
4.- CONNEXIÓ DELS COMPARTIMENTS III I IVa A ESCALA PILOT

Un cop ja s'ha vist que la connexió dels compartiments II, III i IVa a escala de laboratori és factible, i que el funcionament del quart compartiment no es veu alterat per entrades momentànies de nitrit, es planteja la connexió dels compartiments III i IVa a escala pilot.

Cal comprovar, també, l'estabilitat del sistema de control del compartiment IVa quan es troba operant en connexió. Aquest sistema ja ha estat completament desenvolupat i provat quan el compartiment IVa es troba operant aïllat (Vernerey, 2000).

4.1.- Equips, procediment experimental i medi de cultiu

Ja es disposava, inicialment, dels compartiments III i IVa a nivell pilot funcionant en règim continu i, per tant, es va poder procedir directament a la seva connexió. A continuació es fa una breu descripció d'ambdós compartiments i del procediment seguit per connectar-los.

- **Compartiment III**

El tercer compartiment és un llit fix amb cèl·lules immobilitzades sobre el seu suport (Biostyr). El volum de líquid d'aquest reactor és de 3.8 L. Una descripció de la columna empacada i de la seva instrumentació la dona Pérez (1997). Aquest reactor treballa a les condicions òptimes requerides pel procés de nitrificació, és a dir, a pH 8.2, una temperatura de 30°C, airejat i cobert per tal d'evitar la presència de llum. El cabal d'aireació és de 3 L/min. Per assolir una millor mescla entre l'entrada i la recirculació es disposa d'una secció d'entrada al reactor, sense cèl·lules immobilitzades, agitada magnèticament a 400 rpm. El cabal de recirculació és de 30 L/dia. A la figura 4.1 es presenta una fotografia d'aquest compartiment.

- Compartiment IVa

El compartiment IVa és un reactor “air-lift” de bucle extern de 77 L. Una descripció del reactor i de la seva instrumentació la dona Vernerey (Vernerey, 2000). Aquest reactor treballa a les condicions òptimes requerides pel creixement de *S. platensis*, és a dir, a pH 9.5, una temperatura de 36.5°C. La llum incident al reactor durant aquest experiment és de 20 W/m². A la figura 4.3 es troba el calibratge de la intensitat de llum en funció del percentatge d’obertura del controlador. Una fotografia d’aquest compartiment es presenta a la figura 4.2.



Figura 4.1.- Fotografia del tercer compartiment a escala pilot



Figura 4.2.- Fotografia del quart compartiment a escala pilot

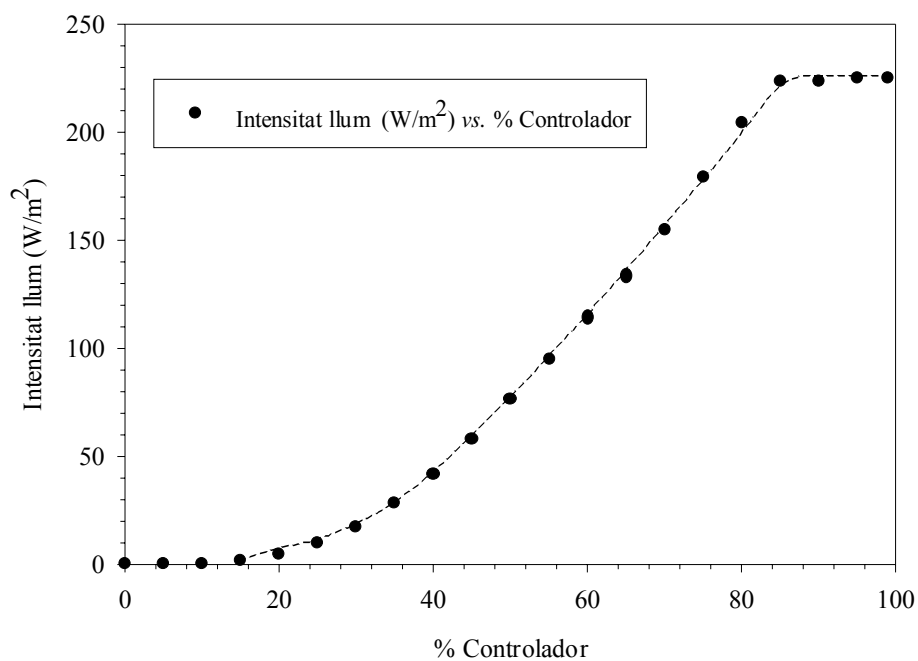


Figura 4.3.- Intensitat de llum incident al compartiment IVa a escala pilot en funció de la obertura del controlador

- Connexió entre ambdós compartiments

La connexió entre aquests dos compartiments es fa mitjançant dues etapes de filtració i un tanc pulmó de 10 L. Les dues etapes de filtració (filtres de líquid MILLIPORE OPTICAP™ 4”) s’afegeixen per tal d’eliminar les poques cèl·lules lliures que surten del tercer compartiment. Un dels filtres es col·loca a la sortida del tercer compartiment i l’altre a l’entrada del quart. D’aquesta manera es tenen ambdós compartiments aïllats, permetent la desconexió en cas de que aquesta sigui necessària. El tanc pulmó s’afegeix per tenir un marge d’actuació, per exemple per poder aturar momentàniament el continu del tercer o quart compartiment sense que això suposi aturar l’altre compartiment o permetre al sistema de control d’un marge d’actuació per corregir desacoblaments temporals entre compartiments.

- Medi de cultiu

Per poder connectar ambdós compartiments s'usa un medi basat en els medis necessaris pel creixement de *N. europaea* (Wijffels, 1994), *N. winogradskyi* (Hendrikus *et al.*, 1992; Wijffels, 1994; Pérez, 1997) i *S. platensis* (Zarrouk, 1966). La composició d’aquest medi basat en la combinació de medis anteriors, es presenta a la taula 4.1.

Medi connexió	
<i>Components</i>	<i>g/L</i>
EDTA-Na·2 H ₂ O	0.08
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.01
KH ₂ PO ₄	0.68
NaHCO ₃	0.80
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.20
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.04
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.32
Na ₂ HPO ₄	0.71
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4 H ₂ O	0.18
<i>Dissolució</i>	<i>mL/L</i>
A5	1.00
B6	1.00

Taula 4.1.- Composició del medi de connexió dels compartiments III i IVa (les composicions d'A5 i B6 es presenten a les taules 3.2 i 3.3)

4.1.- Efectes del canvi de dilució de la connexió dels compartiments III i IVa

Com ja s'ha dit, es vol estudiar la connexió dels compartiments III i IVa a escala pilot. Aquest estudi es vol dur a terme tant en estat estacionari com en els estats transitoris produïts quan s'efectuen diferents canvis en l'operació estable de la connexió. Inicialment s'estudia l'efecte produït quan s'incrementa la velocitat de dilució de la connexió. Per dur a terme aquest experiment s'utilitza el medi descrit a la taula 4.1, amb una concentració d'amoni de 300 N-ppm i una concentració de nahco₃ de 5.0 g/l. Aquesta concentració de NaHCO₃ més elevada és deu al fet de que, en aquest

experiment, la font de C del compartiment IVa ve exclusivament del NaHCO_3 que prové del compartiment III. Les condicions en que operen els reactors en aquest experiment es recullen a la taula 4.2.

	Condicions I		Condicions II		Condicions III	
	Comp. III	Comp.IV	Comp. III	Comp.IV	Comp. III	Comp.IV
$T(^{\circ}\text{C})$	30	36.5	30	36.5	30	36.5
pH	8.2	9.5	8.2	9.5	8.2	9.5
$V_{\text{liquid}} (\text{L})$	3.8	77	3.8	77	3.8	77
$L_{\text{lum}} (\text{W}/\text{m}^2)$	0	20	0	20	0	20
$Q_L (\text{L}/\text{dia})$	4	4	8	8	15	15
$D (\text{h}^{-1})$	0.044	0.002	0.088	0.004	0.164	0.008
$t (\text{dies})$	0.95	19.25	0.475	9.625	0.25	5.13

Taula 4.2.- Resum de les condicions dels compartiments III i IVa durant l'experiment de connexió a escala pilot

Les evolucions del tercer i quart compartiment en fer aquests canvis en la velocitat de dilució es presenten a les figures 4.4 i 4.5.

Com es pot observar a la figura 4.4, quan s'augmenta la velocitat de dilució en aquest compartiment, disminueix la conversió de l'amoni a nitrat, i entren nitrats i amoni al quart compartiment. Aquesta entrada de nitrats i amoni és momentània doncs la columna recupera el funcionament habitual al cap d'unes hores, quan ja s'ha adaptat el biofilm existent i se n'ha format el necessari per degradar les noves quantitats d'amoni que hi entren. Tot l'amoni entrant surt en forma de nitrat quan la columna recupera l'estat habitual de treball, és a dir, la degradació d'amoni a nitrat és completa.

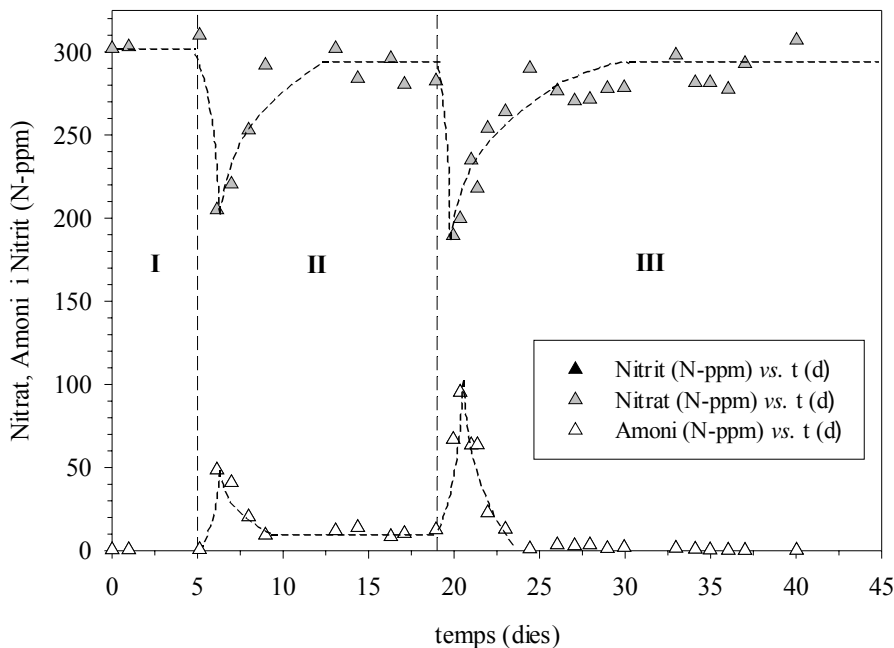


Figura 4.4.- Evolució del compartiment III quan opera amb les condicions presentades a la taula 4.2
I, II, III: condicions d'operació assajades

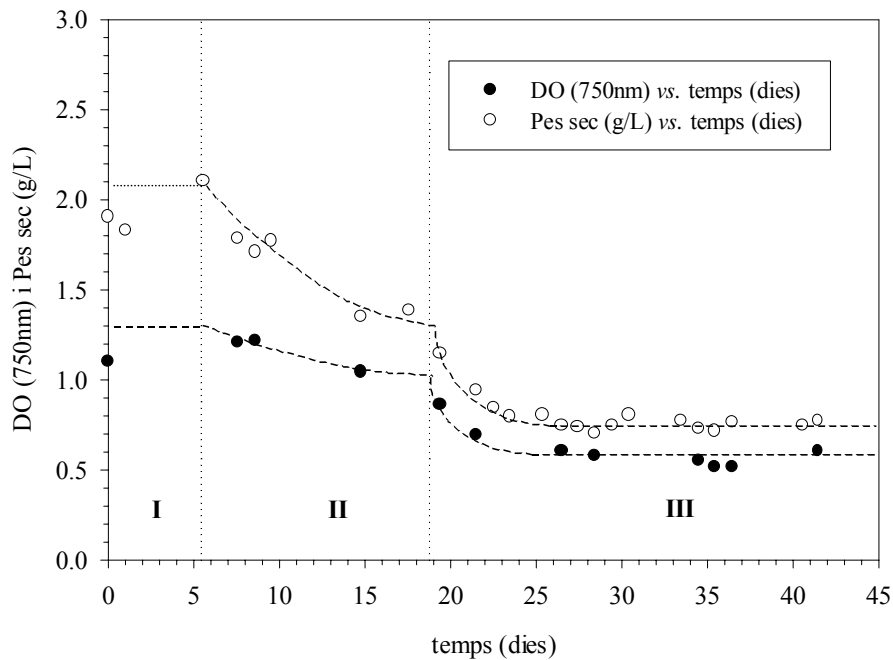


Figura 4.5.- Evolució de la biomassa del compartiment IVa quan opera amb les condicions presentades a la taula 4.2. I, II, III: condicions d'operació assajades

Pel que fa a l'evolució del quart compartiment, s'observa una disminució de la concentració de biomassa en canviar la velocitat de dilució. Per les velocitats de dilució de 0.002 h^{-1} i 0.004 h^{-1} no s'espera assolir l'estat estacionari ja que això hagués suposat molt de temps, doncs, per aquestes velocitats de dilució, el temps de residència en aquest compartiment és molt elevat tal i com es pot observar a la taula 4.2. El que es fa és anar augmentant la velocitat de dilució a mesura que el tercer compartiment va recuperant el seu funcionament normal, és a dir, quan tot l'amoni és convertit a nitrat. Per a la velocitat de dilució de 0.008 h^{-1} sí que s'arriba a l'estat estacionari, podent així avaluar el comportament global de la connexió. Per poder veure com afecta la presència de nitrits al quart compartiment, i per poder fer balanços de carboni i de nitrogen, es segueixen les concentracions de carboni, amoni, nitrit i nitrat a l'entrada i sortida d'aquest reactor. Les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat a l'entrada d'aquest reactor són les de la sortida del tercer compartiment i es troben a la figura 4.4, les altres concentracions es presenten a la figura 4.6.

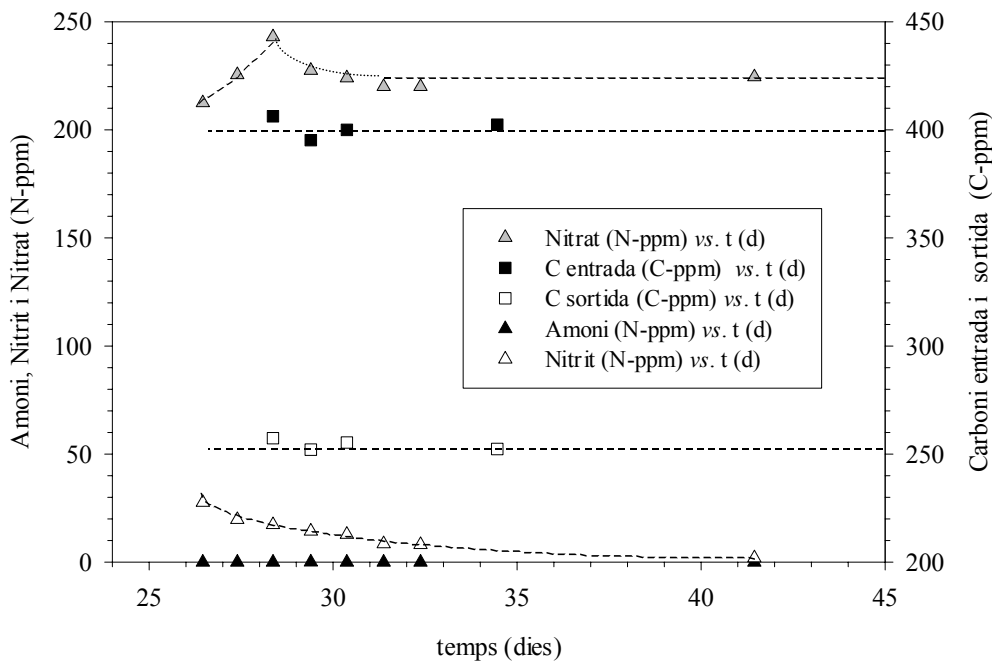


Figura 4.6.- Evolució de les concentracions d'amoni, nitrit, nitrat a la sortida i de carboni a l'entrada i a la sortida del compartiment Iva quan opera amb les condicions presentades a la taula 4.2

A partir de les dades que es troben representades a les figures 4.5 i 4.6, es fan els balanços de carboni i nitrogen del quart compartiment. S'assumeix que la composició de *S. platensis* és de $CH_{1.650}O_{0.531}N_{0.170}S_{0.007}P_{0.006}$, composició determinada per d'altres investigadors del consorci MELISSA (Cornet, 1992a). Aquests balanços es presenten a les taules 4.3 i 4.4.

	Entrada (gC/L)	Sortida (gC/L)
Carboni	0.4	0.25
Cèl·lules	0	0.241
<i>Total</i>	<i>0.4</i>	<i>0.491</i>

Taula 4.3.- Balanç de carboni del compartiment IVa

	Entrada (N- ppm)	Sortida (N-ppm)
Nitrat	280	225
Cèl·lules	0	48
<i>Total</i>	<i>280</i>	<i>273</i>

Taula 4.4.- Balanç de nitrogen del compartiment IVa

D'aquestes taules se'n desprèn que, mentre que el balanç de matèria corresponent al nitrogen es compleix, el balanç de carboni no ho fa. Això es deu segurament al fet de que el pH del quart compartiment es controla mitjançant addicions de CO_2 . És a dir,

s'afegeixen carbonats en solució. Això explica el fet de que la quantitat de carboni a la sortida del reactor sigui superior a la de l'entrada.

A les figures 4.4 i 4.6 es veu com tant l'amoni com el nitrat són consumits en el compartiment IVa. Aquest fet també s'evidencia al capítol 3. Per tal de veure si el nitrit és o no consumit parcialment per *S. platensis* en aquest compartiment, i poder comparar aquests resultats amb els obtinguts al capítol 3, es compara l'evolució de la concentració de nitrit amb la corba de rentat de nitrit en aquest compartiment. El resultat es presenta a la figura 4.7.

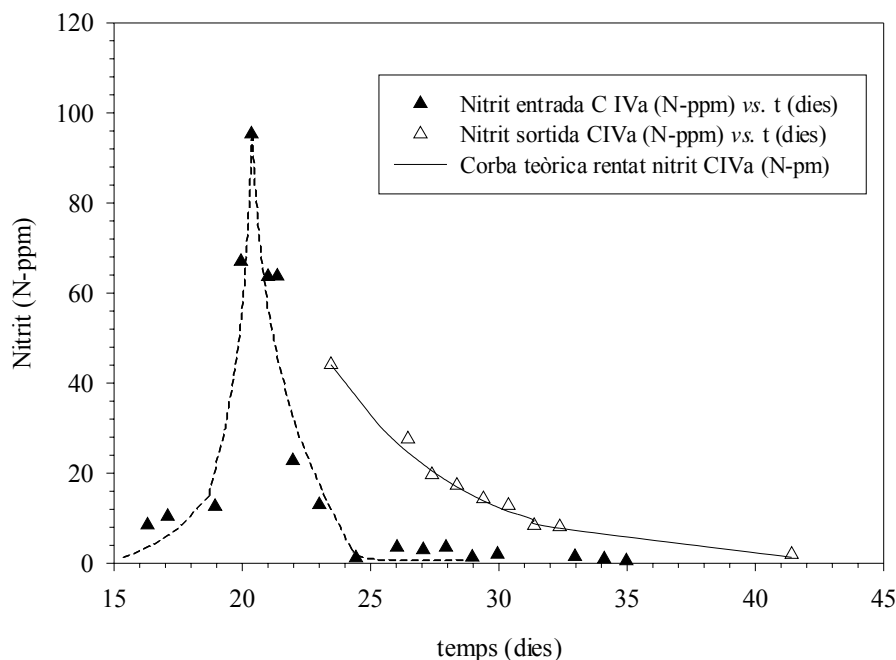


Figura 4.7.- Evolució de la concentració de nitrit i corba de rentat del nitrit al compartiment IVa

Per efectuar la corba de rentat de nitrit es segueix el mateix procediment que a l'apartat 3.3. És a dir, es suposa que l'entrada de nitrit ja no és important en comparació amb la concentració de nitrit que hi ha en aquell moment en el reactor, per tant, es pot considerar nul·la. Fent aquesta consideració, suposant que la concentració inicial de nitrit és la concentració de nitrit existent un cop ja ha entrat el pic important de nitrit en aquest reactor, i si es té en compte que aquest reactor "air-lift" es pot considerar un RCTA (reactor continu de tanc agitat) a efectes de mescla, la corba de rentat de nitrit queda descrita per l'equació 3.2 de l'apartat 3.3.

Substituint les condicions d'aquest compartiment a l'equació 3.2, s'obté l'equació 4.1.

$$[\text{nitrit}] = 4257.34 \exp^{-0.0082 t} \quad (4.1)$$

on la concentració de nitrit està expressada en (N-ppm) i el temps en (h).

Com es pot observar a la figura 4.7, l'evolució de la concentració de nitrit en el quart compartiment coincideix pràcticament amb la corba de rentat. Per tant, el nitrit no és consumit per *S. platensis* en aquestes condicions. És a dir, quan *S. platensis* té com a font de nitrogen amoni, nitrit i nitrat, consumeix inicialment l'amoni i el nitrat però no el nitrit. Aquests resultats que coincideixen amb els presentats al capítol 3.

Durant aquest experiment, a l'igual que a l'apartat 3.3.1, la font de carboni del quart compartiment ha estat el carbonat provenint del l'ajust del pH i del tercer compartiment. Tenint en compte que en el disseny del bucle MELISSA la font de carboni d'aquest compartiment ha de ser el CO₂ que prové de la tripulació, s'ha de passar d'usar carbonats a CO₂ com a font de carboni en aquesta connexió.

En el següent apartat s'estudia la connexió d'ambdós compartiments a llarg termini i emprant CO₂ com a font de carboni del quart compartiment.

4.3- Connexió dels compartiments Iii i IVa a escala pilot a llarg termini, disminuint la concentració d'oxigen dissolt en el compartiment III

En aquest apartat es vol avaluar la connexió a escala pilot dels compartiments III i IVa a llarg termini i l'efecte que té sobre ambdós compartiments la disminució de la concentració d'oxigen dissolt en el tercer compartiment. Per fer això, es connecten ambdós compartiments durant 3 mesos. Les condicions d'operació de cada compartiment durant aquesta connexió es presenten a la taula 4.5. El medi que s'utilitza és el que es presenta a la secció 4.1, variant la concentració d'amoni tal i com es descriu a la taula 4.5. En aquest cas, la font de carboni del compartiment iva prové del CO₂ que es fa bombollear dins del compartiment.

Condicions	COMPARTIMENT III					COMPARTIMENT IV a			
	NH ₄ ⁺ (N-ppm)	Q _L (L/dia)	D (h ⁻¹)	τ (dies)	O ₂ %DO	Q _L (L/dia)	D (h ⁻¹)	τ (dies)	Llum (W/m ²)
I	900	4.5	0.05	0.84	80	4.75 ^(*)	2.6E-7	16.21	35
II	300	14.5	0.16	0.26	80	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
III	300	14.5	0.16	0.26	40	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
IV	600	14.5	0.16	0.26	40	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
V	600	14.5	0.16	0.26	20	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
VI	600	14.5	0.16	0.26	15	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
VII	600	14.5	0.16	0.26	10	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
VIII	600	14.5	0.16	0.26	5	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35
IX	600	14.5	0.16	0.26	40	15.5 ^(*)	8.4E-3	4.96	35

Taula 4.5.- condicions d'operació dels compartiments III i IVa durant aquest experiment (*) la diferència de cabals observada entre compartiments es deu a l'ajust del pH mitjançant NaOH que es duu a terme al compartiment IVa

LES EVOLUCIONS DELS COMPARTIMENTS III i IVa durant aquesta connexió es presenten a les figures 4.8,4.9 i 4.10.

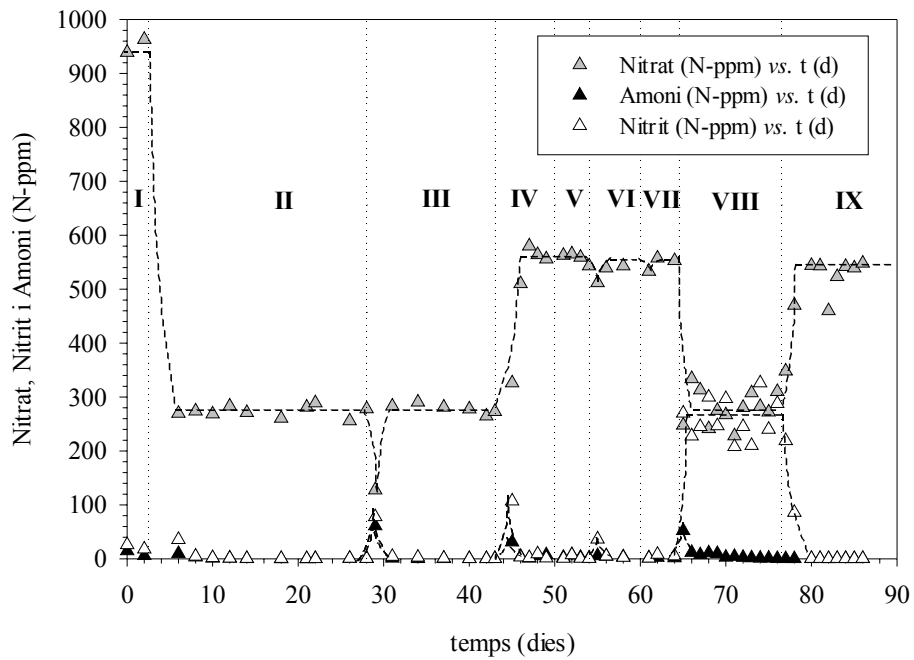


Figura 4.8.- Evolució del compartiment Iii quan opera amb les condicions que es presenten a la taula 4.5 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII i IX: condicions d'operació assajades

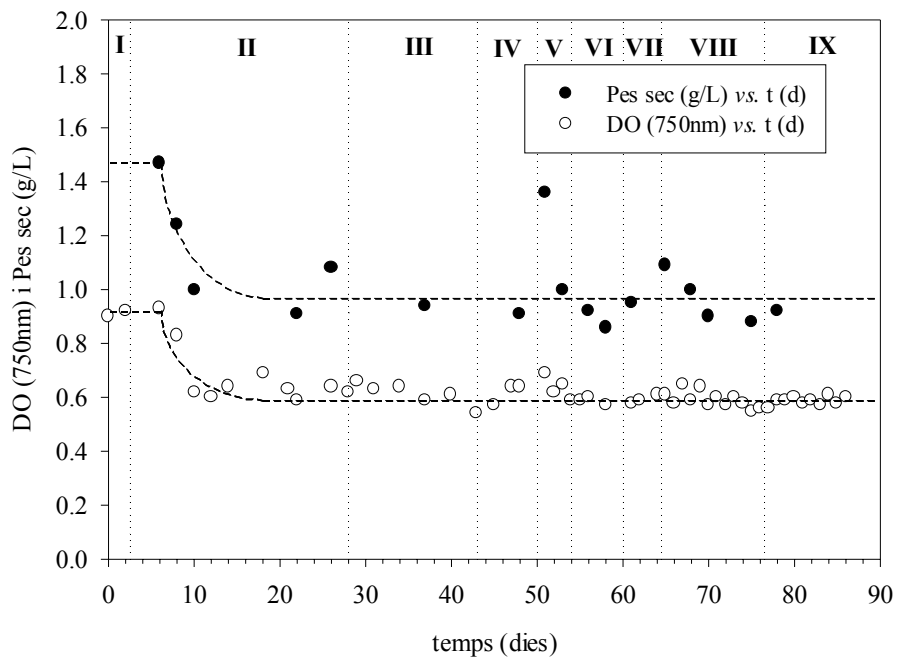


Figura 4.9.- evolució de la biomassa del compartiment IVa quan opera amb les condicions que es presenten a la taula 4.5. I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII i IX: condicions d'operació assajades

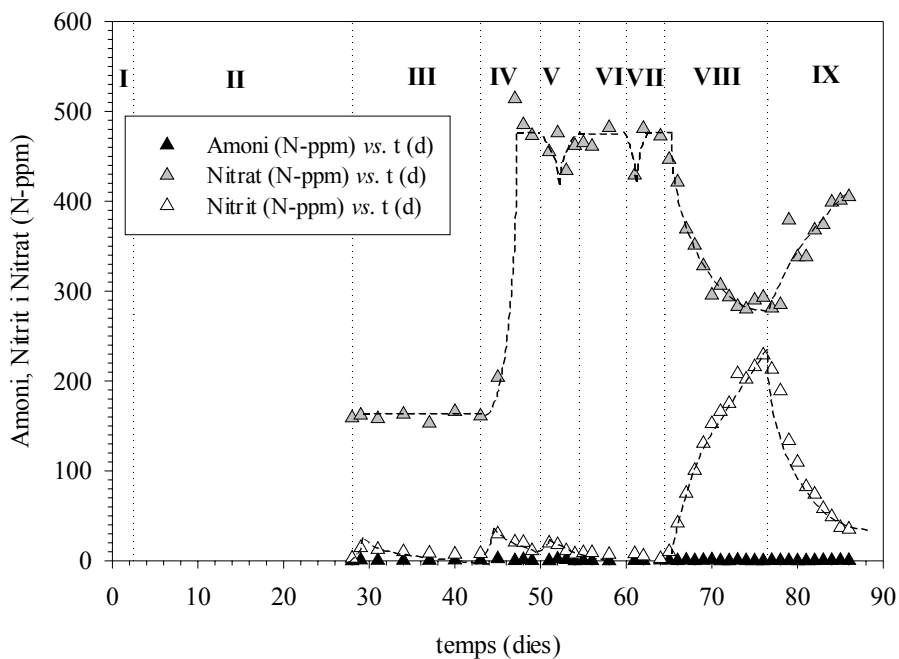


Figura 4.10.- evolució de la concentració d'amoni, nitrit i nitrat en el compartiment IVa quan opera amb les condicions que es presenten a la taula 4.5. I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII i IX: condicions d'operació assajades

Com es desprèn de les figures 4.8, 4.9 i 4.10, ambdós compartiments han estat connectats durant tres mesos sense que s'hagi presentat cap dificultat. Aquest és un resultat important dins dels objectius que es persegueixen a la planta pilot, entre els que hi ha la demostració de la viabilitat de l'operació en continu i interconnexió del conjunt de reactors.

