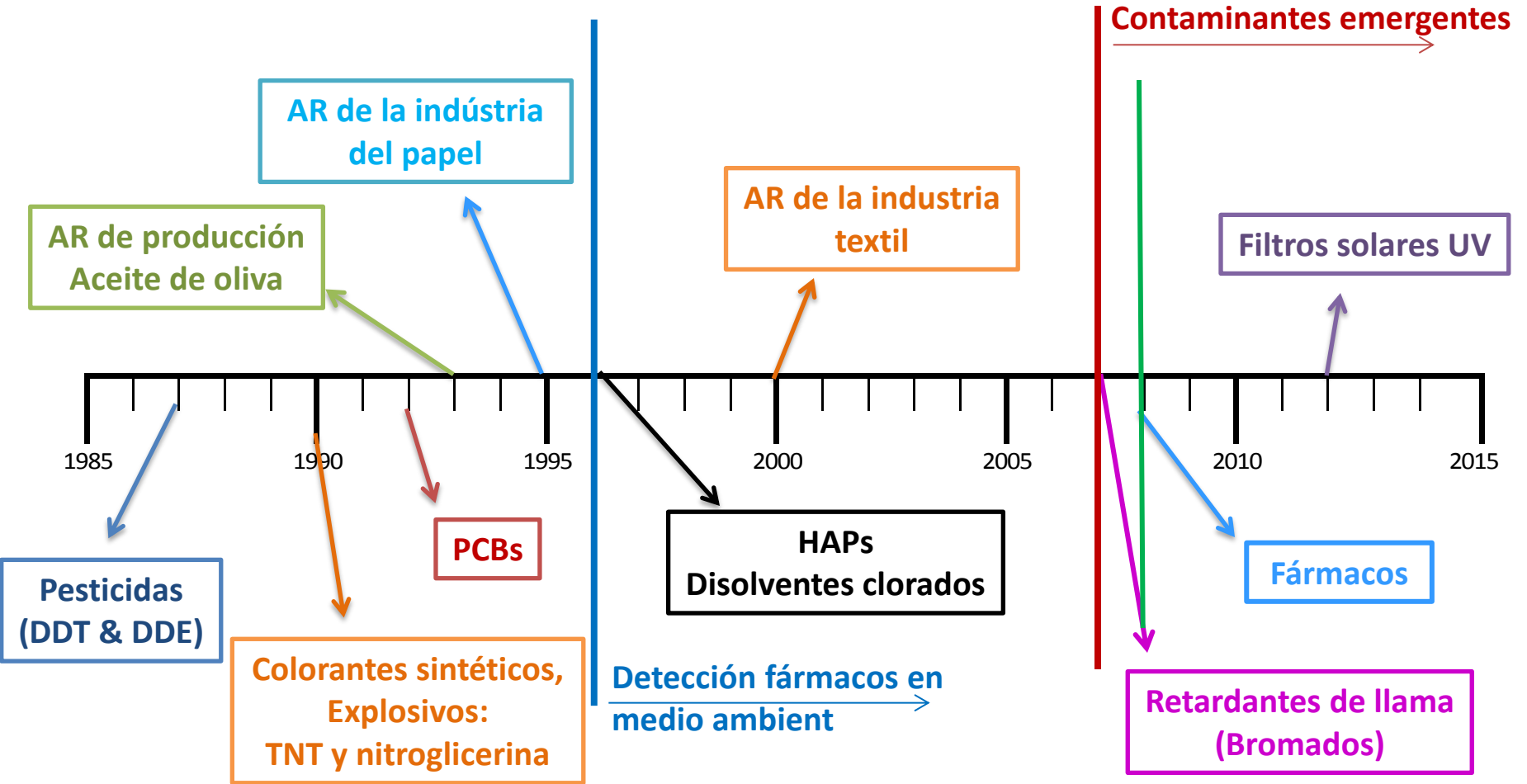


➤ Porque utilizar microorganismos y no enzimas ? si es mucho mas facil dosificar enzimas

- ✓ los efluentes a tratar (líquidos o sólidos) contienen una mezcla muy compleja de contaminantes, no podemos optimizar ni el enzima, ni las condiciones.
- ✓ es difícil que un enzima pueda degradar todos los contaminantes presentes.
- ✓ en muchos casos los enzimas solo realizan un paso de la transformación, y se pueden formar TPs tóxicos o no biodegradables
- ✓ el microorganismo es un sistema multienzimático



➤ **Cronograma** de los trabajos publicados en relación a biodegradación de contaminantes por hongos en medio líquido:





➤ A que se llama contaminantes emergentes?

- ✓ Productos considerados contaminantes actualmente pero no en el pasado; presentes de forma constante en el medio ambiente a bajas concentraciones provocando problemas en el ecosistema y pendientes de ser regulados en un futuro próximo.
- ✓ Entre ellos se incluyen los **fármacos, drogas de abuso, productos asociados a la higiene y cuidado corporal, retardantes de llama, plaguicidas...**
- ✓ Características:
 - alto consumo
 - acumulación en el medio y organismos
 - potencial disruptor endocrino
 - toxicidad...

DEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES



EXCRECIÓN/VERTIDO

- Mezcla de "contaminantes emergentes"
- metabolitos
- sustancias conjugadas

influyente



EDAR

efluente

Inalterados

Transformados

Retenidos en los lodos
inalterados
transformados

Mineralizados

Presencia en aguas
subterráneas, superficiales y
sedimentos
Presencia en suelos



- 2005, la mayoría de estudios realizados se centran en:
 - Puesta a punto de métodos analíticos
 - Detección en aguas superficiales y subterráneas
 - Detección en sistemas de tratamiento convencionales (EDARs)
 - Detección en efluentes de hospitales
- Algunos estudios de degradación por **bacterias en efluentes**
- Escasos (ninguno?) estudios de degradación en **lodos**

HONGOS?

➤ **Cual es el principal problema que presenta estudiar su degradación ?**

Las bajas concentraciones en que se encuentran y el hecho de estar en matrices muy complejas dificulta su detección y cuantificación



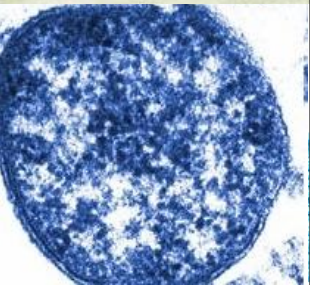
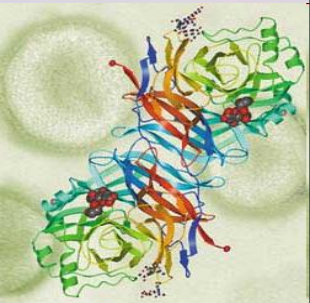
➤ Aplicación : en matrices líquidas y sólidas

Matrices líquidas :

Aguas residuales de hospital
Aguas residuales de la Vila Universitaria
Concentrado de un proceso de membranas
Aguas de un hospital veterinario.

Matrices sólidas:

Lodos de depuradoras urbanas
Lodos de reactor MBR



MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO



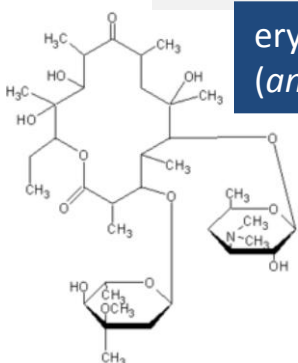
GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

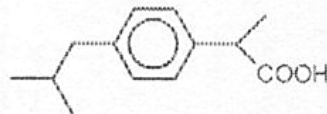
Therapeutic classes, contrast media (ICM), heavy metals in a hospital effluent– Comparison with an urban effluent

Average concentrations for the main classes of micropollutants in HWWs and UWWs.

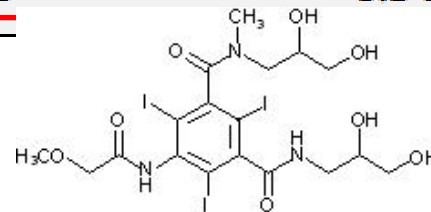
Therapeutic class	Hospital effluent Mean value	Urban effluent Mean value	$\frac{HWWs _{av}}{UWWs _{av}}$
Analgesics, $\mu\text{g L}^{-1}$	100	11.9	8–15
Antibiotics, $\mu\text{g L}^{-1}$	11	1.17	5–10
Cytostatics, $\mu\text{g L}^{-1}$	24	2.97	4–10
β -blockers, $\mu\text{g L}^{-1}$	5.9	3.21	1–4
Hormones, $\mu\text{g L}^{-1}$	0.16	0.10	1–3
ICM, $\mu\text{g L}^{-1}$	1008	6.99	70–150
AOX, $\mu\text{g L}^{-1}$	1371	150	7–15
Gadolinium, $\mu\text{g L}^{-1}$	32	0.7	35–55
Platinum, $\mu\text{g L}^{-1}$	13	0.155	60–90
Mercury, $\mu\text{g L}^{-1}$	1.65	0.54	3–5



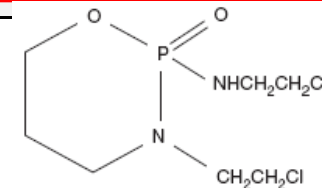
erythromycin
(antibiotic)



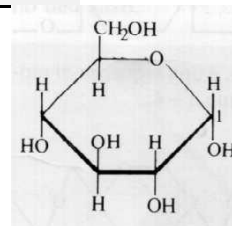
Ibuprofen
(analgesic)



Iopromide
(ICM)



ifosfamide
(cytostatic)



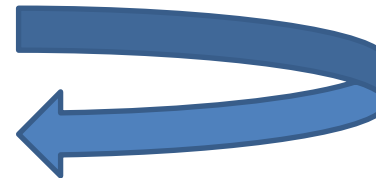
Glucose

Tratamiento de efluentes por hongos

Degradación de fármacos

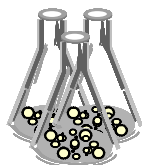
- ▶ Degradación de fármacos modelo e identificación de productos de transformación, en **condiciones estériles**

Nos permite demostrar que el hongo es el responsable de la degradación



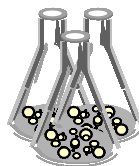
- ▶ Tratamiento de **efluentes reales**, en condiciones **no estériles**. Cuantificación de la eliminación de fármacos y ecotoxicidad

❖ EXPERIMENTOS *IN VIVO* PARA CUANTIFICAR DEGRADACIÓN



Control abiótico

(Medio + contaminante)



Control inactivado

(Medio + contaminante+ hongo inactivado)



Experimental

(Medio + contaminante+hongo activo)

Adsorción

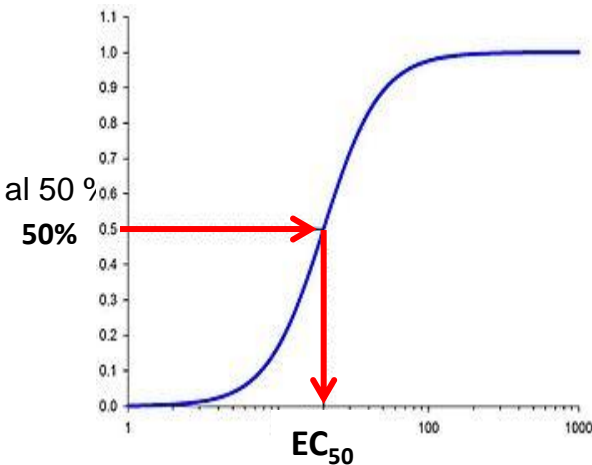
Degradación mínima

❖ EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR EL PAPEL DE LOS ENZIMAS

- *In vitro*: Lacasa comercial
- *In vivo*: Inhibidores del citocrom P450 (1-aminobenzotriazole)

❖ ESTUDIO DE LA TOXICIDAD (Microtox® Test)

- Bacteria bioluminescente *V. fischeri*.
- EC_{50} a los 15 min → Concentración que disminuye la luz emitida por la bacteria al 50 %
- Cuanto mas alta sea la EC_{50} , menor es la toxicidad



❖ ANÁLISIS DE FÁRMACOS: EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA i HPLC

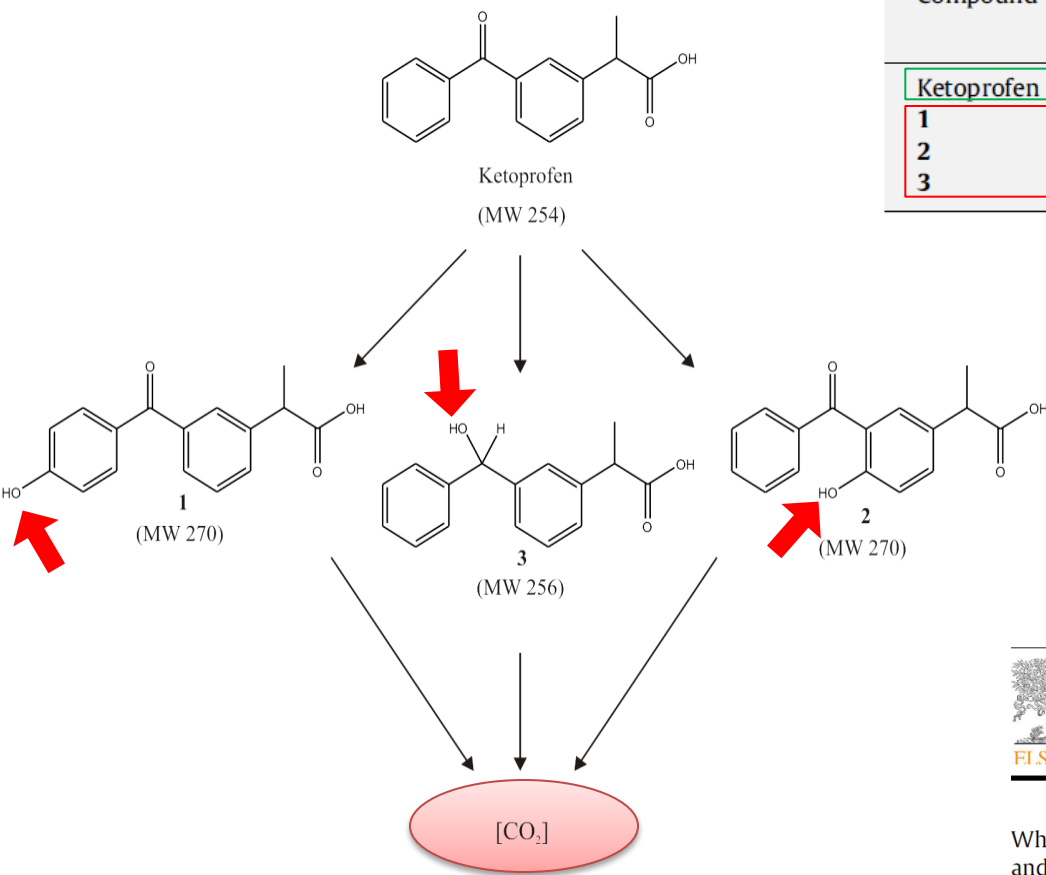
❖ IDENTIFICACIÓN DE SUBPRODUCTOS → Servei RMN-UAB

➤ Ketoprofeno:

✓ Eliminació del 100 %

✓ Metabolits hidroxilats

✓ Perfil de concentració de subproductes del ketoprofeno.



