



UNIVERSIDAD DE LEÓN

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES

ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**ELIMINACIÓN DE CO₂ CON MICROALGAS
AUTÓCTONAS**

Tesis presentada por
Lorena Martínez García
Para optar al grado de Doctor

Dedicado a mis padres

*“La vida es el arte
de sacar conclusiones suficientes
a partir de datos insuficientes”*

Samuel Butler

Agradecimientos

Llegado el momento final, en el que todo este trabajo está a punto para ser dado a luz, encuentro que este es el capítulo más difícil de escribir. Y es que cómo resumir en unas líneas toda mi gratitud a los que durante los últimos cuatro años tanto me habéis ayudado, con vuestras ideas, con vuestras manos, pero sobre todo por estar siempre disponibles cuando os necesité. A todos vosotros quiero expresar hoy mis más sinceras

GRACIAS.

INDICE

RESÚMEN.....	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Efecto invernadero y cambio climático	3
1.2. CO₂: principales fuentes y evolución de las emisiones	3
1.3. El Protocolo de Kyoto	6
<i>1.3.1. Mecanismos flexibles propuestos por el Protocolo de Kyoto</i>	8
1.4. Mecanismos para la eliminación y reducción de emisiones de CO₂	10
1.4.1. <i>Captura y secuestro de CO₂ acoplada a tecnologías limpias basadas en el carbono</i>	12
1.4.2. <i>Secuestro de CO₂ en sumideros de carbono</i>	13
1.5. Bibliografía	14
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Fijación de CO₂ con microalgas. Introducción	17
2.2. Fijación de CO₂ por vía fotosintética	19
2.2.1. <i>Eficiencia fotosintética y fotoinhibición</i>	21
2.3. Cultivo de microalgas	25
2.3.1. <i>Parámetros que influyen en el crecimiento o productividad.</i>	25
2.3.2. <i>Sistemas de cultivo: fotobiorreactores</i>	27
2.4. Estado del arte de la biofijación de CO₂ con microalgas: pasado, presente y futuro	35
2.5. Bibliografía	38

3. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA	43
3.1. Objetivos y justificación del trabajo	45
3.2. Metodología general	46
4. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES	49
4.1. Métodos analíticos	51
4.1.1. <i>Medida del pH, concentración de oxígeno disuelto (DO) y temperatura</i>	51
4.1.2. <i>Medida de la intensidad de luz</i>	52
4.1.3. <i>Determinación de la concentración de biomasa</i>	53
4.1.4. <i>Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo</i>	56
4.1.5. <i>Determinación de la concentración de exopolisacáridos</i>	57
4.2. Método de aislamiento de microalgas, conservación de cepas y cultivo de inóculos monoalgales	57
4.2.1. <i>Esterilización y preparación de materiales</i>	57
4.2.2. <i>Aislamiento de especies de microalgas</i>	58
4.2.3. <i>Conservación de cepas</i>	59
4.2.4. <i>Cultivo de inóculos monoalgales</i>	60
4.3. Limpieza y desinfección de la columna de burbujeo escala planta piloto	62
4.4. Bibliografía	64
5. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROALGAS AUTÓCTONAS PARA LA BIOFIJACIÓN DE CO ₂ MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES	65
5.1. Introducción	67
5.2. Material y métodos	70
5.2.1 <i>Recolección y obtención de especies de microalgas autóctonas</i>	70
5.2.2. <i>Resistencia al CO₂ y aislamiento</i>	71
5.2.3 <i>Selección de la especie con mayor potencial para la fijación de CO₂</i>	72

5.3. Resultados y discusión.....	77
5.3.1. <i>Recolección y obtención de especies de microalgas autóctonas.....</i>	77
5.3.2 <i>Resistencia al CO₂ y aislamiento.....</i>	77
5.3.3. <i>Selección de la especie con mayor potencial para la fijación de CO₂.....</i>	79
5.4. Conclusiones.....	86
5.5. Bibliografía.....	86

6. RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. A LA INTENSIDAD DE LUZ 91

6.1. Introducción.....	93
6.2. Modelos de velocidad de crecimiento en función de la intensidad promedio (I_{av}) y concentración de biomasa (C_b).....	95
6.3. Material y métodos.....	99
6.3.1. <i>Preparación del inóculo.....</i>	99
6.3.2. <i>Montaje y metodología experimental.....</i>	99
6.3.3. <i>Métodos analíticos.....</i>	101
6.3.4. <i>Análisis estadístico.....</i>	101
6.4. Resultados y discusión.....	102
6.4.1. <i>Influencia de la intensidad de luz sobre la pared del cultivo (I_{ext}) en el crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp.</i>	102
6.4.2. <i>Modelos de ajuste de la velocidad de crecimiento a la intensidad de luz interior promedio (I_{av}).....</i>	105
6.5. Conclusiones.....	111
6.6. Bibliografía.....	112

7. OPTIMIZACIÓN DE LA FIJACIÓN DE CO₂ POR *Synechocystis* sp. con METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA 115

7.1. Introducción.....	117
-------------------------------	------------

7.2. Diseños factoriales y metodología de superficie de respuesta.....	118
7.3. Materiales y métodos.....	121
7.3.1. <i>Montaje y metodología experimental.....</i>	121
7.3.3. <i>Métodos analíticos.....</i>	122
7.3.4. <i>Diseño experimental y análisis estadístico.....</i>	123
7.4 Resultados y discusión.....	125
7.5. Conclusiones.....	134
7.6. Bibliografía.....	135

8. CULTIVO Y FIJACIÓN DE CO₂ POR LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp.
EN UN FOTOBIORREACTOR COLUMNA DE BURBUJEO EN PLANTA PILOTO. 139

8.1. Introducción.....	141
8.2. Material y métodos.....	145
8.2.1 <i>Descripción del reactor y sistemas auxiliares.....</i>	145
8.2.2. <i>Determinación del grado de mezcla de la columna.....</i>	148
8.2.3 <i>Caracterización hidrodinámica de la columna de burbujeo.....</i>	149
8.2.4. <i>Preparación del inóculo y modos de cultivo.....</i>	153
8.2.5. <i>Métodos analíticos.....</i>	154
8.3. Resultados y discusión.....	155
8.3.1. <i>Puesta en marcha del reactor.....</i>	155
8.3.2. <i>Comportamiento hidrodinámico del reactor.....</i>	156
8.3.3. <i>Cultivos de <i>Synechocystis</i> sp. en el fotobiorreactor escala piloto.....</i>	161
8.3.4. <i>Cultivo de <i>Synechocystis</i> sp. en las mejores condiciones obtenidas a lo largo del presente trabajo.....</i>	166
8.4. Conclusiones.....	169
8.5. Bibliografía.....	170

9. CONCLUSIONES GENERALES 173

ANEXO I.....	177
ANEXO II	185
ANEXO III.....	191
ÍNDICE DE FIGURAS	195
ÍNDICE DE TABLAS.....	204
NOMENCLATURA.....	209

RESUMEN

El aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera supone un problema ambiental y económico a nivel mundial. Una de las tecnologías disponibles para combatir este problema consiste en la biofijación de CO₂ con microalgas. Un sistema de biofijación con microalgas es idóneo para la reducción de emisiones de dióxido de carbono en gases de combustión, requiriéndose su instalación al lado del foco emisor. Por eso es necesario que dichos sistemas funcionen en las condiciones ambientales del lugar del foco emisor y se basen en el cultivo de microalgas autóctonas en vez de intentar introducir otras especies no adaptadas al medio. La biofijación de CO₂ con microalgas se presenta como una alternativa natural y respetuosa con el medio ambiente.

La presente tesis comprende las investigaciones llevadas a cabo para el aislamiento, optimización de los parámetros de crecimiento y puesta a punto de un fotobiorreactor a escala piloto para el cultivo de una especie de microalga o cianobacteria autóctona adecuada para la fijación de CO₂ en el sistema descrito anteriormente.

Las especies aisladas fueron sometidas a altas inyecciones de CO₂ puro como criterio selectivo, comprobándose que tres especies resistieron estas condiciones. El estudio del crecimiento de las tres especies determinó que la de mayor potencial para la fijación de CO₂ es una cianobacteria unicelular, identificada como *Synechocystis sp.* Tras investigar su respuesta fotosintética a diferentes intensidades de luz se encontró que su velocidad máxima de crecimiento de 0,108 h⁻¹ aparece a la intensidad promedio límite de 930 μE/m²/s. El estudio de las condiciones de cultivo que maximizan la fijación de CO₂ se realizó mediante metodología de superficie de respuesta, encontrando una fijación CO₂ máxima, dentro de la región experimental, de 2,07 g/l/d a 630 μE/m²/s de intensidad promedio, pH 7,2 y temperatura de 35,3° C. La buena resistencia que *Synechocystis sp.* ofrece a altas temperaturas e irradiancias hace que sea especialmente adecuada para su cultivo en sistemas exteriores.

Para asegurar su idoneidad en cultivos a escala comercial, antes debe comprobarse su capacidad de fijación de CO₂ en fotobiorreactores de escala planta piloto, como paso

intermedio entre los resultados del laboratorio y una aplicación real. El tipo de reactor elegido para el paso de escala fue una columna de burbujeo de 9 litros con luz artificial, por su sencillez y versatilidad.

Tras la puesta a punto del reactor, se han mantenido cultivos durante más de cuatro meses seguidos, probando diferentes condiciones de operación sin la necesidad de parada y nuevo arranque. Se comprobó que el crecimiento y fijación de CO₂ por *Synechocystis* sp. es mejor a flujos de entrada de aire del orden de 3 l/min y en cultivos discontinuos, presentando fenómenos de biofloculación espontánea en cualquier modo de operación que implique intercambio de medio de cultivo. Las mejores fijaciones de CO₂ alcanzadas a escala piloto fueron 0,84 g/l/d.

Los resultados presentados demuestran que un sistema de bio-fijación de CO₂, acoplado a una fuente emisora de gases de combustión, en regiones interiores templadas del norte de España, es posible mediante el cultivo de la cianobacteria autóctona de agua dulce *Synechocystis* sp. Investigaciones futuras son necesarias para establecer el tipo de reactor más eficiente y modo de aprovechamiento del fenómeno de biofloculación espontánea, que permitan reducir los costes del proceso. El aprovechamiento de la biomasa y el ingreso por créditos de carbono pueden convertir la necesidad medioambiental de fijación de CO₂ con microalgas en un proceso económicamente viable y rentable.

ABSTRACT

The recent rising of atmospheric concentrations is considered a worldwide environmental and economical problem. One of the available technologies to overcome this problem is the CO₂ biofixation with microalgae. A microalgae biofixation system is specially recommended for CO₂ reduction from flue gases, which should be placed next to emissions sources. Therefore, these systems need to be tested at local environmental conditions. In this sense, this system should be based on native microalgae instead of other good microalgae for CO₂ biofixation, but not environmentally adapted. So, CO₂ biofixation with microalgae represents a natural and respectful attitude towards environment for CO₂ emissions reduction.

This thesis presents the research work involved in isolation, optimization of growth parameters and start-up of a pilot scale photobioreactor to culture a native cyanobacteria or microalgae, suitable for the previously described biofixation system.