A la figura 4.8 es veu que el tercer compartiment opera en condicions òptimes pel funcionament del MELISSA, és a dir, tot l'amoni entrant és convertit a nitrat excepte durant les condicions d'operació VIII, quan no hi ha prou O_2 per convertir totalment l'amoni a nitrat i es troben grans quantitats de nitrit a la sortida d'aquest compartiment. cada cop que es canvien les condicions d'operació d'aquest compartiment també s'observen estats transitoris curts durant els quals l'amoni tampoc és convertit a nitrat completament. aquests períodes són simplement el temps en que tarda el biofilm en adaptar-se a les noves condicions d'operació. en aquest compartiment, el balanç de nitrogen pot considerar-se tancat ja que, durant les condicions d'operació II i III, quan entren 300 N-ppm a la sortida se'n troben 270 N-ppm, i durant les condicions d'operació III, IV V, VI, VII i VIII que entren 600 N-ppm, es troben 550 N-ppm a la sortida.

El compartiment IVa opera de manera completament estable durant tot l'experiment, tal i com es presenta a la figura 4.9. Es té un valor estacionari pel que fa a la concentració de biomassa que es troba entre 0.9 i 1 g/l. Així doncs, sembla que d'entrada les concentracions de nitrit puntuals existents durant aquest experiment, veure les condicions d'operació viii, encara no són tòxiques per *S.platensis*.

No es poden realitzar els balanços de carboni d'aquest compartiment ja que no es mesuren ni l'entrada ni la sortida de CO_2 , única font de carboni en les condicions d'operació emprades en aquest test. Els balanços de nitrogen, en canvi, sí que es poden realitzar i poden considerar-se tancats. Entre l'entrada i la sortida del compartiment IVa

hi ha una diferència d'entre 80 i 100 N-ppm, tal i com es desprèn de les figures 4.8 i 4.10 i, assumint una composició elemental de *S. platensis* de $CH_{1.650}O_{0.531}N_{0.170}S_{0.007}P_{0.006}$ (Cornet *et al.*, 1992a), es requereixen 90 N-ppm per formar 0.9-1 g/L de biomassa.

A les figures 4.11 i 4.12 es presenten amb més detall els canvis que es produeixen en ambdós compartiments quan es disminueix la concentració d'oxigen dissolt en el compartiment III, condicions d'operació IV, V, VI, VII, VIII i IX, taula 4.5.

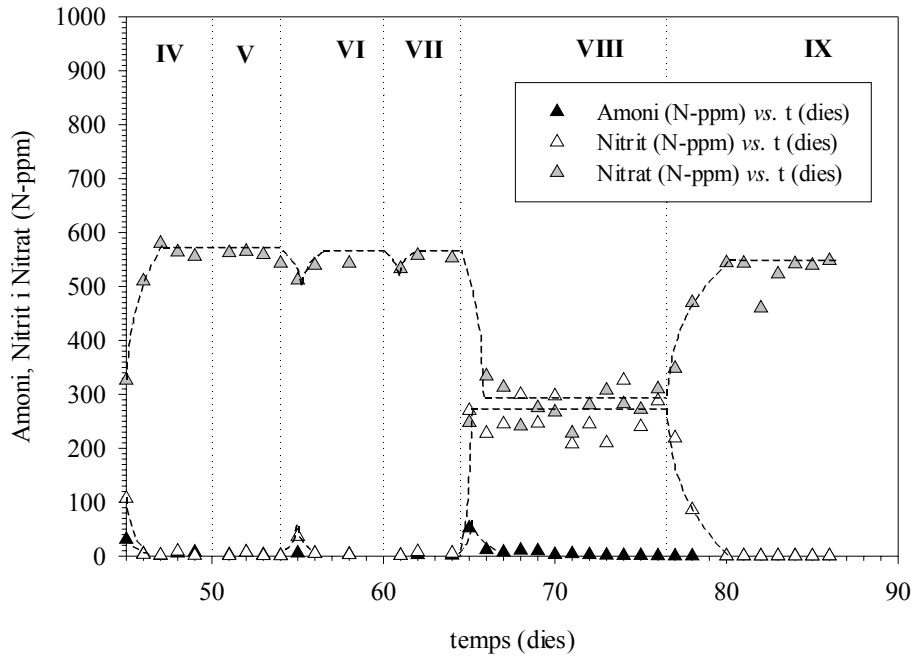


Figura 4.11.- Evolució del compartiment III durant les condicions d'operació IV, V, VI, VII, VIII i IX, veure taula 4.5

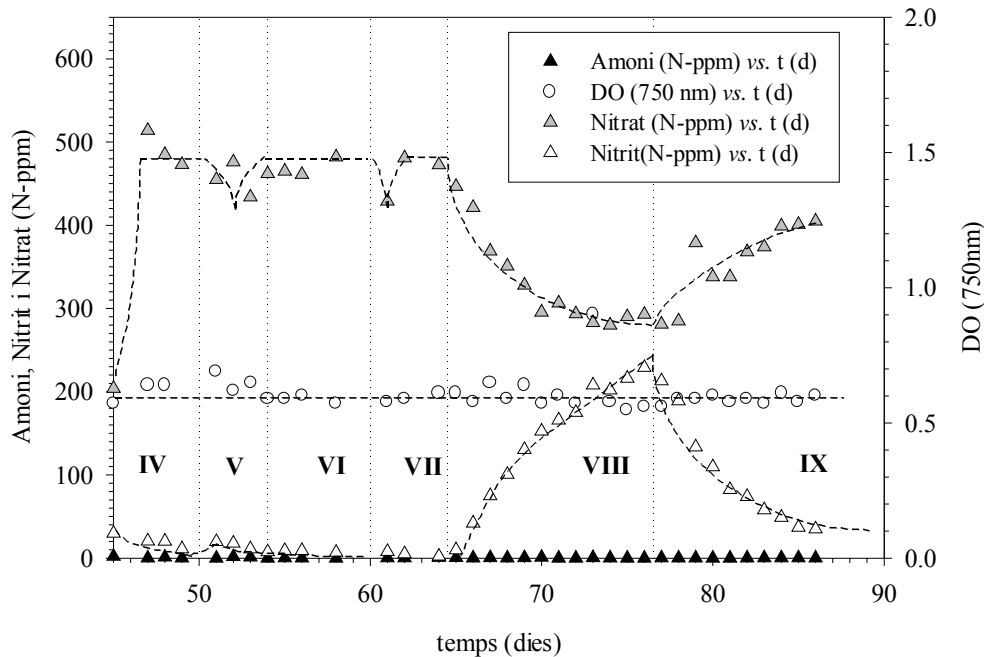


Figura 4.12.- Evolució del compartiment iva durant les condicions D'OPERACIÓ IV, V, VI, VII, VIII i IX, veure taula 4.5

Tal i com es veu a la figura 4.11, cada vegada que es disminueix la concentració d'oxigen en el tercer compartiment, hi ha un estat transitori on l'amoni no és completament convertit a nitrat i hi ha amoni i nitrit sortint d'aquest compartiment. Aquest estat és transitori, i un cop el biofilm s'ha adaptat a les noves condicions de cultiu, tot l'amoni és convertit a nitrat exceptuant per les condicions d'operació VIII, quan la concentració d'oxigen present al reactor és insuficient perquè la biomassa pugui dur a terme el procés complet de nitrificació i, per tant, es troben grans quantitats de nitrit a la sortida d'aquest compartiment. En les condicions d'operació IX, es torna a subministrar l'oxigen necessari perquè el reactor recuperi el seu estat òptim de funcionament i tot l'amoni entrant sigui convertit a nitrat. Com ja s'ha comentat anteriorment i com es pot observar a la figura 4.12, l'entrada de nitrit no afecta la concentració de biomassa del quart compartiment, mantenint-se aquesta totalment estable. Així doncs, no s'observa toxicitat deguda a la presència d'aquestes concentracions de nitrit en el compartiment iva. De la figura 4.12 també es desprèn que l'amoni és completament consumit quan entra en aquest compartiment, tal i com ja s'ha observat en el capítol 3. Cal recordar però, que l'amoni també és parcialment rentat del reactor per la fase gasosa en forma de gas amoníac, degut a l'elevat pH del cultiu. així doncs, la preferència de *S. platensis* per consumir amoni quan, amoni, nitrat i nitrit es troben al cultiu, s'observa a l' igual que en el capítol 3. per tal de veure si el nitrit és consumit o no en aquest compartiment, es comparen els punts experimentals de l'evolució de la concentració de nitrit amb la corba teòrica de concentració de nitrit, per les condicions VIII i amb la corba de rentat de nitrit per les condicions IX, tal i com es pot veure a la figura 4.13.

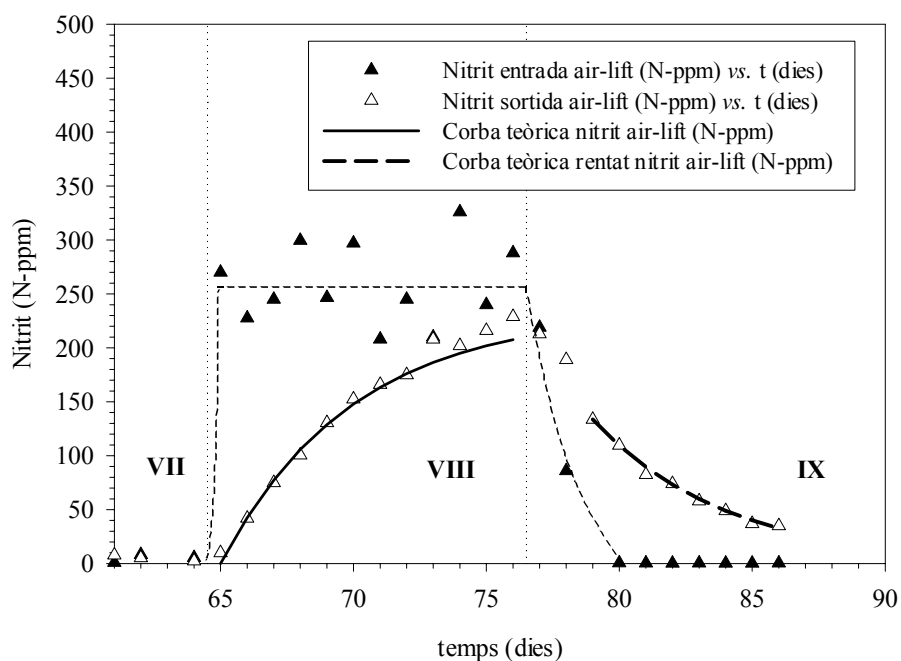


figura 4.13.- concentracions experimentals de nitrit a l'entrada i sortida del compartiment IVa, comparant amb la corba teòrica de concentració de nitrit per les condicions VIII i corba teòrica de rentat de nitrit per les condicions IX

La corba teòrica de la concentració de nitrit per les condicions d'operació VIII es troba descrita a l'equació 4.2, considerant mescla perfecta a dins de l' "air-lift".

$$[\text{nitrit}] = C_E - C_E \exp^{-(t-t_0)/\tau} \quad (4.2)$$

on:

[nitrit] és la concentració de nitrit (n-ppm)

τ és el temps de residència (h)

t_0 és el temps inicial (h)

t és el temps (h)

C_e és la concentració d'entrada de nitrit (n-ppm)

Substituint el temps de residència i considerant la concentració d'entrada de nitrit de 233 N-ppm (a la figura 4.13 la concentració mitjana d'entrada de nitrit és de 250 N-ppm però cal considerar la dilució deguda a l'entrada d'1L/dia de NaOH necessària per ajustar el pH del reactor). Aleshores l'equació 4.2 es converteix en l'equació 4.3.

$$[\text{nitrit}] = 233 - 233 \exp^{-(t-1559.96)/119.23} \quad (4.3)$$

LA CORBA TEÒRICA DE RENTAT DE LES CONDICIONS IX S'OBTÉ SUBSTITUÏNT A L'EQUACIÓ 3.2 ELS PARÀMETRES CORRESPONENTS, OBTENINT L'EQUACIÓ 4.4.

$$[\text{nitrit}] = 133.6 \exp^{-(t-1895.96)/119.23} \quad (4.4)$$

Així doncs, a l'igual que en els experiments anteriors, quan hi ha excés de nitrat, el nitrit no és consumit en aquest compartiment.

Podem concloure, que els compartiments III i IVa han estat connectats de manera satisfactòria a llarg termini. Ambdós compartiments s'han comportat de manera completament estable tant operant en règim estacionari com quan s'efectuen salts en la velocitat de dilució d'ambdós compartiments o es disminueix la concentració d'oxigen del compartiment III.

4.4.- Tests del sistema de control del melissa (MCS)

Un cop s'ha demostrat l'operació estable de la connexió dels compartiments III i IVa a escala pilot, cal verificar el bon funcionament del sistema de control del melissa pel compartiment iva estant aquest interconnectat. Per tal de dur a terme aquest experiment, el sistema de control del melissa del quart compartiment controla la bomba d'entrada del tercer, controlant també així el cabal d'entrada del quart compartiment; tot el que surt del tercer compartiment entra al quart.

4.4.1.- Model de creixement de *S. platensis* en funció de la intensitat lumínica disponible i sistema de control del melissa pel compartiment IVa

La modelització matemàtica dels fotobioreactors consisteix en acoblar el metabolisme dels microorganismes als fenòmens físics de transferència d'energia lumínica al cultiu. El model de creixement de *S. platensis* desenvolupat pel compartiment Iva per Cornet i col·laboradors (Cornet *et al.*, 1992 a i b) es presenta esquemàticament a la figura 4.14 i es basa en:

Modelitzar la transferència d'energia lumínica a partir de lleis físiques locals tenint en compte l'absorció i dispersió de llum causada pel les cèl·lules presents en el fotobioreactor. Aquesta modelització permet obtenir els perfils d'energia radiant disponible en cada punt del reactor. Aquest model es basa en les hipòtesis de Schuster (1905).

Triar una llei biològica que descriu el creixement de *S. platensis* en funció de la intensitat lumínica. Per descriure el creixement de *S. platensis* s'utilitza el model de monod, tenint en compte, però, que a partir d'una certa intensitat de llum incident al cultiu aquest queda fotoinhibit.

Acoblar la cinètica local de creixement amb l'energia radiant local disponible en cada punt del reactor.

Determinar un volum útil il·luminat en el qual la intensitat lumínica és suficient per permetre el creixement cel·lular, en el cas de que no tot el fotobioreactor estigui il·luminat.

Amb la integració de les cinètiques de creixement locals en el volum il·luminat s'obté la velocitat mitjana de creixement de *S. platensis* en el fotobioreactor.

El funcionament estable del sistema melissa implica el desenvolupament d'un sistema de control avançat (MCS). Cal coordinar el funcionament de cadascun dels compartiments amb la finalitat de poder assegurar la supervivència de la tripulació.

En aquest capítol es valida el sistema de control desenvolupat pel compartiment Iva quan aquest opera interconnectat amb el compartiment III.

El MCS es basa en una estratègia jeràrquica de control de cadascun dels compartiments amb la finalitat de que siguin integrats en una estratègia global (Binois, 1993; Fulget i Richalet, 1993; Fulget, 1995). Un esquema d'aquesta estratègia de control es presenta a la figura 4.15.

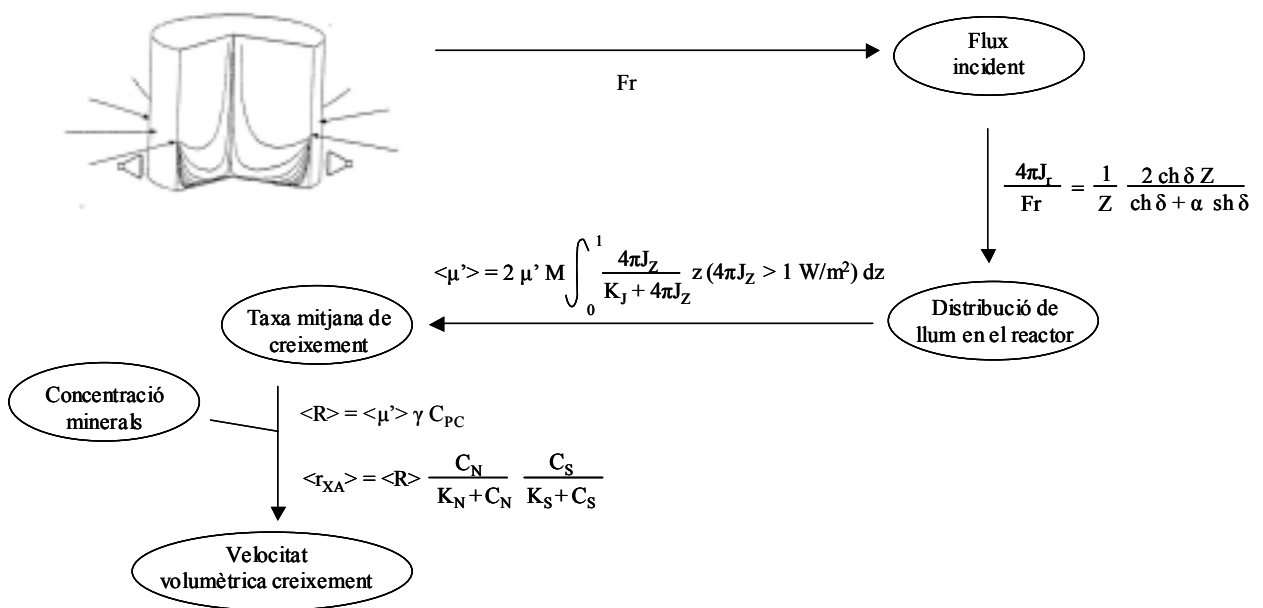


Figura 4.14.- Model de creixement de *S. platensis* (Cornet *et al.*, 1992 a i b)

Aquesta estructura jeràrquica es divideix en 3 nivells diferents que es descriuen a continuació:

Nivell 0: consisteix en la regulació de la intensitat de llum. En aquest nivell es calcula mitjançant un control pi el voltatge que s'ha d'aplicar a les bombetes a fi de regular la intensitat lumínica al centre del reactor.

Nivell 1: consisteix en la regulació de la producció de biomassa actuant sobre la intensitat de llum. La llei de control aplicada és una llei predictiva no lineal, basada en el model de creixement descrit anteriorment a la figura 4.14, i que consisteix en la variació de les intensitats del flux lumínic incident f_r , a través de processos predictius. El model disponible permet calcular el f_r necessari mitjançant un model no lineal on hi intervé la concentració cel·lular.

Nivell 2: en aquest nivell s'optimitzen les consignes tenint en compte les restriccions. Es requereix una consigna de producció nominal i una consigna de cabal nominal. La concentració de biomassa ve limitada per una restricció de mínim i màxim i la de cabal pot variar dins d'un interval limitat. A partir de les restriccions de mínim i màxim pel que fa a la concentració de biomassa i cabal, és possible, doncs, definir unes restriccions de mínim i màxim sobre la producció. El principal objectiu d'aquest nivell de control és el de modificar si és necessari, les consignes de producció i flux per respectar les restriccions.

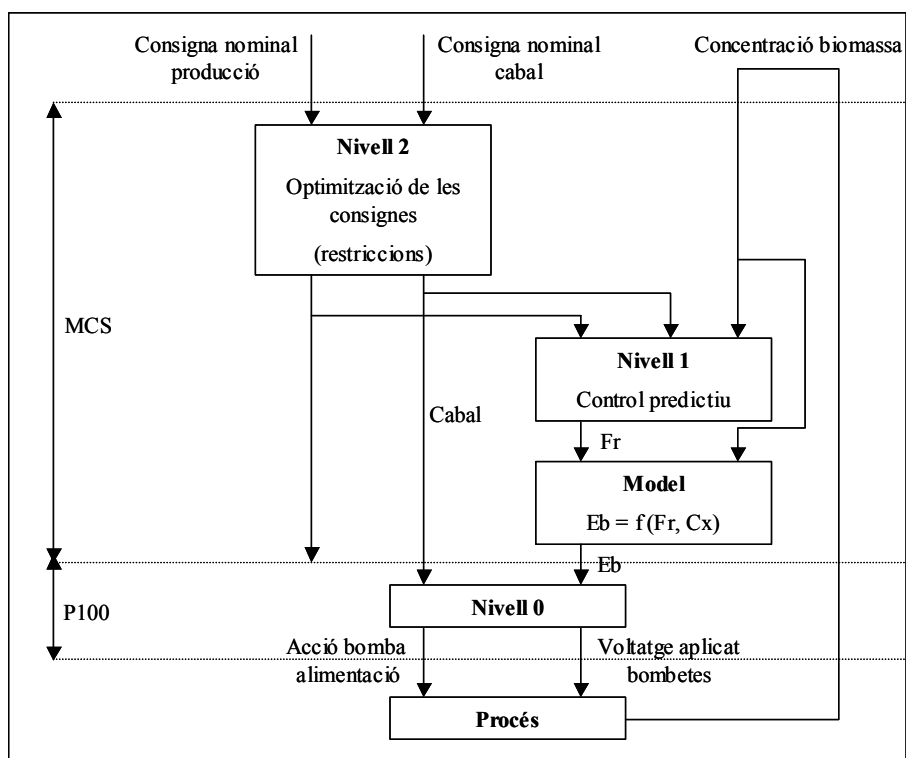


Figura 4.15.- Estratègia de la estructura de control establerta per adersa (Fulget, 1995)

4.4.2.- Muntatge per rentar el sensor de biomassa

Per tal de que el mcs controli completament el quart compartiment cal que el sensor de concentració cel·lular, un sensor de tipus òptic basat en mesures de turbidesa en línia, operi de forma correcte. Un inconvenient perquè aquest sensor operi correctament durant un període llarg d'operació és l'adhesió de biomassa sobre del sensor, fet que comporta lectures errònies. Es planteja, doncs, instal·lar un sistema de neteja automàtic que eviti aquesta adhesió de biomassa sobre del sensor. S'ha desenvolupat un sistema que neteja el sensor llençant-t'hi aire a pressió durant 10 segons cada 5 minuts. Un esquema d'aquest muntatge es presenta a la figura 4.16.

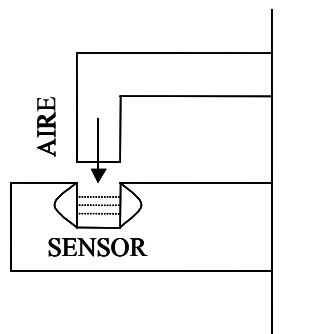


Figura 4.16.- Esquema del muntatge del sistema de neteja del sensor

4.4.3.- Resultats del MCS (sistema de control del melissa) operant sobre el compartiment iva en connexió amb el compartiment III

Per dur a terme aquest experiment s'ha utilitzat el mateix medi que el descrit a l'apartat 4.2, de manera que en no haver de subministrar el carboni via CO_2 , no s'ha afegit gairebé naoh per controlar el pH, no distorsionant, així, el cabal d'entrada del reactor.

Per comprovar el bon funcionament del mcs s'han dut a terme diferents salts en la productivitat desitjada. Aquesta s'ha augmentat de 0.55 a 0.9, de 0.7 a 0.9 i de 0.9 a 1.2 g/h. Per tal de dur a terme aquests canvis, el MCS ha fixat un cabal d'entrada de 0.6 l/h i ha anat variant la llum en funció de les necessitats de biomassa. A les figures 4.17, 4.18 i 4.19 es presenta l'evolució de la productivitat del compartiment IVa durant aquests experiments.

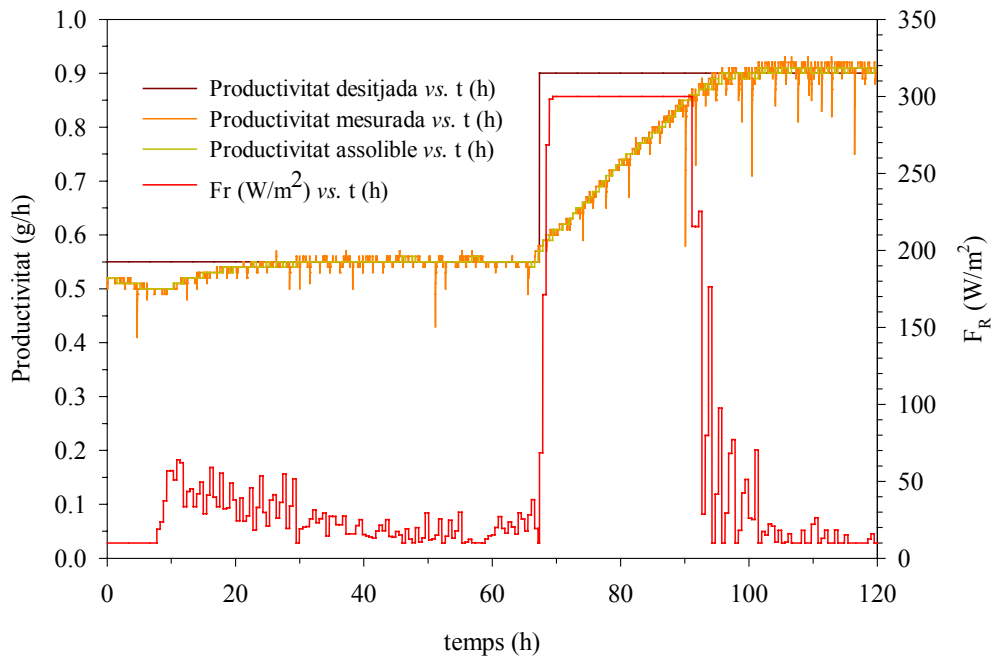


Figura 4.17.- Evolució de la productivitat del quart compartiment i evolució de la llum incident al reactor quan es demana al MCS que es faci un salt de productivitat de 0.55 a 0.9 g/h

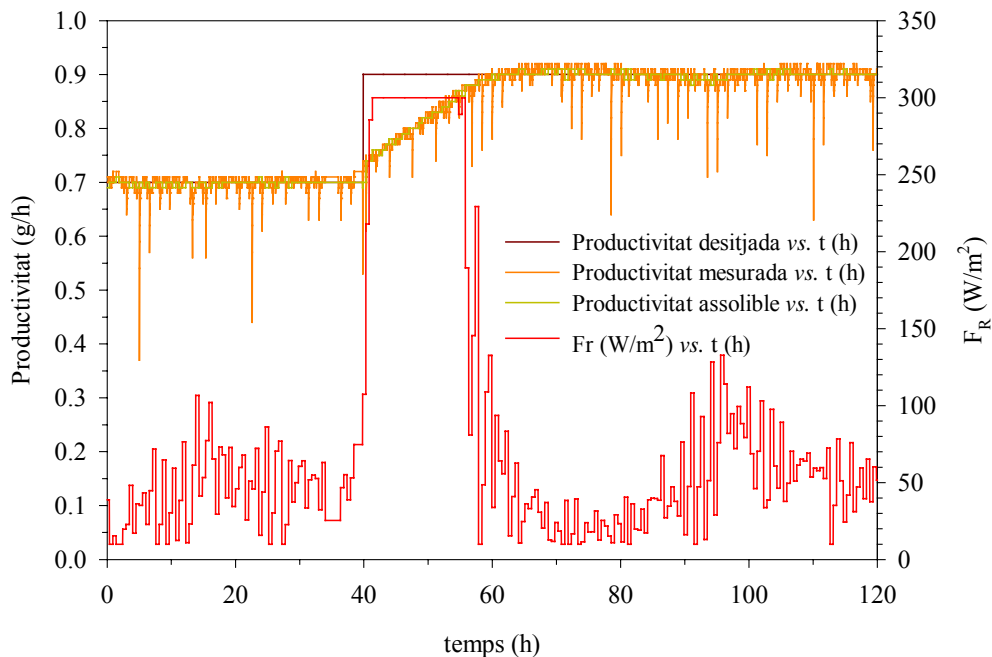


Figura 4.18.- evolució de la productivitat del quart compartiment i evolució de la llum incident al reactor quan es demana al MCS que es faci un salt de productivitat de 0.7 a 0.9 g/h

Tal i com es pot veure a les figures 4.17, 4.18 i 4.19, quan s'efectua el salt de productivitat en el mcs, la productivitat mesurada del compartiment iva augmenta mitjançant l'increment de la intensitat de la llum subministrada al reactor, fins que s'arriba a la productivitat desitjada. Aleshores, la intensitat de llum fluctua a fi de mantenir aquesta productivitat. Així doncs, els mcs és capaç de controlar el compartiment iva tal i com es demana. És a dir, el sistema de control del melissa del compartiment iva no es veu alterat pel fet que aquest compartiment estigui o no connectat.

A la figura 4.19 s'observen dues disminucions sobtades de la intensitat de llum subministrada al reactor. Aquestes són degudes a una apagada i tornada a engegar del programa del mcs. Les apagades han estat causades per operacions d'escriptura no vàlides del sistema de control. D'aquest fet se'n desprèn que el MCS no té memòria del passat immediat ja que, quan es torna a engegar, comença a operar des de zero, incrementant la intensitat de llum subministrada al reactor de manera gradual enlloc de recuperar de manera immediata la intensitat de llum que es subministrava al reactor abans de tornar a engegar l'ordinador. Fet que en una operació en continu i pensant en aplicacions futures caldrà evidentment solucionar.

Tal i com es pot veure a les figures 4.17, 4.18 i 4.19, el valor de la productivitat mesurada té una tendència constant però presenta variacions curtes i brusques. Aquestes variacions són ocasionades pel procés de rentat del sensor explicat a l'apartat 4.4.2. Quan es llença aire a pressió sobre la superfície del sensor, les mesures d'absorbància es veuen alterades. Tot i això, es torna a recuperar la lectura normal d'absorbància en un període inferior als 20 segons. En posteriors operacions s'haurà de filtrar segurament el senyal per tal d'evitar que aquestes variacions brusques del senyal puguin interferir en el control global del melissa, tot i que, com també es desprèn de les figures 4.17, 4.18 i 4.19, no ha suposat cap problema en el control del compartiment IVa interconnectat amb el compartiment III.

