

<b>Índice</b>	
ÍNDICE .....	2
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1.1.- SISTEMAS DE SOPORTE DE VIDA EN EL ESPACIO .....	6
1.1.1.- Clasificación de los sistemas de soporte de vida .....	8
1.1.2.- Selección de un sistema de soporte de vida. Herramientas de comparación .....	9
1.1.3.- Sistemas de soporte de vida físicoquímicos .....	11
1.1.4.- Sistemas de soporte de vida biorregenerativos .....	12
Microorganismos .....	12
Algas .....	12
Plantas superiores .....	13
1.1.5.- Evolución de los sistemas ecológicos cerrados de soporte de vida .....	14
1.2.- EL PROYECTO MELISSA .....	15
1.2.1.- Descripción de los compartimentos .....	17
Primer compartimento: el compartimento digestor .....	17
Segundo compartimento: el compartimento fotoauto/heterótrofo .....	19
Tercer compartimento: el compartimento nitrificante .....	21
Cuarto compartimento: el compartimento fotoautótrofo .....	21
Quinto compartimento: la tripulación .....	22
1.2.2.- El sistema de control en el bucle MELISSA .....	23
1.2.3.- La simulación en el bucle MELISSA .....	24
1.2.4.- El funcionamiento interno del proyecto .....	26
1.2.5.- La planta piloto .....	27
Prestaciones del laboratorio .....	27
Estado actual de los compartimentos .....	27
1.3.- EL COMPARTIMENTO NITRIFICANTE. CRITERIOS DE DISEÑO Y ANTECEDENTES .....	31
1.4.- LA NITRIFICACIÓN BIOLÓGICA .....	34
1.4.1.- Aspectos bioquímicos de la nitrificación .....	35
Oxidación de amonio a nitrito .....	35
Oxidación de nitrito a nitrato .....	37
1.4.2.- Factores que afectan a la nitrificación biológica .....	38
Limitación por sustrato .....	39
Limitaciones físicas .....	41
1.4.3.- Factores que inhiben el crecimiento .....	41
Inhibición por sustrato o producto .....	41
Inhibición física .....	43
Substancias tóxicas .....	43
1.4.4.- Sistemas de nitrificación biológica en aguas residuales .....	43
1.4.5.- Sistemas de nitrificación biológica con biomasa inmovilizada .....	44
Sistemas de nitrificación biológica con células inmovilizadas mediante biopelícula .....	45
1.4.6.- Crecimiento en biopelícula .....	50
Descripción de la formación de biopelículas .....	50
1.4.7.- Biopelículas frente a inmovilización por inclusión .....	53
1.5.- MODELOS DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN BIOLÓGICA EN BIOPELÍCULA .....	55
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
3.1.- CEPAS UTILIZADAS Y MEDIOS DE CULTIVO .....	59
Medios de cultivo .....	59
3.2.- ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS .....	62
3.2.1.- Análisis de amonio ( $NH_4^+$ ) .....	62
3.2.2.- Análisis de nitrato ( $NO_3^-$ ) .....	63
3.2.3.- Análisis de nitrito ( $NO_2^-$ ) .....	64
3.3.- REACTORES DE NITRIFICACIÓN .....	65

3.3.1.- Configuración del reactor piloto .....	65
3.3.2.- Sistema de control en el reactor piloto .....	72
3.3.2.1.- Configuración de los controladores P100 .....	74
3.3.2.2.- La estación de sistema .....	77
3.3.2.3.- Descripción de los lazos de control .....	78
3.3.3.- Los reactores a escala laboratorio .....	94
3.3.4.- Control en los reactores a escala laboratorio .....	97
3.4.- CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS BIORREACTORES .....	97
3.4.1.- Metodología empleada para el estudio del grado de mezcla .....	97
3.4.2.- Metodología empleada para la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia de la fase gas a la líquida ( $K_{L,a}$ ) para el oxígeno. ....	98
El método "gas out-gas in" .....	99
El método del sulfito .....	100
3.5.- OTROS EQUIPOS UTILIZADOS .....	101
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
4.1.- CULTIVOS EN SUSPENSIÓN .....	103
4.1.1.- Cultivos en erlenmeyer .....	104
a) <i>Nitrosomonas europaea</i> .....	104
b) <i>Nitrobacter winogradskyi</i> .....	104
c) Cultivos mixtos .....	105
4.1.2.- Cocultivos en biorreactor .....	106
Análisis elemental de la biomasa .....	108
4.2.- COLUMNAS A ESCALA LABORATORIO .....	110
4.2.1.- Caracterización física .....	110
4.2.1.1.- Determinación de volúmenes de sólido, líquido y gas .....	110
4.2.1.2.- Experimentos de distribución del tiempo de residencia .....	115
4.2.1.3.- Modelo de flujo .....	117
4.2.1.4.- Correlaciones entre parámetros y variables .....	127
4.2.1.5.- Estudio del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida .....	128
4.2.2.- Resultados de operación .....	143
4.2.2.1.- Condiciones experimentales .....	143
4.2.2.2.- Puesta en marcha .....	143
4.2.2.3.- Resultados de los experimentos .....	144
4.2.2.4.- Análisis de una columna una vez parada la operación .....	155
4.3.- EL REACTOR PILOTO .....	164
4.3.1.- Caracterización física .....	164
4.3.1.1.- Determinación de volúmenes de sólido, líquido y gas .....	164
4.3.1.2.- Experimentos de distribución del tiempo de residencia .....	166
4.3.1.3.- Modelo de flujo .....	169
4.3.1.4.- Correlación entre parámetros y variables .....	174
4.3.1.5.- Estudio del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida .....	175
4.3.2.- Resultados de operación .....	182
4.3.2.1.- Condiciones experimentales .....	182
4.3.2.2.- Puesta en marcha .....	182
4.3.2.3.- Resultados de los experimentos .....	184
4.3.2.4.- Análisis de la columna una vez parada la operación .....	197
4.3.2.5.- Problemas operacionales del reactor piloto. Mejoras en el diseño. ....	200
4.4.- MODELIZACIÓN .....	203
4.4.1.- Planteamiento del modelo. Aproximaciones y parámetros utilizados .....	204
4.4.3.- Aplicación del modelo a los reactores a escala laboratorio: fase de optimización, ajuste del valor de los parámetros .....	210
4.4.3.1.- Número de tanques que integran el lecho ( $N$ ) = 1 .....	210
4.4.3.2.- Número de tanques que integran el lecho ( $N$ ) = 5 .....	213
4.4.4.- Aplicación del modelo al reactor piloto: fase de validación. ....	221
4.4.4.1.- Modificaciones en el modelo hidrodinámico del reactor a escala piloto .....	222
4.4.4.2.- Resultados obtenidos en la validación del modelo .....	224
4.4.5.- Explotación del modelo: estudio teórico de la puesta en marcha. Estimación de la máxima capacidad de nitrificación del reactor piloto .....	229

---

4.4.5.1.- Estudio teórico de la puesta en marcha. ....	229
4.4.5.2.-Estimación de la máxima capacidad de nitrificación del reactor piloto .....	239
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>243</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>245</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>247</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>257</b>
CALIBRADO ABSORBANCIA - CONCENTRACIÓN DE AZUL DE DEXTRANO.....	257
CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES DE AMONIACO LIBRE Y ÁCIDO NITROSO .....	258



---

---

# INTRODUCCIÓN

---

---

---

## **1.1.- Sistemas de soporte de vida en el espacio**

---

El término soporte de vida cubre básicamente todas las técnicas disponibles para conseguir mantener la vida en un ambiente o situación en la cual el cuerpo humano sería incapaz de mantener sus funciones vitales sin ayuda externa. Su objetivo es, por tanto, desarrollar aquellas técnicas necesarias para la autonomía biológica del hombre cuando éste es aislado de su biosfera original. El soporte de vida en el espacio parte de las técnicas de soporte de vida practicadas en barcos (proporcionando alimento y agua fresca), estaciones en los polos (proporcionando alimentos y energía) y submarinos (proporcionando aire, alimentos y agua).

Cubrir las necesidades vitales de una tripulación en misiones espaciales es uno de los motivos por los que se han desarrollado estudios de sistemas de soporte de vida. Las aportaciones necesarias para una tripulación son oxígeno, agua y alimento; mientras que los desechos a eliminar son principalmente, dióxido de carbono, orina y heces. De este modo, una visión general de los requerimientos de los sistemas de soporte de vida se presenta en la **figura 1.1.**

Existen, principalmente, cuatro posibilidades para responder a las necesidades del soporte vida en el espacio:

- La misión parte con todas las provisiones necesarias.
- Aportes periódicos de provisiones durante el transcurso de la misión.
- Reciclado de las materias durante la misión.
- Utilización *in situ* de las materias locales (en el caso de bases planetarias).

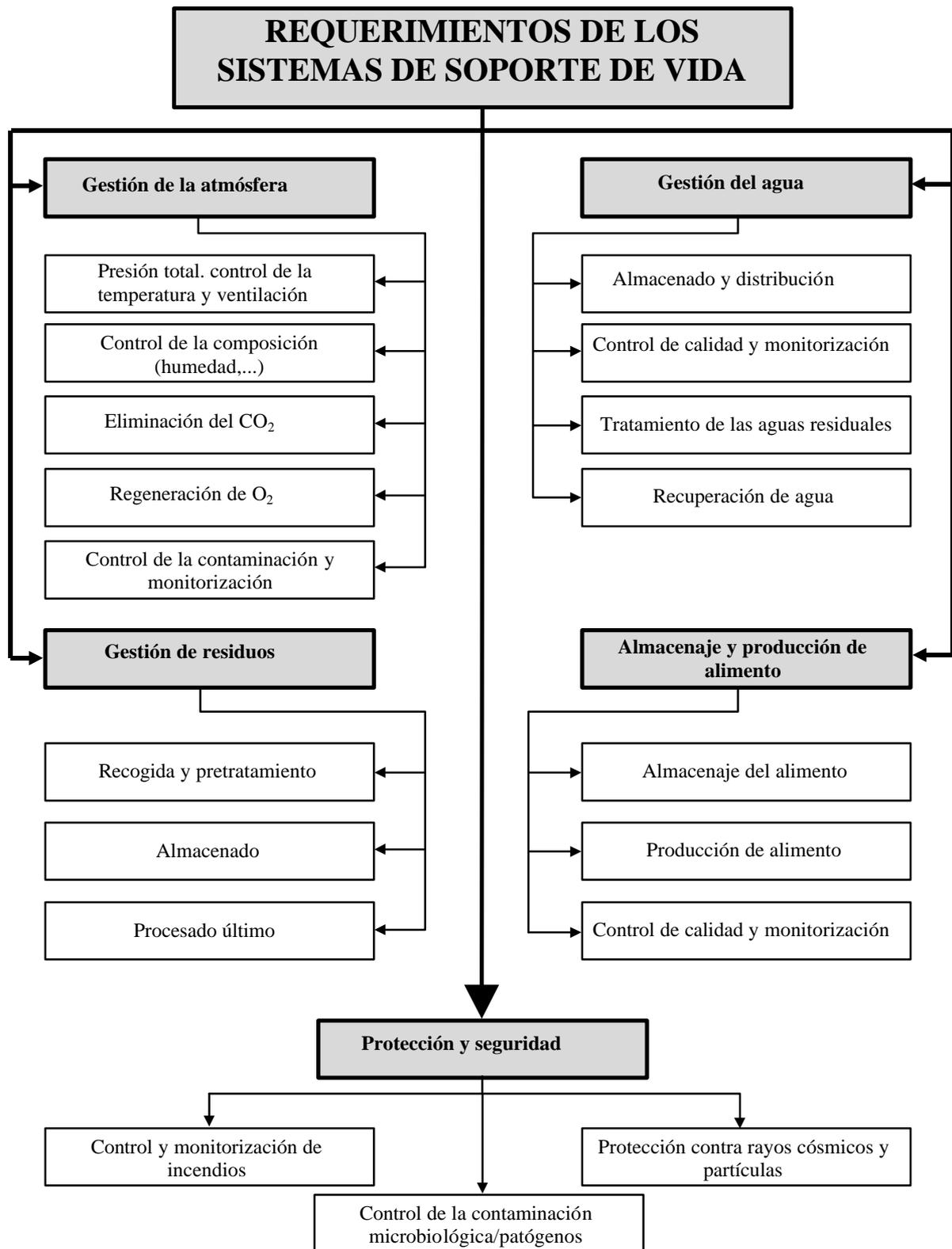


Figura 1.1.- Estructura de un ecosistema cerrado artificial (adaptado de Tamponnet y Savage, 1994)

### 1.1.1.- Clasificación de los sistemas de soporte de vida

Los sistemas de soporte de vida en el espacio se pueden clasificar en dos categorías:

- Los sistemas no regenerativos. Son aquellos que no incluyen ningún tipo de reciclado, como por ejemplo los sistemas que controlan la presión interior, eliminando el gas hacia el espacio exterior.
- Los sistemas regenerativos. Son aquellos que utilizan ciertos elementos susceptibles de ser reciclados como: el oxígeno, el agua y el alimento.

Los sistemas potencialmente regenerativos pero que no integran esta capacidad de reciclado de sus recursos, se denominan abiertos, al contrario que los que reciclan totalmente sus recursos, los cuales se denominan cerrados.

Conseguir mayores porcentajes de reciclado disminuye considerablemente los aportes externos, tal y como puede observarse en la **tabla 1.1**.

**Tabla 1.1.- Reducción de la masa a embarcar en una misión espacial en función del aumento de materias regeneradas (Von Puttkamer, 1987)**

Nivel	Tipo de sistema de soporte de vida	Masa relativa a embarcar (%)
0	Bucle abierto	100
1	Reciclado de agua	45
2	1+ absorción del dióxido de carbono	30
3	2+ reciclado del oxígeno a partir del dióxido de carbono	20
4	3+ producción de alimento mediante reciclado de desechos	10
5	4+ eliminación de fugas	5

Examinando la tabla 1.1, se observa que la reducción del porcentaje de masa a embarcar no varía acusadamente al conseguir producir alimentos a partir de los desechos. Aunque en términos de masa pueda argumentarse que el impacto de regeneración de residuos no es muy significativo en porcentaje (Eckart, 1999), en general estos son considerados indispensables en misiones espaciales de largo recorrido, entre otras por razones de tipo psicológico, dado que se juzga necesario para la tripulación observar “el fenómeno de la vida” para conservar un cierto equilibrio mental.

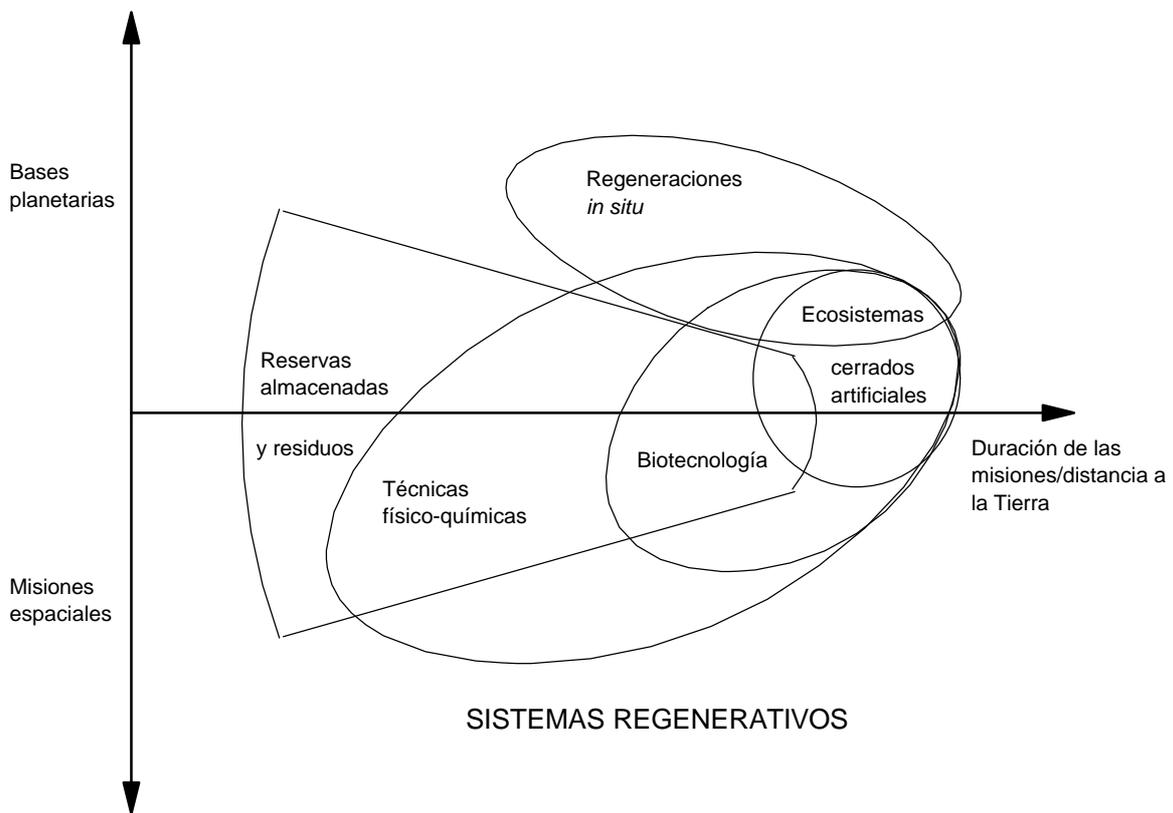
Por otra parte, los sistemas de soporte de vida pueden estar basados en métodos fisicoquímicos o en métodos biológicos, aunque también existen sistemas híbridos, que combinan ambos métodos.

Dentro de los sistemas de soporte de vida regenerativos basados en procesos biológicos (también denominados biorregenerativos) es posible diferenciar dos extremos opuestos: los que tienen por objetivo principal la regeneración de la atmósfera, y los que tienen como objetivo principal la producción de alimento (habitualmente plantas superiores), estos últimos se denominan sistemas ecológicos controlados de soporte de vida.

### 1.1.2.- Selección de un sistema de soporte de vida. Herramientas de comparación

La elección de un sistema de soporte de vida u otro está marcada, principalmente, por dos variables: la duración de la misión espacial y la distancia a la Tierra (Tamponnet y Savage, 1994); tal y como se puede apreciar en la **figura 1.2.**

---



**Figura 1.2.- Elección del tipo de sistema de soporte de vida en el espacio en función de la duración de la misión y de su alejamiento de la Tierra.**

Durante la última década se han desarrollado ciertas conversiones para realizar cálculos y estimaciones sobre la autonomía de las misiones tripuladas, con el objeto de

poder establecer comparaciones entre diferentes sistemas de soporte de vida. Estas conversiones permiten transformar cualquier necesidad de la tripulación en “masa equivalente”. Para calcular esta masa equivalente, se puede utilizar la siguiente expresión (Eckart, 1994):

$$\text{Masa equivalente} = \text{masa del sistema} + \left\{ \begin{array}{l} \text{Cantidad de energía requerida} \times \text{Factor de conversión} \\ \text{Volumen ocupado} \times \text{Factor de conversión} \\ \text{Calor requerido} \times \text{Factor de conversión} \\ \text{Mantenimiento requerido} \times \text{Factor de conversión} \end{array} \right.$$

Para ejemplificar estos cálculos, si se toma como referencia las estimaciones realizadas por Drysdale (1994), los factores de conversión para el cálculo de la masa equivalente en sistemas de soporte de vida biológicos basados en un cultivo de plantas superiores, son los que se presentan en la **tabla 1.2**.

**Tabla 1.2.- Factores de conversión para conocer la masa equivalente en sistemas de soporte de vida biológicos (plantas superiores, Drysdale, 1994)**

Requerimiento	Factor de conversión
Superficie de cultivo	69 kg/m <sup>2</sup>
Fuente de energía	1/211 kg/kWh (fotovoltaica)
	1/369 kg/kWh (solar)
	1/3900 kg/kWh (nuclear)
Sistema de refrigeración	1/1590 kg/kWh
Mantenimiento	0.55 kg/hombre-hora

Durante 1999 Drysdale *et al.* desarrollaron inicialmente dicha métrica aplicada al denominado Soporte de Vida Avanzado para ciertas misiones específicas: la Estación Espacial Internacional (laboratorio orbital de investigación), y para diversos escenarios de una misión a Marte. En la actualidad, dicho Sistema de Masa Equivalente, ha sido adoptado por los investigadores de las distintas agencias del Espacio (Samsonov, *et al.*, 2000, Osburg y Messerschmid, 2000), con la base métrica para medir el progreso del Soporte de Vida Avanzado. De este modo dos sistemas o tecnologías que compitan por una determinada función, pueden tener diferentes requerimientos de masa, volumen, potencia, refrigeración y mantenimiento (Drysdale *et al.* 2000). De entre estos factores, es interesante remarcar como el tiempo requerido por la tripulación para la operación (mantenimiento) del sistema de soporte de vida es uno de los aspectos más importantes (con mayor impacto) en la determinación de la masa total (Drysdale, 2000 y Goins, 2000).

### 1.1.3.- Sistemas de soporte de vida fisicoquímicos

En este tipo de sistemas el único componente biológico es el hombre. Los procesos fisicoquímicos pueden ser aplicados como solución a una parte de las necesidades de un sistema de soporte de vida, principalmente para:

- La gestión de la atmósfera.
- El tratamiento del agua.
- La gestión de los desechos.

En cambio estos procesos no biológicos no pueden producir alimento. Todos los sistemas utilizados hasta el momento en misiones tripuladas han sido de tipo fisicoquímico. A continuación se comentan los principales procedimientos disponibles en la actualidad para realizar el tratamiento de la atmósfera, el agua y los desechos mediante procesos fisicoquímicos (Eckart, 1994).

La regeneración de la atmósfera se lleva a cabo mediante tres etapas diferenciadas (Gustavino, 1994 y Eckart, 1994):

- a) *Concentración del CO<sub>2</sub>*. Los métodos habituales son: el uso de tamices moleculares (zeolitas sintéticas), la concentración por polarización electrónica (en el ánodo se acumula el CO<sub>2</sub>), el denominado procedimiento de SWAD (Solid Amine Water Desorption) o el uso de hidróxido de litio.
- b) *Reducción del CO<sub>2</sub>*. Los métodos comúnmente empleados son: procedimiento Bosch (reacción catalizada a más de 700 °C en presencia de hidrógeno gas, produciéndose carbono y agua); procedimiento de Sabatier (el dióxido de carbono reacciona con hidrógeno gas en presencia de catalizador en torno a 500 °C, para producir metano y agua); electrólisis del dióxido de carbono (reducción del dióxido de carbono y producción de oxígeno); utilización de superóxidos.
- c) *Generación de O<sub>2</sub>*. Electrólisis simple del agua; electrólisis del agua utilizando como electrolito un polímero conductor; electrólisis en fase gas (se utiliza directamente el aire húmedo de la cabina).

En el reciclado de agua pueden distinguirse dos tipos bien diferenciados de procesos fisicoquímicos (Tamponnet *et al.*, 1999):

- a) Métodos basados en procesos de destilación, los cuales se utilizan frecuentemente para el tratamiento de la orina. Los métodos más usuales son: la destilación a presión, la evaporación mediante aire, la evaporación de agua combinada con una oxidación de las impurezas (el amonio se oxida a nitrógeno gas y óxido de dinitrógeno, y los compuestos carbonados a dióxido de carbono e hidrógeno).
- b) Métodos basados en procedimientos de filtración. Son utilizados para generar agua potable y para la higiene, frecuentemente se utilizan para las aguas de

condensación. Los principales métodos son: la ósmosis inversa y la electrodiálisis.