As a selective criterion, isolated freshwater microalgae and cyanobacteria species were grown under high injections of pure CO₂. As a result, three of them showed resistance to this critic conditions. Growth studies for these three species stated a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis sp.*, as the most potential specie for CO₂ microalgae biofixation. *Synechocystis sp.* photosynthetic response showed a maximum specific growth rate of 0.108 h⁻¹ presented at the limit averaged light intensity of 930 μE/m²/s. Maximal CO₂ biofixation growth parameters was researched by means of surface response methodology (SRM). Maximal CO₂ biofixation reached was 2.07 g/l/d, fixing growth parameters at 630 μE/m²/s of averaged light intensity, pH at 7.2 and, temperature at 35.3° C.

To asses the suitability at higher scale, *Synechocystis sp.* CO₂ biofixation capacity was tested at pilot scale cultures, as an intermediate step between laboratory findings and commercial application. By simplicity and versatility, an indoor bubble column pilot scale photobioreactor was selected. After start up, culture was maintained for four months period, resulting in maximum CO₂ biofixation of 0.84 g/l/d at batch cultures and inlet air

flow of 3 l/min. Under continuous operation with replacement of culture medium, spontaneous bioflocculation was found.

The research work presented at this dissertation shows that a CO₂ biofixation system, linked to a local industrial flue gases source, is feasible by photoautotrophic cultivation of native freshwater cyanobacterium, *Synechocystis sp.* Future investigations are needed to asses the best photobioreactor type and the way to take a profit of spontaneous bioflocculation, leading to minimizing downstream costs. Biomass utilization and carbon credits income could change an environmental requirement into a profitable process.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN: LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DEL CO₂

1.1. Efecto invernadero y cambio climático

Según la Convención Marco de las Naciones Unidas existen fuertes evidencias de que el incremento de emisiones de gases de efecto invernadero debidas a actividades antropogénicas es la causa del aumento de la temperatura media en la Tierra (*IPCC, 2005*). Se cree que como consecuencia del aumento de la temperatura media global, está cambiando el clima del planeta, es el llamado *cambio climático*. Los principales gases de efecto invernadero responsables del aumento de temperaturas son: dióxido de carbono, metano, óxidos de nitrógeno y un grupo de compuestos gaseosos que contienen cloro y flúor, como halogenuros de carbono, perfluorocarburos y hexafluoruro de azufre.

1.2. CO₂: principales fuentes y evolución de las emisiones

El consumo global de energía y las emisiones de CO₂ asociadas a este consumo continúan creciendo en los primeros años del siglo XXI. Los combustibles fósiles son la fuente de energía más utilizada en el mundo, el 86% de la energía mundial procede de fuentes fósiles y su combustión es responsable del 75% de las actuales emisiones antropogénicas. El consumo de energía primaria creció una media de un 1,4% anual desde 1990 a 1995. Este crecimiento por sectores fue el siguiente: 0,3% anual en el sector industrial, 2,1% en el sector del transporte, 2,7% en el de la construcción y el sector agrícola/otros tuvo un crecimiento negativo del 2,4% (*Fig. 1.1a*). Durante ese mismo periodo las emisiones de CO₂ globales aumentaron un 1%, una proporción un poco menor que el aumento de consumo de energía primaria (*Fig 1.1.b*). Si nos fijamos en el aumento por sectores, el industrial no incrementó sus emisiones en el periodo de 1900 a 1995, mientras que el transporte y la construcción aumentaron un 1,7 y 2,3% respectivamente. Lógicamente, el sector agrícola/otros disminuyó sus emisiones (2,8%). El sector de la construcción es, por tanto el que ha experimentado un mayor incremento y el que más emisiones aporta, síntoma del aumento de población y del nivel de vida.

Las emisiones totales procedentes de la combustión de combustibles fósiles y escapes de metano fueron de 24 Gt equivalentes de CO₂ por año, siendo los países industrializados responsables del 47% de las mismas.

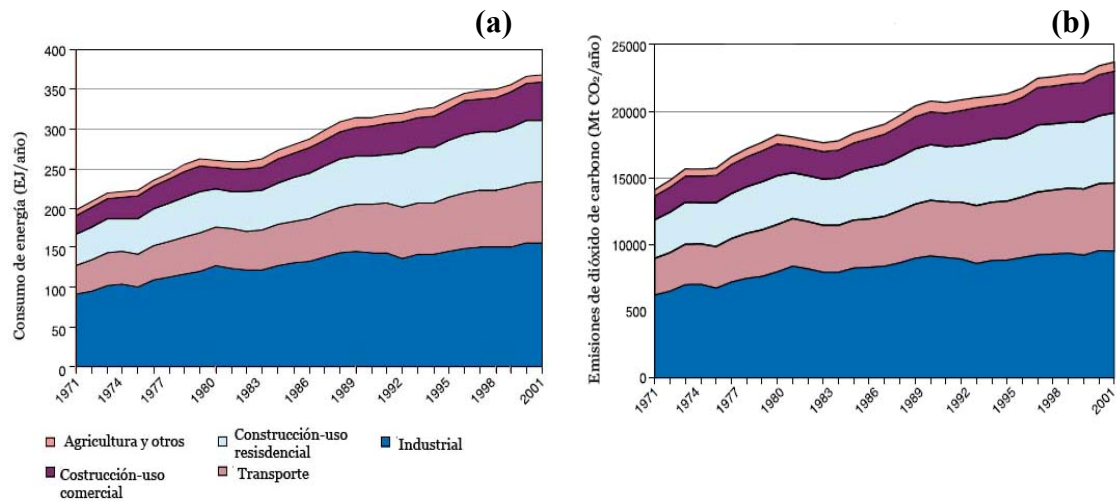


Figura.1.1. Correspondencia entre el consumo primario de energía y las emisiones de dióxido de carbono. (a) Consumo mundial de energía primaria (EJ/año), distribuida por sectores desde el año 1971 a 2001. (b) Emisiones de CO₂ (Mt/año) correspondientes a cada sector, desde 1971 a 2001. Fuente: IPCC, 2005.

Si comparamos las emisiones de CO₂ en función del tipo de energía generada, la producción de energía eléctrica es con diferencia la mayor fuente de emisiones, como puede apreciarse en la tabla 1.1. En cambio, las emisiones debidas al transporte, sector que sigue a la producción de electricidad en emisiones de CO₂, son las que más rápido han crecido en las últimas décadas. El problema de las emisiones del transporte es que son las más difíciles de evitar, ya que son pequeñas fuentes, múltiples y muy distribuidas, por eso es uno de los llamados *sectores difusos*.

Las proyecciones indican que la demanda energética en el mundo crecerá un 58% de 2001 a 2025. Este incremento en el consumo energético será motivado principalmente por los países en vías de desarrollo, siendo los de la zona asiática los que experimenten un aumento mayor y pasen a consumir el doble de la energía que consumen en la actualidad.

Tabla 1.1. Emisiones de CO₂ procedentes de la combustión de fuentes de energía fósiles, según el sector donde se producen, en 2001. Fuente: IPCC, 2005.

	Emisiones de CO ₂ (Mt/año)	Contribución
Producción de electricidad	10.427	44%
Transporte	5.656	23%
Industria y construcción	4.294	18%
Residencial	1.902	8%
Otros sectores	1.405	7%
Total	23.684	100%

La figura 1.2 indica cómo la mayor parte de esta demanda de energía se suplirá con petróleo, gas natural y carbón, mientras que las energías renovables, solo alcanzarán un 20% del consumo total. El consumo de gas natural y petróleo son los que muestran mayor crecimiento. Si estas predicciones se cumplen, el aumento de emisiones mundiales de dióxido de carbono será substancial, incluso cuando los países industrializados realicen grandes esfuerzos por reducirlas (*International Energy Outlook, 2003*).

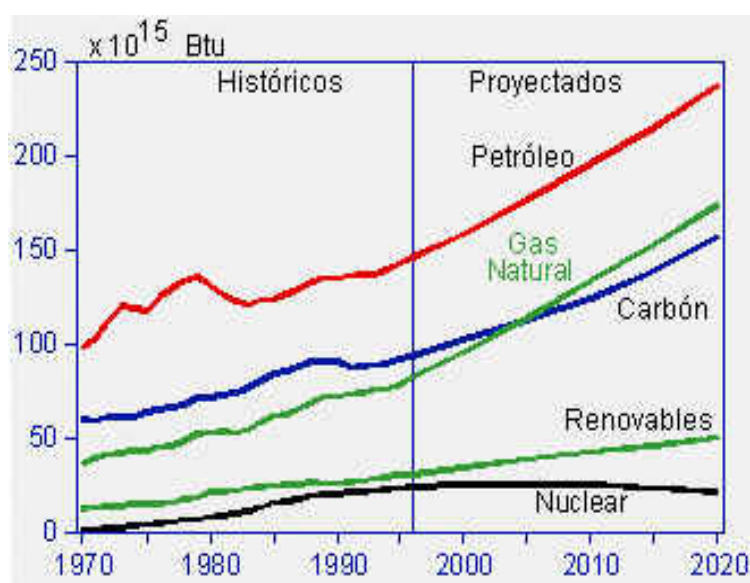


Figura 1.2. Consumo mundial de energía primaria anual (Cuatrillones de Btu/año, 1 cuatrillón=10¹⁵ Btu) por las diferentes fuentes, desde 1970 a 2001 y su predicción hasta 2025. Fuente: International Energy Outlook 2003.

1.3. El Protocolo de Kyoto

El Protocolo de Kyoto es el acuerdo firmado por los principales países industrializados y en vías de desarrollo, el 11 de diciembre de 1997, en el que se promueve el desarrollo sostenible. Los países firmantes, están obligados a cumplir los compromisos cuantificados de limitación y reducción de las emisiones, aplicando y elaborando políticas y medidas de conformidad con sus circunstancias nacionales.

Los países firmantes se comprometen a reducir sus emisiones de GHG un 5% respecto a sus emisiones en el año base (1990), durante el periodo de 2005 a 2012. La reducción puede ser individual o conjunta entre todos. El Anexo B del Protocolo contiene los compromisos de limitación de gases de efecto invernadero, recogidos en la tabla 1.2, como el % de emisiones permitidas respecto al año base para cada uno de los países firmantes (*Protocolo de Kyoto, 1998*).

Los países de la Unión Europea firmaron un acuerdo (Decisión 2002/358/CE) para la reducción conjunta de sus emisiones, estableciendo un sistema de cuotas de carácter asimétrico. Este reparto favorece a los países menos desarrollados para no perjudicarles en su crecimiento. Además, pretende compensarles por su menor contribución histórica a la emisión de GHG. La unión Europea debe reducir globalmente el 8% de sus emisiones sobre la base de 1990 y para conseguirlo, los países más desarrollados deberán limitar sus emisiones más allá del 8% y los menos desarrollados podrán incluso aumentarlas.