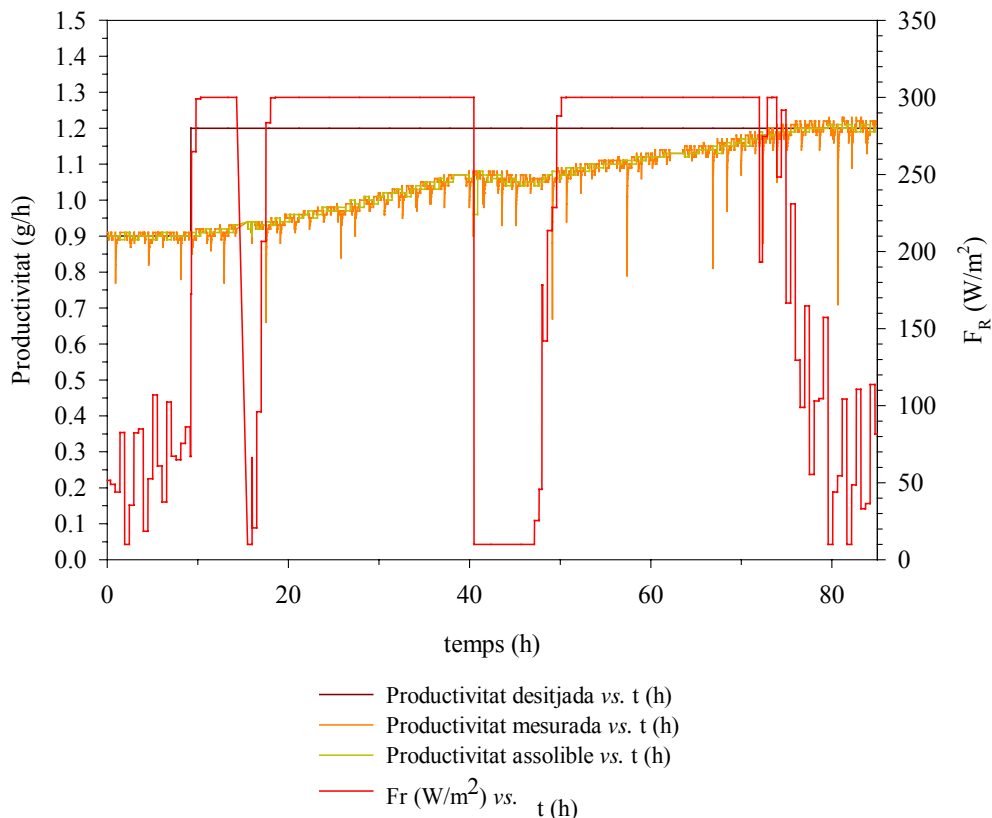


Figure 4.19.- Evolució de la productivitat del quart compartiment i evolució de la llum incident al reactor quan es demana al MCS que es faci un salt de productivitat de 0.9 a 1.2 g/h

4.5.- Objectius assolits i conclusions

En aquest capítol s'han assolit els següents objectius:

- s'ha estudiat la connexió a llarg termini dels compartiments III i IVa a escala pilot. Aquesta connexió s'ha dut a terme durant un període de 3 mesos sense que s'observi cap efecte tòxic i sense que es presenti cap problema operacional a destacar en cap dels dos compartiments.

- s'ha estudiat també l'evolució de la connexió d'aquests compartiments quan s'augmenta la velocitat de dilució de la connexió o quan es disminueix la concentració d'oxigen del tercer compartiment conclouent que, com ja s'havia observat en el capítol 3:

1.- un salt de la velocitat de dilució o una disminució en la concentració d'oxigen present al tercer compartiment provoquen un estat durant el qual no tot l'amoni és convertit a nitrat, i es troben nitrats i amoni a la sortida d'aquest compartiment. Aquests estats són transitoris sempre i quan la columna tingui possibilitats d'adaptar-se a les noves condicions d'operació. Si les noves condicions operacionals són massa dràstiques, pot ser que la manca de conversió de tot l'amoni a nitrat no sigui transitòria i que, a l'estat estacionari, es trobin amoni i nitrat a la sortida d'aquest compartiment.

2.- quan al medi de cultiu del compartiment iva hi ha presents amoni, nitrit i nitrat, *S. platensis* consumeix preferentment l'amoni i posteriorment el nitrat. El nitrit no és consumit en el quart compartiment quan es troben en excés o nitrats o amoni, i és, per tant, rentat del reactor.

3.- així doncs, a la sortida del quart compartiment hi ha presents nitrats. Cal tenir present aquest fet ja que el medi de sortida d'aquest compartiment s'utilitzarà o bé en el compartiment de plantes superiors o bé en d'altres compartiments.

- s'ha estudiat també el sistema de control del melissa pel compartiment iva quan aquest es troba connectat amb el tercer compartiment. S'han requerit diferents salts de productivitat al mcs del quart compartiment, demostrant ser prou robust, ja que sempre s'ha obtingut la productivitat desitjada.

5.- ESTUDI PRELIMINAR DEL TANCAMENT COMPLET DEL BUCLE LÍQUID DEL MELISSA

Un cop s'ha estudiat la connexió dels compartiments II, III i IVa usant àcid acètic o una barreja d'àcids acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del segon compartiment, veure els capítols 4 i 5, cal acostar-se més al funcionament futur del bucle.

En aquest apartat es presenta la connexió a nivell de líquid de tots els compartiments microbians del bucle MELISSA, és a dir, dels compartiments I, II, III i IVa. Per fer això, inicialment s'ha estudiat la connexió dels compartiments II, III i IVa del bucle usant un medi que simula el medi de sortida del primer compartiment i, un cop fixades unes condicions òptimes de treball, s'ha procedit a la connexió completa del bucle de bioreactors. Si l'operació del bucle microbià complet es realitza satisfactòriament, s'haurà demostrat la capacitat de funcionament del bucle MELISSA en fase líquida.

5.1.- Equips i procediment experimental

Per dur a terme la connexió completa en fase líquida del bucle de bioreactors del projecte MELISSA es necessita disposar dels compartiments I, II, III i IVa. El compartiment I està essent desenvolupat per EPAS, un dels grups membres del projecte, a Ghent (Bèlgica). Així doncs, per tal de poder dur a terme la connexió, la sortida del primer compartiment, operat a Ghent, s'autoclava i s'envia per correu urgent a Barcelona, on és centrifugat i filtrat abans de ser usat com a medi per la resta del bucle. A continuació es presenta una descripció de cada un dels compartiments usats en aquest experiment, així com les diferents etapes de separació necessàries per interconnectar-los.

- Compartiment I

Per dur a terme aquest estudi, la composició de l'aliment del primer compartiment ha estat una barreja de: part no comestible de les plantes superiors, *R. rubrum* i *S. platensis* que no es destinin a menjar i matèria fecal. D'aquesta manera, es simula l'aliment real futur del bucle MELISSA. La relació en que s'ha afegit cada un dels components es detalla a continuació i ve donada per la producció de residus diaris per un home, dins del bucle MELISSA (Hermans i Demey, 2001).

Una persona que mantingui una dieta MELISSA-HPC, produeix aproximadament per dia, depenent de la dieta escollida (Poughon, 1997):

- 486 g pes sec de part no comestible de plantes superiors
- 30 g pes sec de matèria fecal

Del bucle de bioreactors del MELISSA hi ha un excés per persona i dia d'aproximadament, depenent de l'estratègia de escalat que es vulgui seguir:

- 25 g *Spirulina platensis*
- 100 g *Rhodospirillum rubrum*

Com s'ha dit anteriorment, aquest reactor a escala de laboratori està essent desenvolupat i operat a EPAS, Ghent (Hermans i Demey, 2001). Aquest reactor presenta un volum de treball d'1 L, és agitat magnèticament, la temperatura d'operació es manté 55°C, el pH fluctua al voltant de 8 i el temps de retenció hidràulic es troba al voltant dels 16 dies. Emprant aquestes condicions s'aconsegueix convertir un 54% de la matèria orgànica, sempre que l'eficiència de conversió es calculi en base a la matèria orgànica alimentada al reactor i la que n'és convertida. A la figura 5.1 es presenta una fotografia d'aquest compartiment.

Com ja s'ha dit anteriorment, la sortida del primer compartiment un cop filtrada i autoclavada s'envia a Barcelona per poder dur a terme la connexió del bucle. A Barcelona és centrifugada un altre cop (BECKMAN J2-21 M/E) (10000 rpm, 4°C, 20 min) i filtrada (MILLIPORE OPTICAP™ 4") de 0.22 µm, abans de procedir a la seva utilització.



Figura 5.1.- Fotografia del primer compartiment (Hermans i Demey, 2001)

El muntatge experimental dels compartiments II, III i IVa usat per realitzar la connexió completa del bucle microbià del MELISSA i les unitats de separació necessàries per la seva connexió, es presenten a la figura 5.2.

▪ Compartiment II

Els cultius corresponents al segon compartiment es realitzen en un bioreactor (BIOSTAT Q, Braun Biotech International) amb una cuba de 0.5 L de volum i 0.4 L de volum útil. La unitat de control de pH (CRISON pHrocon 18) fixa el pH del cultiu a 6.9 mitjançant l'addició d'àcid (HCl 1M) o base (NaOH 1.5M). El cultiu s'agita per mitjà d'un agitador magnètic a 600 rpm. La temperatura d'operació es fixa a 30°C i es controla fent passar aigua termostatitzada a través d'una camisa externa.

L'anaerobiosi del cultiu s'aconsegueix bombollejant CO₂. El cabal de CO₂ varia entre 0.75 i 2.24 mL/min, depenent de les condicions de cultiu, ja que cal subministrar CO₂ assegurant d'una banda, l'anaerobiosi del cultiu i d'altra, que la font de carboni no sigui limitant.

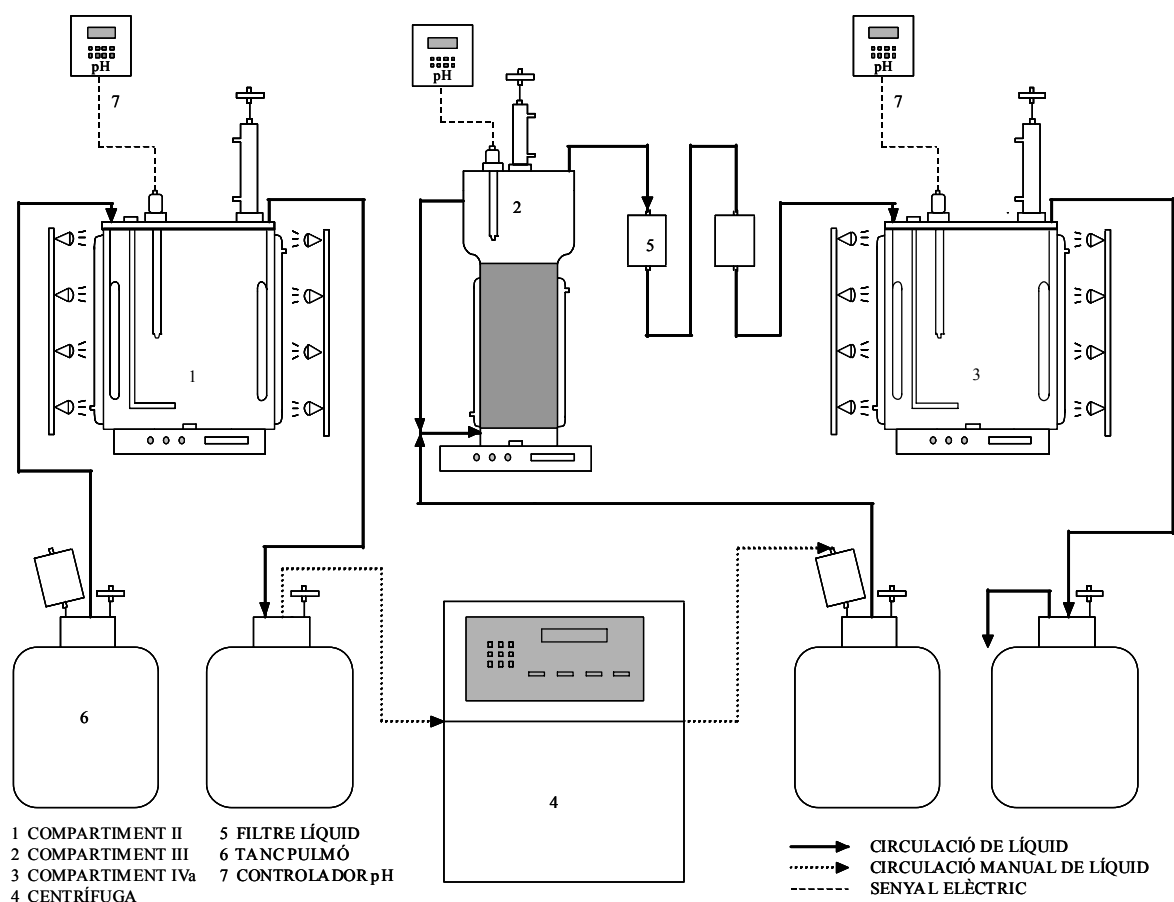


Figura 5.2. – Diagrama del muntatge experimental per la connexió en fase líquida dels compartiments I, II, III i IVa del bucle MELISSA

La il·luminació del bioreactor s'aconsegueix mitjançant 18 bombetes halògenes (SYLVANIA Halogen –Professional de luxe-, 12V, 20W, Ø 50mm) distribuïdes radialment, al voltant de la paret externa del reactor, en 6 columnes que contenen 3 bombetes cada una. Una font d'alimentació de 15V–40A subministra l'energia elèctrica necessària. Canviant el voltatge subministrat a les bombetes es canvia la intensitat de llum emesa. El calibratge de la intensitat de la llum (W/m^2) al centre del reactor, en funció del voltatge subministrat a les bombetes, es fa igual que en el segon compartiment (veure l'apartat 3.1). En aquest cas, de l'equació 3.1, el radi del fotobioreactor (R_b) és de 30 mm i el factor de conversió, calculat integrant l'espectre de la bombeta en el rang d'emissió de 350-950 nm (rang d'absorció de *R. rubrum*), és de 0.425.

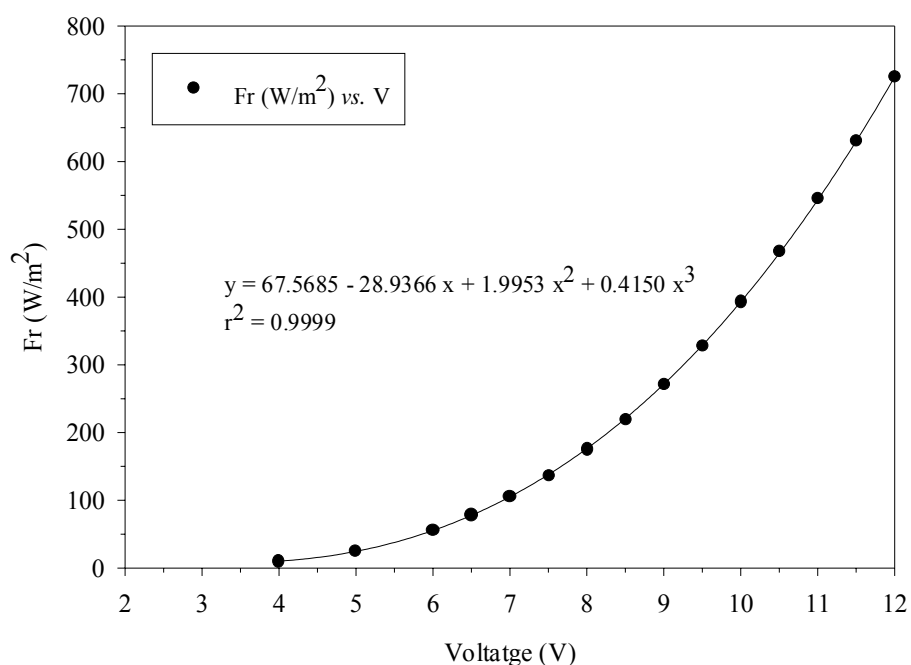


Figura 5.3.- Relació: intensitat mitjana de llum incident al reactor/voltatge subministrat al compartiment II

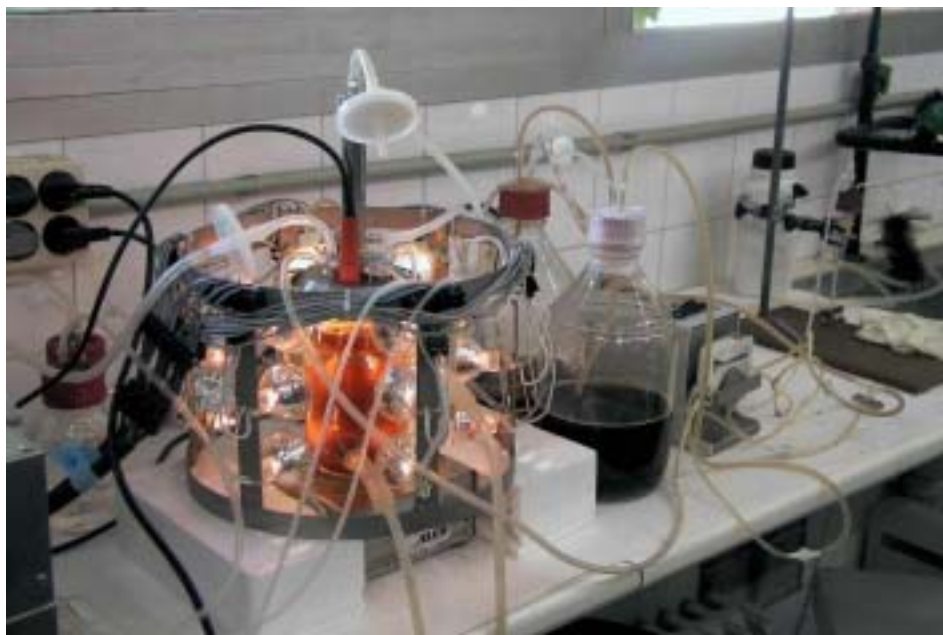


Figura 5.4.- Fotografia del segon compartiment. S'usa medi sortint del primer compartiment com a medi d'entrada

- Connexió dels compartiments II i III

La connexió entre ambdós compartiments es realitza mitjançant el mateix procediment descrit en el capítol 3, apartat 3.1.

- Compartiment III

Pel tercer compartiment s'usa la columna de llit fix amb les condicions d'operació descrites en el capítol 3, apartat 3.1.

- Connexió dels compartiments III i IVa

La connexió entre ambdós compartiments es realitza mitjançant el mateix procediment descrit en el capítol 3, apartat 3.1.

- Compartiment IVa

Per aquest compartiment s'usa el mateix equipament que pel compartiment II. En aquest cas, però, la temperatura d'operació es fixa a 36.5°C i el pH a 9.5. Tot i que aquest reactor no treballa en anaerobiosi, també s'hi bombolleja CO₂ ja que aquest és usat com a única font de C del cultiu. El calibratge de la intensitat de la llum (W/m²) al centre del reactor, en funció del voltatge subministrat a les bombetes, es fa igual que pel segon compartiment (veure l'apartat 3.1). En aquest cas, de l'equació 3.1, R_b és de 30 mm, i el factor de conversió, calculat integrant l'espectre d'emissió de la bombeta en el rang d'emissió de 350-750 nm (rang d'absorció de *S. platensis*), és de 0.291. A la figura 5.5 es presenta la relació: intensitat mitjana de llum incident al reactor/voltatge subministrat.

A la figura 5.6 es presenta una fotografia d'aquest compartiment.

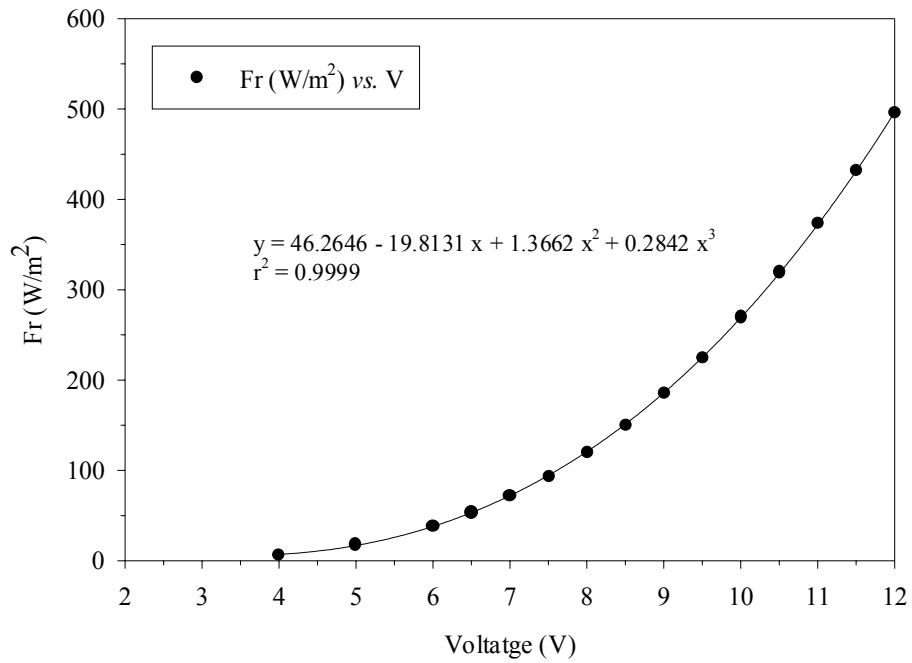


Figura 5.5.- Relació: intensitat mitjana de llum incident al reactor/voltatge subministrat al compartiment IVa



Figura 5.6.- Fotografia del compartiment IVa

5.2.- Medi de cultiu

El medi sortint del primer compartiment, un cop centrifugat i filtrat a Barcelona, és analitzat. La concentració d'àcids grassos volàtils i d'amoni presents en aquest medi es presenta a la taula 5.1.

Àcids grassos volàtils	g/L
Àcid acètic	0.77
Àcid propiònic	0.27
Àcid butíric	0.10
Àcid isobutíric	0.15
Àcid valèric	0.17
Àcid isovalèric	0.15
Font de nitrogen	N-ppm
Amoni	414

Taula 5.1.- Concentració d'àcids grassos volàtils i d'amoni a la sortida del primer compartiment

Així doncs, en condicions òptimes, quan tots els àcids grassos volàtils són consumits en el segon compartiment, la quantitat de *R. rubrum* que s'hauria de produir per litre de medi entrant pot ser calculada, veure taula 5.2, seguint les equacions estequiomètriques que es descriuen a continuació (Favier-Teodorescu *et al.*, 1999):

- **Acètic** + 0.4115 NH₃ + 0.0299 H₃PO₄ + 0.0066 H₂SO₄ → 1.8550 CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161} + 0.1450 CO₂ + 1.1843 H₂O
- **Propiònic** + 0.7201 NH₃ + 0.0523 H₃PO₄ + 0.0116 H₂SO₄ + 0.2462 CO₂ → 3.2462 CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161} + 1.5726 H₂O
- **Butíric** + 1.0287 NH₃ + 0.0748 H₃PO₄ + 0.0165 H₂SO₄ + 0.6374 CO₂ → 4.6374 CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161} + 1.9609 H₂O
- **Isobutíric** + 1.0287 NH₃ + 0.0748 H₃PO₄ + 0.0165 H₂SO₄ + 0.6374 CO₂ → 4.6374 CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161} + 1.9609 H₂O
- **Valèric** + 1.3373 NH₃ + 0.0972 H₃PO₄ + 0.0215 H₂SO₄ + 1.0286 CO₂ → 6.0286 CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161} + 2.3491 H₂O
- **Isovalèric** + 1.3373 NH₃ + 0.0972 H₃PO₄ + 0.0215 H₂SO₄ + 1.0286 CO₂ → 6.0286 CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161} + 2.3491 H₂O

Àcids grassos volàtils	g/L	<i>R.rubrum</i> produït (pes sec) g/L
Àcid acètic	0.77	0.55
Àcid propiònic	0.27	0.27
Àcid butíric	0.10	0.12
Àcid iobutíric	0.15	0.18
Àcid valèric	0.17	0.23
Àcid isovalèric	0.15	0.20
TOTAL		1.55

Taula 5.2.- Producció teòrica de *R.rubrum* de cada AGV per L de medi entrant

A la taula 5.3 es troben les concentracions de diferents elements del medi de sortida del primer compartiment. Aquestes concentracions són comparades a la mateixa taula amb el medi sintètic usat fins el moment per tal de dur a terme la connexió dels compartiments II, III i IVa i, també, amb les del medi entrant en el primer compartiment, donades per EPAS N.V.; Eco Process Assistance, Universitat de Ghent, (Bèlgica).

	Sortida Compartiment I (ppm)		Medi entrada sintètic CII, III, IVa (ppm)		Entrada Compartiment I			
					(*) Tractat (ppm)		(*) Dissolt (ppm)	
	mitjana	D.E.	mitjana	D.E.	mitjana	D.E.	mitjana	D.E.
Na	12	15	314	13	50.63	8.98	40.8	12.76
K	688	3	378	3	-	-	-	-
Mg	26.6	0.5	113.3	0.5	144.38	9.64	99.58	19.38
Ca	24.5	1.5	25.3	1.5	715	96.63	210.25	80.63
B	2.2	<0.5	0.7	0.1	1.41	0.43	0.84	0.64
P	7.2	<1	175.2	1.2	523.13	102.60	139.53	34.77
Mn	<0.5	0.74	3.6	0.2	2.77	0.66	0.17	0.02
Fe	<1	<0.1	5.2	0.1	12.01	3.71	1.24	0.19
Ni	0.74	0.22	<0.3	-	0.471	0.48	0.26	0.23
Cu	<0.1	-	<0.1	-	1.13	0.18	0.10	0.05
Zn	0.22	0.07	0.31	0.7	11.35	2.49	9.91	9.38
S	-	-	-	-	67.69	17.38	62.55	24.43

Taula 5.3.- Anàlisi de la concentració de diferents elements del medi de sortida del primer compartiment i comparació amb el medi artificial usat en la connexió dels compartiments II, III i IVa fins el moment i amb el medi entrant del primer compartiment subministrat per EPAS N.V., Eco Process Assistance, Universitat de Ghent, (Bèlgica) (*) Aquest medi és analitzat de dues maneres diferents: un grup de mostres és tractat amb àcid nítric i l'altre és centrifugat i filtrat. D.E. desviació estàndard.

Si s'analitza aquesta taula s'observen diferents fets:

1.-S'observa una diferència important entre les concentracions dels diferents elements mesurades en el medi d'entrada del primer compartiment i les del medi de sortida d'aquest. Aquesta diferència és massa gran per ser atribuïda a la formació de biomassa. Conseqüentment, aquests elements són retinguts durant els processos de separació existents entre el primer i el segon compartiment.

2.- La concentració dels diferents elements al medi d'entrada del primer compartiment és similar o superior a la concentració d'aquests al medi sintètic utilitzat fins el moment per tal connectar els compartiments II, III i IVa, que tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.4 és excedent en tots els components necessaris per dur a terme la connexió. Així doncs, si aquests elements no es perdessin durant els processos de separació intermedis, la connexió dels quatre compartiments microbians del MELISSA es podria dur a terme, segurament, sense afegir cap element extra, a excepció de Na i Mn. Aquests dos

elements es troben en concentracions força inferiors, tant en el medi d'entrada com en el de sortida del primer compartiment, en comparació amb el medi sintètic de connexió. Tot i això, pel que fa al Na, aquest és afegit per ajustar el pH dels diferents compartiments, durant l'operació normal del bucle.

3.-Per tal de verificar que no hi ha cap component identificat en el medi de sortida del primer compartiment que pugui interferir en l'operació normal del bucle es decideix afegir-hi diferents compostos de manera que la concentració dels diferents elements mesurats sigui igual a la del medi sintètic de connexió, medi que, com ja s'ha vist en el capítol 3, és adequat per connectar els compartiments II, III i IVa. Els compostos afegits al medi sortint del primer compartiment s'especifiquen a la taula 5.4.

	Sortida CI (ppm)	Medi sintètic CII, III, IVa (ppm)		Elements requirits	Afegit al medi de sortida del CI	
		mesurat	calculat		compost	g/L
Na	12	314	233	>200	*	*
K	688	378	362	-	-	-
Mg	26.6	113.3	118.4	91.7	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.93
Ca	24.5	25.3	24.7	0.24	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.001
B	2.2	0.7	0.52	-	-	-
P	7.2	175.2	221.6	214.4	Na ₂ HPO ₄	0.98
Mn	<0.5	3.6	3.4	>3.1	MnCl ₂ .2H ₂ O	0.01
Fe	<1	5.2	6.6	>5.6	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.03
Ni	0.74	<0.3	0.12	-	-	-
Cu	<0.1	<0.1	0.02	-	-	-
Zn	0.22	0.31	1e-3	-	-	-

Taula 5.4.- Elements requerits i compostos afegits al medi de sortida del primer compartiment per fer-lo semblant al medi sintètic usat en la connexió dels compartiments II, III i IVa

(*) Na s'afegeix quan s'afegeix el P i durant l'operació normal del bucle per tal d'ajustar el pH.

Com ja s'ha dit prèviament, a la taula 5.4 es troben els diferents compostos afegits al medi de sortida del compartiment I per tal d'usar aquest medi per connectar el compartiment I amb els compartiments II, III i IVa. A la taula 5.4 s'observa que no s'ha afegit Na en les quantitats que correspondria, només s'ha afegit Na quan s'afegeix Na₂HPO₄, ja que, durant l'operació normal del bucle s'afegeix Na per ajustar el pH dels compartiments II i IVa en quantitats suficients, tal i com es pot veure al capítol 3.

