

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 080**

51 Int. Cl.:

**C02F 3/12** (2006.01)

**C02F 3/34** (2006.01)

**C12P 7/62** (2012.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2016 E 20186433 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.01.2022 EP 3760591**

54 Título: **Proceso para producir un compuesto de almacenamiento microbiano**

30 Prioridad:

**03.12.2015 EP 15197866**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.05.2022**

73 Titular/es:

**PAQUES BIOMATERIALS HOLDING B.V. (100.0%)  
Tjalke de Boerstrjitte 24  
8561 EL Balk, NL**

72 Inventor/es:

**DIJKMAN, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 911 080 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso para producir un compuesto de almacenamiento microbiano

5

**Campo de la invención**

[0001] La invención se refiere a un proceso para producir polihidroxialcanoato (PHA) a partir de aguas residuales que comprenden DQO fácilmente biodegradable (DQOFB) usando lodos activados que comprenden bacterias capaces de acumular PHA.

10

**Antecedentes**

[0002] Se sabe que algunos microorganismos que se encuentran en lodos usados para el tratamiento aeróbico de aguas residuales son capaces de producir compuestos de almacenamiento microbiano, como, por ejemplo, poli(hidroxialcanoato) (PHA) o glicógeno, como compuesto de reserva. Existe un interés creciente en los procesos de tratamiento de aguas residuales donde se maximiza la acumulación de PHA en bacterias acumuladoras de PHA para recuperar dicho PHA de estas bacterias, por ejemplo, para su aplicación como bioplásticos.

15

20

[0003] Los procesos para la selección de microorganismos capaces de producir PHA u otros compuestos de almacenamiento microbiano son conocidos en la técnica y comprenden generalmente varios ciclos que alteran una denominada fase de festín, donde los lodos que comprenden bacterias acumuladoras de PHA se alimentan con un sustrato que comprende compuestos orgánicos fácilmente biodegradables (denominados demanda química de oxígeno fácilmente biodegradable o DQOFB) con una denominada fase de hambruna, donde se retiene el sustrato de las bacterias. En la fase de festín, las bacterias acumuladoras de PHA convierten DQOFB, como los ácidos grasos volátiles (AGV) en PHA. En la fase de hambruna, el PHA acumulado en las bacterias se usa como alimento, lo que da como resultado la selección de aquellas bacterias que son capaces de acumular PHA u otros compuestos de almacenamiento bacteriano.

25

30

[0004] Por ejemplo, la WO00/52189 divulga un proceso para la producción de polihidroxialcanoato, donde, en un primer paso, se seleccionan microorganismos capaces de acumular PHA sometiendo, de forma alterna, a los microorganismos a una fase donde se añade sustrato (fase de festín) y una fase donde se retiene sustrato (fase de hambruna). En un paso de acumulación, el PHA se acumula sometiendo algunos de los microorganismos seleccionados en el primer paso a un sustrato, preferiblemente una corriente que comprende ácidos grasos. En el proceso de WO00/52189, el paso de selección con fases alternas de festín y hambruna se lleva a cabo en un primer reactor y el paso de acumulación se lleva a cabo en un segundo reactor separado.

35

[0005] La WO2011/073744 también divulga un proceso para seleccionar microorganismos filamentosos (biomasa) capaces de producir PHA sometiendo, de forma alterna, la biomasa a condiciones de festín y hambruna. En el proceso de la WO2011/073744, las condiciones de festín y hambruna se pueden aplicar secuencialmente en el mismo reactor o en reactores separados. Los lodos (la biomasa) extraídos del proceso de selección se pueden someter a una mayor acumulación en un paso separado o a extracción de PHA.

40

[0006] La WO2012/023114, la WO2014/108864 y la WO2014/108878 describen métodos similares. En todos estos métodos, cualquier paso de acumulación se realiza en un reactor separado. En el proceso de la WO2014/108878 se controlan las proporciones de nitrógeno a DQOFB y/o fósforo a DQOFB en la alimentación.

45

[0007] La WO2013/022874 divulga un proceso para la producción de PHA utilizando lodos de retorno en un depósito de aireación, de tal manera que se proporciona un régimen de festín-hambruna en el mismo depósito de aireación. Los lodos de retorno se pueden tratar en un reactor de corriente de retorno donde se aplica una proporción de alimentación a biomasa relativamente baja. No se revela ni sugiere ninguna acumulación.

50

[0008] Serafim et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (2008) 615-628, y Bengtsson et al. *Bioresource Technology* 99 (2008) 509-516, divulga procesos para la producción de PHA usando cultivos mixtos en reactores continuos o por lotes de secuenciación, donde los ciclos de festín y hambruna pueden realizarse en un solo reactor (de selección). En los métodos del estado de la técnica, la selección de organismos acumuladores de PHA se realiza usando un régimen de festín y hambruna y un exceso de nutrientes con el fin de cultivar biomasa enriquecida con organismos capaces de acumular PHA. La acumulación final de PHA en la biomasa enriquecida obtenida debe llevarse a cabo en un paso de acumulación separado para alcanzar el contenido máximo de PHA en los lodos.

55

60

[0009] La US 2009/0317879 divulga un método de biosíntesis de PHA alternando fases de privación de nutrientes (festín) y privación de materia prima de carbono (hambruna) de microbios productores de PHA. Sin embargo, el contenido de PHA de los microbios cultivados de acuerdo con la US '879 parece ser bastante bajo ("normalmente por encima del 20 %") y el suministro de carbono y el suministro de nutrientes se controla de forma absoluta: los nutrientes están ausentes en la primera etapa de ciclo y la fuente de carbono está ausente en

65

la segunda etapa de ciclo. Esto implica una separación completa de las etapas de acumulación y las etapas de crecimiento e impide el funcionamiento continuo. En la US '879 falta cualquier orientación adicional sobre cómo controlar el suministro de carbono y nutrientes y los tiempos de retención para llegar a niveles útiles de PHA y una gestión de procesos eficiente y simplificada.

### Resumen de la invención

[0010] Ahora se ha descubierto que el proceso para la selección de microorganismos capaces de producir PHA y una mayor acumulación de PHA en microorganismos seleccionados se pueden mejorar e integrar. Mediante el control de los niveles y la proporción de periodos de presencia mejorada y presencia reducida de elementos esenciales para el crecimiento y la gestión del tiempo de retención de lodos, se pueden alcanzar niveles altos de PHA de hasta el 80 % en peso o más en función del contenido orgánico de los lodos ya en el proceso de selección sin el requisito de un paso de acumulación adicional.

[0011] Además de una simplificación del proceso general para la producción de PHA a partir de aguas residuales que contienen DQOFB al eliminar el paso de acumulación, también se mejora la selección en dos puntos. En primer lugar, el nuevo procedimiento selecciona organismos acumuladores de PHA que pueden alcanzar un contenido de PHA intercelular muy alto, mientras que los procedimientos de selección del estado de la técnica seleccionan una captación rápida de DQOFB, pero no necesariamente por la capacidad de alcanzar los niveles más altos de PHA después de la acumulación. En segundo lugar, la presencia limitada de DQOFB y nutrientes al mismo tiempo, en combinación con los cortos tiempos de retención de lodos aplicados, minimiza la presencia de otros organismos no acumuladores de PHA en la biomasa producida. Esto da como resultado un mayor contenido total de PHA en los lodos producidos, lo que aumenta el rendimiento de PHA en DQOFB y reduce el costo de purificación del PHA.

### Resumen de los dibujos

[0012]

La figura 1 muestra esquemáticamente un sistema de un solo reactor para realizar el proceso de la invención. La figura 2 muestra un sistema de dos reactores fuera del alcance de la invención. La figura 3 muestra oxígeno disuelto durante el proceso de ciclo. Las figuras 4 y 5 muestran los niveles de PHA durante el proceso en un sistema de un solo reactor y un sistema de dos reactores, respectivamente.

### Descripción de la invención

[0013] El proceso según la invención es un proceso cíclico, como se define en la reivindicación 1, para producir un polihidroxiclcanoato (PHA). En el proceso, una corriente de aguas residuales que comprende compuestos orgánicos que incluyen demanda química de oxígeno fácilmente biodegradable (DQOFB) y posiblemente también otra demanda química de oxígeno (= menos fácilmente) biodegradable (ODQOB) se suministra a un reactor que contiene lodos activados que comprenden microorganismos capaces de acumular el compuesto de almacenamiento microbiano deseado. El proceso se realiza en un reactor.