España fue uno de los países considerados como menos próspero, y por ello, basándose en dicha reducción conjunta, se le permite aumentar sus emisiones para el 2012 en un 15 %. A pesar de ello, los expertos pronostican que la ratificación española del Protocolo de Kyoto supone un freno al crecimiento económico que en el 2007 ya estaba reflejando nuestro país. En cambio otros países como Alemania, Francia, Reino Unido e Italia se encuentran en una posición más cómoda para el cumplimiento, ya que sus tasas de crecimiento son moderadas (*Llamas-Moya y Romero-Macías, 2006*).

Tabla 1.2. *Compromisos de reducción de emisiones por los países firmantes del Protocolo de Kyoto. Fuente: Protocolo de Kyoto, 1998.*

País firmante	% emisión permitida respecto 1990	País firmante	% emisión permitida respecto 1990
Alemania	92	Islandia	110
Australia	108	Italia	92
Austria	92	Japón	94
Bélgica	92	Letonia*	92
Bulgaria*	92	Liechtenstein	92
Canadá	94	Lituania*	92
Comunidad Europea	92	Luxemburgo	92
Croacia*	95	Mónaco	92
Dinamarca	92	Noruega	101
Eslovaquia*	92	Nueva Zelanda	100
Eslovenia*	92	Países Bajos	92
España	92	Polonia*	94
Estados Unidos de América	93	Portugal	92
		Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte	92
Estonia*	92	República Checa*	92
Federación de Rusia*	100	Rumania*	92
Finlandia	92	Suecia	92
Francia	92	Suiza	92
Grecia	92	Ucrania*	100
Hungría*	94		
Irlanda	92		

* Países que están en proceso de transición a una economía de mercado.

El 16 de febrero del 2005 entró en vigor el Protocolo de Kyoto, 90 días después de que la Federación de Rusia ratificara su compromiso con el mismo. Hasta ese momento, el Protocolo de Kyoto no había sido más que una declaración de intenciones ya que para entrar en vigor necesitaba la ratificación de al menos 55 países que sumaran el 55% de las emisiones mundiales. A partir de esta fecha, 30 países están obligados a cumplir jurídicamente sus compromisos de reducción y el mercado de emisiones pasó a ser una realidad.

1.3.1. Mecanismos flexibles propuestos por el Protocolo de Kyoto

El Protocolo contempla dos tipos de mecanismos para conseguir los objetivos de reducción:

- a) El Mercado de Emisiones (ETS, *Emissions Trading Scheme*)
- b) Mecanismos basados en proyectos: Mecanismos para el Desarrollo Limpio (CDM, *Clean Development Mechanism*) y la Acción Conjunta (JI, *Joint Implementation*).

Cada país puede adoptar el mecanismo o los mecanismos que desee, cumpliéndose el principio de adicionalidad.

a) El mercado de emisiones

El fin del mercado de emisiones es hacer menos oneroso para los estados el cumplimiento de los objetivos de reducción, creando un comercio de cuotas de emisión. Actualmente existen varios mercados de CO₂, entre ellos destaca el *Mercado Europeo de Emisiones (EU ETS, European Union Emissions Trading Scheme)* por ser el de mayor volumen de mercado. El *EU ETS* se hizo operativo de forma oficial el 1 de enero de 2005 y dos mecanismos han sido básicos para su puesta en marcha. El primero de ellos, la Directiva Europea 2003/87/EC que asesora a los Estados Miembros en la asignación de los derechos de emisión y que cubre la fase piloto, de 2005 a 2007. El segundo es la Directiva Europea 2004/101/EC (*Linking Directive*) que conecta al *EU ETS* con el Protocolo de Kyoto.

Los países adscritos al *EU ETS* deben realizar una asignación de Derechos de Emisión (EUAs, *European Union Allowances*) a aquellas instalaciones (fuentes emisoras de CO₂) reguladas por dicha directiva, mediante la realización de un Plan Nacional de Asignaciones (NAP, *National Allocation Plan*). Los sectores incluidos en el NAP son el energético, la producción y transformación de hierro y acero, industrias minerales, del vidrio, del papel e industrias del cemento. Se estima que éstas representen cerca de la mitad de las emisiones de dióxido de carbono en el 2010. Se excluyen los centros de I+D y experimentación. Para poder realizar los planes de asignación es necesario conocer las emisiones de cada estado, por ello, el artículo 14 de la Directiva 2003/87/EC exige a la Comisión elaborar las

directrices para controlar y notificar las emisiones de gases de efecto invernadero para cada estado miembro.

Durante el primer periodo, de 2005 a 2007 los estados han asignado gratuitamente al menos el 95% de los Derechos de Emisión a las instalaciones emisoras y el 5% por licitación o subasta (es decir, deben comprarlos en el mercado). En el segundo periodo, 2008-2012, al menos el 90% de los derechos de emisión serán asignados gratuitamente, el 10% restante por subasta o licitación.

b) *Mecanismos basados en proyectos: Mecanismos para el Desarrollo Limpio y la Acción Conjunta*

Las Unidades de Reducción de Emisiones (*ERUs, Emissions Reduction Units*) resultan de la inversión en proyectos encaminados a reducir emisiones o crear sumideros de gases de efecto invernadero de origen antropogénico. Se persigue así un doble objetivo: facilitar el cumplimiento del Protocolo en los países obligados a ello y fomentar el desarrollo sostenible en países en vías de desarrollo, sin obligación de cumplimiento, a través de la transferencia de tecnologías limpias.

Los mecanismos flexibles permiten la reducción de emisiones de GHG en un país diferente al que los recibe, a un coste más bajo. Globalmente, el lugar donde se produzca la reducción de emisiones no importa, siempre que sean reducciones reales.

El mecanismo de *Acción Conjunta (JI)* consiste en la inversión de un país obligado al cumplimiento en otro país también obligado al cumplimiento, en proyectos de reducción de emisiones o fijación de CO₂ involucrando cualquier sector de la economía.

El *Mecanismo de Desarrollo Limpio* se realiza entre un país obligado a reducir sus emisiones y otro que no lo está, realizando el primero inversiones para la ejecución de un proyecto que reduzca o fije CO₂ en el segundo, no obligado a reducir sus emisiones.

En ambos casos, el país inversor recibe los créditos de CO₂, que son contabilizados como complemento a las reducciones domésticas llevadas a cabo por el país inversor (*Llamas-Moya y Romero-Macías, 2006*).

1.4. Mecanismos para la eliminación y reducción de emisiones de CO₂

La Convención Marco de las Naciones Unidas para el Cambio Climático (UNFCCC, *United Nations Framework Convention on Climate Change*) hace un llamamiento para la estabilización de la concentración atmosférica de GHGs, pero hasta el momento no hay acuerdo sobre qué alcance debe tener esta reducción de emisiones. Sin embargo, se reconoce que la estabilización se alcanzará cuando las emisiones de GHGs antropogénicas sean equiparadas a las que pueden ser absorbidas por el planeta de forma natural.

Existe una gran variedad de tecnologías que pueden reducir las concentraciones de CO₂ en la atmósfera y otras tantas que serán desarrolladas en un futuro. Los objetivos de reducción, los costes, el potencial de cada tecnología, el impacto ambiental, y factores sociales, como la aceptación pública, serán determinantes para la elección de la tecnología más adecuada a cada situación concreta. Las diferentes opciones para la reducción, según el IPCC (*IPCC, 2005*), son:

- *Mejora de la eficiencia energética*, en la conversión, transporte y uso final de la energía. Esta opción es especialmente interesante para su aplicación al consumo de energía en el transporte y el sector doméstico.
- *Transición de tecnologías basadas en el carbón a tecnologías basadas en gas natural* para la producción eléctrica. Las emisiones de CO₂ del gas natural son la mitad de las del carbón.
- *Aumento de las fuentes de energía de baja emisión: renovables y nuclear*. Estos dos tipos de fuentes de energía tienen grandes limitaciones. Por un lado, a pesar del boom que se está experimentando en este momento, las energías renovables no serán capaces de aportar toda la demanda de energía que se espera en los próximos

años, especialmente en los países con economías emergentes, además del problema de intermitencia en la producción. En cuanto a la energía nuclear, el problema de la inseguridad, el almacenamiento de los residuos y la amenaza terrorista hacen que la decisión de considerar esta opción no esté basada en cuestiones técnicas, sino políticas y de aceptación pública.

- *Captura y secuestro de CO₂ (CCS, CO₂ Capture and Sequestration)*. Consiste en capturar el CO₂ emitido por una central de generación de energía a partir de combustibles fósiles y almacenarlo en el subsuelo.
- *Secuestro de CO₂ en sumideros naturales o biológicos*, como son las plantas y los océanos. La fijación de CO₂ por las plantas gracias a los procesos fotosintéticos y la absorción de este gas ácido en el agua de mar representan los mayores sumideros naturales de dióxido de carbono. La fijación fotosintética puede potenciarse con prácticas correctas de agricultura y forestación.

Todas estas opciones pueden dividirse en dos grupos: las que evitan la emisión de CO₂, que son las tres primeras y las que eliminan o fijan el CO₂ producido, ya sea antes de su emisión a la atmósfera (CCS) o una vez emitido (sumideros biológicos). Puesto que el objetivo de este trabajo se centra en la fijación de CO₂, a continuación se describirán con más detalle estas dos últimas opciones.

Por último, cabe destacar que los objetivos de reducción de emisiones solo se alcanzarán considerando todas estas opciones en conjunto y aplicando a cada caso la más adecuada. Además, debe tenerse en cuenta que las fuentes de energía no basadas combustibles fósiles (renovables y nuclear) serán incapaces de aportar toda la demanda de energía que se espera en los próximos años, especialmente en los países con economías emergentes. Por ello será necesario seguir consumiendo fuentes fósiles, sobre todo carbón y gas natural, los más abundantes. Además debe tenerse en cuenta que la transición de tecnologías actuales a otras más limpias ha de hacerse de modo gradual, para no desestabilizar las economías.

1.4.1. Captura y secuestro de CO₂ acoplada a tecnologías limpias basadas en el carbono

La Captura y Secuestro de CO₂ (CCS) es la técnica más promovida y cada vez más aceptada como la vía más inmediata para la reducción de gases de efecto invernadero en nuestro planeta. En esta técnica, el CO₂ es capturado de una corriente de gases de combustión, donde se encuentra en una proporción del 10-12%. La separación del CO₂ del resto de los gases se realiza mediante procesos de absorción (disoluciones de metil-etilenaminas son las más utilizadas), adsorción en lechos porosos, separación por membranas y criogenización, ordenados de mayor a menor coste. Tras su captura, el CO₂ puede ser almacenado de varias formas:

1. *Inyección en las profundidades oceánicas.* Consiste en la inyección del CO₂ líquido a profundidades por debajo de los 3000 metros, donde las condiciones de presión y temperatura permiten que el CO₂ permanezca en estado líquido, creando una especie de lagos de CO₂ en el fondo marino. Esta técnica está aún en fase de experimentación.
2. *Inyección en yacimientos agotados de gas y petróleo.* El CO₂ se inyecta en las rocas porosas que contuvieron gas o petróleo.
3. *Inyección en formaciones salinas.* Las formaciones salinas son rocas sedimentarias originadas a gran profundidad y saturadas de agua con un alto contenido salino. Estas formaciones son muy comunes y contienen grandes cantidades de agua no apta para el consumo humano o para la agricultura. El CO₂ puede disolverse en esta agua salina. El proyecto más importante hasta la fecha relacionado con la inyección en formaciones salinas es el Proyecto Sleipner de Statoil en una explotación de gas natural en el Mar del Norte.
4. *Inyección en lechos carbonosos, en pozos petrolíferos y en yacimientos de gas natural.* Todos se basan en la inyección de CO₂ presurizado para aumentar la presión del lecho que contiene el gas o petróleo y así facilitar su extracción.

