

3.- CONNEXIÓ DELS COMPARTIMENTS II, III I IVA A ESCALA DE LABORATORI

3.1.- Connexió preliminar dels compartiments II, III i IVa a escala de laboratori

En aquest apartat es planteja la connexió preliminar dels compartiments II, III i IVa del bucle MELISSA a escala de laboratori. Inicialment s'estudia aquesta connexió utilitzant només àcid acètic com a font de carboni del segon compartiment. Estudis previs demostren que *Nitrosomonas europaea* i *Nitrobacter winogradskyi* poden créixer en el medi resultant d'haver fet créixer *Rhodospirillum rubrum* i que *Spirulina platensis* pot créixer en el medi resultant d'haver fet créixer *N. europaea* i *N. winogradskyi* (Mergeay *et al.*, 1990). Ara bé, aquests estudis s'han fet en petits erlenmeyers i en discontinu. El següent pas constitueix en estudiar si, a llarg termini i en continu, s'observen efectes nocius o tòxics en connectar aquests tres compartiments.

3.1.1.- Equips i procediment experimental

El muntatge experimental consisteix en posar a punt tres bioreactors, un per cada compartiment, i els equips de separació necessaris per interconnectar-los. En aquest apartat es dóna una descripció detallada de cada compartiment i dels diferents passos requerits per la seva connexió. A la figura 3.1 es presenta un esquema d'aquest muntatge.

- Compartiment II

Pel cultiu de *R. rubrum* es disposa d'un bioreactor de tanc agitat de 3 litres de volum total, 2.4 L volum útil (APPLIKON). L'agitació que assegura una mescla perfecta és mecànica i consta de dues pales Rushton disposades en un eix central (APPLIKON ADI 101).

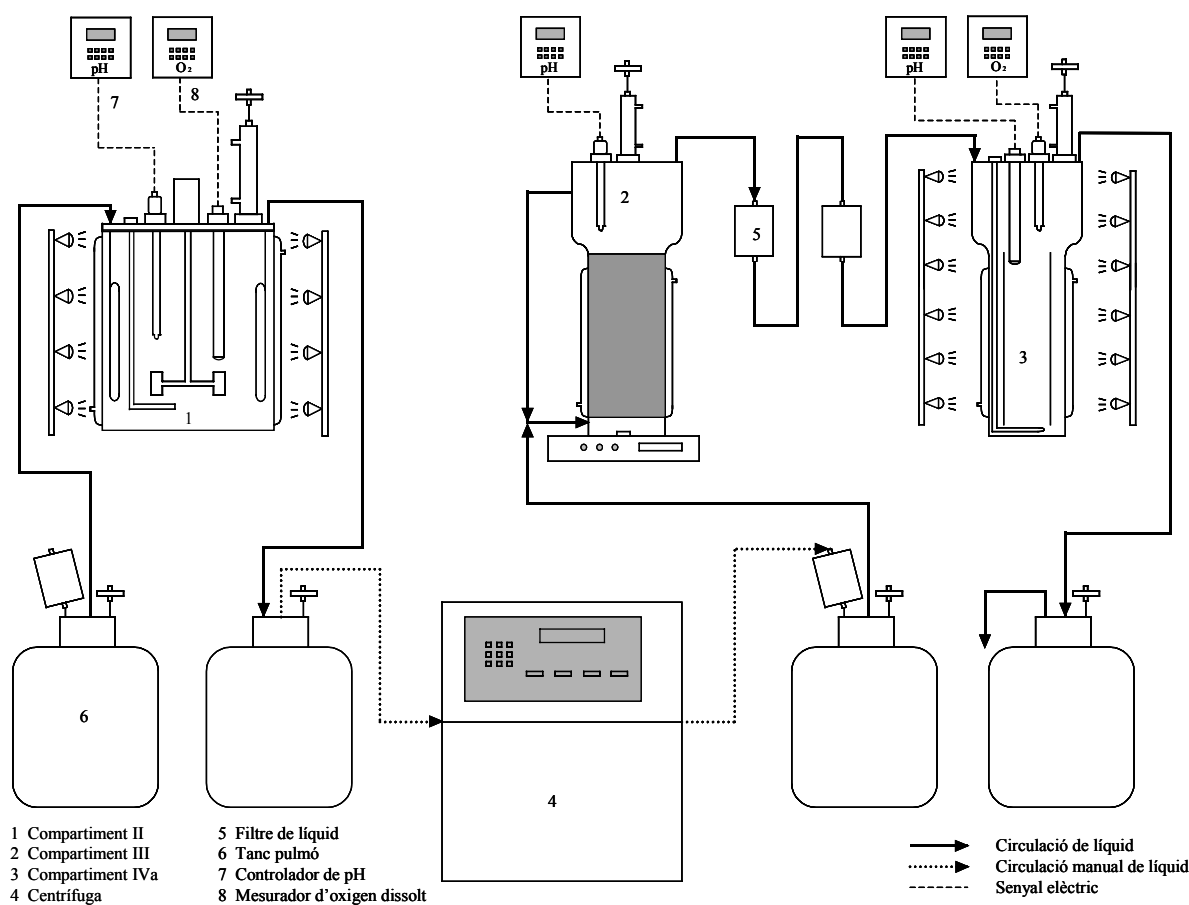


Figura 3.1.- Esquema del muntatge experimental per estudiar la connexió dels compartiments II, III i IVa a escala de laboratori

El pH òptim i la temperatura òptima de creixement d'aquest microorganisme són 6.8 i 30°C, respectivament. Per tal d'assegurar que el reactor es trobi sempre en aquestes condicions es fa servir un controlador autònom de pH (METTLER TOLEDO PH2100) que regula el pH mitjançant l'addició d'àcid (HCl 0.5M) o de base (NaOH 0.5M). La sonda de pH es calibra abans d'autoclavar el reactor seguint un protocol estàndard. Un bany (FRIGITERM, SELECTA) que fa circular aigua a través de la camisa externa del reactor, permet mantenir la temperatura de treball desitjada de manera constant i independent del grau d'il·luminació.

R. rubrum treballa fotosintèticament quan no té oxigen com a acceptor d'electrons, és a dir, quan es troba en condicions anaeròbies. Aquestes condicions s'assoleixen bombollejant He al reactor. L'absència d'oxigen es segueix mesurant l'oxigen dissolt amb un analitzador d'oxigen (INGOLD O₂ amplifier Type 170% O₂). Abans de començar els experiments es calibra la sonda d'oxigen en condicions operacionals fent servir un protocol estàndard.

La il·luminació del bioreactor s'aconsegueix disposant radialment un conjunt de 15 bombetes halògenes (SYLVANIA Halogen –Professional de luxe-, 12V, 20W, φ50mm) distribuïdes en 10 columnes que contenen 1 o 2 bombetes alternativament. L'energia elèctrica necessària la donen dues fonts d'alimentació de 35V-18A. La intensitat de la llum que il·lumina el bioreactor es modifica variant el voltatge subministrat a les

bombetes. El calibratge de la intensitat de la llum (W/m^2) al centre del reactor, en funció del voltatge subministrat a les bombetes, s'especifica a continuació:

La determinació de la disponibilitat de la llum és de gran importància en el funcionament dels fotobioreactors, aquesta es determina coneixent la intensitat de llum a la superfície del reactor.

Mitjançant un sensor que mesura la intensitat de llum a l'eix central del reactor, integrant la llum que arriba a la seva superfície esfèrica, pot determinar-se la intensitat de llum a la superfície del reactor. La conversió de la intensitat de llum mesurada pel sensor a intensitat de llum que arriba a la superfície del reactor pot fer-se mitjançant l'equació 3.1

$$Fr = \frac{Eb \cdot rb}{\pi \cdot Rb} \quad (3.1)$$

On: Fr és el flux de llum a la superfície del bioreactor
 Eb és la intensitat de llum mesurada pel sensor
 rb és el radi del sensor (30mm).
 Rb és el radi del bioreactor (64mm)

La llum és mesurada pel sensor en unitats de $\mu\text{mols}/m^2s^2$. Per tal de poder aplicar el model de transferència de llum desenvolupat per aquest compartiment (Albiol *et al.*, 1997, Cornet i Albiol, 2000) és necessari convertir aquestes mesures a W/m^2 . El coeficient de conversió usat, calculat per Cornet 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.

Els valors d'Eb són obtinguts per a diferents voltatges subministrats a les bombetes i a diferents posicions verticals al llarg de l'eix central del reactor. Aquestes mesures es duen a terme amb el reactor buit i fent circular aigua a través de la camisa externa del reactor. Calculant la mitjana de les mesures obtingudes per cada voltatge subministrat s'obté la relació: intensitat mitjana de llum incident al reactor/voltatge subministrat. Aquesta relació es presenta a la figura 3.2.

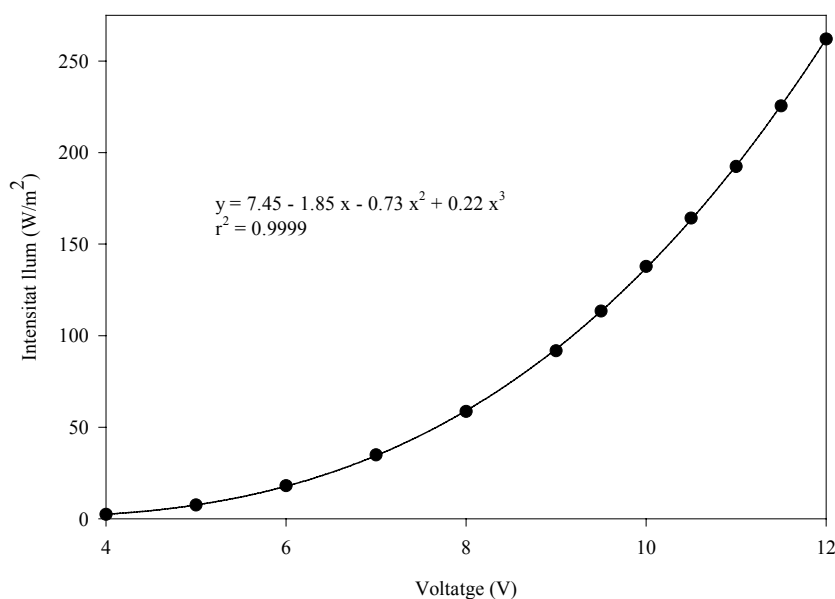


Figura 3.2.- Intensitat de llum mitjana que arriba al segon compartiment en subministrar diferents voltatges a les bombetes

A la figura 3.3 es presenta una fotografia del muntatge d'aquest bioreactor.



Figura 3.3.- Fotografia del muntatge del compartiment II

- Connexió entre els compartiments II i III

Tenint en compte que el segon compartiment és un bioreactor de tanc agitat i que, per tant, la sortida conté cèl·lules en suspensió, cal afegir una etapa de separació que elimini les cèl·lules del medi i que permeti l'entrada d'aquest al tercer compartiment. En el disseny final, les cèl·lules separades en aquesta unitat s'han de recuperar i sotmetre als tractaments necessaris per a emprar-les com a aliment. Aquesta separació s'aconsegueix mitjançant un procés de centrifugació. Els volums diaris a centrifugar són massa petits per poder usar una centrífuga en continu, per tant, s'utilitza una centrífuga en discontinu a 10000 rpm, 4°C durant 20 min (beckman j2-21 m/e). Tenint en compte que el procés de centrifugació és en discontinu, es necessiten dos tancs pulmó, un a la sortida del segon compartiment i l'altre a l'entrada del tercer. Aquests tancs permeten emmagatzemar el líquid efluent del segon compartiment per la seva posterior centrifugació i emmagatzemar el medi, ja lliure de cèl·lules, que posteriorment s'alimenta al tercer compartiment. Aquest procés de centrifugació es fa diàriament ja que s'ha vist que la qualitat de la biomassa empitjora de manera significativa quan s'emmagatzema a temperatura ambient durant un període més llarg (Morist, 2000).

Per assegurar l'entrada de medi estèril i lliure de cèl·lules, el medi s'esterilitza un cop centrifugat fent-lo passar per dues etapes de filtració. Cada etapa de filtració consta d'un filtre de líquid de 0.22µm (MILLIPORE OPTICAP™ 4”).

- Compartiment III

Es disposa d'una columna empacada per dur a terme el procés de nitrificació i desnitrificació per mitjà de l'activitat de *N. europaea* i *N. winogradskyi*. S'ha escollit aquest tipus de reactor degut a les baixes velocitats de creixement d'ambdós microorganismes, que aconsellen tenir la massa cel·lular immobilitzada per tal de poder

dur a terme els processos de nitrificació de manera ràpida i eficient, com ja s'ha descrit prèviament (Pérez, 1997 i 2001). El volum de líquid de la columna és de 0.475L i el suport utilitzat, boletes de poliestirè, s'anomena comercialment Biostyr.

El pH òptim per *N. europaea* i *N. winogradskyi* es troba a 8.2. Per controlar el pH en el reactor es fa servir un controlador autònom de pH (CRISON pH/mV 252) que regula el pH mitjançant l'addició d'àcid (CO_2) o de base (Na_2CO_3 40g/L). La sonda de pH es calibra abans de començar l'esterilització química del reactor seguint un protocol estàndard. La temperatura del reactor es regula a 30°C, temperatura òptima de creixement d'aquests microorganismes, mitjançant un bany (TECTRON BIO, SELECTA) que fa circular aigua a la temperatura desitjada a través de la camisa externa del reactor.

N. europaea i *N. winogradskyi* són microorganismes aerobis que consumeixen CO_2 com a font principal de carboni. L'entrada d'oxigen i CO_2 s'aconsegueix airejant el reactor a través d'un difusor metàl·lic. El cabal d'aireació emprat és 75 mL/min. Per assegurar una bona mescla entre l'entrada i la recirculació es disposa d'agitació magnètica (30 rpm). El cabal de recirculació és de 8.3 mL/min.

Tenint en compte que la llum inhibeix el creixement dels microorganismes emprats, es cobreix la columna amb paper d'alumini. A la figura 3.4 es presenta una fotografia del muntatge d'aquest bioreactor.



Figura 3.4.- Fotografia del muntatge del compartiment III

- Connexió entre els compartiments III i IVa

La connexió entre aquests dos compartiments es fa de manera directa afegint dues etapes de filtració (filtres de líquid MILLIPORE OPTICAP™ 4”) per tal d'eliminar les cèl·lules lliures a la sortida del tercer compartiment. En aquest cas no es requereix cap

etapa de centrifugació ja que la utilització d'un reactor amb cèl·lules immobilitzades redueix molt la quantitat de cèl·lules lliures a la sortida d'aquest. Un dels filtres es posa a la sortida del tercer compartiment i l'altre a l'entrada del quart. D'aquesta manera es tenen ambdós compartiments aïllats, permetent la desconnexió en cas de que sigui necessària.

- Compartiment IVa

Pel cultiu de *S. platensis* es disposa d'un reactor tipus "air-lift" de 3 L de volum total, 2.75-2.5 L de volum útil, amb un cilindre de vidre intern que separa les seccions "riser" i "downcomer". L'entrada de la fase gasosa al "riser" provoca una diferència de densitats al medi del "riser" respecte al del "downcomer", mesclant el líquid del reactor. El pH òptim i la temperatura òptima de creixement d'aquest microorganisme són 9.5 i 36.5°C, respectivament. Per tal d'assegurar que el reactor es trobi sempre en aquestes condicions es fa servir un controlador autònom de pH (METTLER TOLEDO PH2100) que regula el pH mitjançant l'addició d'àcid (HCl 0.5M) o de base (NaOH 0.75M). La sonda de pH es calibra abans d'autoclavar el reactor seguint un protocol estàndard. Un bany (HAAKE GH), que fa circular aigua a la temperatura desitjada a través de la camisa externa del reactor, manté el cultiu a 36.5°C.

S. platensis és un cianobacteri fotosintètic, un dels productes del metabolisme del qual és O₂. Per tant, un dels valors importants a monitoritzar és la presència d'oxigen en el reactor. L'oxigen dissolt es mesura amb un analitzador d'oxigen (INGOLD O₂ amplifier Type 170% O₂). Abans de començar els experiments es calibra la sonda d'oxigen, en condicions operacionals, fent servir un protocol estàndard.

La il·luminació del bioreactor s'aconsegueix disposant radialment un conjunt de 25 bombetes halògenes (SYLVANIA Halogen –Professional de luxe-, 12V, 20W, φ50mm) distribuïdes en 5 columnes que contenen 5 bombetes cadascuna. L'energia elèctrica necessària la dóna una font d'alimentació de 15V-40A. La intensitat de la llum que il·lumina el bioreactor es modifica variant el voltatge subministrat a les bombetes. El calibratge de la intensitat de la llum (W/m²) al centre del reactor, en funció del voltatge subministrat a les bombetes, es fa pel mateix procediment descrit anteriorment pel segon compartiment. En aquest cas, de l'equació 3.1, R_b, el radi del fotobioreactor és de 60 o 40 mm, depenent de la part de la columna on es mesuri i el factor de conversió, calculat per Cornet i col·laboradors (Cornet *et al.*, 1992 a i b) 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 3.5 es presenta la relació: intensitat mitjana de llum incident al reactor/voltatge subministrat.

A la figura 3.6 es presenta una fotografia del muntatge d'aquest bioreactor.

3.1.2.- Elaboració del medi de cultiu

Per realitzar la connexió entre els tres compartiments es requereix un medi que contingui tots els elements necessaris per fer créixer *R. rubrum*, *N. europaea*, *N. winogradskyi* i *S. platensis*. El medi utilitzat és una combinació dels medis usats per créixer aquests microorganismes per separat en cadascun dels compartiments, medis que es presenten a l'annex corresponent a materials i mètodes.

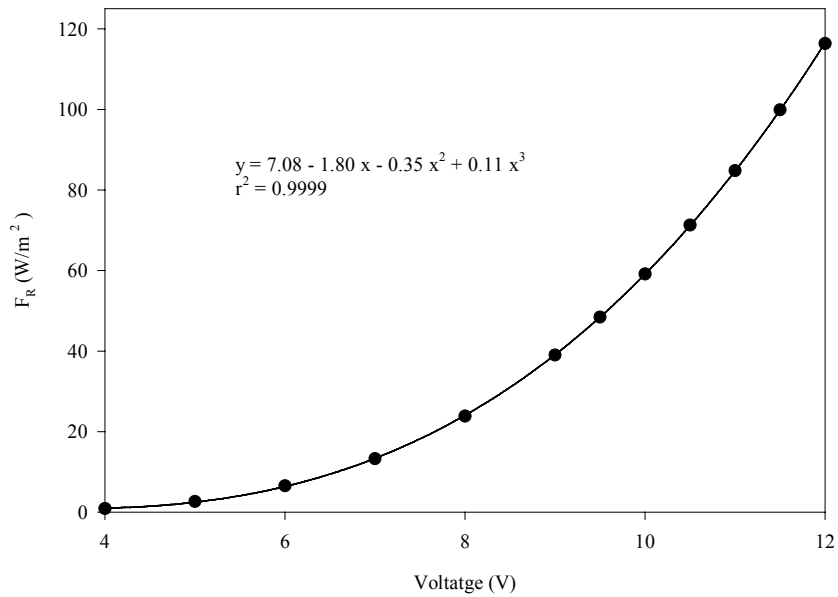


Figura 3.5.- Intensitat de llum mitjana que arriba al quart compartiment en subministrar diferents voltatges a les bombetes

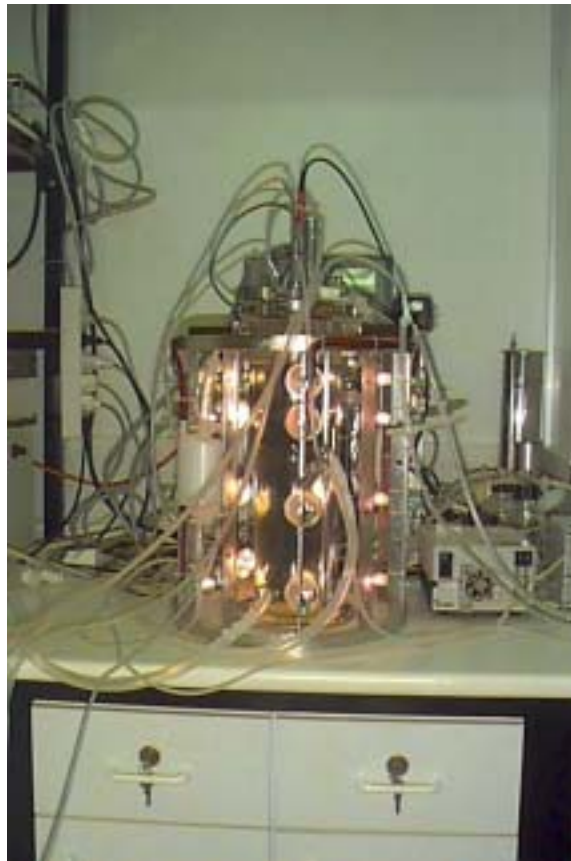


Figura 3.6.- Fotografia del muntatge del compartiment IVa

El medi emprat per fer créixer *R. rubrum* és un medi basat en la mescla de sals basals de Segers & 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 i K_2HPO_4 0.52 g/L. 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). El medi usat pel cultiu de *S. platensis* és la barreja de sals basals descrita per Zarrouk (1966).

Per tal de definir el medi de cultiu es tenen en compte els següents factors:

1.- La quantitat d'àcid acètic inicial ha de ser únicament la suficient per fer de font de carboni en el segon compartiment, ja que inicialment es vol operar en condicions ideals; és a dir, s'han d'esgotar en aquest compartiment tots els àcids volàtils que entren al bucle. Com a primera aproximació es fixa una concentració inicial d'àcid acètic d'1 g C/L. Aquesta concentració ja s'ha provat en anteriors experiments a una velocitat de dilució de 0.034 h^{-1} (Albiol, 1994), velocitat superior a la que es vol treballar inicialment, si es té en compte que el compartiment II té un volum de treball de 2400 mL i que el temps de residència del compartiment III, d'un volum de líquid de 475 mL, es vol fixar a aproximadament 12 h (Pérez, 1997 i 2001).