Los desechos sólidos son básicamente heces, desperdicios alimenticios y posibles residuos sólidos provenientes de otros procesos fisicoquímicos. La secuencia que se realiza para el tratamiento de estos residuos es:

- Recogida y separación
- Fraccionamiento
- Estabilización de los productos o almacenamiento
- Reciclado (en función de la duración de la misión)

Para su tratamiento se utilizan principalmente los siguientes procesos: oxidación húmeda (a temperatura y presión elevadas, se consume oxígeno y se produce dióxido de carbono, agua, hidrógeno gas, nitrógeno gas y restos inorgánicos); combustión/incineración (oxidación completa de los elementos C, H, O, N, S y P).

#### **1.1.4- Sistemas de soporte de vida biorregenerativos**

Al igual que en el caso de los sistemas de soporte de vida fisicoquímicos, los sistemas biológicos permiten el tratamiento y reciclado de la atmósfera, el agua y los desechos sólidos, pero además, son capaces de generar materia comestible para la tripulación. Los principales organismos utilizados en los sistemas de soporte de vida biorregenerativos son: microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), algas y plantas superiores.

##### ***Microorganismos***

Los microorganismos son utilizados habitualmente para el tratamiento de los desechos (desechos sólidos y líquidos de la tripulación, así como partes no comestibles de las plantas). Este campo está relativamente desarrollado por la Biotecnología, y en muchos de los casos, cuando se utiliza uno de estos procesos para sistemas de soporte de vida en el espacio, éste ya ha sido estudiado y desarrollado anteriormente en aplicaciones terrestres.

En general se podrían citar como ventajas de los procesos biológicos que utilizan microorganismos que son procesos relativamente fáciles de controlar, no generan apenas residuos y suelen ser procesos de dinámica rápida. Por el contrario, su biomasa no acostumbra a ser comestible y contienen un elevado porcentaje de ácidos nucleicos (esto podría provocar la aparición de la enfermedad conocida como gota, Jassby 1988).

##### ***Algas***

La investigación de la utilización potencial de algas en sistemas de soporte de vida fue iniciada en los años cincuenta por grandes compañías espaciales y de aviación

norteamericanas y soviéticas (Gitelson *et al.*, 1976). Estos estudios están orientados hacia dos aplicaciones: la regeneración del aire y la utilización con fines alimenticios. Se han realizado estudios para desarrollar métodos de producción de alimento a partir del cultivo de algas en condiciones de microgravedad (Karel y Kamareit, 1984). Posteriormente, Karel y Nakhost (1989) produjeron concentrados proteicos a partir de algas, con un nivel de ácidos nucleicos muy bajo, que se incorporaron a una serie de productos alimenticios, concluyendo que la incorporación de algas a la dieta no representa un problema, pero la cantidad máxima que puede consumirse depende principalmente del grado de purificación de los macronutrientes.

Las principales ventajas de estos organismos son que presentan un crecimiento rápido, un metabolismo controlable y los intercambios de gases son compatibles con las necesidades de la tripulación (regeneración de la atmósfera). En cambio, no son suficientes para cubrir las necesidades nutricionales de la tripulación, y tienen un elevado contenido en ácidos nucleicos.

### ***Plantas superiores***

Las plantas superiores se introducen como organismos en sistemas ecológicos controlados de soporte de vida con la principal función de aportar alimento a la tripulación. Así, estos organismos presentan una variedad muy importante de elementos nutritivos para el ser humano: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc.

No obstante, además de esta función, pueden ser utilizadas tanto como para la gestión de la atmósfera como para la regeneración del agua. Por otra parte, también proporcionan un ambiente similar al de la Tierra, y esto colabora con la confortabilidad psicológica de la tripulación, aspecto que se juzga de gran importancia en estancias prolongadas en el espacio.

Los principales parámetros a tener en cuenta en el estudio y desarrollo de las plantas superiores son la superficie de cultivo, el volumen requerido (ya que las plantas cultivadas crecerán hasta cierta altura), la luz (exposición, eficiencia de la fotosíntesis, fotoperiodo), el control de la atmósfera (temperatura, humedad, presión, composición del aire) y los modos de cultivo (semillas, cultivo sobre tierra, cultivo hidropónico, cultivo aeropónico).

El sistema que se considera como más adecuado para el cultivo de plantas superiores en el espacio es el hidropónico (Eckart, 1994).

Para la selección de las plantas que pueden ser utilizadas en un sistema ecológico controlado de soporte de vida se utilizan los siguientes criterios:

- Producción de biomasa.
- Necesidades de las plantas y condiciones de crecimiento.
- Capacidad de regeneración de la atmósfera.
- Capacidad de regeneración de los desechos.

- Capacidad de reutilización del agua.
- Comportamiento en ambientes extraterrestres.
- Interacciones con otros sistemas.

A partir de estos criterios las plantas que se acostumbran a utilizar se dividen en dos grupos. El primero, es el que incluye a las especies de plantas superiores que pueden proporcionar un mayor aporte nutricional para el hombre (maíz, arroz, patatas, boniatos, cacahuetes, lechuga, soja, remolacha). Las especies pertenecientes al segundo grupo, en cambio, poseen bajo valor nutricional, pero elevado valor psicológico (fresas, guisantes, cebollas, brécol) (Wheeler, 1992).

### **1.1.5.- Evolución de los sistemas ecológicos cerrados de soporte de vida**

La investigación experimental de sistemas ecológicos de soporte de vida aunque ya fue iniciado hace algunas décadas, se ha acentuado durante los últimos años, principalmente debido al interés de las principales agencias espaciales al plantearse como objetivo a medio plazo misiones interplanetarias y viajes espaciales de larga duración, fundamentalmente misiones a la Luna y a Marte.

A continuación se presenta una breve descripción de la evolución de los sistemas ecológicos cerrados de soporte de vida (Meleshko, 1991):

En los Estados Unidos de América, en 1961 se realizaron los primeros experimentos con sistemas basados en cultivos de algas con la intención de regenerar el aire (el sistema se mantuvo funcionando durante más de 50 días). En el mismo año pero en la Unión Soviética, se realizaron experimentos con sistemas del mismo tipo y se utilizaron primero ratas y perros y por último hombres (proyectos BIOS 1 y 2).

En 1977 se desarrolló el proyecto CELSSUS (Japón, USA), que estudiaba un ambiente controlado para el crecimiento de plantas superiores, regulando la luz, las condiciones de humedad, concentración de dióxido de carbono, etc.

El proyecto BIOS 3 (Unión Soviética, 1972-1984) también utilizó plantas superiores en un sistema cerrado para regenerar el agua, y producción de alimento (30-50 % de las necesidades) en un experimento con humanos que se prolongó seis meses.

El proyecto Biosphere 2 (USA, 1984) consistía en un sistema de soporte de vida con un volumen de 18 000 m<sup>3</sup>; estaba cerrado al flujo de materia, pero abierto al de energía. El agua y el aire se regeneraban por completo mediante el sistema ecológico. Ocho personas permanecieron en el sistema durante más de dos años.

El proyecto CEEF (Closed Ecology Experiment Facilities) se está desarrollando desde 1994, en Japón por el IES (Institut for Environmental Science). Este proyecto está constituido por tres módulos:

- CPEF (Closed Plantation Experiment Facility), constituido por cuatro cámaras de cultivo de plantas superiores de tipo hidropónico. La fracción comestible de las plantas producidas, se utiliza en el siguiente módulo, mientras que la fracción no comestible se trata mediante un proceso de oxidación húmeda. Subsistemas: separador de fracción comestible y no comestible.
- CAB&HEF (Closed Animal Breeding & Habitation Experiment Facility), alberga los experimentos de alimentación tanto animal como humana. Subsistemas: regulador del flujo de materia entre módulos: tratamiento de aire, agua y desechos.
- CGHEF (Closed Hydrosphere Experiment Facility), integrado por dos acuarios, los cuales permiten reconstruir diferentes tipos de ecosistemas marinos. Subsistemas: productor de fitoplancton (para la alimentación de los ecosistemas marinos), generador de lluvia artificial.

La NASA desarrolló el proyecto LMLSTP (Lunar Mars Life Support Test Project) durante 1995 y 1997. Como resultado se realizaron experimentos con un sistema de soporte de vida regenerativo con un grupo de cuatro personas, durante noventa días. Durante este periodo de tiempo se regeneró la atmósfera respirable mediante sistemas fisicoquímicos y biológicos (Vodovotz, 1998).

En la actualidad la NASA está construyendo una instalación donde se integrarán distintos avances dentro del campo del soporte de vida, dada su estructura modular. Se trata sin duda del mayor esfuerzo en este campo y se denomina BIO-Plex, estando situado en el Johnson Space Center (Houston, USA). Actualmente, se ha ultimado su construcción y se está procediendo a su equipamiento (Barnes, 2000). El sistema está compuesto por una serie de módulos interconectados, y está dimensionado para experimentar con cuatro personas, durante periodos superiores a un año. El módulo biológico principal para la generación de alimento será de plantas superiores.

En cuanto a la Agencia Europea del Espacio (ESA), está desarrollando un sistema denominado MELISSA, desde 1989. Dado que el presente trabajo está enmarcado dentro de este proyecto, en el siguiente apartado se describe con más detalle.

---

## **1.2.- El proyecto MELISSA**

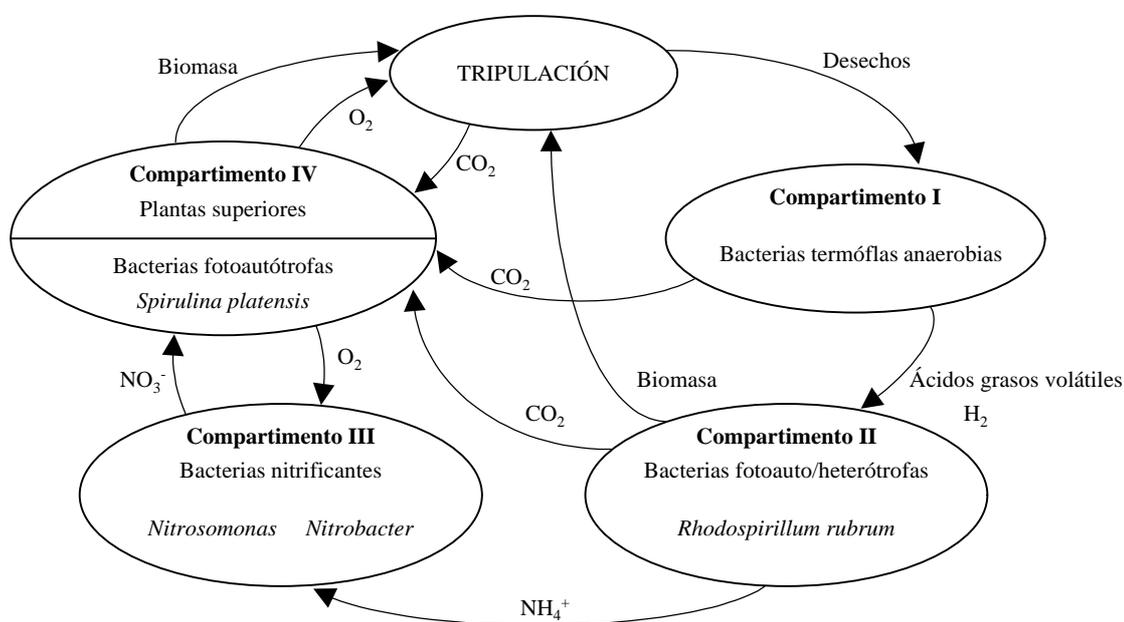
---

MELISSA (Micro Ecological Life Support System Alternative) ha sido concebido como un ecosistema basado en microorganismos y en plantas superiores cuyo objetivo principal es el de profundizar por una parte, en el estudio del comportamiento de los ecosistemas artificiales y por otra, en el desarrollo de la tecnología necesaria para un sistema biológico de soporte de vida para misiones espaciales tripuladas de larga duración, como por ejemplo, una base lunar o una misión a Marte.

Este proyecto está dirigido por la Agencia Europea del Espacio (ESA) desde su centro en ESTEC (European Space and Technology Center, Noordwijk, Holanda) y en su desarrollo intervienen diferentes entidades: CNRS/IBP Gif sur Yvette/Orsay (Francia), Universidad de Ghent (Bélgica), Universidad de Clermont Ferrand (Francia), VITO Mol (Bélgica), ADERSA (Francia), Universitat Autònoma de Barcelona (España), Universidad de Guelph (Canadá).

El concepto MELISSA se deriva de la idea de reciclar los residuos (heces y urea, dióxido de carbono, etc.) en biomasa comestible, junto con la recuperación de agua y la regeneración de la atmósfera (oxígeno) para la respiración humana, utilizando la luz como fuente de energía para la fotosíntesis (Mergeay *et al.* 1988). Para conseguirlo se utilizan varios compartimentos, colonizados por microorganismos, con la excepción del subcompartimento de plantas superiores y el compartimento integrado por la tripulación. Así, la **figura 1.3.** ilustra la estructura del concepto MELISSA, de sus compartimentos y de los principales flujos de materia entre éstos. Como se puede observar, desde su misma concepción, el proyecto MELISSA se plantea separar de forma individual, por compartimentos, las distintas fases primero hidrolíticas, después transformadoras y finalmente sintéticas. Se propone una aproximación a los sistemas de soporte de vida que permite un control directo sobre cada una de las etapas, para lograr una operación coordinada y eficiente de todo el bucle en su conjunto.

De este modo, uno de los objetivos que persigue el proyecto es intentar cerrar dicho bucle, lo que significa, por tanto, conseguir un porcentaje de reciclado lo mayor posible, reduciendo al mínimo, los aportes externos necesarios.



**Figura 1.3.- El bucle MELISSA (Albiol et al., 2000)**

Este bucle es el resultado de la conexión de varios compartimentos, cada uno de los cuales tiene una función definida: degradación anaerobia de los desechos (compartimento I), nitrificación (compartimento III) y biosíntesis (compartimentos II y IV).

### 1.2.1.-Descripción de los compartimentos

#### *Primer compartimento: el compartimento digestor*

El objetivo de este compartimento es la degradación de los residuos sólidos y líquidos que constituyen la salida del compartimento principal (rotura de polímeros como celulosa, hemicelulosa, proteínas...). Debido a que el consumo de oxígeno en el bucle se intenta minimizar, se ha elegido la degradación anaerobia. No es posible alcanzar la completa degradación de los diferentes elementos utilizando una sola especie de microorganismo, por lo tanto deben utilizar diferentes cepas de bacterias.

En la **figura 1.4.** se muestra un esquema general de un proceso de biodegradación anaerobia de materia orgánica. A diferencia de un metabolismo aerobio en el que los productos finales, agua y dióxido de carbono, se alcanzan en una sola etapa, la digestión anaerobia es un proceso multietapa en el que los sustratos son secuencialmente degradados por grupos de bacterias. Existen tres grupos de bacterias responsables de la totalidad del proceso, que se compone de cuatro subprocesos.

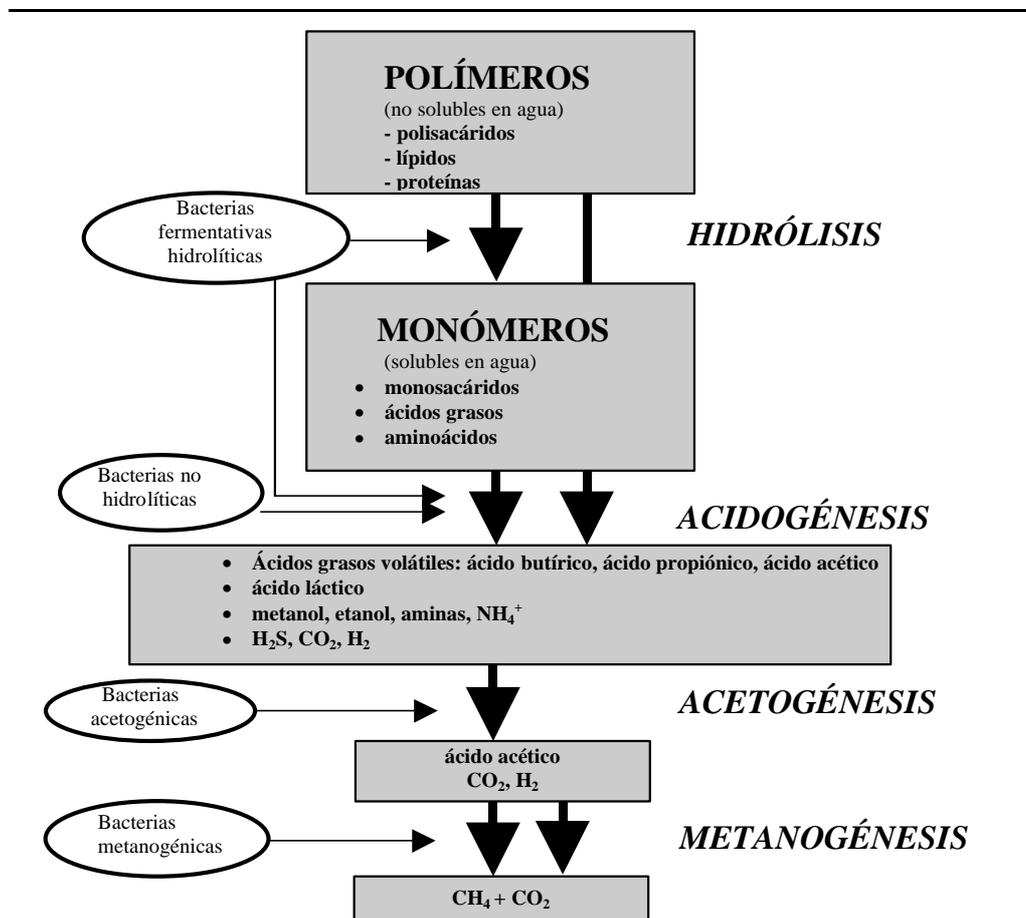
*Bacterias fermentativas (o acidógenas):* estas bacterias son responsables de los primeros dos subprocesos: la hidrólisis y la acidogénesis. Los polímeros orgánicos son hidrolizados a monómeros solubles en agua, los cuales son nuevamente degradados mediante procesos de oxidación-reducción. El resultado de esta degradación es la producción de dióxido de carbono, hidrógeno gas y principalmente ácidos grasos volátiles como propiónico, isobutírico, valérico e isovalérico. Hasta cierto punto también existe la formación de formiato, lactato y alcoholes como butanol, etanol y metanol dependiendo de las condiciones ambientales, así como de los sustratos, pH, y la presión parcial de  $H_2$ .

*Bacterias acetogénicas:* estos microorganismos rompen las cadenas de los productos formados (ácidos grasos volátiles y alcoholes) a, principalmente, acetato,  $H_2$  y  $CO_2$ . Se ha demostrado que las reacciones no están termodinámicamente favorecidas a no ser que el  $H_2$  formado fuese eficientemente eliminado por las bacterias metanogénicas y las bacterias reductoras de sulfato y permaneciese así, a concentraciones suficientemente bajas.

*Bacterias metanogénicas:* estas bacterias producen metano, dióxido de carbono y agua a partir de acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Este tipo de bacterias se puede dividir en dos subgrupos principales: acetotróficas y bacterias hidrogenotróficas.

En sistemas convencionales de digestión anaerobia de residuos sólidos biológicos se intenta maximizar la producción de metano. Dentro del concepto MELISSA la producción de ácidos grasos volátiles debe ser estimulada y no se debe formar metano porque no es un producto valioso para el resto de compartimentos; es decir, la metanogénesis debe ser inhibida (**figura 1.5.**): en estudios preliminares se ha demostrado que concentraciones de

amonio superiores a 7 g/L en el reactor inhiben la metanogénesis (Demey y Van Meenen, 1998).



**Figura 1.4.: Esquema general de la digestión anaerobia**

Después de varios experimentos para seleccionar las bacterias que colonizaran este compartimento, se eligió un inóculo que consistía en una selección de bacterias autóctonas de las heces humanas. El análisis de las cepas aisladas a partir del inóculo ha permitido determinar que las especies predominantes son *Ruminococcus bromii* y *Petrotoga mobilis* (Hermans y Demey, 1999).

Uno de los problemas que impiden obtener un elevado porcentaje de degradación en este compartimento es la presencia de compuestos como la celulosa, los xilanos y la lignina. Para aumentar la eficacia en la degradación de tales compuestos, se realiza un pretratamiento enzimático. Aplicando estos procesos, se consigue una degradación de un 70 % para las proteínas y una eficacia de degradación global del 50 % (Hermans y Demey, 1999). Los ácidos grasos volátiles y el amonio producido durante la fermentación anaerobia son alimentados al segundo compartimento.

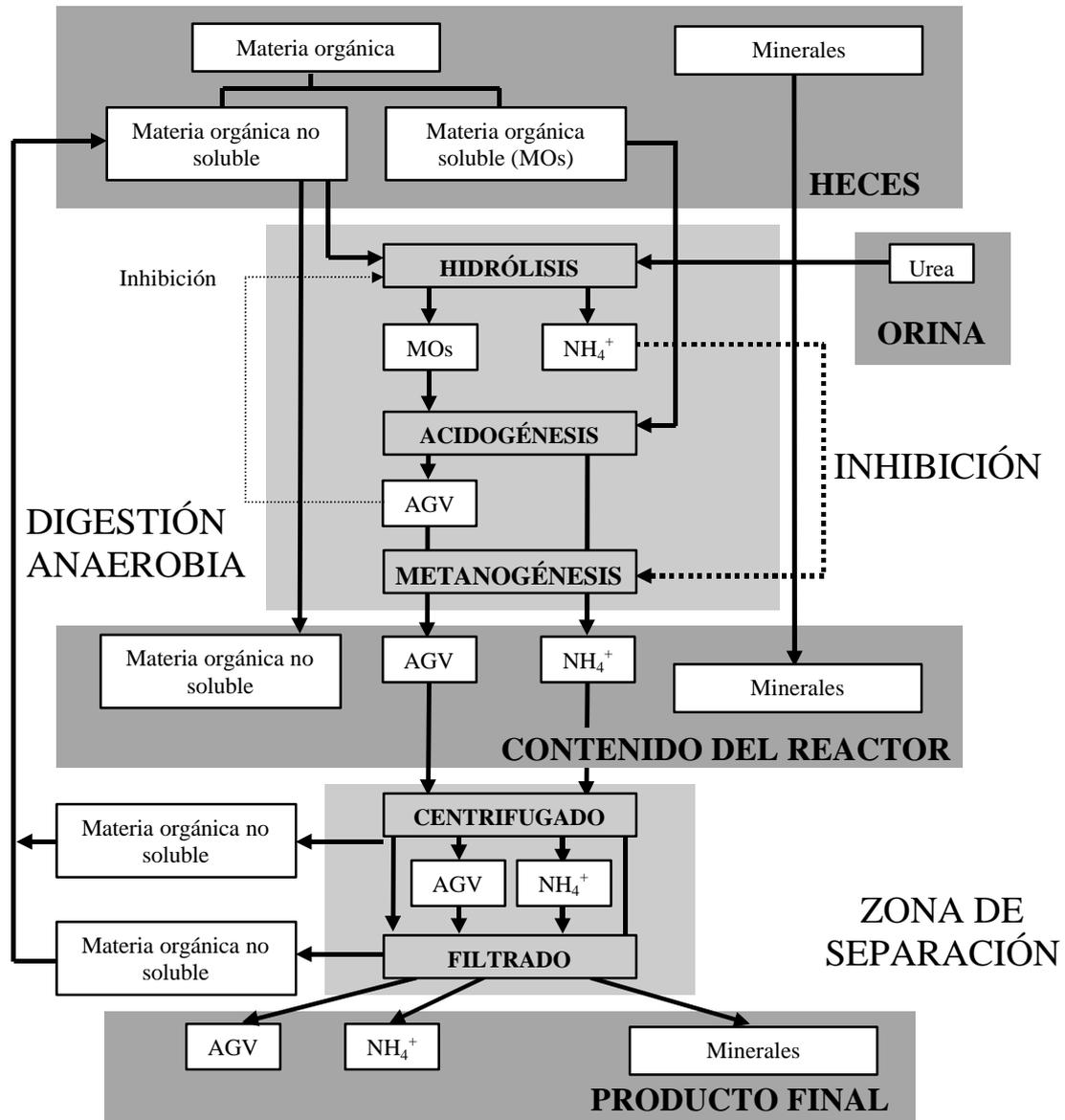


Figura 1.5.- Digestión anaerobia desde el punto de vista del bucle MELISSA (AGV: ácidos grasos volátiles, MOs: materia orgánica soluble).