[0014] El presente proceso comprende los siguientes pasos:

a) suministrar una corriente de aguas residuales a una primera etapa de reactor (1) en un primer reactor y poner en contacto las aguas residuales con los lodos activados transferidos desde el paso d en condiciones acumuladoras de PHA durante un primer periodo de tiempo, donde las condiciones acumuladoras de PHA comprenden la presencia de oxígeno disuelto, donde las aguas residuales suministradas tienen una proporción en peso de nitrógeno a DQOFB-carbono en base elemental ( $N_a/C_a$ ) inferior a 1/25 y/o una proporción en peso de fósforo a DQOFB-carbono en base elemental ( $P_a/C_a$ ) inferior a 1/125 para obtener lodos activados cargados con PHA y aguas residuales tratadas;

b) proporcionar que al menos parte de los lodos activados cargados con PHA y al menos parte de las aguas residuales tratadas obtenidas en la primera etapa de reactor estén presentes en una segunda etapa de reactor (2) en el primer reactor;

c) suministrar nitrógeno y/o fósforo a la segunda etapa de reactor y poner en contacto las aguas residuales con los lodos activados en condiciones de crecimiento durante un segundo periodo de tiempo, donde las condiciones de crecimiento comprenden la presencia de oxígeno disuelto, donde la proporción en peso, en base elemental, de la cantidad de nitrógeno o fósforo suministrada en el paso c), junto con cualquier cantidad disuelta de nitrógeno y fósforo, respectivamente, suministrada con las aguas residuales en el paso a), para nitrógeno ( $N_r/C_a$ ) está comprendida entre 1/20 y 1/100, y/o para fósforo ( $P_r/C_a$ ) está comprendida entre 1/100 y 1/500, para obtener lodos activados cultivados que comprenden PHA residual;

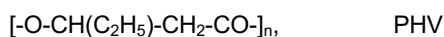
d) proporcionar que al menos parte de los lodos activados cultivados producidos en la segunda etapa de reactor (2) esté presente en la primera etapa de reactor (1);

e) eliminar parte de las aguas residuales tratadas del primer reactor durante o después del paso a) y/o durante o después del paso c) y eliminar parte de los lodos activados cargados con PHA durante o después

del paso a) y/o parte de los lodos activados cultivados durante o después del paso c), donde los lodos activados eliminados comprenden PHA a un nivel de al menos 60 % en peso, en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos, y donde las partes eliminadas son tales que el tiempo de retención promedio de lodos activados (TRL) en el primer reactor es inferior a 72 h, ya que el presente proceso es un proceso cíclico, el paso d) o e) es seguido por el paso a), etc.

[0015] En el contexto de la presente invención se aplican las siguientes definiciones:

- 10 – "Compuestos de almacenamiento microbiano" son compuestos producidos por microorganismos, tales como bacterias, arqueas, mohos y algas, para almacenar su excedente de energía. Los compuestos incluyen ésteres, poliésteres, polioésteres, triglicéridos, otras grasas y aceites y polisacáridos, como el glicógeno. Los poliésteres resultantes de la esterificación intermolecular de ácidos hidroxicarboxílicos son una clase importante de compuestos de almacenamiento microbiano, donde los más destacados son los ésteres polihidroxicanoicos, en particular los ésteres poli-p-hidroxicanoicos, como el poli-p-hidroxitirato (PHB) y el poli-p-hidroxi valerato (PHV), que tienen las siguientes fórmulas, donde n puede oscilar entre decenas y centenas o incluso muchos de miles, así como sus copolímeros.



- 15
- 20
- 25 – Los ésteres polihidroxicanoicos (o polioxicanoatos) se denominan comúnmente (y en este caso) polihidroxicanoato (PHA).
- 25 – "Demanda química de oxígeno" (DQO) se refiere al material orgánico que se puede oxidar hasta moléculas más pequeñas, en última instancia, hasta dióxido de carbono y agua, y el término expresa la cantidad de oxígeno que se necesitaría para oxidar la materia orgánica en un litro de aguas residuales.
- "DQO biodegradable" se refiere al material orgánico en las aguas residuales que se puede asimilar para el crecimiento de la biomasa.
- 30 – "Sustrato" significa sustrato para la asimilación por microorganismos para permitirles crecer, es decir, equivalente a DQO biodegradable.
- "Demanda química de oxígeno fácilmente biodegradable (DQOFB)" se refiere a moléculas orgánicas relativamente pequeñas que pueden ser asimiladas rápidamente por microorganismos, como se ilustra más adelante".
- 35 – "Otra demanda química de oxígeno biodegradable (ODQOB)" se refiere a una DQO biodegradable diferente de DQOFB, es decir, compuestos orgánicos más complejos y menos accesibles, por ejemplo polisacáridos complejos, grasas y proteínas, así como compuestos orgánicos que tienen relativamente pocos grupos que contienen oxígeno y grupos hidrocarbonados relativamente grandes, como los ácidos grasos de cadena larga.
- 40 – "Aguas residuales" se refiere a una corriente acuosa que comprende DQO que debe tratarse antes de que pueda reutilizarse o descargarse al medio ambiente. Las aguas residuales, por ejemplo, incluyen agua de proceso, productos secundarios o corrientes de productos intermedios de industrias de base biológica u otras, como se ilustra más adelante.
- 45 – "Lodos" se refiere a cualquier material sólido o similar presente en un reactor o su afluente o efluente que se puede separar de la parte líquida del reactor (o afluente o efluente) por medios físicos, tales como filtros, ciclones, sedimentadores, membranas y similares. Los lodos pueden comprender una parte orgánica, que incluye todo material biológico, así como compuestos orgánicos no solubles o no finamente dispersables, y una parte inorgánica, que incluye sales no solubles o no finamente dispersables, y otro material inorgánico. Por lo tanto, "lodos orgánicos secos" comprenden material sólido del que se han separado o se han tenido en cuenta en el cálculo de los niveles de producto materiales inorgánicos (sales, ceniza) y agua.
- 50 – "Etapa de reactor" se refiere a una entidad de contenido del reactor que está separada de otra entidad de contenido del reactor en el espacio o el tiempo. Por ejemplo, puede ser un compartimento de un reactor que está parcial o completamente separado físicamente (por una pared, un estrechamiento u otra barrera) de otra parte del reactor. También puede ser un reactor separado. Además, una etapa de reactor puede ser un reactor de la misma que tenga un contenido, una composición o un conjunto de condiciones diferentes de otra etapa, en el mismo espacio, que sigue o precede a la etapa de reactor (en un proceso discontinuo).
- 55 – "Condiciones acumuladoras de PHA" se refieren a las condiciones que permiten la acumulación de PHA en los lodos bacterianos, también denominadas comúnmente condiciones de festín. Estas comprenden la presencia de sustrato en forma de DQOFB y la presencia de oxígeno disuelto. Oxígeno disuelto significa oxígeno molecular disuelto a menos que se indique lo contrario. Preferiblemente, la concentración de oxígeno disuelto es de al menos 0,32 mg, más preferiblemente de al menos 0,5 mg O<sub>2</sub> por litro. Las condiciones acumuladoras de PHA preferiblemente comprenden, además, un pH en el rango de 4 a 10, más preferiblemente de 6 a 8, una temperatura en el rango de 10 a 50 °C, más preferiblemente de 20 a 40 °C, y una conductividad en el rango de 0 a 20 mS/cm. Debe señalarse que las condiciones acumuladoras de PHA, como se utilizan aquí, implican una promoción relativa de la acumulación de PHA, pero no excluyen el crecimiento.
- 60
- 65

- 5 – "Condiciones de crecimiento" se refieren a las condiciones que permiten el crecimiento, es decir, el aumento de la población, de lodos bacterianos, incluidos los microorganismos acumuladores de PHA, también denominadas a veces condiciones de hambruna. Estas comprenden la presencia de elementos esenciales para el crecimiento, como se define más adelante aquí, y permiten la absorción de los elementos por parte de los lodos. Las condiciones de crecimiento comprenden, además, la presencia de oxígeno disuelto, preferiblemente al menos 0,32 mg, más preferiblemente al menos 0,5 mg de O<sub>2</sub> por litro, y comprenden preferiblemente un pH en el rango de 4 a 10, más preferiblemente de 6 a 8, una temperatura en el rango de 10 a 50 °C, más preferiblemente de 20 a 40 °C, y una conductividad en el rango de 0 a 20 mS/cm. Debe señalarse que las condiciones de crecimiento, como se utiliza en este caso, implican una promoción relativa de crecimiento microbiano, pero no excluyen la acumulación y evitan preferiblemente la descomposición completa de PHA. En particular, "condiciones acumuladoras" y "condiciones de crecimiento" pueden diferir esencialmente solo en la proporción entre el suministro de DQOFB y el suministro de elementos esenciales para el crecimiento.
- 10 – "Elementos esenciales para el crecimiento" o "nutrientes esenciales para el crecimiento" comprenden los elementos comúnmente conocidos, además del carbono, el oxígeno y el hidrógeno, que la célula requiere para un crecimiento adecuado. Estos incluyen macroelementos N, P, K y S, microelementos Mg, Ca, Fe y oligoelementos, tales como Mn, Mo, Zn, Co, Cu, Ni, B, Se, W, Cr, así como vitaminas. Mientras cualquiera de los elementos, incluidas las vitaminas, se puede usar para controlar el crecimiento de organismos, el nitrógeno y el fósforo pueden usarse ventajosamente. Los elementos esenciales para el crecimiento se pueden proporcionar en cualquier forma convencional y apropiada, preferiblemente hidrosoluble, por ejemplo, como sales de amonio o urea, sales de fosfato, sales de potasio, magnesio, calcio o hierro (cloruro, nitrato, acetato, etc.), sales de sulfato, sales de metales traza, vitaminas o sales de vitaminas, etc.
- 15 – "Tiempo de retención de lodos" (TRL) es el tiempo de retención de lodos total en el sistema de reactor del presente proceso. Puede ser diferente del tiempo de retención hidráulico (líquido) (TRH) por separación parcial y retorno de lodos. Para este fin, el TRL se define como la suma de la cantidad promediada en el tiempo de lodos presente en el primero (kg de sólidos secos) dividida por la cantidad promediada en el tiempo de sólidos producidos en el sistema y eliminados del sistema (kg de sólidos secos/h).

30 [0016] Una característica importante del presente proceso es un control de las condiciones de acumulación y las condiciones de crecimiento para los lodos productores de PHA. En el paso a), las condiciones de acumulación prevalecen sobre las condiciones de crecimiento. Esto se puede lograr al proporcionar que el nivel relativo de elementos esenciales para el crecimiento sea bajo en comparación con el suministro de DQOFB, es decir, los alimentos que contienen carbono. El paso c) permite la absorción de elementos esenciales para el crecimiento por parte de los lodos y el crecimiento puede ser más predominante que en el paso a), pero muy por debajo de la medida en que se utilizaría todo el PHA para el crecimiento.