2.- La quantitat d'amoni d'entrada ha de ser la suficient per ser emprada com a font de nitrogen de *R. rubrum* i l'excedent, un cop convertit a nitrat per *N. europaea* i *N. winogradskyi*, com a font de nitrogen de *S. platensis*. En estudis previs realitzats amb un reactor idèntic al que s'usa en la connexió com a compartiment III, s'han aconseguit degradar 300 ppm de N-NH_4^+ en un temps de residència de 12 hores (Pérez *et al.*, 1997 a i b). Tenint en compte aquests resultats, es fixa que la concentració d'amoni a la sortida del segon compartiment sigui entre 300-400 ppm de N-NH_4^+ . Si, com és de desitjar, tot l'àcid acètic que entra al segon compartiment passa a formar part de la biomassa, es pot avaluar el nitrogen que es consumeix en aquest compartiment, aproximadament 170 ppm de N-NH_4^+ . Per tant, la quantitat d'amoni inicial ha de ser aproximadament de 570 N-NH_4^+ ppm (es fixen 580 ppm N-NH_4^+ com a primera aproximació).

3.- El tampó de carbonat/bicarbonat que s'afegeix en el medi proposat per Zarrouk (1966) com a font de carboni per *S. platensis* no s'hi ha d'incloure, ja que la font de carboni del quart compartiment durant aquesta connexió és el CO_2 que es bombolleja dins del reactor.

4.- El nitrogen que arriba en forma d'amoni al compartiment III ho fa en forma de nitrat al quart compartiment i, per tant, no s'han d'afegir nitrats per aquest compartiment.

5.- Per evitar problemes en les cèl·lules *R. rubrum*, *N. europaea* i *N. winogradskyi* deguts a la força iònica provocada per la presència excessiva de sals en el medi inicial es decideix no incloure el NaCl, present al medi Zarrouk (1966) proposat pel cultiu de *S. platensis*, en el medi de la connexió.

6.- Es prefereix que els micronutrients estiguin en excés i no en defecte, per tant, es sumen totes les quantitats de micronutrients que es fan servir en cada medi per separat i s'afegeixen en el medi de la connexió.

El medi resultant es presenta a la taula 3.1.

Medi connexió	
<i>Components</i>	<i>g/L</i>
CH ₃ COONa	3.428
EDTA-Na·2 H ₂ O	0.100
MnCl ₂ ·2 H ₂ O	0.008
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.033
KH ₂ PO ₄	0.400
NaHCO ₃	0.250
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1.200
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.091
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.728
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	4.0E-6
Na ₂ HPO ₄	0.489
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	4.3E-6
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4 H ₂ O	0.177
K ₂ SO ₄	0.550
<i>Dissolució</i>	<i>mL/L</i>
Elements traça	1.00
Biotina	1.00
A5	1.00
B6	1.00

Taula 3.1.- Composició del medi usat durant els experiments de connexió

Els elements traça, la biotina, i les solucions A5 i B6 es preparen segons la composició que es presenta a les taules 3.2, 3.3, 3.4 i 3.5:

A5	
<i>Components</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>Components</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

Elements traça	
<i>Components</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 3.4.- Composició de la solució d'elements traça

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

Taula 3.5.- Composició de la solució de biotina

3.1.3.- Posada en marxa i resultats de la connexió en condicions fixes

Abans de procedir a la seva connexió es posa en marxa cada bioreactor per separat.

El compartiment II s'esterilitza per calor, s'inocula i s'opera en discontinu, amb el medi de connexió presentat a la taula 3.1, fins a assolir una concentració de cèl·lules elevada.

Posteriorment s'inicia el funcionament en continu d'aquest compartiment.

L'arrancada del compartiment III es fa tal i com descriu Pérez (Pérez, 1997 i 2001). És a dir, s'esterilitza químicament degut a que el suport Biostyr no permet l'esterilització per calor, s'inocula i es deixa operant en discontinu durant aproximadament 2 setmanes. Posteriorment s'inicia un continu a una velocitat de dilució molt baixa, que es va augmentant a mesura que creix la quantitat de cèl·lules present al bioreactor, així com la capacitat de conversió de l'amoni a nitrat. La posada en marxa d'aquest compartiment es fa amb el medi descrit per Pérez (1997), que es presenta a l'apartat A.2.2 d'aquesta memòria.

El quart compartiment s'esterilitza per calor, s'inocula i s'opera en discontinu fins a assolir una concentració de cèl·lules elevada. En aquest moment, es comença l'operació en continu fent servir el medi descrit per Zarrouk (1966), que es presenta a l'apartat A.2.3 d'aquesta memòria.

Un cop assolit l'estat estacionari del segon compartiment funcionant en continu amb el medi global de la connexió, es connecta manualment la sortida d'aquest compartiment amb l'entrada del tercer. El medi de cultiu sortint del segon compartiment es centrifuga (10000 rpm, 4°C i 20 min) i es filtra abans de ser introduït en el següent. Quan el tercer compartiment ha assolit l'estat estacionari, la seva sortida es connecta directament al quart compartiment. Aquesta connexió es fa, com ja s'ha explicat anteriorment, a través de dues etapes de filtració. Un cop aquest compartiment assoleix el nou estat estacionari, es pot considerar que la connexió dels tres compartiments s'ha dut a terme de manera satisfactòria.

Les condicions d'operació dels tres reactors durant la connexió, és a dir, els cabals d'entrada, queden fixats, bàsicament, pel comportament del tercer compartiment. En ser el més petit de tots i en haver fixat el seu temps de residència a 12 hores, condició amb la qual s'havia vist que aquest reactor podia operar sense cap problema (Pérez, 1997 i 2001), queda fixada tant la velocitat de dilució d'aquest compartiment com la dels altres. Aquestes condicions es resumeixen a la taula 3.6.

	Compartiment II	Compartiment III	Compartiment IVa
$T (^{\circ}C)$	30	30	36.5
pH	6.8	8.2	9.5
$V_{liquid} (L)$	2.4	0.475	2.75
$Llum (W/m^2)$	135	0 (fotoinhibit)	94.37
(dies)	2.3	12.05	2.29 ^(*)
$D (h^{-1})$	0.0181	0.083	0.018 ^(*)
$Q_L (L/dia)$	1.04	0.94	1.19 ^(*)

Taula 3.6.- Resum de les condicions d'operació dels tres compartiments.

^(*) Per calcular aquests valors s'ha tingut en compte l'addició de base diària al reactor, aproximadament 250 mL/dia

Cal fer constar que tal i com es pot observar a la taula 3.6 i en els experiments posteriors el cabal d'entrada del compartiment II ha estat sempre superior a la resta dels compartiments, cosa que pot semblar estranya si es té en compte que es tracta d'experiments en connexió. Aquest fet es deu a diversos motius:

- El volum de líquid del segon compartiment es molt superior al del tercer. Resultant complicat poder observar els canvis produïts en un compartiment en modificar les condicions d'ambdós compartiments a la vegada sense que: o bé el segon compartiment tingui un temps de residència molt gran, o bé, que el compartiment III es trobi treballant a unes velocitats de dilució elevadíssimes.
- Durant el procés de centrifugació es perd part del volum
- El procés de centrifugació s'ha d'efectuar diàriament, tal i com s'ha explicat anteriorment. Així doncs, per tal de que cap compartiment es quedés sense aliment i a la vegada poder passar algun cap de setmana lliure, el cabal del compartiment II havia de ser superior al de la resta.

- Si es vol observar com afecta un canvi en les condicions d'operació d'un compartiment sobre un altre i es canvien les condicions d'operació d'ambdós compartiments a la vegada resulta difícil saber a quin d'ambdós canvis són deguts els resultats obtinguts.

Les evolucions dels compartiments II, III i IVa, durant aquest experiment de connexió, es presenten a les figures 3.7, 3.8 i 3.9.

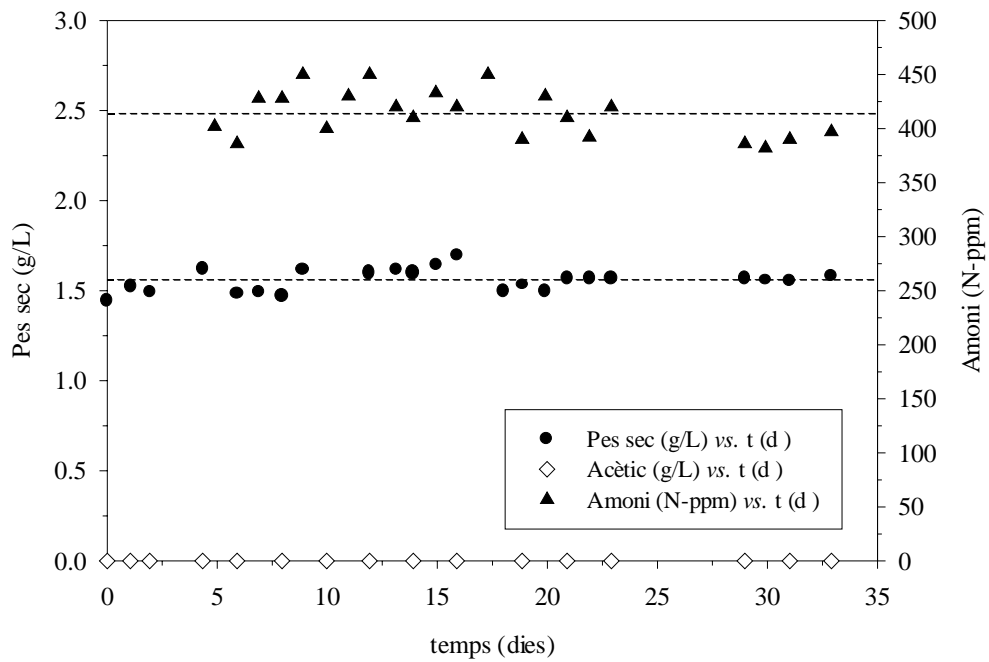


Figura 3.7.- Evolució del compartiment II quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.6

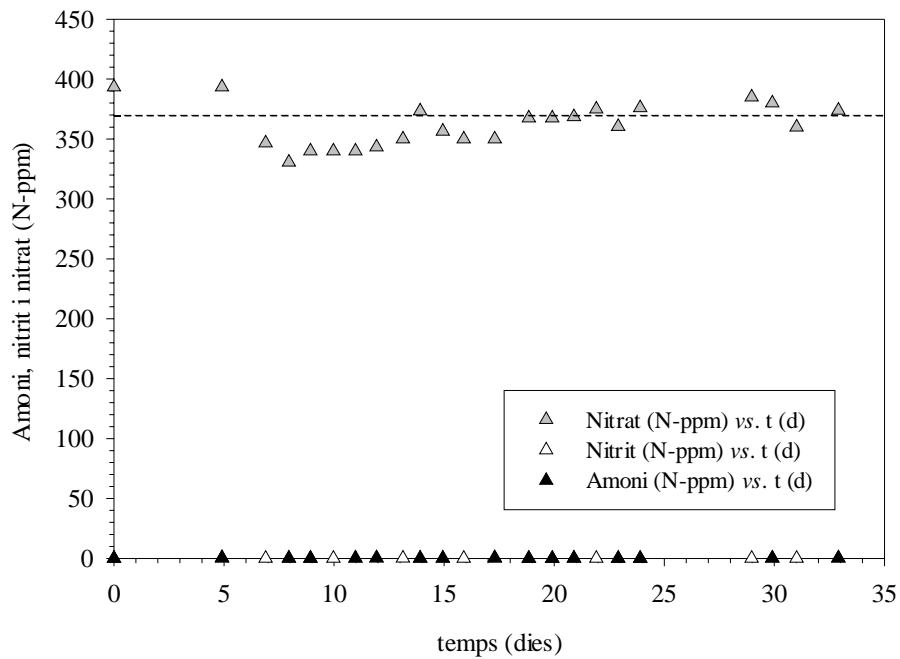


Figura 3.8.- Evolució del compartiment III quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.6

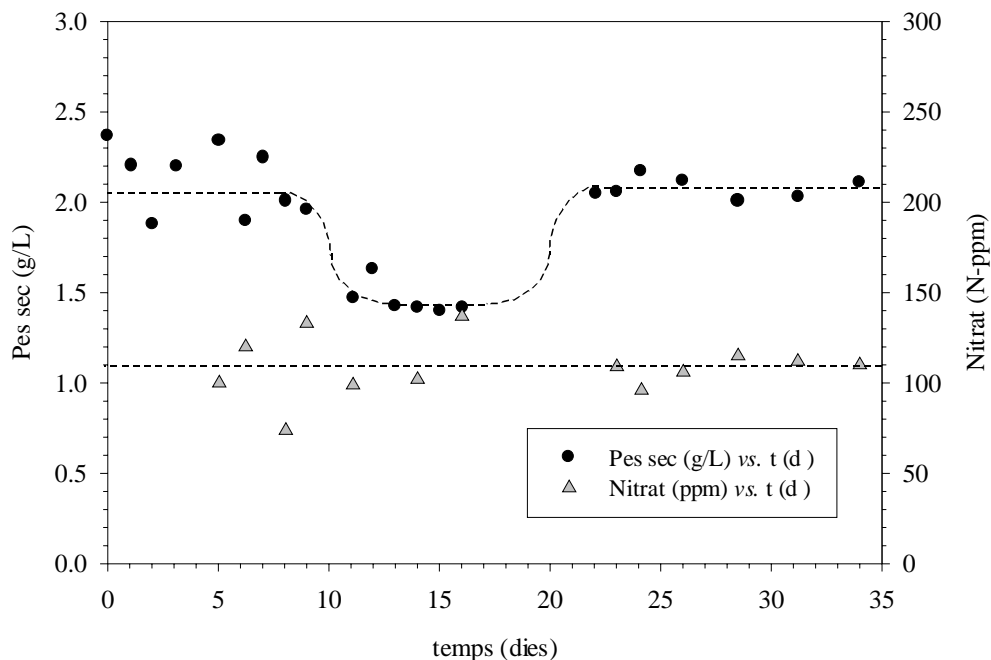


Figura 3.9.- Evolució del compartiment IVa quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.6

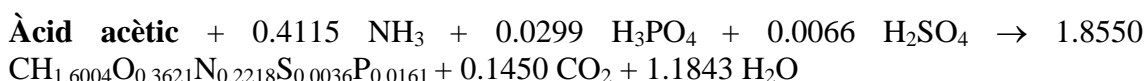
Tant a les figures 3.7, 3.8 i 3.9 com a la resta de les gràfiques d'aquesta memòria; les línies discontinues que marquen la tendència dels punts experimentals són exclusivament, sempre que no es digui el contrari, una guia visual.

En un principi es volia operar a condicions ideals, és a dir, de manera que tot l'àcid acètic es consumís en el segon compartiment i de manera que tot l'amoni que entrés al tercer compartiment fos convertit a nitrat. Com es desprèn de les figures 3.7 i 3.8, aquests objectius s'han aconseguit, ja que, a la sortida del segon compartiment, la presència d'acètic no és detectable i tot l'amoni que entra al tercer compartiment és convertit a nitrat.

El fet de que no hi hagi presència d'acètic a la sortida del segon compartiment fa pensar que aquest reactor funciona sota condicions de limitació de carboni o com a mínim en colimitació amb la llum.

La concentració d'amoni a la sortida del segon compartiment és, aproximadament, de 410 ppm de N-NH₄⁺, com es pot veure a la figura 3.7. Aquest valor és el que ja s'havia predit en dissenyar el medi quan es tenia en compte el nitrogen consumit per *R. rubrum*. Ara bé, la concentració de nitrat a la sortida del tercer compartiment només és de 370 ppm de N-NO₃⁻, com es pot veure a la figura 3.8. Això significa que, des de la sortida del segon compartiment a la sortida del tercer, el balanç de nitrogen desquadra per 40 ppm de N. Per intentar veure perquè el balanç de nitrogen no queda tancat es mesura la concentració de nitrogen en acabar el procés de centrifugació i els processos de filtració presents entre la sortida del segon compartiment i l'entrada del tercer. S'observa que al final d'aquests processos la concentració d'amoni en forma de N-ppm és de 370, és a dir, que durant aquests processos de separació de la biomassa es perden les 40 N-ppm. Una possible explicació d'aquest fet és que existeixi certa precipitació de sals d'amoni les quals s'eliminen en els processos de separació.

Els balanços de carboni i de nitrogen del compartiment II es presenten a les taules 3.7 i 3.8, respectivament. Les concentracions d'entrada d'acètic i d'amoni es mesuren en el medi inicial donant els següents valors: 580 ppm N-NH₄⁺ i 2.60 g/L d'àcid acètic. Per realitzar aquests balanços s'assumeixen diferents supòsits, es menysprea el % de cendres del pes sec, fet que es duu a terme durant tot aquest treball, i es considera la següent estequiometria (Favier-Teodorescu, 1999):



	Entrada (gC/L)	Sortida (gC/L)
Àcid acètic	1.04	0
CO ₂	0	0.08 calculat
Cèl·lules	0	0.83
<i>Total</i>	<i>1.04</i>	<i>0.91</i>

Taula 3.7.- Balanç de carboni del segon compartiment

	Entrada (N-ppm)	Sortida (N-ppm)
Amoni	580	410
Cèl·lules	0	214
<i>Total</i>	<i>580</i>	<i>624</i>

Taula 3.8.- Balanç de nitrogen del segon compartiment

De la taula 3.8 es desprèn que el balanç de nitrogen es pot considerar tancat, si es tenen en compte els possibles errors experimentals, ja que es recupera tot el nitrogen que entra. D'altra banda, tal i com es pot veure a la taula 3.7, el balanç de carboni no queda tancat del tot, recuperant-se un 88% del carboni que entra, resultat que coincideix amb experiments anteriors (Albiol, 1994). Existeixen diversos motius que podrien explicar aquesta situació, per exemple podria haver-hi hagut una acumulació de PHB (polihidroxidbutirat), la qual hagués modificat la composició cel·lular i/o un excés en la producció de CO₂.

La conversió d'amoni a nitrat aconseguida al tercer compartiment, com pot observar-se a la figura 3.8, és d'aproximadament un 100% tal i com s'havia previst.

A la figura 3.9, corresponent al quart compartiment, s'observa una certa dispersió en les mesures de pes sec a l'igual que en la concentració final de nitrat. Pel que fa al pes sec, es té una concentració de 2 g/L de *S. platensis* que després disminueix a 1.5 g/L per, posteriorment, tornar a augmentar fins a 2 g/L. Aquest descens va ser provocat per una falta d'entrada de CO₂, font de carboni en el quart compartiment, degut a una obstrucció del filtre d'entrada. Un cop recuperat el subministrament de CO₂ habitual, el reactor assoleix la concentració de biomassa anterior. Els balanços de C en aquest compartiment no poden realitzar-se ja que no es mesura l'entrada de CO₂. Només es controla que aquest estigui en excés, excepte durant l'obstrucció del filtre, per tal de que no sigui el factor limitant de creixement.

A la sortida del quart compartiment encara existeix una concentració de nitrat important (110 N-ppm), es pot dir, per tant, que el nitrat no és limitant en aquestes condicions de cultiu. Si considerem que la composició de *S. platensis* és de CH_{1.650}O_{0.531}N_{0.170}S_{0.007}P_{0.006} (Cornet *et al.*, 1992a), el balanç de nitrogen en aquest compartiment és el de la taula 3.9.

	Entrada (N-ppm)	Sortida (N-ppm)
Nitrat	370	110
Cèl·lules	0	200
<i>Total</i>	<i>370</i>	<i>310</i>

Taula 3.9.- Balanç de nitrogen del quart compartiment

Com es desprèn de la taula 3.9, els balanços de nitrogen en aquest compartiment no queden tancats, fet que pot deure's a certa precipitació de sals observada a la sortida del tercer compartiment.

Per veure si aquest compartiment es troba limitat o inhibat per algun dels oligoelements més importants, s'han analitzat les concentracions d'aquests al medi d'entrada i s'han comparat amb les concentracions presents en diferents medis o aigües on hi creix *Spirulina sp.*, tal i com es pot veure a la taula 3.10 (Fox, 1996). Com es pot observar, la composició del medi entrant en el quart compartiment, pel que fa als oligoelements estudiats, és semblant a la de les aigües on hi creix habitualment *S. platensis*. Un dels factors limitants del creixement de *S. platensis* és la relació en que es troben en el medi els elements K i Na. Si la relació K⁺/Na⁺ és > 5, el creixement de *S. platensis* es veu inhibat, tot i tenir concentracions elevades de Na (*i.e.* 18 g/L) (Richmond, 1986). Com es pot veure a la taula 3.9, la relació d'aquests elements a l'entrada del compartiment IVA

és molt inferior a 5, no existint, per tant, cap possibilitat d'inhibició deguda a aquest factor.

Tenint en compte la quantitat d'aquests oligoelements presents habitualment en *S. platensis* (Fox, 1996; taula 3.11) i coneixent la producció de cèl·lules obtinguda en el quart compartiment, es pot avaluar la quantitat requerida d'oligoelements per la producció de *S. platensis* aconseguida. Comparant la quantitat d'oligoelements requerida amb la quantitat disponible en el medi d'entrada, es pot observar que tots els micronutrients estudiats es troben en excés (taula 3.11). Sembla doncs, per tant, que aquests elements no són limitants en aquestes condicions de cultiu.

<i>mg/L</i>	Ca	Mg	Na	K	Mn	Fe	Zn
Toliara (Madagascar)	6.5	80	16790	-	-	0.44	-
Camarga (França)	167	552	-	420	-	0.17	-
Rombou (Txad)	16	9.7	3174	1447	-	-	-
Rudolph (Kènia)	100	-	805	19	-	-	-
Aranguadi (Etiopia)	12	-	1628	317	-	-	-
Medi de Zarrouk	21.6	19.79	5437	673.05	-	2.01	-
Medi entrada	26.0	53.8	2350	335	3.33	6.13	0.12

Taula 3.10.- Concentració d'algun dels oligoelements més importants en reserves naturals aquífères on hi creix *Spirulina platensis*, el medi proposat per Zarrouk i el medi d'entrada del compartiment IVa

	<i>g/kg biomassa seca</i>	<i>mg requerits/dia (*)</i>	<i>mg subministrats/dia</i>
K	13.6	27.2	316.24
Ca	5.35	10.7	24.54
Na	4.10	8.2	2218.40
Mg	3.0	6.0	50.79
Fe	0.86	1.72	5.79
Mn	0.03	0.6	3.11
Zn	0.02	0.04	0.11

Taula 3.11.- Quantitats requerides d'algun dels oligoelements principals per kg de biomassa seca i quantitats d'aquests elements subministrades al quart compartiment. (*) La producció de biomassa del quart compartiment és d'aproximadament 2 g/dia i els mg requerits de cada element estan calculats estequiomètricament en funció de la columna 1

Per tant, es pot concloure dient que el cultiu es va veure limitat per la intensitat de llum incident.