Compound	μmol of compound ^a (mg of compound)						
	t ₀ ^b	1 h		24 h	7 d		
Ketoprofen	3.93	(1.00)	3.11	(0.79)	0.19	n.d.	c
1	n.d.	n.d.	n.d.	0.09	n.d.	n.d.	
2	n.d.	n.d.	n.d.	0.08	n.d.	n.d.	
3	n.d.	0.23	(0.06)	2.06	0.32	(0.08)	

Chemosphere 78 (2010) 474–481



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

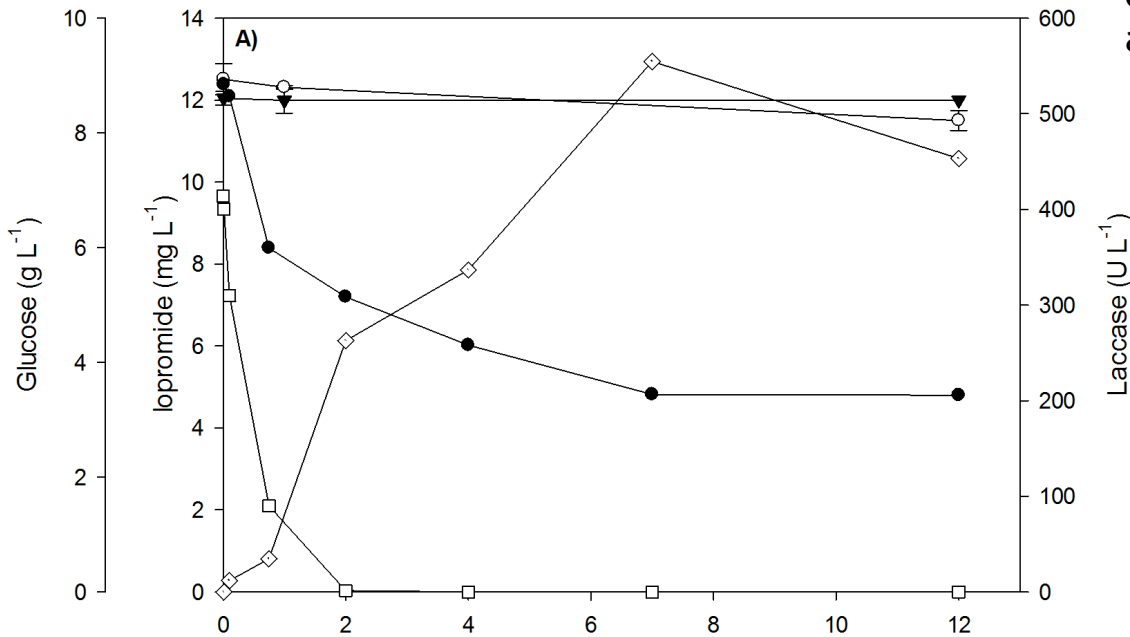


White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC–DAD–MS and NMR

Ernest Marco-Urrea^a, Miriam Pérez-Trujillo^b, Carles Cruz-Morató^a, Gloria Caminal^c, Teresa Vicent^{a,*}

IOPROMIDE degradation in Erlenmeyer flasks by *T versicolor* pellets

Time course degradation of Iopromide added at approximately 12 mg L⁻¹



Symbols: non-inoculated controls (▼), experimental cultures (●), heat-killed controls (○), glucose (□) and laccase activity (◇).

62% degradation is observed after 7 days of exposure and remains constant until the end of the experiment

Toxicity by Microtox bioassay

Time	EC ₅₀ (%)
Non-biotic control	2
15min	2
8h	1
1d	43
4d	66
7d	87
12d	110

High toxicity at initial time (EC₅₀ 2%). Toxicity decreases over time

Gros et al., 2014, Water Research,



Biodegradation of the X-ray contrast agent Iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products

Meritxell Gros^{a,b}, Carles Cruz-Morato^c, Ernest Marco-Urrea^c, Philipp Longrée^d, Heinz Singer^d, Montserrat Sarrà^c, Juliane Hollender^d, Teresa Vicent^e, Sara Rodríguez-Mozaz^{a,e}, Damià Barceló^{a,e}

Degradación de farmacos en aguas residuales en bioreactor

- Fluidized bed bioreactors: 1.5 and 10 L
- Air pulses
- *T. versicolor* in form of pellets
- pH (4.5) and temperature (25°C)

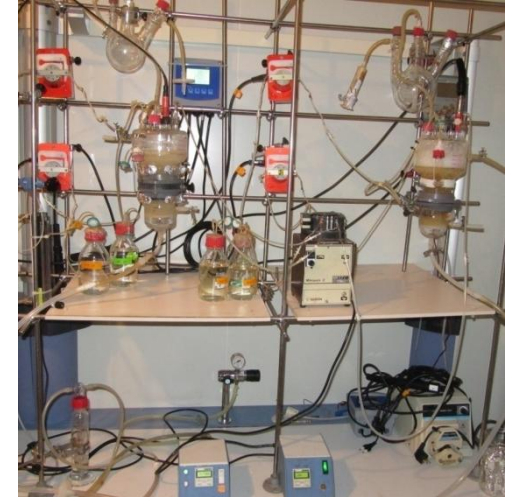
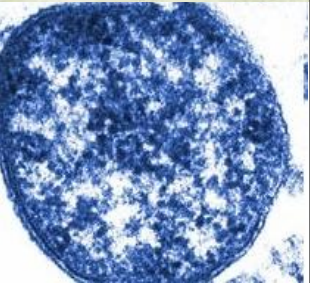
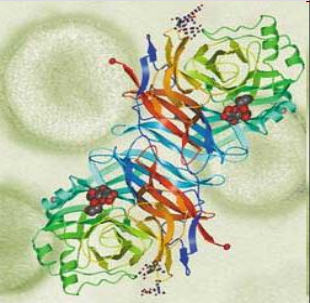
control

MONITORING :

- Pharmaceuticals degradation
- Acute toxicity (Microtox)
- Laccase, glucose, etc.

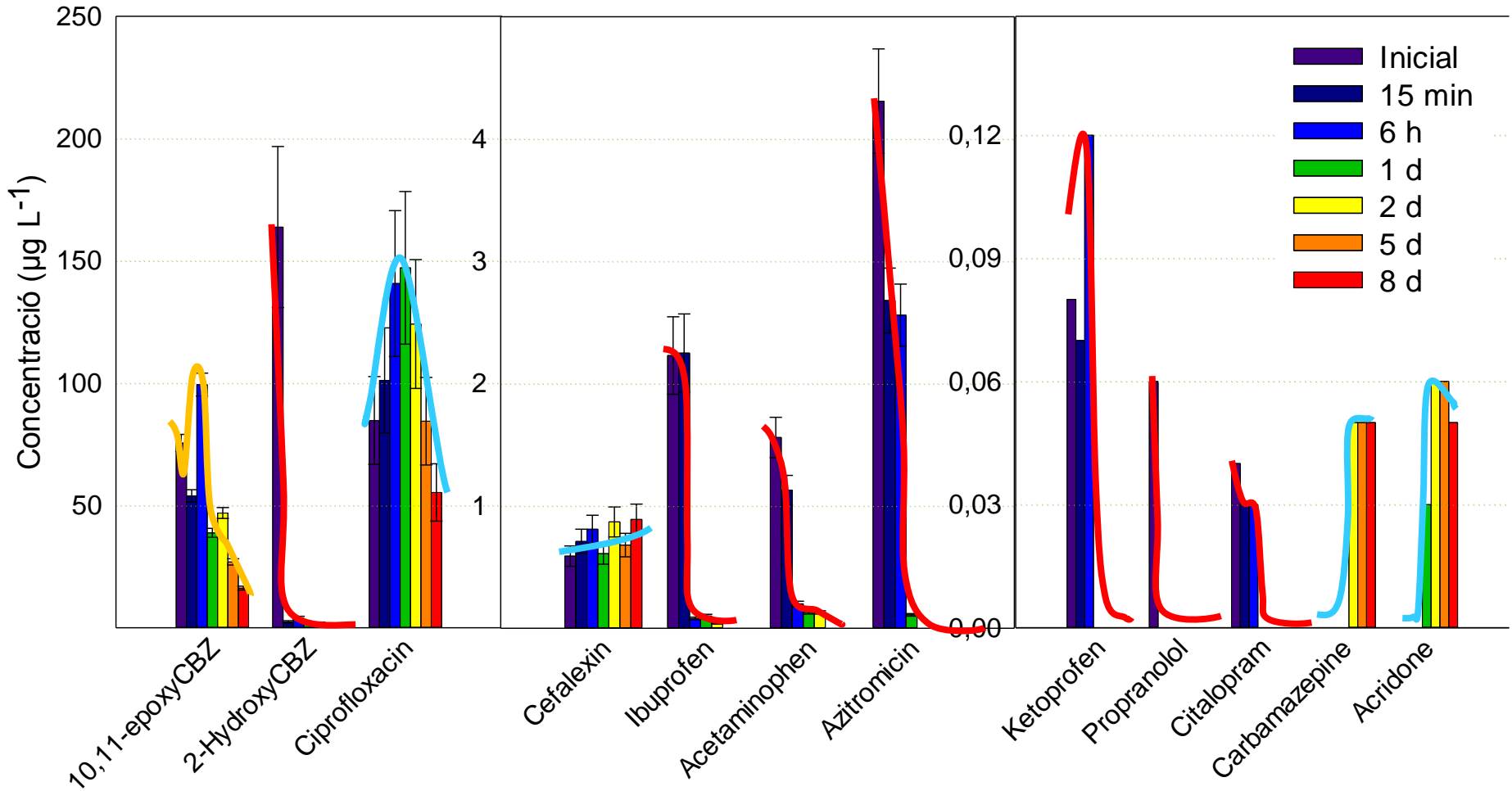
CONDITIONS:

- Sterile effluent
- No sterile
- Batch
- *Continuous*
- Nutrients addition
- Non-nutrients addition



➤ Tratamiento no esteril, en batch:

✓ **Eliminación completa del 70 % de los fármacos detectados**



RESULTADOS AGUAS RESIDUALES URBANAS

➤ Comparación de la eliminación de los fármacos por el

hongo versus lodos activados (bibliografía)

Grup	Fàrmac	Concentració (µg L ⁻¹)	Eliminació estèril (%)	Eliminació no estèril (%)	Eliminació per llots activats (%)
Analgèsics	Acetaminofen	3.87	100	100	82-99
	Ibuprofen	12.61	100	100	82-99
	Ketoprofen	<0.48	35	100	<50
	Codeina	0.02	100	-	<82
Antibiòtics	Azitromicin	4.31	-	100	<40
	Ciprofloxacín	84.71	-	35	50-96 (adsorció)
	Cefalexín	0.59	-	-51	96
β-blockers	Propanolol	0.06	-	100	59-70
Psiquiàtrics	Carbamazepina	0.7	-37	Augmenta	<20 // Augmenta
	10,11- epoxy CBZ	75.5	100	79	-
	2-Hydroxy CBZ	163.8	46	100	-
	Acridone	1.01	100	Augmenta	-
	Citalopram	0.1	100	100	-

WATER RESEARCH 47 (2013) 5200–5210



Available online at www.sciencedirect.com
SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

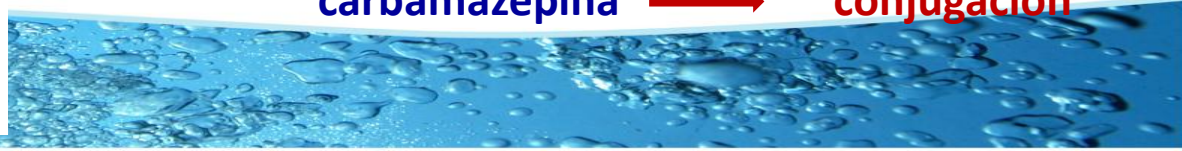


Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor



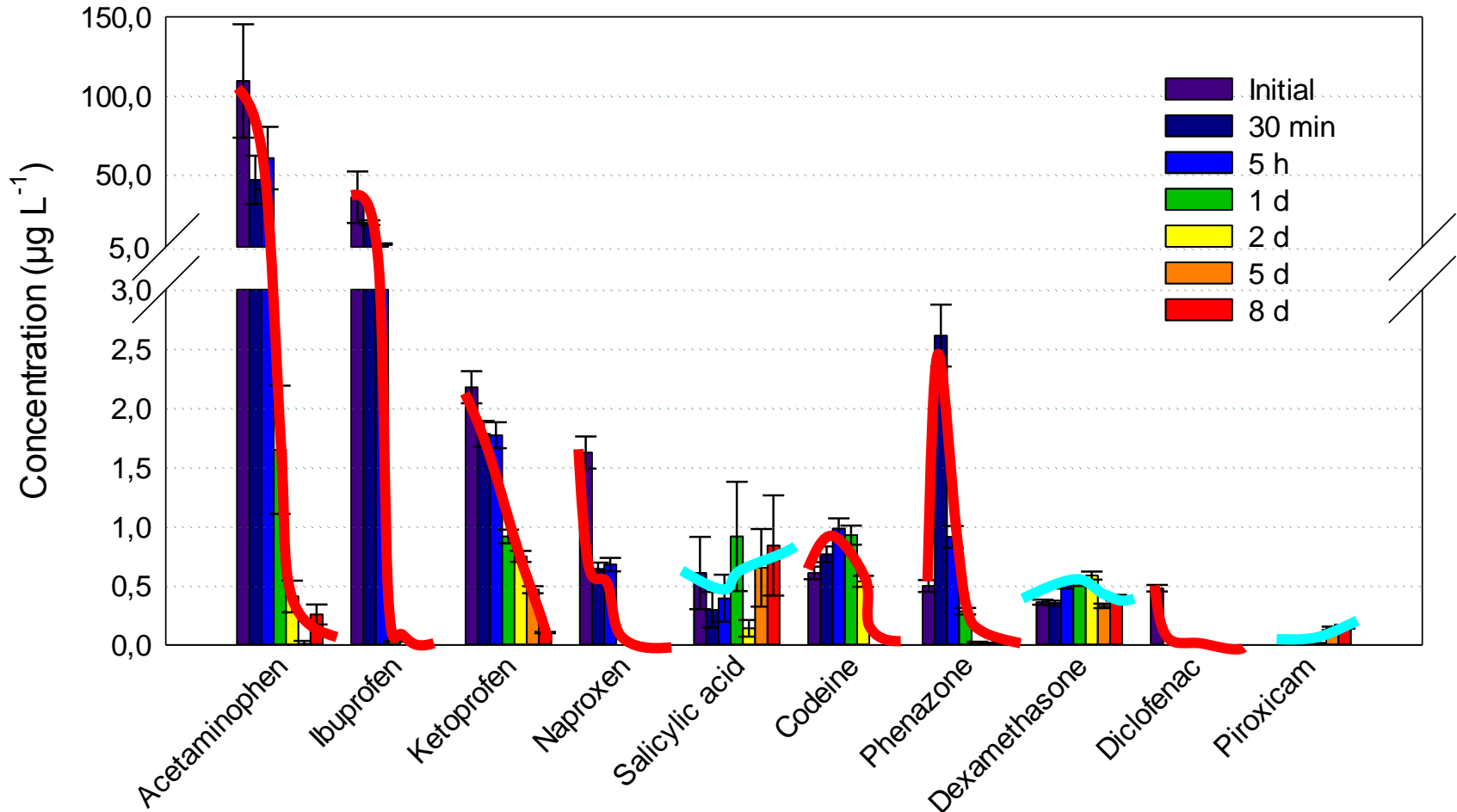
Carles Cruz-Morató^{a,1}, Laura Ferrando-Climent^{b,1},
Sara Rodríguez-Mozaz^b, Damià Barceló^{b,c}, Ernest Marco-Urrea^a,
Teresa Vicent^a, Montserrat Sarrà^{a,*}