35 [0017] La cantidad límite de uno o más elementos esenciales que se va a suministrar en el paso c) del presente proceso es que los microorganismos pueden crecer, para cuyo crecimiento el PHA acumulado proporcionará al menos parcialmente la fuente de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero el crecimiento no debería dar como resultado que se consuma todo el PHA. La cantidad de elementos esenciales que se van a suministrar, que asegura que no se utilice todo el PHA para el crecimiento, depende del elemento particular que sea límite. Si el elemento límite comprende nitrógeno, la cantidad de nitrógeno suministrada en el paso c), junto con el nitrógeno disuelto suministrado con las aguas residuales en el paso a), dividida por la cantidad de DQOFB-carbono suministrada en el paso a) ( $N_p/C_a$ ) está comprendida entre 1/12 y 1/100. Si el elemento límite comprende fósforo, la cantidad de fósforo dividida por la cantidad de DQOFB-carbono suministrada en el paso a) ( $P_p/C_a$ ) está por debajo de 1/100 y 1/500. Para otros elementos esenciales, los valores correspondientes se pueden calcular como se describe a continuación. En estos cálculos, los elementos se toman en base elemental, aunque usualmente se proporcionarán en forma compuesta (sal u otra).

40 [0018] Preferiblemente, la proporción  $N_p/C_a$  es inferior a 1/15, incluso más preferiblemente inferior a 1/20, hasta 1/75. Alternativamente,  $P_p/C_a$  es preferiblemente inferior a 1/100, más preferiblemente inferior a 1/375.

45 [0019] Si el elemento límite comprende otro elemento, su nivel puede ser determinado por el experto en la técnica, sobre la base de la composición conocida y las necesidades elementales de las bacterias. Por ejemplo, el nivel límite de fósforo se puede tomar como 5 veces más bajo que el nivel límite de nitrógeno y los niveles límites de azufre, potasio, calcio, magnesio, hierro y metales traza, como Cu, se pueden tomar como 10 veces (S, K), 30 veces (Ca, Mg), 50 veces (Fe) y 300 veces (metales traza), respectivamente, por debajo del nivel de nitrógeno. El experto en la técnica podrá determinar los niveles límite de estos y otros elementos y vitaminas, en caso de que elija uno de ellos para asegurar un crecimiento limitado, mediante experimentación rutinaria adecuada que implique niveles variables del elemento o de la vitamina en cuestión. Los elementos esenciales que no se utilizan a un nivel límite de crecimiento a menudo ya están presentes en las aguas residuales en cantidades suficientes o se pueden suministrar si es necesario para lograr niveles no límites. Las mezclas de elementos comunes y comercialmente disponibles contienen los diversos elementos en los niveles relativos

50  
55  
60  
65

[0020] El nivel de al menos uno de los elementos de crecimiento, es decir, N o P, en las aguas residuales es límite en comparación con el nivel de DQOFB. Las aguas residuales suministradas en el paso a) tienen una proporción en peso de cantidad de nitrógeno a cantidad de DQOFB-carbono ( $N_a/C_a$ ) inferior a 1/25 y/o una proporción en peso de cantidad de fósforo a cantidad de DQOFB-carbono ( $P_a/C_a$ ) inferior a 1/125. Más preferiblemente,  $N_a/C_a$  es preferiblemente inferior a 1/25, hasta niveles muy bajos, por ejemplo 1/1000, preferiblemente hasta 1/500. Alternativamente,  $P_a/C_a$  es preferiblemente inferior a 1/100, más preferiblemente inferior a 1/125, hasta, por ejemplo, 1/5000, preferiblemente hasta 1/2500. Si las aguas residuales sin tratar tienen niveles de nitrógeno y/o fósforo a DQOFB que exceden estas proporciones, los niveles de N/C o P/C se pueden reducir hasta los niveles preferidos mediante inserción de un paso de pretratamiento destinado a reducir la proporción en peso de elementos pertinentes para la cantidad de DQOFB al eliminar parcialmente dicho uno o más elementos esenciales para el crecimiento, en particular N o P. Por ejemplo, el fosfato (P) y el amoníaco (N) se pueden eliminar añadiendo magnesio a las aguas residuales y eliminando la estruvita precipitada (fosfato de amonio y magnesio) de las aguas residuales antes del paso a). Alternativa o adicionalmente, la proporción se puede reducir añadiendo DQOFB.

[0021] La siguiente tabla 1 brinda más orientación sobre el contenido de PHA alcanzable en función de  $N_a/C_a$  o  $P_a/C_a$ .

Tabla 1: Contenido de PHA frente a nitrógeno y fósforo

% de PHA	$N_a/C_a$	$P_a/C_a$
94	1/112	1/558
93	1/96	1/481
92	1/85	1/424
91	1/76	1/378
90	1/68	1/339
88	1/56	1/278
85	1/46	1/229
80	1/35	1/174
75	1/28	1/142
70	1/24	1/119
65	1/21	1/104
60	1/18	1/92
55	1/17	1/83
50	1/15	1/75
40	1/13	1/64
30	1/11	1/57
20	1/10	1/51
10	1/9	1/46

[0022] El nivel deseado de nutrientes (nitrógeno, fósforo u otros) o las proporciones deseadas de nutrientes a carbono se pueden lograr analizando el nivel del nutrientes y, si es necesario, de carbono, en las aguas residuales en línea o fuera de línea, utilizando métodos conocidos convencionalmente, que incluyen métodos colorimétricos, métodos cromatográficos, electrodos específicos de elementos, valoración, Kjeldahl (nitrógeno), etc., y luego añadiendo uno o más nutrientes o carbono (DQOFB) según corresponda.

[0023] Tal y como se ha definido anteriormente, DQOFB se refiere a moléculas orgánicas relativamente simples que pueden asimilarse para el crecimiento de microorganismos y pueden absorberse rápidamente y convertirse en un compuesto de almacenamiento, a menudo sin necesidad de hidrólisis. Los ejemplos de dicha DQOFB incluyen ácidos grasos volátiles, también denominados ácidos grasos de cadena corta, es decir, que tienen hasta 6 átomos de carbono, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico y ácido caproico, hidroxiacidos, como ácido láctico, carbohidratos, tales como monosacáridos y disacáridos, ácidos urónicos, alcoholes, cetonas y aldehídos, preferiblemente alcoholes, cetonas, y aldehídos con hasta seis átomos de carbono y combinaciones de dos o más del mismos. En otras palabras, DQOFB incluye compuestos orgánicos que tienen hasta 6 átomos de carbono por molécula y que tienen al menos un átomo de oxígeno hidroxílico (C-OH) o cetónico (C=O) por molécula y al menos un átomo de oxígeno por cada cuatro átomos de carbono, preferiblemente que tienen únicamente átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, así como disacáridos. La concentración de DQOFB se puede determinar por medio de métodos estandarizados de respirometría que determinan la fracción de DQO de aguas residuales, que se utiliza rápidamente cuando una parte alícuota de aguas residuales con una cantidad específica de biomasa se alimenta por pulsos con sustrato en condiciones controladas. Un ejemplo de un método normalizado adecuado de respirometría se describe en M. Henze et al., *Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*, IWA Publishing, Londres, 2000, p. 16-17; ISBN 1900222248.

[0024] La corriente de aguas residuales puede ser cualquier corriente de aguas residuales que comprenda DQOFB. La corriente puede ser aguas residuales municipales, industriales o agrícolas o corrientes de proceso o

corrientes residuales de desechos biodegradables sólidos, como tales o pueden ser aguas residuales municipales, industriales o agrícolas que han sido pretratadas, por ejemplo, han sido prehidrolizadas para convertirlas en las denominadas ODQOB a DQOFB, y/o que han sido preacidificadas o fermentadas para convertir sacáridos u otros compuestos en ácidos carboxílicos, preferiblemente ácidos grasos volátiles, ácido láctico o etanol.

[0025] Las aguas residuales contienen típicamente más de 50 mg, preferiblemente más de 100 mg de DQOFB por l. Más preferiblemente, las aguas residuales comprenden DQOFB en el rango de 0,5 a 50 gramos por litro, más preferiblemente en el rango de 1 a 20 gramos por litro. Comprenden preferiblemente ácidos grasos volátiles (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) y/o ácido láctico y/o etanol, más preferiblemente en el rango de 0,5 a 50 gramos por litro de ácidos grasos volátiles, aun más preferiblemente en el rango de 1 a 20 gramos por litro.

[0026] Las aguas residuales suministradas a la primera etapa de reactor en el paso a) puede comprender, además, ODQOB. Preferiblemente, contiene más DQOFB que ODQOB. Una ventaja del presente proceso que implica tiempos de ciclo cortos entre las dos etapas de reacción, la separación en el tiempo de la disponibilidad de DQOFB y nutrientes y el TRL relativamente corto es que la población microbiana es altamente selectiva para la producción PHA de DQOFB, y se suprimen otras poblaciones bacterianas, de modo que es relativamente insensible a la digestión con ODQOB y da como resultado altos rendimientos de PHA. Cuando las aguas residuales contienen altos niveles de ODQOB, puede ser deseable un tratamiento posterior para la degradación de ODQOB.