### Segundo compartimento: el compartimento fotoauto/heterótrofo

El objetivo del segundo compartimento es metabolizar los productos resultantes de la degradación del primer compartimento. Los componentes principales esperados en el flujo procedente del primer compartimento son: ácidos grasos volátiles, algunos alcoholes, aminoácidos, aminas, hidrógeno, dióxido de carbono, sulfuro, etc. (**tabla 1.3**). Para transformar estos productos en biomasa en condiciones anaerobias, fue elegida una bacteria fototrófica. Con la actividad de esta bacteria se espera que la salida principal sea una corriente rica en amonio. El consumo de sulfhídrico se propuso que fuese llevado a cabo por otra cepa (por ejemplo, *Thiocapsa roseopersicina*).

De las cepas propuestas inicialmente, *Rhodobacter capsulata* y *Rhodospirillum rubrum* se consideraron como las más apropiadas para el compartimento. Se realizaron estudios de crecimiento fotoheterótrofo de las dos cepas, utilizando como fuente de carbono ácido láctico, ácido acético, butírico o etanol; como fuente de nitrógeno amonio, urea, betaína y glutamato.

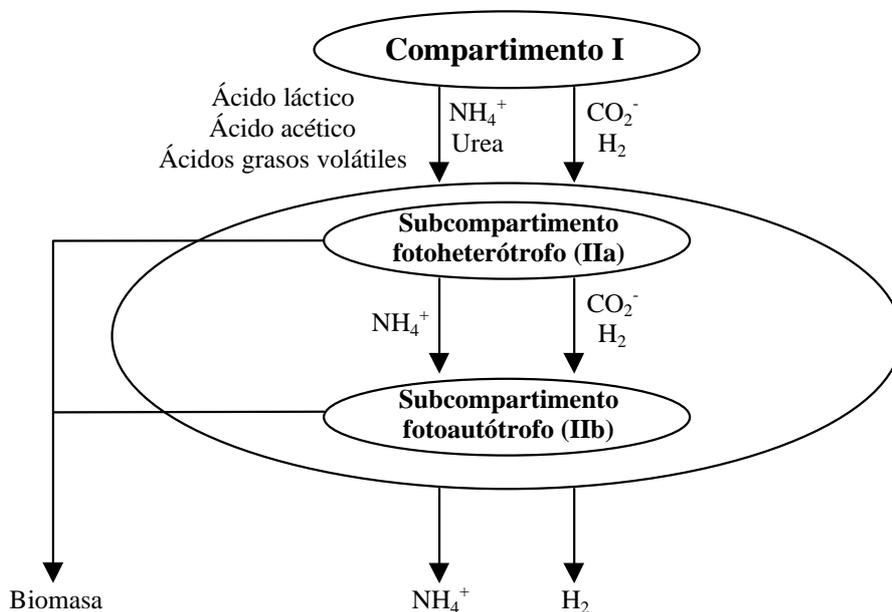
En estudios en condiciones autótrofas ambas cepas crecieron, aunque *Rhodobacter capsulata* mostró una velocidad de crecimiento mayor. Este tipo de crecimiento requiere la ausencia completa de sustancias orgánicas en el medio de cultivo; es por esta razón que el segundo compartimento se dividió en dos subcompartimentos (**figura 1.6.**, Albiol, 1994). En el primero de ellos, el subcompartimento fotoheterótrofo, los ácidos grasos volátiles son la fuente de carbono y dadores de electrones; mientras que en el segundo, el subcompartimento fotoautótrofo, el hidrógeno se utiliza como electrodonador para la fijación del dióxido de carbono.

**Tabla 1.3.- Composición esperada de los afluentes al subcompartimento fotoheterótrofo, procedentes del primer compartimento (Albiol, 1994)**

<b>Fuentes de carbono</b>	<b>Fuentes de nitrógeno</b>	<b>Otros</b>
Ácido acético	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Hidrógeno
Ácido láctico	Urea	Nutrientes minerales
Ácido isovalérico	Aminoácidos	Vitaminas
Ácido propiónico	Aminas	H <sub>2</sub> S
Ácido caprónico		
Ácido isobutírico		
Ácido isocaprónico		
Ácido valérico		
Ácido butírico		
Ácido etanol		
Dióxido de carbono		

El sulfuro puede ser consumido tanto como por *Rhodobacter capsulata* como por *Rhodospirillum rubrum*, pero se produce una acumulación extracelular de azufre (Hansen y Gernerden, 1972; Kompatseva, 1981). Por lo tanto es necesario utilizar una cepa que pudiese reducir el sulfuro a sulfato. Después de varios experimentos preliminares se optó por *Thiocapsa roseopersicina*.

Actualmente, el compartimento fotoheterótrofo se encuentra en desarrollo. Se debe optimizar el consumo de todos los componentes orgánicos de los afluentes para evitar la inhibición en el crecimiento fotoautótrofo del segundo subcompartimento.



**Figura 1.6.: Esquema de los subcompartimentos del segundo compartimento**

### ***Tercer compartimento: el compartimento nitrificante***

Después de realizarse las transformaciones descritas en el segundo compartimento, los principales componentes de la fase líquida serían: una fuente de nitrógeno y nutrientes minerales. En la fase gas existiría un exceso de dióxido de carbono. La fuente de nitrógeno se espera que sea mayoritariamente amonio, pero no puede ser descartada la presencia de otros compuestos de nitrógeno. Teniendo en cuenta que la fuente de nitrógeno necesaria para el crecimiento de las microalgas que se utilizan en el cuarto compartimento es el nitrato, el diseño incorpora un compartimento para realizar dicha transformación. Los microorganismos elegidos para esta biotransformación son dos bacterias quimiolitotróficas: *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi*. Estas bacterias pueden utilizar el dióxido de carbono como fuente de carbono, mientras que obtienen energía de la oxidación del amonio a nitrito (*Nitrosomonas sp.*) y de nitrito a nitrato (*Nitrobacter sp.*).

Este compartimento es el que se desarrolla en el presente trabajo, por lo que en el punto 1.3. se profundiza en su descripción.

### ***Cuarto compartimento: el compartimento fotoautótrofo***

Este compartimento es el que se ha estudiado más profundamente y por tanto el que mejor se conoce. La cianobacteria *Spirulina platensis* es el microorganismo autótrofo que mejor se ajustó a los requisitos que exige este compartimento, es decir:

- Buen rendimiento energético de la fotosíntesis.
- Valor nutricional elevado.
- Tiempo de generación notablemente corto.
- Baja sensibilidad a los microorganismos patógenos y en general un bajo riesgo de contaminación debido a que su pH óptimo de crecimiento es bastante elevado (entre 8 y 10).
- Buena digestibilidad. No tóxica.

Los primeros experimentos de cultivos axénicos (realizados en frascos) permitieron determinar las condiciones óptimas de crecimiento, y los efectos de limitación de nitrógeno y sulfuro. Se realizaron experiencias que demostraron que el medio necesario tanto para el cultivo de *Nitrosomonas-Nitrobacter* como para el cultivo de *Rhodobacter capsulata* y los productos de las degradaciones realizadas por estos microorganismos no eran tóxicos para *Spirulina*.

Se realizaron estudios del efecto que producía la cantidad de luz en el crecimiento de la cianobacteria. El crecimiento exponencial pasaba a ser lineal al disminuir la cantidad de luz que se irradiaba a los cultivos; mientras que con un exceso de la luz incidente aparecía un porcentaje mayor de polisacárido extracelular que producen las células (EPS). Este aumento de la acumulación de polisacárido al aumentar la cantidad de luz sobre el fotobiorreactor permitía ajustar la composición de biomasa a las relaciones óptimas para el consumo humano.

### **Subcompartimento de plantas superiores**

Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de productos vegetales en la dieta humana, no sólo es conveniente, sino necesaria. En un primer estudio, se han seleccionado ocho especies de plantas superiores para ser cultivadas en este subcompartimento: tomates, arroz, lechugas, patatas, soja, espinacas, cebollas y trigo. La alimentación de la tripulación está entonces compuesta de plantas superiores (80 %), por microorganismos (*Spirulina* y *Rhodospirillum*, 10 %) y una aportación externa (10 %) (Vernerey, 2000). Las simulaciones realizadas permiten predecir que para cubrir las necesidades alimenticias de una persona, se requieren biorreactores de un volumen total de 150 L y una superficie de cultivo de 81 m<sup>2</sup> (Vernerey, 2000).

### ***Quinto compartimento: la tripulación***

Para el estudio del compartimento principal se ha elegido a las ratas como organismo modelo. Dicha elección está justificada debido al conocimiento de la fisiología que se tiene de estos animales y a que se pueden utilizar fácilmente en el laboratorio.

Se han realizado varios estudios para conocer la aceptación que estos animales tienen respecto al consumo de *Spirulina*. En los primeros experimentos este alimento se introdujo en un 50 % de su dieta durante dos semanas y los resultados fueron positivos, sin

observarse diferencias entre la salud de los grupos de ratas control y los sometidos a la nueva dieta (Tranquille *et al.*, 1994).

En el siguiente grupo de experimentos (17 semanas) se estudiaron niveles de colesterol, triglicéridos, azúcar, etc., además del peso de los animales, a los que se proporcionaba dietas con porcentajes diferentes de *Spirulina* (5-40 %). Las diferencias aparecieron en los niveles de triglicéridos así como en la cantidad de azúcar en sangre. La conclusión fue que *Spirulina* puede compensar dietas deficientes pero que puede llegar a ser tóxica si se consume como un elevado porcentaje de la dieta. Se realizaron estudios posteriores que profundizaron en este punto, como ya se ha comentado en la descripción del cuarto compartimento, que consiguieron aumentar el porcentaje de la cianobacteria en la dieta sin problemas de toxicidad (Tranquille *et al.*, 1994).

### 1.2.2.- El sistema de control en el bucle MELISSA

La implementación de un sistema ecológico controlado de soporte de vida requiere el desarrollo de un sistema de control capaz de mantener la estabilidad del bucle y asegurar la supervivencia de la tripulación en el compartimento principal. Éste es también el objetivo del sistema de control del bucle MELISSA. El planteamiento que se está llevando a cabo se basa en considerar el sistema dividido en subsistemas interconectados que representan entidades físicas, es decir los compartimentos.

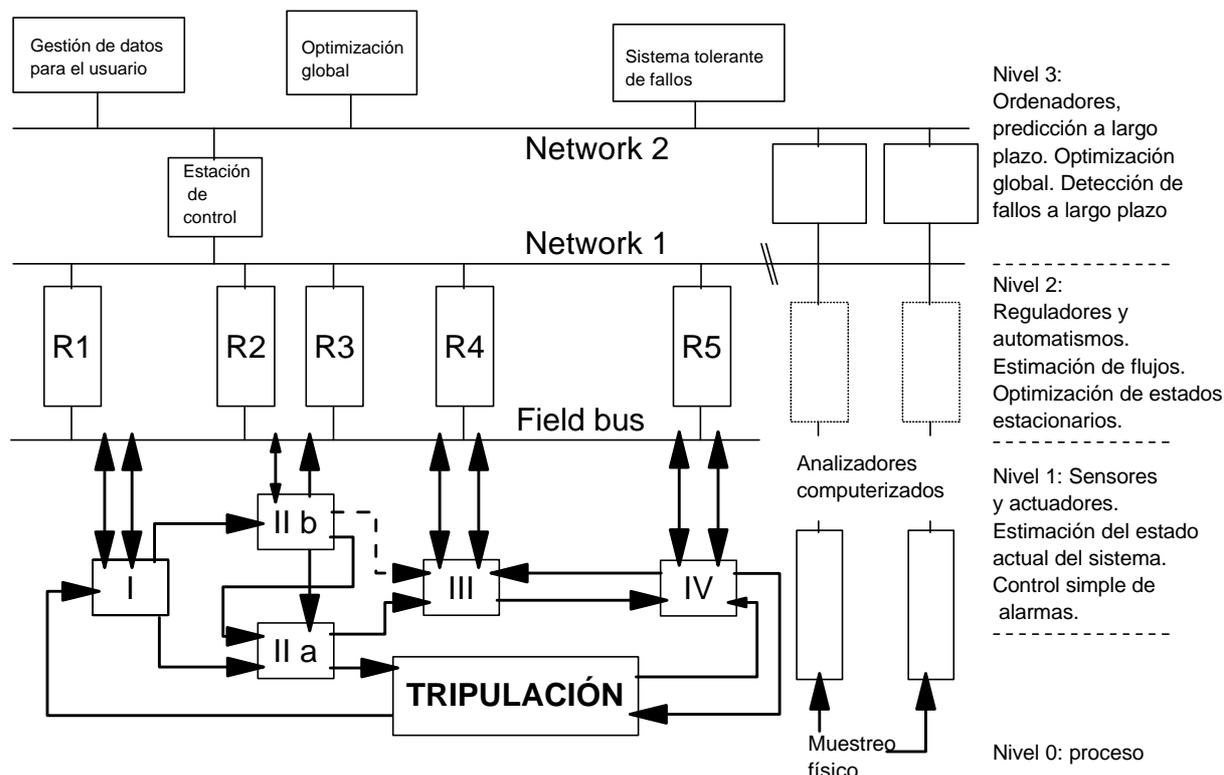
Para conseguir este objetivo, el sistema de control debe ser capaz de optimizar en línea los valores de una serie de variables o parámetros. Para construir este sistema de control tienen que estar disponibles datos tanto actuales como históricos para que éstos sean tratados. El desarrollo de este sistema requiere la progresiva incorporación del conocimiento del comportamiento de cada uno de los compartimentos a modelos matemáticos, que deben ser evaluados por el sistema de control para decidir las acciones de control.

El sistema de control del bucle MELISSA está estructurado de forma jerárquica tal y como se puede apreciar en la **figura 1.7**. (Lasseur y Binot, 1991).

La configuración actual del sistema de control consiste en una red Ethernet, con varias estaciones de control que utilizan MS-DOS como sistema operativo. En la **figura 1.8** se presenta un esquema general del sistema de control de la planta piloto. Se pueden distinguir tres tipos de estaciones: la estación del usuario, la *General Purpose Station* (GPS) y la estación de control/comando. La estación de control/comando es la que está directamente conectada a los controladores de cada uno de los compartimentos mediante la comunicación vertical (SENSYCON VCC, Hartman&Braun, Nanterre, Francia). Los controladores (SENSYCON P100, Hartman&Braun, Nanterre, Francia) son completamente autónomos y programables. Cada uno de ellos es capaz de gestionar dos o cuatro bucles de regulación (dependiendo de su configuración interna). El programa que gestiona la comunicación y el almacenamiento de datos se basa en un sistema MCD100 (INDUSTAR, M.I.C., Nanterre, Francia). La GPS está integrada por una serie de programas (en lenguaje C) y a partir de los datos históricos y los datos actualizados en intervalos de media hora, es

capaz de evaluar los modelos matemáticos de cada uno de los compartimentos y emprender una acción de control para mantener la estabilidad de todo el bucle.

El sistema de control completo ya está implementado para el compartimento IV (fotoautótrofo) y se está empezando a desarrollar para el compartimento II (fotoauto/heterótrofo) y para el compartimento III (nitrificante).

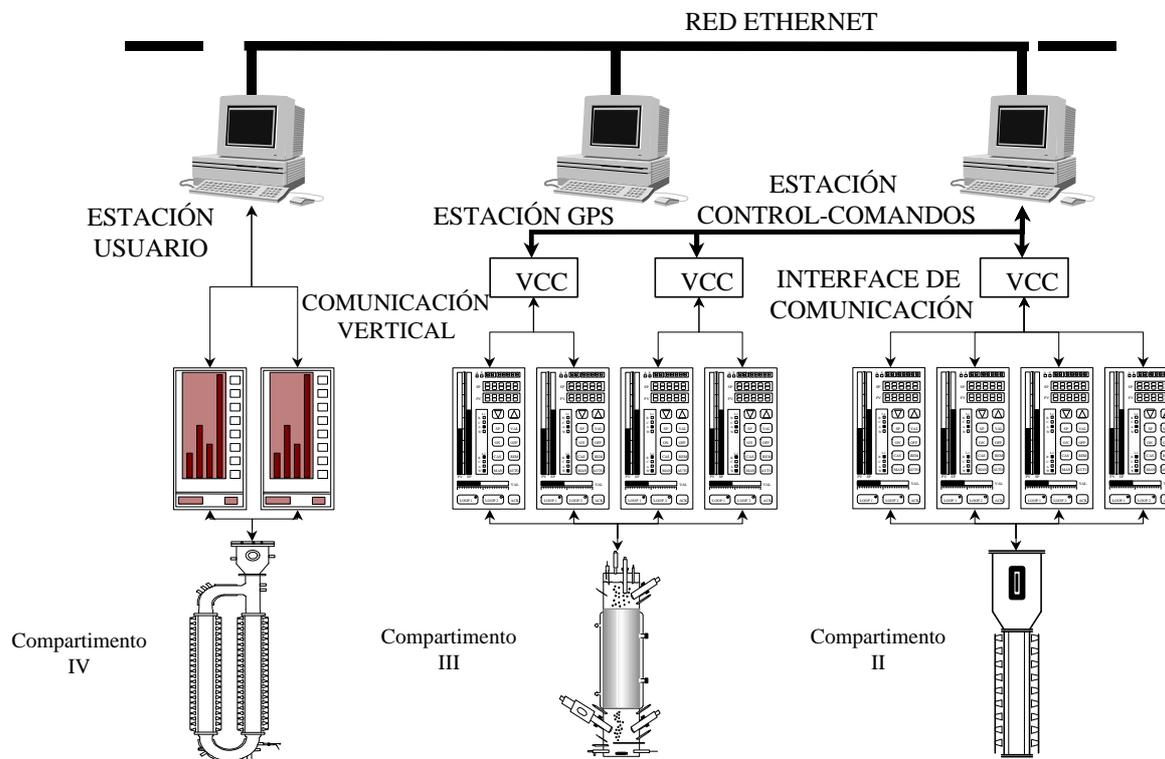


**Figura 1.7.- Estructura del sistema de control en el bucle MELISSA.**  
**(I: compartimento digestor; IIa,b: compartimento heterótrofo/autótrofo; III: compartimento nitrificante ; IV : compartimento fotoautótrofo)**

### 1.2.3.- La simulación en el bucle MELISSA

En el desarrollo de cualquier proyecto complejo, como lo es el proyecto MELISSA, la posibilidad de simular su comportamiento y predecir los resultados impulsa el desarrollo del trabajo, ya que permite evaluar diferentes configuraciones y condiciones de operación de una manera rápida, sencilla y económica.

La eficacia de la simulación de un proceso parte del conocimiento profundo del comportamiento de cada uno de sus componentes en diferentes condiciones de operación que conllevan a la elaboración de un modelo matemático. Como el bucle MELISSA se basa en procesos biológicos no totalmente descritos, la mayoría de la información requerida para la simulación surge necesariamente, de los experimentos que se van realizando a lo largo del proyecto. Es por esta razón que el trabajo de simulación es una tarea progresiva que se debe mejorar continuamente.



**Figura 1.8.- Esquema general del sistema de control implementado en la planta piloto.**

El enfoque básico que se ha dado a la simulación es la necesidad de que ésta sea modular y secuencial; de manera que cada compartimento se modeliza por separado, siguiendo las aproximaciones tradicionales utilizadas en los procesos de diseño de reactores químicos.

La modelización del comportamiento de cada uno de los compartimentos y las ecuaciones de transporte, se basa en considerar la estequiometría y la cinética de los procesos de una forma separada (Noorman, 1991). Cada reacción metabólica principal se caracteriza con la ecuación estequiométrica y con la ecuación cinética, que expresa la velocidad de reacción como función de las concentraciones de las diferentes especies en disolución o valores de las variables de operación. La producción o el consumo global de cada una de las especies se evalúa a partir de la suma de cada una de las velocidades de reacción.

La aplicación de estas técnicas al metabolismo microbiano se lleva a término teniendo en cuenta las rutas metabólicas (anabólicas y catabólicas), junto con el metabolismo de mantenimiento.

No hay que olvidar, sin embargo, que a pesar de toda la información que pueden aportar la modelización matemática en el ámbito de la simulación, el control, la optimización y el dimensionado, dentro de un ecosistema cerrado, la experimentación es

obligatoria para verificar la elección de las variables de estado, así como el efecto de las variables no tenidas en cuenta inicialmente.

Este tipo de modelo está actualmente disponible para el compartimento de *Spirulina*, y está siendo desarrollado para el segundo compartimento (fotoauto/heterótrofo) y el tercer compartimento (nitrificante), por tanto el comportamiento de los otros compartimentos está descrito únicamente a partir de las ecuaciones estequiométricas basadas en sus respectivas rutas metabólicas. Usando toda la información disponible, se ha desarrollado un programa que permite el estudio de los balances de materia y energía del bucle entero.

La aplicación de esta simulación, en la que se consideran hasta quince compuestos, permite valorar distintos escenarios de operación del bucle. De esta forma se ha podido observar la sensibilidad del sistema a un parámetro tal como el porcentaje de *Spirulina* incluido en la dieta de la tripulación. Así pueden analizarse situaciones de operación muy distintas, desde aquellas que permiten reciclar un elevado porcentaje de biomasa, pero generan poco oxígeno para respirar, hasta aquellas que permiten una regeneración elevada del oxígeno.