- Porcentajes de eliminación superiores en el tratamiento por hongos
- Problema: cuantificación inicial de carbamazepina → **conjugación**



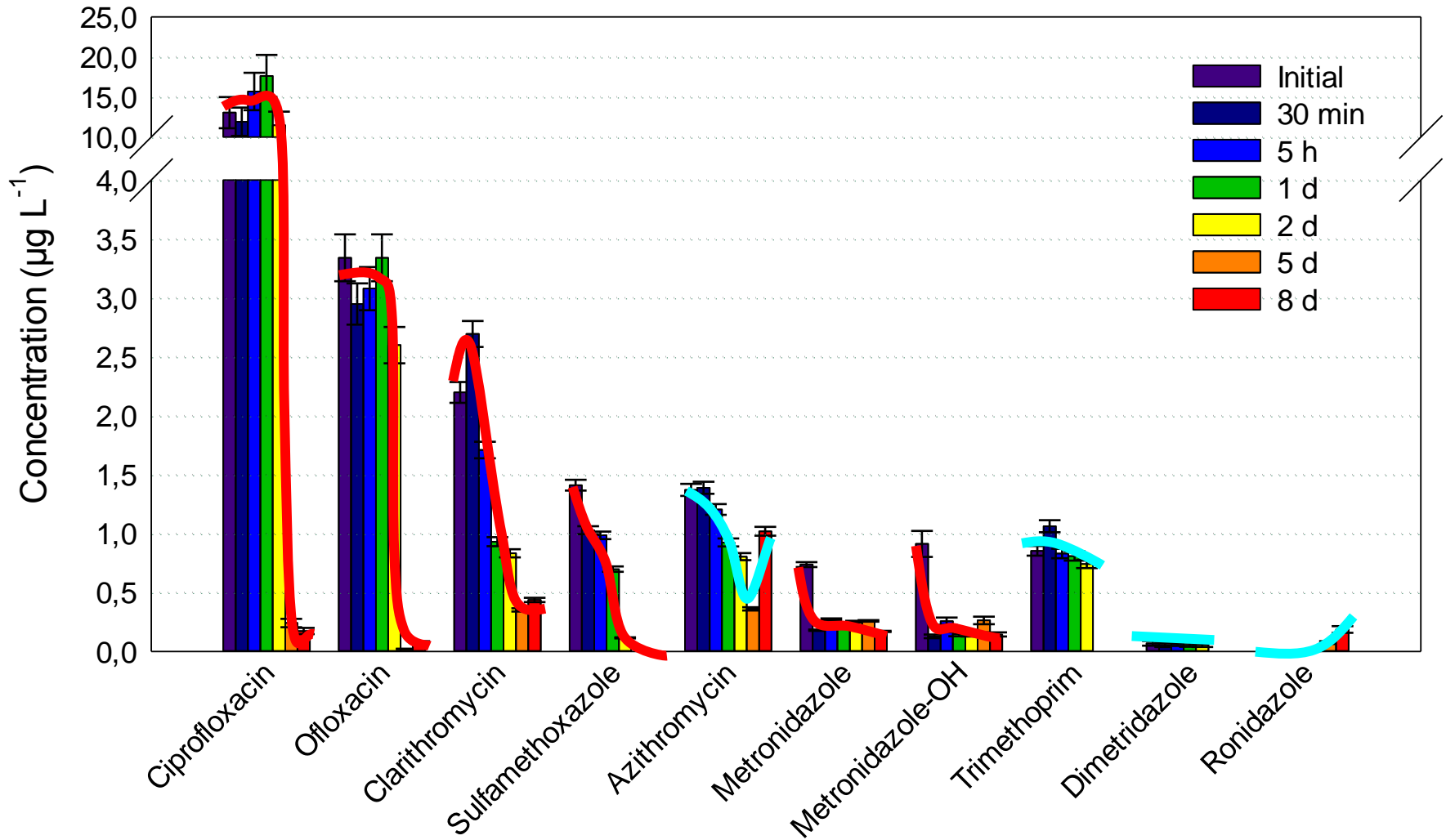
RESULTADOS AGUAS RESIDUALES DE HOSPITAL

➤ Tratamiento no estéril: **Analgésicos**



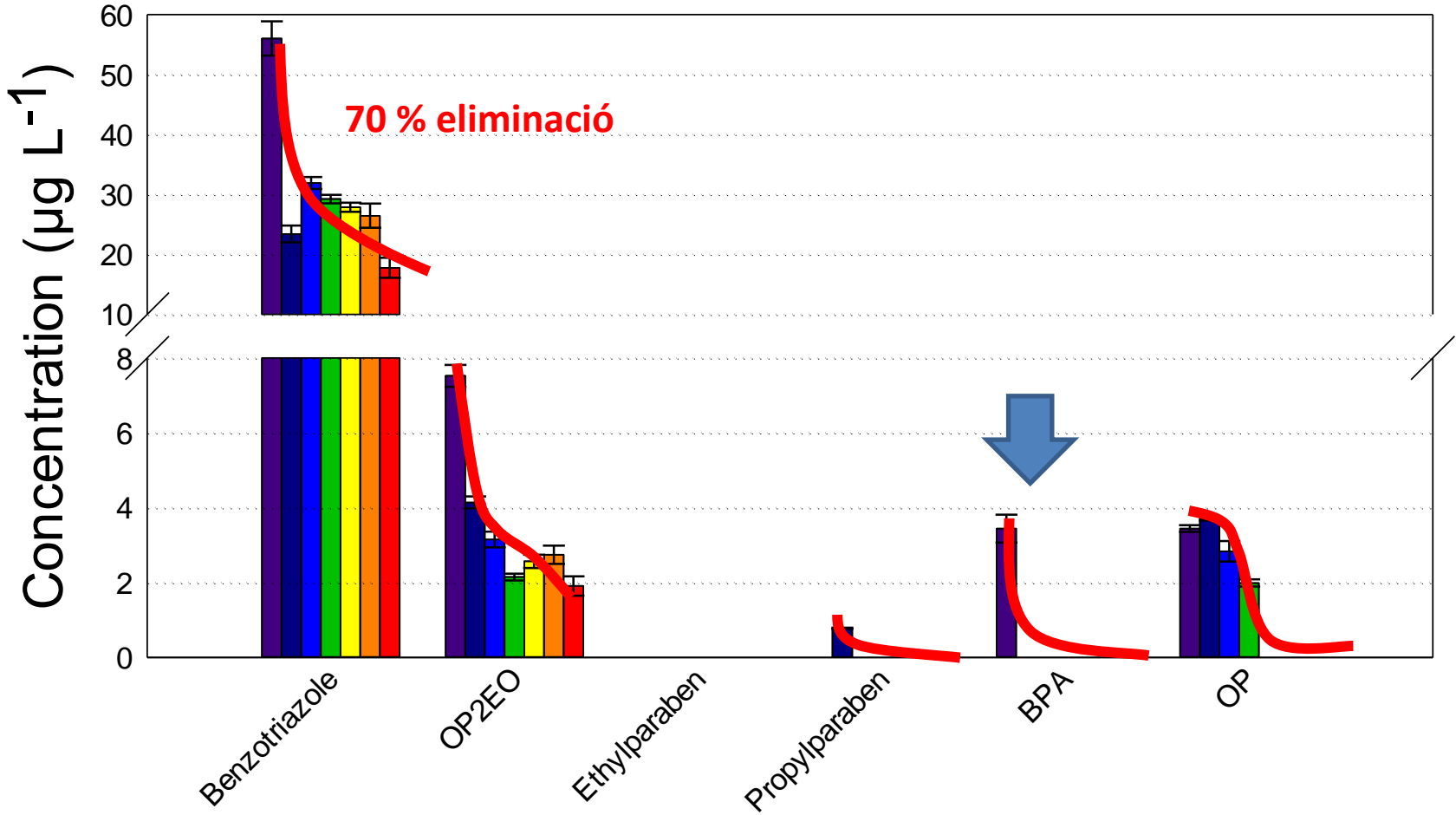
RESULTADOS AGUAS RESIDUALES DE HOSPITAL

➤ Tratamiento no estéril: **Antibióticos**



RESULTADOS AGUAS RESIDUALES DE HOSPITAL

➤ Tratamiento no estéril: **Compuestos disruptores endocrinos**



RESULTADOS AGUAS RESIDUALES DE HOSPITAL

Familia fármacos	Tratamiento estéril			Tratamiento no estéril		
	Carga inicial (μg)	%	Eliminación (%)	Carga inicial (μg)	%	Eliminación (%)
Analgésics	1475	18.0	99.3	1511	17.9	98.8
Antibiòtics	569	6.9	86.1	239	2.8	90.8
Cafeïna	757	9.2	7.9	1490	17.7	38.4
EDC	124	1.5	81.3	704	8.4	74.4
Iopromida	1046	12.8	75.5	4197	49.8	34.0
Altres fàrmacs	557	6.8	86.2	177	2.1	86.3
Psiquiàtrics	3658	44.7	93.7	108	1.3	95.4
Cantidad total	8185	100	83.2	8427	100	53.3



Tratamiento adecuado para degradar fármacos en efluentes de hospital

Siguiente objetivo: Tratamiento en continuo de efluentes?



Fungal inoculated
(I)

Non-inoculated
(NI)



Non-sterile continuous
treatments of real effluents



VHW treatment



Previous studies in synthetic media and sterile conditions

Fungal inoculated (I)

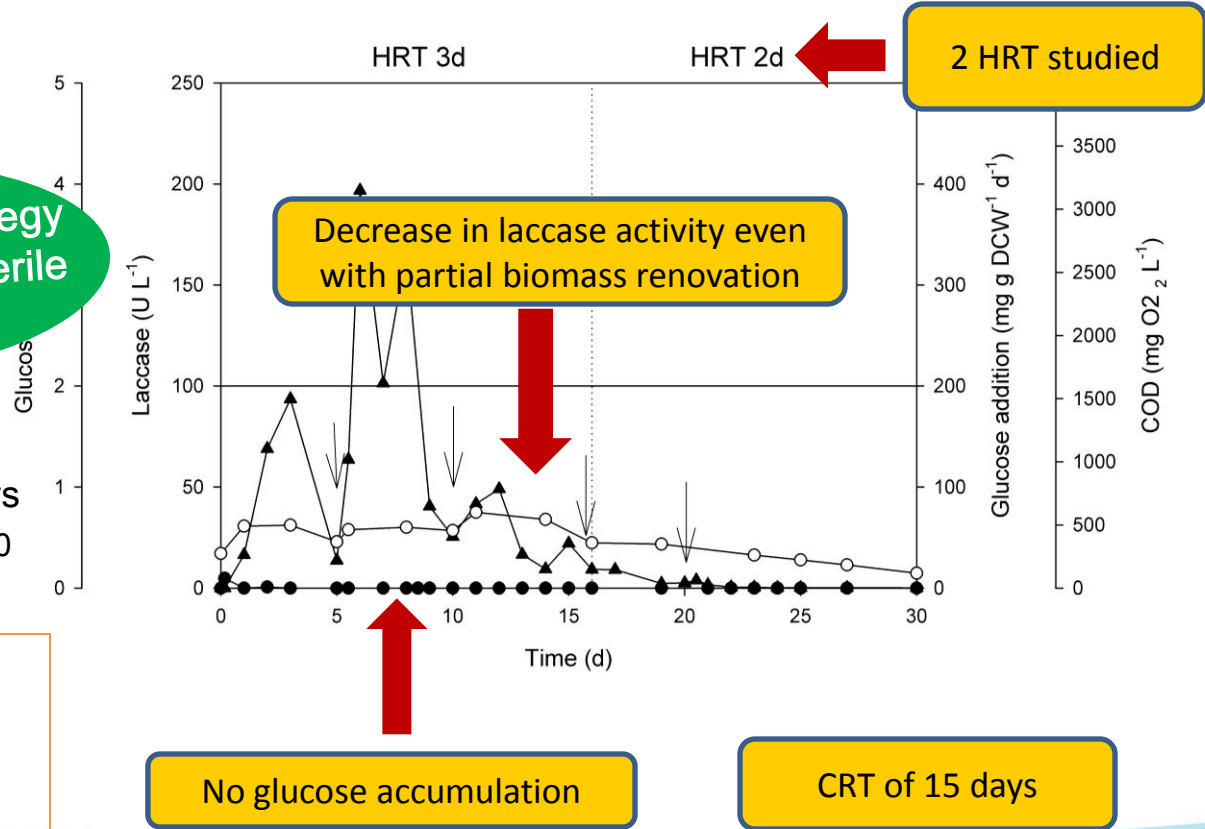
Need for nutrients

Glucose: 0.26 g /g DCW d
 Ammonium: 1.2
 Casas et al. 2006

Will the same strategy work under non-sterile conditions?

CRT

CRT: 21 days
 1/3 biomass renovation every 7 days
 Blánquez et al. 2006. Water Res. 40, 1650



- () Glucose concentration
- () COD
- () Laccase activity
- (↓) Fungal biomass partial renovation
- (→) Glucose addition rate

Que es lo que sucede?



Se muere el hongo?
aunque estamos renovando la
biomasa, no hay suficiente hongo?



No hay degradación?