Així doncs, fent servir el medi elaborat per la connexió dels compartiments II, III i IVa, aquests tres compartiments han estat interconnectats i, després d'esperar més de 5 temps de residència (aproximadament 21 dies) en estat estacionari, no s'ha observat cap

disfunció important i no s'ha detectat cap efecte tòxic o nociu en cap dels tres compartiments.

Es pot afirmar, per tant, que els compartiments II, III i IVa han estat interconnectats satisfactòriament.

Un cop assolida aquesta connexió preliminar, cal avaluar com afecta la variació d'un dels paràmetres d'un dels compartiments en el comportament global. Cal estudiar, per tant, el comportament dinàmic de la connexió després d'efectuar diferents pertorbacions.

Dos dels factors més importants a estudiar són l'efecte de l'entrada d'àcids volàtils al tercer compartiment i l'estudi de l'entrada de nitrits i amoni al compartiment IVa. Aquests factors són, bàsicament, el resultat directe de la variació de la majoria de paràmetres dels compartiments II i III que més poden afectar el comportament global del bucle MELISSA.

3.2.- Efecte d'una entrada d'àcid acètic en el compartiment III

En aquest apartat es planteja l'estudi de com pot afectar l'entrada d'àcids volàtils al compartiment III en el funcionament global de la connexió. Aquesta entrada d'àcids volàtils al tercer compartiment es pot deure a diferents pertorbacions del funcionament del segon compartiment. Aquestes es descriuen a continuació:

1.-Una disminució en la intensitat de llum que arriba al segon compartiment podria fer que aquest passés a estar limitat per la llum i que, per tant, el bioreactor deixés de treballar idealment, és a dir, que no es convertissin tots els àcids volàtils a biomassa. D'aquesta manera arribarien àcids volàtils al tercer compartiment.

2.-Un augment en la velocitat de dilució podria fer, a l'igual que a l'escenari anterior, que el reactor passés a estar limitat per la intensitat de llum incident i això produiria una arribada d'àcids volàtils al tercer compartiment.

3.-Un mal funcionament del segon compartiment faria que aquest no dugués a terme la seva funció correctament. Si això passés, en el segon compartiment no es consumirien tots els àcids volàtils i, per tant, aquests arribarien també, al tercer compartiment.

4.- Un increment de les concentracions d'àcids grassos volàtils a l'entrada del compartiment II degut a un canvi de funcionament del compartiment I.

3.2.1.- Efecte d'una entrada d'àcid acètic en el compartiment III

Per dur a terme aquest experiment s'utilitza, per separat, el compartiment III que es presenta a la secció 3.1.1., i s'afegeixen diferents concentracions d'àcid acètic al medi entrant del compartiment III, medi que es presenta a l'annex d'aquesta memòria. Així doncs, abans de comprovar com afecta una sortida d'àcid acètic del compartiment II a la connexió dels compartiments II, III i IVa s'estudia, únicament, l'entrada d'àcid acètic al compartiment III.

Les condicions d'operació del compartiment III durant aquest experiment es descriuen a la taula 3.12.

L'evolució de l'efecte de la presència d'àcid acètic a l'entrada del compartiment III es presenta a les figures 3.10 i 3.11.

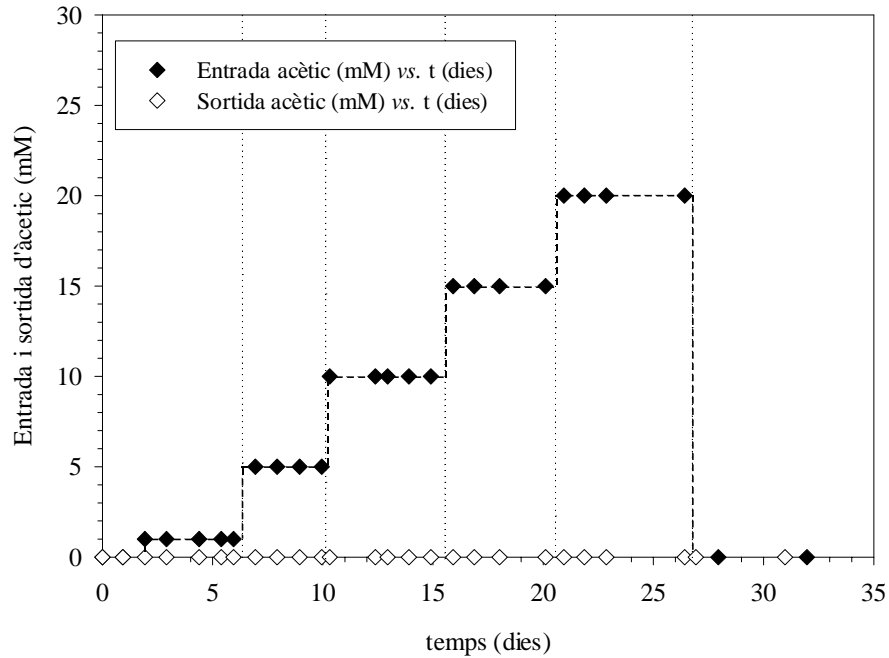


Figura 3.10.- Evolució de la concentració d'àcid acètic a l'entrada i sortida del compartiment III.

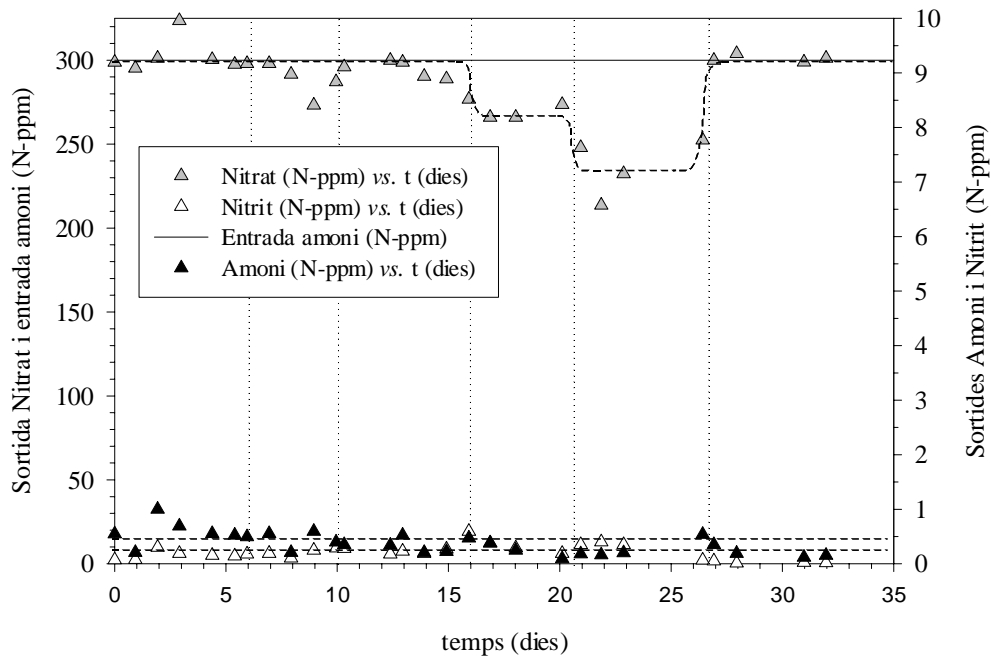


Figura 3.11.- Evolució de les concentracions d'amoni, nitrit, i nitrat a la sortida del compartiment III. La concentració d'amoni entrant és de 300 N-ppm

	Compartiment III
$T (^{\circ}C)$	30
pH	8.2
$V_{liquid} (L)$	0.475
$Q_L (L/dia)$	0.8
$[\text{àcid acètic}]$	0-20 mM

Taula 3.12.- Condicions d'operació del compartiment III durant aquest experiment

A les figures 3.10 i 3.11 s'observen quatre fets importants:

- 1.- L'àcid acètic és completament consumit al tercer compartiment, és a dir, no hi ha presència d'àcid acètic a la sortida d'aquest compartiment.
- 2.- En relació a la conversió d'amoni a nitrat, el comportament d'aquest reactor és completament normal fins a arribar a una concentració d'entrada d'àcid acètic de 15 mM. És a dir, durant aquest període tot l'amoni es converteix a nitrat i no s'observa cap diferència de comportament respecte de quan en aquest reactor no hi arriba acètic.
- 3.- Quan l'entrada d'àcid acètic és de 15 i 20 mM, hi ha una diferència entre l'entrada i la sortida de nitrogen d'aproximadament 40-60 N-ppm, és a dir, es consumeixen de 40 a 60 N-ppm en aquest compartiment.
- 4.- Quan s'atura l'entrada d'àcid acètic després d'haver estat afegint àcid acètic a una concentració de 20 mM al reactor, aquest torna a recuperar el seu comportament normal, és a dir, el balanç de nitrogen torna a complir-se i no s'observa consum de font de nitrogen.

El fet de que part de la font de nitrogen i tot l'acètic siguin consumits al compartiment III durant les condicions mixotròfiques d'operació es deu, segurament, a un major creixement cel·lular en el reactor.

Aquest creixement cel·lular pot ésser causat o bé per un increment de la concentració cel·lular de *N. europaea* i *N. winogradskyi* o bé per una situació de no axènicitat del cultiu.

L'axènicitat del reactor, però, es segueix periòdicament mirant mostres pel microscopi i no s'han detectat microorganismes estranys a la sortida d'aquest compartiment. Tot i això, cal dir que els contaminants podrien restar immobilitzats. I tenint en compte que les cèl·lules de *Nitrobacter sp.* no presenten una morfologia uniforme i que aquesta varia quan aquests microorganismes creixen en àcid acètic (Bock, 1976) la possibilitat de detectar contaminants per observació microscòpica queda restringida.

Al llarg de tot l'experiment han entrat 0.17 mols d'acètic (10.32 g) al reactor. Suposant que tot aquest acètic passi a formar part d'un microorganisme, el rendiment $Y_{X/S}$ del qual sigui de 0.36 g biomassa/g substrat, dada bibliogràfica mitjana del rendiment biomassa/substrat de diferents bacteris, usant acètic com a substrat (Abbott i Clamen, 1973); s'haurien format 3.72 g de biomassa. Això significaria que s'hauria produït una mitjana de 0.17 g de biomassa diària, és a dir, 0.21 g/L.

La majoria d'aquesta biomassa, 2.42 g, s'hauria format durant el període en què les concentracions d'acètic d'entrada són 15 i 20 mM. Si aquesta biomassa tingués una composició típica de $\text{CH}_{1.75}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.43}$ (Blanch i Clark, 1996), això suposaria un consum de N de 0.026 g/L, és a dir, 26 N-ppm. Amb aquesta consideració el balanç de N quedaria més tancat.

Tenint en compte les característiques del tercer compartiment que fan que, en tractar-se d'una columna empacada on *N. europaea* i *N. winogradskyi* s'adhereixen al suport, no hi hagi gairebé microorganismes lliures a la sortida, si el microorganisme que consumís l'acètic fos un contaminant que no s'adherís al suport de la columna, aquesta concentració diària de biomassa seria prou significativa per haver-la detectat microscòpicament.

Si els responsables del consum de l'àcid acètic fossin *N. europaea* i *N. winogradskyi*, voldria dir que s'haurien produït 4.82 g nous de biomassa, essent el rendiment el suposat. Aquest increment de biomassa sembla molt significatiu si ens atenem a les següents dades: al cap d'un any i mig de funcionament d'una columna exactament igual a la usada es tenia una quantitat de biomassa de 44 g/L_{llit} (Pérez, 2001), això suposaria una producció de biomassa de 0.70 g/mes, essent el volum de llit de 0.286 L. Aquesta producció seria només una vuitena part de la obtinguda en aquest experiment; ara bé, s'ha de tenir en compte que en aquest cas però ens trobem en condicions mixotròfiques de cultiu.

A continuació fa un recull bibliogràfic de la capacitat de *Nitrosomonas sp.* i *Nitrobacter sp.* de créixer mixo o heterotròficament i d'incorporar AGV en els seus components cel·lulars:

Microorganismes oxidants d'amoni (Nitrosomonas sp.)

Aquests microorganismes són bàsicament autòtrofs tot i que poden assimilar, amb certes limitacions, alguns àcids grassos volàtils en un creixement mixotròfic. No s'ha descrit mai un creixement heteròtrof d'aquests microorganismes (Bock *et al.* 1991).

Creixement autotròfic: Aquests microorganismes utilitzen CO_2 com a font principal de carboni a través del cicle de Calvin. Els cofactors reduïts necessaris per dur a terme l'assimilació del CO_2 a través del Cicle de Calvin són aportats a través de l'oxidació de l'amoni.

Aquests mecanismes resulten, doncs, suficients per alimentar la totalitat de les rutes metabòliques centrals i sintetitzar totes les molècules necessàries pel creixement d'aquests microorganismes: ADN, ARN, aminoàcids, carbohidrats, lípids.

Creixement mixotròfic: Totes les espècies de *Nitrosomonas* estudiades fins el moment són capaces, amb limitacions, de metabolitzar compostos orgànics, bàsicament acètic (Bock *et al.* 1991).

Les rutes del flux metabòlic central només s'han estudiat en detall en poques soques (Bock *et al.* 1991). D'aquests estudis se'n desprèn que la distribució de ^{14}C de piruvat i acetat a aminoàcids cel·lulars queda restringida a la família del piruvat i glutamat i a la de la leucina i glutamat respectivament, conclouent, per tant, que aquests microorganismes presenten un Cicle dels àcids tricarbòxílics incomplet. Aquest fet també es desprèn dels resultats obtinguts en estudis realitzats en *N. europaea* i

Nitrosolobus multiformis on s'observa una mancança de l'enzim α -oxoglutarat deshidrogenasa en ambdós microorganismes (Hooper, 1989; Watson *et al.*, 1986).

Ara bé, tot i que aquests microorganismes tenen la possibilitat d'incorporar font de carboni orgànic ho fan en quantitats molt petites si es compara amb la font de carboni principal CO_2 .

La restricció de *Nitrosomonas sp.* de créixer en condicions mixotròfiques pot ser deguda a la limitació de la capacitat de fixació de CO_2 a través del Cicle de Calvin provocada per una repressió de l'enzim RubiscCo en presència de matèria orgànica. Cal ressenyar, també, la mancança que tenen aquests microorganismes dels enzims malic i PEP sintasa. Aquests enzims donen la possibilitat a la cèl·lula d'alimentar la part superior de la glicòlisi (glucosa 6P a fosfoenol piruvat) a través de la part inferior (piruvat i compostos intermedis del TCA).

En estudis realitzats per Clark i Schmidt (1966) amb *Nitrosomonas* creixent amb piruvat 2-C^{14} es veu com tot i que *Nitrosomonas* només assimila un 1% del carboni marcat un 95% del restant es troba en forma de carbonats en el medi. Aquests resultats semblen indicar que *Nitrosomonas* és capaç d'oxidar les espècies orgàniques a CO_2 .

Creixement heterotròfic: Aquests microorganismes no poden créixer heterotròficament. Les causes en són, segurament, una repressió completa de la capacitat de fixar CO_2 a través del Cicle de Calvin i/o un aport insuficient de cofactors reduïts (no hi ha oxidació de NH_3 i l'oxidació de la matèria orgànica no és suficient per produir els cofactors reduïts requerits). És a dir, únicament part dels metabolits requerits poden ser sintetitzats impedit així el creixement dels microorganismes.

Microorganismes oxidants de nitrit (Nitrobacter sp.)

Aquests microorganismes són bàsicament autòtrofs i usen CO_2 com a principal font de carboni. Tots aquests microorganismes poden créixer també mixotròficament (Bock, 1976; Steinmüller i Bock, 1976; Smith i Hoare, 1977; Matin, 1978; Krümmel i Harms, 1982; Martiny i Koops 1982 i Bock *et al.*, 1986) i algunes soques de *Nitrobacter* ho fa heterotròficament. (Bock *et al.* 1991).

Creixement autotròfic: Aquests microorganismes utilitzen CO_2 com a font principal de carboni a través del cicle de Calvin. Els cofactors reduïts necessaris per dur a terme l'assimilació del CO_2 a través del Cicle de Calvin són aportats a través de l'oxidació del nitrit. El nitrogen necessari pel creixement l'obtenen principalment de l'amoni i sinó del nitrit.

Creixement mixotròfic: Aquests microorganismes poden créixer mixotròficament quan el nitrit és la seva única font d'energia i el CO_2 junt amb compostos orgànics en són la font de carboni.

Aquests microorganismes presenten tots els enzims del TCA i usen aquesta via per metabolitzar l'acetat sintetitzant molts dels constituents cel·lulars sense que es denoti cap restricció significativa.

La velocitat de creixement d'aquests microorganismes augmenta en condicions de creixement mixotròfic (Watson *et al.*, 1986).

S'ha vist que la relació de N-cel·lular/N-oxidat augmenta en un 11% quan *Nb. agilis* es fa créixer mixotròficament sobre un substrat amb presència d'extracte de llevat

(Steinmuller i Bock, 1976). Aquest microorganisme quan creix en condicions mixotròfiques pot arribar a incorporar entre un 33-39% de carboni cel·lular provenint de l'acetat (Smith i Hoare, 1968).

S'ha observat, també, un increment en la quantitat d'àcid acètic que aquests organismes incorporen a la seva massa cel·lular quan l'operació es realitza en continu enlloc de en batch (Matin, 1978).

L'acumulació de PHB en condicions mixotròfiques de creixement és una altra característica d'aquests microorganismes. *N. agilis* quan creix amb acetat i nitrit acumula aquest polímer de reserva. L'acumulació de PHB pot arribar a ser un 90% de la massa cel·lular de *Nitrobacter* (Bock *et al.*, 1988).

Creixement heterotròfic: Algunes soques d'aquesta espècie de microorganismes poden créixer heterotròficament, per exemple *N. winogradskyi* (Bock, 1976) tot i que el seu creixement és, en general, més lent que en condicions litoautotròfiques.

En aquestes condicions de creixement la capacitat de fixar CO₂ a través del cicle de Calvin-Benson es conserva. Les cèl·lules poden créixer al poder metabolitzar tots els compostos i metabolits requerits. Ara bé, s'ha observat certa repressió en els enzims NADH oxidasa, fosfoenol piruvat carboxilasa i RubiscCo (ribulosa bifosfat carboxilasa oxigenasa) quan aquests microorganismes creixen en condicions heterotròfiques i presència d'amoni o nitrat com a font de nitrogen.

Aquestes dades semblen no descartar un creixement important i una utilització de l'acetat per part de, sobretot, *N. winogradskyi* (33-39% carboni cel·lular provenint de

l'acetat i fins a un 90% en pes d'acumulació de PHB) així com una utilització parcial de l'acetat (components cel·lulars) i una possible oxidació d'aquest a CO₂ (fins a un 95% del Carboni orgànic inicial) per part de *N. europaea*. Tot i això, cal fer experiments futurs per acabar d'elucidar l'estequiometria i cinètiques de creixement d'un co-cultiu de *N. europaea* i *N. winogradskyi* en condicions mixotròfiques: presència d'àcids volàtils, CO₂, amoni, nitrit i nitrat en el cultiu.

3.2.2.- efecte d'un consum incomplet d'àcid acètic en el compartiment II a la connexió dels tres compartiments

Havent demostrat que el compartiment III no es veu afectat per la presència de petites quantitats d'àcid acètic, cal estudiar l'efecte de la sortida d'àcid acètic del compartiment II a la connexió global dels compartiments II, III i IVa.

Es duen a terme diferents experiments variant tant la velocitat de dilució com la intensitat de llum incident al segon compartiment, per tal de que el consum d'àcid acètic entrant sigui incomplet.

A la taula 3.13 es mostren les condicions d'operació utilitzades en el primer experiment.

	COMPARTIMENT II					COMP. III	COMP. IVa
	I	II	III	IV	V		
$V_{líquid} (L)$	2.4					0.475	2.5
$Llum (W/m^2)$	136	92	59	34	18.1	0	20
$D (h^{-1})$	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.017
$Q_L (L/dia)$	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	0.8 ^(**)	1.0 ^(*)
$\tau (dies)$	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.59	2.5

C_0 (gC/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
--------------	-----	-----	-----	-----	-----

Taula 3.13.- condicions d'operació dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment.

(*) aquest cabal és superior al del tercer compartiment degut a l'addició de base pel control de ph

(**) els motius de la diferència que s'observa entre els cabals del segon i tercer compartiment s'expliquen l'apartat 3.1 d'aquest document

A les figures 3.12, 3.13 i 3.14 s'observa l'evolució dels compartiments II, III i IVa quan operen en connexió amb les condicions presentades a la taula 3.13.