#### **1.2.4.-El funcionamiento interno del proyecto**

A menudo, después de conocer el número de colaboradores del proyecto y que éstos están diseminados por toda Europa, una inquietud habitual es conocer, exactamente, cómo fluye la información entre los diferentes miembros. Pues bien, cada grupo debe presentar unos informes técnicos en los que se presentan los resultados de los experimentos u objetivos que se fijan anualmente con unas propuestas aprobadas por la ESA. Estos informes se insertan en la página de internet del proyecto MELISSA (<http://www.estec.esa.nl/tech/melissa>) y son accesibles a todos los miembros colaboradores. Por otra parte un miembro oficial de la Agencia es el encargado de coordinar todo el proyecto mediante reuniones periódicas (cada tres o cuatro meses). Además, una vez al año se celebra una reunión en ESTEC, el cuartel general de la ESA en Holanda. Resultado de esta reunión son los informes anuales que confecciona el coordinador a partir de los resultados obtenidos por todos los grupos asociados al proyecto.

Por último, aunque no menos importante, existe una comunicación fluida entre todos los grupos implicados, de forma que con una frecuencia elevada, se utiliza el correo electrónico para resolver dudas que aparecen en el día a día, permitiendo de este modo, realizar progresos a más corto plazo, aprovechando la experiencia que en cada campo tiene cada uno de los miembros colaboradores del proyecto MELISSA.

Cada uno de los mencionados grupos colaboradores tiene una función principal definida: CNRS/IBP Gif sur Yvette/Orsay, encargados de la selección microbiológica de las cepas utilizadas; la Universidad de Ghent, encargados de desarrollar el compartimento I; la Universidad de Clermont Ferrand, responsables del desarrollo de los modelos de cada uno de los compartimentos así como del bucle global; VITO Mol dedicada al estudio de procesos de separación; ADERSA, encargada de desarrollar el control a implementar en el

bucle MELISSA; Universitat Autònoma de Barcelona, sede de la planta piloto del proyecto; la Universidad de Guelph, responsable de desarrollar el subcompartimento de plantas superiores.

### 1.2.5.-La planta piloto

La función principal que persigue esta instalación es la implementación experimental de los avances realizados en el proyecto MELISSA. Para cumplir este objetivo, se dispone de biorreactores a escalas piloto y laboratorio. Todos los datos obtenidos son procesados por los grupos implicados en el proyecto. De esta manera se consigue la respuesta necesaria que permite el continuo progreso del proyecto (Lasseur y Fedele, 2000).

La planta piloto del proyecto MELISSA está ubicada desde septiembre de 1995 en la Universitat Autònoma de Barcelona, en el Departamento de Ingeniería Química. En este laboratorio se está estudiando experimentalmente la implementación de los compartimentos II, III y IV, estando previsto en menos de dos años la implementación del quinto compartimento y del subcompartimento de plantas superiores.

Durante estos años principalmente, se han desarrollado los compartimentos II y III, que habían sido los menos estudiados con anterioridad. En cambio, el compartimento que había sido investigado de forma más intensa era el compartimento IV, y uno de los últimos avances en este compartimento ha sido el diseño y la construcción de un fotobiorreactor *airlift* con recirculación externa de 77 L de capacidad (diez veces mayor que el anteriormente utilizado, Vernerey, 2001).

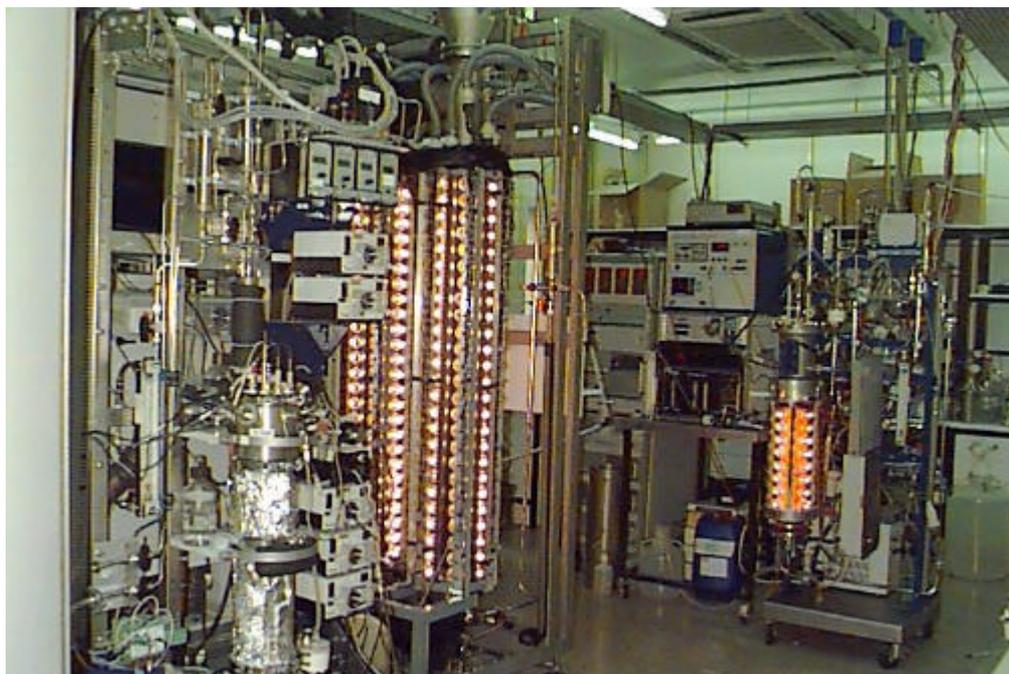
Una visión general de la planta piloto se presenta en la **figura 1.9**.

#### ***Prestaciones del laboratorio***

- Sistema de presión positiva (recirculación de aire estéril)
- Grupo electrógeno (que se pone en funcionamiento de forma automática ante un corte en el fluido eléctrico)
- Servicio de alimentación ininterrumpida (SAI)
- Aire acondicionado
- Circuito de refrigeración
- Línea de vapor para la esterilización *in situ* de los biorreactores
- Líneas de gas (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, He y aire)
- Línea de agua destilada

#### ***Estado actual de los compartimentos***

En el compartimento II (fotoheterótrofo), se han realizado experimentos preliminares para caracterizar la cinética de crecimiento de *Rhodospirillum rubrum* y de *Rhodobacter capsulata* utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Albiol, 1994).



**Figura 1.9.- Visión general de la planta piloto del proyecto MELISSA, ubicada desde 1995 en la Universitat Autònoma de Barcelona.**

Un modelo matemático previamente establecido para describir el crecimiento de *Spirulina platensis* a diferentes intensidades luminosas se ha adaptado al compartimento II, teniendo en cuenta las características específicas de *Rhodospirillum*. Las principales diferencias entre los microorganismos son el tamaño de las células, el espectro de absorción y el metabolismo (Cornet y Albiol, 2000).

Se han realizado experimentos en discontinuo para estudiar la influencia de la naturaleza de la fuente de luz sobre la velocidad volumétrica de crecimiento de *Rhodospirillum rubrum*, empleando iluminación halógena e incandescente y dos fuentes de carbono diferentes, ácido acético y propiónico. De estos experimentos se concluye que las células se pueden adaptar al tipo de radiación, probablemente mediante la variación de las concentraciones relativas de las diferentes tipos de pigmentos fotosintéticos, creciendo con la misma velocidad volumétrica, independientemente de la naturaleza de la fuente de luz, siempre que el flujo de radiación incidente sea el mismo (Cabello, 2000).

Actualmente, en el laboratorio existen dos reactores en funcionamiento: el reactor piloto de siete litros de volumen útil, inicialmente de tipo *gas-lift* (Bioengineering, A.G., Wald, Suiza, **figura 1.10.a.**), fue modificado para convertirlo en un biorreactor con agitación mecánica (Cabello, 2000). Este reactor dispone además de la instrumentación básica (pH, temperatura, oxígeno disuelto y presión) de una sonda de biomasa en línea (Monitek, Düsseldorf, Alemania). La iluminación del reactor se realiza radialmente por medio de lámparas halógenas regulables (Sylvania, BAB 12V, 20W, Bélgica). Por otra parte, el segundo de los reactores dedicado al cultivo de *Rhodospirillum rubrum* a escala

laboratorio, es un reactor agitado mecánicamente (Applikon, Schiedam, Holanda, **figura 1.10.b.**) de tres litros de volumen.

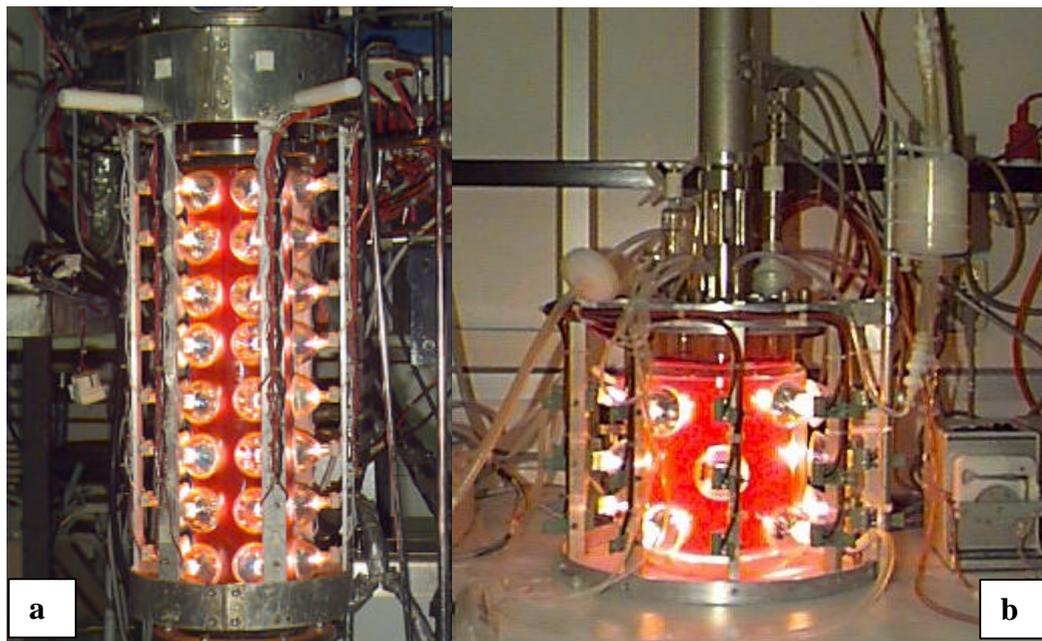
En compartimento III (nitrificante), se tratará en el punto 1.3. de esta memoria más en profundidad, puesto que es el compartimento que se desarrolla en este trabajo.

En el Compartimento IV (fotoautótrofo), a partir del modelo establecido por Cornet (1992) para modelizar el crecimiento de *Spirulina platensis*, se ha validado un modelo predictivo de crecimiento mediante experimentos en diferentes condiciones con cultivos en continuo a diferentes velocidades de dilución e incluso en condiciones de limitación (por luz y por nitrato) (Vernerey, 2000).

Posteriormente, se realizó el diseño de un fotobiorreactor de tipo *gas-lift* de 77 litros para el cultivo de *Spirulina platensis* (**figura 1.11.**). Una vez construido (Bioengineering A.G., Wald, Suiza), se llevó a cabo su caracterización física (estudios de distribución del tiempo de residencia, determinación del tiempo de mezcla y del coeficiente de transferencia de materia de la fase gas a la líquida), y se realizaron experimentos en continuo para estudiar la limitación por fuente de carbono (Vernerey, 2000).

Desde 1998 se empezaron a realizar en la planta piloto experimentos de conexión entre los diferentes compartimentos. Para ello, se iniciaron los estudios experimentales a escala laboratorio. Una vez se disponía de los diferentes biorreactores trabajando individualmente, se procedió a su conexión física. De este modo se conectaron los compartimentos II, III y IV. Mediante estos experimentos se concluye que no se han evidenciado efectos nocivos o tóxicos en ninguno de los compartimentos y que la biotransformación en cada uno de los compartimentos se ha llevado a término satisfactoriamente (Creus, 2000). Una vez realizada la conexión a escala laboratorio se procedió a realizar un experimento de conexión en continuo de los compartimentos III y IV a escala piloto (Creus, 2000).

Un aspecto importante es el que concierne al tratamiento de *Rhodobacter* y *Spirulina* (después de que hayan sido cultivados en biorreactor), es diseñar un proceso que permita su utilización como alimento, y la recuperación del agua. En los biorreactores estos microorganismos se encuentran en unas concentraciones de entre 1 y 2 g/L, por tanto su utilización comporta la reducción del contenido en agua. Para ello, el sistema seleccionado ha sido la centrifugación en continuo y una posterior microfiltración tangencial. Esta configuración ha permitido obtener una reducción del contenido en agua aproximadamente de un 90 % (Vernerey, 2000). Después de la eliminación de agua, es necesaria una etapa adicional para elaborar el producto final: una operación de lavado y un tratamiento adicional específico (utilización de la biomasa liofilizada, pasteurizada, atomizada o fresca), para su conservación como alimento (Morist, 2000).



**Figura 1.10.- Compartimento II fotoheterótrofo, a) reactor piloto; b) reactor a escala laboratorio.**



**Figura 1.11.- Reactor piloto del compartimento IV (fotoautótrofo),, 77 L de volumen útil.**

---

### **1.3.- El compartimento nitrificante. Criterios de diseño y antecedentes**

---

Como ya se ha descrito anteriormente, el tercer compartimento tiene como objetivo principal transformar (con el máximo rendimiento) el amonio (que llega del compartimento anterior) a nitrato, mediante dos poblaciones de bacterias: *Nitrosomonas* que transforma el amonio a nitrito y *Nitrobacter*, que convierte el nitrito a nitrato.

Las cepas que se seleccionaron fueron *Nitrosomonas europaea* (American Type Culture Collection, ATCC 19718) y *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25391) debido a que eran las más estudiadas y por tanto las más conocidas, en el campo de la nitrificación biológica. Por otra parte, una de las dificultades que desde su inicio ha tenido el desarrollo del compartimento nitrificante es que se ha optado por trabajar con cultivos axénicos. Esto es debido a que en el abordaje a los soportes de vida en el espacio por parte de la ESA, siempre se han impuesto fuertes restricciones a la introducción de microorganismos no determinados, por la posibilidad de que éstos sean potencialmente patógenos, puedan sufrir mutaciones genéticas, o puedan, simplemente, provocar problemas desconocidos. Por otra parte, un sistema susceptible de ser controlado y modelizado siempre debe ser lo más definido posible, y en este sentido también es deseable que sea axénico, puesto que de otro modo, parte del proceso podría quedar sin estar representado en los modelos (modelos determinísticos), pudiendo provocar de este modo, imprevistos en el control del sistema.

En una fase del trabajo previa a la actual, se empezó a diseñar y seleccionar una serie de aspectos de este compartimento.

La definición del tipo de biorreactor a utilizar en este compartimento está gobernada por dos aspectos fundamentales: por una parte, la baja velocidad de crecimiento de estas bacterias, conocida de antemano, y por otra, la imposibilidad de que las células puedan ser utilizadas como alimento. Por ello, el sistema más apropiado en este caso es disponer de un reactor con las células inmovilizadas en un soporte, que permita la biotransformación continua del flujo del bucle MELISSA, de amonio a nitrato, con una mínima generación de nitrito.

En la selección del tipo de reactor a utilizar se partió, inicialmente, de tres posibles tipos de biorreactores:

- Reactor de lecho fijo.
- Reactor de tanque agitado.
- Reactor de lecho fluidizado.

El reactor de lecho fluidizado se descartó rápidamente, debido a que el bucle completo debería funcionar en microgravedad. Para la elección entre los otros dos tipos de reactores, se realizaron estudios previos para determinar cuál de ellos era más adecuado (Forler, 1994).

En estos experimentos, durante cinco meses se realizaron dos cultivos no axénicos de bacterias nitrificantes, fijadas en partículas de carbón activo de 300  $\mu\text{m}$  de diámetro en dos tipos de biorreactores:

- Una columna de lecho fijo con aeración.
- Un tanque agitado con un sistema de control actuando sobre la concentración de amonio, pH y  $p\text{O}_2$ .

Los principales resultados obtenidos se muestran en la **tabla 1.4**.

Aunque la eliminación de amonio era similar en ambos reactores, en la columna empacada se observó una mayor conversión a nitrato, cosa que se refleja, además, en la presencia de una menor concentración de nitrito (producto intermedio del proceso). Además, se observó también, que otro de los datos a tener en cuenta es la retención de nitrito por parte del soporte de la biomasa (carbón activo) y que podía llegar a ser un problema debido a que, como ya es sabido, el nitrito puede llegar a ser inhibitorio para el proceso de nitrificación. Además, otro problema importante de la presencia de nitrito es su toxicidad en la dieta alimenticia. A la vista de estos resultados se optó por diseñar un reactor de lecho fijo para desarrollar el tercer compartimento.

**Tabla 1.4.- Comparación de la eficacia de un reactor lecho fijo y un tanque agitado.**

<b>Variables calculadas</b>	<b>Lecho fijo</b>	<b>Tanque agitado</b>
Eliminación de $\text{N-NH}_4^+$	99 %	99 %
Conversión de $\text{N-NH}_4^+$ en $\text{N-NO}_3^-$	98 %	79 %
Concentración mínima obtenida de $\text{N-NO}_2^-$	0.05 mg/L	2.0 mg/L
Carga producida de $\text{N-NO}_3^-$	0.041 $\text{kg/m}^3 \cdot \text{día}$	0.034 $\text{kg/m}^3 \cdot \text{día}$

El paso siguiente en el diseño del compartimento nitrificante fue la elección del soporte para la biomasa. Los parámetros más destacables en la selección de un soporte (Zeghal, 1992) son:

- Superficie específica
- carga eléctrica
- Rugosidad y porosidad
- Porosidad del lecho
- Resistencia mecánica (a la compresión, fuerzas de cizalla,...)
- Peso específico
- Estabilidad química
- Envejecimiento

Los soportes que se probaron fueron los siguientes:

- Biostyr<sup>®</sup> (Anjou Recherche, París, Francia, partículas esféricas de poliestireno de 4 mm de diámetro)

- Limpor (espuma de poliuretano)
- Kaldness (anillo plástico)
- Carbón activo (partículas de 2.5 mm )

Así, se diseñaron una serie de experimentos, utilizando lechos fijos con el objeto de estudiar la nitrificación (Zeghal,1992) con el uso de los diferentes soportes. Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 1.5**. Dados los favorables resultados obtenidos, se optó por trabajar con las partículas esféricas de poliestireno (Biostyr<sup>®</sup>, Anjou Recherche, París, Francia). Siguiendo estos estudios, se procedió al montaje de tres columnas de lecho fijo, utilizando como soporte Biostyr<sup>®</sup>. Se realizaron experimentos con cultivos axénicos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* durante cinco meses (Walter, 1993). Después de este estudio con cocultivos axénicos se concluyó que, en primer lugar se confirmaba la capacidad del soporte para ser utilizado en procesos de nitrificación axénicos. Otro hecho constatado fue que el soporte no retenía nitritos, que como ya se ha mencionado, era una de las consideraciones principales en la elección del soporte. Como principal inconveniente de este soporte, sobre todo para su aplicación en cultivos axénicos, se detectaron problemas importantes a la hora de su esterilización, debido a que éste no resiste las condiciones de esterilización con vapor, y retiene iones pesados de las sustancias esterilizantes comunes.

**Tabla 1.5.- Principales resultados de la comparación de diferentes tipos de soporte. Limpor: espuma de poliuretano, Kaldness: anillos plásticos.**

Material del soporte	Carga máxima eliminada en N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> no eliminado (carga de 1.5 kg/m <sup>3</sup> .día)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> no eliminado (carga de 1.5 kg/m <sup>3</sup> .día)
Biostyr <sup>®</sup>	1.6 kg/m <sup>3</sup> .día	0.1 mg/L	0.2 mg/L
Limpor	0.7 kg/m <sup>3</sup> .día	2 mg/L	2.5 mg/L
Kaldness	0.5 kg/m <sup>3</sup> .día	20 mg/L	12.5 mg/L
Carbón activo	0.3 kg/m <sup>3</sup> .día	47 mg/L	30 mg/L

A partir de los estudios previos mencionados, se llevó a cabo el diseño preliminar del reactor, teniendo en cuenta las restricciones derivadas de la elección del soporte. El reactor de lecho fijo consta de tres partes diferenciadas: la sección inferior, agitada magnéticamente, que permite la homogeneización de la entrada de alimento y la recirculación; la parte principal o lecho, el la cual se halla confinado el soporte y las células inmovilizadas, y por último, la parte superior, en la que se realiza la separación de fases gas/líquido, y al igual que en la sección inferior se hallan los sensores de proceso (para más detalles véase el capítulo de materiales y métodos).

Se estableció un protocolo de esterilización del biorreactor (Forler, 1994):

- Esterilización de toda la instalación con vapor fluyente
- Llenado del reactor con el soporte
- Esterilización química del reactor: primero ácido (hasta pH = 2) y luego base (hasta pH = 12)
- Lavado del reactor con agua destilada estéril

De la discusión realizada sobre los antecedentes de este trabajo, se desprende el estado primitivo de desarrollo de este compartimento en el momento que se realizó su traslado, como parte de la planta piloto MELISSA, a la Universitat Autònoma de Barcelona, y que se puede resumir en los siguientes aspectos:

- Se disponía de un reactor de lecho fijo con recirculación externa con un soporte para la inmovilización de la biomasa.
- El reactor disponía de la instrumentación básica (electrodos de pH, oxígeno disuelto, sondas de temperatura y analizadores automáticos de amonio y nitrato).
- Con el reactor no se había realizado ningún cultivo ni en continuo ni en discontinuo.

Con este punto de partida, el presente trabajo consiste en la puesta en marcha de este compartimento, análisis de su funcionamiento, caracterización, mejora y modelización, como se explicará más adelante en el capítulo de objetivos.

---

## **1.4.- La nitrificación biológica**

---

La importancia de la nitrificación biológica fue reconocida hace más de un siglo. La intensificación de los procesos industriales y agrícolas junto con el crecimiento exponencial de la población humana y la explosión de la urbanización en las últimas décadas han llevado a un importante aumento de los vertidos de compuestos nitrogenados al medio ambiente. Estos compuestos potencian el proceso de eutrofización de aguas estancadas y se piensa que están asociados con la aparición de crecimiento de algas en ríos, lagos y costas. Otros efectos del vertido de compuestos nitrogenados a la atmósfera o en acuíferos son la lluvia ácida, la desaparición de la capa de ozono y la enfermedad infantil conocida como metahemoglobinemia.

Debido a todos estos efectos negativos de los vertidos de compuestos nitrogenados, paralelamente al crecimiento de la cantidad y frecuencia de dichos vertidos, se han desarrollado procesos para su eliminación. Clásicamente, en la depuración biológica de aguas, el proceso comúnmente utilizado es el conocido como lodos activos (véase apartado 1.4.4.).

La forma más común para representar el proceso de nitrificación es mediante las reacciones de oxidación de amonio a nitrito, y de éste a nitrato:



Este tipo de representación se ha utilizado para realizar estudios cinéticos del proceso, (Hunik *et al.*, 1994), o para describir los efectos de inhibición por el pH (Anthonisen *et al.*, 1976).