L'única precaució que s'ha de tenir en compte, és que el creixement de *S. platensis* es veu inhibit si la relació K⁺/Na⁺ és >5 (Richmond, 1986), relació que es compleix a la sortida del compartiment I. S'ha observat prèviament, però (veure l'apartat 3.4) que durant l'operació normal del bucle s'afegeix Na en quantitats suficients perquè la relació K⁺/Na⁺ sigui sempre < 5 al compartiment IVa, tal i com es descriu als apartats 3.1 i 3.4. El medi de sortida del primer compartiment presenta un color marró fosc. Aquest fet s'ha de tenir en compte donat que, tant el compartiment II, com el IVa, són fotosintètics. L'espectre d'absorció del medi a diferents longituds d'ona es presenta a la figura 5.7. En aquesta figura també es presenta l'espectre d'absorció del medi sintètic de connexió dels compartiments II, III i IVa, per permetre la comparació.

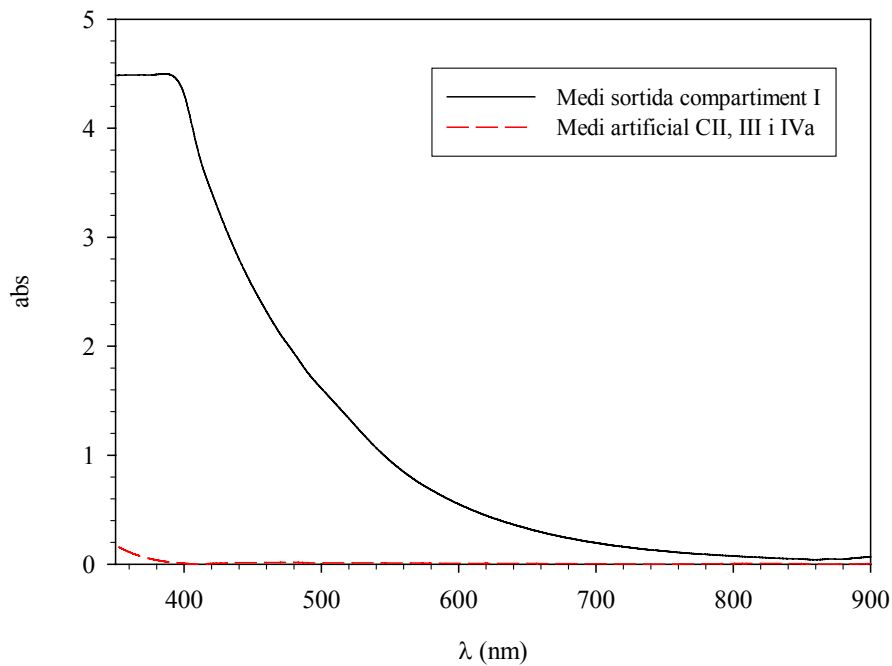


Figura 5.7.- Espectres d'absorció del medi de sortida del primer compartiment i del medi sintètic de connexió dels compartiments II, III i IVa

Per tal d'observar si aquesta major absorció del medi de sortida del primer compartiment (veure la figura 5.7) pot afectar directament els centres de captació d'energia de *S.platensis* i *R. rubrum*, l'espectre d'absorció de llum d'aquests dos microorganismes es presenta a les figures 5.8 i 5.9.

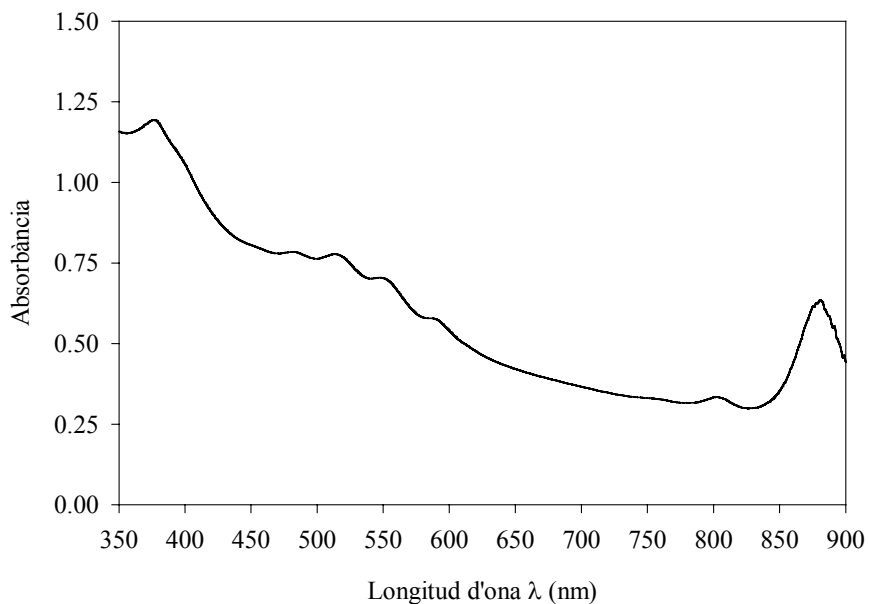


Figura 5.8- Espectre d'absorció de llum de *R. rubrum*. Els pics d'absorció de les clorofil·les es troben a 870, 805 i 360 nm i els dels carotenoids a 525 i 550 nm

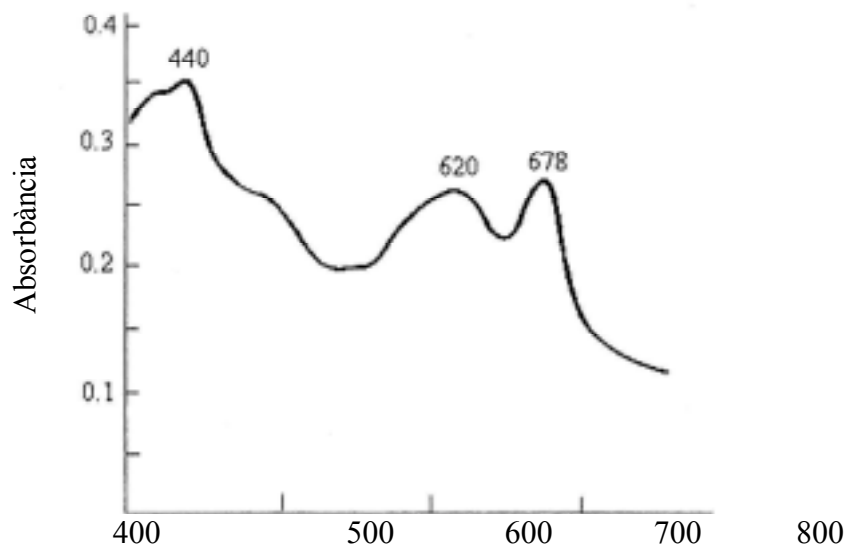


Figura 5.9- Espectre d'absorció de llum de *S. platensis* (Mohanty *et al.*, 1997). Els pics d'absorció de les clorofil·les es troben a 440 i 678 nm i el de les aloficocianines a 620 nm

Com es veu a les figures 5.8 i 5.9, ambdós microorganismes presenten pics d'absorció per longituds d'ona inferiors a 650 nm, franja on el medi sortint del primer compartiment absorbeix la llum de manera significativa si es compara amb el medi sintètic de connexió dels compartiments II, III i IVa usat fins ara (veure la figura 5.7). Així doncs, si es subministra un mateix Fr (W/m^2) al cultiu, l'energia que pot fer servir el microorganisme és inferior quan s'usa el medi sortint del primer compartiment. Aquest fet s'ha de prendre en consideració.

- Medi sintètic que simula el medi sortint del primer compartiment usat per connectar els compartiments II, III i IVa.

Per poder fixar unes condicions d'operació en la connexió dels compartiments II, III i IVa amb el compartiment I, primer es fixen les condicions d'operació de la connexió dels compartiments II, III i IVa amb un medi sintètic que simula el medi sortint del primer compartiment. Aquest medi sintètic conté els mateixos compostos micro i macronutrients que els del medi de connexió dels compartiments II, III i IVa fet servir fins ara, veure capítol 3, però conté la mateixa quantitat d'amoni i d'àcids grassos volàtils que els del medi de sortida del primer compartiment, veure la taula 5.1. Aquest medi es presenta a la taula 5.5.

<i>Components</i>	1 L	
Acètic	0,77	g
Propiònic	0,27	g
Butíric	0,15	g
Isobutíric	0,10	g
Valèric	0,17	g
Isovalèric	0,15	g
EDTA-Na·2 H ₂ O	0,10	g
MnCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01	g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,03	g
KH ₂ PO ₄	0,40	g
NaHCO ₃	0,25	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,20	g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,09	g
Elements traça	1,00	mL
Biotina	1,00	mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,82	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4,00E-06	g
Na ₂ HPO ₄	0,49	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,30E-06	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4H ₂ O	0,18	g
K ₂ SO ₄	0,55	g
A5	1,00	mL
B6	1,00	mL

Taula 5.5. – Composició del medi sintètic usat per fixar les condicions d'operació dels compartiments II, III i IVa per procedir a la connexió d'aquests compartiments amb el compartiment I; on la solució d'elements traça, biotina i solucions A5 i B6 es descriuen a l'apartat 3.1

5.3.- Cultius en discontinu usant el medi sortint del compartiment I complementat

Per tal de veure si *R. rubrum* i *S. platensis* poden créixer en el medi sortint del compartiment i, es duen a terme diferents experiments en discontinu.

R. rubrum i *S. platensis* es fan créixer en ampolles de 250 ml. S'usen 100 ml de medi i 10 ml d'inòcul. Cada experiment es fa per triplicat i en cada experiment hi ha 5 tests on es proven condicions de cultiu diferents:

100% de medi sintètic, veure l'apartat 5.2.

75% de medi sintètic i 25% de medi sortint del compartiment I complementat.

50% de medi sintètic i 50% de medi sortint del compartiment I complementat.

25% de medi sintètic i 75% de medi sortint del compartiment I complementat.

100% de medi sortint del compartiment I complementat.

Al final de cada experiment es treuen mostres per mesurar-ne els àcids grassos volàtils i comprovar l'axenicitat del cultiu.

El muntatge experimental es pot veure a la figura 5.10.



Figura 5.10.- muntatge experimental dels cultius de *S. platensis* i *R. rubrum* en discontinuu

5.3.1.- Cultius en discontinuu de *R. rubrum*

Els resultats dels experiments fent créixer *R. rubrum* en medi sortint del primer compartiment es troben a la taula 5.10.

test	I	II	III	IV	V
A	√	√	√	×C	×C
B	√	√	√	√	√
C	√	√	√	√	√

Taula 5.10.- Cultius en discontinuu fent créixer *R. rubrum* en medi sortint del compartiment I. I, II, III, IV i V són les diferents condicions de cultiu. √: *R. rubrum* creix, ×: *R. rubrum* no creix, C: contaminació. A, B i C són replicats.

De la taula 5.10 es desprèn que *R. rubrum* pot créixer perfectament bé en totes les condicions de cultiu provades en cada experiment, exceptuant a les ampolles amb un 100% i un 75% de medi sortint del compartiment I del primer experiment on s'observen problemes de contaminació.

La llargada de cada experiment no es presenta ja que s'ha observat que bàsicament depèn de l'estat de l'inòcul. Tot i això, s'ha observat un creixement més ràpid a les ampolles que contenen una quantitat superior de medi sintètic. Aquest fet pot ser o bé atribuït a un cert efecte inhibidor del medi sortint del compartiment I o bé al fet de la menor disponibilitat de llum en augmentar la concentració de medi del compartiment I en el medi de cultiu, veure l'apartat 5.1.

Tots els àcids grassos volàtils presents a l'inici del cultiu han estat completament consumits al final de cada experiment.

5.3.2.- Cultius en discontinuu de *S. platensis*

Els resultats dels experiments fent créixer *S. platensis* en medi sortint del primer compartiment es troben a la taula 5.11.

test	I	II	III	IV	V
A	√	√	√	√	√
B	√	√	√	√	√
C	√	√	√	√	√

Taula 5.11 Cultius en discontinu fent créixer *S. platensis* en medi sortint del compartiment I. I, II, III, IV i V són les diferents condicions de cultiu. √: *S. platensis* creix, ×: *S. platensis* no creix
A, B i C són replicats.

Com es desprèn de la taula 5.11, *S. platensis* creix bé en totes les condicions de cultiu provades. En tots aquests experiments s'utilitza, però, un inòcul no axènic degut a la no disponibilitat d'inòcul axènic a l'hora de dur-los a terme. Tenint en compte que, com es pot veure a la taula 5.11 i a la figura 5.11, es pot assegurar el creixement de *S. platensis* en el medi sortint del primer compartiment, no s'ha considerat necessari repetir aquests experiments.



Figura 5.11.- Cultiu de *S.platensis* fent servir medi sortint del compartiment I

5.4.- Connexió dels compartiments ii, iii i iva usant un medi sintètic que simula el medi sortint del compartiment i

El muntatge experimental d'aquesta connexió es presenta a la figura 5.2. Inicialment, i com ja s'ha dit anteriorment, es duu a terme la connexió dels compartiments II, III i IVa amb un medi sintètic que simula el medi de sortida del compartiment I, per tal de fixar unes condicions d'operació òptimes per realitzar la connexió d'aquests compartiments amb el primer, tancant així, en fase líquida, el bucle microbià del MELISSA.

Tenint en compte els resultats presentats a l'apartat 3.4, i com és d'esperar, quan s'incrementa la cadena de carbonis dels àcids grassos volàtils que s'usen com a aliment del segon compartiment, amb un mateix aport d'energia lumínica, disminueix la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum*. Així doncs, les primeres condicions d'operació provades en el segon compartiment i presentades a la taula 5.12, suposen un aport màxim d'energia al cultiu i una velocitat de dilució inferior a la màxima utilitzada a l'apartat 3.4, quan els àcids grassos volàtils alimentats al cultiu són: àcid acètic, propiònic i butíric, ja que, en aquest cas, tant el número d'àcids volàtils com la llargada de la seva cadena de carbonis, com la quantitat de gC/L_{medi} és superior.

	Compartiment II
<i>Llum</i> (W/m^2)	720
<i>D</i> (h^{-1})	0.0092
<i>Q_L</i> (mL/dia)	88
<i>t</i> (<i>dies</i>)	4.5

Taula 5.12.- Condicions inicials del compartiment II

L'evolució del compartiment II quan opera amb les condicions d'operació presentades a la taula 5.12 es presenta a la figura 5.12.

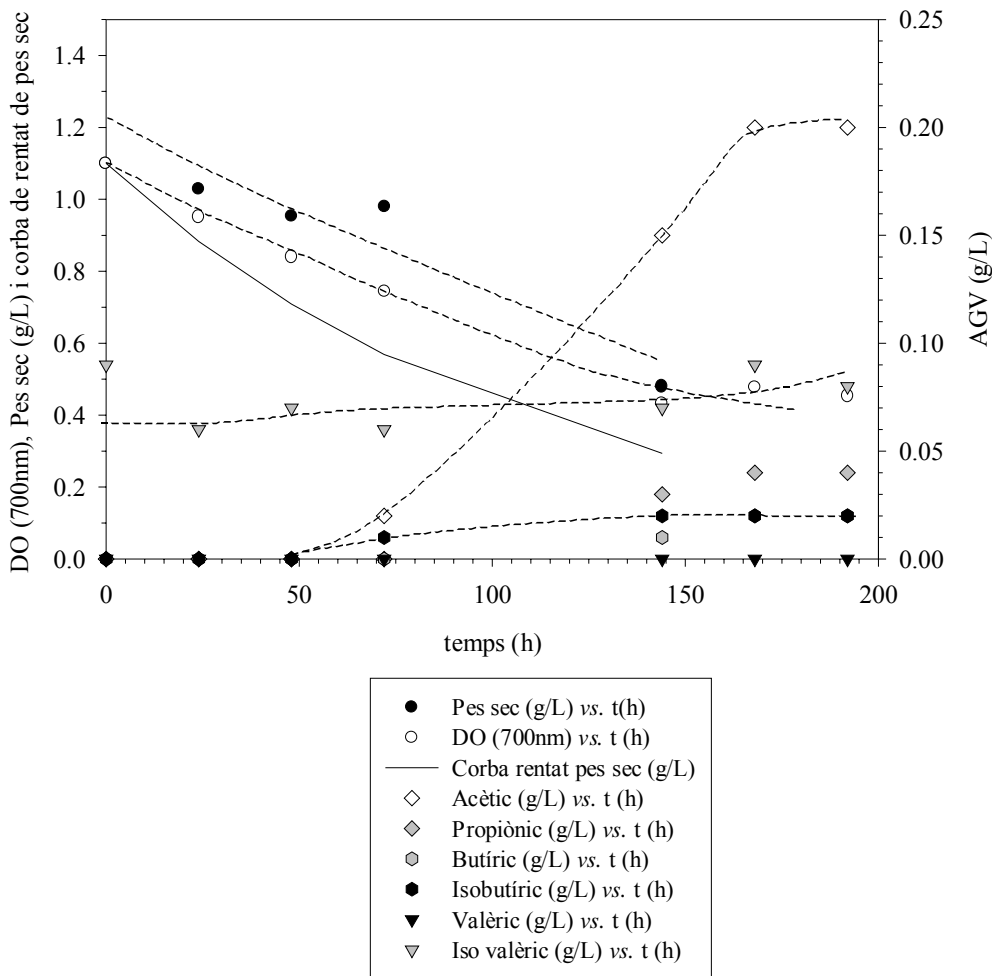


Figura 5.12- Evolució del compartiment II quan opera amb les condicions d'operació descrites a la taula 5.12

Com es pot veure a la figura 5.12, el cultiu no aguanta aquestes condicions d'operació, és a dir, la concentració de biomassa disminueix sense establir-se. La disminució de biomassa pot ser deguda o bé a algun efecte inhibitor o bé a unes condicions d'operació massa estrictes. A la figura 5.12 es veu com la concentració experimental de biomassa es troba sempre per sobre de la corba de rentat d'aquesta; així doncs, *R. rubrum* presenta un cert creixement. Per tal de veure si el rentat del cultiu és degut a que les condicions d'operació són massa extremes, es calcula la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum* sota aquestes condicions d'operació tal i com es descriu a continuació:

Tenint en compte que el reactor no està operant en estat estacionari el balanç de matèria es descriu mitjançant l'equació 5.1:

$$\frac{dX}{dt} = D(X_0 - X) - \mu X \quad (5.1)$$

on: X és la biomassa, D la velocitat de dilució i μ la velocitat màxima de creixement.

Considerant que $X_0 = 0$, no hi ha biomassa al medi d'entrada, l'equació 5.1 pot descriure's mitjançant l'equació 5.2:

$$\frac{dX}{dt} = -(D + \mu)X \quad (5.2)$$

O igualment:

$$\frac{dX}{X} = -(D + \mu)dt \quad (5.3)$$

Integrant l'equació 5.3 s'obté l'equació 5.4:

$$\ln \frac{X}{X_0} = -(D + \mu)(t - t_0) \quad (5.4)$$

Així doncs, representant $\ln(X/X_0)$ vs $t-t_0$, es calcula $D+\mu$ del pendent. I, tenint en compte que la velocitat de dilució del cultiu és coneguda, s'obté directament la velocitat màxima de creixement, μ , de *R. rubrum* en aquestes condicions, tal i com es presenta a la figura 5.13.

A partir de la figura 5.13 es troba la μ experimental: $\mu = 0.0027$. Tenint en compte que en estat estacionari: $\mu = D$, es duu a terme un nou experiment usant la velocitat de dilució trobada. Aquestes noves condicions d'operació es presenten a la taula 5.13.

	Compartiment II	
	I	II
Llum (W/m^2)	78	724
D (h^{-1})		0.0027
Q_L (mL/dia)	DISCONTINU	26.7
(dia)		15

Taula 5.13.- Condicions d'operació del compartiment II

L'evolució del compartiment II, quan opera amb les condicions d'operació presentades a la taula 5.13, es pot veure a la figura 5.14.

Com es desprèn de la figura 5.14, *R. rubrum* tampoc suporta aquestes condicions de cultiu, podent concloure que quelcom està inhibint el seu creixement. Durant el procés en discontinu, condicions I, el cultiu creix sense presentar cap tipus de problema i, en canvi, comença a rentar-se quan s'inicia el mode d'operació en continu. L'únic factor diferent entre ambdós modes d'operació és la quantitat de llum incident al cultiu, així doncs, sembla que la llum és el factor inhibidor de creixement.

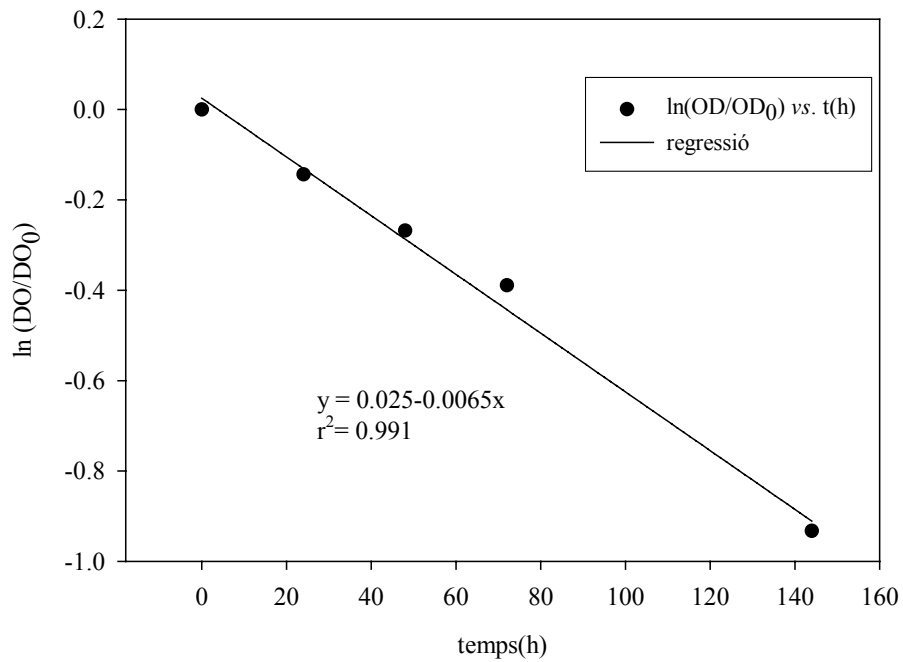


Figura 5.13.- Representació de $\ln(DO/DO_0)$ vs. t per tal de trobar la μ experimental del cultiu presentat a la figura 5.12

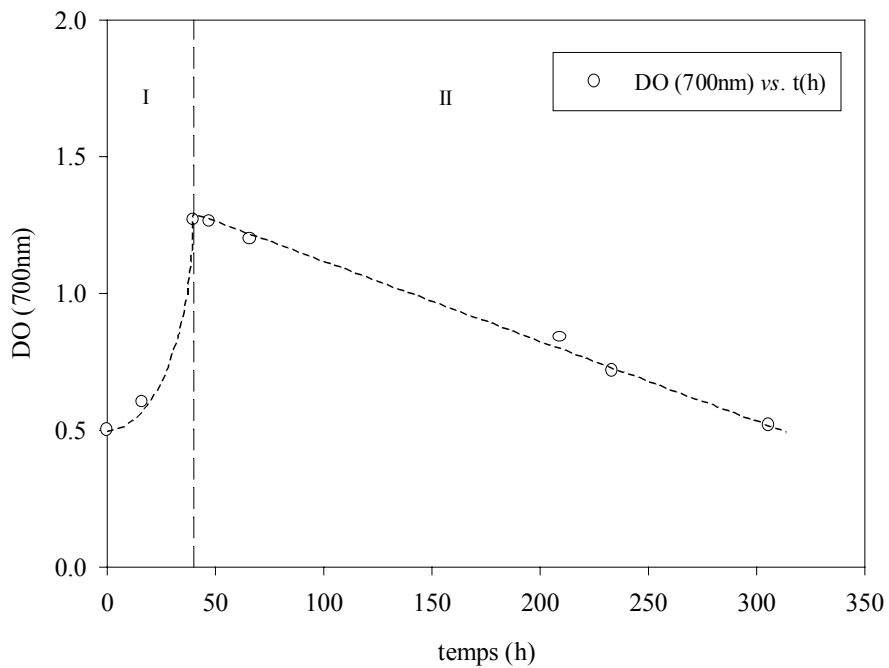


Figura 5.14.- Evolució del segon compartiment quan opera amb les condicions presentades a la taula 5.13

Anteriorment no s'ha descrit cap efecte d'inhibició per excés de llum en cultius de *R. rubrum*, exceptuant en uns experiments en discontinu fets per Albiol (1994), on degut a un efecte concurrent d'altres temperatures, no es va poder acabar de descriure. Així i tot, l'efecte d'inhibició per excés de llum s'ha descrit a la majoria de cultius fotosintètics.

S'ha de tenir en compte que amb aquest nou muntatge es pot aconseguir un valor de F_R superior a qualsevol dels utilitzats anteriorment i el radi del reactor també és més petit. Essent els valors de intensitat lumínica incident els més elevats que mai s'han provat. Conseqüentment es duu a terme un nou experiment amb menor intensitat de llum incident al cultiu, fent servir les condicions d'operació descrites a la taula 5.14.

	Compartiment II						
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>
<i>Llum (W/m²)</i>	724	78	78	78	137	137	137
<i>D (h⁻¹)</i>	DISCONTINU		0.018	0.031	0.093	0.145	0.208
<i>Q_L (mL/dia)</i>			168.75	300	900	1400	2000
<i>t (dies)</i>			2.37	1.33	0.44	0.29	0.2

Taula 5.14.- Condicions d'operació del segon compartiment

L'evolució del compartiment II, quan opera amb les condicions descrites a la taula 5.14, es presenta a la figura 5.15, on es segueix l'evolució de la biomassa, i la figura 5.16, on es segueixen l'amoní i els AGV a la sortida.

Com es pot veure a les figures, 5.15 i 5.16, un excés de llum inhibeix el creixement de *R. rubrum*. Durant les condicions I, quan es subministra un aport màxim d'energia lumínica al cultiu, aquest no creix i, en canvi, comença a créixer quan se'n disminueix l'aport de llum, condicions II. A continuació, el cultiu opera en mode continu sense presentar cap tipus de problema. S'assoleixen, fins i tot, velocitats de dilució similars a les màximes obtingudes, quan *R. rubrum* es fa créixer usant únicament àcid acètic com a font de carboni, veure l'apartat 3.2, i molt superiors a les obtingudes quan *R. rubrum* creix usant àcids acètic, propiònic i butíric com a font de carboni, veure l'apartat 3.4. Aquests fets demostren que la disponibilitat de llum als cultius de *R. rubrum* és un dels factors més importants en el seu creixement. Una manca de llum disminueix fortament la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum* mentre que un excés de llum l'inhibeix.

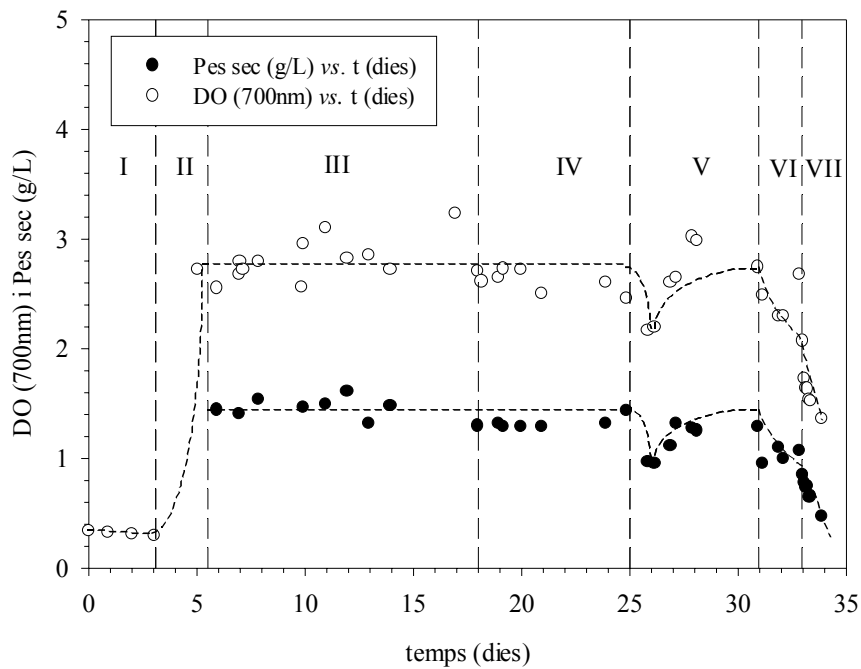


Figura 5.15.- Evolució de la concentració de biomassa en el segon compartiment quan aquest opera amb les condicions presentades a la taula 5.14

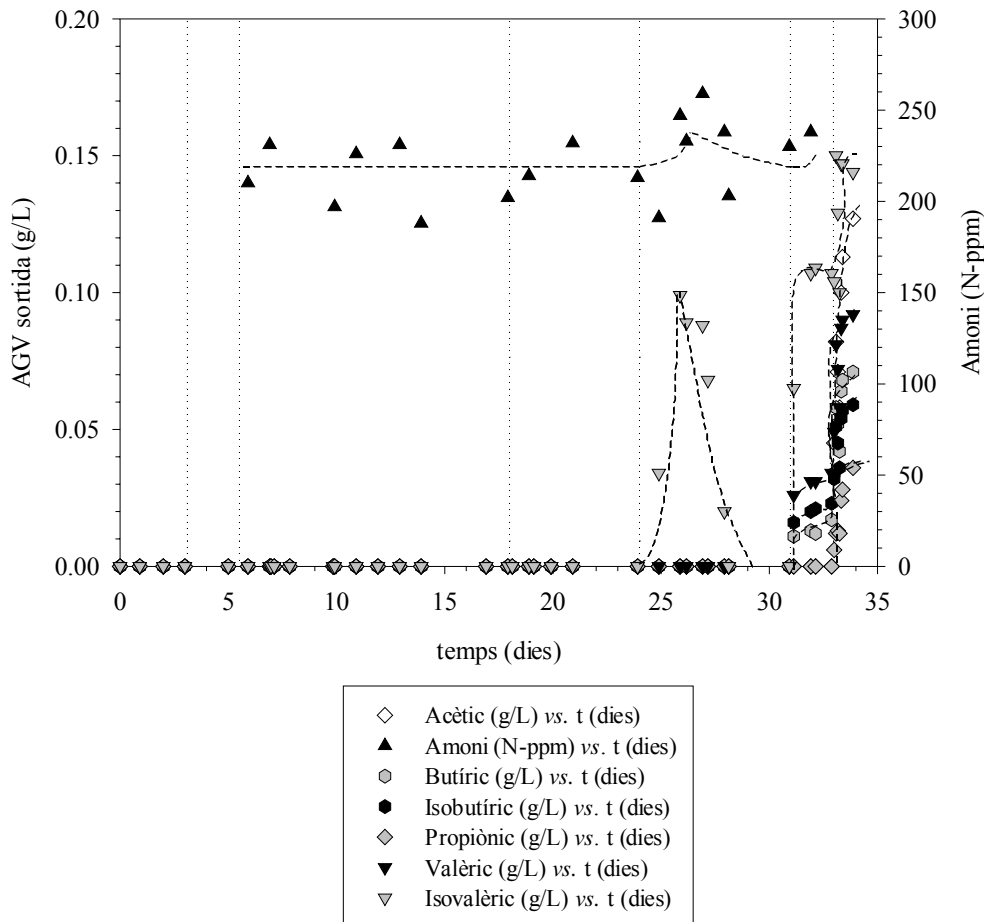


Figura 5.16.- Evolució de les concentracions d'amoni i AGV a la sortida del compartiment II quan aquest opera amb les condicions presentades a la taula 5.14

Com es mostra a les figures 5.15 i 5.16, quan el compartiment II opera amb les condicions III i IV (taula 5.14), es troba en el seu estat òptim, és a dir, no es detecta la presència d'àcids grassos volàtils a la sortida d'aquest. El mateix es pot dir per les condicions d'operació V, ja que el pic d'isovalèric que es presenta a la figura 5.16 és un efecte transitori degut a l'augment de la velocitat de dilució.