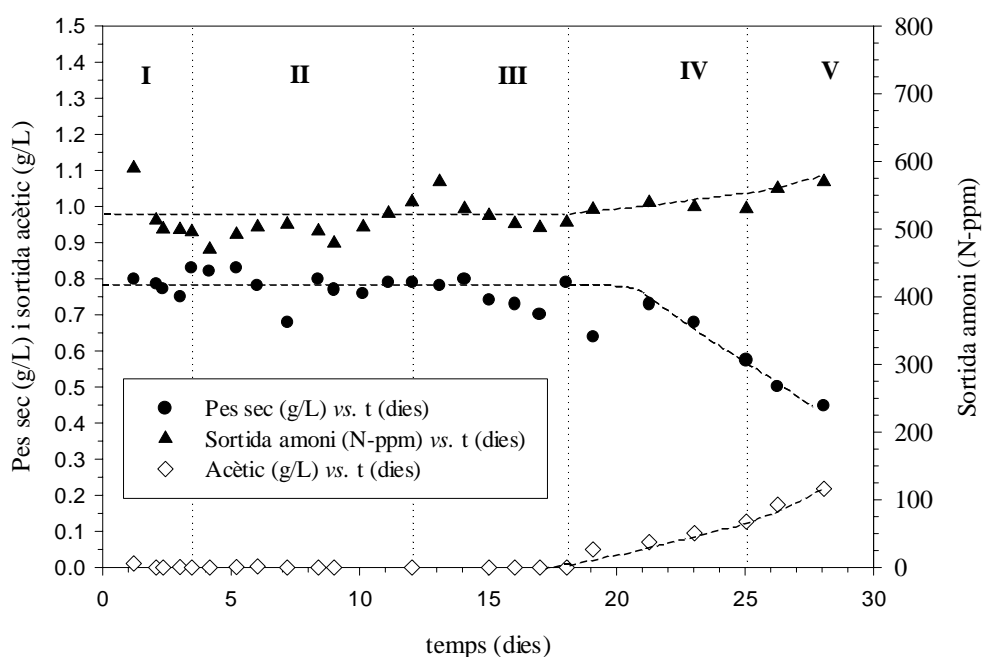


Figura 3.12.- evolució del compartiment II quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.13 I, II, III, IV i V: condicions d'operació assajades

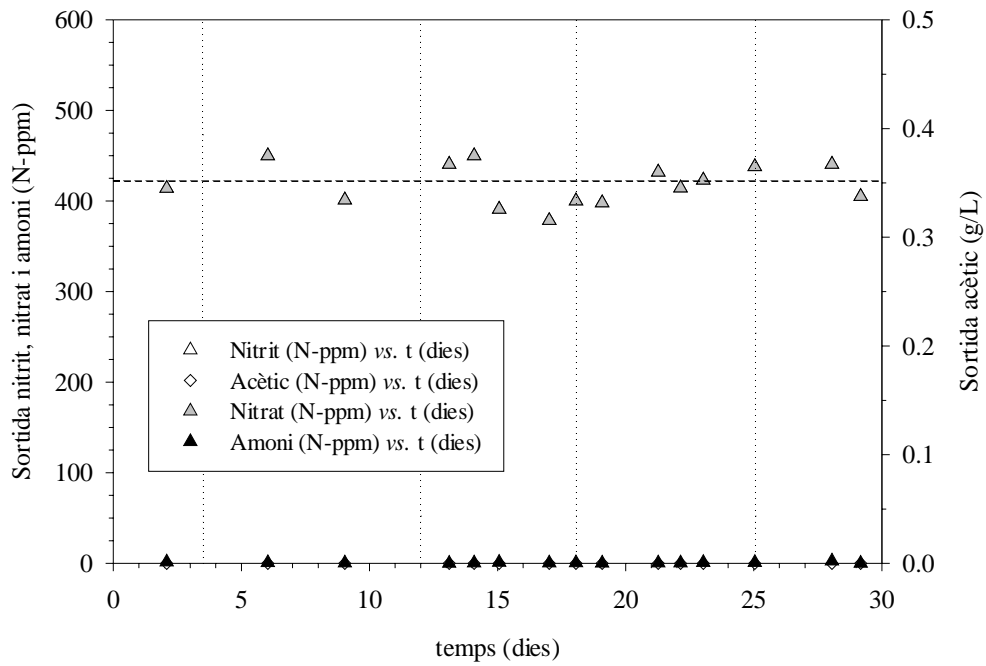


Figura 3.13.- Evolució del compartiment iii quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.13. Les línies divisòries representen els canvis de condicions d'operació del compartiment II

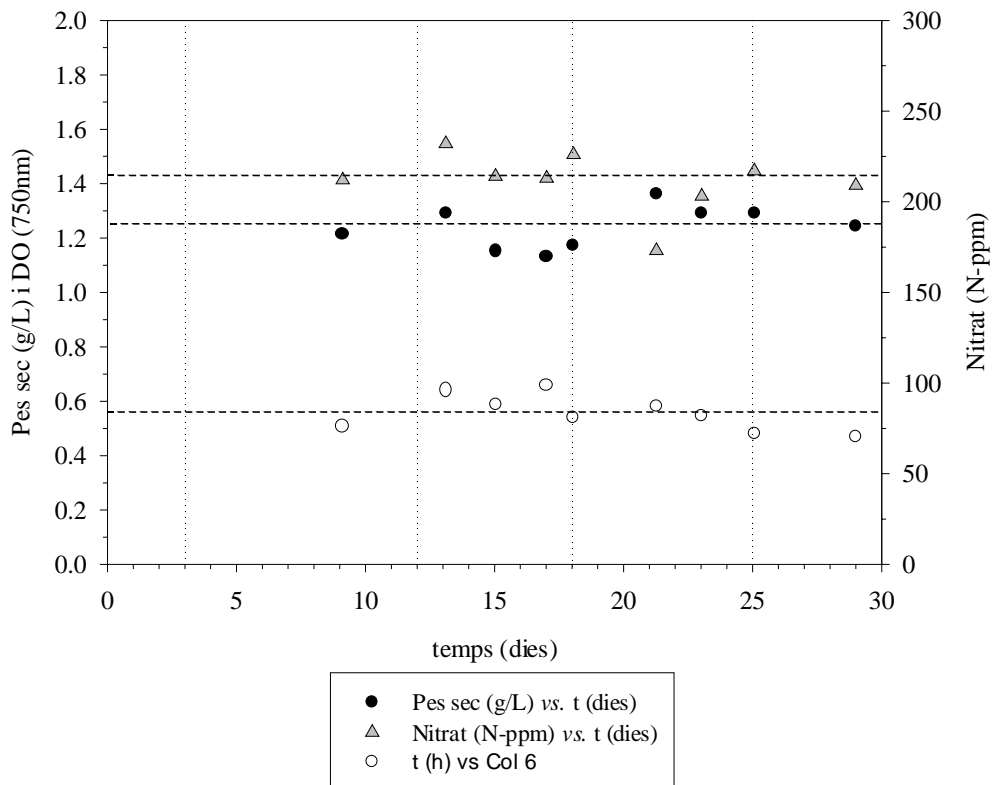


Figura 3.14.- evolució del compartiment iva quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.13. Les línies divisòries representen els canvis de condicions d'operació del compartiment II

Un cop observat el comportament de la connexió quan la velocitat de dilució del compartiment II és de $d=0.08 \text{ h}^{-1}$, aquesta s'incrementa a $D=0.12 \text{ h}^{-1}$. Les condicions d'operació d'aquest nou experiment es troben a la taula 3.14.

	COMPARTIMENT II		COMP. III	COMP. IVA
	I	II		
$V_{liquid} (L)$	2.4		0.475	2.5
$Llum (W/M^2)$	260	260	0	20
$D (h^{-1})$	0.08	0.12	0.07	0.017
$Q_L (L/dia)$	4.8	6.9	0.8 ^(**)	1.0 ^(*)
$t (dies)$	0.52	0.35	0.59	2.5
$C_0 (gC/L)$	0.5	0.5		

Taula 3.14.- condicions d'operació dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment
^(*) aquest cabal és superior al del tercer compartiment degut a l'addició de base pel control de ph
^(**) els motius de la diferència que s'observa entre els cabals del segon i tercer compartiment s'expliquen l'apartat 3.1 d'aquest document

A les figures 3.15, 3.16 i 3.17 es presenta l'evolució de la connexió dels compartiments ii, iii i iva durant aquest experiment.

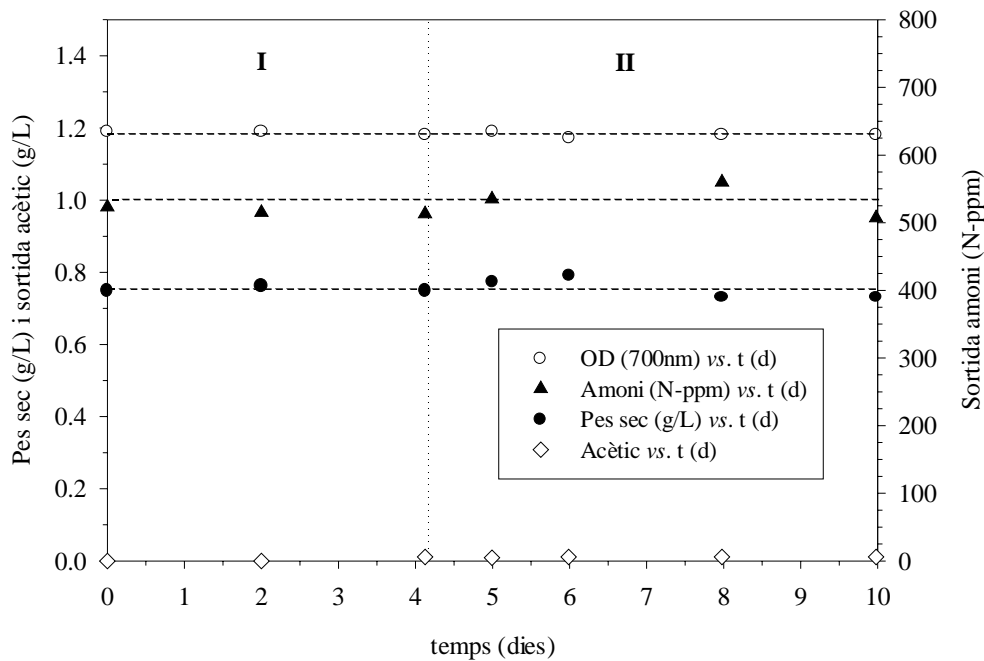


Figura 3.15.- evolució del compartiment ii quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.14
 II, III: condicions d'operació assajades

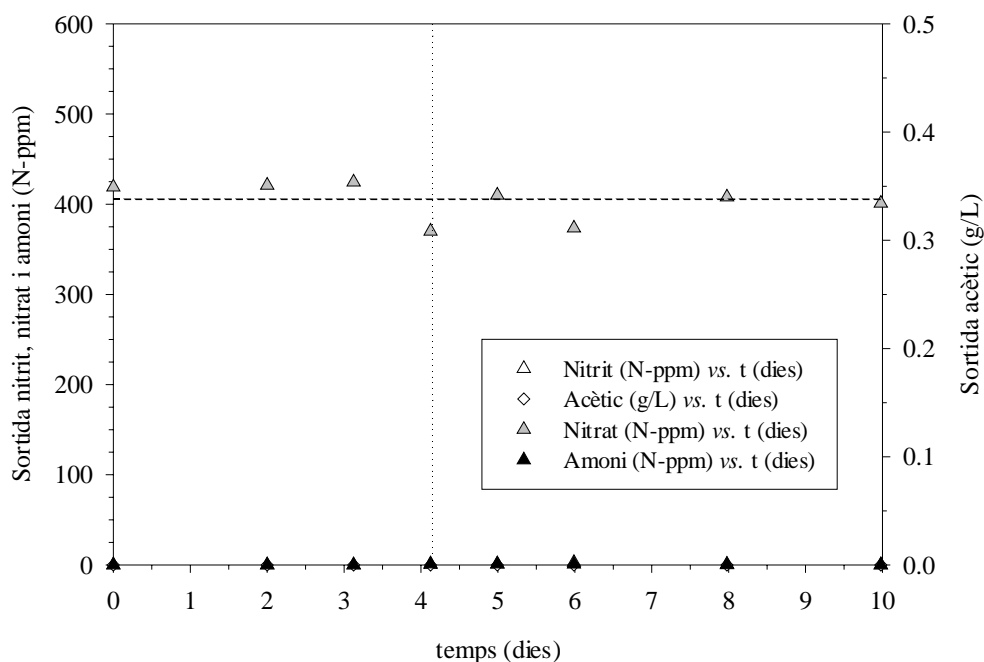


Figura 3.16.- evolució del compartiment iii quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.14
La línia divisòria representa el canvi de condicions del compartiment ii

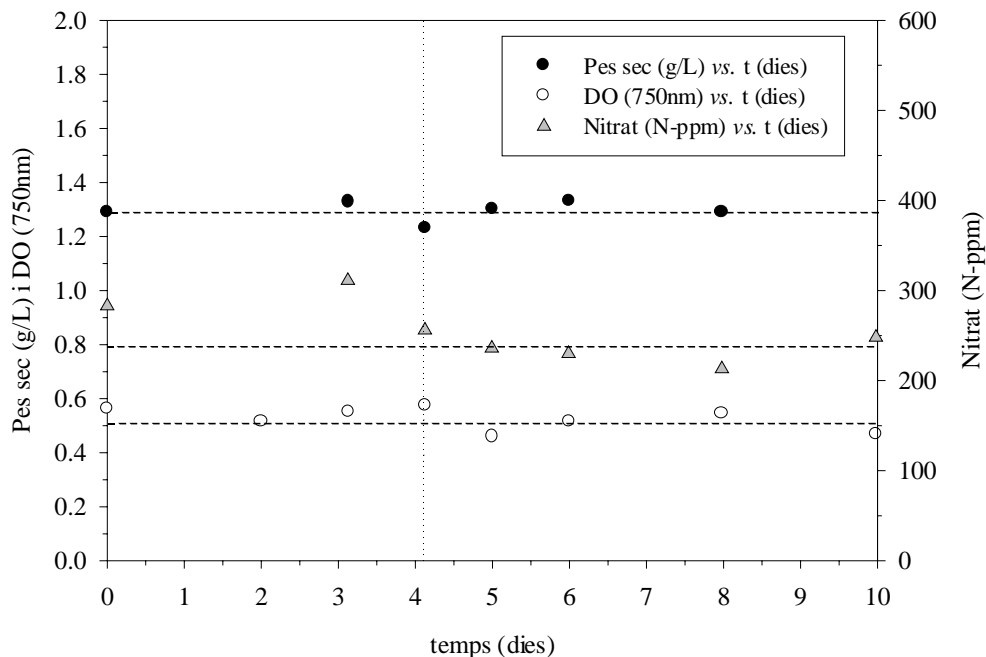


Figura 3.17.- evolució del compartiment iva quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.14
La línia divisòria representa el canvi de condicions del compartiment II

Tal i com s'observa a la figura 3.15, el compartiment ii opera a una velocitat de dilució de $d=0.12 \text{ h}^{-1}$ sense que es trobi àcid acètic a la sortida. Ara bé, amb aquesta velocitat de dilució i usant una concentració inicial de carboni de 0.5 gc/l (veure taula 3.14), es comença a observar una adhesió de cèl·lules a la paret. Aquest fet, tal i com es presenta més endavant en aquesta secció, és senyal de que la font de carboni comença a trobar-se en excés. Per tant, tenint en compte que la llum subministrada al segon compartiment durant aquest experiment és la màxima permesa pel muntatge experimental, es decideix

disminuir la concentració inicial de carboni per tal poder efectuar salts de llum en el segon compartiment a una velocitat de dilució de $d=0.12 \text{ h}^{-1}$. A la taula 3.15 es presenten les condicions d'operació usades en els compartiments ii, iii i iva durant aquest tercer experiment.

	COMPARTIMENT II							COMP. III	COMP. IVa
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
$V_{líquid} (L)$	2.4							0.475	2.5
$Llum (W/m^2)$	260	224	192	138	92	58	14.7	0	20
$D (h^{-1})$	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.07	0.017
$Q_L (mL/h)$	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	0.8 ^(**)	1.0 ^(*)
τ (dies)	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.59	2.5
$C_0 (gC/L)$	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4		

Taula 3.15.- condicions d'operació dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment

^(*) aquest cabal és superior al del tercer compartiment degut a l'addició de base pel control de ph

^(**) els motius de la diferència que s'observa entre els cabals del segon i tercer compartiment s'expliquen a l'apartat 3.1 d'aquest document

A les figures 3.18, 3.19 i 3.20 es presenta l'evolució dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment de connexió.

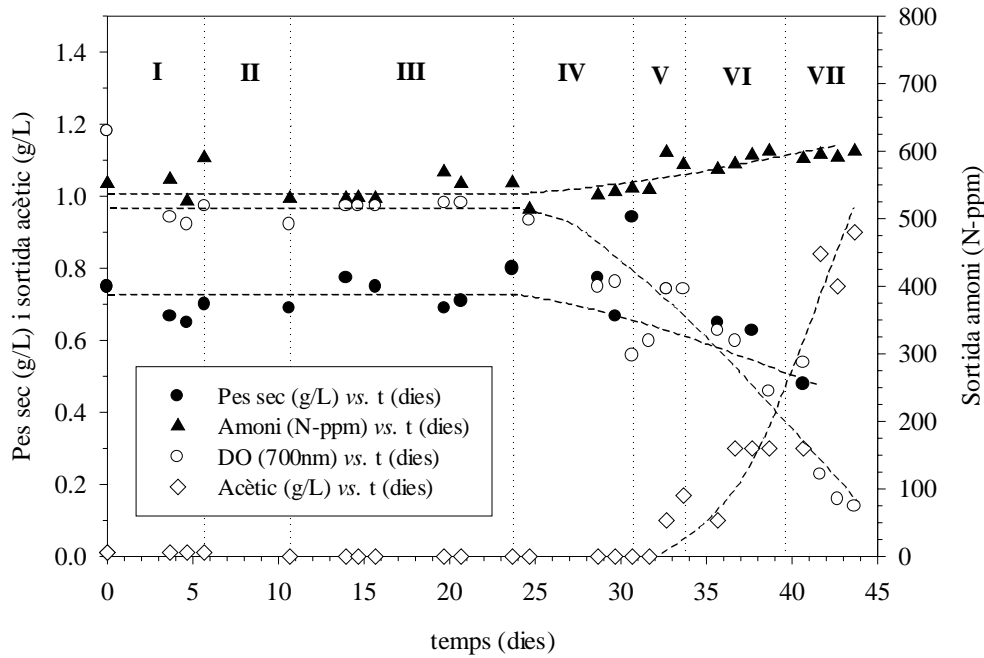


Figura 3.18.- evolució del compartiment ii quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.15 I, II, III, IV, V, VI i VII: condicions d'operació assajades

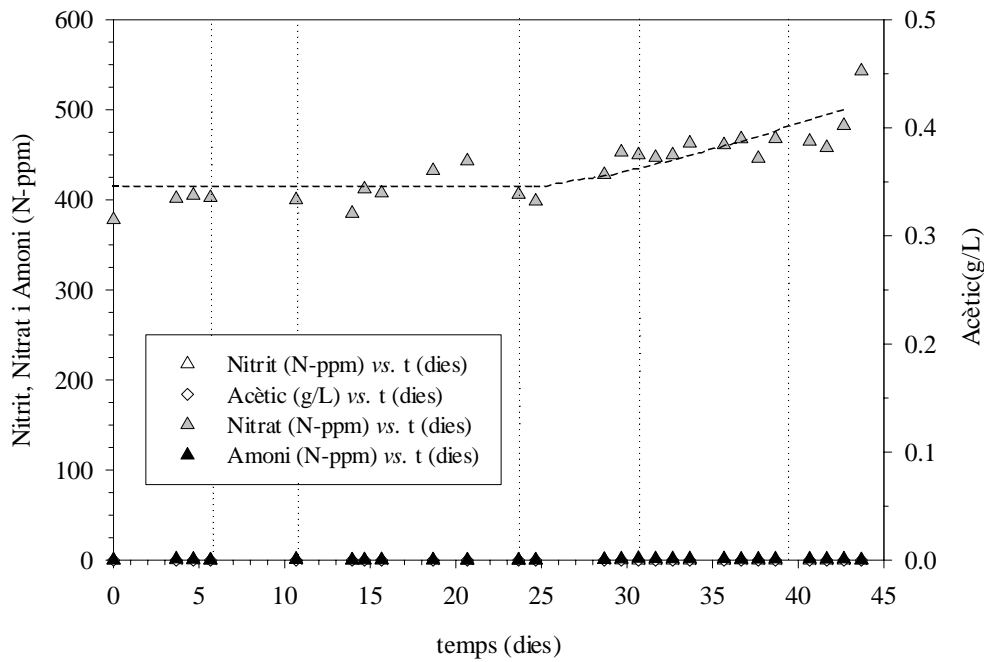


Figura 3.19.- Evolució del compartiment III quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.15
 Les línies divisòries representen els canvis de condicions d'operació del compartiment II

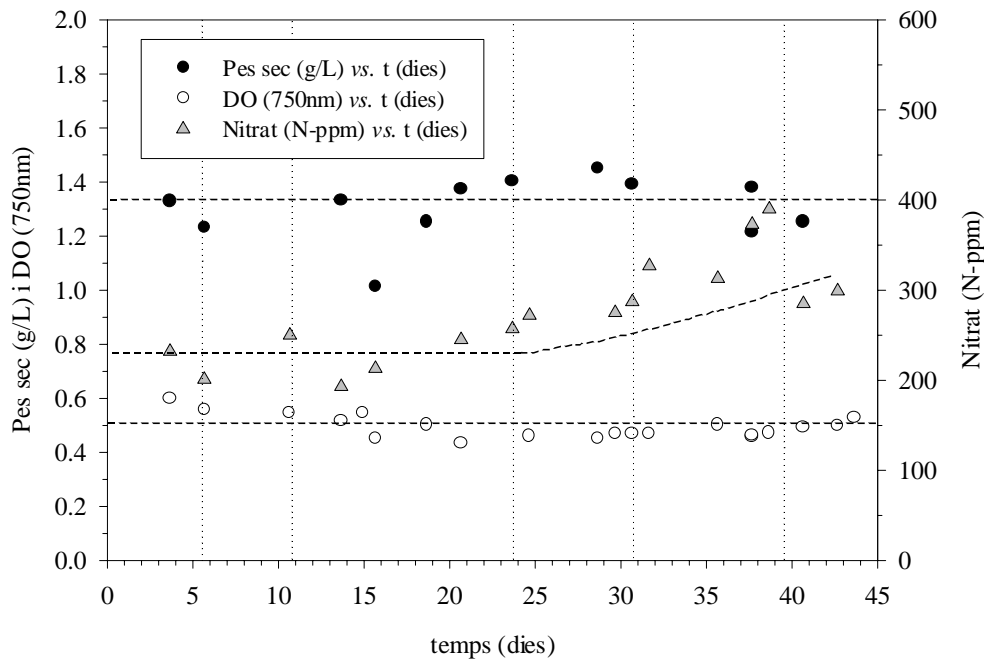


Figura 3.20.- Evolució del compartiment IVa quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.15
 Les línies divisòries representen els canvis de condicions d'operació del compartiment II

Quan es disminueix la llum disponible del cultiu o quan s'incrementa la velocitat de dilució del compartiment II, figures 3.12, 3.15 i 3.18, s'arriba a un punt on la concentració de carboni ja no és limitant, el que limita és la concentració de llum incident al cultiu. En aquests casos, l'àcid acètic es troba en excés, essent present a la sortida d'aquest compartiment i entrant, per tant, al compartiment III.

Tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.2.1 i es presenta a les figures 3.13, 3.16 i 3.19 el compartiment iii no es veu alterat per la presència d'àcid acètic. En aquest compartiment tot l'amoni entrant és convertit a nitrat no trobant-se a la sortida ni amoni ni nitrit. A la sortida d'aquest compartiment no s'hi troba àcid acètic, és a dir, tot l'àcid acètic que entra en aquest compartiment és consumit. Aquest mateix fet ha estat motiu de discussió a l'apartat 3.2.1.

De les figures 3.13, 3.16 i 3.19 se'n desprèn que el balanç de nitrogen no queda tancat en aquest compartiment. Entre l'entrada d'amoni, sortida d'amoni del compartiment ii, figures 3.11, 3.15 i 3.18, i la sortida de nitrat hi ha una diferència d'unes 50-100 n-ppm en tots tres experiments.

Aquesta diferència és explicada bàsicament per un mal funcionament de la sonda de ph d'aquest compartiment, que feia que el ph fós sempre superior al desitjat, causant una pèrdua de nitrogen en forma d'amoníac gas. Degut a la dificultat/impossibilitat d'efectuar un canvi de la sonda de ph enmig dels experiments aquesta no es va canviar fins la seva finalització.

El compartiment iva presenta un comportament completament estable durant els tres experiments, veure les figures 3.14, 3.17 i 3.20. Durant aquests experiments no entren ni amoni ni nitrit en aquest compartiment. Així doncs, és un compartiment que es troba treballant en condicions òptimes de funcionament pel bucle MELISSA.

A les figures 3.12, 3.15 i 3.18 es presenta l'evolució del compartiment II durant aquests tres experiments. A aquestes figures s'observa un comportament normal del reactor tant durant els increments de la velocitat de dilució com en els salts disminuint la llum incident al cultiu fins que l'àcid acètic passa a trobar-se en excés al cultiu. Quan l'àcid acètic limita el cultiu, aquest és completament consumit al compartiment II, mantenint-se la biomassa en solució d'aquest compartiment constant. Quan l'àcid acètic es troba en excés, és a dir, la llum incident limita el cultiu, aleshores s'observa una adherència de les cèl·lules a les superfícies sòlides del reactor i una disminució de la biomassa present en solució, fent-se impossible assolir un estat estacionari. Fins i tot, mantenint unes mateixes condicions d'operació, cada cop hi ha més àcid acètic present al cultiu i menys biomassa en suspensió, tal i com es pot observar a la figura 3.21. Aquest adheriment de les cèl·lules a superfícies sòlides ve provocat per un canvi morfològic de les cèl·lules de *R. rubrum*. Aquestes, tal i com s'observa a les figures 3.22 i 3.23, quan tenen un excés d'àcid acètic al cultiu acumulen grànuls intracel·lulars, perdent la seva capacitat de moviment, adherint-se així a les superfícies sòlides, i mostrant problemes per efectuar el procés de divisió cel·lular.

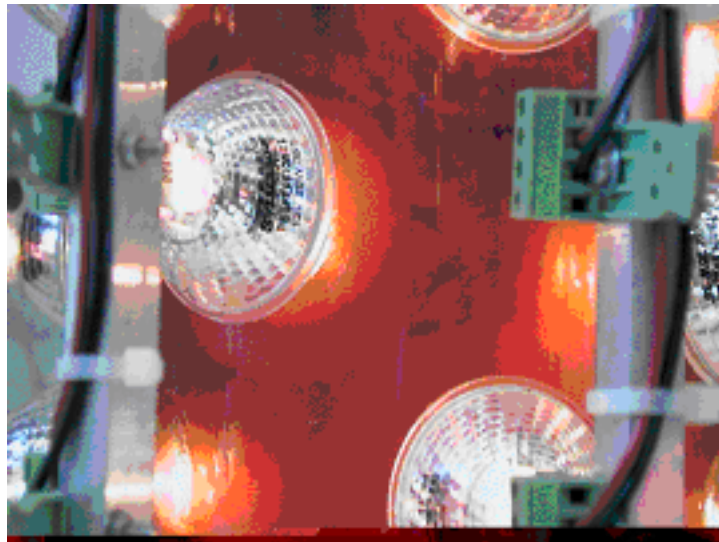


Figura 3.21.- adheriment de les cèl·lules de *R. rubrum* a les superfícies sòlides del compartiment ii quan el cultiu té un excés d'àcid acètic

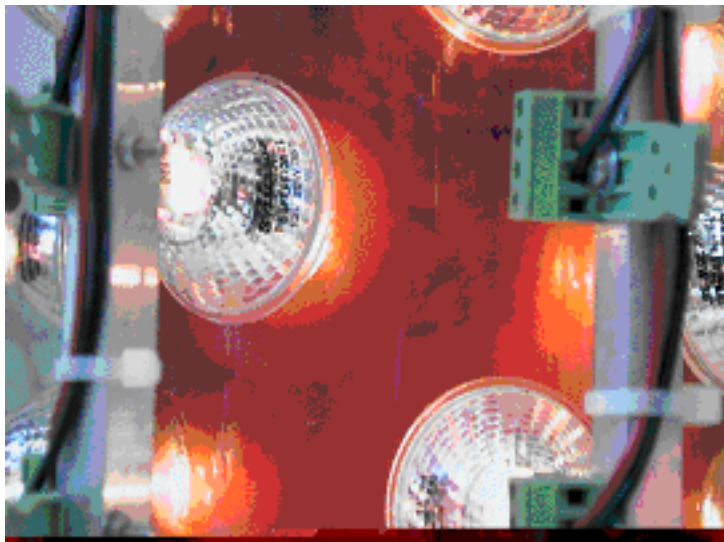


Figura 3.22.- morfologia de les cèl·lules de *R. rubrum* quan l'àcid acètic limita el cultiu

A)



B)





Figures 3.23 a i b.- Morfologia de les cèl·lules de *R. rubrum* quan l'àcid acètic està en excés en el cultiu

R. rubrum pot acumular dos polímers de reserva diferents: glicogen i polihidroxibutirat (PHB). La seva síntesi depèn bàsicament de la font de carboni que *R. rubrum* assimila. Les principals fonts de carboni que causen una acumulació de glicogen són: piruvat, malat, succinat i lactat. En canvi, les principals fonts de carboni que causen una acumulació de polihidroxibutirat són els àcids acètic i butíric (merrick, 1978). Tenint en compte que la única font de carboni usada en aquests experiments és l'àcid acètic és de suposar que els granuls intracel·lulars observats són de PHB.

S'ha analitzat la composició macromolecular de les cèl·lules de *R. rubrum* per cada estat estacionari assolit en aquests experiments per tal de veure els efectes de la variació de les condicions operacionals a la composició de la biomassa. Les diferents anàlisis efectuades en cada estat estacionari consisteixen en la determinació de la quantitat de carbohidrats, proteïnes, lípids, DNA, RNA, PHB, glicogen i composició elemental de les cèl·lules de *R. rubrum*.

Les condicions operacionals de les mostres analitzades es resumeixen a la taula 3.16.

Nº	F_R (W/m ²)	D (h ⁻¹)	$C_{entrada}$ (g C/L)	Pes sec (g/L)
Experiment I				
1	136	0.08	0.50	0.79
2	92	0.08	0.50	0.79
3	59	0.08	0.50	0.76
4	34	0.08	0.50	Adherides
5	18	0.08	0.50	Adherides
Experiment II				
6	260	0.08	0.50	0.75
7	260	0.12	0.50	0.71
Experiment III				
8	260	0.12	0.40	0.71
9	224	0.12	0.40	0.71
10	192	0.12	0.40	0.75
11	138	0.12	0.40	0.75
12	92	0.12	0.40	Adherides
13	58	0.12	0.40	Adherides

Taula 3.16.- Resum de les condicions de cada estat estacionari analitzat

La determinació de la quantitat de carbohidrats, proteïnes, DNA, RNA, PHB i glicogen present a les cèl·lules de *R. rubrum* s'ha dut a terme tal i com es presenta a als apartats A.3.8, A.3.9, A.3.10 i A.3.11 respectivament de l'annex materials i mètodes d'aquest document. Cada mostra s'ha analitzat tres vegades i la mitjana dels resultats, així com la seva dispersió, es presenten a les taules 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21 i 3.22.

Nº	Carbohidrats (% de pes sec)	Desviació estàndard
Experiment I		
1	11.01	2.86
2	11.05	1.15
3	11.47	2.56
4	11.87	1.64
5	11.66	1.98
Experiment II		
6	12.27	2.24
7	10.54	1.43
Experiment III		
8	9.57	1.56
9	10.69	3.03
10	10.03	2.19
11	10.98	0.81
12	9.31	1.38
13	9.90	1.70

Taula 3.17.- Resultats de la determinació de carbohidrats a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

Nº	Proteïnes (% de pes sec)	Desviació estàndard
Experiment I		
1	63.65	6.28
2	63.18	4.74
3	55.32	5.12
4	53.38	7.15
5	48.14	10.33
Experiment II		
6	64.17	2.98
7	63.49	8.72
Experiment III		
8	64.22	6.36
9	57.90	16.18
10	58.54	13.26
11	63.89	10.54
12	54.69	9.73
13	51.72	4.37

Taula 3.18.- Resultats de la determinació de proteïnes a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

Nº	DNA (% de pes sec)	Desviació estàndard
Experiment I		
1	3.73	1.38
2	5.31	0.63
3	3.99	1.09
4	1.72	1.08
5	2.90	0.32
Experiment II		
6	2.29	1.03
7	3.15	0.32
Experiment III		
8	1.48	1.67
9	2.48	0.13
10	2.33	0.62
11	1.17	0.06
12	0.66	0.05
13	2.26	0.99

Taula 3.19.- Resultats de la determinació de DNA a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

Nº	RNA (% de pes sec)	Desviació estàndard
Experiment I		
1	10.56	8.47
3	2.09	10.47
4	1.86	0.75
5	1.55	0.07
Experiment II		
6	2.06	0.09
7	1.09	0.08
Experiment III		
8	4.10	0.08
9	3.20	1.30
10	5.75	0.43
11	2.97	0.17
13	6.25	0.06

Taula 3.20.- Resultats de la determinació de RNA a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

Nº	PHB (% de pes sec)	Desviació estàndard
Experiment I		
1	6.47	1.18
2	6.53	1.37
3	19.91	2.87
4	12.36	2.17
5	32.45	0.96
Experiment II		
6	7.55	0.96
7	12.81	2.71
Experiment III		
8	12.00	1.72
9	20.90	1.63
10	31.45	2.69
11	13.93	1.55

Taula 3.21.- Resultats de la determinació de PHB a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

Nº	Glicogen (% de pes sec)	Desviació estàndard
Experiment I		
1	2.59	0.25
2	2.89	0.32
3	2.48	0.85
4	2.90	0.63
5	2.19	1.91
Experiment II		
6	2.60	0.20
7	1.29	0.18
Experiment III		
8	1.98	0.39
9	2.15	0.29
10	2.51	0.42
11	2.18	0.67
12	2.56	0.30
13	2.61	0.62

Taula 3.22.- Resultats de la determinació de glicogen a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

La determinació de lípids s'ha dut a terme tal i com es presenta a l'apartat A.3.6 de l'annex materials i mètodes. S'ha determinat, per triplicat, la concentració d'àcid palmític, palmitoleic i vaccínic de cada mostra, àcids grassos principals i majoritaris en

la composició cel·lular de *R. rubrum*. La mitjana de la concentració d'aquests lípids per cada mostra, així com la seva dispersió, es presenta a la taula 3.23.

Nº	Àcid palmític (mg/g)	Des. est.	Àcid palmitoleic (mg/g)	Des. est.	Àcid vaccínic (mg/g)	Des. est.	Total lípids (mg/g)	% pes sec
Experiment I								
1	9	3.9	12.9	4.3	27.6	4.2	49.5	4.95
2	9.6	0.3	14.5	0.0	30.6	0.1	54.7	5.47
3	10.4	1.1	15.5	1.1	30.4	1.7	56.3	5.63
4	13	1.7	16.9	1.5	36.5	2.1	66.4	6.64
5	13.1	4.3	16.3	4.1	35.5	4.5	64.9	6.49
Experiment II								
6	10.2	1.6	11.6	0.5	30.5	0.7	52.3	5.23
7	10.1	1.3	12.7	1.6	27.7	1.7	50.5	5.05
Experiment III								
8	9.4	1.2	13.4	1.6	26.1	1.6	48.9	4.89
9	10.1	0.7	14.5	0.1	29.5	0.1	54.1	5.41
10	8.5	4.2	12.4	4.3	25.6	4.9	46.5	4.65
11	10.4	1.6	13.7	1.7	33.6	1.6	57.7	5.77
12	13.6	3.7	16.9	3.0	39.2	3.6	69.7	6.97
13	10.7	0.8	13.8	0.9	31.3	1.0	55.8	5.58

Taula 3.23.- Resultats de la determinació de lípids a les cèl·lules de *R. rubrum* pels diferents estats estacionaris recollits a la taula 3.16

La composició elemental s'ha determinat tal i com es descriu a l'apartat A.3.13 de l'annex materials i mètodes d'aquest document. La mitjana dels triplicats analitzats per cada mostra de la concentració en percentatge de C, N, H i S, així com la seva dispersió, es presenta a la taula 3.24.

Nº	C %	Des. est.	N %	Des. est.	H %	Des. est.	S %	Des. est.
Experiment I								
1	47.46	0.11	11.20	0.03	7.28	0.13	0.41	0.01
2	47.47	0.09	11.05	0.10	7.16	0.16	0.39	0.0
3	48.62	0.05	10.35	0.19	7.27	0.07	0.43	0.04
4	50.73	0.12	10.86	0.02	7.73	0.12	0.37	0.01
5	50.00	0.01	9.42	0.01	7.12	0.03	0.32	0.01
Experiment II								
6	47.50	0.04	11.43	0.07	6.95	0.16	0.41	0.04
7	47.01	0.06	11.90	0.06	7.04	0.01	0.40	0.01
Experiment III								
8	47.20	0.28	11.20	0.04	6.91	0.13	0.36	0.03
9	48.00	0.22	11.05	0.13	7.04	0.20	0.41	0.02
10	47.61	0.01	10.64	0.0	7.00	0.06	0.38	0.01
11	49.38	0.12	10.92	0.02	7.23	0.11	0.38	0.01
12	49.53	0.20	10.16	0.06	7.33	0.09	0.34	0.02
13	49.13	0.16	9.32	0.03	7.09	0.09	0.31	0.02

Taula 3.24.- Resultats de la composició elemental

Nº	F _g (W/m ²)	D (h ⁻¹)	C _{canada} (gC/L)	Carbhidrats (% pes sec)	Proteïnes (% pes sec)	Lípids (% pes sec)	ADN (% pes sec)	ARN (% pes sec)	PHB (% pes sec)	Glicogen (% pes sec)	TOTAL (% pes sec)
Experiment I											
1	136	0.08	0.5	11.01	63.65	4.95	3.73	10.56	6.47	2.59	100.37
2	92	0.08	0.5	11.05	63.18	5.47	5.31	-	6.53	2.89	91.54*
3	59	0.08	0.5	11.47	55.32	5.63	3.99	2.09	19.91	2.48	98.41
4	34	0.08	0.5	11.87	53.38	6.64	1.72	1.86	12.36	2.90	87.83
5	18	0.08	0.5	11.66	48.14	6.49	2.9	1.55	32.45	2.19	103.19
Experiment II											
6	260	0.08	0.5	12.27	64.17	5.23	2.29	2.06	7.55	2.60	93.57
7	260	0.12	0.5	10.54	63.49	5.05	3.15	1.09	12.81	1.29	96.13
Experiment III											
8	260	0.12	0.4	9.57	64.22	4.89	1.48	4.10	12.00	1.98	96.26
9	224	0.12	0.4	10.69	57.90	5.41	2.48	3.20	20.90	2.15	100.58
10	192	0.12	0.4	10.03	53.54	4.65	2.33	5.75	31.45	2.51	107.75
11	138	0.12	0.4	10.98	63.89	5.77	1.17	2.97	13.93	2.18	98.71
12	92	0.12	0.4	9.31	54.69	6.97	0.66	-	-	2.56	71.63*
13	58	0.12	0.4	9.90	51.72	5.58	2.26	6.25	-	2.61	75.71*

Taula 3.25.- Resultats de la suma dels compostos macromoleculars analitzats. (*) No s'ha pogut determinar algun compost macromolecular d'aquesta mostra

A la taula 3.25 tots els resultats per cada mostra de biomassa, exceptuant el del glicogen que es troba inclòs com a carbohidrat, s'han sumat per tal de veure si la seva suma constitueix el 100% de la composició cel·lular. Tal i com s'observa en aquesta taula, la suma de tots els compostos macromoleculars s'aproxima força al 100 % de la massa cel·lular. La diferència entre aquests resultats i el 100% teòric és segurament deguda a que no s'han mesurat els elements minerals que componen la biomassa. D'altra banda, la dispersió de les anàlisis, fa també difícil arribar al 100% teòric. Si s'analitzen els resultats presentats a la taula 3.25, s'observen algunes tendències interessants quan es comparen les composicions macromoleculars amb les condicions de creixement, especialment en funció de la llum incident al cultiu. La concentració de carboni entrant sembla no tenir una gran influència en la composició cel·lular. Aquesta ha estat modificada per tal de poder tenir estats de limitació o excés de font de carboni en funció de cada cas. Les tendències observades, i que es descriuen a continuació, són iguals per les diferents velocitats de dilució. L'evolució macromolecular en funció de la llum incident es presenta a les figures 3.24 i 3.25 per una velocitat de dilució de 0.08h^{-1} , velocitat de dilució a la qual aquestes tendències s'observen més clarament.

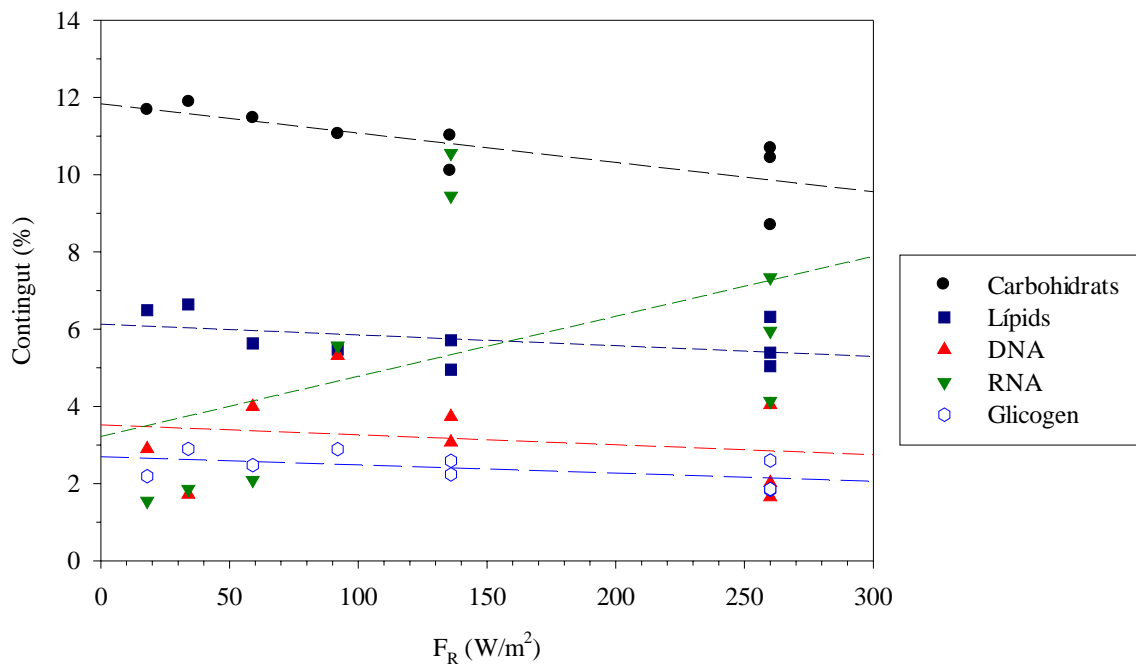


Figura 3.24.- Contingut de carbohidrats, lípids, àcids nucleics i glicogen en front de la llum incident al cultiu pel grup d'experiments amb una velocitat de dilució de 0.08 h^{-1}

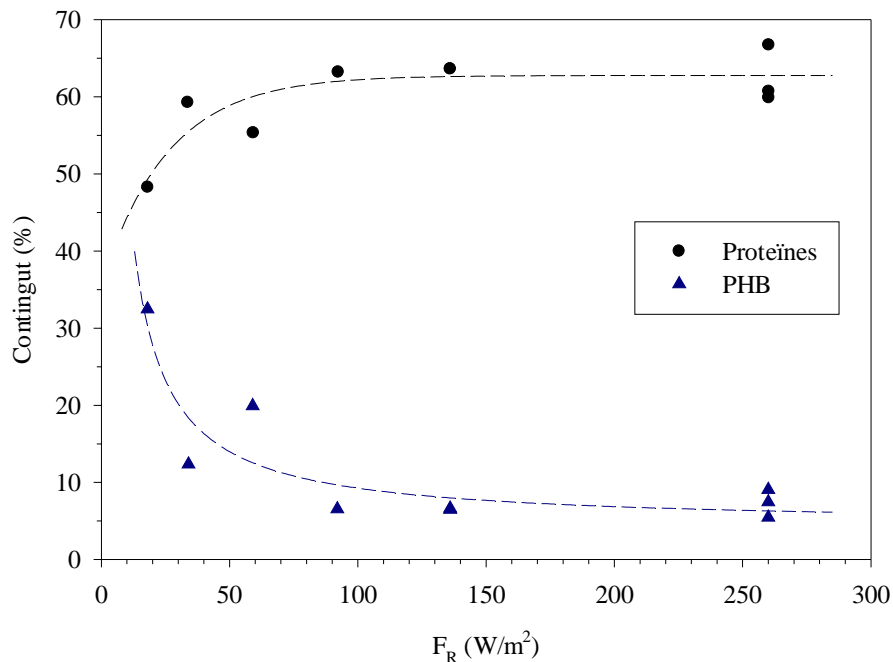


Figura 3.25.- Contingut de proteïnes i PHB en front de la llum incident al cultiu pel grup d'experiments amb una velocitat de dilució de 0.08 h^{-1}

Per una banda, a les figures 3.24 i 3.25 es pot observar que el contingut de carbohidrats, lípids, DNA, glicogen i PHB decreix de manera significativa quan creix la llum incident. D'altra banda, s'observa que el contingut de proteïnes i RNA és superior quan la llum incident al cultiu augmenta.