A menudo se incluye en las reacciones la expresión empírica de la biomasa formada, así se obtiene una representación más completa de este proceso. Debido a que la velocidad de crecimiento de estos microorganismos es muy lenta, la producción de biomasa es costosa y es por esta razón que resulta difícil realizar análisis de su composición. Por esta razón, en la mayoría de estudios se suele tomar como composición de la biomasa correspondiente a una media calculada para bacterias aerobias (Roels, 1983). Las estequiometrías propuestas por varios autores están basadas en la determinación experimental de la relación media entre el CO<sub>2</sub> consumido y el N oxidado. Un ejemplo de ello sería la estequiometría presentada por Kowalski y Lewandowski (1983):



Los microorganismos responsables de la nitrificación biológica se pueden dividir en dos grupos, los nitrificantes autótrofos y los heterótrofos. Esta clasificación se basa en el modo de obtener energía para el crecimiento. Así, las bacterias nitrificantes autótrofas consiguen su energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos de nitrógeno, mientras que las heterótrofas oxidan materia orgánica como fuente de energía. En los sistemas de depuración de aguas residuales, las bacterias autótrofas de la familia *Nitrobacteraceae* son las principales responsables de la nitrificación (Bock *et al.*, 1991). Dicha familia bacteriana comprende dos grupos: las bacterias que oxidan amonio y las que oxidan nitrito, todas ellas Gram negativas. Los distintos géneros de bacterias que oxidan amonio son *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio*; mientras que las que oxidan nitrito son *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira* (Campos, 2000). Los géneros detectados comúnmente en depuración biológica son *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, aunque recientemente se ha asignado al género de las bacterias nitrito-oxidantes a *Nitrospira* (Schramm, 1998), mediante técnicas de marcaje de DNA.

### 1.4.1.- Aspectos bioquímicos de la nitrificación

#### *Oxidación de amonio a nitrito*

El primer paso de la oxidación es la conversión a hidroxilamina por medio de la enzima monooxigenasa, la cual está asociada a proteínas de membrana. El sustrato es amoniaco y no amonio (Suzuki *et al.*, 1974). La reacción requiere oxígeno y una fuente de poder reductor.



El segundo paso es la oxidación de la hidroxilamina a nitrito; siendo este paso el que permite extraer energía a las bacterias que oxidan amonio. Esta oxidación se realiza por medio de la enzima hidroxilamina óxidoreductasa (representada como E en las reacciones 1.5. a 1.9.), responsable de la deshidrogenación catalítica de la hidroxilamina, formando

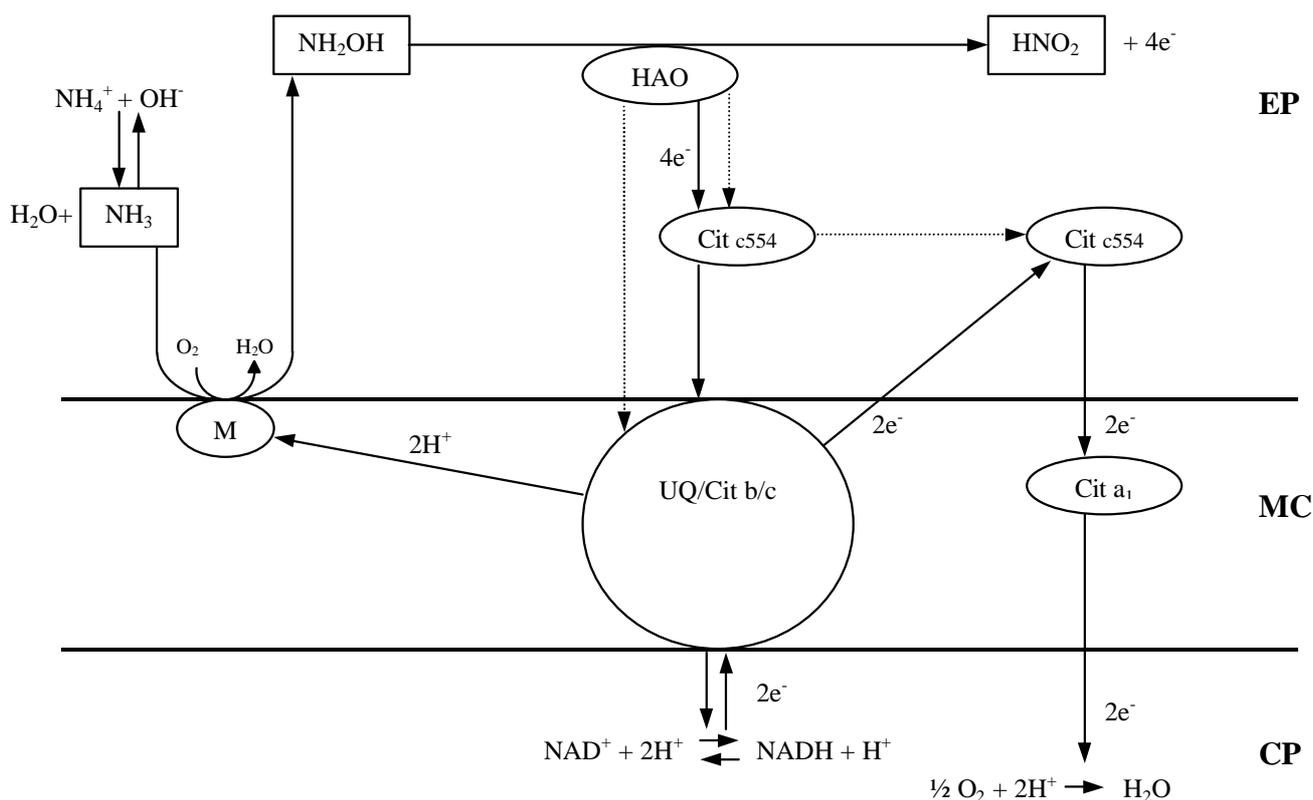
---

\* La fórmula empírica de la biomasa para un átomo de carbono sería: CH<sub>1.4</sub>O<sub>0.4</sub>N<sub>0.2</sub>

HNO, compuesto que espontáneamente se transforma en HNO<sub>2</sub> (Anderson y Hooper, 1983).



La hidroxilamina óxidorreductasa está localizada en el espacio periplasmático (Olson y Hooper, 1983); el modelo de transporte seguido por los cuatro electrones involucrados en las anteriores reacciones todavía no ha sido demostrado, pero se han realizado algunas hipótesis. Una de las más recientes es la planteada por Bock *et al.* (1991), y se presenta en la **figura 1.12**. Dos de estos cuatro electrones se requieren para la formación de hidroxilamina, por lo que dos electrones son los que aportan energía a la cadena respiratoria durante la transformación del amonio a nitrito. El salto de potencial de amonio a nitrito es de +340 mV, o sea, menos de un ATP. El crecimiento de las bacterias que oxidan amonio está limitado termodinámicamente.



**Figura 1.12.- Modelo hipotético de transporte de electrones en Nitrosomonas adaptado de Bock et al., 1991). EP: espacio periplasmático, MC: membrana citoplasmática, CP: citoplasma, HAO: hidroxilamina reductasa, M: amonio monooxigenasa, UQ/ cit b/c: complejo ubiquinona-citocromo b/c. Las flechas discontinuas son rutas alternativas de electrones.**

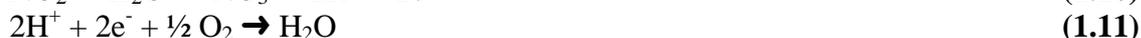
El color rojizo de las bacterias que oxidan amonio es debido al inusualmente elevado contenido celular de citocromos que se encuentran en el espacio periplasmático y en la membrana.

Todas estas reacciones hacen posible la oxidación de amoníaco a nitrito en condiciones energéticamente favorables ( $-\Delta G^\circ = 250\text{-}350$  kJ/mol), sin embargo, en condiciones deficientes de oxigenación estas bacterias pueden producir óxidos de nitrógeno (NO y N<sub>2</sub>O). Bock *et al.* (1991), observaron una evolución de la producción de N<sub>2</sub>O de 0.003 a 0.1 mol N<sub>2</sub>O / mol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> producido, al disminuir la concentración de oxígeno disuelto desde 7 a 0.18 mg/L.

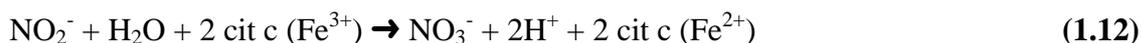
El dióxido de carbono se fija mediante el ciclo de Calvin, y sirve como fuente de carbono primaria.

### *Oxidación de nitrito a nitrato*

La oxidación de nitrito a nitrato por parte de las bacterias que oxidan nitrito se produce sin intermediarios de reacción, y se realiza mediante la enzima nitrito óxidoreductasa (**reacción 1.10.**). El oxígeno usado para la oxidación proviene del agua (**reacción 1.11.**) (Aleem *et al.*, 1965). La mayoría de estudios se han realizado utilizando el género *Nitrobacter*. Al contrario que en el caso de *Nitrosomonas*, el género *Nitrobacter* utiliza directamente la forma iónica como sustrato.



La reacción global es:



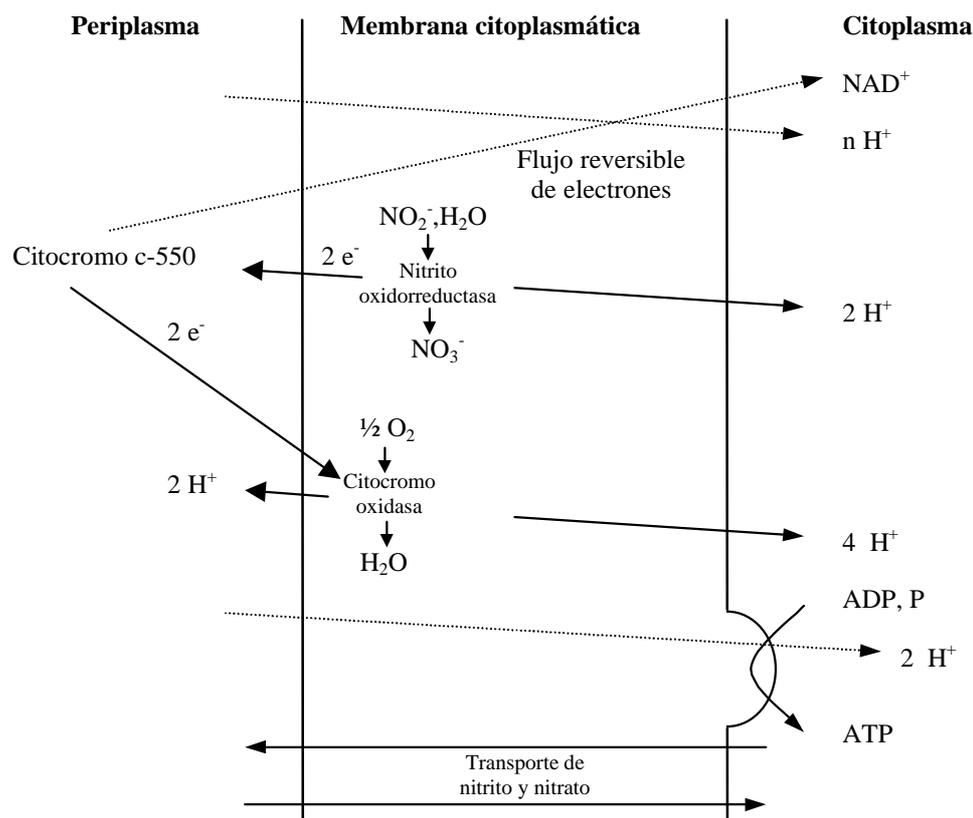
El sistema de oxidación de nitrito en *Nitrobacter* está asociado a membrana. En metabolismo quimiolitotrófico, el nitrito tiene una función doble: como dador de electrones para la fosforilación oxidativa, y por otra parte, como dador de electrones para la síntesis de NADH. La reducción del citocromo c es termodinámicamente desfavorable. El par nitrito/nitrato tiene un potencial redox de +420 mV, mientras que el potencial redox del par cit c<sup>2+</sup> / cit c<sup>3+</sup> es de +260 mV; por tanto la energía producida es también pequeña y al igual que en el caso de *Nitrosomonas*, esto influye en la baja velocidad de crecimiento de *Nitrobacter*. Menos del 10 % de la energía producida se emplea para el crecimiento celular. En la **figura 1.13.** (Campos, 2000) se presenta un esquema de la ruta energética del género *Nitrobacter*.

La enzima nitrito óxidoreductasa puede funcionar de forma reversible, y puede reducir nitrato de forma anaerobia (Aleem y Sewell, 1984). *Nitrobacter winogradskyi* no es capaz de convertir amoníaco o nitrito a N<sub>2</sub>O, pero sí es capaz de producir NO gas

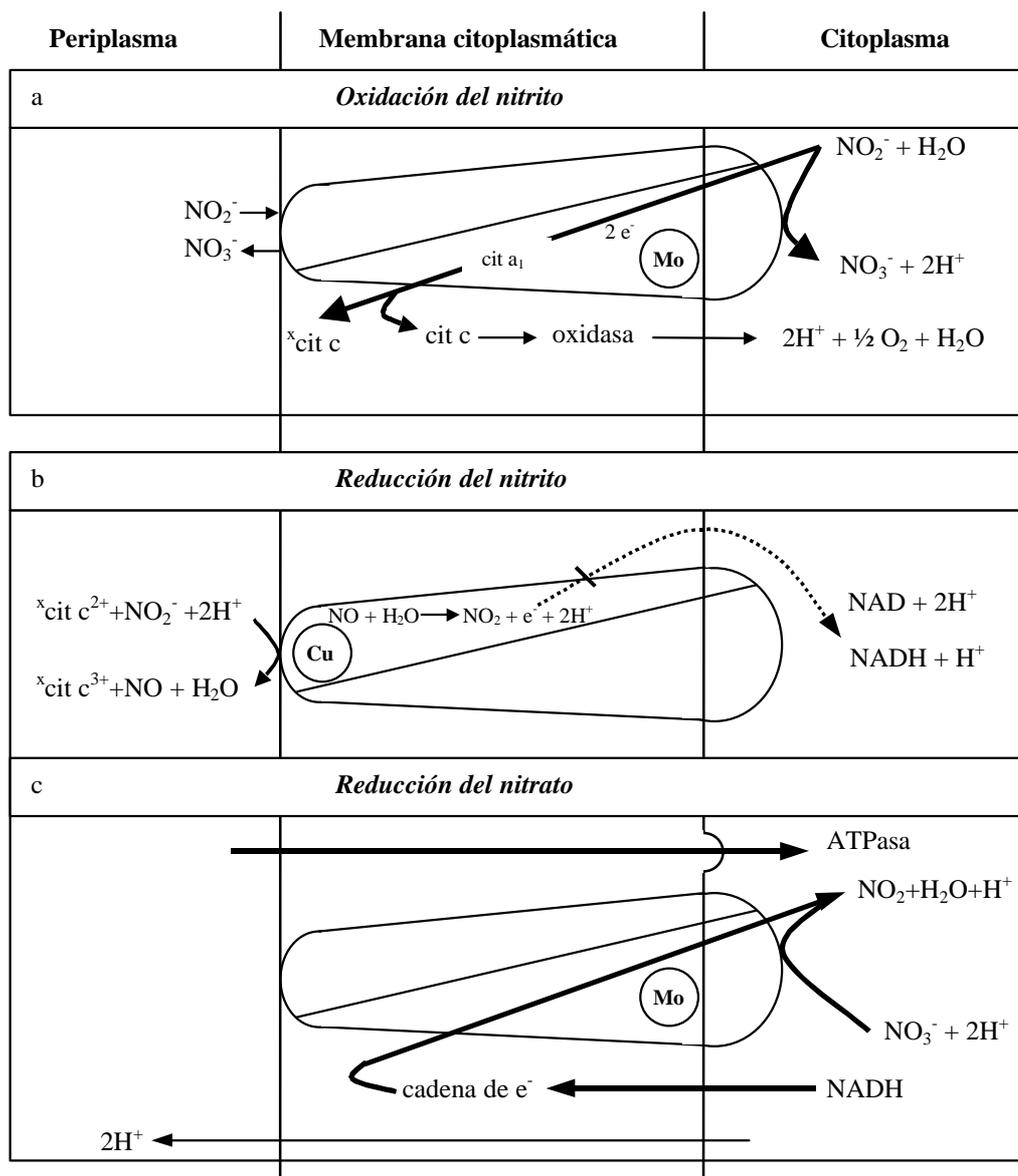
(Blackmer *et al.*, 1980). Efectivamente, bajo condiciones anaerobias estas células pueden reducir nitrato a nitrito, por lo tanto la oxidación del nitrito es un proceso reversible, como ya se ha mencionado. En anaerobiosis *Nitrobacter* puede utilizar piruvato como sistema dador de electrones y nitrato como aceptor de electrones. Los diferentes aspectos del metabolismo del nitrógeno inorgánico y de la generación de energía en *Nitrobacter* se resumen en el esquema de la **figura 1.14**. (Bock *et al.*, 1991).

### 1.4.2.- Factores que afectan a la nitrificación biológica

En este apartado se intenta enumerar y comentar los principales factores que influyen en el proceso de nitrificación biológica. Para ilustrar de una forma más directa y sencilla, se presenta en la **figura 1.15**. un esquema en el que se sintetizan estos factores. Además, en ella se resaltan en **negrita** los aspectos específicos de sistemas de nitrificación con biomasa inmovilizada (desarrollado en los puntos 1.4.5. y siguientes de este capítulo).



**Figura 1.13.- Esquema de la ruta energética del género *Nitrobacter* (adaptado de Campos, 2000).**



**Figura 1.14.- Metabolismo del nitrógeno inorgánico en el género *Nitrobacter* (adaptado de Bock et al., 1991)**

### *Limitación por sustrato*

CO<sub>2</sub>. En crecimiento autótrofo esta limitación se produce por fuente de carbono. Bazin *et al.* (1982) estudiaron las causas potenciales de nitrificación incompleta en una columna de lecho fijo colonizada por cepas axénicas de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter agilis*, y concluyeron que no existía limitación por CO<sub>2</sub>. En el caso que estudiaron, el CO<sub>2</sub> se aportaba por medio de la aeración, a la vez que el oxígeno. Debido a la elevada solubilidad del CO<sub>2</sub> y a su bajo rendimiento, el dióxido de carbono no aparece como factor limitante del crecimiento, ya que antes, se produciría una limitación por oxígeno. No obstante, si el caudal de aeración suministrado no contuviese CO<sub>2</sub>, se debería

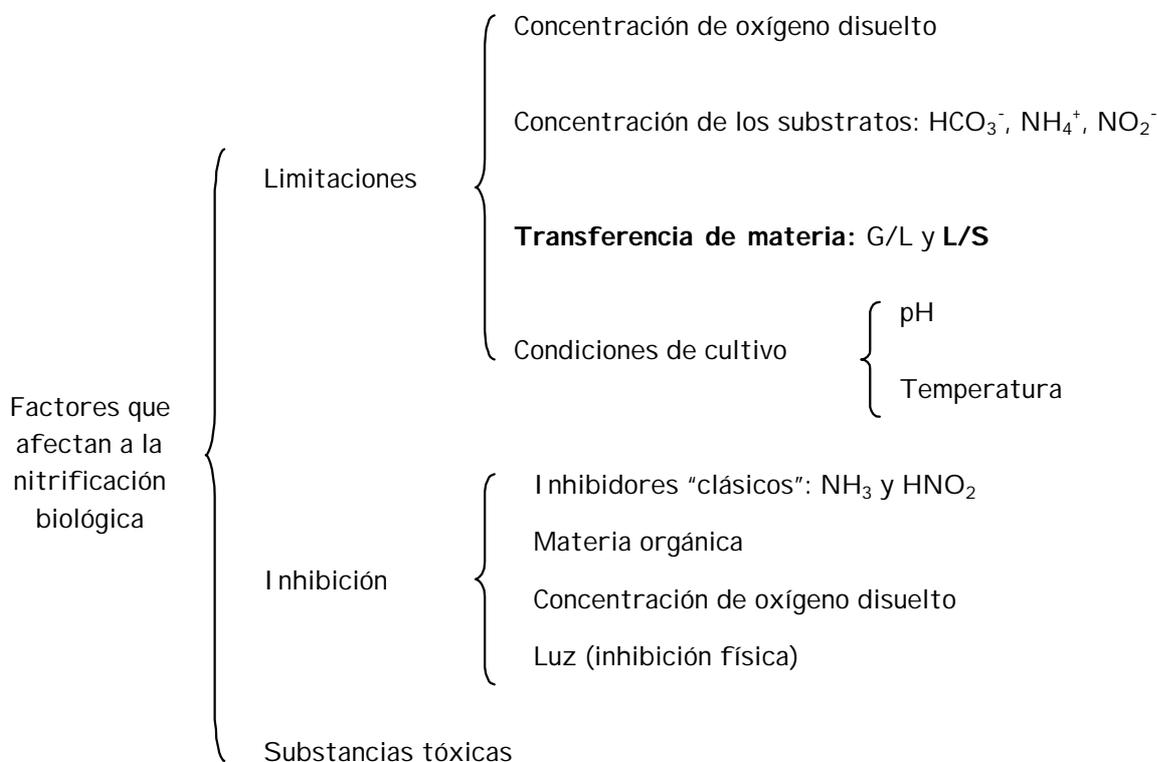
asegurar cierto nivel de carbonatos en la fase líquida, para que no existiese limitación por fuente de carbono en crecimiento autótrofo.

$O_2$ . Debido a que las bacterias nitrificantes requieren una cantidad importante de oxígeno, el efecto de limitación del crecimiento debido a una falta de  $O_2$  ha sido ampliamente estudiado. Cuando no existe limitación por sustrato nitrogenado, el efecto del oxígeno disuelto se ajusta a una cinética tipo Monod:

$$m_N = m_{max,N} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} ; \tag{1.1.}$$

Donde,  $S_{O_2}$  es la concentración de oxígeno disuelto y  $K_{O_2}$  es la constante de saturación para el oxígeno. Las constantes de saturación para cultivos puros de bacterias nitrificantes están en un rango aproximado de 0.25 - 2.5 mg/L de oxígeno disuelto (Painter, 1986). También resulta un hecho constatado que las bacterias que oxidan amonio tienen una constante de saturación mayor que la de las bacterias que oxidan nitrito.

$NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ . Son las fuentes de energía (dadores de electrones) de las bacterias que oxidan amonio y de las que oxidan nitrito (respectivamente). Es por esta razón que se consideran los factores limitantes del crecimiento más importantes, junto con el oxígeno. Generalmente, la constante de saturación de las bacterias que oxidan amonio es mayor que la de las que oxidan nitrito; sin embargo, la bibliografía consultada presenta una variabilidad notable (recopilación bibliográfica realizada por Prosser, 1989, y por otra parte, Hunik, 1994).



**Figura 1.15.- Esquema de los factores que influyen en el proceso de nitrificación. La transferencia de materia de la fase líquida a la sólida sólo afecta en el caso de células inmobilizadas.**

### ***Limitaciones físicas***

***pH.*** El pH óptimo de las bacterias nitrificantes está entre 7.5-8.5, aunque la nitrificación biológica se puede llevar a cabo en un rango más amplio (entre 6-10, según Prosser, 1989). En la limitación del crecimiento de las bacterias nitrificantes debido al pH se pueden diferenciar dos causas. La primera es que el pH afecta a la actividad enzimática, lo que provoca la consiguiente pérdida de actividad en las células. La segunda es que la concentración de protones afecta a los equilibrios ácido-base de los substratos:  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$  (lo cual, como se expondrá seguidamente, puede provocar inhibición), y afecta también a la concentración disponible de  $\text{HCO}_3^-$  (fuente de carbono).