Quan s'utilitzen les condicions d'operació VI, s'arriba a un estat estacionari on a la sortida d'aquest compartiment s'observa presència de butíric, isobutíric valèric i isovalèric. Com era de preveure, els àcids grassos completament consumits són l'acètic i el propiònic, àcids amb cadena de carbonis més curta. En experiments anteriors, veure l'apartat 3.2, s'ha observat que quan hi ha presència d'àcid acètic en el cultiu, *R. rubrum* acumula PHB, perdent la seva mobilitat i presentant dificultats en el procés de divisió cel·lular. Aquests problemes però, no s'han observat en aquest cas. Sembla, doncs, que quan els àcids presents en excés al cultiu són butíric, isobutíric, valèric i isovalèric, *R. rubrum* o no acumula PHB o ho fa en quantitats molt inferiors que en presència exclusiva d'àcid acètic.

Per tal de trobar la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum* quan l'aport de llum és el mencionat a la taula 5.14, es fixen les condicions d'operació VII. Amb aquestes condicions d'operació, i mitjançant l'equació 5.4, es troba $D+\mu$ al representar $\ln(X/X_0)$ respecte $t-t_0$, veure la figura 5.17. Trobant així el valor de μ , ja que la velocitat de dilució de l'experiment és coneguda.

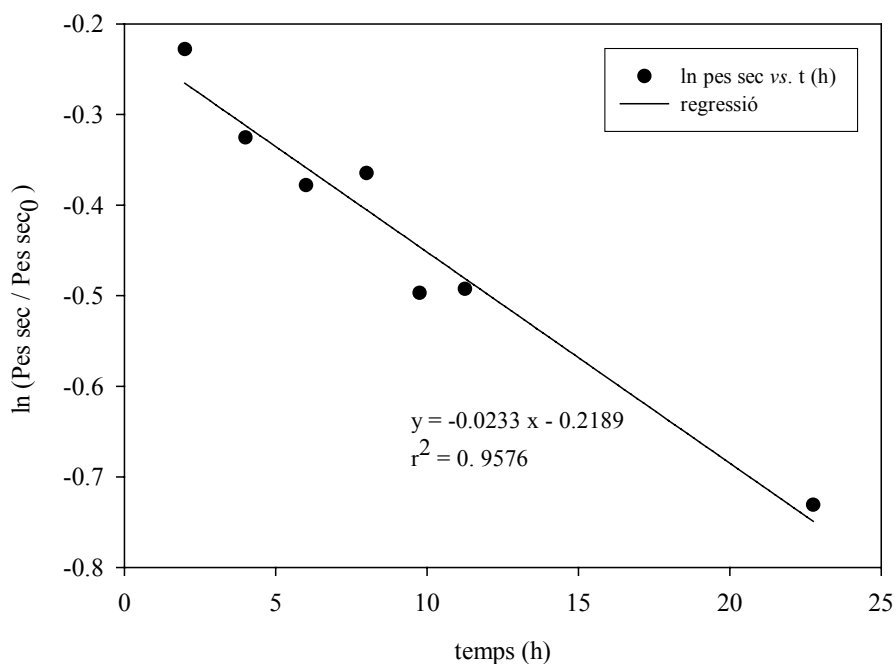


Figura 5.17.- Representació de $\ln(\text{Pes sec}/\text{Pes sec}_0)$ vs. t per tal de trobar μ_{\max}

De la figura 5.17 se'n desprèn que la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum* en aquestes condicions és de $\mu_{\max} = 0.17 \text{ h}^{-1}$. Aquest valor és força elevat i semblant a la velocitat màxima de creixement assolida per *R. rubrum* en experiments anteriors on es feia servir únicament àcid acètic com a font de carboni (0.15 h^{-1} en cultius en continu i 0.17 h^{-1} en discontinu) (Albiol, 1994).

Els balanços de nitrogen i carboni dels estats estacionaris de les condicions d'operació III, IV i V es duen a terme tot seguit. Com es pot veure a la figura 5.15, durant aquestes

condicions la quantitat de biomassa present al reactor és de 1.4 g pes sec/L, és a dir, un 90% de la quantitat de biomassa esperada si es té en compte que, amb la composició del medi d'entrada, s'haurien de formar 1.55 g pes sec /L, veure la taula 5.2. Si es considera que la composició elemental de *R. rubrum* és la presentada a l'apartat 5.2, una producció d'1.4 g pes sec/L requereix sobre unes 194 N-ppm. La quantitat de nitrogen consumida en el segon compartiment és de 184 N-ppm, ja que, el medi d'entrada conté 414 N-ppm i a la sortida es troben 230 N-ppm. Podent considerar així el balanç de nitrogen tancat. El medi de sortida del compartiment II durant les condicions d'operació III, IV i V, quan no hi ha presència d'àcids grassos volàtils a la sortida, és introduït un cop centrifugat i filtrat als compartiments III i IVa per tal d'avaluar la connexió d'aquests tres compartiments.

Les condicions experimentals d'operació dels compartiments III i IVa durant l'experiment de connexió es presenten a la taula 5.15 i l'evolució d'aquests compartiments durant aquest experiment es presenta a les figures 5.18 i 5.19.

	<i>Compartiment III</i>	<i>Compartiment IVa</i>
F_R (W/m^2)	-	94
Q_L (mL/dia)	400	400
D (h^{-1})	0,035	0,042
τ (<i>dies</i>)	0,84	1

Taula 5.15.- Condicions experimentals d'operació dels compartiments III i IVa durant la connexió amb el segon compartiment

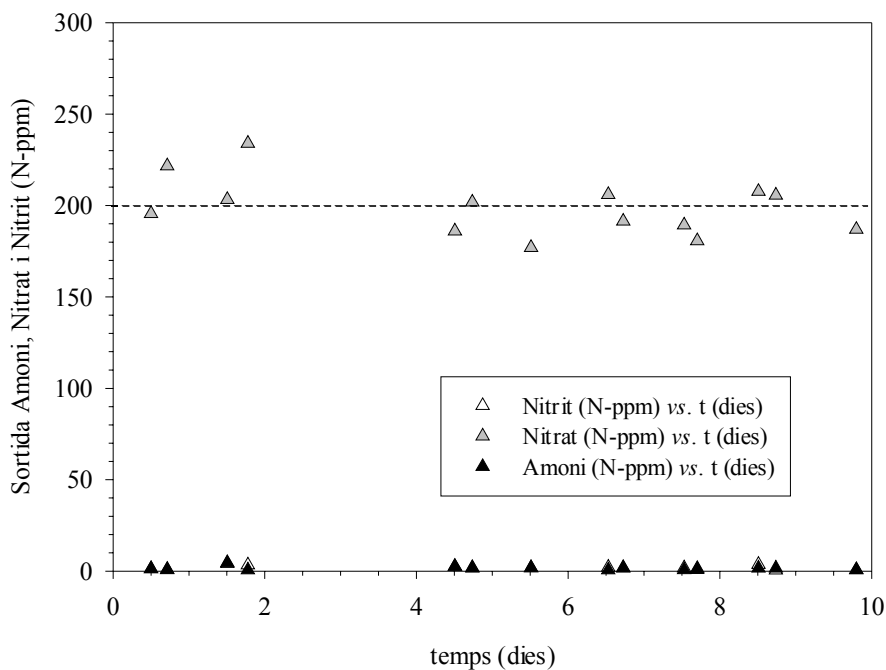


Figura 5.18.- Evolució del compartiment III quan es fan servir les condicions d'operació presentades a la taula 5.15

Com es desprèn de la figura 5.18, el compartiment III opera en condicions òptimes pel funcionament del bucle MELISSA. És a dir, tot l'amoni que entra, sobre unes 200 N-ppm que es troben a la sortida del segon compartiment, és convertit a nitrat i a la sortida ni amoni ni nitrit hi son presents.

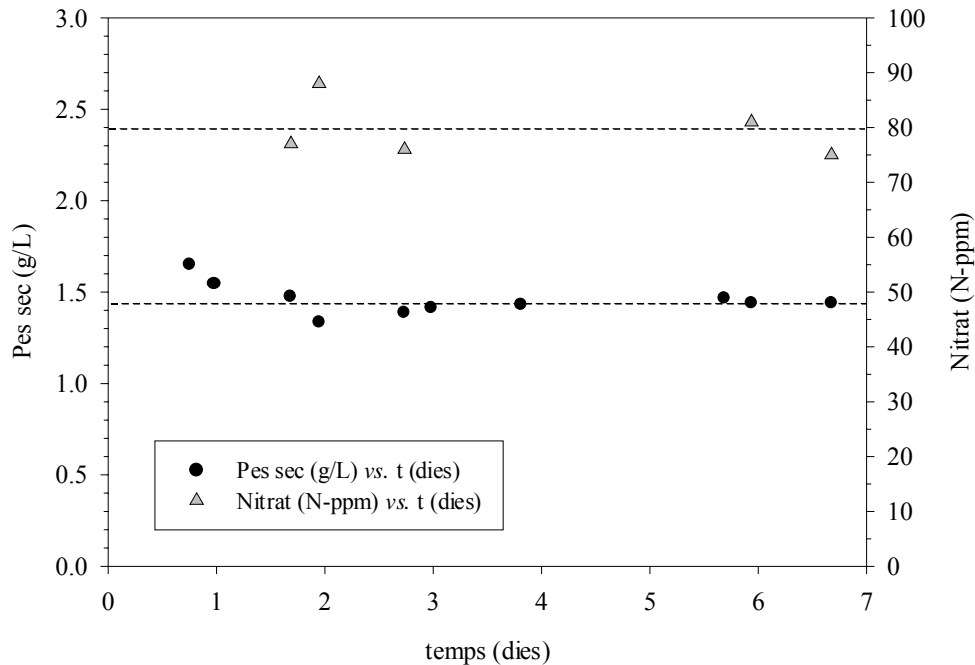


Figura 5.19.- Evolució del compartiment IV quan opera amb les condicions descrites a la taula 5.15

Tal i com es veu a la figura 5.19, el compartiment IVa presenta una situació totalment estable. Amb aquestes condicions d'operació s'assoleix un estat estacionari amb una concentració de biomassa d'1.43 g pes sec/L i no s'observa cap efecte tòxic o nociu que alteri el funcionament d'aquest compartiment.

El balanç de carboni no es pot dur a terme ja que la font de carboni en aquest compartiment és CO_2 , que és introduït en excés i no és mesurat a la sortida.

Si es considera que la composició elemental de *S. platensis* és la donada per Cornet i col·laboradors (Cornet *et al.*, 1992a, b i c): $\text{CH}_{1.650}\text{O}_{0.531}\text{N}_{0.170}\text{S}_{0.007}\text{P}_{0.006}$, per tal de produir 1.43 g pes sec/L es requereixen 136 N-ppm. De les figures 5.18 i 5.19 es desprèn que existeix un consum de nitrogen al compartiment IVa de 120 N-ppm, quedant el balanç de nitrogen tancat.

En aquest apartat s'han fixat les condicions experimentals mitjançant les quals poden connectar-se els compartiments II, III i IVa, fent servir el nou muntatge experimental i un medi d'entrada similar al medi de sortida del primer compartiment. La connexió d'aquests compartiments s'ha dut a terme sense presentar grans dificultats i no s'ha observat cap efecte tòxic o nociu en cap dels compartiments derivat de l'ús del medi descrit a l'apartat 5.2. Cal tenir en compte, però, el fort efecte que té la quantitat de llum incident al cultiu sobre el creixement de *R. rubrum*. S'ha vist que un excés de llum inhibeix fortament el seu creixement mentre que una mancança en disminueix, també fortament, la seva velocitat màxima de creixement.

Havent fixat les condicions experimentals de connexió dels compartiments II, III i IVa amb un medi que simula la sortida del compartiment I, es pot procedir a la connexió real dels quatre bioreactors del bucle MELISSA.

5.5.- Connexió, en fase líquida, del bucle de bioreactors complet del MELISSA

Un cop s'ha vist que tant *R. rubrum* com *S. platensis* poden créixer en discontinu amb el medi de sortida del primer compartiment complementat, i un cop s'han trobat unes condicions d'operació en que els compartiments II, III i IVa poden ser connectats usant un medi similar al de sortida del primer compartiment, cal dur a terme la connexió completa en fase líquida del bucle sencer de bioreactors del MELISSA.

Com s'ha dit anteriorment, el compartiment I és operat a Bèlgica i la sortida és enviada a Barcelona per poder procedir amb la connexió d'aquest compartiment amb els compartiments II, III i IVa. El medi sortint del compartiment I és complementat tal i com es descriu a la taula 5.4 abans de procedir a dur a terme la connexió.

Les condicions d'operació del primer compartiment durant aquest experiment de connexió són descrites a l'apartat 5.1, i les condicions d'operació dels compartiments II, III i IVa es presenten a la taula 5.16. Aquestes condicions són similars a les utilitzades a l'apartat 5.4; tot i això, si es compara amb la taula 5.14, s'ha incrementat la llum incident al segon compartiment, ja que no es volen àcids grassos volàtils a la sortida i el medi de sortida del primer compartiment que s'usa com a medi d'entrada del segon presenta certa absorció de llum, veure figura 5.7.

Les evolucions dels compartiments II, III i IVa en aquest experiment de connexió es mostren a les figures 5.20, 5.21 i 5.22.

	Compartiment II	Compartiment III	Compartiment IVa
F_R (W/m ²)	137	-	94
Q_L (mL/dia)	400	400	400
D (h ⁻¹)	0,042	0,035	0,042
τ (dies)	1	0,84	1

Taula 5.16.- Condicions experimentals dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment

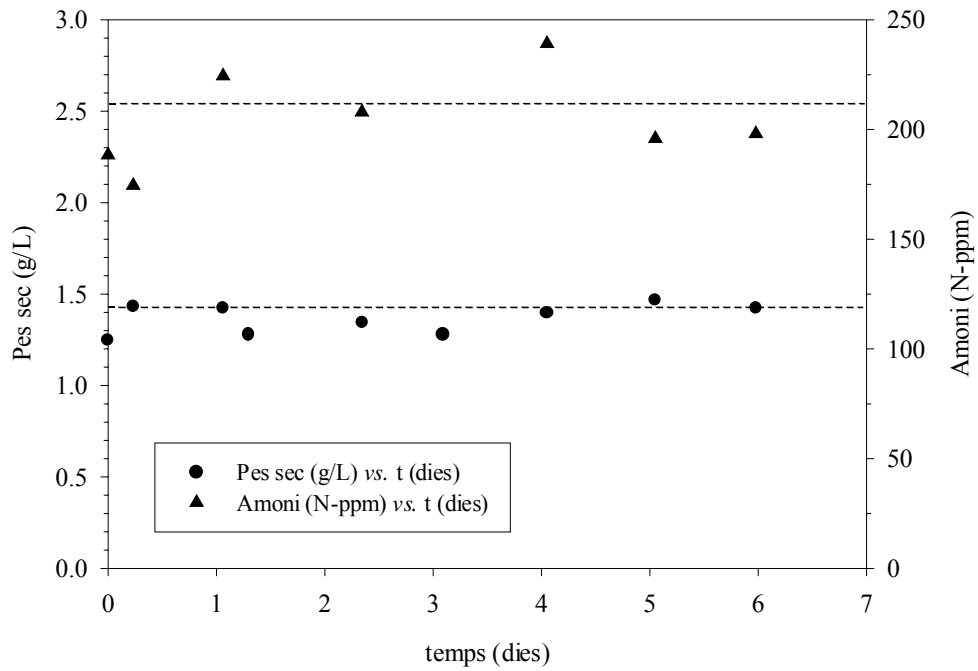


Figura 5.20.- Evolució del compartiment II quan opera amb les condicions descrites a la taula 5.16

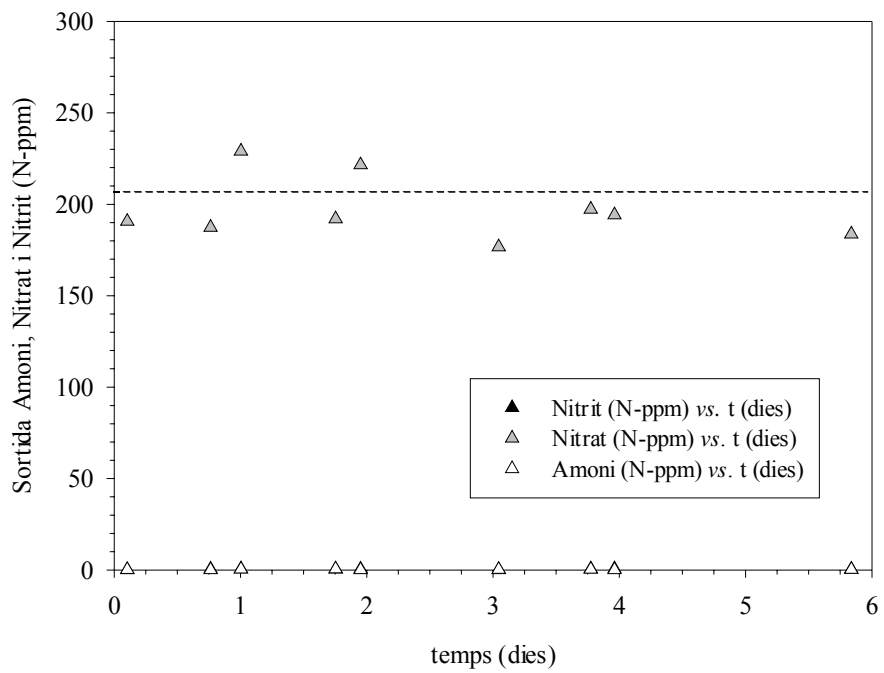


Figura 5.21.- Evolució del compartiment III quan opera amb les condicions descrites a la taula 5.16

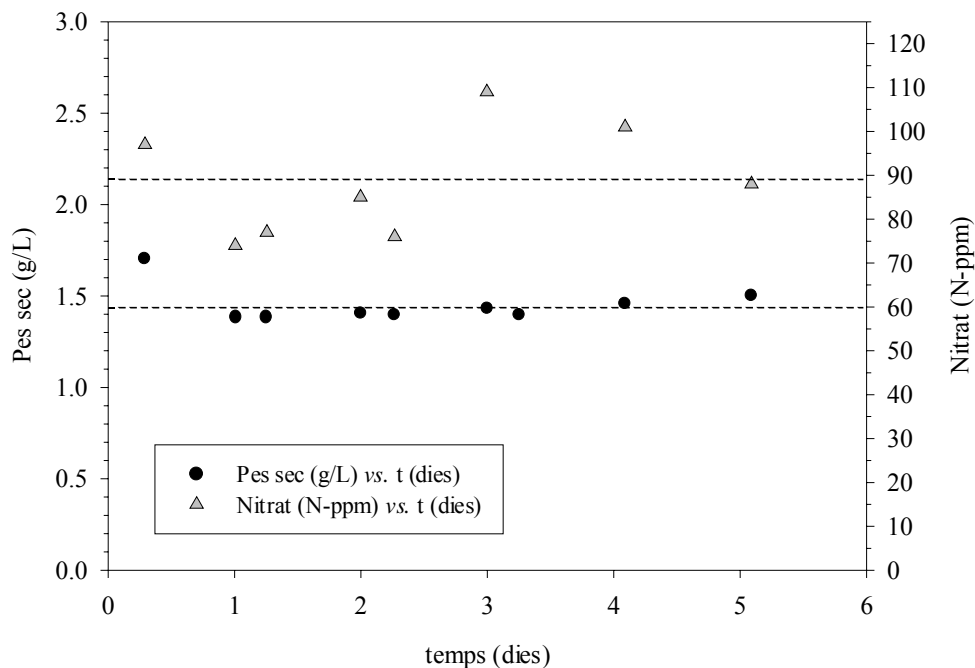


Figura 5.22.- Evolució del compartiment IVa quan opera amb les condicions descrites a la taula 5.16

Tal i com es pot veure a les figures 5.20, 5.21 i 5.22, la connexió en fase líquida del bucle de bioreactors del MELISSA s'ha dut a terme satisfactòriament durant més de 5 temps de residència. No s'ha observat cap efecte tòxic o nociu en cap dels compartiments degut a la utilització del medi sortint del primer compartiment.

Al segon compartiment s'assoleix un estat estacionari amb una concentració de biomassa de 1.45 g/L, tal i com es pot veure a la figura 5.20. A la sortida d'aquest compartiment no es troben àcids grassos volàtils, és a dir, tots els àcids grassos volàtils presents en el medi d'entrada són consumits en aquest compartiment. Tenint en compte aquests fets, es produeix un 94 % de la biomassa que s'hauria de produir, ja que, teòricament amb el medi d'entrada s'haurien de produir 1.55 g pes sec/L, veure l'apartat 5.2. Així doncs, el balanç de carboni d'aquest compartiment pot considerar-se tancat. Per produir 1.45 g pes sec/L de *R. rubrum* es requereixen 195 N-ppm, si es considera la composició elemental de *R. rubrum* presentada a l'apartat 5.2. El consum de nitrogen observat en aquest compartiment es de 204 N-ppm, si es té en compte que el medi d'entrada presenta 414 N-ppm i a la sortida es troben sobre 210 N-ppm, veure la figura 5.20. Conseqüentment, el balanç de nitrogen d'aquest compartiment pot considerar-se, també, tancat.

El compartiment III, tal i com es pot veure a la figura 5.21, opera òptimament, és a dir, tot l'amoni entrant és convertit a nitrat.

Com es desprèn de la figura 5.22, el compartiment IVa presenta, també, una situació completament estable. S'assoleix un estat estacionari amb una concentració de biomassa d'1.45 g pes sec/L i no s'observa cap efecte ni tòxic ni inhibidor.

El balanç de carboni no es pot dur a terme ja que la font de carboni en aquest compartiment és CO₂, que és introduït en excés i no és mesurat a la sortida.

Si es considera que la composició elemental de *S.platensis* donada per Cornet i col·laboradors (Cornet *et al.*, 1992 a, b i c):CH_{1.650}O_{0.531}N_{0.170}S_{0.007}P_{0.006}, per tal de produir 1.45 g pes sec/L es requereixen 139 N-ppm. De les figures 5.21 i 5.22 es

després que existeix un consum de nitrogen al compartiment IVa de 120 N-ppm, així doncs el balanç de nitrogen es pot considerar pràcticament tancat.

Es pot concloure doncs, que la connexió en fase líquida de tots els bioreactors del bucle MELISSA s'ha dut a terme de manera totalment satisfactòria.

5.6.- Objectius assolits i conclusions

En aquest capítol s'han assolit els següents objectius i conclusions:

- s'ha analitzat la sortida del primer compartiment i s'ha comparat amb el medi sintètic utilitzat per la connexió dels compartiments II, III i IVa, per tal de veure els seus requeriments per poder procedir amb la connexió en fase líquida del bucle complet de bioreactors del MELISSA.

- s'ha estudiat la connexió dels compartiments II, III i IVa fent servir un medi sintètic semblant al medi de sortida del primer compartiment. Aquesta connexió s'ha dut a terme satisfactòriament sense major complicació i sense observar cap efecte tòxic ni inhibidor en cap del compartiments.

- s'ha demostrat el fort efecte que té la disponibilitat d'energia lumínica sobre el creixement de *R. rubrum*. Un excés de llum inhibeix fortament el seu creixement i, en canvi, una mancança en disminueix, també fortament, la seva velocitat màxima de creixement.

- s'ha vist que tant *R. rubrum* com *S. platensis* són capaços de créixer en discontinu en el medi complementat de sortida del primer compartiment.

- i finalment, s'ha dut a terme satisfactòriament la connexió dels compartiments I, II, III i IVa. És a dir, s'ha connectat en fase líquida el bucle complet de bioreactors del melissa durant més de 5 temps de residència, sense que s'hagi presentat cap dificultat major, ni que s'hagi observat cap efecte nociu en cap dels compartiments provocat per aquesta connexió.

6.- ANÀLISI DEL TANCAMENT I DIMENSIONAT DEL BUCLE MELISSA

Els estudis experimentals efectuats en aquest treball tenen dos objectius principals: la demostració de que el concepte que es vol desenvolupar a MELISSA és factible, i l'obtenció de dades que permetin, al llarg del desenvolupament d'aquest projecte, dissenyar els bioreactors de la planta pilot al nivell precís i necessari per tal d'assolir els objectius que es fixen.

En conseqüència, en aquest capítol es fa un estudi sobre el tancament del bucle MELISSA, plantejant dimensionar cadascun dels seus compartiments a partir de les dades experimentals obtingudes i en funció de diferents escenaris possibles. Inicialment es pretén especificar les necessitats de cada compartiment per tancar el bucle a nivell de planta pilot i, posteriorment, s'analitzarà el tancament d'aquest cicle per un home.

6.1.- Tancament del MELISSA a nivell de planta pilot

Un cop s'ha evidenciat el bon funcionament del tancament global en fase líquida del bucle de bioreactors del projecte MELISSA a nivell de laboratori, cal dimensionar cada compartiment per tal de poder dur a terme aquest tancament a nivell de planta pilot. L'objectiu principal és demostrar la viabilitat del disseny, construcció i operació en connexió de tots els compartiments del bucle MELISSA.

En un primer plantejament, per a comprovar la validesa a nivell experimental del bucle MELISSA, simplificant les mesures de seguretat i requeriments legals, es proposa que el compartiment de la tripulació estigui representat per un compartiment de rates. Aquests animals respirarien l'aire generat/reciclat completament dins del bucle MELISSA i s'alimentarien de compostos generats bàsicament en el bucle. Tot i això, la dieta d'aquests animals pot variar en funció del grau de tancament assajat en cada experiment.

Tenint en compte que el bucle MELISSA és un sistema de suport de vida per humans, les soques del seu primer compartiment estan especialitzades en la degradació de femta humana. Així doncs, la femta i l'orina produïdes per les rates no seran introduïdes en aquest compartiment.

Caldrà doncs alimentar el primer compartiment amb residus fecals humans externs. Per això, es necessita plantejar i dissenyar un sistema de recollida usant voluntaris. Aquests seguiran controls mèdics rigorosos i seran alimentats progressivament amb una dieta MELISSA.

El tancament total del bucle no es podrà assolir fins que no es realitzi amb humans. Cal destacar, però, la validesa dels experiments amb animals; sobretot tenint en compte que la quantitat de matèria a reciclar formada pels excrements de la tripulació és petita si es compara amb la quantitat total de residus generats per cada membre de la tripulació dins del bucle MELISSA.

La metodologia definitiva per reciclar els residus generats en el compartiment de plantes superiors s'ha d'acabar de perfilar. S'ha demostrat, però, que el reciclatge d'aquests residus a través del compartiment I ofereix uns resultats i eficiències similars als obtinguts quan en aquest compartiment es degraden exclusivament excrements humans (Hermans i Demey, 2001). Així doncs, es considera que el reciclatge a través d'aquest compartiment és possible i s'ha de prioritzar.

Per tal de poder dissenyar el bucle MELISSA a nivell de planta pilot, es considera que el compartiment de plantes superiors haurà d'aportar el 20 % dels requeriments de la dieta nutricional d'una persona. Els altres compartiments es dissenyen, també, en funció d'aquesta restricció. Aquest escenari és interessant ja que és el que planteja una situació experimental més realista, sense la necessitat de confinar cap persona en el compartiment de la tripulació. Té l'avantatge que permet avançar molt en la demostració del bucle MELISSA a partir de les instal·lacions actuals disponibles i no incorpora les complexitats associades al confinament d'una persona; des del punt de vista de control mèdic, seguiment, aspectes legals, etc., que s'hauran de plantejar en una segona etapa.

6.1.1.- Tripulació

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, s'ha considerat tenir, inicialment, un compartiment de tripulació a nivell de planta pilot compost per animals enlloc d'humans. Els animals triats han estat les rates, al ser animals molt estudiats i presentar una relació respiratòria oxigen / CO₂ semblant a la dels humans.

Per tal de complir la restricció de disseny fixada, és a dir, que el bucle a nivell de planta pilot aportí el 20% de les necessitats d'una persona, s'ha decidit que aquest compartiment estigui compost per quatre rates d'uns 400g, al ser aquestes equivalents al 20% de la demanda d'oxigen diària d'una persona.