Aquest comportament pot explicar-se tenint en compte el fet de que quan la llum disponible global és major, la relació llum en funció de la quantitat de carboni és també alta i les cèl·lules molt possiblement readapten la seva composició (augmentant la seva capacitat enzimàtica), per preparar-se per tal de créixer amb una velocitat específica de creixement major. Conseqüentment, si les cèl·lules preveuen incrementar la seva composició proteica, augmenta també el contingut en RNA.

Quan la quantitat de llum incident disminueix i es fa suficientment petita per passar a limitar el cultiu, la font de carboni comença a trobar-se en excés i s'acumulen polímers intracel·lulars, bàsicament PHB, com a font de reserva de carboni i d'energia. A les condicions ambientals estudiades, el PHB s'acumula de manera major al glicogen, fet que ja s'esperava degut a la font de carboni que s'utilitza i també per la manca de CO_2 en el cultiu. Aquests resultats concorden amb els observats per Albiol (Albiol, 1994) on al disminuir l'acètic disponible, disminuïa la biomassa a l'estat estacionari i baixava el contingut en PHB

Així doncs, la producció de PHB és funció de la llum disponible en el cultiu i la quantitat de carboni lliure en aquest.

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquests experiments, cal destacar diferents factors rellevants.

El tercer compartiment no s'ha vist alterat per la presència en petites quantitats d'àcid acètic en el cultiu, i la connexió dels tres compartiments s'ha dut a terme de manera satisfactòria.

Ara bé, quan la llum ha estat el factor limitant en el compartiment II, han sorgit problemes per tal de que el reactor pogués treballar en continu, en concret associats al canvi morfològic de les cèl·lules i a la seva adhesió a les superfícies del reactor.

Quan les cèl·lules no són capaces de consumir tot el carboni present al cultiu, tendeixen a acumular-lo en forma de PHB en grànuls intracel·lulars, canviant la seva morfologia, tenint dificultats per moure's i per dividir-se i disminuint o fins i tot aturant el seu creixement.

Per tal de poder mantenir un cultiu de *R. rubrum* en continu cal, doncs, restablir unes condicions de cultiu on el carboni no es trobi en excés un cop s'observa que les cèl·lules estan canviant la seva morfologia, sinó, els problemes d'adherència de les cèl·lules a la superfície del reactor i la seva dificultat de divisió i creixement només es poden solucionar deixant el cultiu en discontinu i esperant a que les cèl·lules consumeixin tot l'excés de carboni i tot el carboni intracel·lular de reserva que han acumulat.

Aquests resultats semblen indicar que hi ha un marge òptim de condicions d'operació, de llum incident al cultiu i concentració de carboni, per tal de treballar en mode continu amb cultius de *R. rubrum*.

Els polihidroxicanoats (PHA's) són polimers d'hidroxicanoats que s'acumulen intracel·lularment com a reserva d'energia o de font de carboni quan el microorganisme es troba sota condicions de limitació d'algun factor nutricional com, per exemple, N, P, S i O (Durner, *et al.*, 2001). Recentment, l'estudi de la producció de polihidroxicanoats s'ha accelerat en tractar-se de polièsters hidrofòbics biodegradables que poden ser utilitzats com a substituïts de molts plàstics (Durner *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999, Williams *et al.*, 1999).

Ara bé, tot i que bibliogràficament s'han trobat moltes referències de *R. rubrum* com a microorganisme acumulador de PHB, no s'ha descrit mai anteriorment la dificultat que aquest microorganisme presenta per moure's i per seguir el seu procés de divisió cel·lular a l'acumular aquest polihidroxicanoat (Merrick, 1978; Merrick *et al.*, 1999; Lenz, *et al.*, 1988). Tenint en compte els resultats obtinguts i la bibliografia consultada podria dir-se que *R. rubrum* només presenta aquestes dificultats quan el factor limitant en el cultiu que provoca l'acumulació de PHB és la manca d'energia.

Així doncs, sembla que, 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. L'acumulació de PHB només requereix NADH que pot obtenir-se de l'oxidació de l'acètic. La manca o dificultat de moviment i de divisió observada pot atribuir-se a la manca d'energia existent, que es tradueix en nivells baixos de disponibilitat d'ATP. Aquesta disponibilitat baixa d'ATP implica també el no poder fer glicogen de l'àcid acètic ni fixar CO₂.

Aquest fet cal però estudiar-lo amb més deteniment i per altres fonts de carboni en treballs futurs. Del treball fet fins aquí es poden acotar les condicions necessàries a nivell macroscòpic per a assegurar un bon funcionament del compartiment II, però no es poden acabar d'establir amb detall quins són els mecanismes intracel·lulars implicats en els canvis morfològics observats.

3.3.- Efecte d'una entrada d'amoni i nitrit en el compartiment IVa

Continuant amb l'estudi de l'efecte de possibles perturbacions al funcionament del bucle es proposa a continuació analitzar com es veu afectat el funcionament del compartiment IVa quan hi ha una desviació del funcionament òptim del compartiment III. És a dir, quan tot l'amoni no és convertit a nitrat i, consegüentment entren amoni i nitrit en el compartiment IVa. Les possibles i més comuns desviacions que provocarien un funcionament no òptim del compartiment III, serien produïdes pel canvi de la velocitat de dilució o bé una disminució de la concentració d'oxigen disponible en aquest compartiment.

3.3.1.- Efecte d'un canvi en la velocitat de dilució de la connexió dels compartiments III i IVa

En aquest apartat, per tal d'avaluar l'efecte d'una entrada d'amoni i nitrit en el compartiment iva, es fa un canvi en la velocitat de dilució de la connexió dels compartiments III i IVa.

Per dur a terme aquest experiment s'usa el muntatge experimental explicat a l'apartat 3.1, on només es tenen connectats els compartiments III i IVa que són els necessaris per a fer aquest experiment. El medi usat per aquesta connexió és doncs, diferent al plantejat a l'apartat 3.1.

Per poder connectar ambdós compartiments es fa servir 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). Aquest medi, basat en la combinació de medis anteriors, es detalla a la taula 3.26.

Medi connexió	
<i>Component</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 medi</i>
A5	1.00
B6	1.00

Taula 3.26.- 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)

Les condicions d'operació usades en ambdós compartiments per dur a terme aquest experiment es presenten a la taula 3.27.

	Condicions I		Condicions II	
	Compartiment III	Compartiment IVa	Compartiment III	Compartiment IVa
T ($^{\circ}\text{C}$)	30	36.5	30	36.5
pH	8.2	9.5	8.2	9.5
V_{liquid} (L)	0.475	2.5	0.475	2.5
$Llum$ (W/m^2)	0	11	0	11
(dies)	0.79	4.13	0.41	2.17
D (h^{-1})	0.053	0.01	0.1011	0.0192
Q_L (L/dia)	0.6	0.6	1.2	1.2

Taula 3.27.- Condicions d'operació dels compartiments III i IVa durant aquest experiment

Les evolucions dels compartiments III i IVa al llarg d'aquest experiment de connexió es presenten a les figures 3.26 i 3.27.

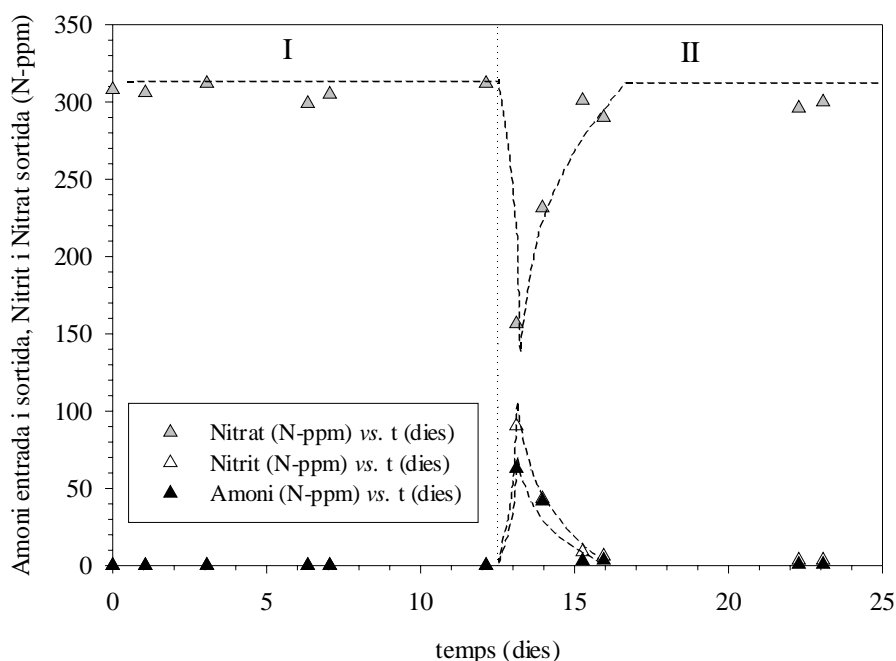


Figura 3.26.- Evolució del compartiment III operant amb les condicions presentades a la taula 3.27

Tal i com es veu a la figura 3.26, quan s'augmenta la velocitat de dilució el compartiment III no és capaç de convertir tot l'amoni a nitrat i, per tant, entren amoni i nitrit en el compartiment IVa. Aquesta situació és únicament transitòria i el compartiment III es recupera al cap de 72 h, quan s'ha adaptat el biofilm del compartiment III a les noves condicions, per tal de poder degradar la nova càrrega d'amoni.

Dades prèvies indiquen que, tot i que el nitrat és la principal font de nitrogen que s'utilitza pel creixement de *S. platensis*, l'amoni i el nitrit també poden ser usats (Ciferri, 1983; Richmond, 1986; Becker, 1994). De fet, s'ha observat que quan *S. platensis* disposa d'amoni i nitrat en el cultiu consumeix primer l'amoni (Guerrero i Lara, 1987). Ara bé, quan *S. platensis* creix en nitrat el seu creixement no es veu inhibit significativament pel nitrat fins que la concentració de nitrat no és de 16800 N-ppm

(Ciferri, 1983). En canvi, quan creix usant amoni com a font de nitrogen el seu creixement es veu inhibït quan la concentració d'amoni supera les 100 N-ppm (Richmond, 1986). El nitrit també pot ser assimilat per *S. platensis* tot i que n'és tòxic a certes concentracions (Becker, 1994). La concentració límit de toxicitat del nitrit no queda clarament definida a la bibliografia. En un cultiu fent servir nitrit i nitrat simultàniament com a font de nitrogen, es va observar que el nitrit començava a ser tòxic a partir de 18 N-ppm (Soyer, 1992). En canvi, en un altre estudi, la velocitat de creixement de *S. platensis* va ser estudiada per diferents fonts de nitrogen obtenint resultats semblants quan s'utilitzaven 28 N-ppm de nitrat o nitrit (Filali i Dubertret, 1996).

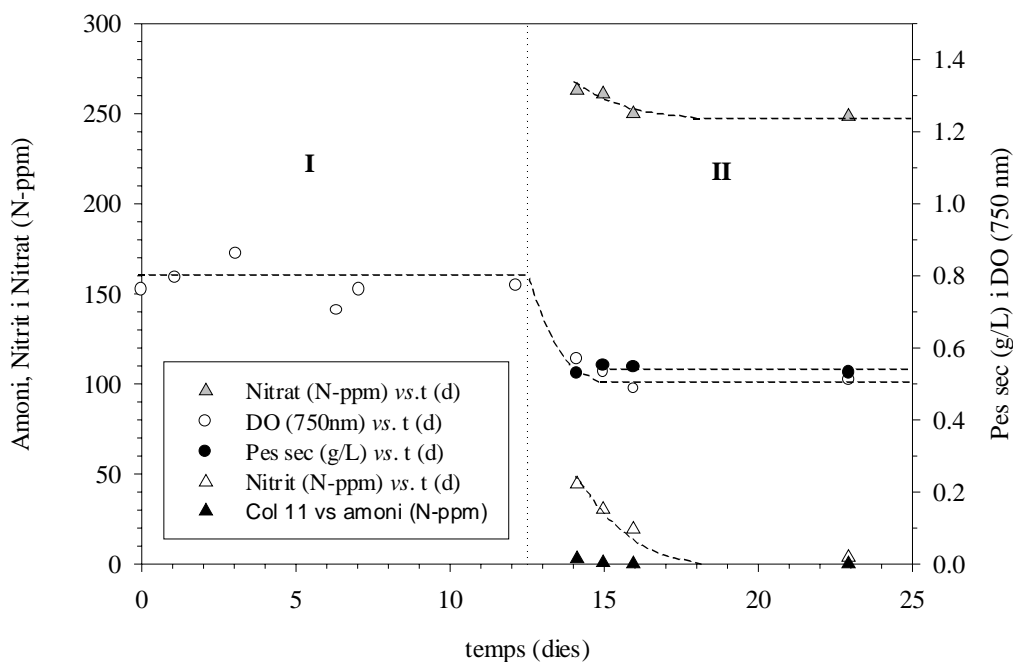


Figura 3.27.- Evolució del compartiment IVa operant amb les condicions presentades a la taula 3.27

A la figura 3.27 s'observa una disminució de la concentració de biomassa del compartiment IVa en dur a terme l'augment en la velocitat de dilució. Aquesta disminució es deu únicament al canvi de les condicions d'operació.

Si s'apreciés certa toxicitat deguda al nitrit, la concentració de biomassa hauria de recuperar-se quan disminueix la presència de nitrit en aquest compartiment, cosa que no succeeix. Així doncs, no s'observa cap efecte tòxic degut a la presència temporal de concentracions de nitrit de 50 N-ppm en el compartiment IVa.

Un consum preferent d'amoni quan hi ha amoni, nitrat i nitrit en el medi de cultiu s'observa també a la figura 3.27. Tot i que a l'entrada d'aquest compartiment hi ha un pic d'amoni similar al de nitrat, veure figura 3.26, no s'observa presència d'amoni a la sortida. Així doncs, tenint en compte aquest fet i que augmenta el consum de nitrat quan disminueix la presència d'amoni a l'entrada del cultiu, veure figures 3.26 i 3.27, es pot afirmar que l'amoni és consumit en aquest compartiment. Cal remarcar, però, que part de l'amoni entrant en el quart compartiment és rentat per la fase gas en forma d'amoniac gasós degut a l'elevat pH del cultiu.

Així doncs, en aquest experiment ha quedat demostrada la preferència del consum d'amoni per *S. platensis* quan disposa d'amoni i nitrat com a fonts de nitrogen.

S'ha observat que concentracions de nitrit superiors a les suposades tòxiques a la literatura (Soyer, 1992, Filiali i Dubertret, 1996) no han resultat tòxiques pel creixement de *S. platensis* en el compartiment IVa. Per tal de veure si el nitrit és parcialment consumit en aquest compartiment, s'ha comparat la corba teòrica de rentat de nitrit amb les concentracions experimentals de nitrit trobades en el reactor, tal i com es pot veure a la figura 3.28.

Per calcular la corba teòrica de rentat de nitrit, s'ha considerat que la concentració de nitrit en el corrent d'entrada pot ser menyspreada comparant amb la concentració de nitrit existent en aquell moment en el reactor. Fent aquesta assumptió i considerant que el reactor "air-lift" presenta mescla perfecta, la corba de rentat de nitrit pot calcular-se tal i com es descriu a l'equació 3.2.

$$[NO_2^-] = C_0 \exp^{-(t-t_0)/\tau} \quad (3.2)$$

on: $[NO_2^-]$ és la concentració de nitrit (N-ppm)
 t_0 és el temps inicial (h)
 t és el temps (h)
 τ és el temps de residència (h)
 C_0 és la concentració inicial de nitrit (N-ppm)

Substituint a l'equació 3.2 les condicions d'operació del compartiment IVa, presentades a la taula 3.27, s'obté l'equació 3.3.

$$[\text{nitrit}] = 29839.85 \exp^{-0.0192 t} \quad (3.3)$$

on el nitrit s'expressa en N-ppm i el temps en hores.

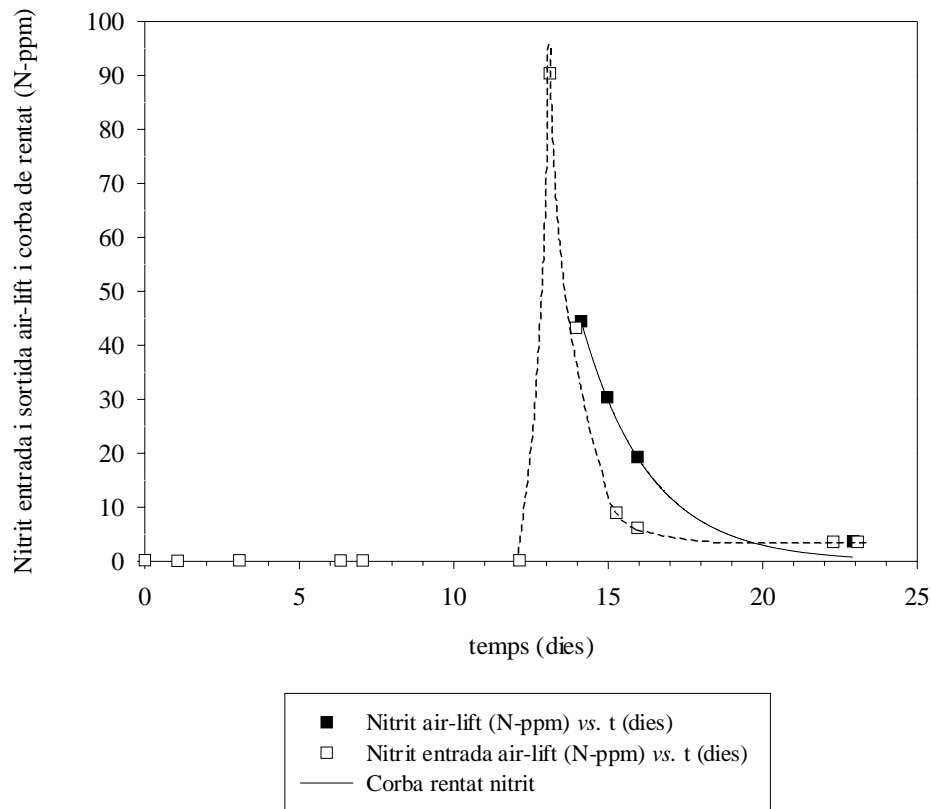


Figura 3.28.- Evolució de les concentracions experimentals de nitrit a l'entrada i sortida del compartiment IVa i corba teòrica de rentat del nitrit

Tal i com es desprèn de la figura 3.28., la corba teòrica de rentat de nitrit concorda perfectament amb la concentració experimental de nitrit en el quart compartiment. Així doncs, es pot afirmar que el nitrit no és consumit en aquest compartiment i que és completament rentat. Aquest fet s'ha de tenir en consideració ja que el medi sortint d'aquest compartiment ha de ser utilitzat en altres compartiments com, per exemple, en el compartiment de plantes superiors, IVb, o en el de la tripulació, compartiments on aquest nitrit sí que pot resultar tòxic.

3.3.2.- Efecte d'una disminució de la concentració d'oxigen del compartiment III sobre la connexió dels compartiments II, III i IVA

Finalment, una última pertorbació que es planteja estudiar en aquesta sèrie d'experiments efectuats en el bucle a nivell de laboratori és l'efecte d'una disminució de la concentració d'oxigen al compartiment III. La redundància d'aquesta prova ve del fet que conèixer l'aport necessari d'oxigen per tal que el compartiment III operi en condicions òptimes de funcionament és vital per la correcta operació del bucle.

Per dur a terme aquest experiment s'utilitza el mateix muntatge experimental que a l'aparat 3.1. En aquest cas, es tenen els compartiments II, III i IVA interconnectats i es disminueix la concentració d'oxigen del tercer compartiment, disminuint el cabal d'aireació, per tal de veure com en queda afectat i com afecten aquests canvis al compartiment IVa.

Les condicions d'operació dels compartiments II, III i IVA durant aquest experiment es presenten a la taula 3.28.

	Compartiment II	Compartiment III			Compartiment IVa
		I	II	III	
$V_{liquid} (L)$	2.4	0.475			2.5
$Llum (W/m^2)$	260	0	0	0	20
$D (h^{-1})$	0.04	0.07	0.07	0.07	0.017
$Q_L (L/dia)$	2.3	0.8 ^(**)	0.8 ^(**)	0.8 ^(**)	1.0 ^(*)
$t (dies)$	1.04	0.59	0.59	0.59	2.5
$Q_{Laire} (mL/min)$	0	≈20	≈10	75	1200

Taula 3.28.- Condicions d'operació dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment.

^(*) aquest cabal és superior al del tercer compartiment degut a l'addició de base pel control de ph

^(**) els motius de la diferència que s'observa entre els cabals del segon i tercer compartiment s'expliquen a l'apartat 3.1 d'aquest document

L'evolució dels compartiments II, III i IVa durant aquest experiment de connexió es presenta a les figures 3.29, 3.30 i 3.31.