[0027] Los lodos activados comprenden microorganismos acumuladores de PHA, preferiblemente bacterias acumuladoras de PHA. Una vez que el proceso funciona en estado estable, los lodos activados son los lodos activados que se enriquecen aun más al acumular microorganismos obtenidos en los pasos a) y c). Al principio del proceso, la primera etapa de reactor se puede inocular con lodos activados u otras muestras que comprendan dichos microorganismos acumuladores o con cepas de microorganismos capaces de acumular el compuesto de almacenamiento microbiano deseado, en particular PHA. La corriente de aguas residuales suministrada al primer reactor a menudo comprende microorganismos capaces de acumular el compuesto de almacenamiento microbiano deseado, y luego el proceso se puede iniciar sin inoculación con lodos o con dichos microorganismos.

[0028] Las bacterias y arqueas acumuladoras de PHA, así como otros microorganismos capaces de acumular compuestos de almacenamiento microbiano, suelen estar presentes en cultivos no axénicos de microorganismos, como los que se encuentran en muestras de suelo, agua natural o biomasa mixta. También se pueden aislar o enriquecer a partir de plantas comunes de aguas residuales municipales. Las bacterias acumuladoras de PHA pueden pertenecer a varios géneros, tales como *Alcaligenes* (por ejemplo *A. latus*), *Ralstonia* (por ejemplo, *R. eutropha*), *Cupriavidus* (por ejemplo, *C. necator*), *Chromatium* (por ejemplo *C. vinosum*) *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Thauera*, etc. Pueden crecer de forma específica o no específica en diversas fuentes de carbono, tales como glucosa, metanol, etanol, acetato y/o otros ácidos grasos. Véase, por ejemplo, Tan G-Y.A. et al. *Polymers* 2014, 6, 706-754; Huang Y-T. et al. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 22, 1141-47. Particularmente útiles son las bacterias del género *Plasticicumulans*, tales como *P. acidivorans* (que consumen acetato) y *P. lacatativorans* (que consumen lactato), véase, por ejemplo, Jiang et al. *Int. J. systematic Evolutionary Microbiology* 2011, 61, 2314-2319, Tamis et al. *J. Biotechnology* 2014, 192, 161-169. Ventajosamente, los microorganismos usados en el presente proceso comprenden bacterias del género *Plasticicumulans*, en particular de la especie *P. acidivorans*.

[0029] Al suministrar aguas residuales al paso a), se forma una mezcla de lodos activados en aguas residuales en la primera etapa de reactor y luego la mezcla se somete a condiciones de reacción que acumulan el PHA durante un primer periodo de tiempo para obtener lodos activados que comprenden el PHA en aguas residuales tratadas. La presencia de oxígeno disuelto se consigue preferiblemente suministrando un gas que comprende oxígeno molecular, más preferiblemente aire, al primer reactor. Esto se puede realizar de forma continua o discontinua, preferiblemente continua, durante el paso a).

[0030] Las cantidades de DQOFB y de oxígeno disuelto son tales que no limitan la producción del compuesto de almacenamiento microbiano. Se apreciará que las concentraciones mínimas de DQOFB y oxígeno disuelto dependerán de la cantidad de microorganismos capaces de acumular el compuesto de almacenamiento microbiano presente en la primera etapa de reactor, el compuesto de almacenamiento microbiano que se va a producir y otras condiciones del proceso, tales como la temperatura y el pH de la mezcla en el reactor.

[0031] El periodo de tiempo se aplica al tiempo promedio que los lodos permanecen en la primera etapa de reactor antes de que se proporcione a la segunda etapa de reactor. En caso de funcionamiento por lotes, el periodo de tiempo se aplica a la mezcla. Si las aguas residuales o una corriente de reciclaje de intercambio de lodos se añade de forma intermitente o continua (y, por lo tanto, las aguas residuales tratadas se descarga de forma intermitente o continua), el periodo de tiempo no se aplica al agua, sino a los propios lodos, cuando los lodos no se descargan solo parcialmente con las aguas residuales tratadas (continuamente) descargadas.

5 [0032] El primer periodo de tiempo terminará cuando se alcance una cierta concentración mínima de DQOFB, cuando se produzca una cierta cantidad de PHA, o cuando disminuya el consumo de consumo de oxígeno. En una forma de realización preferida con funcionamiento continuo en dos reactores, el primer periodo de tiempo normalmente está predeterminado por el volumen del reactor de diseño y el flujo de aguas residuales. En este caso, la concentración de biomasa en el primer reactor se controla para lograr una cierta concentración mínima de DQOFB o tasa de consumo de oxígeno. Alternativamente, la concentración de DQOFB en la mezcla en el primer reactor durante el paso a) se puede mantener constante ajustando el suministro de la corriente de aguas residuales o la concentración de biomasa en el primer reactor. El primer periodo de tiempo también puede 10 terminar cuando el caudal del suministro de aguas residuales cae por debajo de un determinado valor.

15 [0033] El nivel de DQOFB mantenido en el paso a) es preferiblemente de al menos 20 mg/l, más preferiblemente de al menos 100 mg/l. El nivel de DQOFB mantenido en el paso c) es preferiblemente inferior a 100 mg/l, más preferiblemente inferior a 40 mg/l, de la manera más preferible inferior a 20 mg/l. La tasa de carga de DQOFB en el paso a) puede estar comprendida entre 2 y 80 kg/m<sup>3</sup>.d, preferiblemente entre 4 y 40 kg/m<sup>3</sup>.d.

20 [0034] Al final del paso a) (primer periodo de tiempo), los lodos activados cargados con PHA comprenden PHA a un nivel de al menos 50 % en peso, más preferiblemente de al menos 60 % en peso, aun más preferiblemente de al menos 70 % en peso o incluso más, en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos.

25 [0035] Las condiciones de crecimiento aplicadas en el paso c) comprenden la presencia de elementos esenciales para el crecimiento a un nivel suficiente, pero limitado, como se ha descrito anteriormente, y permiten la absorción de los elementos por parte de los lodos. Las condiciones de crecimiento comprenden, además, la presencia de oxígeno disuelto, como se ha definido anteriormente.

30 [0036] Al final del paso c) (segundo periodo de tiempo), los lodos activados cultivados comprenden PHA residual a un nivel de al menos 20 % en peso en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos, preferiblemente de al menos 40 % en peso, más preferiblemente de al menos 50 % en peso, e incluso más preferiblemente de al menos 60 % en peso, en base al peso seco.

35 [0037] En una forma de realización del presente proceso, el suministro de aguas residuales en el paso a) se reduce o interrumpe durante el paso c). Por lo tanto, la cantidad de DQOFB suministrada durante el paso c) y/o el nivel promedio de DQOFB presente durante el paso c) es menor, preferiblemente de al menos 50 % menor que en el paso a). En una disposición preferida, el suministro de DQOFB se detiene durante el paso c) (no se añade DQOFB más allá de lo que ya está disponible para los lodos).

40 [0038] El primer periodo de tiempo (paso a) y el segundo periodo de tiempo (paso c) corresponden a los tiempos promedios de permanencia de los lodos en estas etapas de reactor antes de pasar a la siguiente etapa en el ciclo. Preferiblemente, el único reactor funciona de forma semicontinua, o por lotes o por pulsos, en cuyo caso el primer y segundo periodo de tiempo también corresponden al tiempo entre el inicio del suministro de aguas residuales y el suministro de nutrientes (o la eliminación de lodos antes de suministrar nutrientes), y entre el inicio de suministro de nutrientes y la eliminación de lodos o el suministro de aguas residuales, respectivamente. El primer periodo de tiempo (paso a) está comprendido preferiblemente entre 0,5 y 8 horas, más preferiblemente entre 1 y 4 horas. El segundo periodo de tiempo (paso c) está comprendido preferiblemente entre 0,1 y 6 h, más preferiblemente entre 0,2 y 4 h, aun más preferiblemente entre 0,25 y 2 h. El segundo periodo de tiempo puede ser relativamente corto cuando la absorción de nutrientes es rápida y una parte del crecimiento también se puede lograr en el siguiente paso a). Por lo tanto, el ciclo total puede estar comprendido ventajosamente entre 0,5 h y 10 h, preferiblemente entre 1 y 6 h.

50 [0039] En los pasos b) y d) al menos una parte de los lodos obtenidos en los siguientes pasos a) y c), respectivamente, se transfiere o, si no se necesita ninguna transferencia física, está presente en los siguientes pasos c) y a) respectivamente. En el paso b), incluso los lodos totales se pueden transferir al paso c), siempre que al menos una parte de los lodos transferidos en el paso d) se elimine o recolecte. En una forma de realización preferida, todos los lodos en el paso d) se transfieren al paso a), y al menos parte de los lodos transferidos en el paso b) se elimine o recolecta.

60 [0040] Parte de los lodos activados cargados con PHA producidos en el paso a) puede eliminarse del ciclo y, preferiblemente, recolectarse. Además, dependiendo, por ejemplo, del nivel de PHA después del paso c), una parte de los lodos activados cultivados producidos en el paso c) se puede eliminar del ciclo y, además, procesar y/o recolectar. Las cantidades de lodos eliminadas (y recolectadas) son preferiblemente tales que el tiempo de retención promedio de lodos (TRL) en el sistema, es inferior a 72 h, más preferiblemente inferior a 48 h, aun más preferiblemente inferior a 36 h, de la manera más preferible inferior a 24 h.