***Temperatura.*** Al igual que para todas las bacterias, el crecimiento de las bacterias nitrificantes varía con la temperatura; el valor óptimo se sitúa en el rango 26-30 °C. El valor de la temperatura afecta a los valores de las constantes de equilibrio ácido/base, gas/líquido, a la solubilidad de las sustancias, a los coeficientes de difusión y a la actividad enzimática. La influencia de la temperatura en las diferentes constantes biológicas o físicas se expresa habitualmente mediante la ecuación de Arrhenius.

***Limitaciones de transferencia y difusión.*** En el caso de cultivos en suspensión, la transferencia de materia entre fases puede limitar el crecimiento: por ejemplo, el oxígeno se suministra en fase gas, y tiene que llegar a la fase líquida para ser consumido. En el caso de células inmovilizadas, no sólo hay que tener en cuenta la transferencia entre la fase gas y la líquida, sino que adquiere también importancia la transferencia entre la fase líquida y la sólida y la posterior difusión en el sólido (Garrido *et al.*, 1997).

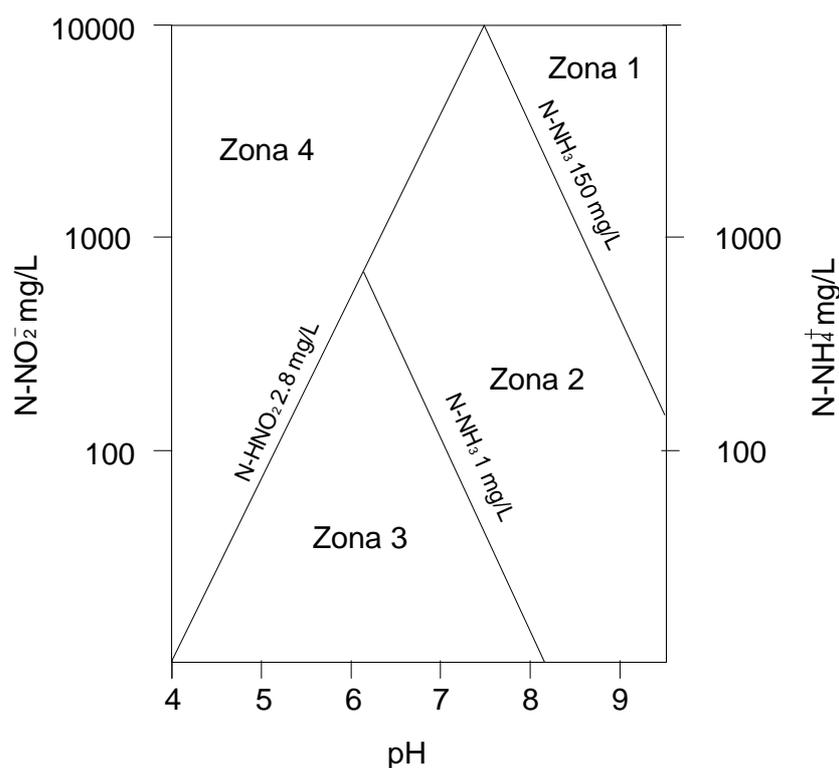
### **1.4.3.- Factores que inhiben el crecimiento**

#### ***Inhibición por substrato o producto***

\*  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ . Como resultado del estudio de la inhibición de la nitrificación por  $\text{NH}_3$  y  $\text{HNO}_2$  se propuso un diagrama (**figura 1.16.**) que combinaba el pH con el efecto inhibitorio de los compuestos  $\text{NH}_3$  y  $\text{HNO}_2$  en los cocultivos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Anthonisen *et al.*, 1976). En este diagrama se pueden observar diferentes zonas, en las que existe inhibición o no de alguna o de ambas especies debido a la concentración de las especies  $\text{NH}_3$  y  $\text{HNO}_2$  (verdaderos inhibidores), a ese pH.

\*  $Q_2$ : a elevadas concentraciones el oxígeno es inhibidor e induce a un aumento de la acumulación de polifosfatos (Prosser, 1989). No obstante, la inhibición por oxígeno parece más importante en procesos en los cuales se añade oxígeno puro o una elevada presión parcial de oxígeno, que en los que se aporta aire.

\* *Materia orgánica*: ya se ha comentado la posibilidad de crecimiento en medio mixotrófico por parte de las bacterias que oxidan nitrito. Además, lejos de ser inhibidora para estas bacterias, la presencia de materia orgánica acelera la velocidad de crecimiento de *Nitrobacter winogradskyi* (Watson *et al.*, 1989). La inhibición por la materia orgánica podría estar ligada más bien al hecho de que en poblaciones nitrificantes no axénicas, la aparición de una fuente de carbono orgánico altera los porcentajes de poblaciones relativas de microorganismos, permitiendo el desarrollo de células que, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno estarán asociadas a uno u otro género, estableciéndose competencias importantes. No obstante, se realizaron experimentos para intentar separar este efecto del posible efecto inhibitorio sobre las bacterias que oxidan amonio (Hanaki *et al.*, 1990a,b). Las conclusiones de este estudio fueron, que la oxidación de amonio por parte de las bacterias amonio-oxidantes, presentaba un claro efecto inhibitorio debido a la presencia de materia orgánica, mientras que no se observaba efecto en la oxidación de nitrito por parte de las bacterias nitrito-oxidantes.



**Figura 1.16.- Diagrama de Anthonisen. Zona 1 : inhibición de *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp. Zona 2 : inhibición de *Nitrobacter* sp por  $NH_3$  . Zona 3 : nitrificación. Zona 4 : inhibición de *Nitrobacter* sp por  $HNO_2$  .**

### ***Inhibición física***

***Inhibición del crecimiento por la luz:*** la inhibición por la luz es significativa en la superficie del agua, donde se observa una reducción del 50 % de la actividad de las bacterias nitrificantes a intensidades de luz de un orden de magnitud tres veces menor que la intensidad a plena luz del día. *Nitrobacter* parece ser más sensible a la fotoinhibición que *Nitrosomonas* (Prosser, 1989). En el crecimiento de las bacterias que oxidan amonio se puede reducir la sensibilidad a la luz mediante ausencia de oxígeno o altas concentraciones de amonio (Prosser, 1989).

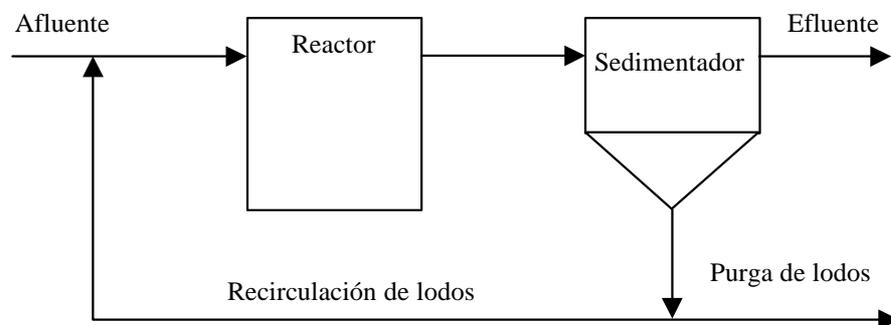
### ***Substancias tóxicas***

Al igual que en el caso del pH o la temperatura, el efecto de las sustancias tóxicas sobre las bacterias nitrificantes depende de la concentración de la sustancia tóxica y del tiempo de exposición a ésta. Las sustancias tóxicas más referenciadas en el campo de las aguas residuales son: tiourea, cianuro, fenoles, anilina (con efecto más acusado sobre *Nitrosomonas*), clorato y cianato (que producen una mayor toxicidad sobre *Nitrobacter*).

## **1.4.4.- Sistemas de nitrificación biológica en aguas residuales**

Para llevar a cabo el proceso de nitrificación de forma biológica se ha trabajado con diferentes sistemas, entre los cuales se distinguen principalmente dos tipos:

- a) Los sistemas con biomasa en suspensión. Es el tratamiento biológico más extendido en la actualidad en el campo de las aguas residuales. Estos sistemas consisten en biomasa suspendida en diferentes reactores en serie (un esquema de la configuración básica que consta de un reactor y un sedimentador se presenta en la **figura 1.17.**). Debido a la lenta velocidad de crecimiento de los microorganismos implicados en el proceso (especialmente los responsables de la oxidación del amonio y del nitrito), se requieren grandes tiempos de residencia y grandes tanques aerados para una eliminación eficiente de los compuestos nitrogenados. Por esta razón, se ha intensificado la investigación y desarrollo de sistemas compactos de nitrificación-desnitrificación tratando de minimizar el volumen requerido.



---

**Figura 1.17.- Configuración básica de un sistema de lodos activos.**

- b) Los sistemas con biomasa inmovilizada. Los microorganismos responsables de la nitrificación se fijan en algún tipo de soporte, permitiendo de esta manera trabajar con tiempos de residencia menores, y alcanzar velocidades de nitrificación más elevadas. Existen diferentes configuraciones y diferentes formas de inmovilización.

#### **1.4.5.- Sistemas de nitrificación biológica con biomasa inmovilizada**

Como ya se ha comentado, la concentración de biomasa que se alcanza en sistemas con células en suspensión (sistemas de lodos activos), limita fuertemente la capacidad y la efectividad del tratamiento. Una forma razonable de evitar esta limitación sería concentrar la biomasa en el reactor. Esta concentración puede realizarse mediante la inmovilización de los microorganismos sobre un soporte sólido o en su interior. La inmovilización se puede definir como el confinamiento físico de células en una región permitiendo que éstas mantengan la actividad deseada. Mediante la inmovilización, el tiempo de residencia de la fase líquida de un reactor que opera de forma continua, puede establecerse de forma independiente de la velocidad de crecimiento específico de los microorganismos que intervengan en dicho proceso. También es posible obtener mayores concentraciones de microorganismos para un mismo tiempo de residencia hidráulico, dado que éstos se retienen en el reactor. De esta manera, se pueden alcanzar capacidades de nitrificación mayores, utilizando reactores menores, con la ventaja adicional de que las células pueden separarse del efluente tratado mucho más fácilmente, eliminándose la dependencia de operaciones como la sedimentación o la centrifugación.

Por otra parte existen varios estudios que demuestran que bajo numerosas condiciones, los procesos con células inmovilizadas tienen otras ventajas sobre los sistemas de células en suspensión. Como ejemplos directamente relacionados con la nitrificación biológica se puede citar la disminución de la sensibilidad ante bajas temperaturas (Tanaka *et al.*, 1996, Wijffels y Tramper, 1995) o el aumento de la tolerancia en presencia de agentes inhibitorios (Tsai *et al.*, 1986, Hunik *et al.*, 1992). Esta disminución de la sensibilidad ante condiciones externas parece estar relacionada no con un efecto real de protección, sino con una mayor profundidad de penetración de los substratos limitantes en las capas de biomasa, como resultado de un descenso en la actividad de la biomasa más cercana a la fase líquida. La biomasa más interna posee por tanto, un papel importante como “biomasa tampón” que permite al sistema enfrentarse mejor a condiciones adversas (Martins dos Santos *et al.*, 1998; Characklis y Marshall, 1990).

Antes de describir a grandes rasgos las configuraciones básicas más comunes de los sistemas de nitrificación con biomasa inmovilizada, es interesante diferenciar los posibles tipos de inmovilización. De entre los distintos métodos de inmovilización de células, se puede distinguir entre los que se basan en la adhesión o enlace sobre una superficie o los que realizan una inclusión de las células en una partícula sólida. En procesos de nitrificación, las células inmovilizadas se acostumbra a dividir entre células adheridas de forma natural (biopelículas, adhesión sobre una superficie), y células inmovilizadas de forma artificial. Aunque el segundo es un proceso más reproducible, el primero es mucho

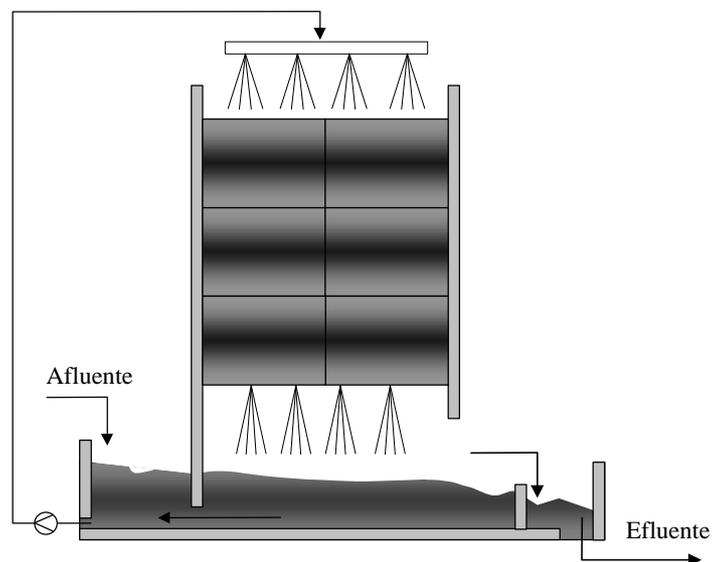
más simple, lo cual es una ventaja importante, sobre todo en sistemas de depuración de aguas residuales. Un segundo aspecto importante a destacar de los sistemas de adhesión sobre una superficie es que, dada la reversibilidad del proceso, un correcto diseño de la operación de los reactores permite ejercer un control sobre la cantidad de biomasa inmovilizada, sin necesidad de detener la operación, característica muy favorable en el caso del compartimento III del proyecto MELISSA, como se comprobará más adelante.

La inmovilización artificial se ha utilizado para estudiar más en profundidad el proceso de nitrificación, ya que son sistemas más controlables y mejor definidos (Wijffels, 1994). En los procesos de nitrificación, la forma habitual de inmovilizar las células de forma artificial es atrapándolas en una matriz polimérica. En general, mediante este procedimiento, una suspensión celular se mezcla con una suspensión del pre-polímero y la mezcla se hace polimerizar en su forma final (generalmente esferas de entre 0.5 y 3 mm de diámetro), o en una forma que pueda ser posteriormente extrusionada (cubos o cilindros para formar láminas o fibras). Existen varios principios en la formación del gel: gelificación ionotrópica, gelificación térmica, entrecruzamiento ('cross-linking') y polimerización entre otros. Los materiales utilizados pueden ser tanto polisacáridos naturales (como alginato, carragenato o agar), como polímeros sintéticos (alcohol polivinílico, poliacrilamida, poliuretano y sus derivados) (Martins dos Santos *et al.*, 1998).

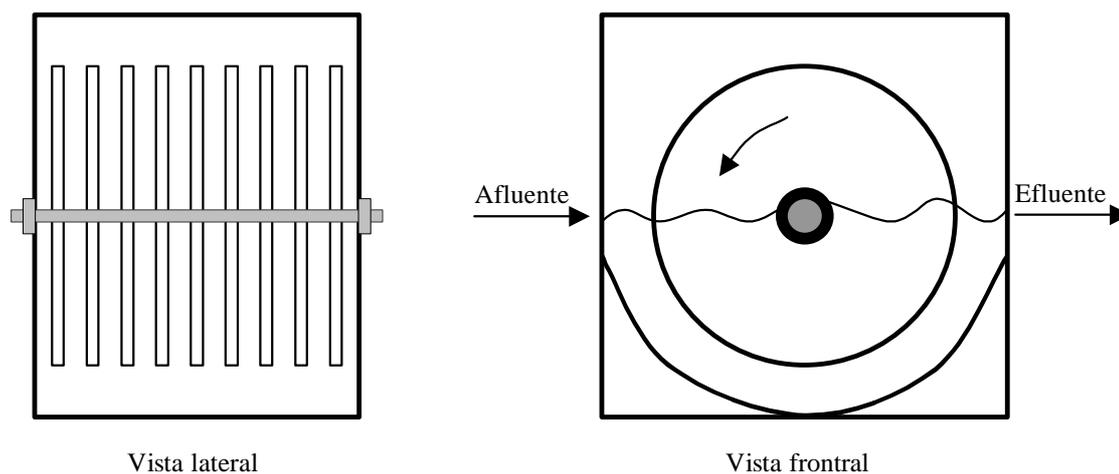
Uno de los métodos más comunes utilizados para el estudio de procesos de eliminación de nitrógeno con células inmovilizadas artificialmente consiste en atrapar microorganismos nitrificantes (desnitrificantes o mezclas de ambos) en cuentas de alginato o carragenato, formadas a partir de la extrusión de una mezcla de células y la suspensión de gel, y su posterior gelificación por contacto con iones (calcio, potasio, etc.). En este tipo de sistemas es posible trabajar con poblaciones de células perfectamente definidas, cuantificadas y uniformemente distribuidas en la partícula de biocatalizador (Wijffels, 1994).

### ***Sistemas de nitrificación biológica con células inmovilizadas mediante biopelícula***

En el caso de células inmovilizadas de forma natural, los sistemas más utilizados en la actualidad, en el caso de la nitrificación biológica, en el campo de las aguas residuales son los filtros percoladores, los biodiscos o contactores rotatorios biológicos, filtros sumergidos y lechos móviles (véase **figuras 1.18.-21**, y **tabla 1.6.**). Aunque inicialmente estos sistemas fueron concebidos para realizar únicamente el proceso de nitrificación, actualmente todos ellos pueden incorporar variaciones que permitan el crecimiento de microorganismos desnitrificantes (Martins dos Santos *et al.*, 1998). Debido a que el área específica de este tipo de sistemas es relativamente baja, la capacidad de nitrificación que tienen es limitada. Para mejorar dicha capacidad es necesario aumentar el área específica del soporte, aspecto que se consigue utilizando partículas más pequeñas. Este sería el caso de sistemas de lecho fijo y de lecho fluidizado. Estos reactores contienen partículas sólidas de diámetro reducido, entorno a las cuales se adhiere y desarrolla la biopelícula integrada por los microorganismos nitrificantes.



**Figura 1.18.- Esquema de un filtro percolador, (adaptado de Garrido, 1996).**



**Figura 1.19.- Esquema de un sistema de biodiscos o contactores rotatorios biológicos, (adaptado de Martins dos Santos et al., 1998).**

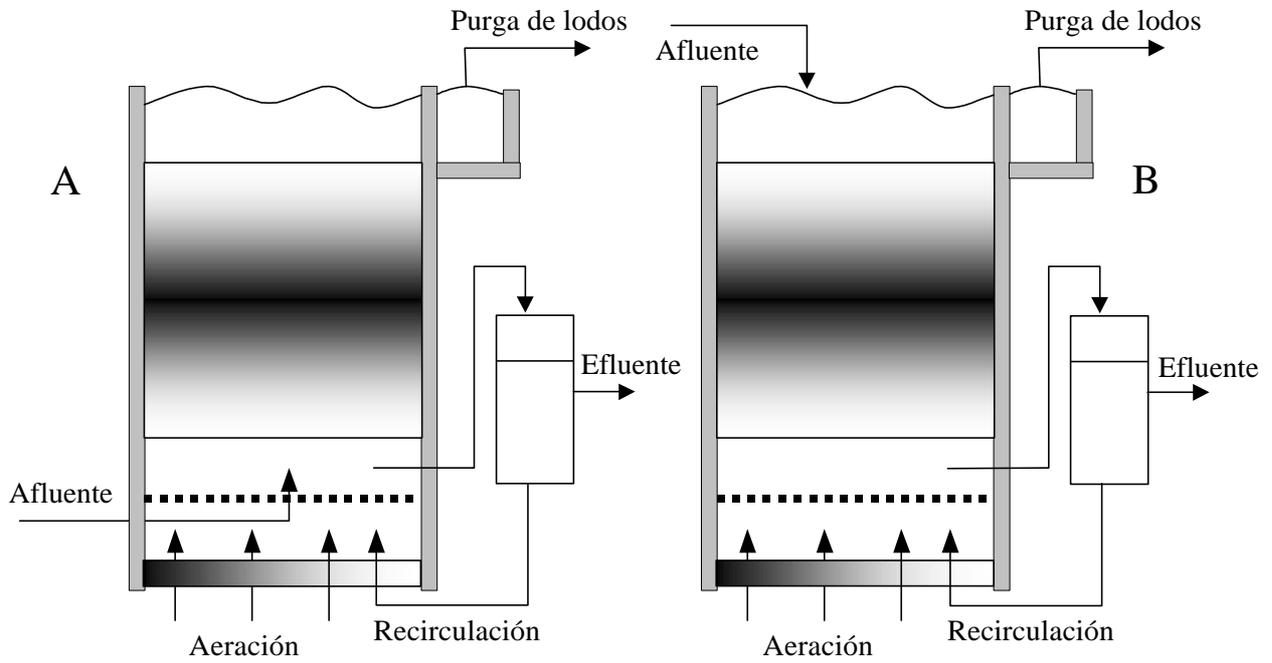


Figura 1.20.- Esquema de un filtro sumergido. A: flujo ascendente, B: flujo descendente, (adaptado de Garrido, 1996).

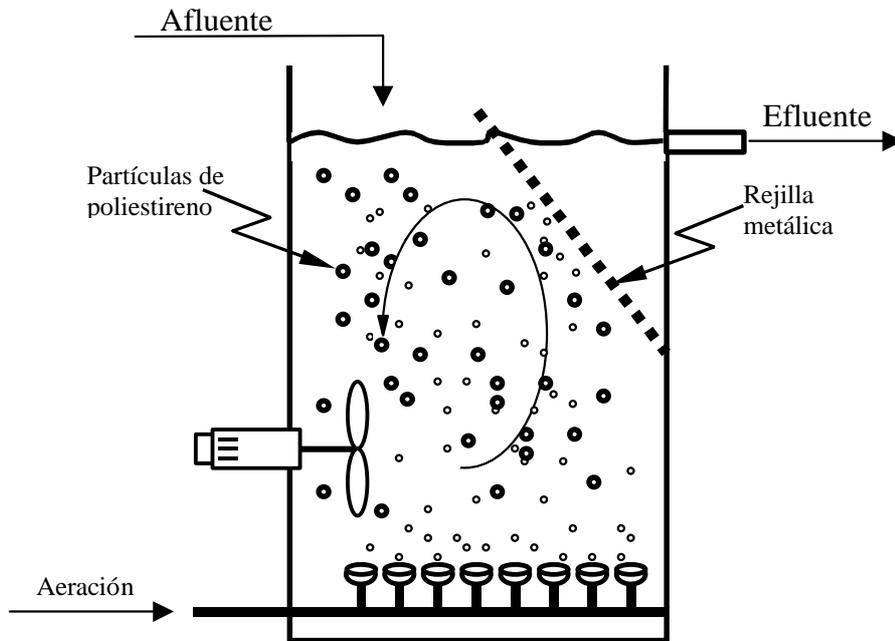


Figura 1.21.- Esquema de un reactor de lecho móvil (adaptado de Martins dos Santos et al., 1998).

De entre los distintos tipos de sistemas descritos, cuyas principales características se recogen en la tabla 1.6., cabe destacar que dentro de los denominados filtros sumergidos, se pueden diferenciar principalmente dos tipos de sistemas, dependiendo de la naturaleza del soporte: filtros sumergidos convencionales y lechos flotantes. Los lechos flotantes reciben esta denominación debido a que el material del soporte utilizado (poliestireno, polipropileno y polietileno) tiene una densidad menor que la del medio; este hecho disminuye el consumo de energía necesario para bombear el fluido a través del lecho, y por otra parte, facilita la limpieza en contracorriente. Los lechos fijos utilizados para realizar la parte experimental del presente trabajo son de este tipo: “flotantes”, ya que como ya se ha mencionado, el soporte utilizado es poliestireno.