Una persona requereix uns 700-800 g d'O₂ / dia, veure la figura 6.1, i 4 rates actives requereixen sobre 140 g d'O₂ / dia, veure la taula 6.6, és a dir, aproximadament un 20% dels requeriments d'una persona.

6.1.2.- Compartiment de plantes superiors (CPS)

Per tal de poder dimensionar el CPS com un 20% del CPS requerit per una persona, cal recordar les necessitats diàries d'aquesta. Aquestes necessitats, que s'indiquen a la figura 6.1, són les presentades també a la figura 1.15.

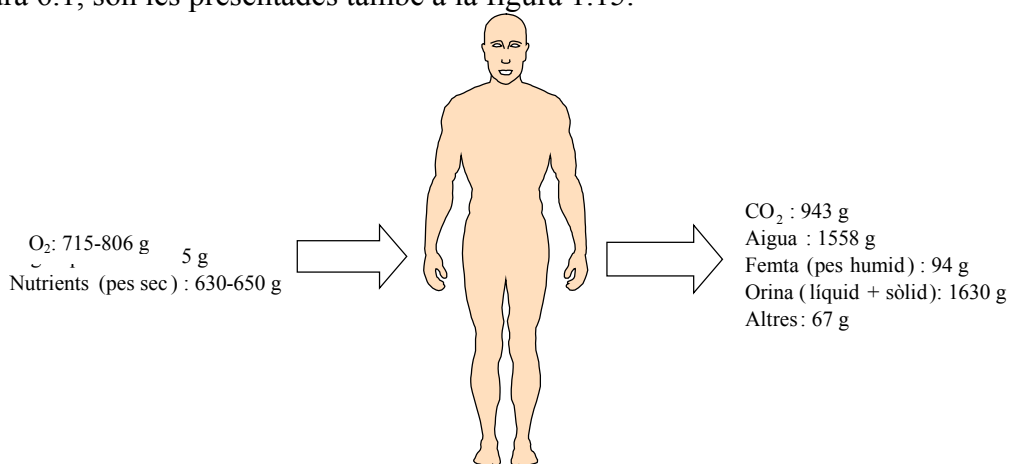


Figura 6.1.- Metabolisme diari d'una persona

Es pot suposar, en primera instància, que aproximadament un 70% de la dieta diària està aportada pel CPS, el 30% restant serà biomassa microbiana formada en el bucle i subministre extern.

Una primera consideració a fer és suposar que aquest compartiment de plantes superiors està compost per 8 plantes: arròs, tomàquet, patata, soja, espinacs, ceba, blat i enciam. El percentatge comestible d'aquestes plantes així com la composició de la part comestible es troba a la taula 6.1 a i b (Soucy *et al.*, 1990).

Amb aquestes suposicions cada planta es trobaria en la dieta en el percentatge que es presenta a la taula 6.2 (Poughon, 1997).

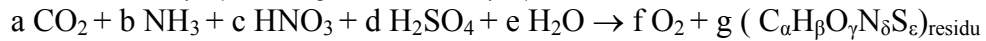
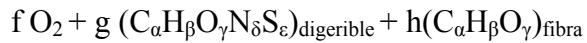
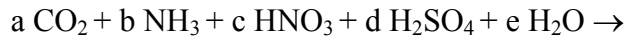
	% pes fresc planta		Composició de la part comestible (% pes sec)				
	Residu	Menjar	Proteïnes	Greix	Carbohidrats	Fibra	Total
Tomàquet	55	45	14.75	3.26	53.57	28.42	100
Arròs	55	45	8.42	2.57	85.66	3.35	100
Enciam	15	85	30.56	5.38	26.89	37.16	100
Patata	17	83	10.17	0.55	76.77	12.51	100
Soja	50	50	46.14	24.76	8.34	20.76	100
Espinacs	30	70	47.82	5.69	11.57	34.91	100
Ceba	25	75	12.09	2.42	56	29.5	100
Blat	60	40	13.8	2.35	71.73	12.12	100

Taula 6.1 - a) Percentatge comestible de la planta b) Composició de la part comestible de la planta

	HPC (%composició)	Comestible (g sec/dia)	Residu (g sec/dia)
<i>Tomàquet</i>	0.8	3.4	32.9
<i>Arròs</i>	20	92.7	111
<i>Enciam</i>	0.4	2.1	1.8
<i>Patata</i>	29.7	137.9	68.9
<i>Soja</i>	1.5	6.9	3.8
<i>Espinacs</i>	1.5	6.9	10.9
<i>Ceba</i>	1.5	6.9	10.9
<i>Blat</i>	44.6	206.9	315.5
TOTAL	100	463.7	555.7
CPS		92.74	111.14

Taula 6.2.- Percentatge en que es trobaria cada planta representada en el CPS i grams diaris requerits

Per considerar els requeriments d'aquest compartiment el creixement de cada planta es pot esquematitzar emprant les següents equacions, per a la part comestible i no comestible respectivament:



A)

	g Dig.	αC	βH	γO	δN	ϵS	h Fibra	αC	βH	γO	a CO₂	e H₂O	c NH₃	d HNO₃	f O₂	d H₂SO₄
<i>Tomàquet</i>	1	1	1.7928	0.8004	0.0546	0.0005	0.404	1	1.6560	0.828	1.404	1.1799	0.0232	0.0313	1.4744	0.0005
<i>Arròs</i>	1	1	1.665	0.7546	0.0257	0.0006	0.0335	1	1.6667	0.8333	1.0335	0.836	0.0109	0.0147	1.0836	0.0006
<i>Enciam</i>	1	1	1.7107	0.4464	0.1348	0.0019	0.5016	1	1.6537	0.8268	1.5016	1.1435	0.0574	0.0774	1.7627	0.0019
<i>Patata</i>	1	1	1.6492	0.775	0.0335	0.0006	0.1413	1	1.6513	0.8257	1.1413	0.9097	0.0142	0.0192	1.1803	0.0006
<i>Soja</i>	1	1	1.6878	0.2952	0.1321	0.0035	0.2022	1	1.6	0.8	1.2022	0.8799	0.0562	0.0758	1.5344	0.0035
<i>Espinacs</i>	1	1	1.6406	0.2835	0.187	0.0088	0.4215	1	1.6467	0.8233	1.4215	0.9855	0.0796	0.1074	1.7777	0.0088
<i>Ceba</i>	1	1	1.8113	0.751	0.0742	0.001	0.4183	1	1.656	0.828	1.4183	1.1823	0.0316	0.0426	1.5266	0.001
<i>Blat</i>	1	1	1.6548	0.7215	0.043	0.0012	0.132	1	1.6667	0.8333	1.132	0.8963	0.0183	0.0247	1.2039	0.0012

B)

	g Residu	αC	βH	γO	δN	ϵS	a CO₂	e H₂O	b NH₃	c HNO₃	f O₂	d H₂SO₄
<i>Tomàquet</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007
<i>Arròs</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007
<i>Enciam</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.007	0.0098	1.064	0.007

						7			2		8	
<i>Patata</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007
<i>Soja</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007
<i>Espinacs</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007
<i>Ceba</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007
<i>Blat</i>	1	1	1.43	0.62	0.017	0.007	1	0.6923	0.0072	0.0098	1.0648	0.007

Taula 6.3.- a) Coeficients estequiomètrics per l'equació de creixement de la part comestible de les vuit plantes proposades pel MELISSA.
b) Coeficients estequiomètrics per l'equació de creixement de la part del residu de les vuit plantes proposades pel MELISSA

Si es fa la suposició que la relació $\text{NO}_3^-/\text{NH}_3$ és igual a 5 (Poughon, 1997), aleshores els coeficients estequiomètrics de les equacions plantejades anteriorment per cada planta són els que es descriuen a les taules 6.3 a i b (Soucy *et al.*, 1990). Tenint en compte aquests coeficients i la quantitat diària requerida de cada planta, es poden calcular les necessitats d'aquests components tal i com es recull a la taula 6.4.

	CO₂	H₂O	NH₃	HNO₃	O₂	H₂SO₄
CPS Persona (g/dia)	-1809.73	-545.36	-7.51	-37.70	1398.52	-17.61
CPS pilot (g/dia)	-361.95	-109.07	-1.50	-7.54	279.70	-3.52

Taula 6.4.- Necessitats globals del CPS (els números amb signe negatiu significarien requeriment i els positius producció)

Aquestes necessitats serien les que es requeriria per alimentar una persona el 70% de la dieta de la qual fossin plantes.

Per aquest CPS es requeriria una àrea que es podria calcular a partir de la taula 6.5 (Drysdale *et al.*, 1994, Toki *et al.*, 1994).

	(g comestible/m².dia)	Àrea requerida per persona (m²)	20 % CPS pilot (m²)
<i>Tomàquet</i>	18	2.99	0.60
<i>Arròs</i>	4	26.73	5.35
<i>Enciam</i>	6	8.35	1.67
<i>Patata</i>	33	20.39	4.08
<i>Soja</i>	15	0.51	0.10
<i>Espinacs</i>	21	6.03	1.21
<i>Ceba</i>	22.5	2.90	0.58
<i>Blat</i>	33	7.24	1.45
TOTAL		75.15	15.03

Taula 6.5.- Àrea requerida pel cultiu de cada planta i àrea global pel CPS proposat

Així doncs, aquest compartiment, a nivell de Planta pilot donaria un 20% del requerit per una persona.

En altres aproximacions dins de l'estudi del bucle MELISSA, i tal i com ja s'ha descrit a l'apartat 1.2.6, s'està considerant un compartiment de plantes superiors compost de 25 plantes diferents (Cloutier *et al.*, 2001). Aquest compartiment s'està dissenyant per tal que, en un futur ja aplicat a l'espai, es pugui subministrar una dieta amb un menú cíclic de 10 dies per una tripulació de 6 astronautes. D'aquestes 25 espècies de plantes superiors, però, 8 serien les principals que aportarien els requeriments necessaris per la dieta humana. Aquestes 8 són les mateixes que s'han considerat en l'aproximació anterior amb l'excepció del canvi del tomàquet per la remolatxa. En aquesta aproximació ens quedaria un compartiment de plantes superiors molt semblant al que ja s'ha exposat.

De la taula 6.5 se'n desprèn que una àrea de cultiu de 15 m² seria suficient per poder aportar el 20% dels requeriments d'una persona, és a dir, seria suficient pel CPS de la planta pilot.

Ara bé, cal considerar 2 fets importants:

Aquesta àrea és de cultiu actiu, és a dir, plantes que ja produeixen aliments.

Hi ha plantes amb fotoperíodes diferents.

Així doncs, l'àrea de cultiu s'ha d'incrementar per tal de poder satisfer les necessitats de creixement de cada una de les espècies.

Com a estimació inicial, i tal com es desprèn de la figura 1.6, es volen destinar 72 m² pel compartiment pilot de plantes superiors.

Inicialment, i tal i com s'ha descrit a l'apartat 1.2.6, el cultiu a nivell pilot es reduirà a 3 espècies, les que s'han considerat més representatives de cada grup de plantes: blat (tiges), enciam (fulles) i remolatxa (arrel) (Masot *et al.*, 2003).

L'espai destinat al CPS, 72m², és suficient per instal·lar 3 cambres de cultiu de 5m² de superfície neta de cultiu; podent així cultivar separatament cada una d'aquestes espècies fixant les seves condicions òptimes de cultiu, (Masot *et al.*, 2003) i dotar de les instal·lacions necessàries que aquestes cambres requereixen, com per exemple, una zona o cambra destinada al creixement de les llavors.

Aquest espai ha de permetre realitzar la demostració del bucle en les condicions fixades en aquest escenari, permetent obtenir ja dades més precises de rendiments, etc., i poder ajustar les superfícies requerides en etapes posteriors del desenvolupament del CPS.

6.1.3.- Compartiment IVa

Al dissenyar aquest compartiment sorgeixen dues bases de disseny:

El compartiment IVa pot subministrar el 20% de l'oxigen requerit per una persona. D'aquesta manera es garanteix certa independència respecte al compartiment de plantes superiors i es pot tancar el bucle gasós exclusivament amb els compartiments microbians i tripulació de rates. Aquest fet és redundat, ja que l'aport d'oxigen del compartiment de plantes superiors és molt important, però, poder tancar el bucle gasós amb ambdós compartiments per separat assegura una major estabilitat del sistema i una major capacitat de realitzar proves a nivell pilot. Caldrà, però, disposar de tancs pulmó per equilibrar les diferències temporals en consum i producció d'O₂ i CO₂ d'ambdós compartiments.

El compartiment IVa ha d'aportar un 20% de la quantitat de *S. platensis* que consumeix una persona en la dieta anteriorment proposada. Tal i com s'ha presentat a l'apartat 1.2.5 i com es pot veure a l'apartat 6.2 una persona pot consumir un màxim de 190 g de *S. platensis* al dia. Així doncs, en aquest compartiment, s'haurien de produir 38 g de *S. platensis* al dia.

Ambdues bases de disseny garanteixen també l'aport d'oxigen i de nutrients del compartiment de la tripulació plantejat a la planta pilot, ja que:

4 rates són equivalents en quant a demanda d'oxigen al 20% d'una persona humana, motiu pel qual han estat triades com a compartiment de la tripulació, tal i com ja s'ha comentat a l'apartat 6.1.1. i es desprèn de la taula 6.6 i figura 6.1.

Requeriments	
Aliments	25 g/dia
Oxigen	35 g/dia
Producció	
CO ₂	42 g/dia

Taula 6.6.- Requeriments d'aliments, oxigen i producció de CO₂ per rata (Vernerey, 2000)

S'ha determinat que la quantitat màxima recomanada d'ingesta de *S. platensis* per rates és d'un 40% de l'aport nutricional total. Aquests resultats s'han obtingut en estudiar el comportament fisiològic de diferents rates alimentades amb una dieta de 25 g/dia enriquida amb diferents percentatges de *S. platensis* (de Chambure, 1992; Tranquille *et al.* 1994). Així doncs, si per alimentar 4 rates es requereixen 100 g de nutrients al dia i l'aport màxim de *S. platensis* que se'ls pot subministrar és d'un 40%, es necessiten 40 g *S. platensis* /dia. És a dir, es necessita la mateixa quantitat a la requerida per subministrar el 20% de la *S. platensis* per una persona.

La productivitat de *s. platensis* necessària per aportar l'oxigen i biomassa requerits i el corresponent consum de CO₂ pot extreure's de diferents estudis previs on s'han realitzat cultius en mode continu de *S. platensis*.

En experiments anteriors, s'ha obtingut una productivitat de $6.9 \cdot 10^{-2}$ g biomassa/l·h i de 0.1gO₂/l·h en un reactor de 7 l quan la llum incident al reactor és de 300 W/m², la superfície il·luminada de 0.154 m² i el volum il·luminat de 3.64 l (Vernerey, 2000).

Altres dades d'interès són les obtingudes per Martí (1997). En aquest estudi s'estableixen les dades estequiomètriques de *S. platensis*, tant en condicions normals, com en condicions de limitació de carboni. Aquestes dades permeten determinar els requisits i productivitats d'aquest compartiment en termes de consum de fonts de carboni i nitrogen i producció d'oxigen. Així, a partir d'aquests experiments es troba que, per cada gram de biomassa produït en condicions de no limitació de les fonts de carboni i nitrogen, es consumiran 0.08 g N-NO₃⁻ i 1.74 g CO₂ (0.47 g C-CO₂) i es produiran 1.6 g d'O₂. Aquesta producció d'oxigen és molt similar a l'esmentada anteriorment en els experiments realitzats per Vernerey, 1.54 g O₂ (Vernerey, 2000).

Tenint en compte aquests valors, i amb l'ajuda d'un simulador photosim (cornet *et al.*, 1993) es va dissenyar un reactor de 77 l (vernerey, 2000) que havia de ser suficient per assolir les necessitats del bucle melissa a nivell de planta pilot.

Si s'assumeix una composició estequiomètrica mitjana de *S. platensis*, CH_{1.65}O_{0.53}N_{0.17}S_{0.007}P_{0.06}, i el nitrat com a única font de nitrogen, i s'espera una producció d'oxigen de uns 140 g O₂/dia, aproximadament un 20% del requerit per una persona i el 100 % del que requereixen 4 rates, s'espera consum un de 7-8.15 gN-NO₃⁻/dia i una fixació de CO₂ de 152.2 g/dia. Aquesta producció d'oxigen seria suficient per mantenir les rates vives.

Ara bé, tenint en compte les necessitats de *S. platensis*, 40 g/dia, si s'assumeix també una composició estequiomètrica mitjana de *S. platensis*, CH_{1.65}O_{0.53}N_{0.17}S_{0.007}P_{0.06}, i el nitrat com a única font de nitrogen, per produir 40 g de *S. platensis* s'espera un consum de 3.19-3.80 gN-NO₃⁻/dia una producció d'oxigen de 64.0 g/dia i una fixació de CO₂ de

69.3 g/dia. Aquesta producció d'oxigen seria però insuficient per satisfer els requeriments de la tripulació.

Amb el reactor de 77L dissenyat s'ha assolit una producció de *S. platensis* d'aproximadament 40 g/dia i, per tant, compliria els requisits com a font d'aliment.

Ara bé, tenint en compte les productivitats obtingudes fins el moment amb aquest reactor, si es volgués produir tot l'oxigen requerit es necessitarien 2-3 reactors iguals als que es disposa actualment o un reactor que de 77L que assolís les mateixes productivitats a les assolides al reactor de 7 L (Vernerey, 2000). Cal dir però que aquest reactor pilot de 77 L encara no ha estat operat en condicions òptimes d'operació i que, per tant, s'espera que la seva productivitat d'oxigen pugui ser superior.

Així doncs, sembla que el reactor actualment existent a la planta pilot és suficient per garantir l'aport d'aliment requerit per la planta pilot, i falta comprovar la seva capacitat de subministrar tot l'oxigen requerit. Ara bé, tenint en compte que la demanda d'oxigen que no pugui ser subministrada per aquest compartiment ho pot ser pel compartiment de plantes superiors, es considera que aquest reactor ja és suficient a nivell de planta pilot.

6.1.4.- Compartiment III

La producció de biomassa dels compartiments IVa i b requereix un subministrament continu de nitrat que dins l'estructura del bucle MELISSA prové del tercer compartiment. Així doncs, aquest compartiment ha de subministrar la quantitat de nitrat requerida en ambdós compartiments.

Tal i com ja s'ha presentat a la descripció del compartiment IVa si s'assumeix una composició estequiomètrica mitjana de *S. platensis*, $\text{CH}_{1.65}\text{O}_{0.53}\text{N}_{0.17}\text{S}_{0.007}\text{P}_{0.06}$, i el nitrat com a única font de nitrogen, per produir 40 g de *S. platensis* s'espera un consum de 3.19-3.80 gN- NO_3^- /dia, si es volgués aportar tot l'oxigen requerit les necessitats de nitrat serien de 7-8.15 gN- NO_3^- /dia.

Pel que fa al compartiment de plantes superiors, per tal d'aconseguir una producció d'un 20% dels requeriments de plantes superiors en la dieta MELISSA d'un humà, es necessita un subministre de 1.68 gN- NO_3^- /dia, tal i com es dedueix de la taula 6.4.

Així doncs, el compartiment III ha de subministrar 5.48 gN- NO_3^- /dia, si el compartiment IVa només garanteix l'aport de nutrients, o bé 9.18 gN- NO_3^- /dia si el compartiment IVa garanteix el subministre d'oxigen.

En experiments anteriors, en una columna empacada amb un volum de líquid de 3.82 L, volum total de 8 L i volum de sòlids 3.9 L, columna actualment instal·lada a la Planta pilot MELISSA, s'ha obtingut una productivitat màxima de 11.1 g N- NO_3^- /dia (Pérez, 2001). Així doncs, aquesta columna és òptima pels requeriments del bucle MELISSA en aquest escenari. Després d'un any de funcionament d'aquesta columna es tenia una quantitat de biomassa de 13 g/L (referit al volum total del llit empacat) (Pérez, 2001), això suposaria una producció de biomassa de 6.5 g/mes, essent el volum de llit 6 L. És a dir que els requeriments de carboni i nitrogen en aquest compartiment serien de 3.32 g C/mes i 0.78 g N/mes, suposant que la biomassa té una composició típica de $\text{CH}_{1.75}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.43}$ (Blanch i Clark, 1998).

L'amoni que es convertirà a nitrat i biomassa en aquest compartiment prové de l'amoni sortint del segon compartiment i l'orina produïda per l'home, la qual és la principal font d'amoni del sistema plantejat.

La composició i quantitat d'orina excretada per persona i dia es presenta a la taula 6.7 (Tortora i Grabowski, 1992).

	ORINA (excretada/dia)
Aigua	1500 mL
Proteïnes	0.1 g
Sodi (Na ⁺)	4.6 g
Clor (Cl ⁻)	6.3 g
Bicarbonat (HCO ₃ ⁻)	0
Glucosa	0
Urea	25 g
Potassi (K ⁺)	2.0 g
Àcid úric	0.8 g
Creatinina	1.6 g

Taula 6.7.- Composició i quantitat d'orina excretada per persona diàriament

Segons aquestes dades, i assumint que es formen dos mols d'amoni i un mol de CO₂ per cada mol d'urea i 4 mols d'amoni i 5 mols de CO₂ per cada mol d'àcid úric provenint de l'orina, s'obtenen 12.7 g N-NH₄⁺/dia i 18g CO₂/dia de la descomposició global de l'orina excretada diàriament per una persona.

Si es considera un aport d'un 20% de l'orina excretada per una persona a la planta pilot, es produirien 2.54g N-NH₄⁺/dia i 3.6g CO₂/dia.

El procés de descomposició de l'orina així com la decisió d'on serà introduïda dins del bucle encara s'ha de determinar. Cal ressaltar que un excés d'amoni inhibeix el primer compartiment i que el compartiment de plantes superiors necessita un subministrament continu i directe d'amoni com a font de nitrogen.

6.1.5.- Compartiment I

La part no comestible de les plantes superiors, els excrements i la biomassa en excés de *S. platensis* i *R. rubrum* produïts seran reciclats en aquest compartiment.

Una persona excreta una mitjana d'uns 94 g de matèria fecal (pes humit) diaris, la composició de la qual es troba a la taula 6.8 (Hermans i Demey, 1998). Aquesta composició s'ha trobat experimentalment i concorda amb altres dades publicades (Guyton, 1986). La composició de la matèria fecal no depèn gaire de la dieta ja que el seu component principal són bacteris intestinals. Aquest fet s'observa a la taula 6.9 (Ganong, 1977).

	COMPOSICIÓ MATÈRIA FECAL
<i>Pes sec</i>	200 (g/kgPH)
<i>Matèria orgànica</i>	850 (g/kgPS)
<i>Nitrogen orgànic</i>	37.7 (g/kgPS)
<i>Amoni</i>	3.2 (g/kgPS)

<i>Àcids volàtils</i>	45 (g/kgPS)
<i>Cendres</i>	150 (g/kgPS)

Taula 6.8.- Composició de la matèria fecal. PH: Pes humit. PS: Pes sec

Percentatge del pes total	
<i>Aigua</i>	75
<i>Sòlids</i>	25
Percentatge de sòlids totals	
<i>Cel.lulosa i fibres no digeribles</i>	Variable
<i>Bacteris</i>	30
<i>Matèria inorgànica</i>	15
<i>Greixos i derivats</i>	5

Taula 6.9.- Composició de la matèria fecal (Ganong, 1977)

Angelidaki i col·laboradors van presentar un model estequiomètric per la biodegradació anaeròbia de femta de vaca (Angelidaki *et al.*, 1993). Extrapolant els valors que ells van trobar a la biodegradació anaeròbia de femta humana i tenint en compte que en el primer compartiment del MELISSA s'ha d'inhibir la metanogènesis, es pot estimar que 1 gram d'àcids volàtils produïts correspon a la degradació de 1.24 grams de matèria orgànica (Hermans i Demey, 1998).

En experiments previs de degradació de matèria fecal, diluïda 1/10, s'ha aconseguit degradar un 53% de la matèria fecal fent servir un conjunt de dos reactors i un tractament enzimàtic intermig (Hermans i Demey, 1999). Un esquema d'aquest procés es presenta a la figura 6.2.

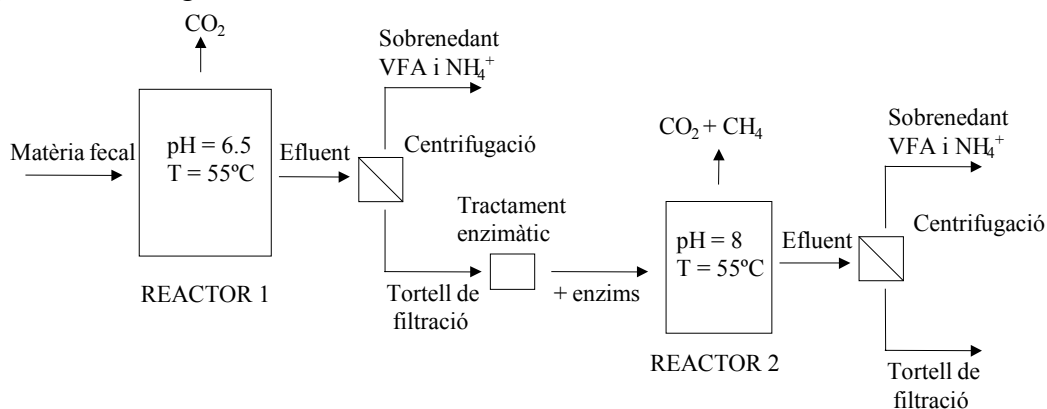


Figura 6.2.- Esquema de funcionament òptim del primer compartiment

En el primer reactor d'1.6 L de volum s'assoleix una conversió d'un 40%, essent la conversió de les proteïnes d'un 60% i la de les fibres d'un 29%, quan el temps de residència és de 21 dies. La sortida d'aquest reactor es centrifuga i s'envia el tortell de centrifugació al segon reactor. Abans d'entrar al segon reactor, el tortell es dilueix al mateix volum que tenia abans de centrifugar i es fa un tractament enzimàtic per afavorir la degradació de les fibres. La relació solució enzimàtica solució d'aliment del segon reactor és d'1:2. En el segon reactor de 0.9 L s'assoleix una conversió del 38%, essent la

conversió de les proteïnes d'un 40% i la conversió de les fibres d'un 37%. L'eficiència global de conversió assolida entre ambdós compartiments és d'un 53%.

Ambdós reactors operen de manera semicontínua alimentant 150 mL cada dos dies. La composició de l'afluent sortint d'ambdós reactors es presenta a la taula 6.10.

La millora en degradació obtinguda en el segon reactor és considerada insuficient. Així doncs, tant pels càlculs com per l'escalat com en estudis posteriors d'aquest compartiment només s'ha considerat la inclusió del primer reactor.

S'ha comprovat que quan aquest primer compartiment és alimentat amb la composició de residus típica que es produeix en el bucle MELISSA s'obtenen resultats similars als presentats anteriorment usant exclusivament un únic reactor (Hermans i Demey, 2001). A la taula 6.11 es presenta la composició de sortida del compartiment I en aquestes condicions d'operació, resultats també presentats a la taula 5.1 d'aquest document.

Així doncs, per dur a terme els càlculs d'aquest apartat es considerarà un únic reactor amb un temps de residència de 21 dies, entrada d'aliment diluït 20g pes sec/ L alimentat i una producció d'àcids volàtils i amoni relativa al pes sec entrant igual a la presentada a la taula 6.11.

En aquest compartiment caldrà doncs, degradar:

Un 20% de la femta humana; que, tal i com s'ha explicat anteriorment fa referència a la restricció de disseny de la planta pilot: és a dir si es considera una producció total de femta per persona i dia de 23.5 g pes sec /dia caldrà degradar 4.7 g pes sec /dia.

La biomassa no comestible produïda en el compartiment de plantes superiors, que, tal i com s'ha descrit a la taula 6.2, és de 111.14 g/dia.

La biomassa produïda en excés dins del bucle MELISSA: s'ha considerat que tota la *S. platensis* serà consumida en el compartiment de la tripulació i la totalitat del *R. rubrum* produït serà alimentat de nou al primer compartiment. Cal doncs dimensionar els compartiments I i II en paral·lel al tenir en compte que tota la biomassa produïda en el compartiment II és retornada al compartiment I.

	Reactor I		Reactor II	
	Entrada (g/L)	Sortida (g/L) [rang]	Entrada (g/L)	Sortida (g/L) [rang]
<i>pH</i>	6,9	[6,5-6,9]	6,8	[7,3-8,5]
<i>Matèria seca</i>	23	18 [7.54-26.5]	5,99	4,9 [4.3-15]
<i>Cendres</i>	3,7	3 [1.7-5.1]	0,76	1,7 [1.5-3.2]
<i>total-N</i>	1,241	1,25 [0.75-1.97]	0,227	0,3 [0.17-1.7]
<i>N-NH₃</i>	0,1	0,7 [0.55-1.4]	0,043	0,09 [0.07-1.1]
<i>total-AGV</i>	0,85	2,4 [0.59-3.26]	0,21	0,3 [0.048-1.4]
<i>acètic</i>	0,354	0,4 [0-1.8]	0,047	0,1 [0-0.63]
<i>Propiònic</i>	0,218	0,85 [0.31-1.2]	0,066	0,2 [0.047-1.02]
<i>Iso Butíric</i>	0,029	0,24 [0-0.28]	0,024	0 [0-0.055]
<i>Butíric</i>	0,167	0,26 [0-0.35]	0,03	0 [0-0.082]
<i>Iso Valèric</i>	0,046	0,51 [0-0.6]	0,043	0 [0-0.071]
<i>Valèric</i>	0,033	0,03 [0-0.08]	0	0 [0-0.017]
<i>Caproic</i>	0,02	0,015 [0-0.032]	0	0 [0-0.013]
<i>Iso Caproic</i>	0	0	0	0
<i>CO₂</i>	0	0,59 [0,5-1,95]	0	-

(g/L-reactor) <i>CH₄</i> (molar %)	0	0	73 [51-79]
---	---	---	------------

<i>pH</i>	6,5	8
<i>Temp</i>	55	55
<i>Vol</i>	1,6	0,9
<i>Cabal aliment</i> (mL/2dies)	150	150
<i>gas sec/6h</i>	10	-
<i>t (dies)</i>	21	18

Taula 6.10.- Composició de l'aliment i sortida del compartiment I (Hermans i Demey, 1998)

Àcids grassos volàtils	g/L
Àcid acètic	0.77
Àcid propiònic	0.27
Àcid butíric	0.10
Àcid isobutíric	0.15
Àcid valèric	0.17
Àcid isovalèric	0.15
Font de nitrogen	N-ppm
Amoni	414

Taula 6.11.- Composició a la sortida del compartiment I

Si considerem que la composició de sortida del compartiment I és la presentada a la taula 6.11 i que *R. rubrum* presenta una composició estequiomètrica mitjana de $CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161}$, aleshores es produiran 1.55 g/L de *R. rubrum* per cada litre sortint del primer compartiment tal i com es presenta a la taula 5.2.