1.4.2. *Secuestro de CO₂ en sumideros biológicos*

La fijación fotosintética del CO₂ atmosférico en plantas y árboles juega un papel fundamental para mantener el nivel de este gas en la atmósfera. De hecho, se cree que la deforestación es en parte responsable del aumento del CO₂ y que la reforestación podría ser una solución al problema del efecto invernadero. Es difícil evaluar la cantidad de CO₂ que puede fijar una masa forestal o un cultivo y por eso se están llevando a cabo numerosos estudios por todo el mundo. Investigaciones preliminares (*Dang y Steingerg, 1980*) estimaron que una superficie de 1000 km² de árboles de crecimiento moderado es suficiente para fijar el CO₂ producido anualmente por una central térmica de carbón de 1000 MW, a lo largo de toda su vida útil.

Otra vía biológica para la reducción de CO₂ atmosférico es la llevada a cabo por los organismos acuáticos, especialmente los microorganismos. En este caso nos encontramos con organismos fotosintéticos, como (*macro-*) algas y microalgas, que fijan CO₂ en forma de biomasa, o como los cocolitoforos, que además lo incorporan como carbonato cálcico a su estructura microscópica, quedando así retenido en las profundidades marinas.

Sin embargo, solo las microalgas son adecuadas para la eliminación directa del CO₂ en gases de combustión, porque son los únicos organismos capaces de utilizar altas concentraciones de este gas (*Benemann, 1992*) y de adaptarse a ambientes extremos (temperatura, salinidad, pH, etc.). Por otro lado, el pequeño tamaño de estos seres fotosintéticos y su alta relación superficie/volumen permite una fácil y rápida difusión de nutrientes y CO₂ desde el seno del medio de cultivo hasta la célula, reduciendo, además, el gasto energético de agitación y posibilitando cultivos de alta densidad (*Watanabe et al., 1992*).

1.5. Bibliografía

- Benemann, J.R., 1992. Biological utilization of CO₂ – A review. Prepared for MIT White Paper. Unpublished.
- Dang, V. D., Steinberg, M., 1980. The value of forestation in absorbing carbon dioxide surrounding a coal-fired power plant. BNL 51299. Broohaven National Laboratory, Upton, NY, USA.
- Halmann, M. M., Steinberg, M., 1999. Greenhouse gas carbon dioxide mitigation. Science and Technology. Ed. Lewis Plublishers. Boca Raton, Florida. USA.
- International Energy Outlook, 2003. Energy Information Administration. Office of Integrated Analysis and Forecasting. U.S. Department of Energy. Washington, DC 20585. Disponible en: www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html.
- IPCC, 2005. *IPCC Special Report on Carbon Capture and Storage 2005*. Disponible en: www.ipcc.ch.
- Llamas-Moya, B., Romero-Macías, E., 2006. Tecnologías de lucha contra el cambio climático. Servicio de publicaciones de la Universidad de Huelva. España.
- Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Naciones Unidas, 1998. Disponible en: www.unfccc.int.
- UNFCCC: United Nations Framework Convention on Climate Change. Essential Background. Disponible en: http://unfccc.int/essential_background/feeling_the_heat/items/2918.php.
- Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H. 1992. Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae which functions under CO₂ enriched atmosphere. Energy Conversion and Management, 33 (5-8) pp. 545-552.
- Weart, S.R., 1997. The discovery of the risk of global warming, Physics Today, January, pp. 34-40.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1. Fijación de CO₂ con microalgas. Introducción

Las microalgas y cianobacterias son plantas microscópicas que normalmente crecen suspendidas en agua y realizan los mismos procesos fotosintéticos que las plantas superiores terrestres: la conversión de agua y CO₂, utilizando la energía de la luz solar, en oxígeno y biomasa. Sin embargo, de todos los organismos capaces de fijar o acumular CO₂, microalgas y cianobacterias cobran una importancia especial debido a que presentan ciertas ventajas únicas (*Benemann, 1992*):

- Son los únicos organismos fotosintéticos capaces de utilizar directamente el CO₂ de una corriente de gases de combustión, como puede ser el de centrales térmicas (a base de carbón, fuel o metano), sin necesidad de tratamientos previos, ya que son resistentes a altas concentraciones de CO₂. A diferencia de los cultivos vegetales o árboles, las microalgas mejoran su productividad con el aumento, hasta cierto límite, de la concentración de CO₂ respecto a la atmosférica.
- Poseen un potencial de productividad mucho mayor que el de las plantas superiores y otras plantas acuáticas.
- Para su producción pueden utilizarse ciertos recursos que no son adecuados para la agricultura, como aguas salobres, agua marina y aguas residuales y suelos arcillosos, duros o salinizados, por lo que no compiten con la agricultura respecto a los usos del suelo y el agua. Además, su alto requerimiento de nutrientes (principalmente N y P) permite su cultivo en aguas residuales, aportando el beneficio adicional de la reducción de los contenidos de nitrógeno y fósforo en dichas aguas.

En esta memoria de tesis el término microalgas será referido a microorganismos unicelulares fotoautótrofos, abarcando tanto microalgas como cianobacterias.

Las tecnologías basadas en microalgas cuentan con la ayuda de tiempos muy cortos de generación celular (t_d , el tiempo necesario para que una alga se duplique), de un día o

menos, y la relativa simplicidad y facilidad de escalado de los sistemas hidráulicos de cultivo, permitiendo el desarrollo de procesos de producción más rápidos y a menor escala que los necesarios para plantas superiores.



Figura 2.1. Instalación comercial de Cyanotech Corporation para la producción de microalgas, en estanques tipo *race-way*, en Hawaii. Los estanques de color verde son de *Spirulina* y los rojos, de *Hematococcus pluvialis*.

Las microalgas han sido estudiadas intensivamente en los últimos 50 años en Estados Unidos, Japón y algunos lugares de Europa para la producción de alimento animal (industria piscícola) y humano (suplementos nutritivos por su alto contenido en proteínas), en la industria farmacéutica (carotenoides, antioxidantes), como tratamiento de aguas residuales y para la generación de biocombustibles (biogás, biodiesel, hidrógeno o metanol). Tradicionalmente la mayor parte de la producción comercial de microalgas y cianobacterias se ha cultivado en estanques abiertos, similares a los de la figura 2.1, donde las algas circulan por canales agitados con paletas (sistemas tipo *race-way*), con suministro externo de CO₂. La producción comercial se limita a unas pocas especies como *Spirulina* (Earthrise Farms, Sur de California, Cyanotech, Hawaii), *Chlorella* (Far East Microalgae Industries, Taiwan, Sun Chlorella, Japan) y *Dunaliella* (Cognis Nutrition and Health, Australia). Sin embargo en los últimos tres o cuatro años están surgiendo importantes iniciativas empresariales para la producción de biocombustibles a partir de microalgas y cianobacterias (Fig. 2.2). Muchas de estas iniciativas son subvencionadas económicamente

por empresas del sector energético. El ejemplo más claro es la empresa Cellana (Hawaii), formada como *joint venture* de Shell y HR Biopetroleum. También los gobiernos, que ven en las microalgas una oportunidad de energía sostenible para el futuro (Aguilar, 2008), están disponiendo sus recursos para el desarrollo del conocimiento sobre microalgas y los biocombustibles derivados de ellas. Algunas empresas parecen estar cerca de conseguirlo, como Sapphire Energy (California) o Solix Biofuel (Colorado), que argumentan tener ya a punto sus tecnologías de producción, sin embargo el mercado energético aún no cuenta con un combustible de origen microalgal.

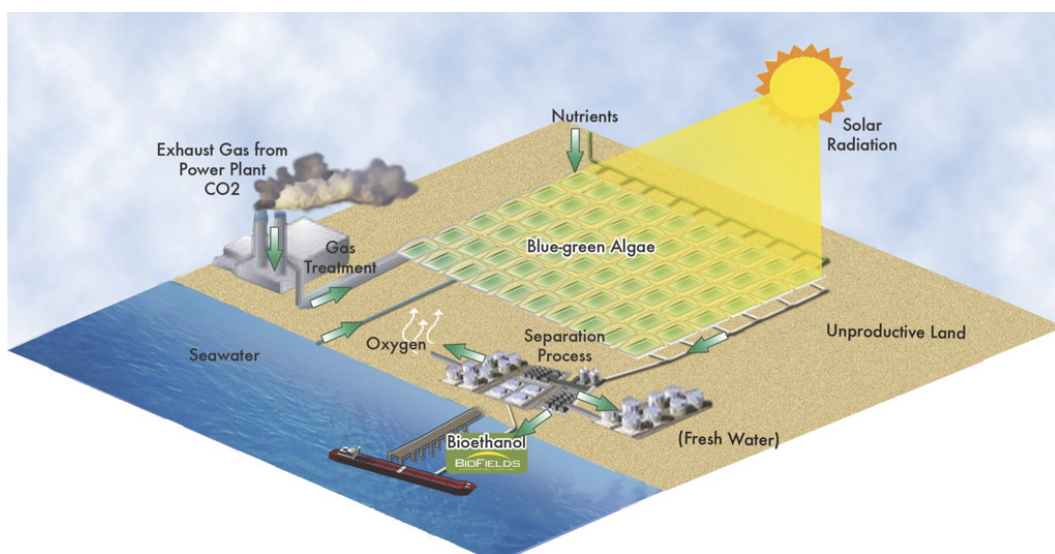


Figura 2.2. Esquema, publicado por la empresa Algenol Biofuels (www.algenoilbiofuels.us) que representa la estrategia de producción de bioetanol a partir de cianobacterias

2.2. Fijación de CO₂ por vía fotosintética.

Las microalgas son individuos unicelulares o pluricelulares cuyas células funcionan independientemente, realizando todas las funciones vitales. Obtienen su energía gracias a su capacidad para realizar la fotosíntesis.

La fotosíntesis, proceso por el cual el agua se descompone en oxígeno y un agente reductor necesario para la reducción de CO₂ a carbono orgánico, es un mecanismo complejo y muy

eficiente, resultado de varios millones de años de evolución. Este proceso es realizado por cianobacterias (procariotas), microalgas (eucariotas), (*macro-*) algas y plantas superiores.

Para fijar una molécula de CO₂ se necesitan 2 moléculas de NADPH y tres de ATP, es decir, una energía de 5.2x10⁴ Julios, que se consigue mediante la absorción de al menos ocho fotones de luz (*Richmond, 2004*). Esta reacción puede expresarse como:



En ausencia de luz, no se produce la fotosíntesis y las células obtienen energía de compuestos orgánicos de reserva almacenados en su estructura celular, que al ser oxidados, liberan CO₂, vapor de agua y energía en forma de ATP, que suple las necesidades fisiológicas celulares. Éste proceso es la *respiración celular*.