65 [0041] La parte de los lodos activados cargados con PHA eliminados en el paso e) contiene preferiblemente al menos 70 % de PHA, o incluso al menos 75 % en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos, y los lodos activados que están presentes en una segunda etapa de reactor en el paso c) contienen preferiblemente al menos 50 % de PHA. La parte de los lodos activados cultivados eliminados opcionalmente en el paso e)

5 contiene al menos 20 %, preferiblemente al menos 40 %, más preferiblemente al menos 50 %, aún más preferiblemente al menos 60 %, de la manera más preferible al menos 65 % de PHA en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos. De la manera más preferible, el nivel de PHA de los lodos cargados con PHA (derivados del paso a)) y el nivel de lodos activados cultivados (derivados del paso c)) difieren en menos del 20 %, más preferiblemente en menos del 10 % (del peso en seco total de lodos orgánicos). La diferencia en el contenido PHA alcanzado después de las dos etapas de reactor está determinada principalmente por la concentración total de lodos aplicada en las dos etapas de reactor y puede verse influenciada por las cantidades de lodos retenidos y reciclados entre las etapas de reactor primera y segunda y por las cantidades de lodos eliminados en el paso e).

10 [0042] Las etapas de reactor primera y segunda son etapas en el mismo reactor, separadas en el tiempo. A continuación, las aguas residuales se suministran en la primera etapa de reactor, y el suministro se suprime o interrumpe preferiblemente durante la segunda etapa de reactor c). Los elementos esenciales para el crecimiento se miden en el paso c) según sea necesario, ya sea de forma continua o por pulsos. El único reactor puede funcionar preferiblemente en un modo semicontinuo o por pulsos. Una ventaja de la presente invención es que en el paso c) no siempre se puede interrumpir el flujo de aguas residuales, especialmente en el caso de que la fracción de DQOFB de la DQO biodegradable sea alta. En dicho modo, el paso c) de promoción relativa del crecimiento, se inicia mediante el suministro de elementos esenciales para el crecimiento dentro de los límites, como se ha definido anteriormente. En otra forma de realización de un único reactor, puede funcionar en un reactor por lotes secuencial, que comprende la secuencia de llenado con aguas residuales, reacción para permitir la acumulación, adición de nutrientes, reacción para permitir la absorción de nutrientes y crecimiento limitado, con asentamiento de lodos, eliminación de efluentes y eliminación parcial de lodos o después de la acumulación (a) o después del crecimiento limitado (c), o excepcionalmente ambos.

15 [0043] Según la presente invención, el presente proceso comprende los siguientes pasos:

20 **a)** suministrando una corriente de las aguas residuales a una etapa de primer reactor (1) en un primer reactor y poner en contacto las aguas residuales con los lodos activados transferidos desde el paso d) en condiciones acumuladoras de PHA durante un primer periodo de tiempo, las condiciones acumuladoras de PHA, que comprende la presencia de oxígeno disuelto, donde las aguas residuales suministradas tiene una proporción en peso de nitrógeno a DQOFB-carbono en base elemental ( $N_a/C_a$ ) inferior a 1/25, y/o una proporción en peso de fósforo a DQOFB-carbono en base elemental ( $P_a/C_a$ ) inferior a 1/125 para obtener lodos activados cargados con PHA y aguas residuales tratadas;

25 **b)** proporcionar que al menos parte de los lodos activados cargados con PHA y al menos parte de las aguas residuales tratadas obtenidas en la primera etapa de reactor estén presentes en una segunda etapa de reactor (2) en el primer reactor;

30 **c)** suministrar nitrógeno y/o fósforo a la segunda etapa de reactor y poner en contacto las aguas residuales con los lodos activados en condiciones de crecimiento durante un segundo periodo de tiempo, donde las condiciones de crecimiento comprenden la presencia de oxígeno disuelto, donde la proporción en peso, en base elemental, de la cantidad de nitrógeno o fósforo suministrada en el paso c) junto con cualquier cantidad disuelta de nitrógeno y fósforo, respectivamente, suministrada con las aguas residuales en el paso a), a la cantidad de DQOFB suministrada en el paso a) para nitrógeno ( $N_d/C_a$ ) está comprendida entre 1/20 y 1/100, y/o para fósforo ( $P_d/C_a$ ) está comprendida entre 1/100 y 1/500, para obtener lodos activados cultivados que comprenden PHA residual;

35 **d)** proporcionar que al menos parte de los lodos activados cultivados producidos en la segunda etapa de reactor (2) esté presente en la primera etapa de reactor (1);

40 **e)** eliminar parte de las aguas residuales tratadas del primer reactor durante o después del paso a) y/o durante o después del paso c) y eliminar parte de los lodos activados cargados con PHA durante o después del paso a) y/o parte de los lodos activados cultivados durante o después del paso c), donde los lodos activados eliminados comprenden PHA a un nivel de al menos 60 % en peso, en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos, y donde las partes eliminadas son tales que el tiempo de retención promedio de lodos activados (TRL) en el primer reactor es inferior a 72 h.

45 [0044] La cantidad de elementos esenciales para el crecimiento suministrado en el paso c) limitar el crecimiento de modo que no se use PHA para el crecimiento, corresponde a las proporciones de  $N_d/C_a$  o  $P_d/C_a$ , como se ha definido anteriormente. El proceso de la invención, en todas las formas de realización, permite la producción y el aislamiento de lodos microbianos que tienen altos niveles de PHA. Por lo tanto, los lodos activados que contienen PHA obtenidos en el paso e) comprenden PHA a un nivel de al menos 60 % en peso, preferiblemente de al menos 70 % en peso, o en particular de al menos 75 % en peso, o incluso de al menos 80 % en peso, en base a los lodos orgánicos secos, donde estos lodos se pueden separar y aislar.

50 [0045] El proceso de la invención puede estar precedido por un paso de fermentación anaeróbica de las aguas residuales para aumentar el nivel de DQOFB, en particular ácidos grasos volátiles y/o ácido láctico y/o etanol. Por lo tanto, el proceso puede comprender un paso anterior en el que las aguas residuales sin tratar se sometan a hidrólisis y/o fermentación en un reactor separado, por ejemplo, un reactor anaeróbico en el que se logra una fermentación parcial (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis). Ventajosamente, también durante este paso se

elimina parte de los nutrientes presentes en las aguas residuales, lo que reduce la proporción de nutrientes a DQOFB.

5 [0046] La transferencia de lodos de una etapa de reactor a la otra y la eliminación de parte de los lodos en el paso e) se puede realizar mediante medios conocidos en la técnica, por ejemplo mediante sedimentación de lodos dentro o fuera del reactor o mediante un separador sólido-líquido dentro o fuera del reactor. Los separadores sólido-líquido adecuados son conocidos en la técnica e incluyen colonizadoras, hidrociclones, centrifugadoras, membranas y filtros de cinta. Cuando se requiere la retención de lodos, dicha separación se  
10 puede llevar a cabo en un sedimentador dentro del primer reactor, más preferiblemente mediante sedimentación. Por ejemplo, dicha sedimentación se puede lograr deteniendo el suministro de aguas residuales y de aire al primer reactor al final del paso a).

15 [0047] Se puede hacer que parte de las aguas residuales tratadas en el paso a) esté presente en la segunda etapa de reactor, típicamente con la mezcla (concentrada) de lodos y aguas residuales tratadas, para que sirva como medio de reacción líquido en el paso de crecimiento c). Alternativamente, las aguas residuales tratadas se pueden separar primero de los lodos sólidos en un separador interno o externo y luego parte de las aguas residuales tratadas separadas se puede transferir a la segunda etapa de reactor para servir como medio de  
20 reacción líquido en el paso c).

[0048] Las aguas residuales tratadas se pueden extraer continuamente del reactor durante los pasos a) a e) por lotes al final del paso a) y/o al final del paso c). En el caso de que las aguas residuales tratadas se extraigan continuamente de la primera etapa de reactor durante los pasos a) a e), el reactor comprende preferiblemente un sedimentador para separar lodos de las aguas residuales tratadas para que los lodos se retengan al menos  
25 parcialmente en el primer reactor. Dicho sedimentador puede estar situado dentro del reactor, preferiblemente en una parte superior del reactor justo antes de una salida para las aguas residuales tratadas, o fuera del reactor con reciclaje de lodos separados al primer reactor. Se apreciará que un sedimentador para evitar que se extraigan lodos del primer reactor con la extracción continua de aguas residuales tratadas puede ser un sedimentador diferente de un sedimentador que se puede usar para concentrar lodos activados que se van a transferir a la segunda etapa de reactor en el paso b).

[0049] Después de la eliminación de lodos activados después de las etapas de reactor primera y segunda, el PHA se puede recuperar de esta corriente de producto en uno o más pasos adicionales para su aplicación, por ejemplo, en bioplásticos. Dichos pasos son bien conocidos en la técnica y comprenden típicamente la ruptura de  
35 las células microbianas para recolectar el compuesto de almacenamiento microbiano y otros pasos de purificación.

[0050] En el paso d), parte de los lodos activados enriquecidos con microorganismos capaces de acumular el compuesto de almacenamiento microbiano está presente en la primera etapa reactor para formar los lodos activados que comprenden microorganismos capaces de acumular el compuesto de almacenamiento microbiano  
40 en el paso a).