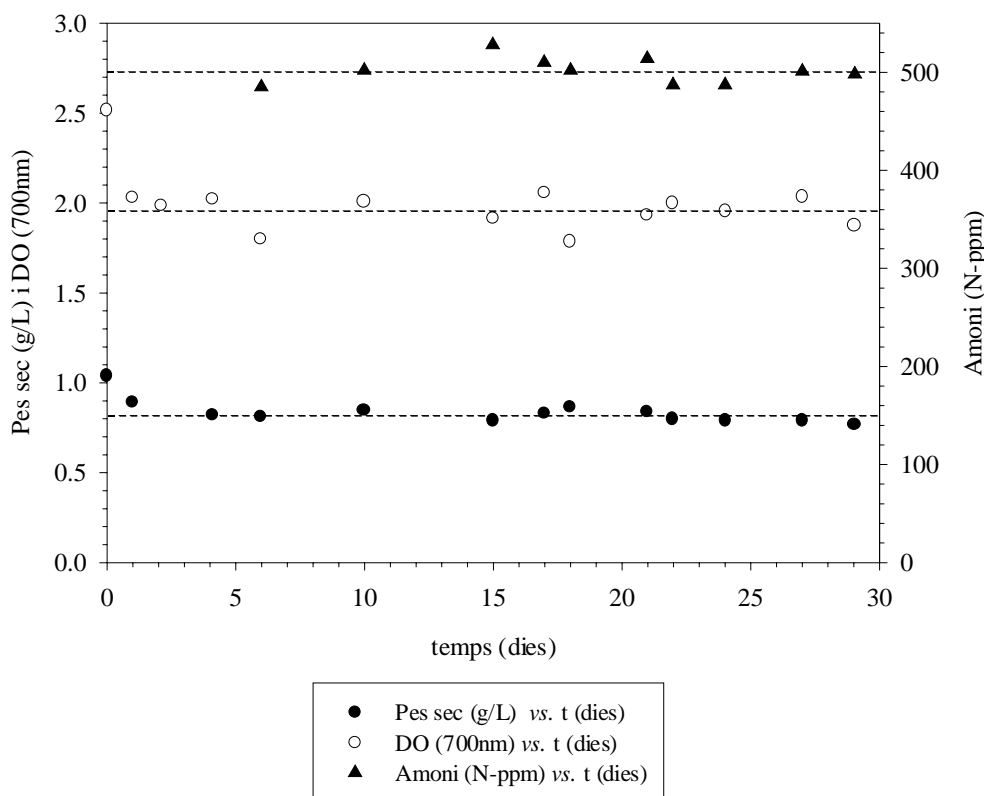


Figura 3.29.- Evolució del compartiment II operant amb les condicions presentades a la taula 3.28

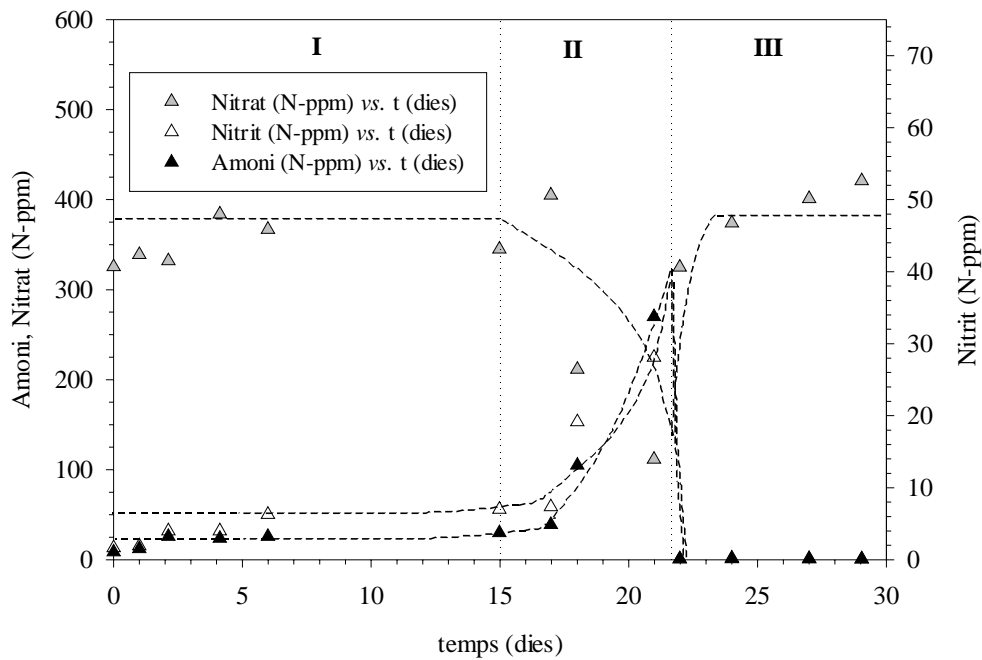


Figura 3.30.- Evolució del compartiment III operant amb les condicions presentades a la taula 3.28

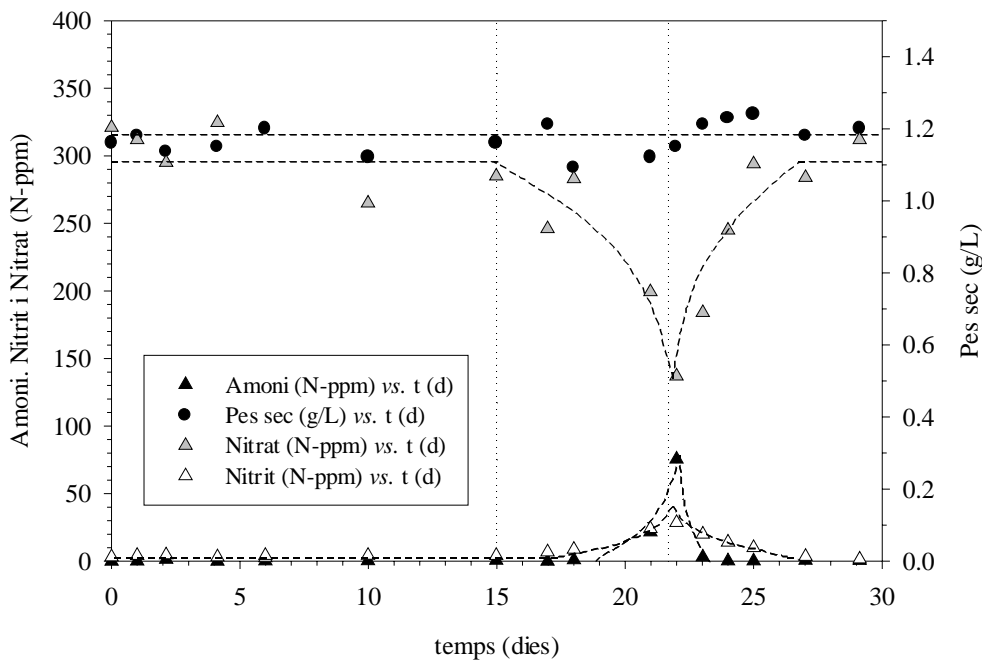


Figura 3.31.- Evolució del compartiment IVa operant amb les condicions presentades a la taula 3.28
La línies divisòries indiquen un canvi de condicions del compartiment III

El compartiment II presenta una situació completament estable, veure la figura 3.29. Fet que és d'esperar si es té en compte que presenta les mateixes condicions durant tot l'experiment, veure la taula 3.28.

Tal i com s'observa a la figura 3.30, quan es disminueix la concentració d'oxigen i aquest passa a limitar en el compartiment III, no tot l'amoni pot ser convertit a nitrat, trobant amoni i nitrit a la sortida d'aquest compartiment, condicions d'operació II. És a dir, hi ha amoni i nitrit a l'entrada del compartiment IVa.

Igual que s'ha descrit a l'apartat 3.3.1, de la figura 3.31 es desprèn la preferència de *S. platensis* per consumir amoni com a font de nitrogen quan té amoni, nitrat i nitrit en el medi de cultiu. S'observa un pic d'amoni entrant al compartiment IVa superior al pic de nitrit i, en canvi, gairebé no hi ha amoni a la sortida d'aquest compartiment. Només trobem amoni a la sortida quan aquest es troba en excés i la biomassa no el necessita. Cal dir, també, que part de l'amoni és rentat en fase gasosa degut a l'elevat pH del cultiu. A la figura 3.32, es presenta la corba teòrica de rentat del nitrit en el compartiment iva per les condicions d'operació III, veure la taula 3.28. Durant les condicions d'operació III, a l'augmentar l'aport d'oxigen, el compartiment III recupera el seu funcionament òptim i tot l'amoni és degradat a nitrat fent que no entri més nitrit en el compartiment iva, podent així, representar la corba de rentat de nitrit teòrica del compartiment iva. Aquesta corba s'ha obtingut substituint les condicions d'operació d'aquest experiment, que es troben a la taula 3.28, a l'equació 3.2.

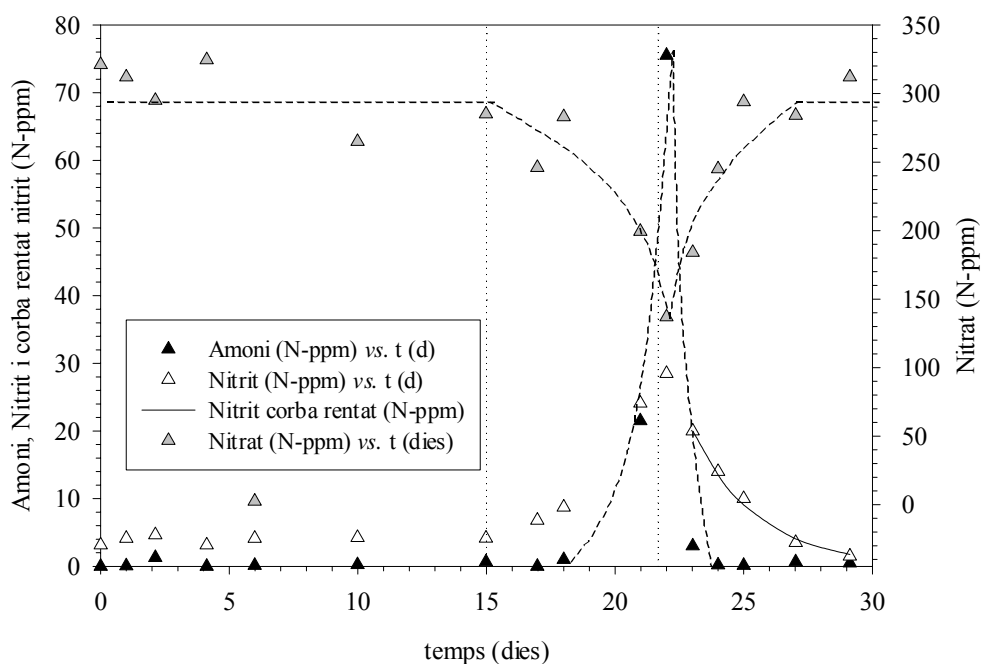


Figura 3.32.- concentració experimental de nitrit en el compartiment iva i corba teòrica de rentat del nitrit. Les línies divisòries indiquen els canvis de condicions del compartiment III

Per tant, es pot afirmar que el nitrit no és consumit en el compartiment IVa i que és completament rentat del reactor, veure la figura 3.32.

3.4.- Connexió a escala de laboratori dels compartiments II, III i IVa usant una barreja d'àcid acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del compartiment II

Un cop s'ha demostrat la viabilitat de connectar en fase líquida i a escala de laboratori els compartiments II, III i IVa, quan s'usa àcid acètic com a font de carboni del segon compartiment, cal aproximar-se més al funcionament real del bucle MELISSA, on l'aliment del segon compartiment és la sortida del primer.

A la sortida del primer compartiment hi ha una barreja dels següents àcids grassos volàtils: acètic, propiònic, butíric, isobutíric, valèric i isovalèric.

Així doncs, en aquest apartat es planteja l'estudi de la viabilitat de funcionament de la connexió d'aquests tres compartiments quan el medi d'entrada dels segon compartiment conté una barreja d'àcid acètic, propiònic i butíric, àcids grassos volàtils majoritaris a la sortida del primer compartiment (Hermans i Demey, 1998).

Tant el muntatge experimental usat per dur a terme aquest experiment com el medi de connexió són els presentats a l'apartat 3.1, amb l'única diferència que ara la font de carboni del segon compartiment enlloc de ser exclusivament àcid acètic és, com ja s'ha dit, una barreja dels tres àcids volàtils.

3.4.1.- Establiment de les condicions d'operació del compartiment II

Per un funcionament òptim del bucle MELISSA, tots els àcids volàtils presents en el segon compartiment han de ser consumits en aquest. Així doncs, per dur a terme la connexió en condicions òptimes de funcionament cal establir inicialment les condicions d'operació del compartiment II.

Per realitzar aquest estudi, s'ha afegit al medi de connexió diferents concentracions d'àcids acètic, propiònic i butíric i s'ha estudiat el comportament del compartiment II treballant a diverses condicions d'operació, les quals es descriuen a la taula 3.29.

Com a concentració inicial de treball d'AGV s'ha decidit treballar amb 0.5 gC/L en el medi d'entrada, ja que en experiments preliminars, veure l'apartat 3.2, s'ha observat que *R. rubrum* pot consumir amb diferents intensitats de llum subministrades al cultiu 0.5g C/L en forma d'àcid acètic, a velocitats de dilució força elevades ($D=0.08h^{-1}$). Per tal de simular les condicions reals d'operació del bucle MELISSA, la proporció entre els tres AGV utilitzats s'estableix semblant a la que s'obté del primer compartiment (Hermans i Demey, 1998).

	Compartiment II				
	I	II	III	IV	V
$V_{líquid} (L)$	2.4				
$Q_L (L/dia)$	0.850	BATCH	0.5	0.850	1.225
$t (dies)$	2.82	BATCH	4.80	2.82	1.96
$D (h^{-1})$	0.0148	BATCH	0.0087	0.0148	0.0212
Acètic (g/L)	0.625	BATCH	0.625	0.313	0.313
Butíric (g/L)	0.469	BATCH	0.469	0.235	0.235
Propiònic (g/L)	0.156	BATCH	0.156	0.081	0.081
Llum (W/m^2)	250	250	250	250	250

Taula 3.29.- Condicions experimentals provades en el compartiment II

L'evolució del compartiment II al llarg d'aquest experiment es presenta a la figura 3.33.

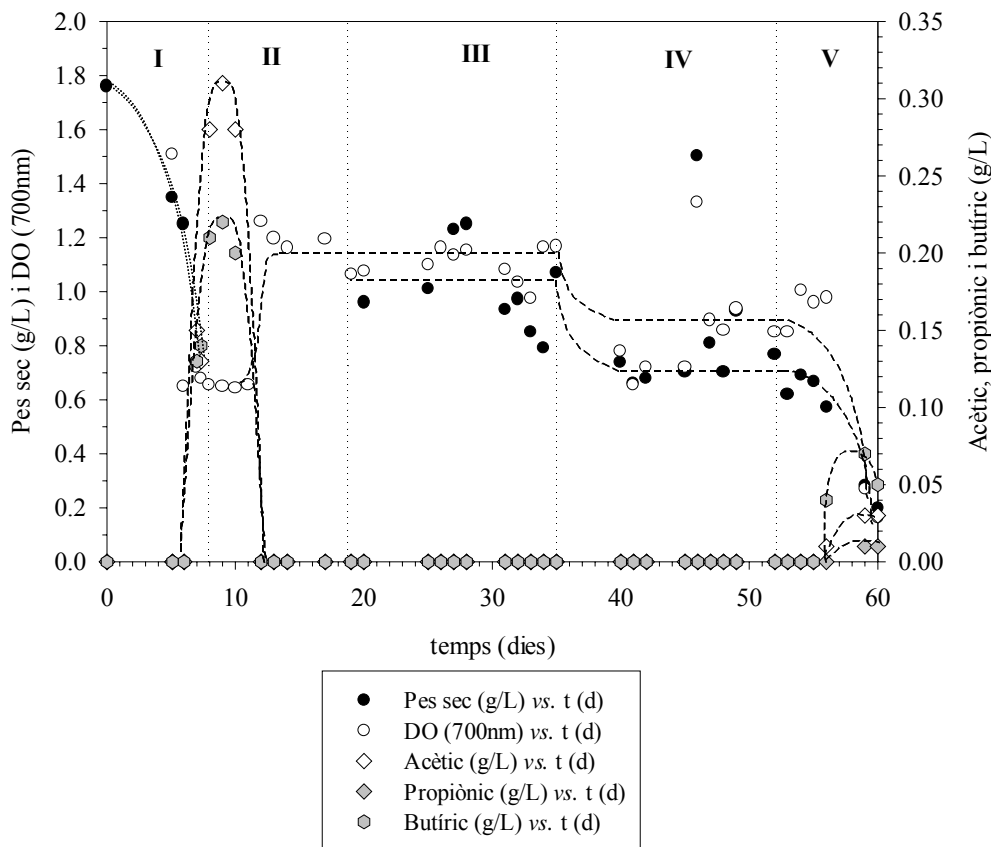
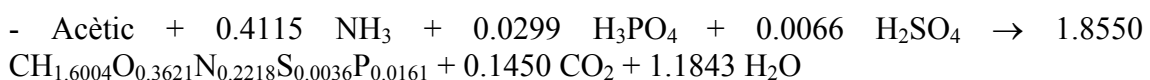
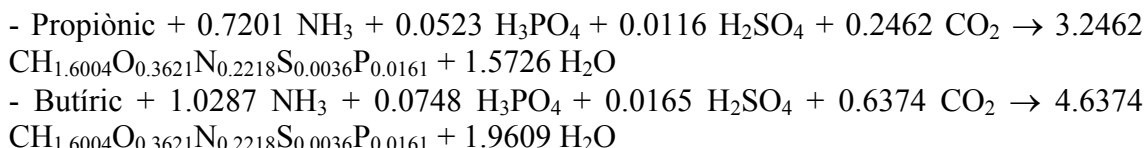


Figura 3.33.- Evolució del compartiment II quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.29

Tal i com es desprèn de la figura 3.33, quan el reactor opera amb les condicions I es renta. Per aquest motiu es deixa en discontinu fins que tots els àcids grassos volàtils són consumits augmentant consegüentment la concentració de biomassa, condicions II. Es torna, posteriorment, a re-emprendre el cultiu en continu, condicions III, amb una velocitat de dilució inferior. Quan s'usen aquestes condicions d'operació, el compartiment II opera de manera òptima pel funcionament del bucle MELISSA, és a dir, tots els AGV entrants són consumits en aquest compartiment. Tot i això, usant aquestes condicions d'operació la velocitat de dilució és molt baixa. Si es considera que cal esperar 5 temps de residència per assolir un estat estacionari, això suposa esperar 25 dies. Per tal de poder augmentar la velocitat de dilució, i tenint en compte que l'energia subministrada no pot augmentar-se per motius operacionals, es disminueix la concentració d'AGV en el medi d'entrada, condicions IV. Quan s'usen aquestes condicions d'operació, el reactor es troba en condicions òptimes de funcionament. Un cop assolit l'estat estacionari, la velocitat de dilució s'augmenta, condicions V, per tal de veure en quin rang de velocitats de dilució el compartiment II opera en condicions òptimes.

Els balanços de carboni durant els estats estacionaris presentats en les condicions d'operació III i IV s'indiquen a la taula 3.30. Les equacions estequiomètriques usades per dur a terme aquests balanços són les que es presenten a continuació, (Favier-Teodorescu *et al.*, 1999):





	Balanç de carboni			
	III		IV	
	Entrada (gC/L)	Sortida (gC/L)	Entrada (gC/L)	Sortida (gC/L)
<i>Acètic</i>	0.250	-	0.125	-
<i>Butíric</i>	0.254	-	0.127	-
<i>Propiònic</i>	0.080	-	0.040	-
<i>CO₂</i>	0.046	0.02	0.023	0.01
<i>cèl·lules</i>	0	0.55	0	0.34
TOTAL	0.63	0.57	0.32	0.35

Taula 3.30.- Balanços de carboni del compartiment II. Condicions III i IV.

Tal i com es veu a la taula 3.30, els balanços de carboni es poden considerar tancats. Si s'accepta un 10% d'error experimental, el carboni d'entrada coincideix amb el de sortida en ambdues condicions d'operació.

D'aquest experiment se'n desprèn que utilitzant un mateix aport energètic que en experiments anteriors amb acètic, la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum* és molt inferior a la que s'obté quan la font de carboni d'aquest compartiment és exclusivament àcid acètic. Així doncs, per unes mateixes condicions d'operació, quan s'augmenta el nombre d'AGV, i la llargada de la cadena de carbonis d'aquests en el medi d'entrada, la velocitat màxima de creixement de *R. rubrum* disminueix. Fet també observat per Cornet i Albiol (2000).

Un cop fixades les condicions amb les quals el segon compartiment opera de manera òptima pel funcionament del bucle MELISSA, ja es pot procedir amb la connexió dels compartiments II, III i IVa a escala de laboratori.

3.4.2.- Resultats de la connexió dels compartiments II, III i IVa usant àcid acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del compartiment II

Les condicions d'operació usades per dur a terme la connexió a escala de laboratori dels compartiments II, III i IVa quan s'usa una barreja d'àcid acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del segon compartiment es presenten a la taula 3.31. D'entrada no es vol tenir AGV a la sortida del compartiment II, és a dir, es vol que aquest operi en condicions òptimes de funcionament.

	Compartiment II	Compartiment III			Compartiment IVa		
		I	II	III	I	II	III
$V_{liquid} (L)$	2.4	0.475			2.25		
$Llum (W/m^2)$	250	0	0	0	20	20	20
$D (h^{-1})$	0.015	0.031	0.031	0.053	0.0074	0.0074	0.0120
$Q_L (L/dia)$	0.875	0.35 ^(**)	0.35 ^(**)	0.6 ^(**)	0.4 ^(*)	0.4 ^(*)	0.65 ^(*)
$t (dies)$	2.74	1.36	1.36	0.79	5.63	5.63	3.46
Connexió		III-IVa	3 comp	3 comp	III-IVa	3 comp	3 comp

Taula 3.31.- Condicions d'operació de la connexió al llarg d'aquest experiment

- (*) aquest cabal és superior al del tercer compartiment degut a l'addició de base pel control de pH
(**) Els motius de la diferència que s'observa entre els cabals del segon i tercer compartiment s'expliquen a l'apartat 3.1 d'aquest document

Tal i com es veu a la taula 3.31, el compartiment II opera sempre amb les mateixes condicions. Es vol que aquest compartiment treballi en condicions òptimes de funcionament pel bucle MELISSA. Inicialment, durant les condicions I, els compartiments III i IVa estan interconnectats però no estan connectats amb el segon compartiment. La connexió entre els tres compartiments comença amb les condicions d'operació II. La velocitat de dilució dels compartiments III i IVa en les condicions d'operació II és força baixa, requerint molt de temps perquè el compartiment IVa arribi a un estat estacionari. Així doncs, aquesta velocitat de dilució s'augmenta, condicions d'operació III. El fet de que el compartiment IVa presenti un cabal d'entrada superior al del compartiment III es deu a l'entrada de base necessària per regular-ne el pH. No es vol que aquest compartiment estigui limitat per la font de carboni, CO₂, i, per tant, aquesta és introduïda en excés, requerint una entrada de base per tal d'ajustar el pH del cultiu al valor desitjat.