Tenint en compte aquestes consideracions i que el *R. rubrum* sortint d'aquest compartiment és alimentat un altre cop al compartiment I, s'obté que la quantitat de *R. rubrum* produïda en el segon compartiment és de:

9.73 g/dia quan es considera un 20% de la femta produïda per persona i dia.

Així doncs, les dimensions i requeriments del primer compartiment es descriuen a continuació:

El compartiment I dissenyat pels requeriments de la planta pilot haurà de tractar un total de 125.57 g secs/dia. Fet que suposa un volum disponible de 131.85 L al considerar un temps de residència de 21 dies i una alimentació de 6.28 L/dia a 20 g/L. Degradant, així, tota la biomassa restant del bucle i produint 10.10 g AGV/dia, 2.60 g N-NH₄⁺/dia i 3.70 g CO₂/dia.

6.1.6 Compartiment II

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment en aquest compartiment es consumeixen tots els àcids volàtils produïts en el compartiment I retornant-ne la biomassa generada.

Quan *R. rubrum* rep una quantitat òptima de llum pot assolir velocitats de dilució que arriben a 0.17 h⁻¹ al créixer en, exactament, el medi sortint del primer compartiment,

veure el capítol 5 d'aquest document. Per dimensionar aquest compartiment, però, s'ha considerat una velocitat de dilució de $D=0.08 \text{ h}^{-1}$ al considerar les elevades dificultats de subministrar l'aport de llum necessari per assolir velocitats de dilució superiors.

Tenint en compte aquest fet, i els cabals i composicions sortint del primer compartiment les dimensions i requeriments del compartiment II es presenten a continuació:

El compartiment II presentaria un volum de 3.27 L, es produirien 9.73 g biomassa/dia, consumint tots els àcids grassos volàtils sortints del compartiment I, 10.10 g AGV/dia, i requerint un aport de 1.35 g N-NH_4^+ /dia i 1.13g CO_2 /dia

6.2.- Tancament del bucle MELISSA per una persona

Quan es vol dimensionar el tancament del bucle MELISSA en base a una persona cal tenir en compte les següents consideracions:

La dieta aconsellable per una persona està basada com a mínim en l'aport d'aliments provinents de dues fonts d'aliments diferents.

Una persona no pot menjar més de 190 g/dia de *S. platensis* tractada enzimàticament per eliminar-ne la major part dels àcids nucleics, veure l'apartat 1.2.5.

En la dieta MELISSA cal un aport extern d'aliments al voltant d'un 10% per tal d'assolir una dieta equilibrada. En una dieta a base de plantes i biomassa falten, sobretot, greixos que s'han d'aportar de l'exterior.

Les necessitats d'una persona es descriuen a la figura 6.1.

Una vegada s'han considerat aquests factors es pot procedir a l'estudi del dimensionat de cada un dels compartiments:

6.2.1.- Compartiment de plantes superiors

El dimensionat d'aquest compartiment ja s'ha dut a terme a l'apartat 6.1.2. Les necessitats, produccions i requeriments d'aquest compartiment es presenten a les taules 6.1, 6.2, 6.4 i 6.5.

6.2.2.- Compartiment IVb

Tal i com s'ha comentat la quantitat màxima de *S. platensis* tractada enzimàticament que pot ingerir un home sense perill de contraure la malaltia de la gota és de 190 g/dia. Tenint en compte aquest factor es pot dimensionar aquest compartiment per produir aquesta quantitat de biomassa.

Si s'assumeix una composició estequiomètrica mitjana de *S. platensis*, $\text{CH}_{1.65}\text{O}_{0.53}\text{N}_{0.17}\text{S}_{0.007}\text{P}_{0.06}$ i el nitrat com a única font de nitrogen, per produir 190 g de *S. platensis* s'espera un consum de 17.8g n-NO_3^- /dia una producció d'oxigen de 304 g/dia i una fixació de CO_2 de 329.3 g/dia.

Si s'assolissin les productivitats assolides per vernerey (2000) en el reactor de 7 l, amb un reactor de 144 l i garantint una il·luminació suficient, s'aconseguirien obtenir 200 g de *S. platensis* / dia. Ara bé, s'hauria de garantir la il·luminació requerida per obtenir aquesta producció. En cas contrari, el volum requerit seria major.

6.2.3.- Compartiment III

La producció de biomassa dels compartiments IVa i b requereix un subministrament continu de nitrat que dins l'estructura del bucle MELISSA prové del tercer compartiment.

Per produir 190 g de *S. platensis* s'espera un consum de 17.8 gN-NO₃⁻/dia si s'assumeix una composició estequiomètrica mitjana de *S. platensis*, CH_{1.65}O_{0.53}N_{0.17}S_{0.007}P_{0.06} o CH_{1.59}O_{0.59}N_{0.13}, i el nitrat com a única font de nitrogen.

Pel que fa al compartiment de plantes superiors, per tal d'aconseguir una producció d'un 100% dels requeriments de plantes superiors en la dieta MELISSA d'un humà, es necessita un subministre de 8.38 gN- NO₃⁻/dia tal i com es dedueix de la taula 6.4.

Així doncs, el compartiment III ha de subministrar 26.18 gN- NO₃⁻/dia.

En experiments anteriors, en una columna empacada amb un volum de líquid de 3.82 L, volum total de 8 L i volum de sòlids 3.9 L, columna actualment instal·lada a la Planta pilot MELISSA, s'ha obtingut una productivitat màxima de 11.1 g N-NO₃⁻/dia (Pérez *et al.*, 1999). Així doncs, caldria triplicar aquest volum de reacció, per satisfer aquests requeriments plantejats en aquest nou escenari.

Els requeriments de carboni i nitrogen en aquest compartiment seran de 9.96 g C/mes i 2.34 g N/mes, suposant que la biomassa té una composició típica de CH_{1.75}N_{0.2}O_{0.43} (Blanch i Clark, 1998) i que s'assoleixen concentracions de biomassa similars a les assolides per Pérez (1997 i 2001).

L'amoni que s'emprarà per dur-ne a terme la degradació a nitrat serà el que prové del compartiment II i el que prové de l'orina excretada per un humà que, tal i com s'ha explicat a l'apartat 6.1.4, assumint que es formen dos mols d'amoni i un mol de CO₂ per cada mol d'urea i 4 mols d'amoni i 5 mols de CO₂ per cada mol d'àcid úric provenint de l'orina, s'obtenen 12.7 g N-NH₄⁺/dia i 18g CO₂/dia de la descomposició global de l'orina excretada diàriament per una persona.

6.2.4.- Compartiment I

En aquest compartiment caldrà tractar la femta produïda per persona i dia, 23.5 g secs/dia, la part no comestible del compartiment de plantes superiors, 555.7 g/dia i el *R. rubrum* produït en el compartiment II.

Si considerem que la composició de sortida del compartiment I és la presentada a la taula 6.11 i que *R. rubrum* presenta una composició estequiomètrica mitjana de CH_{1.6004}O_{0.3621}N_{0.2218}S_{0.0036}P_{0.0161}, aleshores es produiran 1.55 g/L de *R. rubrum* per cada litre sortint del primer compartiment tal i com es presenta a la taula 5.2.

Tenint en compte aquestes consideracions i que el *R. rubrum* sortint d'aquest compartiment és alimentat un altre cop al compartiment I, s'obté que la quantitat de *R. rubrum* produïda en el segon compartiment serà de:

48.66 g/dia

Així doncs, al considerar un únic reactor amb un temps de residència de 21 dies, entrada d'aliment diluït 20g pes sec/ L alimentat i una producció d'àcids volàtils i amoni relativa al pes sec entrant igual a la presentada a la taula 6.11 les dimensions i requeriments del primer compartiment es descriuen a continuació:

El compartiment I haurà de tractar un total de 579.2 g secs/dia. Fet que suposa un volum disponible de 628 L al considerar un temps de residència de 21 dies i una alimentació 31.4 L/dia a 20 g/L.

En aquest compartiment es degradaria tota la biomassa restant del total del bucle i es produïrien 50.54 g AGV/dia, 13.0 g N-NH₄⁺/dia, 18.52 g CO₂/dia.

6.2.5.- Compartiment II

En aquest compartiment es consumeixen tots els àcids volàtils produïts en el compartiment I retornant-ne la biomassa generada.

Tot i que quan *R. rubrum* rep una quantitat òptima de llum pot assolir velocitats de dilució que arriben a 0.17 h^{-1} al créixer en el medi sortint del primer compartiment, veure el capítol 5 d'aquest document, per dimensionar aquest compartiment a nivell de planta pilot s'ha considerat una velocitat de dilució de $D=0.08 \text{ h}^{-1}$. Cal considerar la gran dificultat de subministrament d'un aport de llum necessari per assolir velocitats de dilució superiors.

Tenint en compte aquest fet i els cabals i composicions sortint del primer compartiment, el compartiment II presentaria un volum de 16.35L, es produirien 48.66 g biomassa/dia, consumint tots els àcids grassos volàtils sortints del compartiment I, 50.54 g AGV/dia, i es requeriria un aport de 6.74 g N-NH_4^+ /dia i 5.63 g CO_2 /dia.

6.3.- Consideracions del tancament del MELISSA

A la planta pilot de la Universitat Autònoma de Barcelona es disposa d'un segon, tercer i quart compartiment, de 7 L, $3.8 \text{ L}_{\text{liquid}}$ i 77 L, respectivament.

D'aquest capítol se'n desprèn que a fi de dimensionar el MELISSA a nivell de planta pilot i procedir a fer els experiments amb rates alimentades en un 40% amb *S. platensis*, els volums dels reactors requerits pels compartiments III i IVa són els que ja es disposen a la planta pilot de la UAB.

El compartiment II seria també suficient. Ara bé, s'ha comprovat que aquest no té una disposició i subministre de llum adequats per assolir les productivitats requerides (Cabello, 2000).

Pel que fa al dimensionat del MELISSA en base a una persona, si s'aconseguís un tancament complet es presentaria un escenari on la dieta de l'home només dependria d'un aport extern d'un 10%. Per tal de que aquest escenari sigui viable i el tancament del cicle s'aproximi al 100%, es necessita una millora del primer compartiment i/o un procés alternatiu per a recuperar parcial o totalment els residus que es desprenen en el bucle. En aquest sentit, si es té en compte que existeix un excés d'oxigen i una manca de CO_2 , sembla que un procés de combustió podria ser una possibilitat a contemplar.

Per minimitzar els volums i massa requerits en el disseny final del bucle caldrà optimitzar l'aport lumínic dels compartiments fotosintètics.

Arran dels resultats, i tenint en compte que la majoria de l'aport de nutrients i d'oxigen a la tripulació es dona en el compartiment de plantes superiors, es pot qüestionar la necessitat de l'existència de la vessant microbiològica del MELISSA. Aquesta necessitat es posa de manifest quan es veu que els únics processos que converteixen l'amoni present als residus a nitrat, necessitat per les plantes i pel quart compartiment, són processos biològics. Quedaria així justificada la necessitat de la presència del primer, segon i tercer compartiments. Pel que fa al quart compartiment, la seva presència pot justificar-se per diverses raons:

Les relacions O_2 /pes sec i O_2/CO_2 obtingudes en el CPS i en el compartiment IVa són $1.37 \text{ g O}_2/\text{g secs}$ i $0.77 \text{ g O}_2/\text{g CO}_2$ i $1.54 \text{ g O}_2/\text{g secs}$ i $0.88 \text{ g O}_2/\text{g CO}_2$ respectivament. Així doncs, aquestes dues relacions són més elevades en el quart compartiment. La

relació O₂/CO₂ obtinguda en el compartiment IVa és, també, més propera a la relació O₂/CO₂ humana que és 0.86 g O₂/g CO₂.

El quart compartiment té un temps de resposta molt inferior al compartiment de plantes superiors, així doncs, si es requerís un augment en la producció d'oxigen i de biomassa i un augment en el consum de CO₂, es podria actuar més ràpidament modificant els paràmetres d'aquest compartiment.

La *Spirulina* com a font nutricional proteica és molt similar a la carn i és molt millor que qualsevol vegetal.

Així doncs, tenint en compte aquests motius, sembla evident que el bucle MELISSA millora amb la presència del quart compartiment, el qual complementa les deficiències d'un compartiment de plantes superiors.

7.- CONCLUSIONS

En aquest treball:

1.- S'ha avaluat el funcionament de la connexió a nivell de laboratori dels compartiments II, III i IVa del bucle MELISSA, usant un medi sintètic amb àcid acètic com a única font de carboni, concloent que:

El medi dissenyat per dur a terme aquesta connexió ha funcionat eficientment, havent arribat tots els micronutrients necessaris al quart compartiment.

La connexió dels compartiments II, III i IVa s'ha portat a terme satisfactòriament a nivell de laboratori. No s'han evidenciat efectes nocius o tòxics en cap dels compartiments.

2.- S'ha estudiat l'efecte que produeix un excés d'àcid acètic en el segon compartiment, un dels possibles estats transitoris més freqüents del comportament global de la connexió, concloent que:

Un excés d'àcid acètic en el segon compartiment, provocat per una manca d'energia lumínica incident al cultiu, comporta:

Les cèl·lules de *R. rubrum* comencen a agregar-se i a adherir-se a la superfície del reactor, mostrant problemes de divisió cel·lular quan l'àcid acètic és present en excés en les condicions de cultiu en concentracions superiors a 0.1g/L.

Aquests problemes de divisió i mobilitat van associats a una acumulació de PHB per part de *R. rubrum*.

Així doncs, sembla que en les condicions assajades, en disminuir la llum incident al cultiu, s'augmenta el carboni en solució i s'inicia un mecanisme d'acumulació de font de carboni intracel·lular en forma de PHB. La manca o dificultat de moviment i de divisió pot atribuir-se a la manca d'energia existent, que es tradueix en nivells baixos de disponibilitat d'ATP.

L'entrada d'àcid acètic en el tercer compartiment:

Si entra àcid acètic en concentracions de fins a 20 mM en el tercer compartiment, això no comporta, en principi, un mal funcionament.

S'ha observat que tot l'àcid acètic és consumit en aquest compartiment.

3.- S'ha avaluat l'efecte que produeix una conversió parcial d'amoni a nitrat en el tercer compartiment, conclouent que:

Una manca d'oxigen o un augment en la velocitat de dilució del compartiment III comporten una conversió parcial de l'amoni a nitrat en aquest compartiment amb una possible aparició d'amoni i de nitrit a la sortida del mateix.

Una entrada d'amoni nitrit i nitrat en el compartiment IVa causa:

L'amoni és la font de nitrogen usada de manera preferencial per part de *S. platensis*.

Entrades momentànies de nitrit, en concentracions superiors a les descrites com a tòxiques a la bibliografia, en el quart compartiment, no representen cap disfunció en el seu comportament.

S. platensis, tot i ser capaç d'usar nitrit com a font de nitrogen, no l'utilitza quan té altres fonts com són l'amoni i el nitrat.

El fet de que *S. platensis* no utilitzi el nitrit en presència i excés d'altres fonts de nitrogen, fa que s'hagi de pensar en un mètode per eliminar el nitrit de la sortida del quart compartiment, donat que aquest és tòxic per l'home i per part del compartiment de plantes superiors.

4.- S'ha avaluat el funcionament de la connexió a nivell de laboratori dels compartiments II, III i IVa del bucle MELISSA, usant un medi sintètic amb una mescla d'àcids acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del segon compartiment, conclouent que:

La connexió dels compartiments II, III i IVa ha estat duta a terme satisfactòriament. No s'han evidenciat efectes nocius o tòxics en cap dels compartiments.

En augmentar la cadena de carbonis dels àcids grassos volàtils que s'usen com aliment del segon compartiment, amb un mateix aport d'energia lumínica, disminueix la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum*.

S'ha analitzat la biomassa obtinguda i els medis intermedis de connexió observant:

Una pèrdua d'elements en els processos de centrifugació i filtració intermedis.

Que tots els elements analitzats semblen trobar-se en excés en el medi sintètic utilitzat.

5.- s'ha estudiat la connexió a llarg termini dels compartiments III i iva a escala pilot:

Aquesta connexió s'ha dut a terme sense que s'observi cap efecte tòxic i sense que es presenti cap problema operacional a destacar en cap dels dos compartiments.

S'ha estudiat també l'evolució de la connexió d'aquests compartiments quan s'augmenta la velocitat de dilució de la connexió o quan es disminueix la concentració d'oxigen del tercer compartiment conclouent que, com ja s'havia evidenciat anteriorment:

Un salt de la velocitat de dilució o una disminució en la concentració d'oxigen present al tercer compartiment provoquen un estat durant el qual no tot l'amoni és convertit a nitrat, i es troben nitrats i amoni a la sortida d'aquest compartiment. Aquests estats són transitoris sempre i quan la columna tingui possibilitats d'adaptar-se a les noves condicions d'operació. Si les noves condicions operacionals són massa dràstiques, pot ser que la no conversió de tot l'amoni a nitrat no sigui transitòria i que, a l'estat estacionari, es trobin amoni i nitrat a la sortida d'aquest compartiment.

Quan al medi de cultiu del compartiment iva hi ha amoni, nitrat i nitrat, *s. Platensis* consumeix preferentment l'amoni i posteriorment el nitrat. El nitrat no és consumit en el quart compartiment quan es troben en excés els nitrats o l'amoni, i és, per tant, rentat del reactor.

Així doncs, a la sortida del quart compartiment es troben nitrats en les condicions operacionals abans descrites. Cal tenir present aquest fet ja que el medi de sortida d'aquest compartiment s'utilitzarà o bé en el compartiment de plantes superiors, o bé en d'altres compartiments.

S'ha estudiat també el sistema de control del melissa pel compartiment iva quan aquest es troba connectat amb el tercer compartiment. S'han introduït diferents salts al valor de consigna de la productivitat del sistema de control del quart compartiment, demostrant ésser prou robust, ja que sempre s'ha obtingut la productivitat desitjada.

6.- s'ha avaluat el funcionament de la connexió a nivell de laboratori dels compartiments ii, iii i iva, usant un medi sintètic que emula la sortida del primer compartiment:

Aquesta connexió s'ha dut a terme satisfactòriament sense major complicació i sense observar cap efecte tòxic ni inhibidor en cap dels compartiments.

La velocitat màxima de creixement de *r. Rubrum*, per unes mateixes condicions d'operació, disminueix en augmentar el nombre i cadena d'àcids grassos volàtils en el medi de cultiu.

7.- s'ha avaluat el tancament, en fase líquida, del bucle microbià complet de melissa:

S'ha analitzat la sortida del primer compartiment i s'ha comparat amb el medi sintètic utilitzat per la connexió dels compartiments ii, iii i iva, per tal de veure els seus requeriments per poder procedir amb la connexió en fase líquida del bucle complet de bioreactors del melissa.

S'ha observat que tant *r. Rubrum* com *s. Platensis* són capaços de créixer en discontinu en el medi complementat de sortida del primer compartiment.

S'ha demostrat el fort efecte que té la disponibilitat d'energia lumínica sobre el creixement de *r. Rubrum*. Un excés de llum inhibeix fortament el seu creixement i, en canvi, una mancança en disminueix, també fortament, la seva velocitat màxima de creixement.

I finalment, s'ha dut a terme satisfactòriament la connexió dels compartiments i, ii, iii i iva. És a dir, s'ha connectat en fase líquida el bucle complet de bioreactors del melissa durant més de 5 temps de residència en estat estacionari, sense que s'hagi presentat cap dificultat major, ni que s'hagi observat cap efecte nociu en cap dels compartiments provocat per aquesta connexió.

8.- S'ha estudiat el dimensionat del bucle MELISSA calculant el grau de tancament per a diversos elements en diferents escenaris, conclouent que:

La grandària dels bioreactors corresponents als compartiments III i IVa existents a la planta pilot de la UAB és adequada per avaluar el funcionament en interconnexió dels compartiments del bucle MELISSA a escala pilot, si es pren com a base de planta pilot el garantir l'aportació del 20% dels requeriments d'una persona.

La presència dels compartiments microbiològics, tot i no ser suficient per permetre l'autosuficiència de l'home a l'espai, és necessària per una òptima recirculació i reaprofitament dels elements que fan possible la vida humana.

L'anàlisi del tancament per un escenari amb persones demostra que els aspectes més importants que cal millorar, per tal de disminuir el volum i la massa dels equips necessaris, són un augment en l'eficiència de degradació del compartiment I i una optimització de l'aport lumínic dels compartiments fotosintètics: II i IVa.

Es necessita millorar el funcionament del primer compartiment, i/o trobar un procés alternatiu de recuperació de residus, per tal que el bucle MELISSA pugui ser viable garantint un grau de tancament elevat.

REFERÈNCIES

A

Abbott, B. J. i Clamen, A. (1973) The relationship of substrate, growth rate and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotech. Bioeng.* **15**, 117-127.

Albiol, J. (1994) Study of the MELISSA photoheterotrophic compartment. Kinetics and effects of C limitation. ESA/YCL/2148.JAS. ESA-EWP-1808.

Albiol, J., Gòdia, F., Cornet, J. F. i Gros, J. B. (1997) Model validation for growth kinetics of *R. rubrum* under limitation. *Proceedings of the Sixth European Symposium on Space Environmental Control Systems.*

Angelidaki I., Ellegaard, L. i Ahring B. K.(1993) A mathematical model for the dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotech. Bioeng.* **42**, 159-166.

Anthonisen, A., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. i Srinath, E. C. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal WPCF***48**, 835-852.

B

Bazin, M. J., Cox, D. J. i Scott, R. I. (1982) Nitrification in a column reactor: limitations transient behaviour and effect of growth on a solid substrate. *Soil Biol. Biochem.* **14**, 477-487.

Becker, E. W. (1994) Microalgae: biotechnology and microbiology. *Ed. Cambridge University Press.* Cambridge.

- Becker, E. W. i Venkatamaran, L. V.** (1984) Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass* **4**, 105-125.
- Binois C.** (1993) Description du modèle de controle. MELISSA Contract 8125/NL/FG. Technical Note 18.3.
- Blanch, H. W. i Clark, D. S.** (1996) Biochemical engineering. *Ed. Marcel Dekker, INC.* New York (Estats Units d'Amèrica).
- Bock, E.** (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter: II. Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* **108**, 305-312.
- Bock E., Koops H. P. i Harms H.** (1986) Cell biology of nitrifying bacteria. A: Nitrification. *Ed. Prosser IRL Press, Oxford.*
- Bock E., Wilderer, P. A. i Freitag, A.** (1988) Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Wat. Res.* **22**, 245-250.
- Bock E., Koops H. P., Harms H. i Ahtlers** (1991) The biochemistry of nitrifying organisms. A: Variations in autotrophic life. *Ed. Academic Press.* Editors: Shively J.M i Barton L.L. San Diego.

C

- Cabello, F.** (2000) Posada a punt d'un fotobioreactor per al cultiu de *Rhodospirillum rubrum* i estudi del comportament cinètic. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ciferri, O.** (1983) *Spirulina*, the Edible Microorganism. *Microbiological Rev.* **47**, 551-578.
- Clark, C. I Schmidt, E. L.** (1966) Effect of mixed culture *Nitrosomonas europaea* simulated by uptake and utilisation of pyruvate. *J ournal of Bacteriology* **91**, 1.
- Cloutier, G., Dixon, M., Hunter, J.B. i Olabi, A.** (2001) Area requirements for biomass production units (BPUs) including current MELISSA candidate crops Technical Note 46.2. ECT/FG/MMM/97.012.
- Comeau, Y., Hall K. H., Oldhan, W. K.** (1988) Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and poly- β -hydroxyvalerate (PHV) in activated sludge by liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology.* **54** (9) 2325-2327.
- Cornet, J.F. i Albiol, J.** (2000) Modelling photoheterotrophic growth kinetics of *Rhodospirillum rubrum* in rectangular photobioreactors. *Biotechnol. progr.* **16**, 199-207.
- Cornet, J. F., Dussap C. G. i Dubertret, G.** (1992 a) A structured model for simulations of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: I. Coupling between light transfer and growth kinetics. *Biotech. Bioeng.* **40**, 817-825.
- Cornet, J. F., Dussap C. G., Cluzel, P. i Dubertret, G.** (1992 b) A structured model for simulations of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotech. Bioeng.* **40**, 826-834.
- Cornet, J.F.** (1992 c) Etude cinétique et énergétique d'un photobioréacteur-Etablissement d'un modèle structuré; Applications à un écosystème clos artificiel. Tesis doctoral. Universitat de Paris-Sud, Orsay, França.
- Cornet, J. F., Dussap C. G. i Gros J. B.** (1993) Modelling of physical limitations in photobioreactors. Application to stimulation and control of the spirulina compartment of

the MELISSA artificial ecosystem. Technical Note 19.3. MELISSA CONTRACT PRF 130820.

D

Drysdale, A. E., Dooley, H. A., Knott, W. M., Sager, J. C., Wheeler, R. M., Stutte, G. W. i Mackowiak, C. L. (1994) A more completely defined CELSS. SAE Technical Paper Series 941292.

Drysdale, A.E., Levri, J.A. i Vaccari, D.A. (2000) Theory and Application of the Equivalent System Mass Metric. 30th International Conference on Environmental Systems. Toulouse. SAE Technical paper 2000-01-2395.

Durand-Chastel, H. i Clément, G. (1975) Spirulina algae: food for tomorrow. *Proceedings of the ninth international congress of nutrition* **3**, 85-90.

Durner, R., Zinn, M., Witholt, B. i Egli, T. (2001) Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotech. Bioeng.* **72**, 278-288.

E

Eckart, P. (1994) Life support and biospherics. *Herbert Utz Publishers*, München, Alemanya.

Eckart, P. (1999) System considerations for Long Duration Life Supportb- The Luna Base Example. Presentació oral. Workshop on Advanced Life Support. Nordwijk, Holanda.

F

Favier-Teodorescu, L., Pons, A., i Poughon, L. (1999) Stoichiometric analysis of *R. rubrum* growth on different carbon substrates. Technical Note 45.4. ESTEC/CONTRACT 13323/98/NL/MV.

Filali, R. i Dubertret, G. (1996) Growth capability of *Spirulina* on several nitrogen sources in the photosynthetic compartment of MELISSA. Technical Note 33.2. MELISSA. ESA-ESTEC/UNIVERSITE PARIS-SUD.

Forler, C. (1992) MELISSA: première étude du compartiment nitrificateur. CUST Clermont Ferrand. ESA/YCL 1567/CF.

Forler, C. (1994) Development of a fixed bed pilot reactor for a continuous axenic coculture of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*. ESA-X-997.

Fox, W. R. D. (1996) Spirulina production & potential. *Ed. Edisud*. Aix-en-Provence.

Fulget N. i Richalet J. (1993) MELISSA: first approach of model based predictive control of *Spirulina* compartment. MELISSA Contract PRF 132443. Technical Note 24.2.

Fulget N. (1995) Study for the non linear model based predictive control of *Spirulina* compartment using knowledge model strategy of control. MELISSA Contract PRF 142356. Technical Note 24.1.

G

Ganong, W. F. (1977) Review of medical physiology *Ed. Lange medical publications* New York (Estats Units d'Amèrica).

Gitelson, I. I., Kovrov, B. G., Lisovsky, G. M., Okladnikov, Y. N., Rerberg, M. S., Sidko, F. Y. i Terskov, I. A. (1975) Problemy kosmicheskoy niologii: experimental'nyye ekologicheskie sistemy vklyuchayushchiye cheloveka. *Ed. Nauka Press Moscow*. **28**, 1-312. NASA Technical Translation NASA-TT-F-16993.

Gitelson, I. I., Terskov, I. A., Kovrov, B. G., Lisovsky, G. M., Okladnikov, Y. N., Sidko, F. Y., Trubachev, I. N., Shillenko M.P., Alekseev S. S., Pankova, I. M. i Tirranen, L. S. (1989) Long term experiments on man's stay in biological life-support system. *Adv. Space Res.* **9**, 865-871.

Guerrero, M. G. i Lara, C. (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. In: The cyanobacteria. *Ed. Elsevier Science Publisher*. Amsterdam.

Gicqueau, B. (1993) MELISSA: culture continue de *Rhodobacter capsulatus*. Etude de sources carbonées et influence de la lumière. UTC Compiègne, Produits biologiques et alimentaires. ESA-953, YCL 1775. BG.

Guyton, A. C. (1986) Tratado de fisiología médica. *Ed. Nueva editorial interamericana*. 6^{ena} edició. Mexico city (Mèxic).

H

Hanaki, K., Wantawin, C. i Ohgaki, S. (1990) Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**, 297-302.

Hansen, T. A. i Gernerden, H. (1972) Sulphide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **86**, 49-56.

Hendrikus, J., Laambroek, H. J. i Gerards, S. (1992) Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed cultures. *Microbiology* **159**, 453-459.

Herbert, T. D., Phillips, P. J. i Strange, R. E. (1971) Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology* **5b**, 209-344.

Hermans V. i Demey D. (1998) Detailed characterisation of the thermophilic biodegradation process. Technical Note 41.2. MELISSA CONTRACT ETC/GF/MMM/97.012

Hermans V. i Demey D. (1999) MELISSA demonstration reactors. Technical Note 43.2. ESA Contract 12922/98/NL/MV.