[0051] Las concentraciones deseadas de oxígeno disuelto en los pasos a) y c) se mantienen suministrando oxígeno molecular u otro oxidante que comprende oxígeno al primer reactor durante estos pasos, preferiblemente suministrando continuamente una corriente de aire al reactor.  
45

### Descripción de los dibujos

50 [0052]

La figura 1 muestra esquemáticamente un sistema de un solo reactor según la presente invención. El reactor de acumulación y crecimiento 1 está provisto de un suministro de aire 2 con medios de distribución de aire. Las aguas residuales que contienen DQOFB y tienen un contenido limitado de nutrientes se pueden suministrar de forma continua o por lotes a través de la línea de entrada 3. Los nutrientes se pueden  
55 suministrar por pulsos o por lotes a través de la línea de entrada 4. El reactor puede estar provisto de sensores para medir el oxígeno disuelto (OD), los nutrientes (por ejemplo, nitrógeno), DQO(FB), especialmente los ácidos grasos volátiles (AGV), la temperatura, el pH, etc. El suministro de DQOFB se puede interrumpir y luego se pueden añadir nutrientes cuando el nivel de DQOFB en el reactor ha caído a un nivel mínimo, por ejemplo 10 mg/l, derivado de la disminución de la tasa de consumo de oxígeno basada en una mayor concentración de OD medida. La línea de salida 5 permite la descarga de efluentes que contienen lodos. El efluente se separa en el separador 6, del cual se descarga el efluente clarificado a través de la línea 7. Alternativamente, un sedimentador interno se puede proporcionar en el reactor 1 (no mostrado). Los lodos salen del separador a través de la línea 8 y se divide entre la línea de retorno opcional 9 y la línea de descarga (producto) 10 de manera controlable. La línea de salida opcional 11 permite descargar lodos directamente del reactor 1. En un sistema de reactor por lotes secuencial, la separación de lodos se puede lograr en el reactor 1 sedimentando los lodos después de que el suministro de aire se detenga temporalmente y se pueda prescindir del separador 6.  
65

La figura 2 muestra esquemáticamente un sistema de dos reactores, no según la presente invención. El reactor de acumulación 1 está provisto de un suministro de aire 2 con medios de distribución de aire. Las aguas residuales que contienen DQOFB y tienen un contenido limitado de nutrientes se pueden suministrar de forma continua o semicontinua a través de la línea de entrada 3. La línea de salida 5 permite la transferencia del efluente que contiene lodos al separador 6 (que también puede ser interno, no mostrado), donde se descarga el efluente clarificado a través de la línea 7. Los lodos salen a través de la línea 8 y se dividen en la línea de descarga (de producto) 10, la línea de ciclo 15 y la línea de retorno opcional 9, de manera controlable. La línea 15 lleva los lodos al reactor de crecimiento 12, que está provisto de un suministro de aire 13 con medios de distribución de aire. Los nutrientes se pueden suministrar al reactor de crecimiento de forma continua o pulsada a través de la línea de entrada 14. La línea de salida opcional 11 permite descargar lodos directamente del reactor 1 para su eliminación o recolección a través de la línea de salida 17 y/o el suministro directo de lodos al reactor de crecimiento 12 a través de la línea 18. La línea 16 transfiere los lodos que contienen el efluente del reactor 12 de regreso al reactor 1.

La figura 3 representa un gráfico que muestra el oxígeno disuelto (% de saturación) durante aproximadamente tres ciclos de proceso en un reactor operado como SBR, como se describe más adelante en el ejemplo 1. El gráfico muestra la concentración de oxígeno disuelto en función de la adición de acetato (paso 1), la disminución del acetato, la adición de nutrientes (paso 2) y la eliminación parcial del contenido del reactor (paso 3).

La figura 4 muestra los niveles de PHA (% de material orgánico seco) de los lodos durante el ciclo de proceso en un sistema SBR. Los diamantes (◆) muestran el nivel de PHA al final del periodo de acumulación y los cuadrados (■) muestran el nivel de PHA al final del periodo de crecimiento. La figura 5 muestra los niveles de PHA (% de material orgánico seco) de los lodos durante el ciclo del proceso en un sistema de dos reactores operados de forma continua. Los diamantes (◆) muestran el nivel de PHA en el reactor de acumulación y las esferas (●) muestran el nivel de PHA en el reactor de crecimiento.

### Ejemplo 1

[0053] Un reactor de vidrio de doble pared de 6 litros se mantuvo a  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . El pH se mantuvo entre 6,8 y 7,0 añadiendo continuamente una pequeña cantidad de gas  $\text{CO}_2$ . El reactor se hizo funcionar como un reactor por lotes de secuenciación con un ciclo de 3,5 horas (210 minutos). A lo largo del ciclo, el reactor se aireó con una cantidad fija de aire. El ciclo consistió en:

Paso 1 en  $t=0$  minutos: adición de 750 ml de medio sintético que contiene 10 g/l de acetato (50 % de mol de NaAc y 50% de mol de HAc), 200 mg/l de K (como KCl), 100 mg/l de Ca (como  $\text{CaCl}_2$ ) y 50 mg/l de Mg (como  $\text{MgCl}_2$ ).

Paso 2 en  $t=160$  minutos: adición de una mezcla de nutrientes comerciales que contiene N (como urea), P (como  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) y metales traza, donde N es el compuesto límite. Cada ciclo se añade 90 mg/l de N.

Paso 3 en  $t=200$  minutos: eliminación de 750 ml del contenido del reactor.

[0054] Las características del sistema son las siguientes:

- Tiempo de retención hidráulica (TRH): 28 horas
- Tiempo de retención promedio de lodos (TRL): 28 horas
- Primer periodo de tiempo: 160 minutos
- Segundo periodo de tiempo: 40 minutos
- N/C en peso basado en elementos: 1/33

[0055] Al poner en marcha el reactor en las condiciones anteriores, los lodos ya contenían una mezcla de organismos acumuladores de PHA resultantes de investigaciones previas. Inicialmente, el reactor de laboratorio se sembró con lodos aeróbicos a partir de una planta de aguas residuales municipales.

[0056] La figura 3 muestra la concentración de oxígeno disuelto medida durante aproximadamente tres ciclos. Esta muestra que tan pronto como se suministra acetato al reactor (paso 1), la concentración de oxígeno disuelto cae, lo que indica el consumo de oxígeno requerido para la absorción de acetato y la producción de PHA. Después de aproximadamente 100 minutos, el acetato se agota y la concentración de oxígeno disuelto aumenta repentinamente hasta el nivel de línea de base. Tan pronto como se añaden los nutrientes (paso 2), la concentración de oxígeno disuelto vuelve a disminuir y, dentro de 20 minutos, la concentración de oxígeno disuelto vuelve a aumentar hasta el nivel de línea de base, con una ligera variación al eliminar el contenido del reactor (paso 3). Durante el periodo de acumulación (el periodo de OD bajo después del paso 1), la concentración de nitrógeno disuelto es baja y la concentración de acetato se agota al final de este periodo (no mostrado). Durante la absorción de nutrientes y el periodo de crecimiento limitado (después del paso 2), la concentración de N disuelto aumenta directamente después de la adición de nutrientes y vuelve a caer dentro de los 20 minutos del periodo de crecimiento.

[0057] El reactor SBR se hizo funcionar durante más de un mes (lo que equivale a unos 200 ciclos o 25 veces el tiempo de retención de lodos (TRL)) con estos ajustes y se analizó el contenido de PHA al final del periodo de acumulación de PHA y al final del periodo de crecimiento. El contenido de PHA en los lodos se determinó mediante el análisis termogravimétrico (ATG) en el que el contenido de PHA de las muestras de lodos se pierde entre 200 y 300 °C. Esto da como resultado un pico distintivo para la pérdida de peso en base al cual se puede determinar el contenido de PHA. Los resultados se muestran en la figura 4.

[0058] La figura 4 muestra que el contenido de PHA promedio en los lodos cicló entre 70 y 78 % en peso en base al contenido orgánico, donde el contenido de PHA promedio después del periodo de acumulación PHA es solo ligeramente superior al contenido de PHA promedio después del periodo de crecimiento.

#### **Ejemplo 2 (no según el objeto reivindicado)**

[0059] Se hizo funcionar una configuración continua que incluía dos reactores de vidrio de doble pared durante más de dos meses según el diagrama de flujo de la figura 2 (con omisión de las líneas 9, 11, 17 y 18) y con los siguientes ajustes:

- Reactor de acumulación de PHA (1): volumen de 3,5 litros, temperatura controlada a 30 °C, pH controlado a pH 7,0 usando un suministro adicional de dióxido de carbono y aireado usando aire que asegura una concentración de oxígeno disuelto por encima del 20 % de saturación.
- Suministro (3): 1,4 l/h de medio sintético que contiene 1,8 g/l de acetato (50 % de mol de NaAc y 50% de mol de HAC), 100 mg/l de K (como KCl), 50 mg/l de Ca (como CaCl<sub>2</sub>) y 30 mg/l de Mg (como MgCl<sub>2</sub>)
- Sedimentador (6): 10 cm de diámetro con fondo cónico
- Reactor de crecimiento (12): volumen de 3 litros, temperatura controlada a 30 °C, pH controlado a pH 7,0 usando un suministro adicional de dióxido de carbono y aireado usando aire que asegura una concentración de oxígeno disuelto por encima del 20 % de saturación. Adición de pulsos (14) cada 30 minutos de una mezcla de nutrientes comerciales que contiene N (como urea), P (como H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y metales traza, donde N es el compuesto límite. Cada pulso se añade 19 mg de N.
- Descarga de lodos (10) del sedimentador: 0,4 l/h
- Reciclado de lodos (15) desde el sedimentador hasta el reactor de crecimiento: 0,6 l/h.

[0060] Las características del sistema son las siguientes:

- El primer periodo de tiempo es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH) en el reactor de acumulación de PHA: 1,8 horas
- El segundo periodo de tiempo es igual al TRH en el reactor de crecimiento: 5 horas
- Tiempo de retención promedio de lodos (TRL): alrededor de 17 horas
- N/C en peso basado en elementos: 1/27
- Tasa de carga orgánica del primer reactor: 17 kg/m<sup>3</sup>.d de acetato.