Existen tres mecanismos principales por los que se realiza la fijación del CO₂ y las plantas pueden clasificarse según éstos en tipo C₃, C₄ y CAM. Plantas C₃ son todas las algas (macro, micro y cianobacterias) y el 90% de las plantas superiores. La reacción de fijación de CO₂ en las plantas C₃ está catalizada por la enzima RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa), que es la enzima más abundante en la tierra, entre otras razones, porque es bastante lenta, (se activa sola una vez por segundo) y porque requiere concentraciones relativamente altas de CO₂ para funcionar eficientemente (*Raven, 1991*). De hecho, a niveles de CO₂ atmosféricos solo una de cada diez de estas enzimas consigue unirse a una molécula de CO₂. Consecuencia de ello es que las plantas C₃ se benefician de concentraciones de dióxido de carbono más altas que las atmosféricas. Pero lo más importante es que la enzima RUBISCO, cuando no consigue unirse al CO₂ tiende a reaccionar con el O₂, gastando ATP y NADPH y produciendo CO₂. Este proceso, llamado *fotorrespiración*, es indeseable, ya que consume energía sin aportar ningún otro tipo de ganancia metabólica. La fotorrespiración depende de las concentraciones relativas de oxígeno y dióxido de carbono en el ambiente: una relación alta O₂/CO₂ estimula este proceso. Así en condiciones de alta irradiación, altas cantidades de O₂ y bajas de CO₂, la fotorrespiración prevalece a la fotosíntesis. En algunas especies la mitad de la energía captada en fotosíntesis es desperdiciada en la fotorrespiración.

Debido a la fotorrespiración, para obtener cultivos microalgales de alto rendimiento es necesario que en el medio de cultivo exista una alta proporción CO_2/O_2 , que se consigue retirando efectivamente el O_2 del medio y aportando CO_2 en exceso.

2.2.1. Eficiencia fotosintética y fotoinhibición

Un aspecto fundamental de la utilización fotosintética del CO_2 es el rendimiento fotosintético alcanzable, es decir, la eficiencia en la conversión solar en términos de unidades de CO_2 procesadas por fotón que llega a la célula.

De todo el espectro de radiación electromagnética emitida por una fuente de luz, solamente la parte correspondiente a la zona visible (380 a 750 nm) es aprovechable por las plantas para realizar la fotosíntesis. Este rango de luz es lo que se conoce como radiación fotosintéticamente activa (*PAR, photosynthetically active radiation*) (Richmond, 2004).

Los pigmentos y todos los organismos relacionados con la captación de luz se asocian con sistemas especiales de membranas fotosintéticas, localizadas en el interior de los cloroplastos, como muestra la figura 2.3a, que contienen las moléculas de clorofila. La mayoría de ellas actúan como centros captadores de luz o *antena* y una pequeña parte son centros de reacción que reciben la energía capturada por las antenas (figura 2.3b).

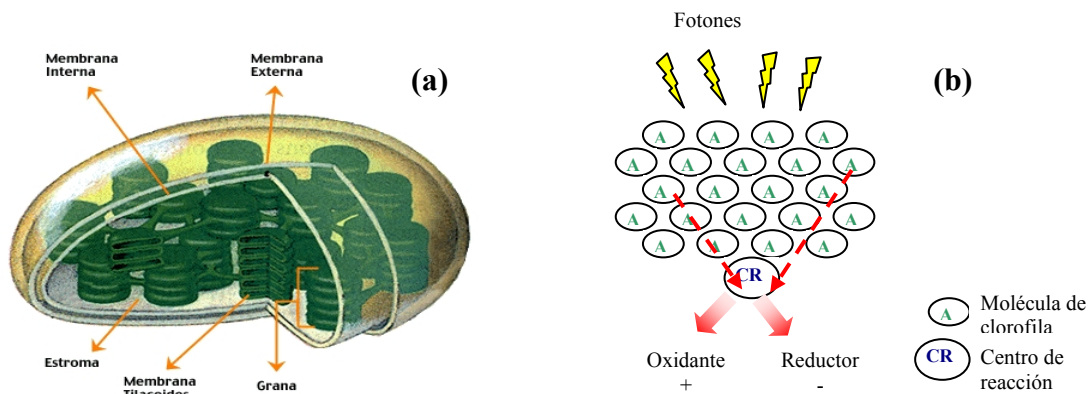


Figura 2.3. (a) Detalles de la estructura interna del cloroplasto, mostrando cómo los repliegues de las membranas del tilacoide, definen un espacio interno llamado estroma y forman apilamientos llamados grana. (b) Unidad fotosintética y su centro de reacción.

El mecanismo fundamental de la fotosíntesis, es decir, las reacciones que generan ATP y NADPH en la reducción de CO_2 , implica una secuencia de dos reacciones luminosas en cadena que tienen lugar en los fotosistemas I y II (PSI, y PSII), donde dos fotones actúan a la vez para transferir electrones desde el agua al NADPH. El llamado esquema Z, presentado en la figura 2.4, describe la secuencia de reacciones fotosintéticas llevadas a cabo en los PSI y PSII para la fijación del CO_2 . La energía lumínica de los fotones absorbidos en los pigmentos *antena* y enviada a los centros de reacción (PSI y PSII), es transformada a energía química en forma de ATP y NADPH (*Madigan et al., 1999*).

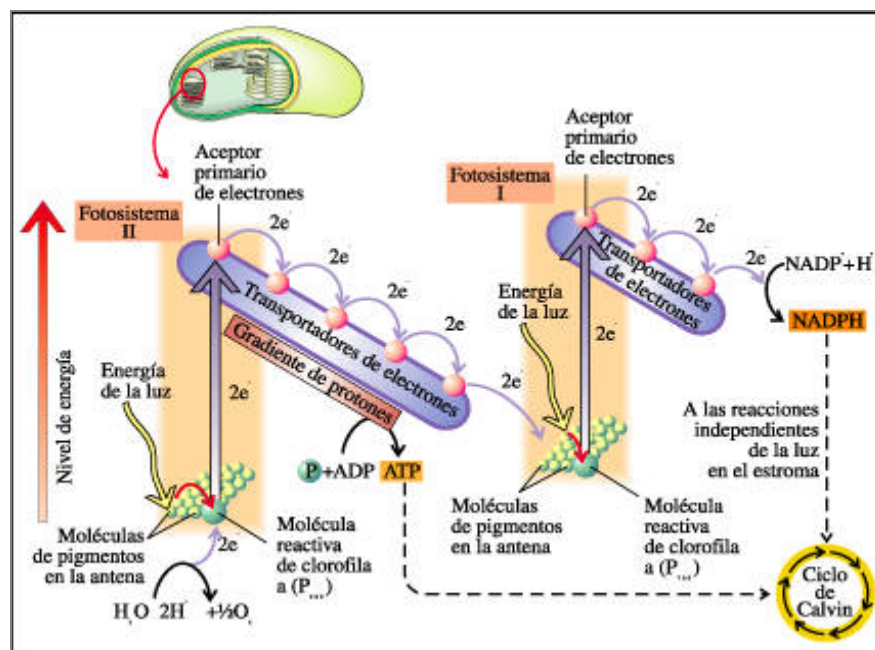


Figura 2.4. Esquema "Z" que describe las reacciones para la captación de energía en la fotosíntesis.

Un aspecto fundamental del fenómeno de la fotosíntesis es que todos los fotones captados son finalmente absorbidos por el centro de reacción de la clorofila, que tiene el máximo de 42,1 Kcal por mol de fotones. Asumiendo el caso más optimista, (8 moles de fotones por mol de CO_2) y que el producto es un carbohidrato (114 kcal/mol de carbono fijado), la máxima eficiencia fotosintética posible es del 34%.

Sin embargo, hay una serie de factores que impiden que se alcance esta eficiencia, como que (*Benemann, 1992*):

- Solo el 43% de la energía solar llega con una longitud de onda que puede ser absorbida por el aparato fotosintético.
- Es probable que se necesiten más de 8 fotones por mol de CO₂.
- No todos los fotones incidentes pueden ser absorbidos por el aparato fotosintético: alrededor de 10-20% son reflejados o absorbidos por otros componentes inactivos.
- La productividad global debe tener en cuenta el gasto energético en la respiración, en el mantenimiento de la célula, reproducción, etc.

Todos estos factores reducen el potencial máximo de eficiencia fotosintética a un 10%. Incluso este 10% de eficiencia no se consigue en la práctica, ya que la velocidad a la cual los fotones pueden ser procesados es considerablemente menor que la velocidad con la que son absorbidos en los centros antena. Los fotones extra que no pueden ser metabolizados se eliminan en forma de calor y fluorescencia, y ello supone una pérdida del 30 al 90% de la energía incidente. Este fenómeno se conoce como *fotoinhibición*, que significa que la actividad fotosintética no aumenta con la luz recibida a partir de una cierta intensidad de luz e incluso puede llegar a disminuir.

La figura 2.5 muestra la curva de respuesta a la intensidad de luz, curva P/I, que es una buena herramienta de análisis de la actividad fotosintética (P) a diferentes intensidades de luz (I). La curva P/I representa una respuesta típica del crecimiento respecto a la disponibilidad del sustrato y se divide en tres zonas: una zona de limitación de luz (*zona 1*), en la que actividad fotosintética aumenta con la intensidad de luz hasta alcanzar un valor máximo (P_{max}), una zona de saturación por luz (*zona 2*), en la que la actividad fotosintética es independiente de la intensidad de luz y se mantiene aproximadamente en P_{max} , y una zona de fotoinhibición por luz (*zona 3*), donde la actividad fotosintética comienza a reducirse con el aumento de la intensidad de luz. El valor de la constante I_k , que es característico para cada especie, define la intensidad de luz a partir de la cual la actividad fotosintética sufre una desaceleración, es decir, a la que el sistema fotosintético comienza a saturarse (*Richmond, 2004*). Debe tenerse en cuenta que esta curva dosis-

respuesta es únicamente válida cuando la luz es el factor limitante al crecimiento y todas las células reciben la misma cantidad de luz, como sucede en cultivos de baja densidad.

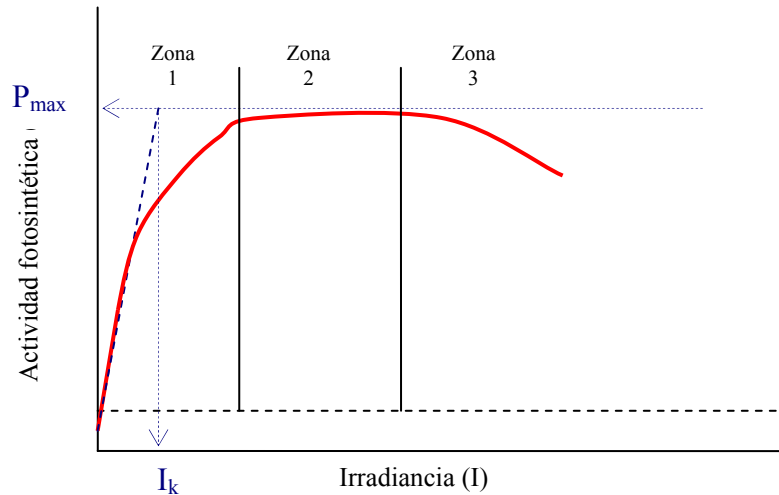


Figura 2.5. Curva dosis-respuesta que describe la actividad fotosintética de una célula frente a la intensidad lumínica que recibe. La constante I_k viene dada por la intersección entre la pendiente de la curva P/I en su tramo lineal con la actividad fotosintética máxima (P_{max}).