**Tabla 1.6.- Características principales de los sistemas de nitrificación con células inmovilizadas a modo de biopelícula. Comparación con un sistema de lodos activos convencional. El área específica es antes del desarrollo de la biopelícula, (adaptado de Martins dos Santos et al., 1998).**

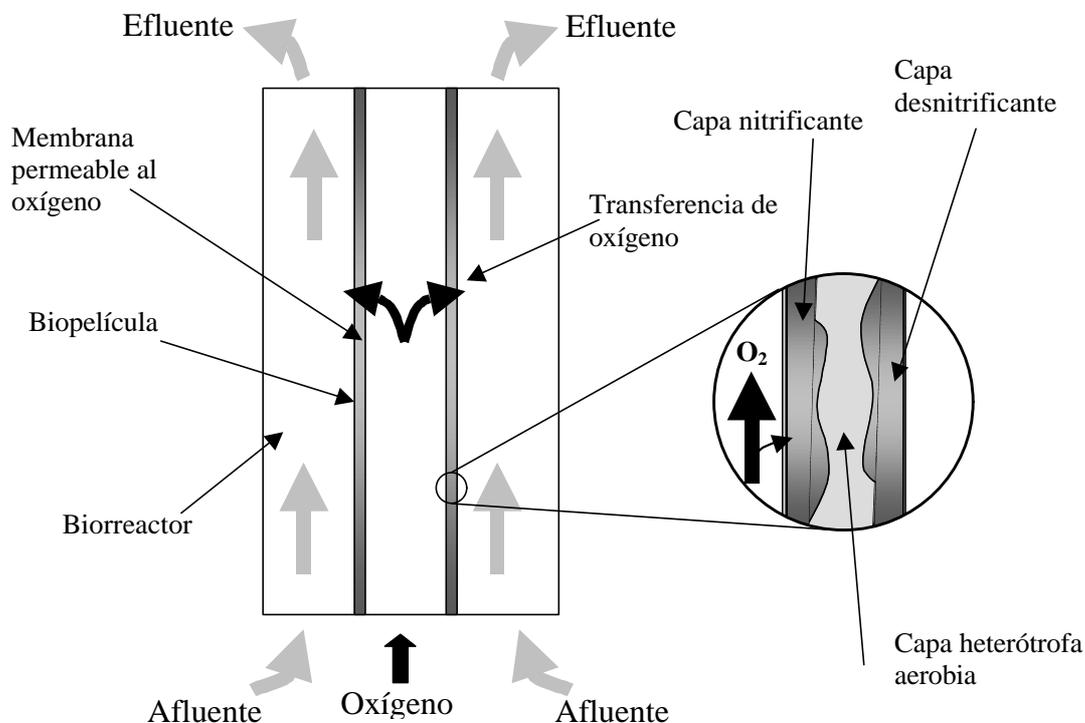
Sistema de nitrificación	Diámetro de las partículas de soporte (mm)	Área específica ( $m^2/m^3$ )	Concentración de biomasa (g/L)	Capacidad de nitrificación $kg N.m^{-3}.día^{-1}$
<b>Lodos activos</b>	--	--	0.5 - 6	0.2 - 0.6
<b>Filtro percolador</b>	2 - 5	150 - 300	5 - 15	0.4 - 0.8
<b>Biodiscos</b>	--	200 - 400	5 - 15	0.2 - 0.5
<b>Filtro sumergido</b>	1 - 5	200 - 700	5 - 15	0.4 - 1.5
<b>Lecho móvil</b>	2 - 10	100 - 500	3 - 10	0.3 - 0.6
<b>Lecho fluidizado</b>	0.2 - 2	1500 - 3000	5 - 60	1 - 3
<b>Reactor tipo <i>Gas-lift</i></b>	0.2 - 2.5	1500 - 3000	5 - 60	1 - 6
<b>Reactores de membrana</b>	--	200 - 1500	3 - 40	0.5 - 3

Muchos de los sistemas convencionales basados en biomasa inmovilizada anteriormente descritos han mejorado considerablemente la efectividad y la eficiencia de la nitrificación (y en general, la eliminación de nitrógeno). Estos sistemas están siendo utilizados en la actualidad en el tratamiento de aguas residuales, como resultado de las mejoras en el diseño de estas unidades de tratamiento. Al conseguir trabajar con una concentración relativamente elevada de biomasa, estos reactores son muy adecuados para tratar caudales importantes de aguas residuales con una baja concentración de compuestos nitrogenados. Sin embargo, en el caso de afluentes con elevada concentración de compuestos nitrogenados, estos tipos de reactores no son todavía suficientemente compactos, y tienen una limitación en cuanto a la capacidad de nitrificación volumétrica. Esto es debido básicamente a dos causas: baja área específica de biopelícula ( $200-500 m^2/m^3$ ), y coeficientes de transferencia de materia relativamente pobres, como consecuencia de una mezcla deficiente (Martin dos Santos *et al.*, 1998). Además, con excepción de los lechos móviles, este tipo de sistemas tiene un importante inconveniente debido a la necesidad de frecuentes lavados en contracorriente, para evitar la colmatación del lecho.

Para mejorar estas limitaciones se han desarrollado otros sistemas con nuevos diseños y concepciones, entre otros: lechos fluidizados, reactores tipo *gas-lift* y configuraciones compactas (véase tabla 1.6.), que integran nitrificación y desnitrificación en zonas diferenciadas del sistema, combinando zonas aerobias con zonas anaerobias (Martin dos Santos *et al.*, 1998). Una aproximación diferente al sistema es no dividir el

reactor en zonas diferenciadas, sino que las zonas diferenciadas (con especies de microorganismos diferentes) están incluidas en las partículas de biocatalizador, así surgió el concepto de las denominadas “cuentas mágicas” (Tramper *et al.*, 1984 y 1987). Estas partículas de gel contienen dos estratos: el externo, que está ocupado por las células nitrificantes, mientras que el interno alberga a las células desnitrificantes. De este modo, el acceso al oxígeno queda favorecido para las primeras, y al ser consumido no alcanza el corazón de la partícula, que se halla en anaerobiosis. Uno de los inconvenientes de este sistema es que aparecía competencia por el oxígeno entre las células nitrificantes y los heterótrofos aerobios que se adherían a la superficie del biocatalizador.

Por último, otro grupo de reactores con el que se ha tratado de mejorar la eficacia de los procesos de nitrificación son los denominados reactores de membrana (véase también tabla 1.6.). La configuración más sencilla sería un reactor de células en suspensión con un módulo de membranas que permite extraer el efluente libre de biomasa (Brindle y Stephenson, 1996). Otra concepción diferente es la presentada por Timberlake *et al.* (1988), denominado sistema de biopelícula de soporte permeable. En esta configuración los microorganismos se fijan en una membrana permeable y lo hacen de forma estratificada: la capa contigua a la membrana, por donde llegará el oxígeno, está colonizada por células nitrificantes, contiguo a este estrato, se hallan los heterótrofos aerobios, y en último lugar los microorganismos desnitrificantes, en contacto directo con la fase líquida de biorreactor. De forma que estas membranas están sumergidas en un módulo en el que se suministra el agua a tratar en el espacio exterior de las fibras en una zona y la aeración en otra (**figura 1.22.**).



**Figura 1.22.- Esquema de un sistema de biopelícula de soporte permeable, (adaptado de Martins dos Santos *et al.*, 1998).**

#### 1.4.6.- Crecimiento en biopelícula

Aplicando ciertas condiciones (habitualmente una velocidad de dilución en el reactor que exceda la velocidad específica máxima de crecimiento de las células, van Loosdrecht y Heijnen, 1993), muchos microorganismos se adhieren a la superficie de un sólido (preferiblemente rugoso), formando una biopelícula.

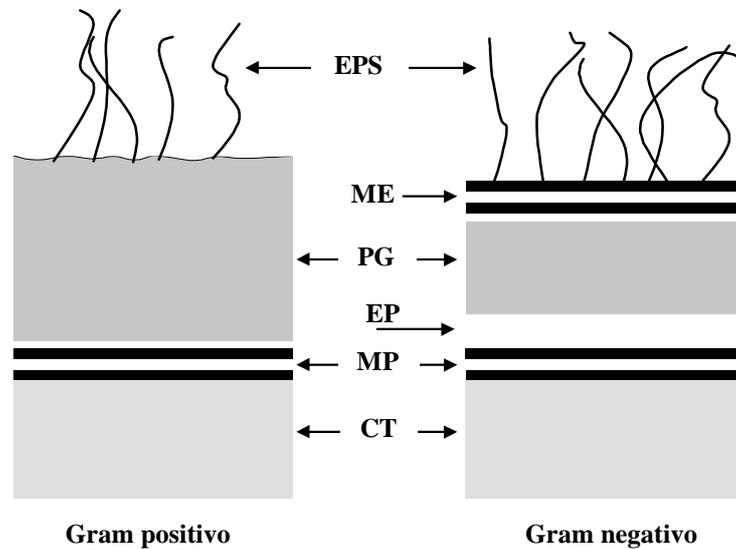
Los sistemas de biomasa fijada mediante biopelícula son complejos debido a la combinación de factores como el crecimiento bacteriano, el consumo de sustrato, adherencia, transferencia de materia externa e interna de sustrato y productos, muerte celular, pérdida de biopelícula por la erosión, estructura del material de soporte, competencia entre especies de bacterias (Wijffels, 1994), compresión y deformación de la biopelícula y/o soporte, etc.

##### *Descripción de la formación de biopelículas*

La formación de biopelículas es un proceso que se ha descrito en profundidad por varios autores (Nogueira *et al.*, 1998; Wijffels, 1994; Tjihuis *et al.*; 1995 Capdeville, 1992 y Characklis y Marshall, 1990 entre otros). La descripción más detallada de este proceso (de las consultadas) es la propuesta por Characklis y Marshall (1990). Estos autores distinguen entre dos tipos adhesión para describir el proceso de la formación de biopelículas: inicialmente los primeros microorganismos se adhieren directamente al soporte (adsorción). Mientras el soporte disponga de superficie sin colonizar este proceso se puede seguir produciendo, pero, simultáneamente, ocurre el segundo mecanismo de adhesión: la adhesión de células o unidades formadoras de colonias que se unen a las células que ya están unidas al soporte, de forma que esta adhesión se lleva a cabo desde la fase líquida a la biopelícula (y no directamente al soporte).

La adhesión de las primeras células al soporte, denominada proceso de adsorción, se puede llevar a término de forma química (generalmente irreversible, y que se produce gracias a una interacción química, como, por ejemplo, enlace covalente o iónico) o mediante una adsorción física (reversible, mas débil, mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces de coordinación,...). Una posibilidad habitual de adsorción irreversible es la que se realiza mediante sustancias poliméricas extracelulares (EPS, véase **figura 1.23.**), producidas por los microorganismos.

Tanto el proceso de adsorción al soporte como la adhesión de biomasa a la biopelícula, está influenciado principalmente, por tres factores: el tipo de flujo existente (laminar o turbulento), la microrrugosidad del soporte (o biopelícula) y el estado fisiológico de los microorganismos.

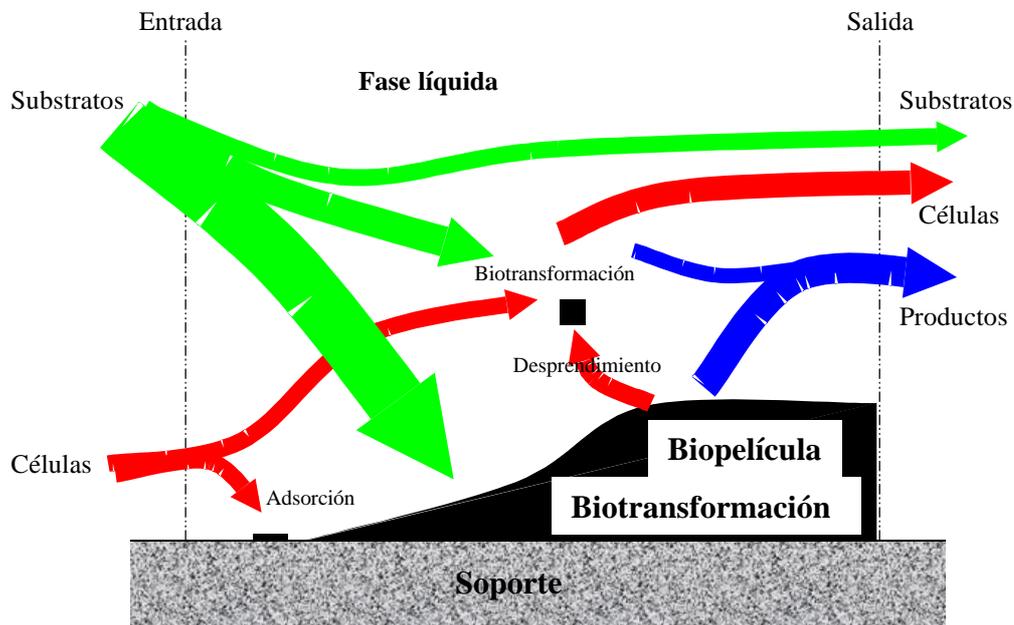


**Figura 1.23.- Representación esquemática de la pared celular de las bacterias gram positivo y gram negativo. EPS: sustancias poliméricas extracelulares, ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, EP: espacio periplasmático, MP: membrana plasmática, CT: citoplasma.**

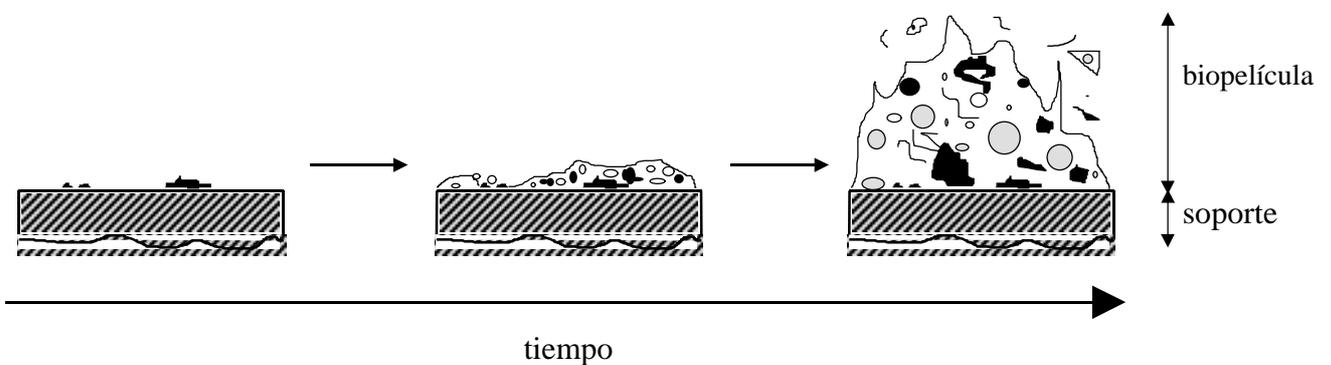
La microrrugosidad del soporte (y de la biopelícula), afecta directamente el proceso debido a dos causas: la rugosidad aumenta el área disponible (el área específica soporte/fase líquida), y protege a las células ya adsorbidas frente a la turbulencia y las fuerzas de cizalla.

En el desarrollo de la biopelícula intervienen varios procesos (en la **figura 1.24.** se esquematiza una visión global de los mismos): transporte y difusión de los substratos (incluyendo el oxígeno) a través de la fase líquida y hasta la biopelícula; transporte de células hasta el soporte; adsorción/desorción de células al/del soporte; crecimiento celular, formación de producto y muerte en la fase de la biopelícula y adhesión/desprendimiento de células en la interfase biopelícula/fase líquida. La evolución del grosor de biopelícula sigue normalmente una función sigmoidea (Characklis y Marshall, 1990).

La evolución de la formación de una biopelícula bacteriana se esquematiza en la **figura 1.25.** La formación natural de biopelículas se inicia sobre un soporte debido al crecimiento bacteriano; el espesor de la biopelícula se incrementa, siendo este crecimiento contrarrestado únicamente por el desprendimiento de biomasa (aunque podría afectar la compactación de la biopelícula, que alteraría su densidad y por tanto su espesor), lo que llegado el momento lleva a una situación pseudoestacionaria en la que la velocidad de formación de biomasa es igual a la de desprendimiento (Garrido, 1996).



**Figura 1.24.- Representación esquemática de los procesos que contribuyen al desarrollo de la biopelícula (adaptado de Characklis y Marshall, 1990).**



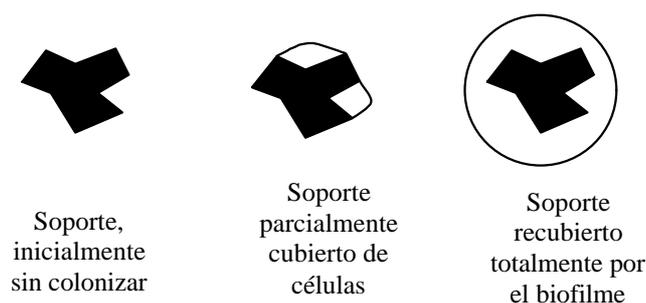
**Figura 1.25.- Representación esquemática de la formación de la biopelícula. (Wijffels, 1994)**

La formación y desarrollo de biopelículas sobre un soporte se puede describir macroscópicamente, mediante varias etapas (Capdeville, 1992):

- I. Fase de latencia: el soporte no está cubierto de biomasa.
- II. Crecimiento dinámico: el soporte se recubre de una biopelícula.
- III. Fase de crecimiento lineal: la biomasa se acumula proporcionalmente al tiempo.
- IV. Desprendimiento: ocurre cuando la biopelícula se ha desarrollado plenamente.

Otros autores, (Nogueira *et al.*, 1998; Tjihuis *et al.*, 1995), diferencian tres estadios en el proceso de colonización del soporte por parte de las células (fases I y II en la anterior descripción) (véase **figura 1.26.**):

- I. Adhesión de las células.
- II. Formación de biopelícula en las concavidades del soporte (la biopelícula no recubre el soporte de forma homogénea).
- III. Extensión de la biopelícula desde las áreas colonizadas al resto de superficie (hasta que el soporte está cubierto de forma completa u homogénea).



**Figura 1.26.- Representación esquemática de las fases en el proceso de formación de biopelícula (adaptado de Tjihuis *et al.*, 1995).**

Existe una amplia variedad de materiales utilizados como soporte para la inmovilización natural de células mediante biopelícula. Estos soportes (a menudo con forma esférica o cilíndrica y preferiblemente rugosos) incluyen arena, basalto, madera, grava, arcilla, carbón activo, acero inoxidable, cerámica, materiales plásticos (poliestireno, poliuretano), entre otros.

Muchas de las biopelículas naturales contienen diferentes grupos de bacterias, cada una con sus propias necesidades y parámetros de crecimiento específicos. Esto significa que en este tipo de procesos se establecerán gradientes de concentración de sustrato, y por tanto aparecerá competencia entre especies por el espacio a ocupar en la biopelícula (cuanto más externa sea la posición, más sustrato habrá disponible) y por los tipos de sustratos a consumir (Martins dos Santos *et al.*, 1998). Debido a la mencionada competencia entre especies, las biopelículas se desarrollarán en estructuras estratificadas, en las cuales, las células más cercanas a la superficie serán las que tendrán una mayor velocidad de crecimiento.

#### **1.4.7.- Biopelículas frente a inmovilización por inclusión**

La inmensa mayoría de sistemas descritos están basados en reactores con células inmovilizadas, en algunos casos de forma natural (biopelícula), mientras que en otros mediante inclusión de los microorganismos en gel. En ambos casos las células experimentan restricciones similares en el transporte de sustrato en la interfase líquido-sólido y a través de la fase sólida (biopelícula o matriz de inmovilización). Sin embargo,

existe una diferencia importante: en las partículas de gel existe inicialmente una distribución homogénea (definida) de biomasa, que termina concentrándose en la zona próxima a la superficie de la partícula.; mientras que en el caso de biopelículas adheridas de forma natural, el crecimiento consiste en la acumulación de células en la superficie de una partícula de soporte inicialmente no colonizada.

Por tanto, mientras que el crecimiento celular provoca que la densidad de biomasa aumente en el interior de las partículas de gel, en las biopelículas disminuye el área específica de la partícula de biocatalizador. En estado estacionario, como ya se ha descrito, parte de la biopelícula se desprende, fenómeno que depende en gran medida de la turbulencia y las fuerzas de cizalla que actúan sobre la estructura de la biopelícula. En el caso de partículas de gel, si éstas poseen una estructura mecánicamente estable no sufren desprendimiento de células, sin embargo, en este caso también se produce liberación de células al medio líquido, una vez las partículas han alcanzado la máxima capacidad para soportar células, el crecimiento celular en la partícula se traduce en la liberación de células al medio líquido del reactor (Wijffels, 1994). Por lo tanto, en ambos casos terminan apareciendo células en suspensión en el efluente.

De todo ello se puede concluir que aunque se parta de metodologías distintas, la estructura final de la partícula que se consigue a nivel de distribución espacial de células es bastante parecida.

Como ventajas y desventajas relevantes de los procesos de inmovilización mediante biopelícula aplicados a procesos de nitrificación, se pueden citar:

- El procedimiento de inmovilización en el caso de biopelículas es mucho más simple y con menor coste económico.
- Los materiales empleados en la inclusión artificial de células son más caros que los empleados como soporte en la inmovilización a modo de biopelícula.
- Las partículas extrusionadas a partir de polímeros naturales (alginato y carragenato), tienen una carencia importante de estabilidad mecánica y son biodegradables por microorganismos presentes en las aguas residuales. En cambio, los materiales típicos de soporte en biopelículas (basalto, silicatos o carbón activo), son inertes, resistentes y obviamente no biodegradables. No obstante, se han utilizado polímeros sintéticos que han dado resultado positivos a gran escala (Tanaka *et al.*, 1996).
- Los procesos de inmovilización natural en biopelícula, permiten trabajar con partículas de diámetro muy reducido (Tijhuis *et al.*, 1996), lo cual aumenta de forma importante el área específica disponible, permitiendo alcanzar velocidades de nitrificación más elevadas que en el caso de los microorganismos encapsulados.
- Las biopelículas no son sistemas completamente definidos. De hecho existen todavía muchos interrogantes entorno a su formación y crecimiento, su estructura, el desprendimiento de biomasa, las dinámicas de las poblaciones implicadas, el escalado,... Por esta razón estos sistemas son más complejos.
- Debido a la falta de conocimiento profundo de los sistemas de biopelícula y a su naturaleza dinámica que se ve afectada por múltiples factores, el diseño, la optimización y el control de estos reactores son difíciles de abordar de una forma perfectamente

definida y los modelos matemáticos que se desarrollan para describir este proceso suelen ser muy complejos, con parámetros difíciles de ser evaluados, o deben incluir necesariamente simplificaciones razonables, que permitan una descripción satisfactoria del sistema (en el caso de sistemas como el del proyecto MELISSA, en el que se trabaja con células axénicas, este inconveniente se puede evitar). Y por último la turbulencia y las fuerzas de cizalla que aparezcan en el sistema van a terminar determinando tanto el grosor como la densidad de la biopelícula.