[0061] Al iniciar el sistema en las condiciones anteriores, los reactores se sembraron con lodos ya contenía una mezcla de organismos acumuladores de PHA tomados del reactor mencionado en el ejemplo 1. Inicialmente, el reactor SBR de laboratorio del ejemplo 1 se sembró con lodos aeróbicos a partir de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales.

[0062] En estas condiciones, se logró un estado estable después de algunas semanas. Se confirmó por análisis que normalmente la concentración de acetato en el reactor de acumulación de PHA y el desbordamiento del sedimentador estaba entre 50 y 100 mg/l. La concentración de oxígeno disuelto en el reactor de crecimiento cayó directamente después de la adición de nutrientes del pulso y volvió a aumentar antes de que se suministrara el siguiente pulso.

[0063] El contenido de PHA se analizó en muestras tomadas tanto del reactor de acumulación de PHA como del reactor de crecimiento. Los resultados se muestran en la figura 5. El contenido promedio de PHA en los lodos en el reactor de acumulación PHA fue del 70 % en peso en base al contenido orgánico, mientras que el contenido promedio de PHA en el reactor de crecimiento estaba entre 50 y 60 % en peso.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso cíclico para producir polihidroxialcanoato (PHA) a partir de aguas residuales que comprenden DQO fácilmente biodegradable (DQOFB) usando lodos activados que comprenden bacterias capaces de acumular PHA, que comprende los siguientes pasos:
- 10 a) suministrar una corriente de las aguas residuales a una primera etapa de reactor (1) en un primer reactor y poner en contacto las aguas residuales con los lodos activados transferidos desde el paso d en condiciones acumuladoras de PHA durante un primer periodo de tiempo, donde las condiciones acumuladoras de PHA comprenden la presencia de oxígeno disuelto, donde las aguas residuales suministradas tienen una proporción en peso de nitrógeno a DQOFB-carbono en base elemental ( $N_a/C_a$ ) inferior a 1/25 y/o una proporción en peso de fósforo a DQOFB-carbono en base elemental ( $P_a/C_a$ ) inferior a 1/125 para obtener lodos activados cargados de PHA, y aguas residuales tratadas;
- 15 b) proporcionar que al menos parte de los lodos activados cargados con PHA y al menos parte de las aguas residuales tratadas obtenidas en la primera etapa de reactor estén presentes en una segunda etapa de reactor (2) en el primer reactor;
- 20 c) suministrar nitrógeno y/o fósforo a la segunda etapa de reactor y poner en contacto las aguas residuales con los lodos activados en condiciones de crecimiento durante un segundo periodo de tiempo, donde las condiciones de crecimiento comprenden la presencia de oxígeno disuelto,
- 25 donde la proporción en peso, en base elemental, de la cantidad de nitrógeno o fósforo suministrada en el paso c) junto con cualquier cantidad disuelta de nitrógeno y fósforo, respectivamente, suministrada con las aguas residuales en el paso a) a la cantidad de DQOFB-carbono suministrada en el paso a) para nitrógeno ( $N_c/C_a$ ) está comprendida entre 1/20 y 1/100 y/o para fósforo ( $P_c/C_a$ ) está comprendida entre 1/100 y 1/500 para obtener lodos activados cultivados que comprenden PHA residual;
- 30 d) proporcionar que al menos parte de los lodos activados cultivados producidos en la segunda etapa de reactor (2) esté presente en la primera etapa de reactor (1);
- 35 e) eliminar parte de las aguas residuales tratadas del primer reactor durante o después del paso a) y/o durante o después del paso c) y eliminar parte de los lodos activados cargados con PHA durante o después del paso a) y/o parte de los lodos activados cultivados durante o después del paso c),
- donde los lodos activados eliminados comprenden PHA a un nivel de al menos 60 % en peso en base al peso en seco de la parte orgánica de los lodos, y donde las partes eliminadas son tales que el tiempo de retención promedio de lodos activados (TRL) en el primer reactor es inferior a 72 h.
- 40 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que  $N_c/C_a$  está comprendido entre 1/20 y 1/75 y/o  $P_c/C_a$  está comprendido entre 1/100 y 1/375.
- 45 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en el que, en las aguas residuales suministradas en el paso a), la proporción en peso de al menos un elemento esencial para el crecimiento a DQOFB-carbono está limitada, donde la proporción límite, en base elemental, para nitrógeno  $N_a/C_a$  está comprendida entre 1/25 y 1/500 y/o  $P_a/C_a$  está comprendida entre 1/125 y 1/2500.
- 50 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que está precedido por un paso de reducir la proporción en peso de N o P a DQOFB eliminando al menos parcialmente N o P y/o añadiendo DQOFB.
- 55 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las aguas residuales tratadas que se extraen del primer reactor se separan de al menos parte de los lodos activados.
- 60 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que en el paso e) parte de los lodos activados cargados con PHA se elimina durante o después del paso a) y los lodos activados eliminados comprenden PHA a un nivel de al menos 65 % en peso.
- 65 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la parte de los lodos activados cargados con PHA y/o los lodos activados cultivados eliminados en el paso e) contiene al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 % en base al peso en seco de PHA de la parte orgánica de los lodos.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que en las aguas residuales suministradas en el paso a) la cantidad de otra DQO biodegradable (ODQOB) es superior a 0,2 veces el nivel de DQOFB en el paso a).
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de DQOFB mantenido en la primera etapa de reactor en el paso a) es de al menos 20 mg/l, preferiblemente de al menos 100 mg/l.

10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer periodo de tiempo (paso a) está comprendido entre 0,5 y 8 h, preferiblemente entre 1 y 4 h, y el segundo periodo de tiempo (paso c) está comprendido entre 0,1 y 6 h, preferiblemente entre 0,2 y 2 h.
- 5
11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las bacterias comprenden bacterias del género *Plasticumulans*, en particular de la especie *P. acidivorans*.
- 10
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está precedido por un paso de fermentar anaeróticamente las aguas residuales para aumentar el nivel de DQOFB, en particular ácidos grasos volátiles, ácidos grasos de cadena media, lactato, etanol y/o AGCM.

Fig. 1

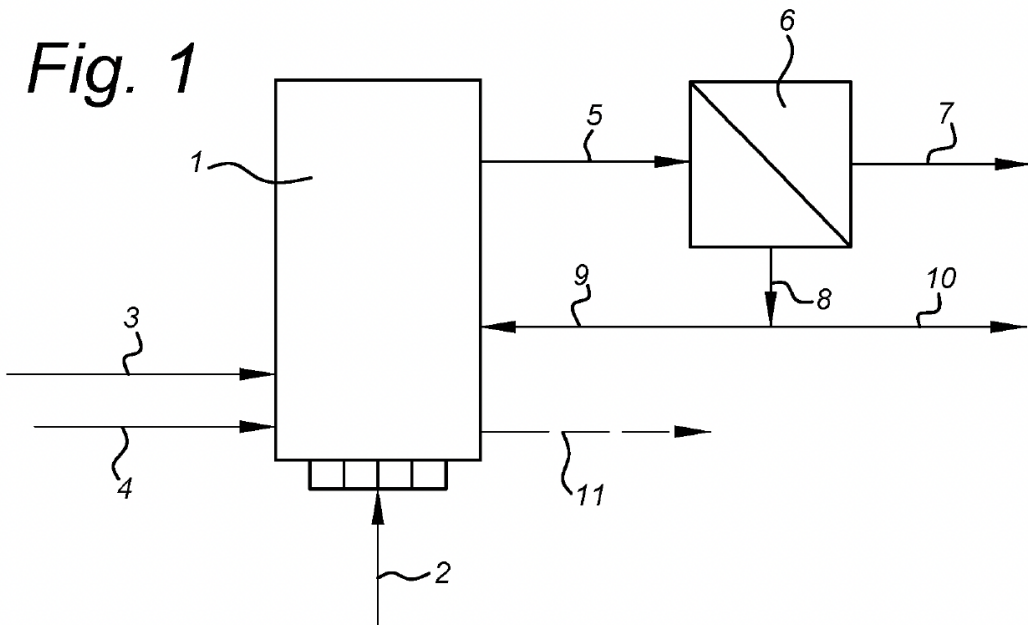
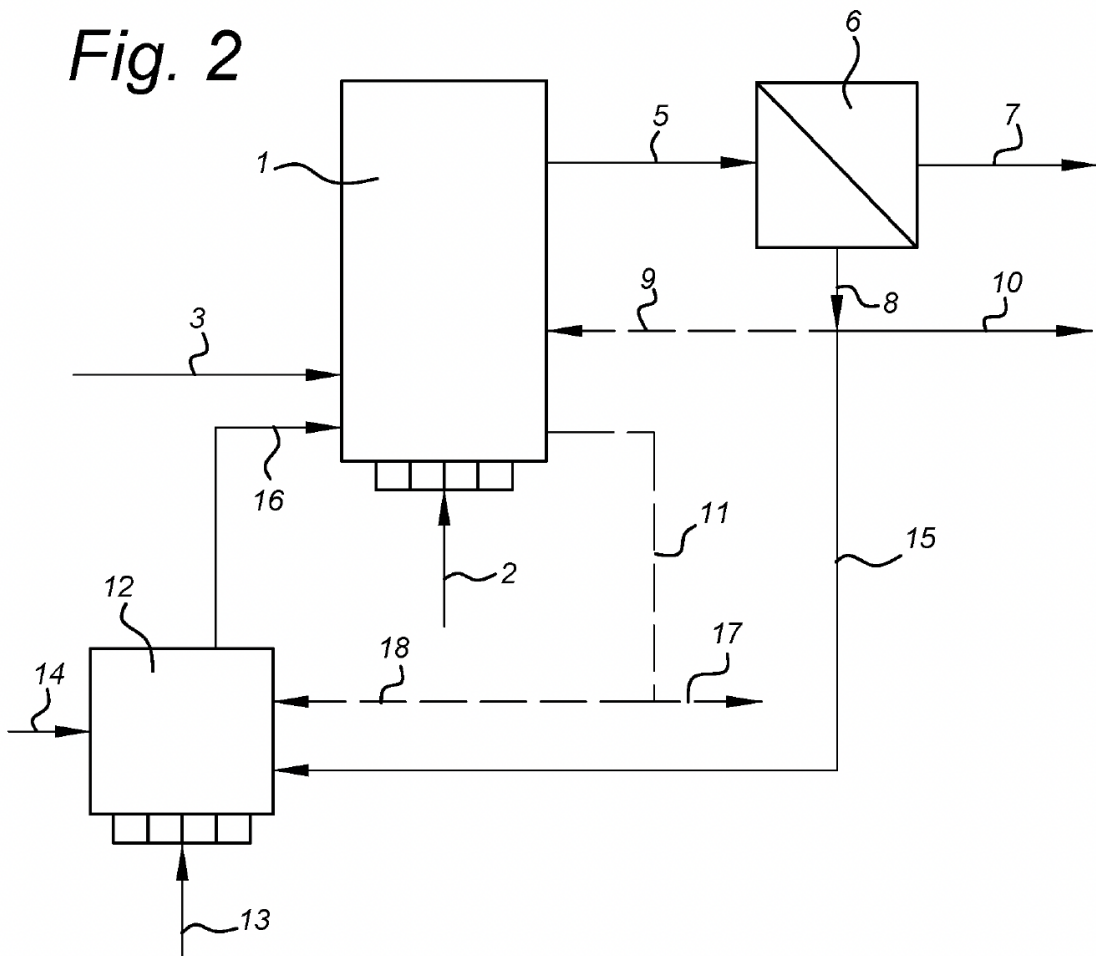