VHW treatment (2)



Day 0

Day 1

Day 6

Day 11

Day 14

Day 21

Day 25

VHW4-I



VHW4-NI





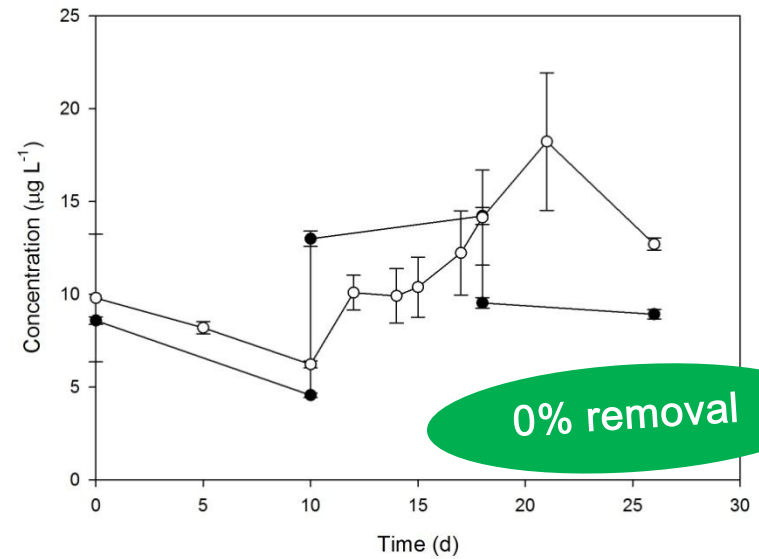
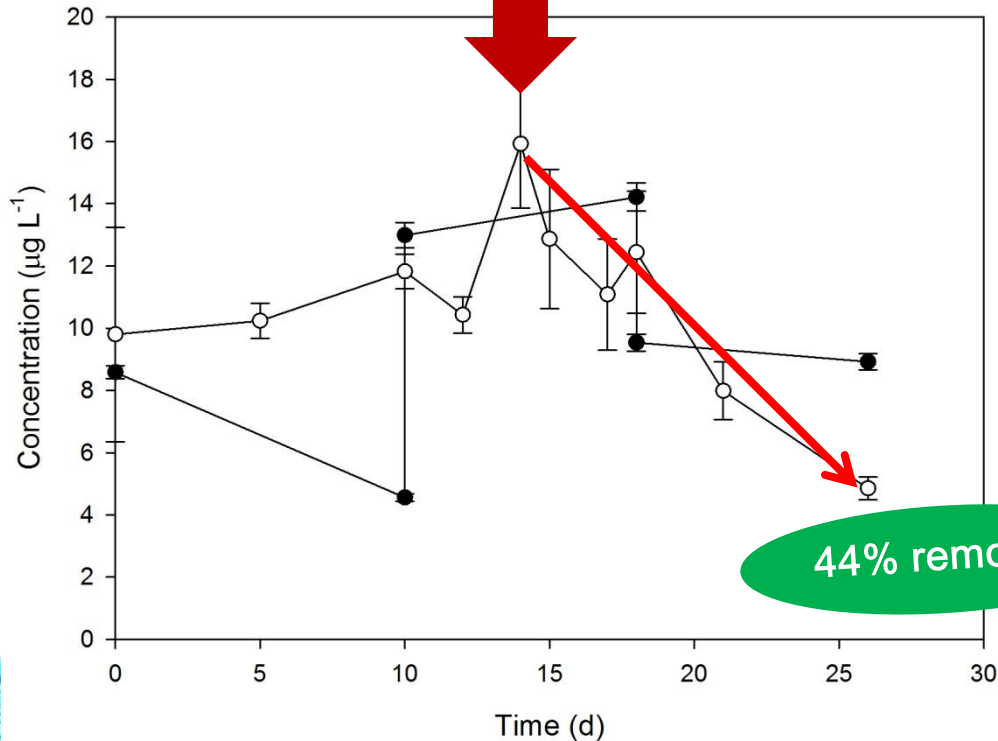
PhACs removal



Non-inoculated (NI)

NH₄⁺ addition

Fungal inoculated (I)



(○) Wastewater (Influent)
 (●) Reactor effluent

The analyses have been performed by:





Microbial community assessment (DGGE)

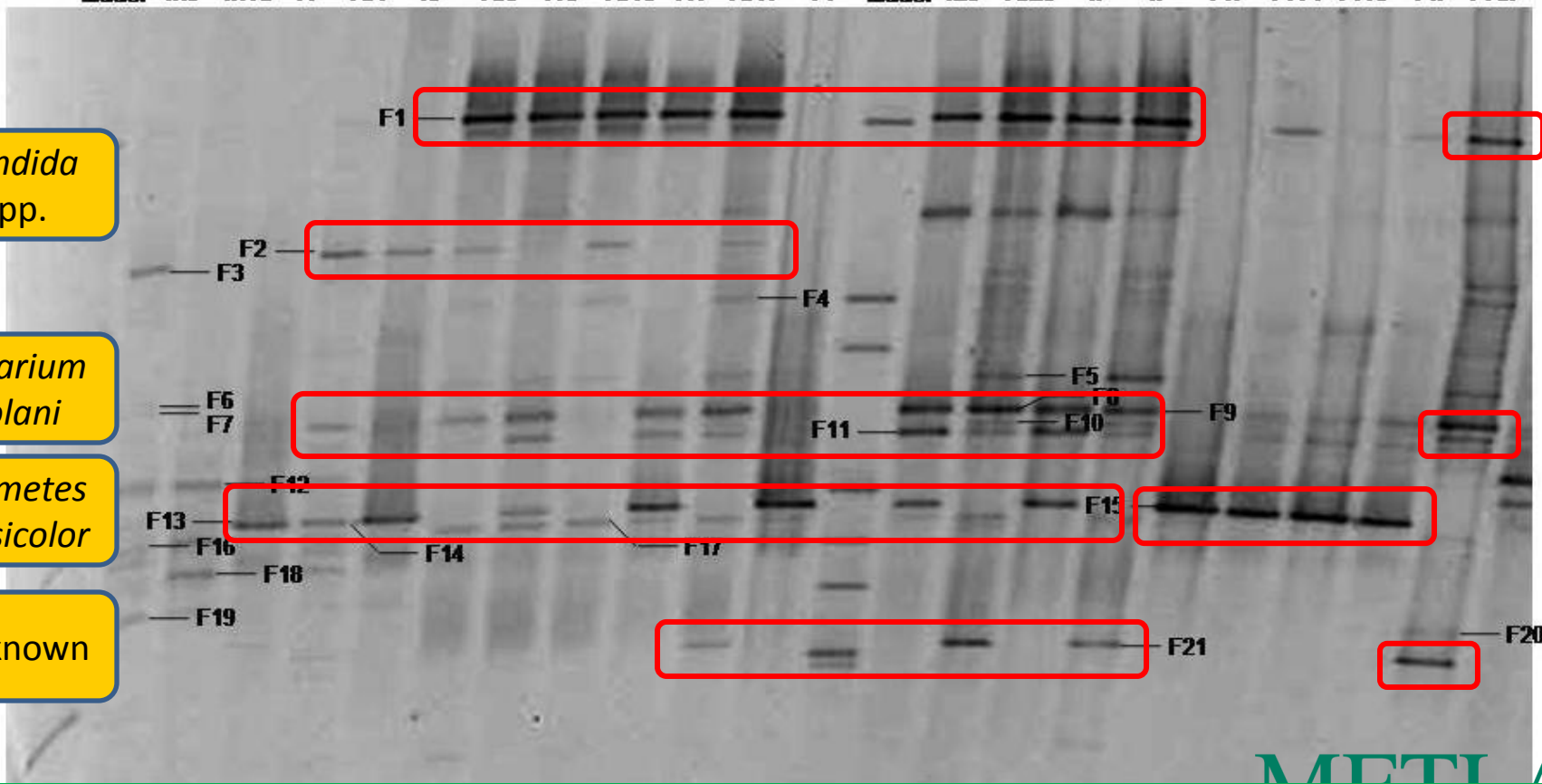


Candida spp.

Fusarium solani

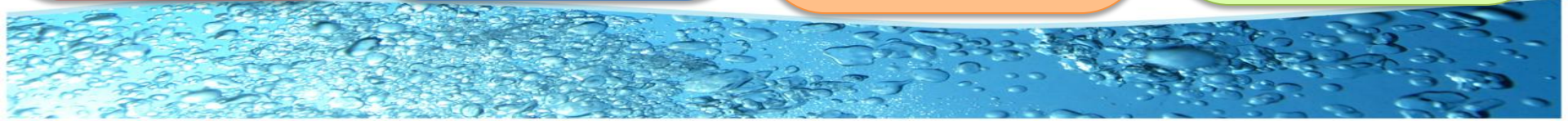
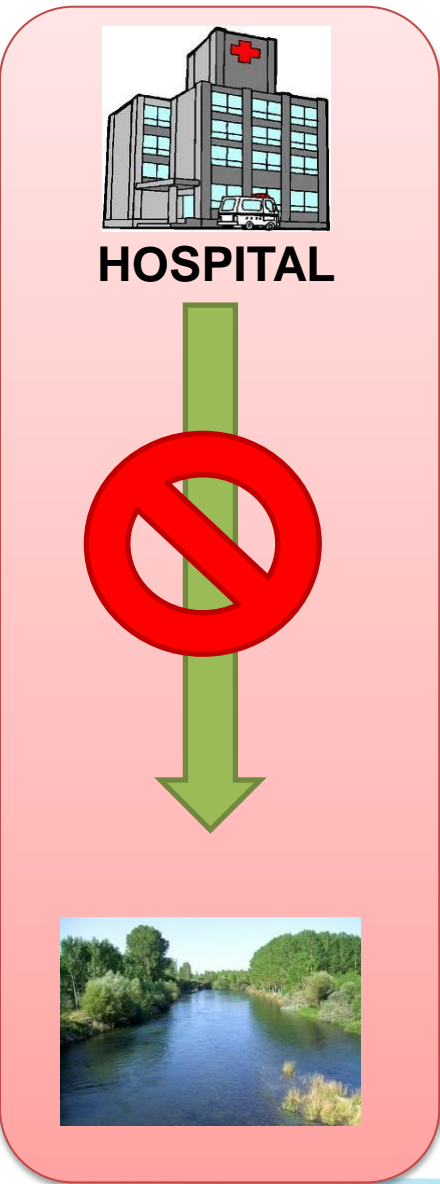
Trametes versicolor

Unknown



***T. versicolor* survived until the end of the treatment: laccase activity is not a good indicator**

ESCENARIOS DE GESTIÓN DE EFLUENTES DE HOSPITAL



Tractament en continu d'HWW amb *T. versicolor* en reactor

S'ha comprovat la capacitat de *T. versicolor* per degradar fàrmacs:

- ✓ Badía-Fabregat et al., 2014
- ✓ Rodríguez-Rodríguez et al., 2014
- ✓ Cruz-Morató et al., 2013

Inconvenients al tractament d'aigües d'hospitals reals

- Necessitat d'addicionar nutrients.
- Competència amb bacteris.



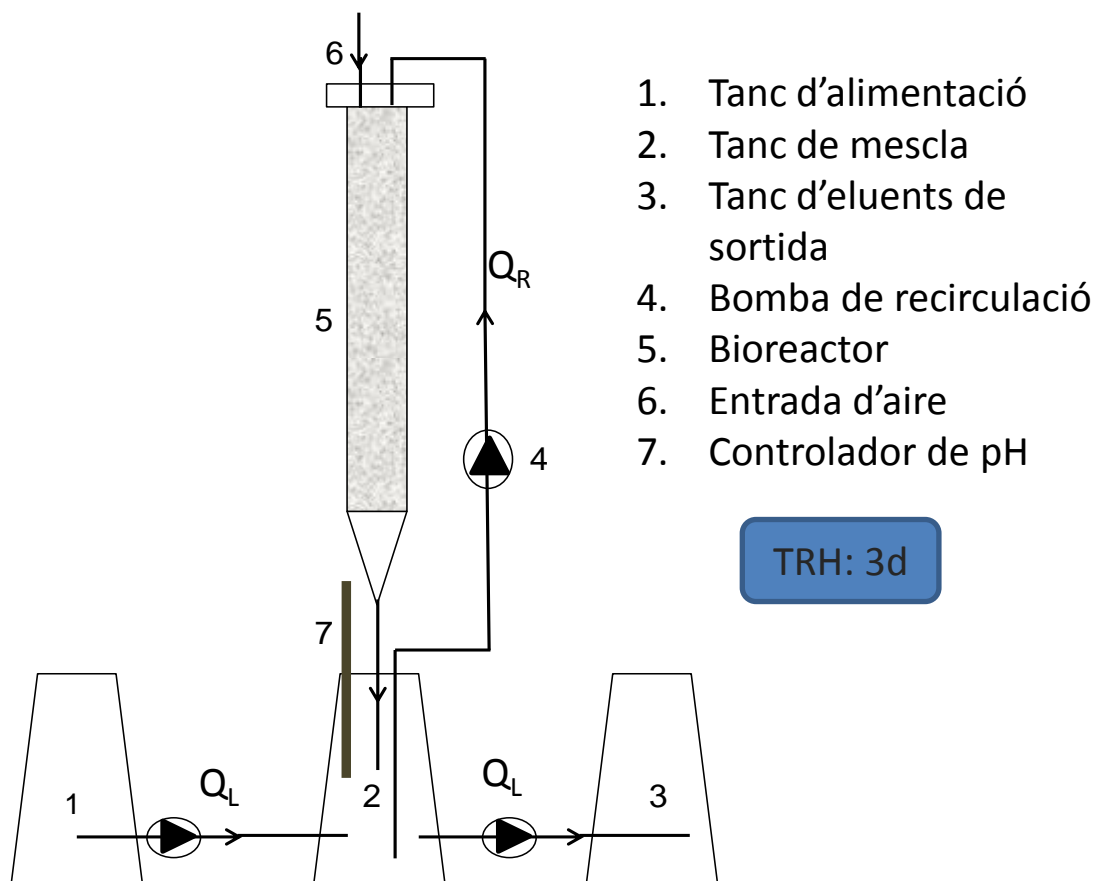
Possibles solucions → Estratègies

- Pretractament de l'efluent.
- Altres configuracions de reactors
- Canvi en la font de carboni



Tractament en continu d'HWW amb *T. versicolor* en reactor

Alternativa: filtre percolador amb *T. versicolor* pre-crescut sobre fusta



TRH: 3d

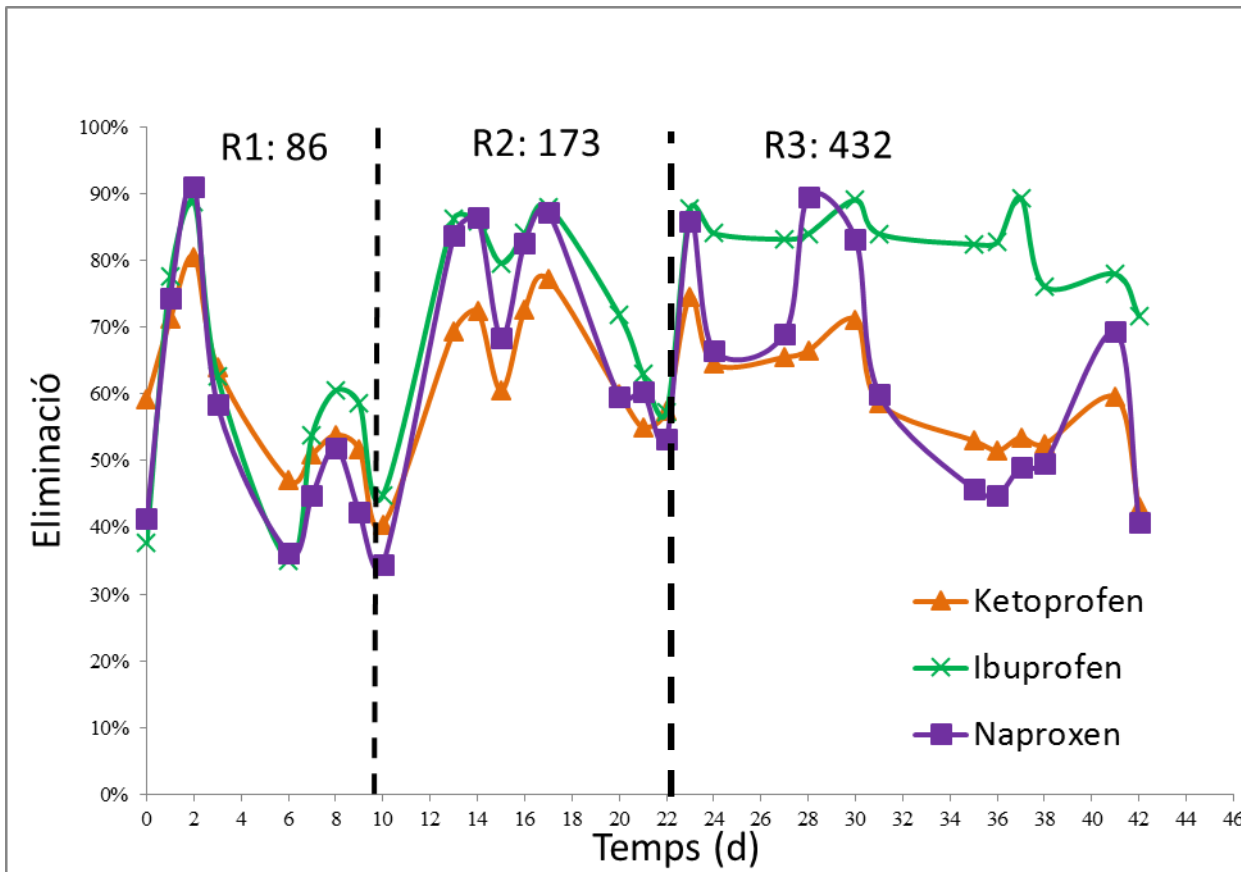
Posada a punt del sistema:

- * TRH
- * Relació Q_R/Q_L



Tractament en continu d'HWW amb *T. versicolor* en reactor

Alternativa: filtre percolador amb *T. versicolor* pre-crescut sobre fusta

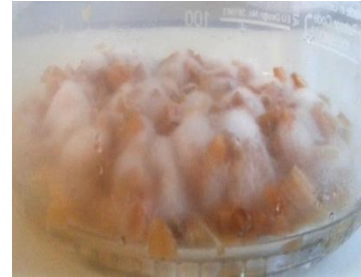




Efluent hospital real (HWW)



Trametes versicolor

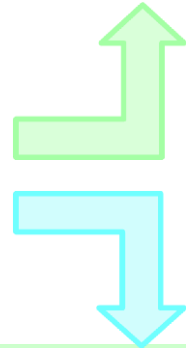


T. versicolor crescut sobre fusta



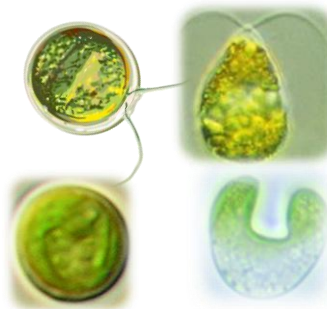
Filtre percolador amb *T. versicolor* crescut sobre fusta

Desenvolupament processos



Aigües residuals urbanes (UWW)

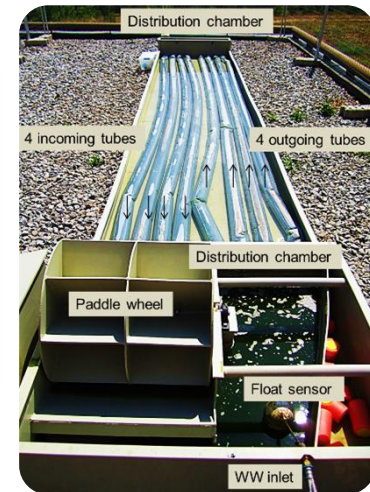
Valorització de residus



Microalgues



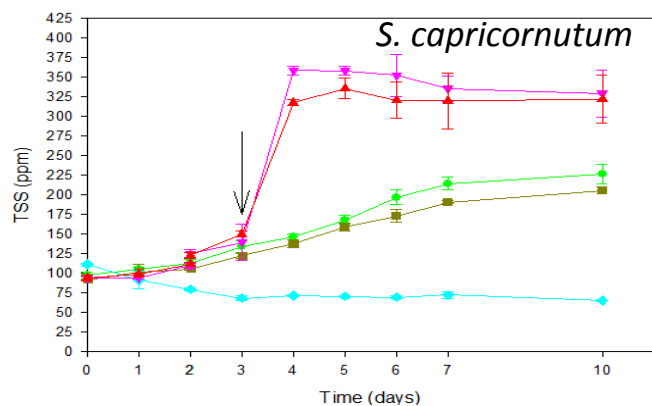
Degradació a escala Erlenmeyer



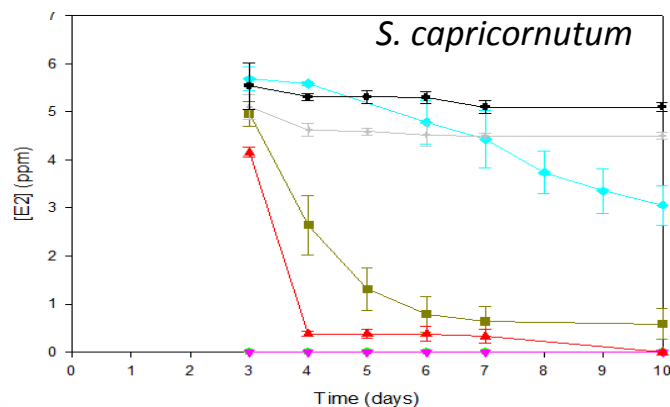
Fotobioreactor FBR

Degradació d'hormones i fàrmacs per microalgues

- Degradació d'hormones del digestat d'un DA dopat amb E2 i EE2 amb les algues *S. capricornutum* i *C. reinhardtii*: creixement i degradació



- A (algae+medium)
- B (algae+medium+hormone)
- C (killed algae+medium+hormone)
- F (algae+medium+effluent)
- G (algae+medium+effluent+hormone)



- A (algae+medium)
- B (algae+medium+hormone)
- C (killed algae+medium+hormone)
- D (medium+hormone)
- E (medium+hormone, light protected)
- F (algae+medium+ADC)
- G (algae+medium+ADC+hormone)

- No efecte tòxic de les hormones sobre les algues
- Utilització de digestat de llots per creixer

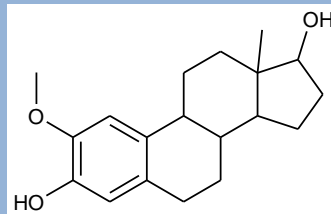
	<i>Selenastrum capricornutum</i>				<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			
	E2 (%)		EE2 (%)		E2 (%)		EE2 (%)	
	24h	7d	24	7d	24h	7d	24	7d
B	47	88	30	60	89	100	26	100
C	2	46	0	41	27	86	6	71
G	91	100	27	95	98	100	28	76

Degradació d'hormones i fàrmacs per microalgues

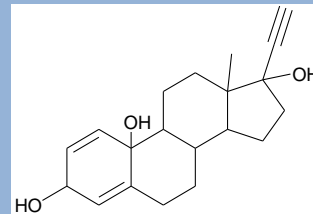
- Identificació productes de degradació d'E2 i EE2:

- Es detecten diferents productes de degradació d'E2 i EE2
- Majoritàriament productes de fotodegradació
- Alguns directament relacionats amb la biodegradació per part de les algues

E2 TP1



EE2 TP2



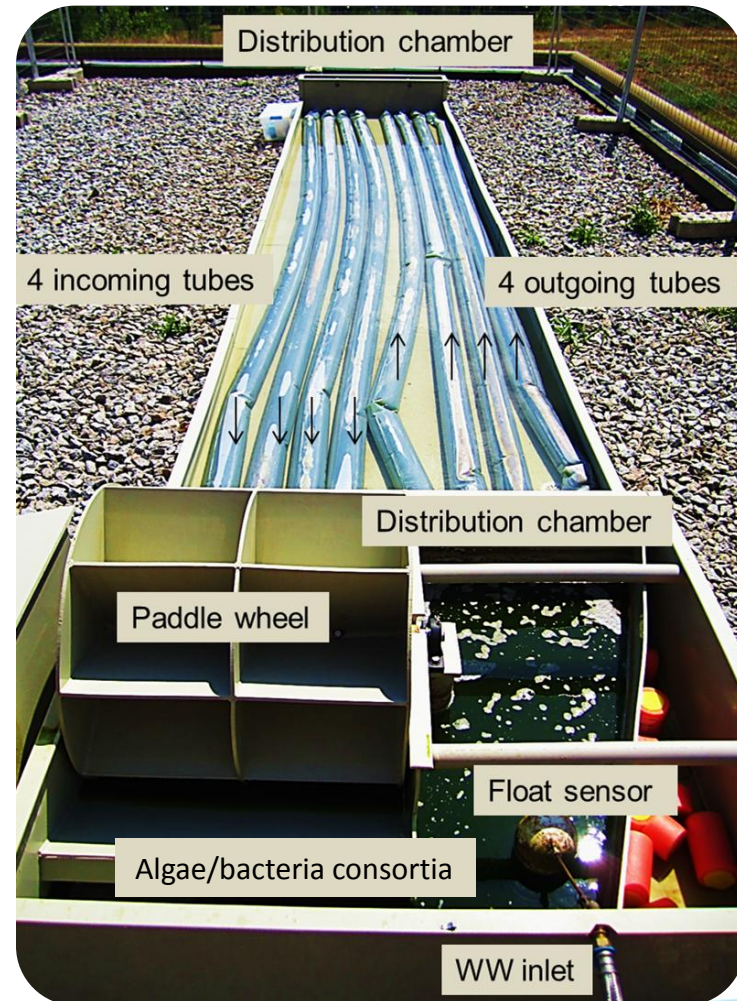
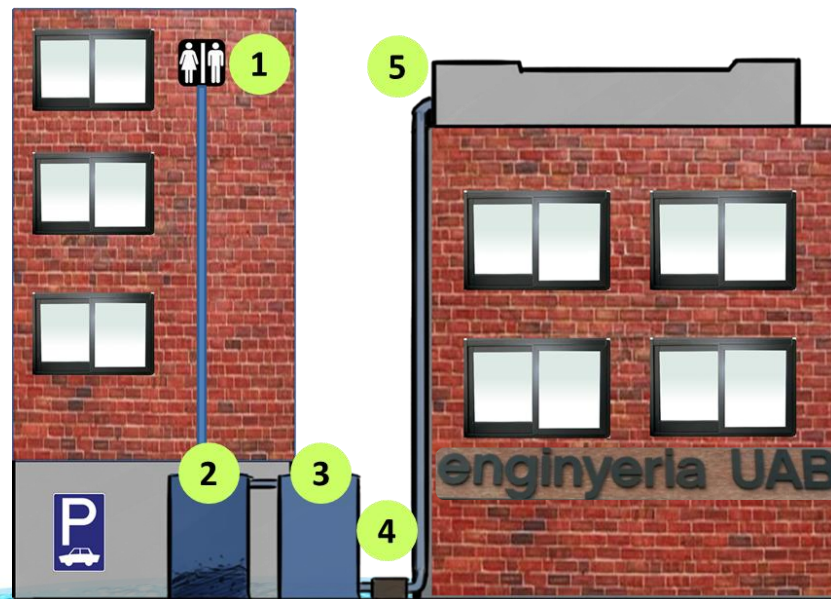
Tractament d'UrbanWW i eliminació de PhACs en FBR

Fotobioreactor de tractament d' UrbanWW despres de decantació

Volum 1000L

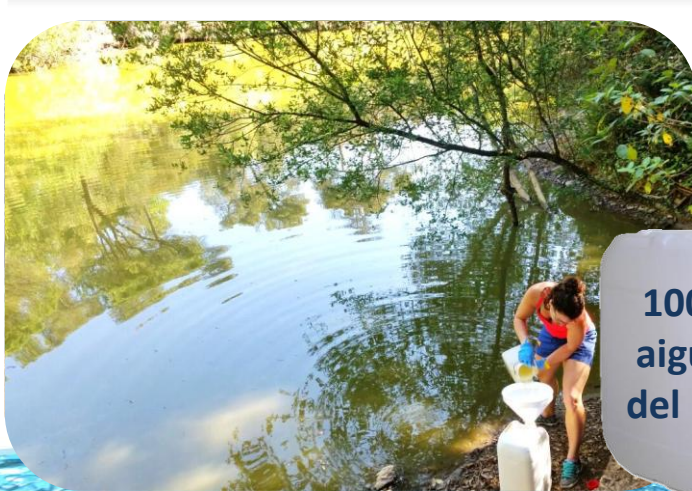
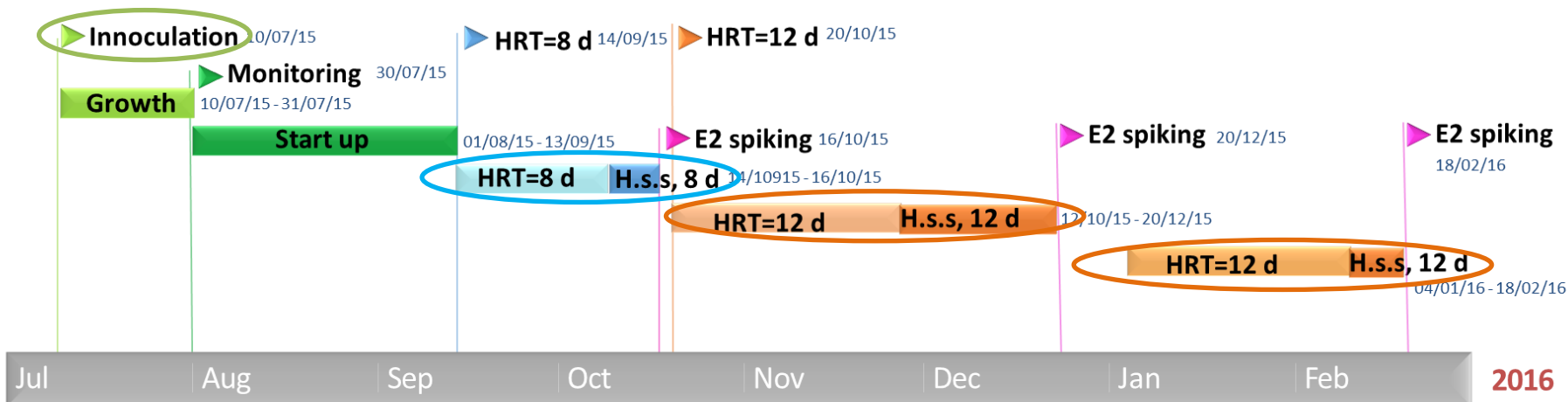
Semiobert