Hermans, V. i Demey, D. (2001) Biodegradation of non edible parts of plants and bacterial biomass. Technical note 56.2. ESA contract 12922/98/NL/MV.

Hoare, D. S. (1963) The photo-assimilation of Acetate by *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* **87**, 284-300.

Hooper A.B. (1989) Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. A Autotrophic bacteria. *Ed. Science Tech. Pub.* Editors: Schegel, H.G. i Bowien B, Madison.

Hunik, J. H., Bos, C. G., Den Hoogen, M. P., De Gooijer, C. D. i Tramper, J. (1994) Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in K-carrageenan gel beads. *Biotech. Bioeng.* **43**, 1153-1163.

J

- Jassby, A.** (1988) *Spirulina*: a model for microalgae as human food. A: Algae and human affairs. Ed. Cambridge University Press. Melbourne.
- Jensen, S. i Knutsen, G.** (1993) Influence of temperature and photoinhibition on photosynthesis in *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* **5**, 495-504.
- JSC 39168, CTSD-ADV-348** (2002) Advanced Life Support Project Plan. NASA

K

- Kibe, S., Suzuki, K., Ashida, A. Otsubo, K. i Nitta, K.** (1997) Controlled Ecological Life Support System- Related Activities in Japan. *Life Support & Biosphere Science* **4**, 117-125.
- Kompatseva, E. I.** (1981) Utilization of sulfide by nonsulfur purple bacteria *Rhopseudomonas capsulata*. *Microbiologia* **50**, 429-436.
- Kowalski, E. i Lewandowski, Z.** (1983) Nitrification process in a packed reactor with chemically active bed. *Biotech. Bioeng.* **18**, 1249-1273.
- Krauss, R. W.** (1979) Closed ecology in space from a bioengineering perspective. *Life Science and Space Research* **17**, 13-25.
- Krümmel, A. i Harms, A.** (1982) Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **133**, 50-54.

L

- Lee, S.Y., Choi, J. i Wong, H.H.** (1999) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 31-36.
- Lenz, R.W., Gross, R.A., Fuller, R.F. i Brandl. H.** (1988) Bioresorbable polyesters from bacterial polymerization reactions. *Polymers in Medicine III*. Ed Elsevier Science, 19-26.
- Litchfield, J. H.** (1983) Single cell proteins. *Science* **219**, 740-746.

M

- Marti, A** (1997) Etude et modélisation du comportement de *Spirulina platensis* en photobioréacteur en condition de limitation par la lumière et la source de carbone. These Docteur d'Université. Université Blaise Pascal n° 231.
- Martiny, H. i Koops, H. P.** (1982) Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic, ammonia-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**, 327-336.
- Masot, A., Albiol. J. i Gòdia, F.** (2003) Higher plant chambers requirements document. Technical Note 65.5. ESTES/CONTRACT 13292/98/NL/MV.
- Matin, A.** (1978) Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 436-468.
- Meleshko, G.I., Sheelevel, Y.Y., Averner, M. i Volk, T.** (1991) Biological Life Support Systems. A "Space Biology and medicine" Editors: Nicogossian, A.E., Mohler,

S.R., Gazenco, O.G. i Grigoryev, A.I. *American Institute of Aeronautics Publishers*. 357-394.

Mergeay, M., Jansen P. i Kreps, S. (1990) MELISSA final report CCN1 and CCN2. ESTEC CONTRACT 8125/88/NL/FG.

Merrick, J.M. (1978) Metabolism of reserve material. A "The photosynthetic bacteria" Ed. Clayton R.K. i Siström W.R. *Plenum Press* 199-219.

Merrick, J.M., Steger, R. i Dombroski, D. (1999) Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 129-134.

Morist, A. (2000) Recuperació i preparació com aliment de *Spirulina platensis* produïda en un fotobioreactor. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona.

N

Nakhost, Z. i Karel, M. (1989) Potential utilization of algal protein concentrate as a food ingredient in space habitats. *Sci. Aliments* **9**, 491-506.

Nichols, B. W. i Woods B. J. B. (1968) The occurrence and biosynthesis of γ linoleic acid in a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Lipid* **3**, 46-50

Nitta, K., Otsubo, K. i Ashida, A. (2000) Integration test project of CEEF. A test bed for closed ecological life support systems. *Adv. Space. Res.* **2**, 335-338.

Noorman, H. (1991) Methodology on monitoring and modelling of microbial metabolism. PhD Tesis. Delft University of Technology. Delft (Holanda).

O

Ogawa, T. i Terui, G. (1970) Studies on the growth of *Spirulina platensis* (I). On the pure culture of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.* **48**, 361-367.

Osburg, J. I Messerschmid, E. (2000) Integrated Simulation of Synergistic Space Station Subsystems During the Conceptual Design Phase. 30th International Conference on Environmental Systems. Toulouse. SAE Technical paper 2000-01-2398.

P

Painter, H. A. (1986) Nitrification in the treatment of sewage and waste waters. In: Nitrification. Ed. IRL Press. Editors: Prosser J. I. Oxford.

Pérez, J. (1997) Caracterización y puesta a punto de reactores de lecho fijo para su aplicación en procesos de nitrificación. Treball de Màster. Universitat Autònoma de Barcelona.

Pérez, J. (2001). Utilizació de Nitrosomonas y Nitrobacter en forma de biopel·lícula para la nitrificación biológica en reactores de lecho fijo. PhD Tesis. Universitat Autònoma de Barcelona.

Poughon, L. (1996) Review of models and basis of a dynamic structured model of the nitrifying compartment. Technical Note 27.1. ESTEC CONTRACT ECT/FG/CB/95.205.

Poughon, L. (1997) Including of a higher plants chamber in the MELISSA loop. Description of a HPC for MELISSA loop steady state simulations. Technical Note 32.3. ESTEC CONTRACT ECT/FG/CB/95.205.

Prosser, J. I. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbial. Phys.* **30**, 125-177.

R

Riccardi, G., Sanangelantoni, A. M., Carbonera, D., Savi, A. i Cifferi, O. (1981) Characterization of mutants of *Spirulina platensis* resistant to amino acid analogues. *F.E.M.S. Microbiol. Lett.* **12**, 333-336.

Richmond, A. (1986) Principles of pond maintenance, in *Handbook of Microalgal Mass Cultures*. Ed. *CRC Press*. Boca Raton.

S

Samsonov, V.M., Kurmazenko, E.A., Farafonov, N.S. i Menkin, E.V. (2000) An Efficiency of Technologies and A Strategy for Synthesis of Integrated Life Support System Efficiency. 30th International Conference on Environmental Systems. Toulouse. SAE Technical paper 2000-01-2396.

Schuster A. (1905) Radiation through a foggy atmosphere. *Astrophys J.*, **21**, 1-22.

Smith, A. J. i Hoare, D. S. (1977) Specialist phototrophs, litotrophs and methylophototrophs: a unity among a diversity of procaryotes?. *Bacteriol. Rev.* **41**, 419-448.

Soong, P. (1980) Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: *Algae Biomass Production and use*. Ed. *Elsevier*. Amsterdam (Holanda).

Soyer, C. (1992) Étude d'une culture de *Spirulina platensis* sur un effluent du compartiment nitrifiant. Mémoire de DESS de microbiologie appliquée et génie biologique. Université Paris VI.

Souci, S. W., Fachmann, W. i Kraut, H. (1990) Food composition and nutrition tables 1989/1990. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart.

Steinmüller, W. i Bock, E. (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter: I. Mixotrophic growth. *Arch. Microbiol.* **108**, 299-304.

Suhaimi, M., Liessens, J. i Verstraete, W. (1987) NH_4^+ -N assimilation by *Rhodobacter capsulatus* ATCC 23782 grown axenically and non-axenically in N and C rich media. *J. App. Bacteriol.* **62**, 53-63.

T

Tamponnet, C. i Savage, C. (1994) Closed ecological systems. *Journal of Biological Education* **28**, 167-173.

Tamponnet, C., Savage, C., Amblard, P., Laserre, J.C., Personne, J.C. i German, J.C. (1999) Water recovery in space. *ESA bulletin*, **97**, 56-60.

Thermal Control & Life Support Division (1992) Life support and habitability manual. ESA-PSS-03-406. Ed ESA. ESTEC (Holanda).

Toki, A., Kosaka, S., Takama, N. i Nitta, K. (1994) Plant cultivation experiments for CEEF. SAE Technical Paper Series 941540.

Tortora, G. J. i Grabowski, S. R. (1992) Principles of anatomy and physiology. Ed. *HarperCollins College Publishers*. 7^{ena} edició. New York (Estats Units).

Tranquille, N., Emeis, J. J., de Chambure, D., Binot, R. A. i Tamponnet, C. (1994) *Spirulina* acceptability trial in rats. A study for the MELISSA life support system. *Adv. Space. Res.* **14**, 167-170.

V

- Vernerey, A.** (2000) Conception, contrôle et fonctionnement d'un photobioréacteur pour la culture en continu de la cyanobactérie *Spirulina platensis*. PhD Tesis. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Viprey, E.** (1994) MELISSA: *Rhodospirillum rubrum*. Etude de la limitation azotée. UTC Compiègne, Produits biologiques et alimentaires. ESA-X-1102.
- Vodovotz, Y.** (1998) Advanced life support systems at Johnson Space Center. Proceedings of International Comité for Material Circulation in Geo-hydrosphere and its Applications. Cultural Exchange Plaza, Rokkasko, Aomori, Japon. July 21-23.
- Von Puttkamer, J.** (1987) Der Mensch im Weltraum. Eine Notwendigkeit. Ed. UMSCHAU. Frankfurt.
- Vrati, S.** (1984) Single cell production by photosynthetic bacteria grown on the clarified effluent of biogas plant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 199-202.

W

- Watson S.W., Bock E., Valois, F.W., Waterbury, J.B. i Schlosser U.** (1986) *Nitrospira marina* gen. nov., sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Arch. Microbiol.* **144**, 1-7.
- Wijffels, R. H.** (1994) Nitrification by immobilized cells. Landbouwniversitet Wageningen. PhD thesis.
- Wijffels, R. H, Shepers, A. W., Smit, M., de Grooijer, C. D. i Tramper, J.** (1994) Effect of initial biomass concentration on the growth of immobilized *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 153-157.
- Williams, S.F., Martin, D.P., Horowitz, D.M. i Peoples, O.P.** (1999) PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *International Journal of Biological macromolecules* **25**, 111-121.
- Wouters, J.** (1969) Influence of mineral surroundings on the weightable yield and the spectrum of aminoacids of *Spirulina platensis*. *Ann. Physiol. Veg.* **14**, 85-105.
- Wydeven, T., Tremor, J., Koo, C. i Jacques, R.** (1989) Sources and processing of CELSS wastes. *Adv. Space Res.* **9**, 885-897.

Z

- Zarrouk, C.** (1966) Contribution a l'étude d'une cyanophyceé: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance de *Spirulina maxima*. Université de Paris. PhD thesis.
- Zeghal, S.** (1992) Nitrification compartment. Technical Note 1. ESA-MELISSA Contract PRF 310882.

ANNEX I.- Materials i mètodes

A.1.- SOQUES

La soca de *Rhodospirillum rubrum* utilitzada per a la realització dels cultius en el segon compartiment és la soca ATCC 25903, obtinguda de l'American Type Culture Collection.

Les soques emprades per a la realització dels cultius en el tercer compartiment, que procedeixen directament de l'American Type Culture Collection, són *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), bacteri capaç d'oxidar amoni a nitrit, i *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25391), bacteri capaç d'oxidar nitrit a nitrat.

La soca de *Spirulina platensis* utilitzada per a la realització dels cultius en el compartiment IVa, és la soca PCC 8005 (*Arthrospira platensis*) que prové de l'Institut Pasteur.

A.2.- MEDIS

A.2.1.- Medi per *R. rubrum*

El medi emprat per fer créixer *R. rubrum* és un medi basat en la mescla de sals basals de Segers i Verstrate, descrita per Suhaimi i col·laboradors (Suhaimi *et al.*, 1987), que conté àcid acètic com a font de carboni, biotina com a única vitamina i on s'ha disminuït la concentració de fosfats als següents nivells: KH_2PO_4 0.49 g/L, K_2HPO_4 0.52 g/L. Aquest medi es presenta a la taula A.1, on la composició de les solucions elements traça i biotina es troba a les taules A.2 i A.3.

A.2.2.- Medi per *N. europaea* i *N. winogradskyi*

El medi emprat per fer créixer *N. europaea* i *N. winogradskyi* està basat en un medi adaptat al creixement de *N. europaea* (Wijffels, 1994) i un medi adaptat al creixement de *N. winogradskyi* (Hendrikus *et al.*, 1992; Wijffels *et al.*, 1994). Aquest medi està descrit per Pérez (1997) i es presenta a la taula A.4.

Medi <i>R. rubrum</i>	
<i>Compost</i>	<i>g/L medi</i>
CH ₃ COOH	2.502
EDTA-Na·2 H ₂ O	0.020
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0.010
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.020
KH ₂ PO ₄	0.200
NaHCO ₃	0.250
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.200
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.050
(NH ₄)Cl	0.761
K ₂ HPO ₄	0.300
Na ₂ SO ₄	0.538
<i>Dissolució</i>	<i>mL/L medi</i>
Elements traça	1.0000
Biotina	1.0000

Taula A.1.- Composició del medi usat per *R. rubrum*. La composició de les solucions d'elements traça i biotina es troba a les taules A.2 i A.3.

Elements traça	
<i>Component</i>	<i>g/L</i>
NiSO ₄ ·6 H ₂ O	0.005
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0.005
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.005
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.001
CoCl ₂ ·2 H ₂ O	5e-4
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	5e-5
H ₃ BO ₃	0.001
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	5e-4

Taula A.2.- Composició de la solució d'elements traça

Biotina	
<i>Component</i>	<i>g/L</i>
Biotina	0.015

Taula A.3.- Composició de la solució de biotina

Medi <i>N. europaea</i> i <i>N. winogradskyi</i>	
<i>Compost</i>	<i>g/L medi</i>
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	2.5E-3
KH ₂ PO ₄	0.680
NaHCO ₃	0.800
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.052
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	7.4E-4
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.320
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	4.0E-6
Na ₂ HPO ₄	0.710
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	4.3E-6
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4 H ₂ O	0.177

Taula A.4.- Composició del medi usat per fer créixer *N. europaea* i *N. winogradskyi*

A.2.3.- Medi per *S. platensis*

El medi usat pel cultiu de *S. platensis* és la barreja de sals basals descrita per Zarrouk (1966). Aquest medi es presenta a la taula A.5 i la composició de les solucions A5 i B6 es presenten a les taules A.6 i A.7.

A.3.- PROCEDIMENTS ANALÍTICS

A.3.1.- Mesura de la concentració de cèl·lules

Pes sec

Per determinar el pes sec de *R. rubrum*, es filtra un volum conegut de mostra a través d'un filtre de 0.22 µm, que ha estat prèviament pesat, s'asseca fins a pes constant en una mufla a 100°C i es deixa refredar en un dessecador fins a assolir la temperatura ambient. Posteriorment es procedeix a la pesada.

Per determinar el pes sec de *S. platensis*, el procediment seguit és igual a l'anterior però emprant un filtre de 0.40 µm

Medi <i>S. platensis</i>	
<i>Component</i>	<i>g/L</i>
NaNO ₃	2.500
EDTA-Na ₂	0.080
NaCl	1.000
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.010
Na ₂ CO ₃	7.600
NaHCO ₃	10.800
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.200
CaCl ₂	0.040
K ₂ HPO ₄	0.500
K ₂ SO ₄	1.000
<i>Dissolució</i>	<i>mL/L</i>

A5	1.0000
B6	1.0000

Taula A.5.- Composició del medi usat per fer créixer *S. platensis*. La composició de les solucions A5 i B6 es troba a l'apartat 3.1.2

A5	
<i>Component</i>	<i>g/L</i>
H ₃ BO ₃	2.860
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1.810
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.222
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.079
MoO ₃	0.015

Taula 3.2.- Composició de la solució A5

B6	
<i>Component</i>	<i>g/L</i>
NH ₄ VO ₃	0.023
KCr(SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O	0.096
NiSO ₄ ·7 H ₂ O	0.048
(NO ₃) ₂ Co·6 H ₂ O	0.049
Na ₂ WO ₄ ·2 H ₂ O	0.018
Ti(SO ₄) ₂ +TiOSO ₄	0.048

Taula 3.3.- Composició de la solució B6

Densitat òptica

La mesura de densitat òptica a 700nm per *R. rubrum* i a 750nm per *S. platensis* dona una mesura de la concentració cel·lular. A aquestes longituds d'ona no absorbeixen ni els polisacàrids ni els bacteris corresponents. Així doncs, aquesta mesura reflecteix únicament la difusió de la llum pels microorganismes, que és proporcional a la concentració de cèl·lules presents en el cultiu. Les mesures de densitat òptica s'han realitzat amb un espectrofotòmetre (Kontron Instrument, Uvikon 941, Milà, Itàlia)

A.3.2.- Mesura de les concentracions d'ions nitrats, nitrits i d'amoni en solució

Nitrats

L'equip d'anàlisi emprat (Dr. Lange test LCK 339, Berlin, Alemanya) és un mètode colorimètric d'anàlisi de concentracions de nitrats.

Principi: Els ions nitrat, en solucions que contenen àcid sulfúric i fosfòric, reaccionen amb el 2,6-dimetilfenol per formar 4-nitro-2,6-dimetilfenol, que es quantifica mesurant l'absorbància a 370 nm.

Nitrits

L' equip d'anàlisi usat (Dr. Lange test LCK 341, Berlin, Alemanya) és un mètode colorimètric d'anàlisi de concentracions de nitrits.

Principi: Els ions nitrit, en solucions àcides, reaccionen amb amines aromàtiques primàries per formar sals de diazoni, que es quantifiquen mesurant l'absorbància a 524 nm.

Amoni

L' equip d'anàlisi emprat (Dr. Lange test LCK 305, Berlin, Alemanya) és un mètode colorimètric d'anàlisi de concentracions de nitrits.

Principi: Els ions amoni reaccionen amb ions hipoclorit i saliciat en presència de nitroferrocianida, que actua com a catalitzador, (pH=12.6) per formar blau de iodofenol. Aquest es quantifica mesurant l'absorbància a 694 nm.

A.3.3.- Mesura de l'àcid acètic present en solució

La concentració d'àcid acètic es segueix mitjançant cromatografia en fase líquida d'alta resolució (HPLC) (Hewlett Packard (HP) 1050 amb una columna de bescanvi iònic Aminex HPX-87H i un detector d'índex de refracció HP 1047 A).

La fase mòbil usada és àcid sulfúric 0.015M preparat amb aigua Milli-Q (resistència 18.2 Ω), i filtrant a través d'una membrana de 0.45 μm . El cabal de la fase mòbil usat és de 0.6 mL/min, essent el volum d'injecció de 20 μL i el temps d'anàlisi de 30 min.

S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.4.- Mesura del carboni inorgànic present en solució

El carboni inorgànic total s'ha mesurat mitjançant un analitzador (O.I Corporation, 700 TOC analyser, Texas, Estats Units). Es tracta d'un sistema totalment automàtic que analitza mostres tant líquides com sòlides. El carboni inorgànic total (TIC) es defineix com el carboni que es converteix en CO_2 després de l'acidificació de la mostra. Inclou el CO_2 en solució, els carbonats i els bicarbonats.

Principi: El TIC es determina per la mesura del CO_2 alliberat en produir una acidificació de la mostra. El descens del pH provoca la conversió dels ions carbonats, bicarbonats a CO_2 en solució. Aquest CO_2 es purga de la solució, es concentra per atrapament, es desorbeix i es vehicula a un analitzador infraroig no dispersiu que està calibrat per donar directament la massa de CO_2 detectada.

S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.5.- Determinació de la concentració total de carbohidrats en una mostra de biomassa

La concentració de sucres totals es determina seguint el mètode proposat per Herbert *et al.* (1971).

Principi: S'hidrolitzen els polisacàrids a monosacàrids escalfant en presència d'àcids. Els monosacàrids obtinguts són derivats del furfural (pel cas de les pentoses) i derivats del hidroximetilfurfural (pel cas de les hexoses). Aquests compostos reaccionen amb

fenol formant un compost colorat que es pot mesurar per absorbància (Herbert *et al.*, 1971).

S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.6.- Determinació de la concentració de lípids en una mostra de biomassa

Aquestes analítiques han estat realitzades pel Servei d'Anàlisi Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Principi: La determinació d'àcids grassos es realitza per transesterificació dels àcids amb BF_3 en medi metanol. A la mostra s'addiciona BF_3 i metanol i es manté a reflux a 95°C durant 20 min. Transcorregut aquest temps s'afegeix aigua i hexà a la mescla de reacció i es fa una extracció líquid-líquid durant 2 min. Tota la mescla es centrifuga, separant-ne la fracció orgànica, que és la que conté els àcids metilats. Aquesta s'injecta al cromatògraf de gasos (HP 6890 amb una columna HP-5) acoblat a un espectòmetre de masses (HP 5973), per tal de fer-ne la determinació i quantificació. S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.7.- Determinació de la concentració de proteïnes en una mostra de biomassa

Per mesurar la concentració de proteïnes s'ha usat el mètode de Lowry modificat per Herbert *et al.* 1971.

Principi: Aquest mètode es basa en extreure i solubilitzar les proteïnes mitjançant un tractament amb sosa i tartrat. Aquestes, un cop solubilitzades redueixen el reactiu de Folin-Ciocalteu per formar blau de molibdè, que es pot detectar colorimètricament. S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.8.- Determinació de la concentració de DNA en una mostra de biomassa

Per a la determinació d'àcids nucleics cal tractar prèviament la mostra amb àcid per tal d'extreure els components moleculars de baix pes molecular. Posteriorment, s'extreuen els seus components solubles en dissolvents orgànics (lípids i pigments). El "pellet" obtingut conté àcids nucleics, proteïnes i carbohidrats. El DNA es solubilitza en HClO_4 i es quantifica colorimètricament després de fer-lo reaccionar durant 16-20 h a 30°C amb difenilamina sobre àcid acètic i gotes de sulfúric (Herbert *et al.*, 1971). S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.9.- Determinació de la concentració de RNA en una mostra de biomassa

El tractament inicial de la mostra per poder determinar l'RNA és el mateix que per determinar DNA. Es parteix d'un "pellet" que conté àcids nucleics, proteïnes i carbohidrats. L'RNA s'extreu tractant aquest pellet amb KOH durant 18-24 h a 30°C i, posteriorment, acidificant amb HClO_4 fred. L'RNA es quantifica colorimètricament després de fer-lo reaccionar durant 35 min. en aigua bullint amb un reactiu amb orcinol i cúpric (Herbert *et al.*, 1971). S'usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.10.- Determinació de la concentració de PHB en una mostra de biomassa

Per determinar PHB cal rentar prèviament la mostra amb aigua, acetona i etanol. El PHB es pot determinar colorimètricament extraient-lo del “pellet” obtingut del tractament previ amb cloroform i fent-lo reaccionar amb àcid sulfúric en aigua bullint durant 10 minuts (Comeau *et al.*, 1988). S’usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.11.- Determinació de la concentració de glicogen en una mostra de biomassa

El glicògen s’extreu de la mostra fent-lo reaccionar amb HCl en aigua bullint durant 1 h per obtenir glucosa. Aquesta es determina posteriorment per assaig enzimàtic utilitzant un analitzador de glucosa (Herbert *et al.*, 1971). S’usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.12.- Determinació de la concentració de metalls

Aquestes analítiques han estat realitzades pel Servei d’Anàlisi Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Mostres sòlides de biomassa

0.3 g de mostra son pre-digerits durant 12 h amb 6 mL d’ HNO₃. Posteriorment es duu a terme la digestió en un microones analític escalfant la mostra fins a 170°C. L’escalfament es fa de manera gradual i la temperatura desitjada s’obté després de 4 min. Després es torna a realitzar un altre escalfament gradual que dura 3.5 min, fins a 180°C. Un cop assolits els 180°C, aquesta temperatura es manté durant 10 min. Les solucions obtingudes es dilueixen amb aigua milli-Q fins als 100 mL i es filtren. Els 5 elements (Na, K, Mg, Ca i P) s’analitzen directament d’aquestes solucions usant espectroscopia d’emissió per plasma d’acoblament inductiu (ICP-OES). Els altres elements (B, Mn, Fe, Ni, Cu i Zn) son analitzats de solucions 2/10 (2/100 en el cas del Fe) usant espectroscòpia de masses per plasma d’acoblament inductiu (ICP-MS). S’usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

Mostres líquides

Les mostres líquides son filtrades previ anàlisi. El Na, K i Ca s’analitzen mitjançant ICP-OES de dilucions 1/10 o 1/100. Els altres elements (Mg, B, P, Mn, Fe, Ni, Cu i Zn) s’analitzen mitjançant ICP-MS diluint la mostra 1/100. S’usen patrons externs per tal de quantificar les mostres.

A.3.13.- Determinació de la composició de C, N, H, S cel·lular

Aquestes analítiques han estat realitzades pel Servei d’Anàlisi Química de la Universitat Autònoma de Barcelona

La tècnica de microanàlisi elemental orgànica per a la determinació de N,C,H,S està basada en la combustió de la mostra dins una càpsula de Sn en atmosfera d’O₂ en un forn a 1000 °C. En aquestes condicions:

Els components orgànics de la mostra es transformen en els òxids corresponents, així s’obté una mescla CO₂, N₂,N_xO_y, H₂O, SO₂, SO₃ en estat gasós.

L'Sn es transforma en SnO₂(s), reacció exotèrmica que donarà al conjunt de la càpsula una temperatura de fins 1800 °C. El SnO₂ restarà dipositat com a sòlid en la zona de combustió.

Els components inorgànics de la mostra resten sovint com a òxids sòlids també dipositats en la zona de combustió.

Els gasos formats i l'excés d'O₂ son arrossegats amb He (gas portador) dins un reactor carregat amb WO₃ que provoca la transformació de l'anterior mescla a espècies úniques per a cada element, tot obtenint-se CO₂, N₂, H₂O, SO₂ i l'excés d'O₂ i He.

La mescla es condueix cap una altra part del reactor a 500 °C que conté Cu₀ que reaccionarà amb l'excés d'O₂ (formació de CuO(s)) tot eliminant-lo.

Els gasos restants CO₂, N₂, H₂O, SO₂ son transportats per l'He cap una columna de cromatografia de gasos (de farciment, Porapak) on es separen i a continuació són dirigits cap un detector de conductivitat tèrmica, el qual registra un senyal proporcional a la quantitat d'analit.

La quantificació es fa per calibració externa amb patrons adients.

A.3.14.- Control de l'axenicitat del cultiu

Es va comprovar l'absència de microorganismes contaminants en el brou de cultiu i el medi d'entrada de cada compartiment mitjançant una observació directa amb microscopi (ZEISS AXIOSKOP).

ANNEX II.- Publicacions derivades d'aquesta tesi

Publicacions científiques internes de caràcter confidencial:

Albiol, J., Creus, N., Pérez, J., J. Montràs, A., Masot, S. i Gòdia, F. (2002) Pilot Plant liquid loop review. Technical Note 62.3. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Cabello, F., Creus, N., Albiol, J. i Gòdia, F. (2002) Photoheterotrophic compartment. Light limitation. Technical Note 37.7. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Creus, N., Albiol, J. i Gòdia, F. (1999) Preliminary connection between 3 compartments. Technical Note 43.8. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Creus, N., Albiol, J. i Gòdia, F. (2001) Tests with the 3 linked bench compartments. Technical Note 47.5. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Creus, N., Pérez, J., Mengual J., Montesinos J.L., Albiol, J. i Gòdia, F. (2001) Connection of compartments III and IV at pilot scale. Technical Note 47.6. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Creus, N., Albiol, J. i Gòdia, F. (2002) Tests with the 3 linked bench compartments using 3 different carbon sources. Technical Note 52.6. ESTEC/CONTRACT 13292/98/NL/MV.

Creus, N., Albiol, J. i Gòdia, F. (2002) Bench scale loop tests using artificial medium and compartment I output medium. Technical Note 66.2. ESTEC/CONTRACT 13292/98/NL/MV.

Creus, N., Montràs, A., Masot, S., Pérez, J., Albiol, J. i Gòdia, F. (2002) Pilot design of the MELISSA solid loop. Technical Note 62.5. ESTEC/CONTRACT 13292/98/NL/MV.

Gòdia, F., Albiol, J., Creus, N., Pérez, J. (2001) Preliminary review of the pilot plant integration loop. Technical Note 47.3. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Pérez, J., Albiol, J., Creus, N., J. Montràs, A., Masot, S. i Gòdia, F. (2002) Pilot Plant gas loop review. Technical Note 62.4. ESTEC/CONTRACT13292/98/NL/MV.

Publicacions internacionals:

Albiol J., Gòdia F., Montesinos J. L., Pérez J., Vernerey A., Cabello F., Creus N., Morist A., Mengual X. i Lasseur Ch. (2000) Biological Life Support System Demonstration Facility: The Melissa Pilot Plant. SAE paper 2379. *30th International Conference on Environmental Systems*, Toulouse, France.

Creus, N., Cabello, F., Pérez, J., Albiol, J., Gòdia, F. i Lasseur, Ch. (2001) Connection between different compartments of the MELISSA biological life support system. *31st International Conference on Environmental Systems*, Orlando, USA.

Gòdia, F., Albiol, J., Montesinos, J.L., Pérez, J., Creus, N., Cabello, F., Mengual, X., Montràs A. i Lasseur Ch. (2002) MELISSA: a loop of interconnected bioreactors to develop life support in Space *Journal of Biotechnology* **99** (3), 319-330.

Gòdia, F., Albiol, J., Pérez, J., Creus, N., Cabello, F., Montràs A., Masot, A. i Lasseur Ch. (2003) The MELISSA pilot plant facility as an integration test-bed for advanced life support systems *Adv. in Space Research* (**en premsa**).