Los cultivos microalgales exteriores suelen sufrir fotoinhibición en las horas centrales del día, debido a las altas intensidades lumínicas (Falkowski y Owens, 1980, Molina-Grima, 1996, Vonshak, A, y Guy, R., 1992). Cuando esto ocurre las células desarrollan diversos mecanismos para aclimatarse a la nueva situación, como la producción y degradación del complejo captador de luz o fotosistema. Si la situación de fotoinhibición es alta, puede resultar en la producción de sustancias tóxicas derivadas del oxígeno y como consecuencia, la muerte foto-oxidativa. Por ello, si ocurre el fenómeno de fotoinhibición, la célula puede reducir su velocidad de fotosíntesis o incluso, morir, implicando todo ello pérdida de eficiencia fotosintética y productividad (Benemann, 1992).

La fotoinhibición podría evitarse reduciendo el tamaño de la antena colectora de luz, mediante modificación genética. Con un menor tamaño de antena las células absorberían

menor cantidad de luz, impidiéndose así la saturación y dejando luz disponible para otras células (*Polle et al., 2002, Melis, 2004*).

Por todas las razones argumentadas anteriormente, incluida la fotoinhibición, la eficiencia fotosintética teórica se ve reducida en las instalaciones comerciales a un 3-4% (*Benemann, 1992*), es decir, que de 100 fotones que inciden sobre una célula fotosintética, solo se aprovechan 3 ó 4.

2.3. Cultivo de microalgas

2.3.1. Parámetros que influyen en el crecimiento o productividad.

Los factores determinantes en la productividad de un cultivo de microalgas son la temperatura, el pH, los nutrientes del medio y la luz que incide sobre cada célula. Los fotobiorreactores son los sistemas de cultivo cuyo objetivo consiste en facilitar el aporte de nutrientes y luz a las células microalgales y adecuar (en la medida de lo posible) las condiciones ambientales a las condiciones óptimas de crecimiento de la especie en concreto que se va a cultivar. Estos sistemas pueden ser cerrados (*closed systems*) o abiertos, tipo estanques (*open ponds*).

Temperatura

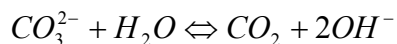
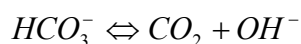
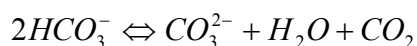
La temperatura en el crecimiento microalgal es un factor a tener en cuenta, ya que ésta influye en los coeficientes de velocidad de reacciones biosintéticas (*Richmond, 1986*). La relación entre temperatura y velocidad de crecimiento crece exponencialmente hasta que se alcanza la temperatura óptima. Cuando se trata de un sistema de cultivo cerrado, la temperatura puede ser controlada fácilmente por varios mecanismos, como rociadores de agua, inmersión del colector solar en un baño (piscina) termostatzado, situar reactor dentro de un invernadero, etc (*Reboloso-Fuentes, 1999*). Sin embargo, en un sistema de cultivo en estanques abiertos, es más difícil de controlar y existen ciertos recursos como cubrir los estanques con plásticos transparentes a modo de invernadero.

Nutrientes

Los requerimientos nutritivos para el cultivo de las microalgas (*Richmond, 2004*) incluyen:

- *Carbono inorgánico*. Para conseguir altas producciones de biomasa microalgal, el aporte externo de CO₂ es fundamental. Las concentraciones atmosféricas de CO₂ no satisfacen las necesidades de sistemas autotróficos (cuya única fuente de carbono es el CO₂) de producción de microalgas de alto rendimiento (*Lee, 1995*). Por otro lado, el sistema de equilibrio CO₂–H₂CO₃–HCO₃⁻–CO₃²⁻ es el mecanismo amortiguador más importante presente en las aguas dulces, y el mejor modo de controlar y mantener un nivel específico de pH, óptimo para cada especie.

El sistema bicarbonato-carbonato puede aportar CO₂ para la fotosíntesis mediante las siguientes reacciones:



La existencia de este equilibrio provoca que durante la fijación fotosintética de CO₂, se acumule OH⁻ en el medio de cultivo, subiendo el pH. Posiblemente, la mejor forma de regular el pH sea mediante un controlador estático que inyecta CO₂ directamente en el medio cuando detecta una caída de pH, al mismo tiempo que aporta el CO₂ necesario para cultivos de alta productividad. Se debe tener en cuenta, además, que durante la respiración, los microorganismos liberan CO₂ al medio, bajando el pH, aunque su influencia no suele ser muy grave, ya que como regla general la respiración suele ser un 10% de la fotosíntesis.

- *Nitrógeno*. Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas. El contenido en nitrógeno en la biomasa microalgal varía desde un 1 al 10%. El nitrógeno, normalmente, se añade como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺). La adicción de amonio suele ser más problemática, ya que al ser fijado por los microorganismos, el pH baja significativamente. La utilización de nitrato como

fuente de N conlleva una subida de pH, pero no muy acusada. Un problema adicional del amonio es que, éste puede perderse por volatilización, sobre todo a pH elevado. Lo que aún no se ha determinado es qué forma de nitrógeno es más beneficiosa energéticamente para la producción de microalgas.

- *Fósforo.* El fósforo es esencial para muchos procesos celulares, como son la transferencia de energía, formación de ácidos nucleicos, etc. Suele añadirse a los medios de cultivo en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4^- . Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. Las deficiencias ocurren porque el ortofosfato tiene tendencia a unirse a otros cationes (CO_3^{2-} , Fe^{3+}) y precipitar.
- *Otros macro- y micronutrientes.* Aparte del C, N y P, otros elementos son necesarios para el cultivo de microalgas, tanto macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg, Ca) como micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se), tal como se deriva de la composición elemental de las células microalgales. Muchos de los elementos traza son relevantes en reacciones enzimáticas y biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo. Al igual que el P, estos iones también muestran cierta afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para aliviar este problema, se añaden al medio agentes quelantes de metales, como el EDTA (especialmente el Na-EDTA, que es de fácil disolución).

pH y alcalinidad

El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO_2 , y por tanto, en la alcalinidad, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes. Cada especie de microalga necesita un cierto rango de pH al cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas esté más habituada a asimilar. Como se ha comentado anteriormente, el pH se controla fácilmente con la inyección controlada de CO_2 , pero también con adición de ácido o base.

Disponibilidad de luz

La disponibilidad de luz es sin duda el principal factor limitante de los cultivos fotoautótrofos de microalgas. Los nutrientes inorgánicos e incluso el CO₂ pueden ser incorporados al medio de cultivo en exceso, de forma que nunca sean limitantes al crecimiento. Sin embargo la luz debe ser continuamente suministrada al cultivo, ya que la energía radiante no se puede acumular (*Molina-Grima et al., 1996*).

En cultivos poco densos la disponibilidad de luz queda asegurada suministrando luz a la intensidad en la que se alcanza P_{max} (*Fig. 2.5*), pero si este cultivo está en el exterior, en las horas de mayor irradiancia solar, el cultivo sufrirá fotoinhibición. La forma de combatir la fotoinhibición consiste en aumentar la densidad del cultivo, de forma que las células se hacen sombra entre ellas (*efecto de autoensombrecimiento*). Así se va reduciendo la intensidad de luz desde el exterior hacia el interior del cultivo. Pero es posible que la densidad sea lo suficientemente alta como para que la luz no pueda llegar hasta el interior, habiendo zonas en el reactor expuestas a una alta intensidad de luz (zonas fotoinhibidas) y otras a las que la luz no llega (zonas fotolimitadas), como muestra el esquema de la figura 2.6.

Por ello en cultivos densos se hace necesario una adecuada agitación del cultivo, que haga circular a las células constantemente entre las zonas iluminadas y deficientes en luz, como muestra el esquema de la figura 2.6. En la zona iluminada las células absorberán gran cantidad de luz, debiendo permanecer en ella un tiempo corto para evitar la fotoinhibición. De ahí pasarán a la zona oscura, donde pueden seguir realizando la fotosíntesis aún a intensidad es nula, un cierto tiempo después de haber absorbido la luz, gracias a la inercia del crecimiento fotosintético (*Molina-Grima et al., 1996*). La geometría del reactor condicionará el recorrido realizado por las células mientras son impulsadas por la agitación. Así por ejemplo, en reactores tubulares, a mayor diámetro mayor recorrido y tiempo necesario para pasar de la zona iluminada a la zona oscura. El tiempo que tarda una célula en hacer este recorrido determina lo que se conoce como ciclo luz/oscuridad.

Es por esto que, uno de los mayores esfuerzos en la investigación aplicada de microalgas se ha centrado en el diseño de fotobiorreactores que optimizan las condiciones de

agitación, superficie iluminada, penetración de luz, etc., para que cada célula reciba una iluminación adecuada. Éste sigue siendo actualmente uno de los retos de la investigación (Pulz, 2001).

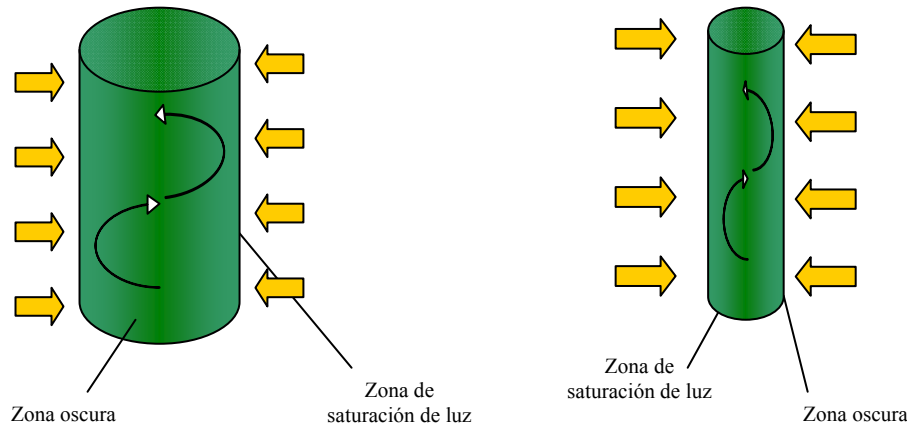


Figura 2.6. Recorrido de las células, desde la zona exterior, con saturación de luz, a la zona interior, fotolimitada, en fotobiorreactores tubulares de diferente diámetro.