- La puesta en marcha de sistemas de inmovilización a modo de biopelícula es mucho más larga que en el caso de las células incluidas en una matriz polimérica (Tijhuis *et al.*, 1995).
- En los procesos en biopelícula existe la posibilidad de controlar el desarrollo excesivo de ésta, de forma que es posible alargar la duración de la operación (característica muy relevante para el proyecto MELISSA), lo cual resulta imposible en el caso de la inmovilización artificial.

---

### **1.5.- Modelos del proceso de nitrificación biológica en biopelícula**

---

Los modelos matemáticos utilizados para describir sistemas biológicos representan tan sólo una aproximación a la realidad: “Incluso la más simple célula viva es un sistema de tan imponente complejidad que cualquier descripción matemática es una aproximación extremadamente modesta” (Bailey, 1998); o “todos los modelos son incorrectos, pero algunos son útiles” (Brown, 1997).

La complicación de cualquier sistema biológico está acentuada en el caso de las biopelículas. El desarrollo de modelos matemáticos que describan los sistemas con biopelículas dispone de un valor añadido importante. Debido a la complejidad de estos sistemas y junto con las dificultades experimentales que comporta su estudio (acentuadas, si cabe, en el caso de biopelículas axénicas), los modelos matemáticos se convierten en una herramienta casi indispensable para estudiar tanto el proceso biológico, físico y químico, así como el sistema en sí mismo (Gujer y Wanner, 1990).

En general, la modelización de sistemas biológicos pretende responder a una serie de necesidades que deben ser definidas anteriormente a la formulación del modelo: organizar la información de una forma coherente, definir qué componentes e interacciones son relevantes en el sistema, estudio de nuevas estrategias, profundizar en la comprensión de las características fundamentales del sistema, permitiendo de este modo demostrar incluso aspectos que difieren del conocimiento aceptado hasta el momento (Bailey, 1998).

En general los modelos de sistemas en biopelículas se pueden dividir en dos subsistemas: un subsistema que describiría las concentraciones de sustrato y otro que describiría las concentraciones celulares y la distribución de cada una de las poblaciones. Los tiempos característicos de cada uno de estos subsistemas son muy diferentes. Por esta razón, dependiendo del subsistema de interés, es habitual considerar que uno de ellos se encuentra en estado estacionario. De este modo, los modelos que se hallan en la bibliografía

se pueden clasificar, principalmente, en: modelos de estado estacionario y modelos dinámicos.

En el proceso de nitrificación biológica mediante biopelículas, una aproximación usual es considerar despreciable el crecimiento y sólo tener en cuenta la degradación que producirán las células, suponiendo que la biopelícula se halla en un estado pseudoestacionario. Esta aproximación, únicamente describirá adecuadamente el estado estacionario, y por tanto no permitirá obtener información de los periodos transitorios de respuesta del sistema a una determinada perturbación cualitativamente importante. Otro inconveniente de este tipo de modelos es que el grosor de biopelícula debe ser perfectamente conocido. Para biopelículas con dos poblaciones celulares el modelo propuesto por Wik y Breitholtz (1996), aporta una aproximación a la solución en estado estacionario.

En el caso de modelos dinámicos, éstos se caracterizan por describir el proceso tanto en el caso de periodos transitorios como en el caso de estados estacionarios, por tanto, tienen en cuenta el crecimiento de los microorganismos. En este tipo de modelos, el grosor o la densidad de la biopelícula aumentará o disminuirá en función del tiempo. Esta variación, sin embargo, debe tener una restricción física o biológica, un máximo. En general, la biopelícula se desarrollará mientras que la velocidad de crecimiento sea mayor que la velocidad de muerte celular. Habitualmente, la pérdida de porciones de biopelícula por la erosión o una limitación en el crecimiento acota el grosor de la película celular, en caso contrario la biopelícula crecería de forma infinita (Chen *et al.*, 1989).

La pérdida de porciones de biopelícula es un proceso complejo, que no sólo depende de la difusión de los sustratos y de su consumo, sino también de la turbulencia presente alrededor de la superficie de la biopelícula.

Los modelos dinámicos son realmente complejos, ya que se requieren ecuaciones en derivadas parciales y dependiendo del modelo de flujo utilizado, una o dos variables espaciales. Una de las descripciones más exhaustivas es la propuesta por Wood y Whitaker (2000), en la que se consigue describir los problemas difusionales y de reacción en biopelículas y sistemas celulares en los que la velocidad de reacción está limitada simultáneamente por el sustrato y por el aceptor de electrones.

La selección del tipo de modelo estará, no obstante, ligada a las aplicaciones posteriores. Es decir, en caso de que el modelo quiera ser utilizado para realizar acciones de control sobre el sistema, el tiempo de cálculo es realmente una variable muy condicionante. Además, a menudo, en este tipo de sistemas, la utilidad de los modelos matemáticos está sin duda enfocada a la descripción de los resultados experimentales, y a menudo, una descripción cualitativa del comportamiento se considera satisfactoria. Desde este punto de vista, las aproximaciones que permitan disminuir la complejidad de las expresiones matemáticas, así como la reducción del número de parámetros a optimizar son de vital importancia.



---

---

## OBJETIVOS

---

---

El objeto principal del trabajo es desarrollar el tercer compartimento (compartimento nitrificante) del proyecto MELISSA. Como se ha descrito en el apartado 1.3., este trabajo parte de unos antecedentes en los que se definió el tipo de biorreactor para este compartimento (lecho fijo con células inmovilizadas), el tipo de soporte (poliestireno) y se construyó un primer reactor a escala piloto (aunque de forma incompleta y sin llegar a ponerse nunca en marcha). A partir de este punto, y para alcanzar el objetivo de este trabajo, se plantean las siguientes metas específicas:

- Obtención de suficiente biomasa de las dos cepas bacterianas (*Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi*) como para poder inocular los diferentes reactores y llevar a cabo la realización de experimentos.
- Configuración del control básico del reactor piloto (pH, temperatura, oxígeno disuelto, sobrepresión y control de nivel).
- Diseño y desarrollo de reactores de lecho fijo a escala laboratorio, que permitan complementar el trabajo efectuado en el reactor a escala piloto.
- Caracterización física de los reactores: estudio del tipo de flujo en el reactor mediante experimentos de distribución del tiempo de residencia, determinación de volúmenes de cada una de las fases y transferencia de materia entre fases (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno).
- Experimentos de nitrificación que permitan el estudio de las variables y condiciones básicas que afectan al proceso, tanto en estado estacionario como en los períodos transitorios: oxígeno disuelto, tiempo de residencia, temperatura, etc.
- Construcción de modelos que permitan profundizar en el estudio del proceso de nitrificación biológica en biopelícula, en la interpretación del comportamiento de los reactores y en la definición de condiciones de operación.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

### 3.1.- Cepas utilizadas y medios de cultivo

---

Se utilizaron las siguientes cepas de bacterias procedentes de la American Type Culture Collection:

- *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), bacteria capaz de oxidar el amonio a nitrito.
- *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25391), bacteria capaz de oxidar el nitrito a nitrato.

#### Medios de cultivo

##### a.- Medios de recuperación de las cepas

Las cepas se recibieron o bien liofilizadas (*Nitrobacter winogradskyi*) o en suspensión (*Nitrosomonas europaea*). Para recuperarlas se utilizaron las recomendaciones y los medios propuestos por la ATCC. Para *Nitrosomonas europaea* se utilizó el medio n° 221 (**tabla 3.1.**) y para *Nitrobacter winogradskyi* el medio n° 480 (**tabla 3.2.**).

##### b.- Medios de cultivo

Para los cultivos de *Nitrosomonas europaea* se utilizó el medio que se muestra en la **tabla 3.3.** (adaptado de Wijffels, 1994). Para los cultivos de *Nitrobacter winogradskyi* se utilizaron principalmente dos medios:

- Medio mixotrófico. La composición de este medio (adaptado de Hendrikus *et al.*, 1993), se detalla en la **tabla 3.4.** Se utilizó inicialmente para acelerar el crecimiento de los cultivos. Ya se ha comentado en el primer capítulo la capacidad de estas bacterias para consumir una fuente de carbono orgánica. Crecer en estas condiciones aumenta de forma muy notable la velocidad de crecimiento (en un medio con extracto de levadura, peptona y ácido pirúvico estas bacterias disminuyen el tiempo de duplicación y aumenta el crecimiento celular en un factor de 10 (Watson *et al.*, 1989)).
- Medio autótrofo. La composición de este medio se especifica en la **tabla 3.5.** (adaptado de Wijffels, 1994).

Para los cocultivos se utilizó el medio que se muestra en la **tabla 3.6.** (adaptado de Wijffels, 1994).

**Tabla 3.1.- Medio n° 221 de la ATCC (recuperación de *Nitrosomonas europaea*). Ajustar el pH a 8.2 con  $K_2CO_3$  (50 %). Autoclavar por separado sales de calcio y magnesio. ( \* La solución de Fe / EDTA se prepara con 0.14 g de EDTA (sal disódica), 0.50 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05 ml de  $H_2SO_4$  concentrado y 100 ml de agua destilada).**

Componente	Cantidad por litro de agua destilada
$(NH_4)_2SO_4$	3.0 g
$K_2HPO_4$	0.5 g
Fe / EDTA *	0.1 mL
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.78 g
$MgSO_4$	0.05 g
$CaCl_2$	$4.0 \cdot 10^{-3}$ g

**Tabla 3.2.- Medio n° 480 de la ATCC (recuperación de *Nitrobacter winogradskyi*). Ajustar el pH a 8.2 con  $Na_2CO_3$  (50 %). La solución de Fe / EDTA se prepara igual a la del medio de la tabla 3.1. Las soluciones A, B, D, E y F se detallan en la tabla 3.2bis.**

Componente	Cantidad por litro de agua destilada
solución A	0.5 mL
solución B	0.5 mL
Fe / EDTA	1.0 mL
solución D	0.5 mL
solución E	0.5 mL
solución F	0.01 mL

**Tabla 3.2bis.- Composición de las soluciones A, B, C, D, E y F del medio n° 480 de la ATCC (recuperación de *Nitrobacter winogradskyi*).**

Solución	Componente	Cantidad
A	$CaCl_2$	2.0g
	agua destilada	100 mL
B	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20.0 g
	agua destilada	100 mL
D	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.08 g
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02 g
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.002 g
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.2 g
	agua destilada	1000 mL
E	$NaNO_2$	41.4 g
	agua destilada	100 mL
F	$K_2HPO_4$	1.74 g
	agua destilada	100 mL

**Tabla 3.3.- Medio para cultivos de *Nitrosomonas europaea*. Ajustar el pH a 8.2 con carbonato de sodio. ( \* Compuestos que se esterilizaban por separado o se filtraban (0.22 mm) posteriormente a la esterilización en autoclave).**

Componente	Masa (g) por litro de agua destilada
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.32
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.2·10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.71
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.78
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O *	0.052
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O *	7.4·10 <sup>-4</sup>

**Tabla 3.4.- Composición del medio mixotrófico utilizado en los cultivos de *Nitrobacter winogradskyi*. Ajustar el pH a 8.2 con carbonato de sodio. ( \* Compuestos que se esterilizaban por separado o se filtraban (0.22 mm) posteriormente a la esterilización en autoclave). Solución D: véase tabla 3.2bis.**

Componente	Cantidad por cada litro de agua destilada
NaNO <sub>2</sub>	0.691 g
NaCl	0.584 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.150 g
KCl	0.075 g
Piruvato sódico (NaC <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> )	0.550 g
Extracto de levadura	1.5 g
Peptona pancreática	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O *	0.049 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O *	0.147 g
solución D (micronutrientes)	0.5 mL

**Tabla 3.5.- Composición del medio inorgánico que se utilizó en el cultivo de *Nitrobacter winogradskyi*. Ajustar el pH a 8.2 con carbonato de sodio. ( \* Compuestos que se esterilizaban por separado o se filtraban (0.22 mm) posteriormente al autoclavado).**

Componente	Masa (g) por cada litro de agua destilada
NaNO <sub>2</sub>	1.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.68
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.79
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.177
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4.3·10 <sup>-6</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4·10 <sup>-6</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	0.0244
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O *	0.0517
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O *	7.34·10 <sup>-4</sup>

**Tabla 3.6.- Composición detallada del medio del cultivo mixto de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi*. ( \* Compuestos que se añaden filtrados (0.22  $\mu\text{m}$ ) posteriormente a la esterilización en autoclave).**

Componente	Masa (g) por cada litro de agua destilada
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.32
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$4 \cdot 10^{-6}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.71
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.68
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.177
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$4.3 \cdot 10^{-6}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ *	0.052
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ *	$7.4 \cdot 10^{-4}$
$\text{NaHCO}_3$ *	0.8

### **3.2.- Análisis de los compuestos nitrogenados**

#### **3.2.1.- Análisis de amonio ( $\text{NH}_4^+$ )**

El análisis de la concentración de amonio se realizó mediante dos métodos diferentes:

- Electroforesis capilar (Waters, Milford (MA) USA, Capillary Ion Analyzer ).

Se trata de una técnica de separación en la que la muestra es inyectada en un extremo del capilar. En éste se separan los compuestos, según su movilidad bajo el efecto del campo eléctrico que se aplica entre los dos extremos del capilar. El detector se sitúa en el capilar. La detección de las especies separadas se realiza mediante la lectura de la absorbancia en la región UV/Vis.

Para el catión amonio se utilizaban como condiciones analíticas, las presentadas en la **tabla 3.7**.

- Método colorimétrico químico comercial: (Dr. Lange, Düsseldorf, Alemania, cubetas test LCK 305, rango de análisis 1-12 ppm). El principio de este análisis se basa en la reacción de los iones amonio con iones hipoclorito y salicilato en presencia de nitroferrocianida como catalizador (pH = 12.6) para formar azul de indofenol. La medida de la absorbancia se realiza a 694 nm.

Los resultados de los dos métodos se contrastaron y aunque resultaban coherentes, se ha utilizado más frecuentemente el método de reacción química, debido a que los análisis se realizaban con una frecuencia poco elevada e interesaba conocer los resultados

rápidamente. Los análisis mediante electroforesis capilar son más adecuados para analizar un mayor número de muestras, ya que, entre otras causas, es necesaria una calibración exhaustiva del aparato para obtener cierta precisión. Esta consideración se puede extender a los análisis de nitrato y nitrito, que se tratan a continuación.

**Tabla 3.7.- Condiciones analíticas que permiten analizar el amonio por electroforesis capilar en presencia del catión potasio sin que éste sea una interferencia. (\* La composición del electrolito es 30 mg de tropolona, 52 mg de éter 18-corona-6 y 60 mg de UV-Cat 2 por cada 100 ml de agua Milli-Q)**

Electrolito	UV-Cat 2, Tropolona, éter-18-corona-6 *
Capilar	Sílice fundida, 75 µm x 60 cm
Fuente de alimentación	Positiva
Potencial de análisis	20 KV
Intensidad de corriente aproximada	12 µA
Modo de inyección	Hidrostático
Tiempo de inyección	30 s
Tiempo de análisis	6 min
Detección	UV indirecta 185nm / lámpara de mercurio
Temperatura	20 °C
Tiempo de purga automática	2 min
Velocidad de adquisición de datos	10 puntos/s

### 3.2.2.- Análisis de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

Al igual que en el caso del amonio se utilizaron dos métodos de análisis:

- Electroforesis capilar: en el caso del análisis de nitrato se utilizaron como condiciones analíticas las que se especifican en la **tabla 3.8**. En este mismo análisis se consigue determinar la concentración de nitrito en la muestra.
- Método colorimétrico químico comercial: (Dr. Lange, Düsseldorf, Alemania, cubetas test LCK 339, rango de análisis: 0.23 - 13.5 ppm). El principio de este análisis se basa en la reacción de los iones nitrato, en soluciones que contienen ácido sulfúrico y fosfórico, con 2,6-dimetilfenol para formar 4-nitro-2,6-dimetilfenol, que se cuantifica mediante la absorbancia a 370 nm.

**Tabla 3.8.- Condiciones de análisis mediante electroforesis capilar de iones nitrato y nitrito (se trata de un electrolito comercial de la marca Waters)**

Electrolito	Ionselect High Mobility Anion Electrolyte*
Capilar	Sílice fundida, 75 µm x 60 cm
Fuente de alimentación	Negativa
Potencial de análisis	15 KV
Intensidad de corriente aproximada	14 µA
Modo de inyección	Hidrostático
Tiempo de inyección	30 s
Tiempo de análisis	5 min
Detección	UV indirecta 254 nm / lámpara de mercurio
Temperatura	25 °C
Tiempo de purga automática	2 min
Velocidad de adquisición de datos	20 puntos/s

### 3.2.3.- Análisis de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Al igual que en los casos anteriores, se utilizaron los mismos métodos para determinar de la concentración de nitrito:

- Electroforesis capilar: en el caso del análisis de nitrito se utilizaron las mismas condiciones que en el análisis de nitrato, ya que el análisis mediante electroforesis era simultáneo.
- Método colorimétrico químico comercial: (Dr. Lange, Düsseldorf, Alemania, cubetas test LCK 341, rango de análisis: 0.015 - 0.6 ppm). El principio de este análisis se basa en la reacción de los iones nitrito en solución ácida, con aminas aromáticas primarias para formar sales de diazonio, que se cuantifican mediante la lectura de la absorbancia a 524 nm.

---

### 3.3.- Reactores de nitrificación

---

#### 3.3.1.- Configuración del reactor piloto

Como ya se ha comentado en el capítulo introductorio, el reactor piloto del tercer compartimento del bucle MELISSA es un reactor de lecho fijo con células inmovilizadas sobre un soporte.

El reactor consta de tres secciones o partes diferenciadas: la parte inferior agitada mediante un agitador magnético, el lecho o parte central del reactor donde se halla el soporte y por tanto las células inmovilizadas; y por último, la sección superior. En la **figura 3.1.** se presenta un esquema del reactor piloto de nitrificación. En la **tabla 3.9.** se detallan cada uno de los instrumentos, sondas y demás componentes del reactor piloto.

El reactor piloto tiene un volumen total aproximado de 8 L, pero los volúmenes de cada una de las partes y sus dimensiones se presentan en el punto 4.3.1.1. del presente trabajo.

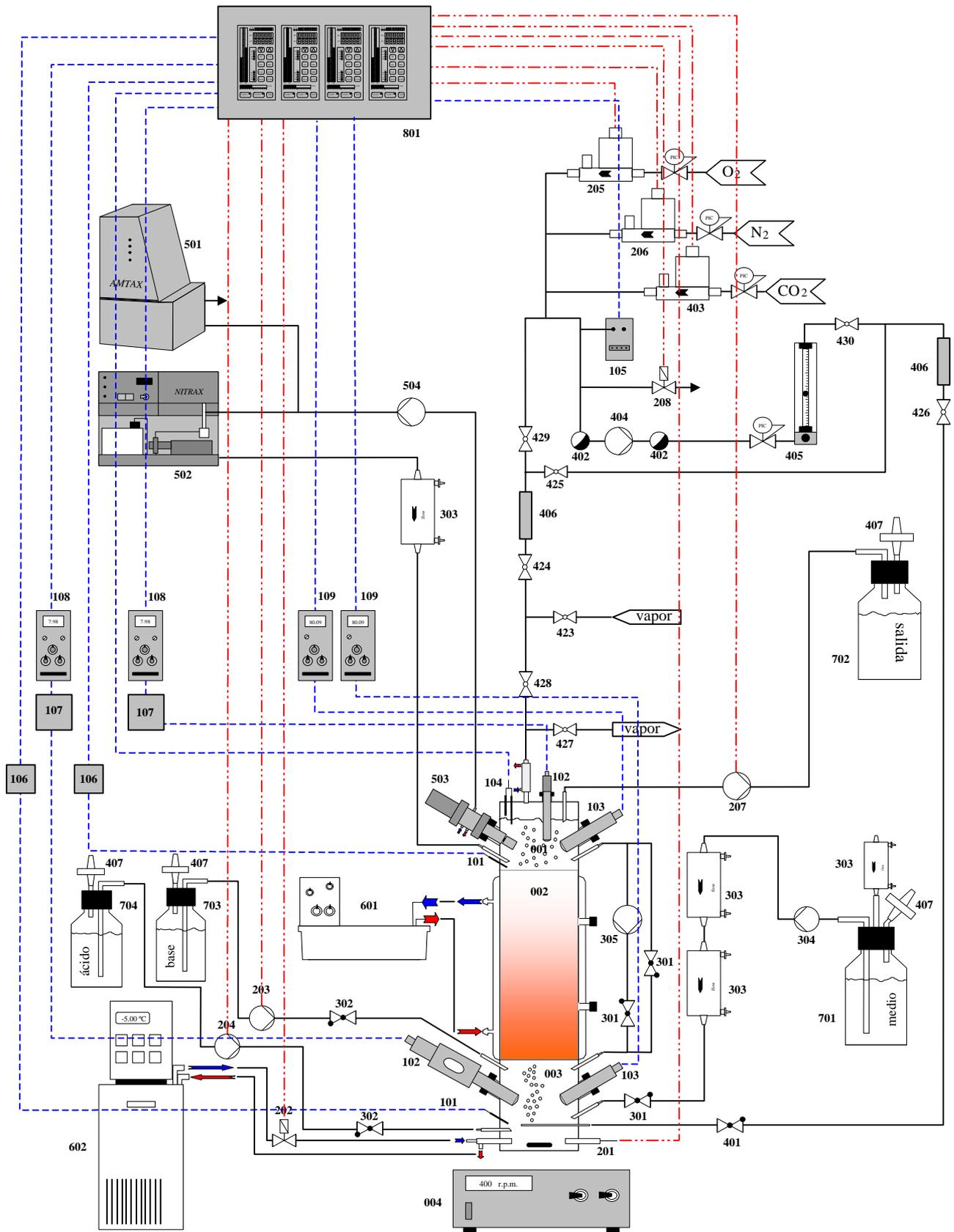
El reactor dispone de dos analizadores en línea: uno de amonio y otro de nitrato. Estos instrumentos analizan muestras de la cabecera del reactor (salida) mediante un dispositivo de extracción de muestras libre de biomasa.

Principales características del analizador de amonio Amtax LYX720 (Dr. Lange, Düsseldorf, Alemania):

- Método de medida: método del azul de indofenol (DIN 38406 E 5)
- Sistema de medida: fotómetro (la reacción es colorimétrica),  $\lambda = 694$  nm.
- Rango de medida: 0 - 30 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>
- Tiempo de respuesta: 12min
- Calibración: automática (períodos programables)
- Señal de medida de salida: 0 - 20 mA ó 4 - 20 mA

Principales características del analizador de nitrato Nitrox LPG 192 (Dr. Lange, Düsseldorf, Alemania):

- Sistema de medida: fotómetro (absorción en el UV de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- Rango de medida: 0 - 100 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- Tiempo de respuesta: 20 s
- Calibración: cero automático (períodos programables) y la pendiente con KNO<sub>3</sub> (manual)
- Señal de medida de salida: 0 - 20 mA ó 4 - 20 mA



**Figura 3.1a.- Instrumentación del reactor piloto. Las referencias se detallan en la tabla 3.9. El color azul indica señales eléctricas entre los sensores de proceso y los controladores (línea discontinua), mientras que el rojo indica señales eléctricas entre los controladores y los elementos actuadores (línea discontinua y punteada).**