Tubs plastic transparent



Tractament d'UWW i eliminació de PhACs en FBR

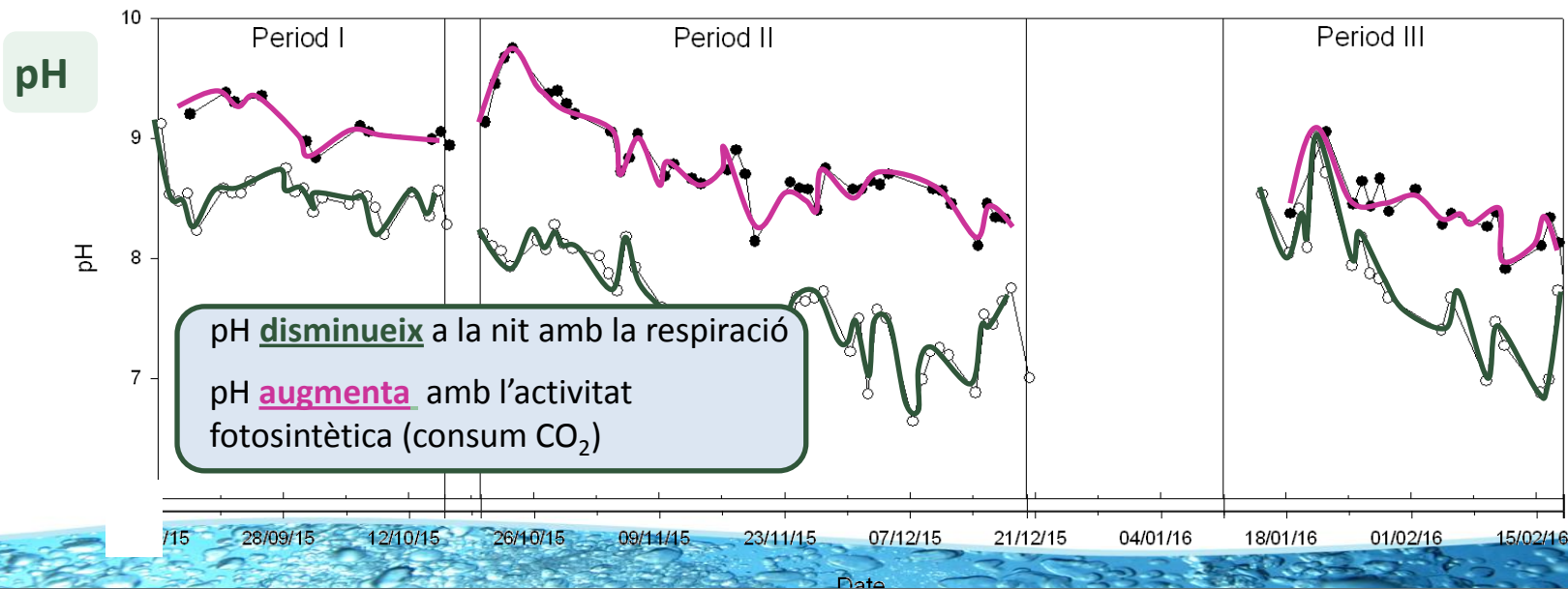
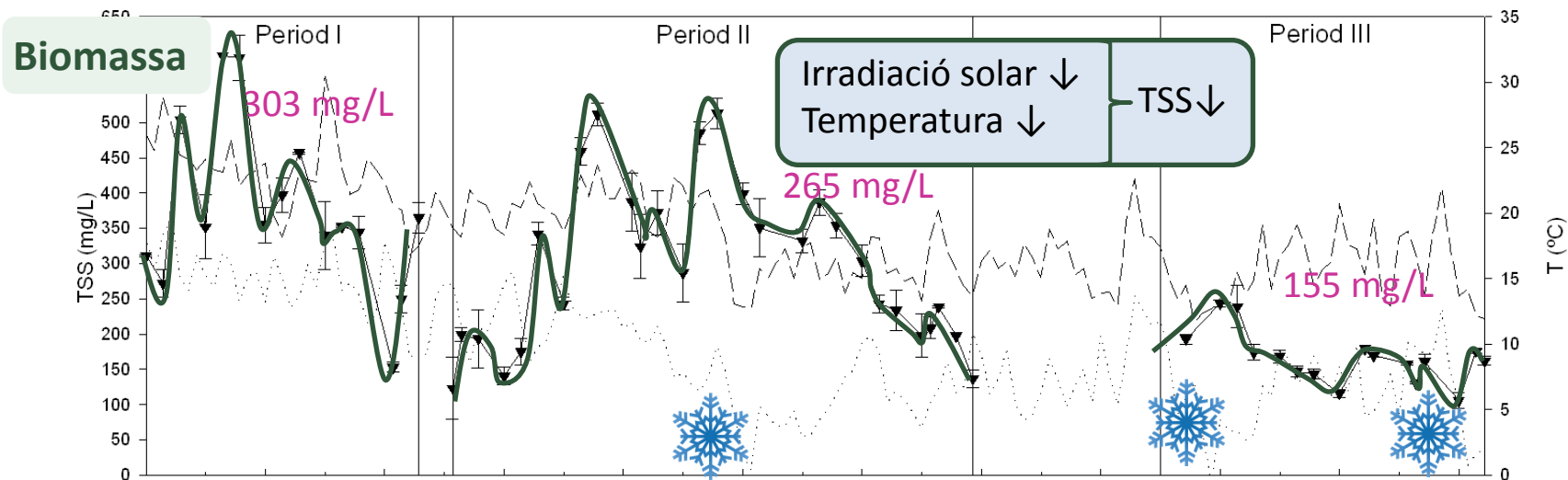
Plàn d'operació del FBR



Estat Estacionari

- PhACs
- Biodiversitat

Tractament d'UWW i eliminació de PhACs en FBR



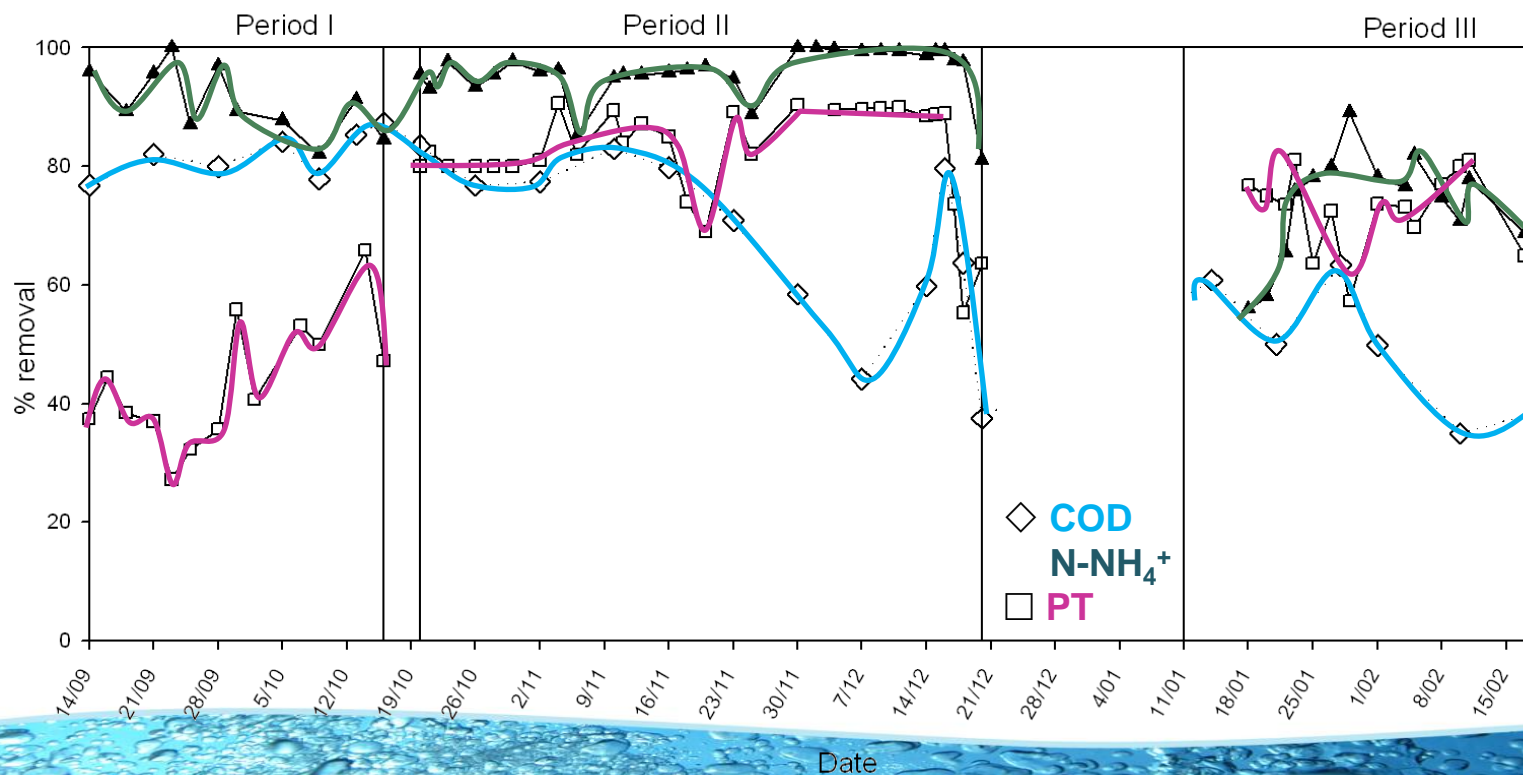
Tractament d'UWW i eliminació de PhACs en FBR

Eliminació de nutrients

Entrada

- COD=365 mg/L
- N-NH₄⁺=79 mg/L
- PT=17 mg/L

Paràmetre	Període I	Període II	Període III
DQO (%)	83	61	41
N-NH ₄ ⁺ (%)	86	99	80
PT (%)	54	89	75



Tractament d'UWW i eliminació de PhACs en FBR

PhACs

Antiinflamatoris
Eliminació >85%

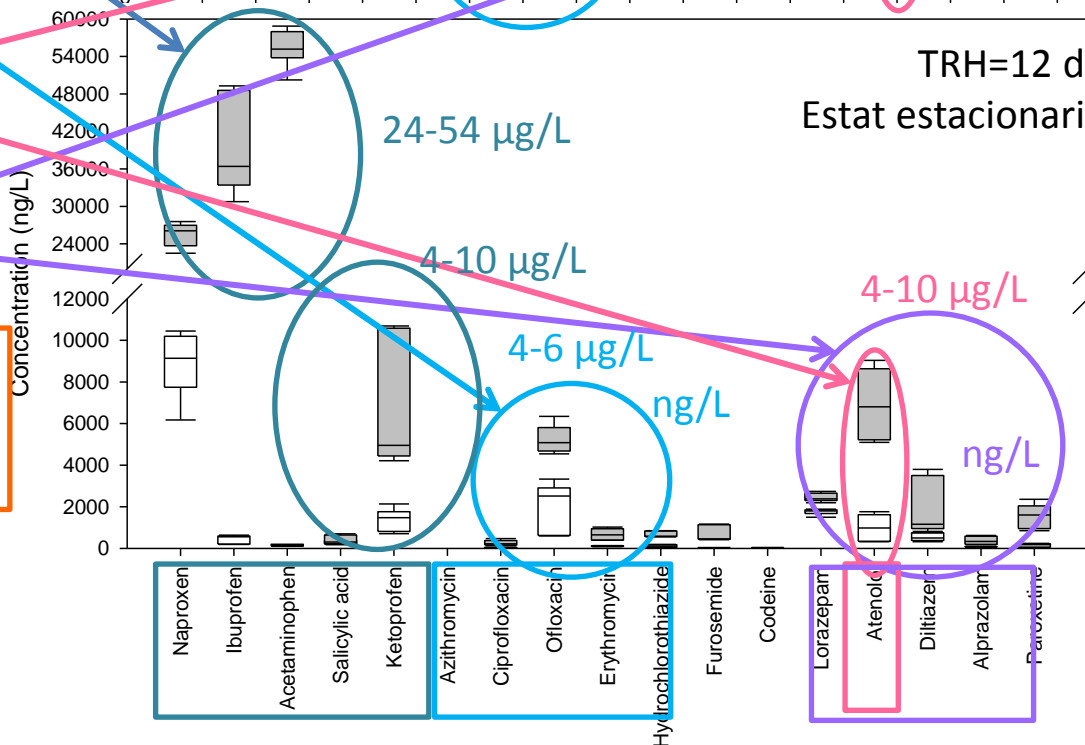
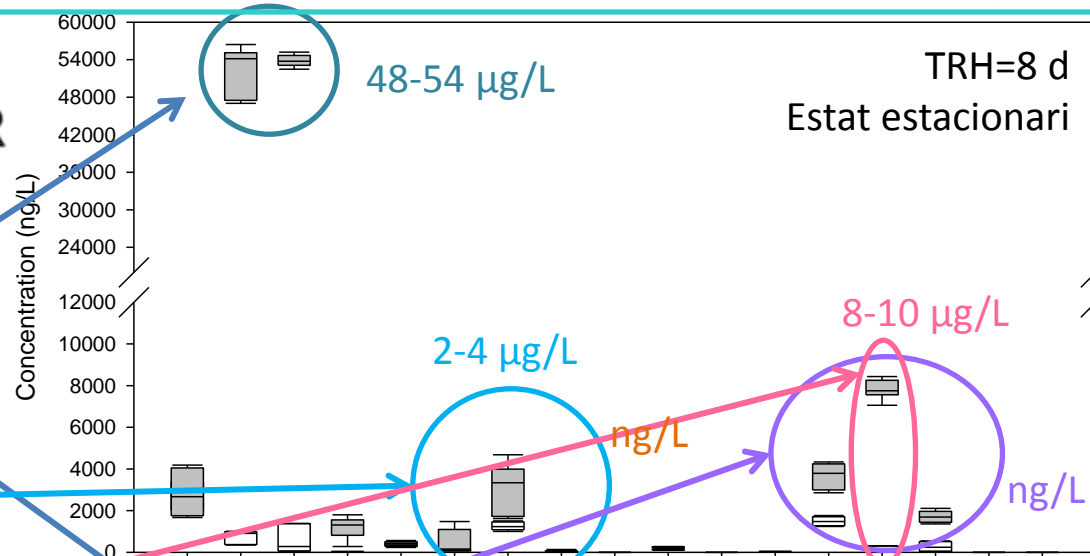
Antibiòtics
Eliminació > 67%

β-bloquejants
Eliminació >86%

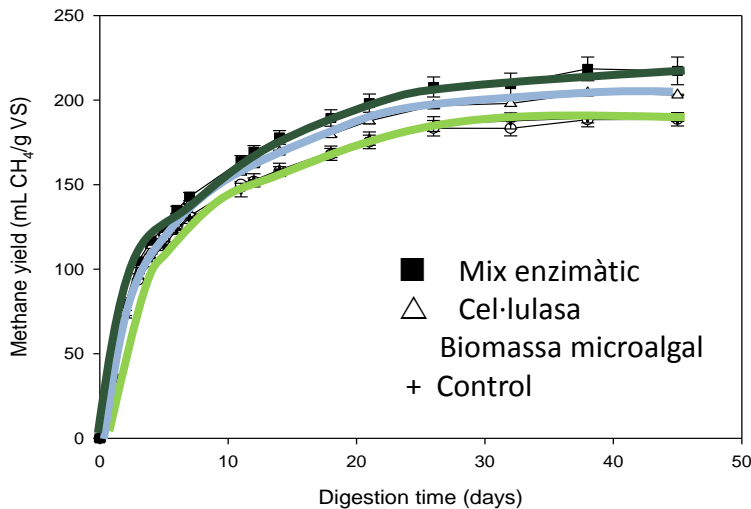
Antidepressius
Eliminació >87%

Altres (ng/L)
Diurètics >44%
Bloquejants de canal lent >72%

■ Concentració PhACs entrada
□ Concentració PhACs sortida



Valorització de biomassa algal mitjançant pretractament enzimàtic i DA



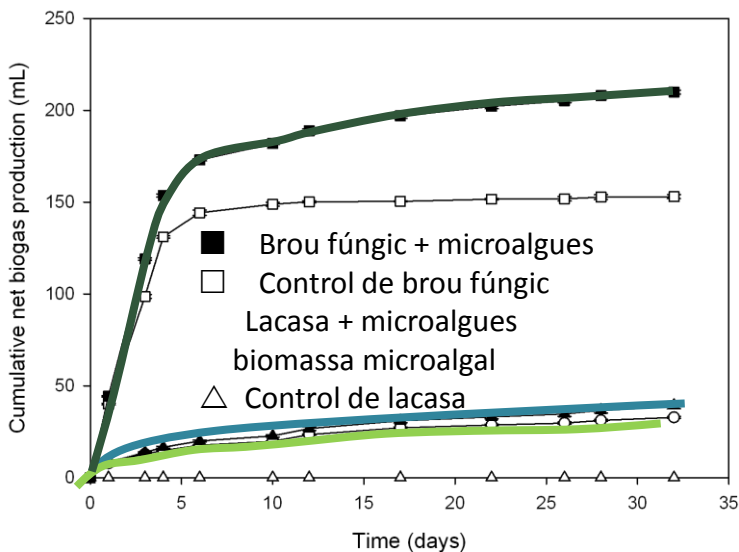
Producció de biogas amb enzims específics