2.3.2. Sistemas de cultivo: fotobiorreactores.

Los fotobiorreactores (PBR) son reactores donde organismos fotótrofos son cultivados con alta eficiencia. Aunque la palabra fotobiorreactor se suele utilizar para sistemas cerrados, en un sentido más amplio, es válida también para estanques abiertos.

Los criterios comunes de diseño de un fotobiorreactor son aquellos que resultan en una alta productividad volumétrica y conversión de energía lumínica de forma económicamente viable. Un PBR eficiente no se puede diseñar sin los adecuados conocimientos del comportamiento de los organismos durante su cultivo. Puesto que los organismos fotótrofos presentan gran diversidad en cuanto a morfología, requerimientos nutritivos y de luz y resistencia a diferentes tipos de estrés, los PBR deben ser diseñados para un organismo y unas condiciones ambientales concretas. Los principales criterios de diseño son: relación superficie iluminada/volumen del reactor, orientación e inclinación, sistemas de mezcla y desorción de gases, sistemas de limpieza y de regulación de la temperatura, transparencia y durabilidad del material. Facilidad de operación y de escalado, así como

bajos costes de construcción y operación son también de particular importancia para los fotobiorreactores comerciales.

Sistemas abiertos (estanques)

Toda la producción comercial de microalgas que se está realizando en este momento, salvo pequeñas excepciones, se está cultivando en este tipo de sistemas. Las razones principales son la facilidad de construcción y operación, su bajo coste y su mayor durabilidad (Richmond, 2004). Sin embargo, las mayores limitaciones de los sistemas abiertos incluyen la mala accesibilidad de las células a la luz, las pérdidas por evaporación, el uso de grandes extensiones de terreno y la contaminación del cultivo por depredadores y otros organismos heterótrofos de rápido crecimiento (Ugwu, 2007). Por ello las producciones comerciales se reducen a especies que crecen en condiciones extremas de pH, salinidad, etc.

Los estanques abiertos son tanto sistemas naturales (lagunas, estanques), como sistemas artificiales, que presentan diferentes diseños: inclinados (de capa fina), circulares y los más extendidos, los tipo *raceway*. En los fotobiorreactores inclinados el cultivo va descendiendo resbalando por una superficie inclinada, creando gran turbulencia y una fina capa de cultivo. Las desventajas son las típicas de los sistemas abiertos, añadiendo el coste energético de bombear el cultivo de nuevo a la parte superior. En los estanques circulares como los de la figura 2.7a, la agitación se realiza mediante una pala que gira recorriendo toda la superficie. A pesar de ser costosos en su construcción y operación, son muy usados en Japón, Taiwán e Indonesia para la producción de *Chlorella* (Lee, 2001). Por último los estanques tipo *raceway* (ver figura 2.7b), consisten en una cavidad escavada en el suelo, con una profundidad de 15-20 cm, cubierta con plástico para evitar percolación. El estanque se divide en dos canales y la circulación y agitación del cultivo se realiza mediante paletas giratorias, que además hacen circular el cultivo a lo largo del estanque.

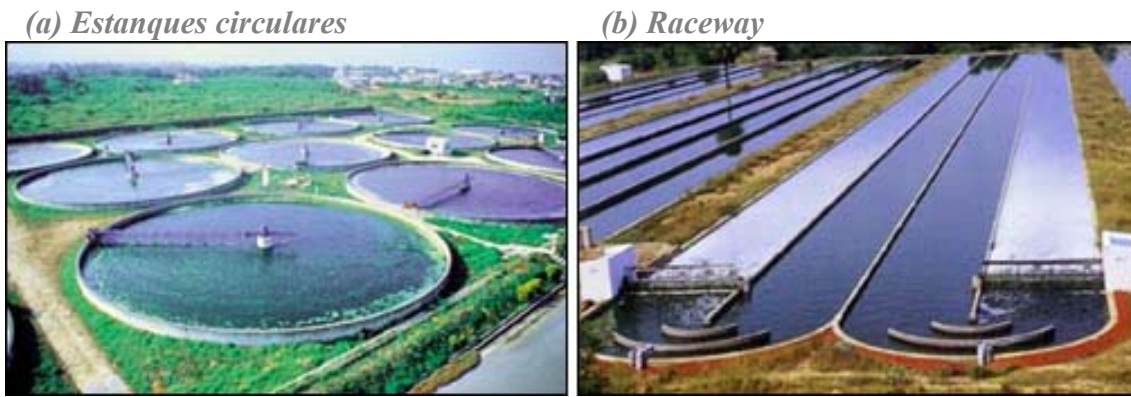


Figura 2.7. Dos tipos de fotobiorreactores abiertos: (a) sistemas circulares y (b) tipo raceway.

Sistemas cerrados

Los fotobiorreactores cerrados se caracterizan por la regulación y control de casi todos los parámetros importantes, al mismo tiempo que reducen el riesgo de contaminación y las pérdidas de CO₂. Además, éstos permiten condiciones de cultivo reproducibles, control de temperatura y diseño flexible (Pulz, 2001). En estos equipos, la luz no incide directamente en las células, sino que atraviesa unas paredes transparentes para llegar hasta ellas. Por ello en los PBR cerrados el intercambio directo de gases entre el cultivo y la atmósfera suele estar fuertemente limitado. La principal consecuencia es la acumulación de oxígeno en su interior. Las posibilidades técnicas de un PBR cerrado son mucho mayores que las de los sistemas abiertos.

Los fotobiorreactores pueden ser clasificados según su diseño y modo de operación. En cuanto a diseño, los reactores pueden ser: (a) planos o tubulares, (b) horizontales, verticales, inclinados o espirales, (c) serpentines (tubos acodados, circulación en serie) o múltiples (circulación en paralelo desde un colector repartidor a uno recogedor). Desde el punto de vista del modo de operación, los PBR pueden clasificarse como: (d) impulsados/agitados por aire o por bombas y (e) reactores de una fase (el intercambio de gases se produce en una cámara separada) o de dos fases (no existe cámara de intercambio de gases, sino que éste se produce a lo largo de todo el reactor).

De todas las posibles configuraciones, los reactores cerrados que más están siendo investigados para su aplicación a la producción comercial de sustancias de alto valor son:

1. *PBR tubulares*. Los reactores tubulares (*Fig. 2.8a*) son de los más adecuados para cultivos en el exterior, debido a su alta relación área iluminada/volumen reactor. La figura 2.8a muestra un reactor tubular de serpentín, en el que todo el líquido de cultivo pasa por todos los tubos hasta llegar a la zona de degaseado (columna vertical, no mostrada en la imagen), tras la cual, comienza de nuevo su recorrido. El grado de agitación y la transferencia de materia en los PBR tubulares son limitados, causando altas concentraciones de O₂. Los problemas de fotoinhibición también son comunes, ya que si no hay un buen grado de mezcla las células de la superficie reciben grandes cantidades de luz, mientras que a las interiores no les llega la suficiente (*Ugwu et al., 2007*). A principios de los 80, Pirt y colaboradores desarrollaron un PBR tubular que posteriormente fue patentado (*Pirt et al., 1983*).

Molina-Grima y colaboradores han contribuido con importantes avances al desarrollo de los fotobiorreactores. En la figura 2.9c puede verse uno de sus diseños: un reactor tubular de 3.000 litros. El reactor de mayor tamaño que han desarrollado es un reactor tubular horizontal, con desorción en columna airlift, de 30.000 litros, instalado en el interior de un invernadero, para amortiguar los cambios de temperatura (*Molina-Grima, 2008*).

2. *PBR de paredes planas, inclinados o verticales*. Su principal ventaja es la gran superficie iluminada (*Fig. 2.8b*). Generalmente están hechos de materiales transparentes (plásticos). Se ha comprobado que las concentraciones de O₂ disueltas son bajas y que se alcanzan altas eficiencias fotosintéticas. Tiene ciertos problemas, como la dificultad de escalado, imposibilidad de controlar la temperatura y posible estrés hidrodinámico de ciertas especies (*Ugwu et al. 2007*). Este tipo de reactores han sido ampliamente investigados por Tredici y colaboradores (*Tredici et al., 1991, Tredici, y Materassi, 1992, Tredici y Chini-Zitelli, 1998*). Una nueva versión de reactores planos puede verse en la figura 2.9b, construido con bolsas de plástico e inmersos en un estanque de agua para regulación térmica.

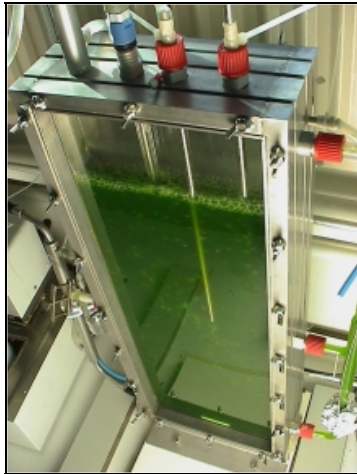
(a) Reactor tubular*(b) Reactor de paredes planas*

Figura 2.8. Dos tipos de fotobiorreactores cerrados exteriores. (a) Reactor tubular horizontal y (b) reactor plano inclinado.

3. *PBR de columna vertical.* Son muy sencillos de esterilizar y de operar monosépticamente, compactos y de bajo coste. Su sistema de agitación consiste en inyección de aire desde el fondo (Ugwu *et al.*, 2007). La desorción de gases tiene lugar en la parte alta de la columna. Se estima que pueden ser adecuados para el cultivo a gran escala, sin embargo, tampoco existen aplicaciones comerciales.

4. *PBR iluminados interiormente.* La iluminación puede ser artificial, mediante lámparas fluorescentes, o natural, mediante el uso de colectores solares y fibra óptica que recogen luz solar del exterior y la transfieren al interior de los reactores (Fig. 2.9a) (Usui e Ikenouchi, 1997, Ono y Cuello, 2006). Los reactores con colector solar siguen siendo una tecnología que acapara gran interés en la investigación, dado su gran potencial de productividad porque reduce los problemas de accesibilidad a la luz y la fotoinhibición. La iluminación artificial con lámparas solo puede considerarse en la investigación, ya que el consumo de energía es muy elevado para ser utilizada en producciones comerciales.

(a) Reactor plano iluminado interiormente



(b) Reactor plano de bolsas



(c) Reactor tubular de 3.000 l impulsado por columna airlift



Figura 2.9. *Diferentes tipos de Fotobiorreactores: (a) plano con iluminación interior utilizado para investigación, (b) plano inmerso en estanque de agua , (c) tubular horizontal impulsado por columna airlift .*

La elección del tipo de fotobiorreactor es complicada y no debe hacerse sin un estudio previo de la especie a cultivar, respecto a resistencia a condiciones ambientales o hidrodinámicas, costes de operación, necesidad de esterilidad, del valor del producto final o de los recursos hídricos o de suelo disponibles (Ugwu et al., 2007).