L'evolució dels compartiments II, III i IVa al llarg d'aquest experiment es presenta a les figures 3.34, 3.35 i 3.36.

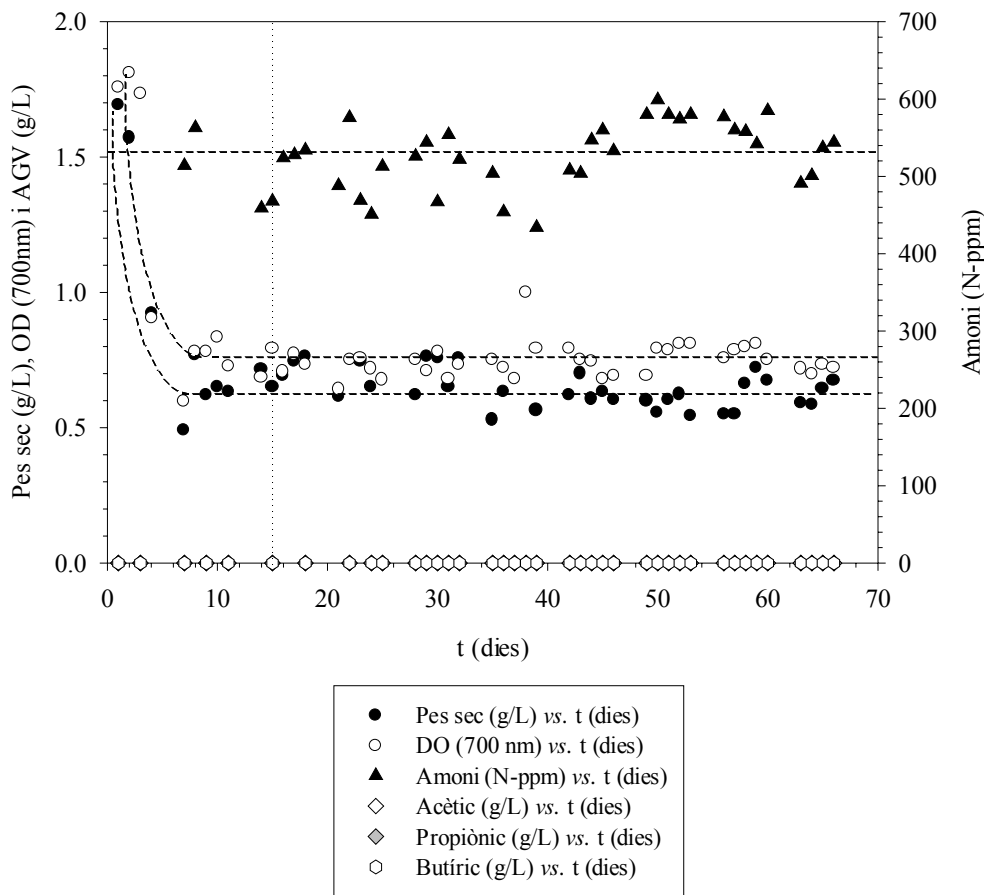


Figura 3.34.- Evolució del compartiment II quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.31
La línia divisòria indica l'inici de la connexió d'aquest compartiment amb els compartiments III i IVa

Tal i com es veu a la figura 3.34, el compartiment II està operant en condicions òptimes de funcionament pel bucle MELISSA, és a dir, tots els AGV que entren en aquest compartiment hi són consumits.

Els balanços de carboni i de nitrogen d'aquest compartiment es presenten a les taules 3.32 i 3.33. Per dur a terme aquests balanços s'han utilitzat les estequiometries presentades a l'apartat 3.4.1. Si s'admet un 10% d'error experimental, es pot concloure que es compleixen els balanços de matèria per al nitrogen i carboni.

	Balanç de carboni	
	<i>Entrada</i> (gC/L)	<i>Sortida</i> (gC/L)
<i>Acètic</i>	0.125	-
<i>Butíric</i>	0.127	-
<i>Propiònic</i>	0.040	-
<i>CO₂</i> ^(*)	0.023	0.01
<i>Cèl.lules</i>	0	0.32
TOTAL	0.32	0.33

Taula 3.32.- Balanç de carboni del segon compartiment

(*) El CO₂ no s'ha mesurat, s'ha calculat en funció de les estequiometries de degradació dels diferents àcids volàtils per part de *R. rubrum*

	Balanç de nitrogen	
	Entrada (N-ppm)	Sortida (N-ppm)
Amoni	600	530
Cèl.lules	0	81
TOTAL	600	611

Taula 3.33.- Balanç de nitrogen del segon compartiment

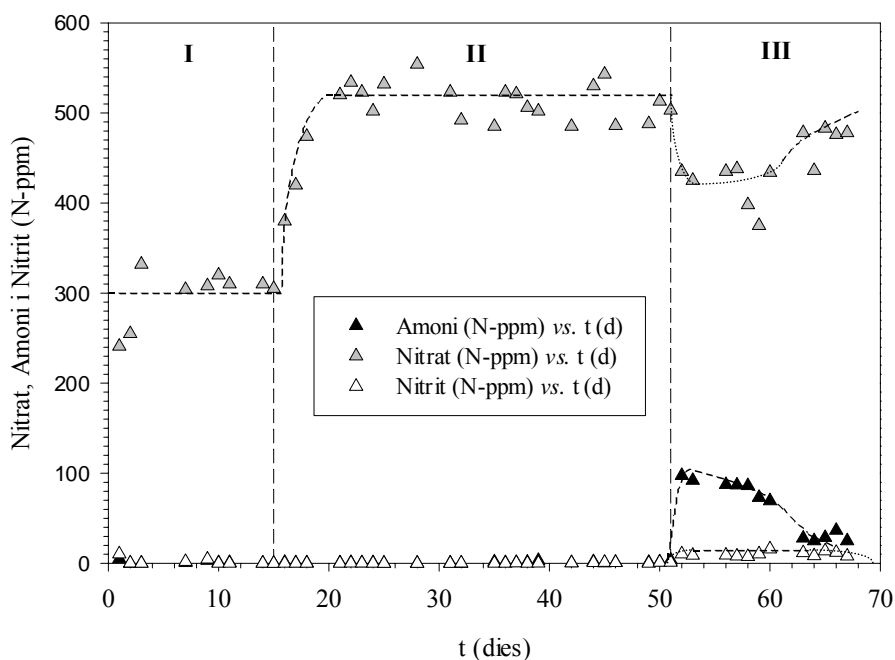


Figura 3.35.- Evolució del compartiment III quan opera amb les condicions presentades a la taula 3.31
I, II, III: Condicions d'operació assajades

En les condicions d'operació I i II tot l'amoni entrant en el compartiment III, en les condicions d'operació I 300 N-ppm i en les II 530 N-ppm, és convertit a nitrat, tal i com s'indica a la figura 3.35. En canvi, quan la velocitat de dilució augmenta, condicions d'operació III, es presenta un estat transitori on es troben amoni i nitrits a la sortida d'aquest compartiment. Tant la concentració d'amoni com la de nitrit disminueixen amb el temps a mesura que es va formant més biofilm i s'adapta l'existent a les noves condicions d'operació, augmentant així la capacitat de degradació de la columna.

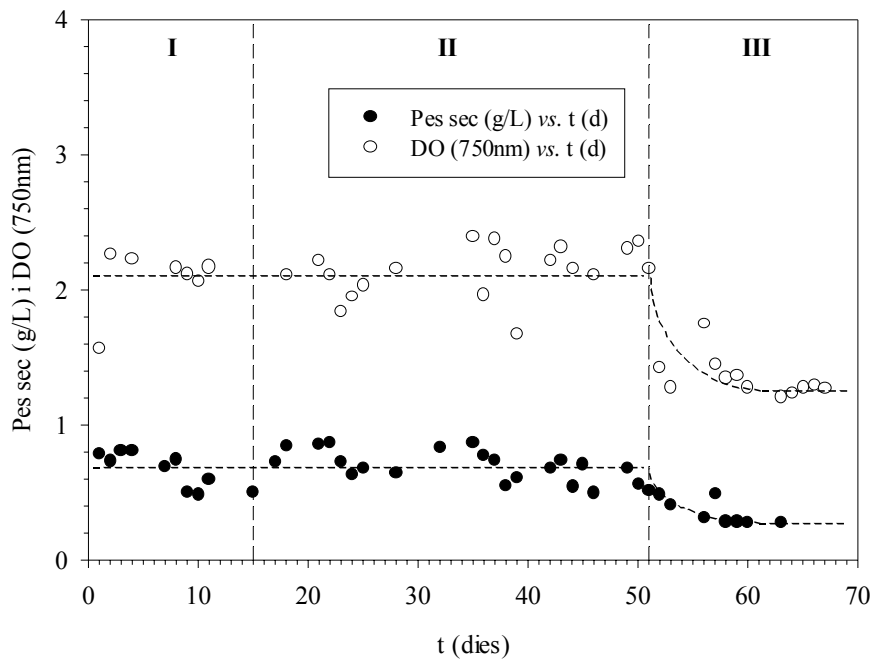


Figura 3.36.-Evolució del compartiment IVa quan opera amb les condicions descrites a la taula 3.31
I, II, III: Condicions d'operació assajades

En l'evolució del quart compartiment, figura 3.36, no s'observen canvis de la concentració de biomassa en passar de les condicions d'operació I a II. Així doncs, no es té constància de la presència de cap efecte tòxic o nociu degut a la connexió d'aquest compartiment amb els compartiments II i III. La concentració de biomassa disminueix quan es passa a operar amb les condicions d'operació III. Aquesta disminució és deguda a l'augment de la velocitat de dilució que suposa aquest canvi de condicions.

Així doncs, la connexió a escala de laboratori dels compartiments II, III i IVa s'ha dut a terme de manera satisfactòria usant una barreja d'àcid acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del segon compartiment.

3.4.3.- Anàlisis elementals de mostres de medi i biomassa

Al llarg d'aquest experiment s'han anat traient mostres de biomassa i medi de cada compartiment, exceptuant mostres de biomassa del compartiment iii que, en ser un lilit fix, no poden ser extretes sense pertorbar les seves condicions d'axenicitat, per tal de fer un seguiment extens de la concentració de diferents elements. Es poden fer així balanços elementals i avaluar les necessitats reals que es tenen de cada un d'aquests elements per dur a terme la connexió sense que cap d'ells sigui limitant.

Així doncs, s'han analitzat 11 elements diferents (na, k, mg, ca, b, p, mn, fe, ni, cu i zn) de diverses mostres de medis d'entrada, sortida i de biomassa de cada compartiment. Aquestes anàlisis es presenten a la taula 3.34.

Tal i com es veu en aquesta taula, hi ha una gran concordança entre els resultats de les diferents mostres de medi o biomassa d'un mateix compartiment. Les diferències observades es poden atribuir a la complexitat del procediment experimental perquè aquest sigui reproducible: el medi de sortida del compartiment II s'ha de centrifugar i filtrar, el del compartiment III s'ha de filtrar i el del iva s'ha de filtrar dues vegades

abans de poder-los analitzar. Així doncs, si s'ha produït certa precipitació, aquests elements són eliminats durant aquests processos de separació. La biomassa s'ha de rentar i liofil·litzar. Qualsevol diferència en el procediment de rentat o una inhomogeneïtat de la mostra comporta conseqüentment una variació en el resultat de les anàlisis. Cal tenir en compte, també, que el medi d'entrada no és sempre exactament el mateix. El medi es prepara en ampolles de 20l essent la quantitat de cada component afegida no exactament la mateixa i l'enras amb aigua no gaire precís al fer-se a ull.

Tenint en compte aquests factors, cal dir que la composició teòrica del medi d'entrada i l'experimental estan en molta concordància, exceptuant el Zn i el Na, com es pot veure a la taula 3.34. La concentració de Zn experimental és superior a la teòrica. Dues explicacions per aquest fet serien la possible addició de Zn com a impuresa d'algun altre compost i/o alguna possible interferència d'algun element del medi que afecti a l'anàlisi del Zn. La concentració experimental de Na és també molt superior a la teòrica; aquest fet s'explica per l'addició de NaOH usada per l'ajust del pH del medi d'entrada.

A la taula 3.34 s'observa un increment en les concentracions de Na i B del medi d'entrada del compartiment II al medi de sortida del compartiment IVa. L'augment de la concentració de Na és deguda, possiblement, a l'addició de NaOH que s'utilitza per regular el pH dels cultius dels compartiments II i IVa. En canvi, l'augment en la concentració de B només pot ser explicada si hi ha algun tipus d'interferència d'algun altre element en l'anàlisi del B o si es desprèn B de les ampolles d'àcid o base dels bioreactors, que facin augmentar-ne la concentració.

A la taula 3.35 es presenta un balanç elemental per cada compartiment. Tal i com es pot veure, els diferents balanços no coincideixen. La diferència de concentracions de cada element entre l'entrada i sortida de cada compartiment és superior a la quantitat de cada element requerida per produir la biomassa present en el compartiment (0.6g/l *R. rubrum*, i 0.4 g/l *S. platensis*, veure les figures 3.34 i 3.36). Això pot ser degut a diversos factors, a l'eliminació de certa concentració de cada element durant les etapes de separació a causa de certa precipitació i també a l'efecte de dilució causat per l'addició d'àcid o base pel control del pH del cultiu.

D'aquestes taules se'n desprèn la necessitat real, dels micronutrients estudiats, que tenen aquests microorganismes per créixer. A partir d'aquestes dades es pot predir algun excés o mancança d'aquests elements en el medi real de connexió del bucle melissa. Cal destacar també la pèrdua observada d'aquests micronutrients que pot atribuir-se, tal i com s'ha comentat anteriorment, als processos de separació intermedis entre els diferents reactors.

			Na	K	Mg	Ca	B	P	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
CII	<i>medi entrada</i>	ppm	314	378	113.3	25.3	0.7	175.2	3.6	5.2	<0.3	<0.1	0.31
	<i>sortida C II</i>	ppm	394	372	85.6	24.2	0.9	97.6	3.3	5.6	<0.3	<0.1	0.28
	Entrada-sortida	ppm	-80	6	27.7	1.1	-0.2	77.6	0.3	-0.4	<0.3	<0.1	0.03
	<i>R. rubrum</i> 0.65 g/L	ppm	1.67	3.17	3.65	1.13	0.02	13.64	0.06	0.75	0	0.02	0.02
CIII	<i>sortida C II</i>	ppm	394	372	85.6	24.2	0.9	97.6	3.3	5.6	<0.3	<0.1	0.28
	<i>sortida C III</i>	ppm	1511	353	79.5	23.0	1.3	89.1	3.1	4.7	<0.3	<0.1	0.30
	sortida CII-CIII	ppm	-1117	19	6.1	1.2	-0.4	8.5	0.2	0.9	<0.3	<0.1	-0.02
CIVa	<i>entrada C IVa</i>	ppm	1511	353	79.5	23.0	1.3	89.1	3.1	4.7	<0.3	<0.1	0.30
	<i>sortida C IVa</i>	ppm	2355	297	55.8	15.4	2.9	73.8	2.1	1.7	<0.3	<0.1	0.29
	entrada-sortida	ppm	-844	56	23.7	7.6	-1.6	15.3	1	3	<0.3	<0.1	0.01
	<i>S. platensis</i> 0.4 g/L	ppm	4.34	5.83	1.12	0.39	0.06	3.67	0.01	0.25	0	0.01	0.07

Taula 3.35.- Balanços elementals de cada compartiment

	mostra	Na	s.d.	K	s.d.	Mg	s.d.	Ca	s.d.	B	s.d.	P	s.d.	Mn	s.d.	Fe	s.d.	Ni	s.d.	Cu	s.d.	Zn	s.d.
<i>S. piliferensis</i> (mg/kg)	1	11543	441	13834	256	2931	181	860	35	184.9	1.5	9200	500	28.3	0.2	558	2	12.0	0.3	19.0	0.3	192.7	0.4
	2	9272	459	16220	258	3070	182	855	37	109.6	1.1	9864	501	33.9	0.2	708	2	7.3	0.3	7.0	0.4	120.5	0.4
	3	11713	456	13650	253	2417	181	1206	34	176.1	1.4	8396	500	27.6	0.2	577	2	5.8	0.3	7.8	0.3	193.5	0.4
	mijjana	10843	1363	14568	1434	2806	344	973	201	157	41	9153	735	29.9	3.5	614	82	8.4	3.2	11.3	6.7	168.9	41.9
<i>R. pubescens</i> (mg/kg)	1	2793	18	2640	320	4057	183	1961	34	21.9	1.1	16798	479	30.6	0.2	557	3	<1.9		22.2	0.3	31.1	0.5
	2	988	23	6123	295	7061	172	1714	35	28.2	1.1	21558	456	91.1	0.2	857	2	4.7	0.4	29.5	0.3	34.1	0.5
	3	801	20	4794	340	5021	201	1806	39	23.5	1.3	19541	526	176.0	0.3	2693	3	<1.9		26.7	0.4	33.3	0.5
	4	5716	18	5951	290	6337	171	1450	35	24.3	1.1	26012	433	49.2	0.2	505	3	<1.9		14.9	0.3	35.2	0.5
mijjana	2575	2279	4877	1604	5619	1340	1733	214	24.5	2.7	20977	3882	86.7	64.7	1153	1038	2.5		23.3	6.4	33.5	1.8	
<i>mezà</i> (mg/L)	233		362		118		24.7		0.5		221		3.4		6.6		0.1		0.02		1e-3		
<i>scorrida</i> <i>C II</i> (mg/L)	1	314	13	378	3	113.3	0.5	25.3	1.5	0.7	0.1	175.2	1.2	3.6	0.2	5.2	0.1	<0.3		<0.1		0.31	0.07
	1	450	13	394	3	89.1	0.5	24.0	1.5	0.7	0.1	80.2	1.0	3.0	0.2	5.8	0.1	<0.3		<0.1		0.26	0.07
	2	418	13	361	3	84.7	0.5	24.0	1.5	1.0	0.1	88.9	1.0	3.4	0.2	5.5	0.1	<0.3		<0.1		0.30	0.07
<i>scorrida</i> <i>C III</i> (mg/L)	3	315	13	361	3	82.9	0.5	24.6	1.5	1.0	0.1	123.7	1.0	3.6	0.2	5.4	0.1	<0.3		<0.1		1.01	0.07
	mijjana	394	71	372	19	85.6	3.2	24.2	0.4	0.9	0.2	97.6	23.0	3.3	0.3	5.6	0.2	<0.3		<0.1		0.28	0.42
	1	1462	13	351	3	79.5	0.5	20.1	1.5	1	0.1	79.6	1.0	3.1	0.2	4.8	0.1	<0.3		<0.1		0.29	0.07
<i>scorrida</i> <i>C IV</i> (mg/L)	2	1559	13	355	3	97.1	0.5	25.9	1.5	1.6	0.1	98.6	1.0	3.0	0.2	4.5	0.1	<0.3		<0.1		0.30	0.07
	mijjana	1511	69	353	3	79.5	12	23.0	4.1	1.3	0.4	89.1	13.4	3.1	0.1	4.7	0.2	<0.3		<0.1		0.30	0.01
	1	2531	138	216	3	32.7	0.5	14.6	1.5	3.3	0.1	70.1	1.0	2.2	0.2	1.7	0.1	<0.3		<0.1		0.26	0.07
	2	3368	133	298	3	31.4	0.5	11.7	1.6	2.9	0.1	46.9	1.0	1.9	0.2	1.8	0.1	<0.3		<0.1		0.25	0.07
<i>scorrida</i> <i>C IVa</i> (mg/L)	3	1790	142	339	3	69.4	0.5	22.9	1.5	2.7	0.1	72.2	1.0	2.0	0.2	1.9	0.1	<0.3		<0.1		0.35	0.07
	4	1730	143	335	3	89.5	0.5	12.4	1.6	2.8	0.1	105.8	1.0	2.3	0.2	1.5	0.1	<0.3		<0.1		0.28	0.07
	mijjana	2355	768	297	57	55.8	29	15.4	5.2	2.9	0.3	73.8	24.3	2.1	0.2	1.7	0.2	<0.3		<0.1		0.29	0.05

Taula 3.34.- anàlisi elements dels medis d'entrada i sortida i de la biomassa de cada compartiment

3.5.- Objectius assolits i conclusions

En aquest capítol s'ha demostrat la viabilitat de la connexió en fase líquida a escala de laboratori dels compartiments II, III i IVa del bucle MELISSA:

Els compartiments II, III i IVa han funcionat interconnectats en estat estacionari durant més de 5 temps de residència sense observar cap efecte tòxic o nociu usant o bé àcid acètic o bé una barreja d'àcids acètic, propiònic i butíric com a font de carboni del segon compartiment. Veient:

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*.

El medi dissenyat per dur a terme aquesta connexió ha funcionat eficientment havent arribat tots els micronutrients necessaris al quart compartiment. Cal destacar, però, que tot i que cap dels elements limita en les condicions de cultiu, part dels elements presents en el medi es perden en els processos de filtració i centrifugació existents entre els diferents compartiments. S'han determinat també les necessitats reals d'aquests micronutrients per formar la biomassa.

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, conclouent que:

Un excés d'àcid acètic en el segon compartiment, provocat per una manca d'energia lumínica incident al cultiu o un augment en la velocitat de dilució al reactor, comporta que:

Sembla que, en disminuir la llum incident al cultiu o augmentar la velocitat de dilució, augmenta el carboni en solució i s'inicia un mecanisme d'acumulació de font de carboni intracel·lular, en forma de PHB, per part de *R. rubrum* provocant una manca o dificultat de moviment i de divisió cel·lular. Aquest fet pot atribuir-se a la manca d'energia suficient existent, que es tradueix en nivells baixos de disponibilitat d'ATP.

La presència d'àcid acètic en el tercer compartiment no altera el funcionament normal de la columna.

S'ha avaluat l'efecte que produeix una conversió no total d'amoni a nitrat en el tercer compartiment, produït o bé per un increment de la velocitat de dilució o per una disminució de l'oxigen disponible en aquest compartiment, conclouent que:

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 de nitrogen com són l'amoni i el nitrat.