Mix enzimàtic
217 mL CH₄/g VS

Cel·lulasa
203 mL CH₄/g VS

Microalgues
188 mL CH₄/g VS

Mix enzimàtic millora la producció de metà



Producció de biogas amb enzims no específics

Brou fúngic
210 mL CH₄

Lacasa
40 mL CH₄

Microalgues
38 mL CH₄

Brou fúngic millora la producció de metà



Projecte de col·laboració entre el Consorci per a la Gestió de Residus del Valles Oriental i el grup de recerca Biorem UAB (2014SGR476) dins del marc del programa de Doctorats Industrials de la Generalitat de Catalunya



RESULTATS DE L'ANY 2015



FORM
49.000 T/any



BIOGÀS
3.610.741 m³/any



COMPOST
3.815 T/any



Generació
electricitat
7,1 GWh/any



Equivalent al
consum
d'aprox. 6200
habitants/any



Estalvi en 2.736 T CO₂/any



FASE I- CODIGESTIÓ

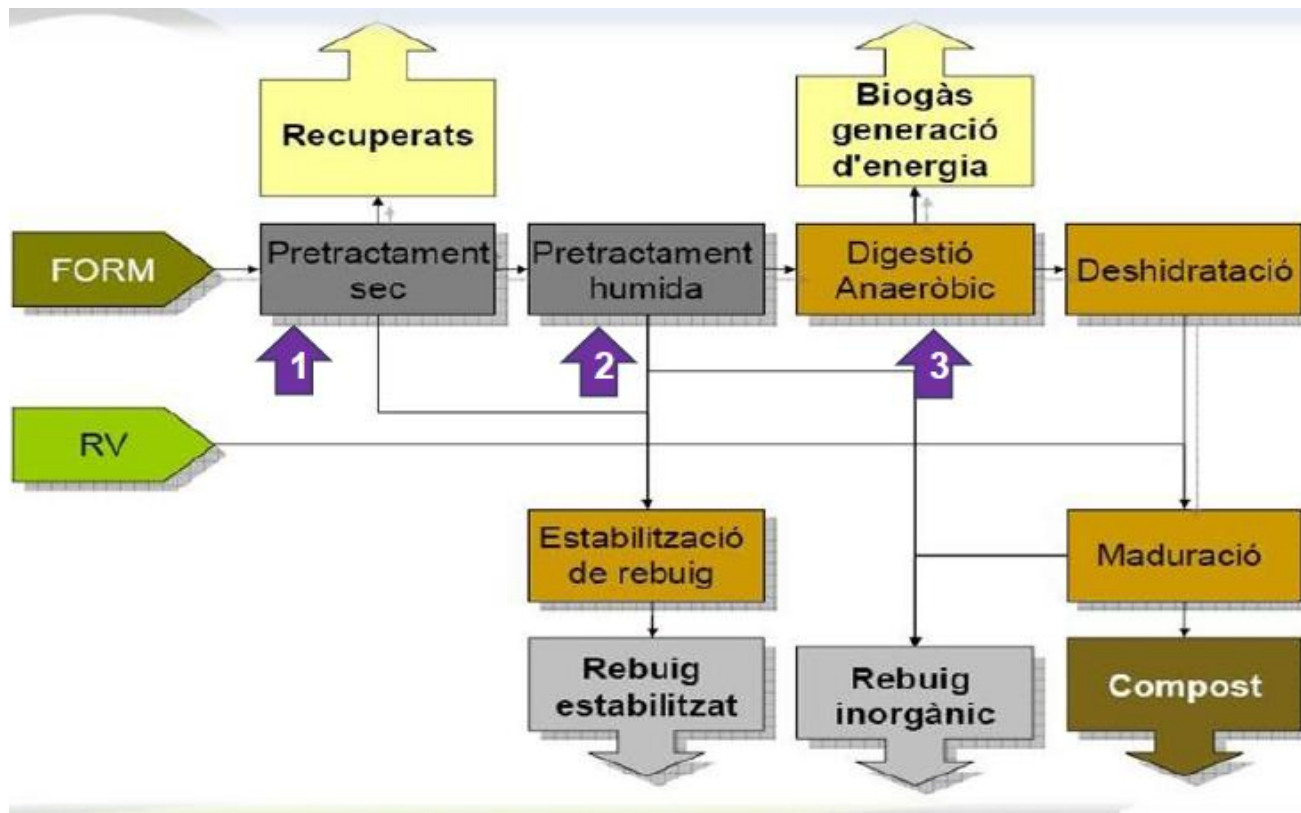
- RECERCA RESIDUS SUSCEPTIBLES SERVIR COM A COSUBSTRATS.
- VALORACIÓ EXPERIMENTAL DEL POTENCIAL DE BIOGÀS.



FASE II- ANÀLISI DE FLUXOS

- Anàlisi de fluxos de materials i energètics amb l'objectiu de millorar el coneixement de la instal·lació, en la gestió i possibilitats de recuperar calor d'algun d'ells.





RESIDU	Nm3 biogàs/T SV	Nm3 metà/T SV
RESIDU ORGÀNIC COMERCIAL SENSE TRITURAT	448	283
	+55%	+66%
RESIDU ORGÀNIC COMERCIAL TRITURAT	694	469
	+36%	+33%
FORM	509	353

Bioremediació “in situ” d'aqüífers contaminats per compostos organoclorats

*Decloració d'organoclorats mitjançant bacteris
dehalorespiradors*

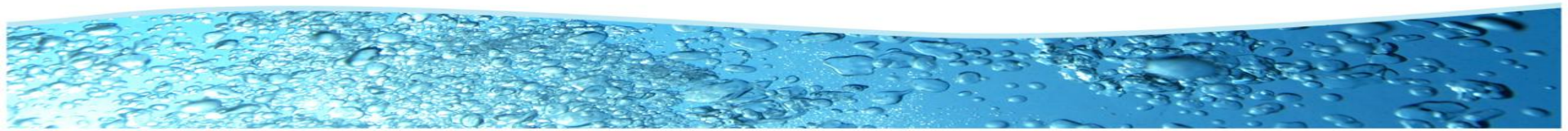
UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



INVESTIGACIÓN **litoclean**
& REMEDIACIÓN DE SUELOS

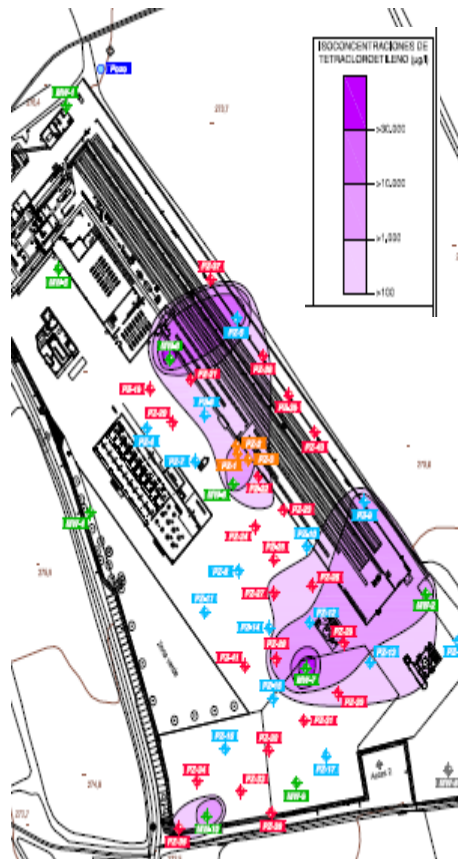
***Projecte de col·laboració entre Litoclean i el grup de recerca Biorem
UAB (2014SGR476) dins del marc del programa de Doctorats
Industrials de la Generalitat de Catalunya***



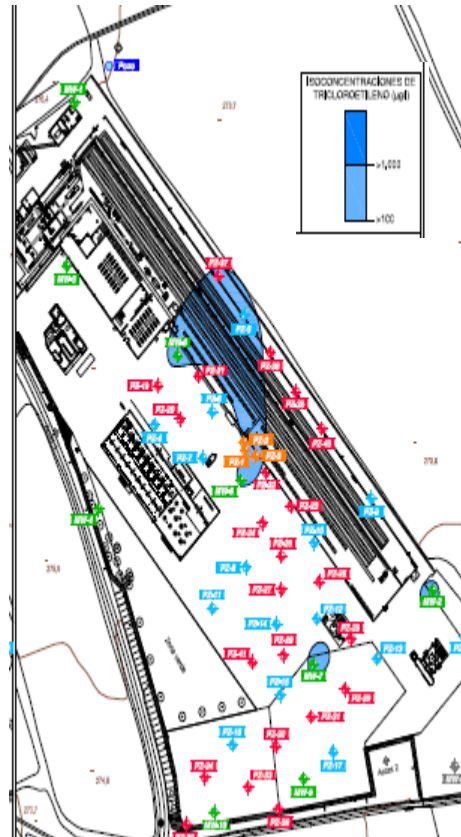
1. Tecnologia consolidada amb centenars de casos d'aplicació amb èxit.
 2. Transformació de productes organoclorats tòxics a innocus.
 3. Compatible amb altres mètodes de remediació.
 4. Disminució del temps de remediació de l'aquífer i costos associats.
 5. Tecnologia més econòmica que tractaments fisico-químics.
 6. Potencialment pot eliminar els cloroalcans a concentracions ≤ 0.005 mg/L.
 7. Percepció social
- Marc del projecte:
 - Aplicació de metodologies de Bioremediació per via anaeròbia en tres emplaçaments afectats per la presència de compostos organoclorats.
 - Cada un d'aquests tres emplaçaments, consta/rà de les següents fases:
 - Fase 1: anàlisi al laboratori
 - a) Caracterització de l'emplaçament.
 - b) Assaig de laboratori. Microcosmos.
 - Fase 2: assaig in-situ.
 - Fase d'implantació: A partir dels resultats obtinguts, aplicació de metodologia a l'emplaçament estudiat per part de Litoclean.

Característiques de l'emplaçament

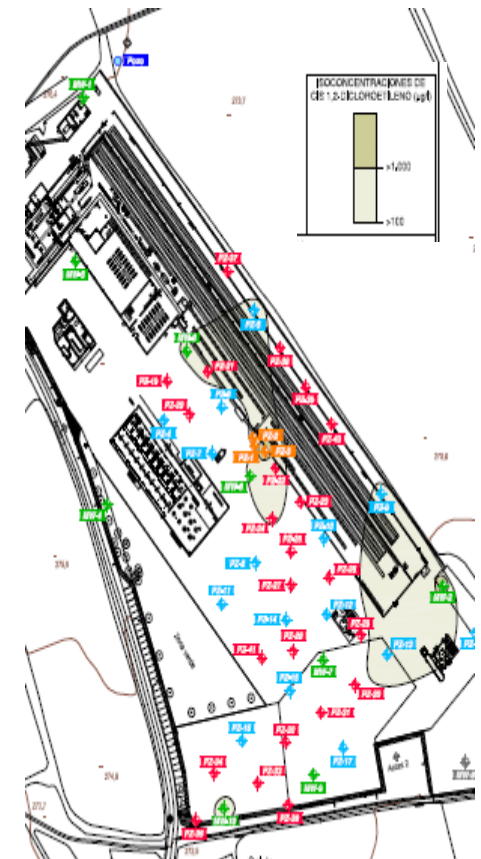
- Emplaçament contaminat per un abocament controlat i finit de Percloretilè (PCE) en una parcel·la amb activitat industrial.



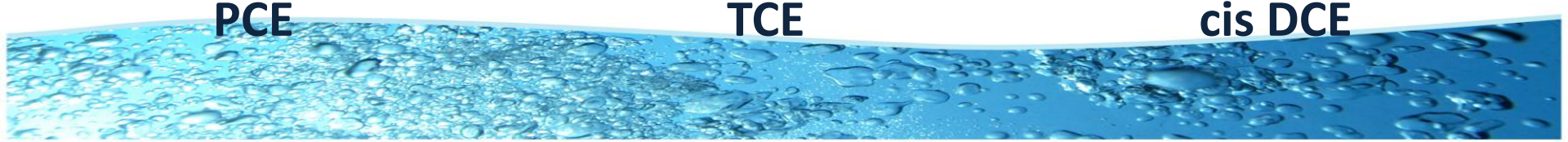
PCE



TCE

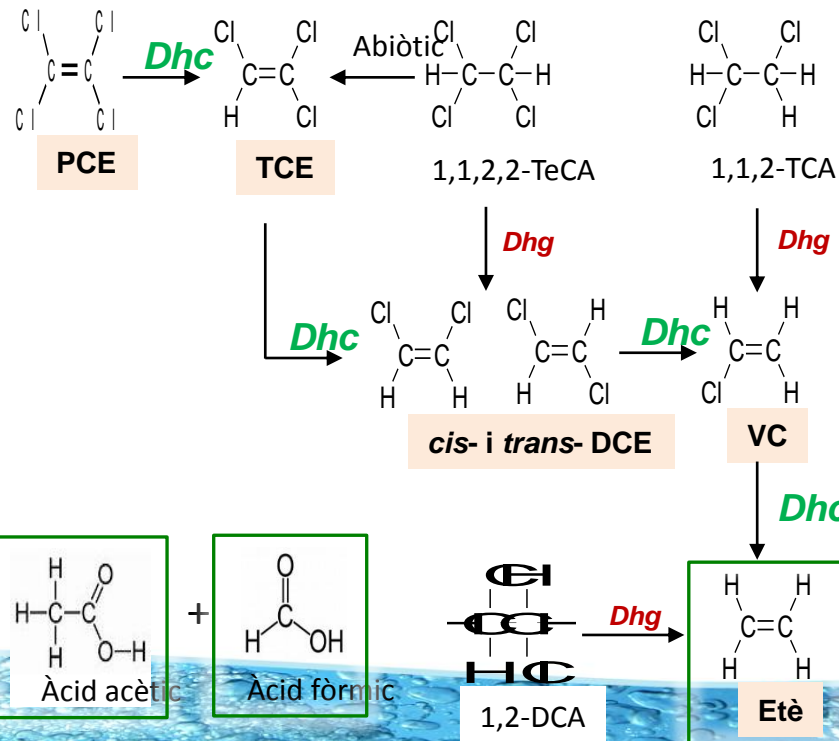


cis DCE



Bacteris dehalorespiradors

- Respiren compostos orgànics clorats i els transformen a molècules menys clorades.
- Anaerobis estrictes.
- Es poden trobar als aquífers contaminats.
- El grup Biorem UAB (2014SGR476) disposa de diferents línies de cultius de bacteris dechloradors amb **capacitat per detoxificar** un ampli ventall d'organoclorats.