Fig. 2



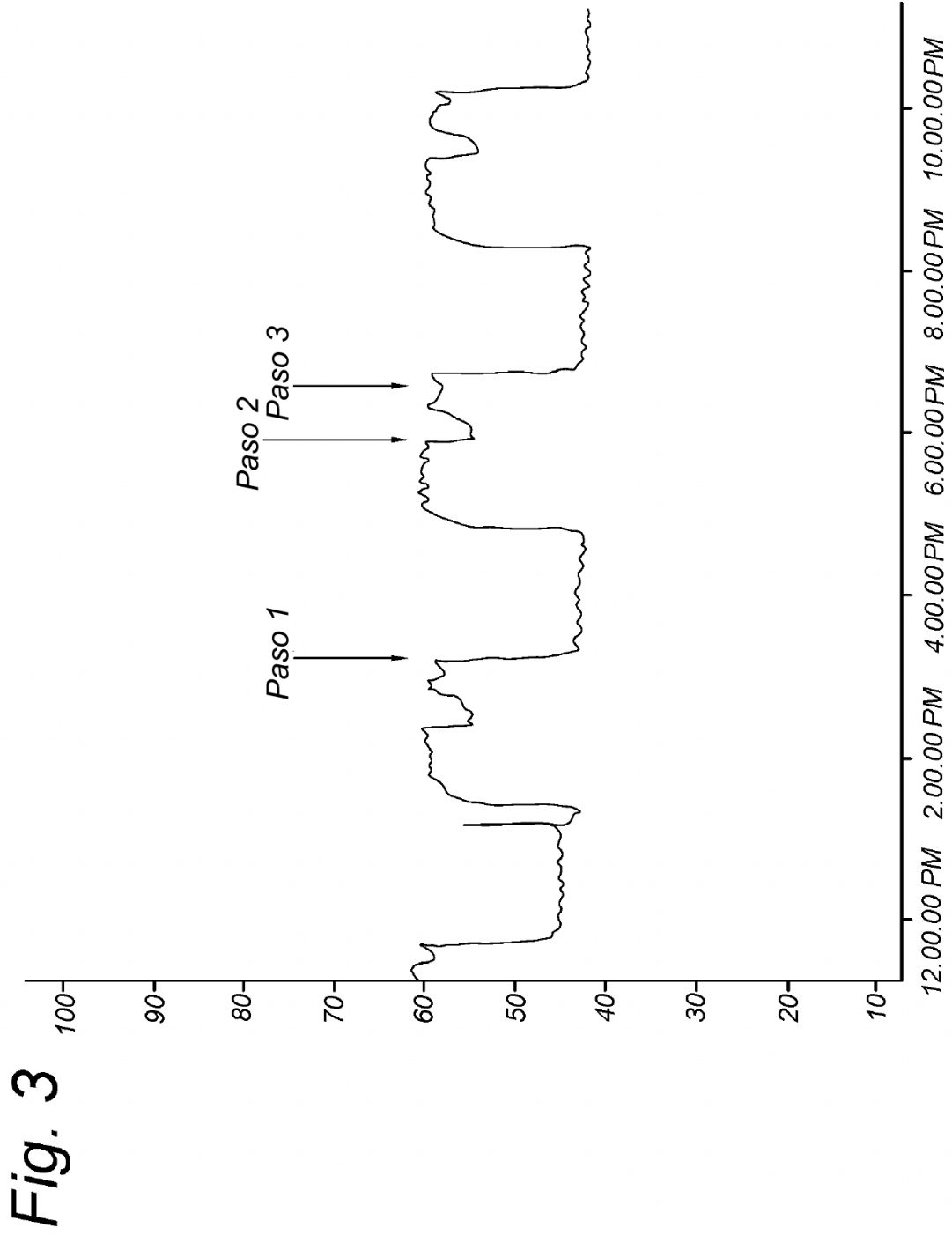


Fig. 3

Fig. 4

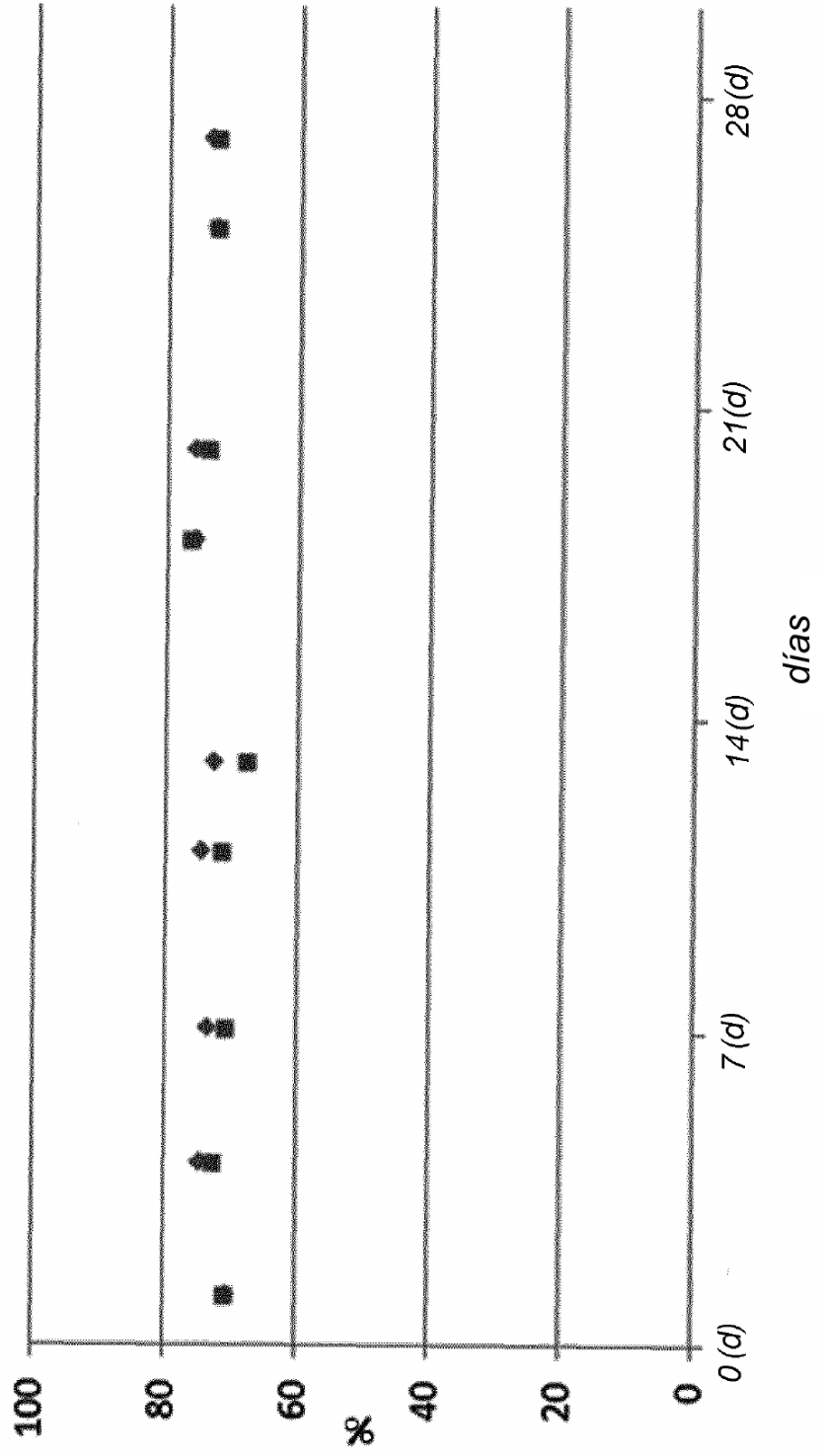


Fig. 5