Dhc: Dehalococcoides
Dhg: Dehalogenimonas
Dhb: Dehalobacterium

- Trueba-Santiso et al. 2017. *Sci. Total. Environ.*, 581-582, pp. 640-648.
- Mortan et al. 2017. *J. Hazard. Mat.* In press.

1a Pregunta

Les condicions d'aquests aqüífers són adequades per eliminar els compostos organoclorats amb bacteris dehalorespiradors?

1. Anàlisi dels paràmetres de camp

Fase 1

2a Pregunta

Les poblacions bacterianes autòctones poden transformar els contaminants fins a compostos innocus?

2. Detecció de l'activitat dechloradora

Fase 2

3a Pregunta

La població bacteriana a l'aqüífer és suficient per completar el procés de descontaminació de forma natural?

Atenuació natural monitoritzada

Bioestimulació

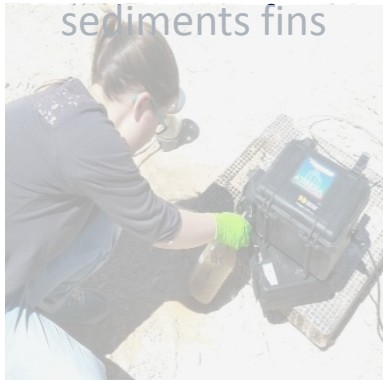
Bioaugmentació



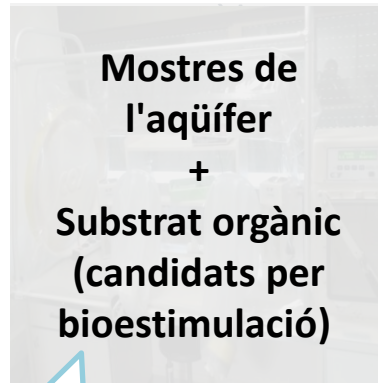
2. Detecció de l'activitat decloradora

Cultius anaerobis i anàlisi de metabòlits

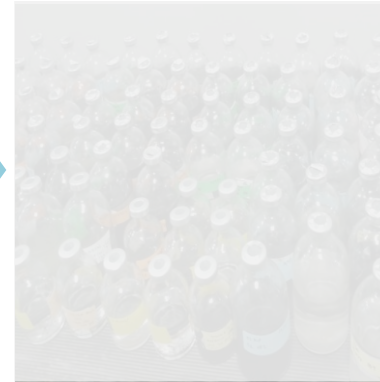
Mostreig d'aigua
del pou amb
sediments fins



Preparació dels
cultius en cambra



Incubació dels
cultius en cambra



Anàlisi de
metabòlits per



Concentració de
cloroetens

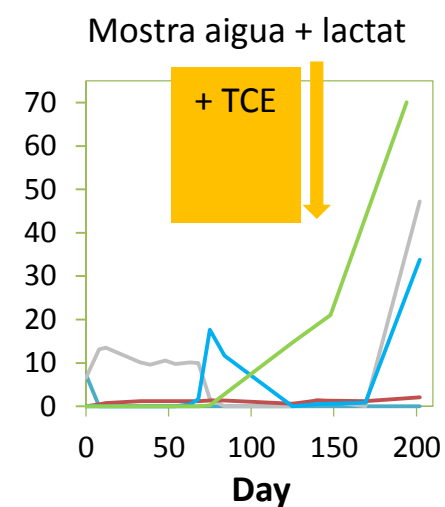
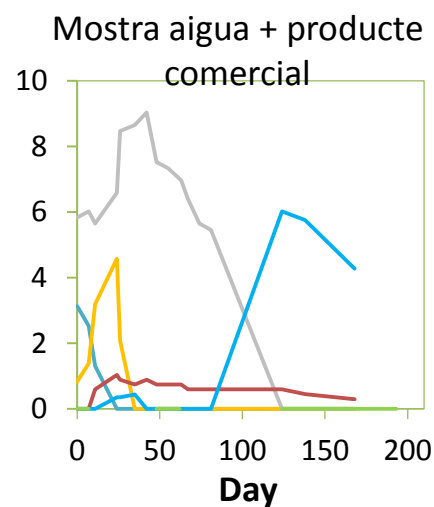
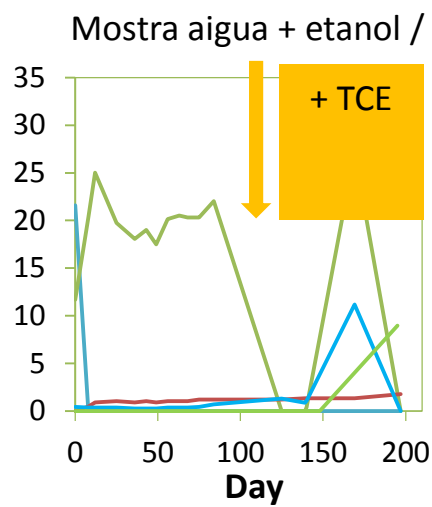
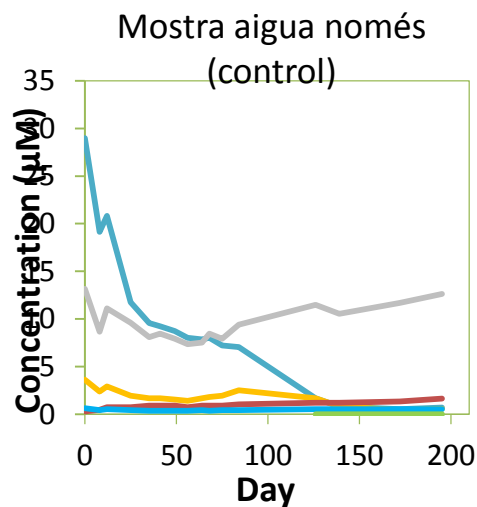
1. Només mostra
2. + Metanol i etanol
3. + Producte comercial
4. + Lactat



Fase
1

2. Detecció de l'activitat decloradora

Cultius anaerobis i anàlisi de metabòlits



✓ La bioestimulació és efectiva

✓ La decloració més ràpida és amb lactat

✓ La biodegradació és completa (etè)

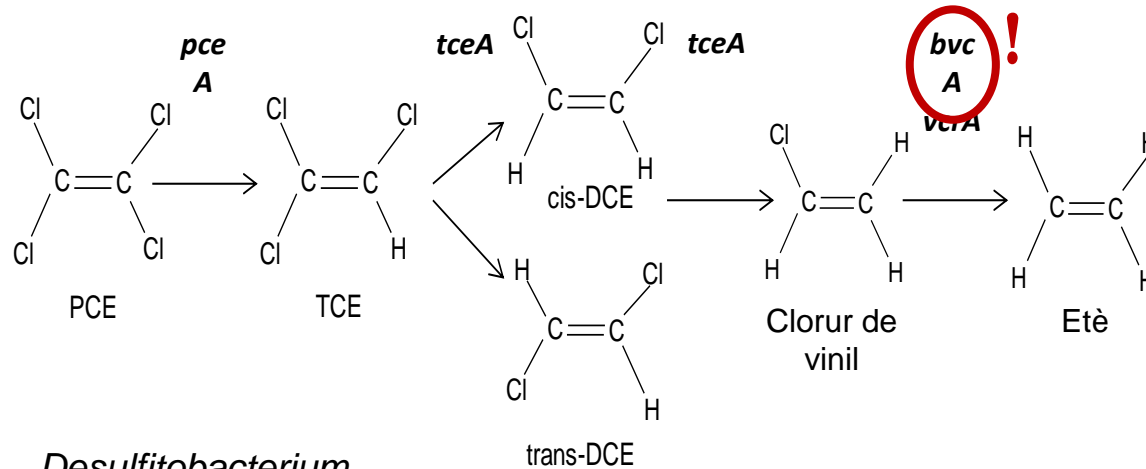
Resultats per a un pou

Fase 1

2. Detecció de l'activitat decloradora

Tècniques moleculars (PCR)

Detecció i identificació dels bacteris i enzims responsables de la degradació completa

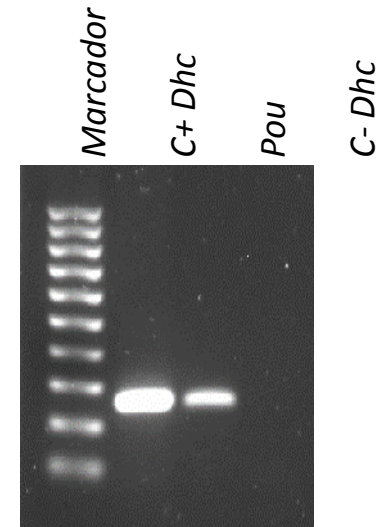


Desulfitobacterium

Dehalobacter, Desulforomonas,

Sulfurospirillum, Geobacter, Desulfitobacterium

Dehalococcoides



Assaig *in situ* per BIOESTIMULACIÓ

Injecció i monitorització

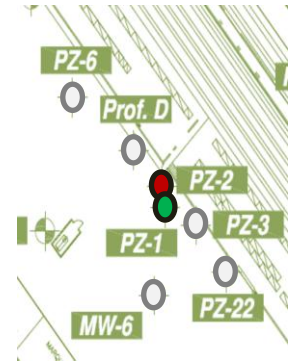


- Injecció d'estimulant segons conclusions de l'assaig de laboratori (**Lactat comercial**), en les concentracions de diseny.
- Injecció de traçador (fluoresceïna)



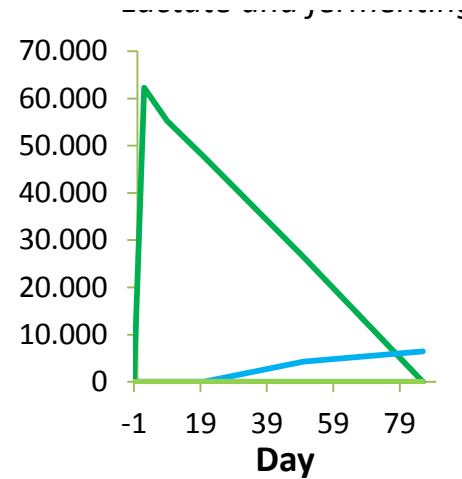
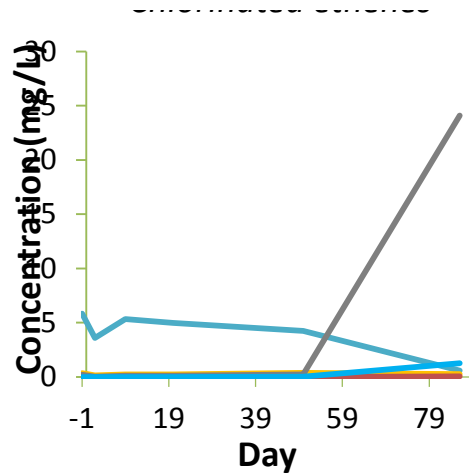
Direct injection of lactate (MW-PZ2)

Monitoring Wells: PZ2, PZ1, PZ3, MW6, PZ22, PZ6 and ProfA.



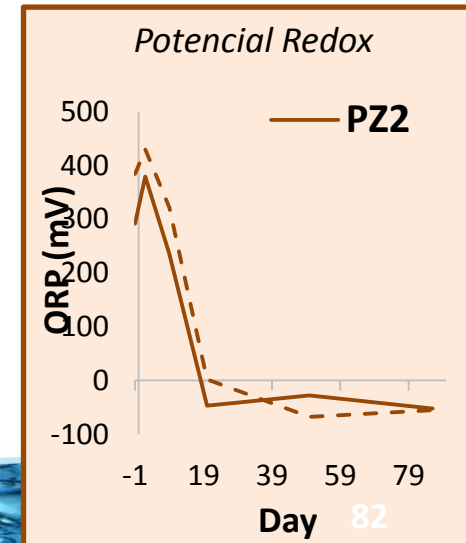
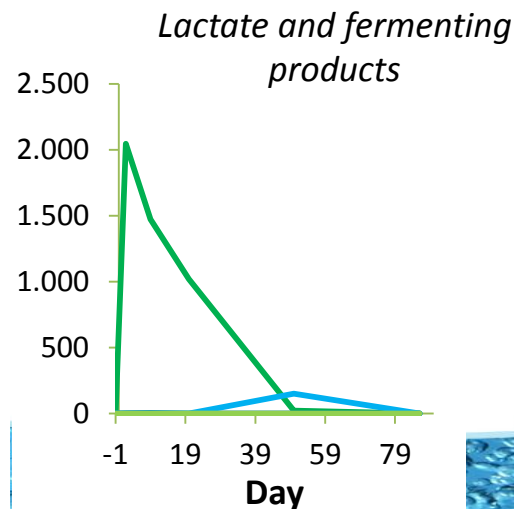
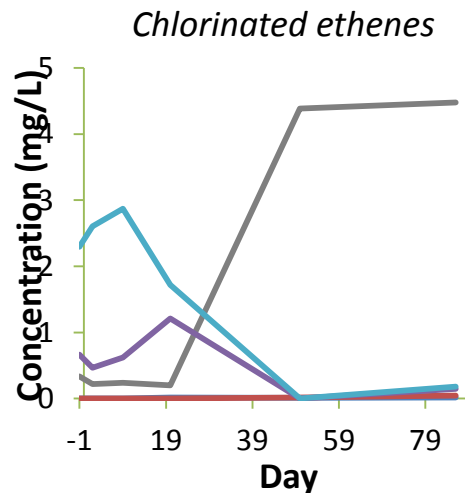
Well PZ-2

- PCE
- TCE
- *cis*-DCE
- *trans*-DCE
- CV
- Ethene



- Lactate
- Pyruvate
- Acetate
- Formate

Well PZ-1



Conclusions de la **Fase 2** (assaig *in situ*)

- ✓ Els **resultats de la Fase 1** són **vàlids** per decidir quin tractament de bioremediació seguir a la Fase 2.
- ✓ El **lactat** estimula la degradació:
 - Augmenta la velocitat de decloració
 - Proporciona acetat i hidrogen als bacteris
 - **Consumeix l'oxigen** present
 - **Disminueix el potencial redox**
- ✓ Es detecta **degradació** de PCE i transformació a **compostos menys clorats**.
- ✓ Es confirma la presència de **bacteris dehalorespiradors autòctons i actius**.

A partir dels resultats obtinguts durant les dues fases es dissenyarà i es proposarà l'execució d'un **procés de bioremediació anaeròbia estimulada** aplicant la metodologia establerta.



Gràcies



Grup de recerca BioremUAB (teresa.vicent@uab.cat)

UAB