2.4. Estado del arte de la biofijación de CO₂ con microalgas: pasado, presente y futuro.

La idea de utilizar los gases de combustión (principalmente de centrales eléctricas) para la producción de microalgas y conversión de la biomasa a biocombustible (en aquel caso, a metano) surgió por primera vez en 1955, durante el encuentro de la *Solar Energy Society*, (Arizona, USA), inspirada en los trabajos de Oswald (*Oswald, et al., 1957*) sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas con microalgas. Oswald propuso un sistema combinado de depuración de aguas residuales, basado en el crecimiento conjunto de bacterias y microalgas. Para que las bacterias degraden la materia orgánica de forma rápida y eficiente, se requieren altas concentraciones de O₂ en el medio. Por otro lado, las microalgas pueden crecer bien en este tipo de aguas, ya que contienen grandes cantidades de N y P, sus nutrientes principales. La producción de biomasa microalgal reduce la contaminación de N y P de aguas residuales y libera O₂ que favorece la degradación de materia orgánica. Así, el sistema de depuración se vuelve mucho más eficiente y menos costoso en tiempo y energía (*Benemann, 1992*).

El aprovechamiento de los gases de combustión con microalgas cobró especial interés tras la crisis energética de 1973, como una alternativa de “energía solar” y así se financiaron varios programas de investigación con microalgas para biocombustibles, especialmente en EEUU (*Department of Energy, DOE*). El principal avance fue la aplicación de los sistemas propuestos por Oswald en reactores tipo raceway con agitación de paletas. La productividad alcanzada fue de 60 t/ha/año. El 90% de la producción se cosechaba mediante biofloculación (proceso espontáneo).

Durante los años 80 los esfuerzos en la investigación de fijación de CO₂ con microalgas se intensificaron. Los principales proyectos se llevaron a cabo en EEUU (*Aquatic Species Program*, en el NREL, *National Renewable Energy Laboratory*) y en Japón por el RITE (*Research Institute of Innovative Technology for the Earth*) y Mitsubishi Heavy Industries Ltd. Las mayores contribuciones del *Aquatic Species Program*, fueron por un lado, la demostración de que los PBR exteriores son factibles para la utilización eficiente de CO₂ de gases de combustión, dando lugar a altas productividades (5% eficiencia de conversión

solar) y por otro, el aislamiento de especies de microalgas adecuadas para la fijación de CO₂ en cultivos masivos y aquellas con alto contenido en lípidos (orientadas a la producción de biodiesel). El programa también apuntó la necesidad de modificación genética de las microalgas para conseguir sus objetivos a un menor coste (reducir fotoinhibición, mayores contenidos en lípidos, facilidad de cosechado, etc.) (Benemann, 1992).

Las investigaciones llevadas a cabo por los programas japoneses demostraron que ciertas especies de microalgas (*Nannochloris* y *Nannochloropsis*) no solo crecían bien en altas concentraciones de CO₂, sino también cuando se inyectaban en el cultivo los gases reales de combustión, conteniendo SO₂ y NO_x (Negoro et al., 1991) y metales pesados como Ni y V (Negoro et al., 1992). Pero probablemente, su aportación más beneficiosa fueron los avances en fotobiorreactores con colectores solares e iluminación interior a través de fibra óptica (Michiki, 1995).

Actualmente existe un renovado interés en la investigación con microalgas debido a los problemas ambientales y económicos que augura el cambio climático y la prevista escasez de petróleo, y es que las microalgas tienen el potencial de fijar grandes cantidades de CO₂ en su biomasa y ésta de ser transformada a biocombustibles. Dado que existe este gran potencial y que la lucha contra el efecto invernadero requiere la coordinación de diferentes tecnologías, la Agencia Internacional de la Energía, bajo su programa de investigación y desarrollo para la mitigación de gases efecto invernadero (*IEA greenhouse Gas R&D Programme*), ha creado una red internacional de investigación para la *bio*-fijación de CO₂ con microalgas, la *International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae*. Esta red representa el mayor esfuerzo coordinado que se está llevando a cabo en este momento sobre la lucha contra el efecto invernadero con microalgas. La organización estima una productividad de las microalgas alrededor de las 100 toneladas de biomasa/ha/año (cultivos en estanques abiertos de poca profundidad) y un alto rendimiento en la producción de biodiesel y otros biocombustibles.

Sin embargo, estas previsiones aún deben ser demostradas en la práctica, lo que requerirá considerables esfuerzos de I+D. Más criticables son los altos costes de capital para estos sistemas de producción de microalgas (cerca de 72.000 €/ha) comparados con los costes

de los sistemas de producción en cultivos agrícolas (por debajo de 7.200 €/ha). Por tanto, incluso con altas productividades, la obtención de biomasa microalgal será más cara que para las plantas superiores. Esta diferencia de costes debe ser justificada en base a la alta calidad de la biomasa microalgal, que permite una conversión a biocombustibles menos costosa y a la posibilidad de co-producción de sustancias de alto valor como biopolímeros, pigmentos, antioxidantes, etc. La baja ocupación del suelo de estos sistemas de alta productividad en comparación con cultivos agrícolas convencionales, la posibilidad de cultivo de las microalgas conjuntamente con la depuración de aguas residuales y la utilización de agua o suelo inservible para otro tipo de cultivos podrían justificar el desarrollo a largo plazo (más de 20 años) de esta tecnología para su dedicación exclusiva a la reducción de CO₂ y la producción de biocombustibles. A medio plazo, (5-10 años) se estima que estos sistemas serán rentables si se combinan con el tratamiento de aguas residuales (*Benemann, 2002*).

Para la productividad estimada de 100 t biomasa/ha/año se predice una fijación de 165 t CO₂/ha/año, sin tener en cuenta el dióxido de carbono derivado del gasto energético en su producción, en la transformación a biocombustible y en el que se producirá al consumir el biocombustible. Si se utiliza el sistema combinado de producción de microalgas con tratamiento de aguas residuales, inyectando CO₂ de gases de combustión, la biomasa se destina a biocombustibles y fertilizantes (a partir del residuo de la producción de biocombustibles), la reducción neta de CO₂ será de una tonelada por tonelada de biomasa (*Harmelen y Oonk, 2006*). En este caso el balance de CO₂ es realmente negativo gracias al ahorro de energía derivado del tratamiento más eficaz de las aguas residuales cuando se utilizan microalgas y en la producción de fertilizantes químicos que son sustituidos por biofertilizantes.

Ya que la biofijación con microalgas puede actuar como sumidero real de CO₂, esta tecnología es particularmente adecuada para la promoción de Mecanismos de Desarrollo Limpio (CDM) en países en vías de desarrollo, donde las condiciones climáticas (radiación solar, disponibilidad de aguas saladas, etc) suelen ser favorables. Además, el tratamiento de aguas residuales junto a la producción de microalgas es un proceso tecnológicamente simple, que aportaría beneficios ambientales directos sobre la zona e ingresos por la venta

de biocombustible y aplicación de biofertilizante en su agricultura local, ayudando al desarrollo de la zona y a mejorar sus condiciones de vida.

Comparando la biofijación de CO₂ con microalgas con otras tecnologías de reducción de gases de efecto invernadero, la fijación con microalgas destinadas a la producción de biocombustibles se vuelve más competitiva con el aumento de los precios de la energía, al no depender sus gastos de una fuente fósil y aumentar su beneficio por la venta del biocombustible residual (*Harmelen y Oonk, 2006*).

2.5. Bibliografía

Aguilar, A., 2008. Microalgae as biofuels and biorefineries: initiatives of the European Union. Jornadas técnicas sobre la producción y uso de microalgas con fines energéticos. Madrid, Noviembre, 2008.

Benemann, J., 2002. Greenhouse gas emissions and potential for mitigation from wastewater treatment processes. *Report to the Electric Power Research Institute and U.S. Department of Energy*.

Benemann, J.R., 1992. Biological utilization of CO₂ – A review. Prepared for MIT White Paper. Unpublished.

Falkowski, P.G. y Owens T.G., 1980. Light shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiology*, 66, pp. 592-595.

Harmelen, T., Oonk, H., 2006. Microalgae Biofixation Processes: Applications and potencial contributions to greenhouse gas mitigation options. Prepared for the International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae operated under the International Energy Agency Greenhouse Gas R&D Programme.

Lee, Y. K.; Ding, S. Y.; Low, C. S.; Chang, Y. C.; Forday, W. L.; Chew, P. C., 1995. Design and performance of an alpha -type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 7, n° 1, pp. 47-51.

- Lee, Y.K., 2001. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13. pp. 307-15.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1999. Brock, *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia. Madrid. España
- Melis, T. 2004. Maximizing photosynthetic efficiencies and hydrogen production in microalgal cultures. Annual Progress Report II. U.S. Department of Energy.
- Michiki, H. 1995. Biological CO₂ biofixation and utilization proyect. *Energy Conversion and Management*, 36, pp. 701-705.
- Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez Pérez, J.A., García-Camacho, F., 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, pp. 59-69.
- Molina-Grima, E., Acién-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Christi, Y. 1999. Photobioreactors:Light regime, mass transfer and scale up. *Journal of Biotechnology*, 70, 233-249.
- Molina-Grima, E., Acién-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Camacho-Rubio, F., Chisti, Y., 2000. Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 355-368.
- Molina-Grima, E., 2009. Photobioreactor engineering and scale-up. *Jornada Técnica Internacional: Producción y uso de las microalgas con fines energéticos*. Madrid, 11 de Noviembre de 2009.
- Negoro, M., Shioji, N., Miyamoto, M., Miura, Y., 1991. Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SO_x and NO_x. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28, nº 29, 877-886.
- Negoro, M., Shioji, Y., Ikuta, Y., Makita, T., Uchiumi, M. 1992. Growth characteristics of microalgae in high concentration CO₂ gas and effects of culture medium trace components impurities thereon. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 34, nº 35, pp. 681-692.

- Ono, E., Cuello, J.L., 2006. Feasibility Assessment of Microalgal Carbon Dioxide Sequestration Technology with Photobioreactor and Solar Collector. *Biosystems Engineering*, 95, n° 4, pp. 597–606.
- Oswald, W.J., Gootas, H.B., Golueke, C.G., Kellen, W.R., 1957. *Algae in waste treatment*. *Sewage and Industrial Wastes*, 29, pp. 437-457.
- Pirt, S. J. Lee, Y.K., Wallach, M.R. Balyuzi, H.H., Bazin M.J., 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production from carbon dioxide: design and performances. *Journal of Chemical Biotechnology*, 33, pp. 35-58.
- Polle, J., Kanakagiri S., Jin, E.S., Masuda T., Melis A., 2002. Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, pp. 1257-1264
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 287-293.
- Raven, J.R., Johnston, A. M., 1991. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine phytoplankton and their implication for the use of other resources. *Limnology and Oceanography*, 36, pp. 1701-1714.
- Reboloso-Fuertes M.M, García-Sánchez, J.L., Fernández-Sevilla, J.M., Ación-Fernández, F.G., Sánchez-Pérez, J.A., Molina Grima., E. 1999. Outdoor continuous culture of *Porphyrium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 271-288.
- Richmond, A., 1986 .Microalgaculture. CRC, *Critical Reviews in Biotechnology*, 4, pp. 369-438.
- Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK.
- Tredici, M.R., Chini Zitelli, G., 1998. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat fotobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, pp.187-197.

- Tredici, M.R, Chini Zitelli, G., 1998. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in development of reactors for mass cultivation of phototrophic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 4, pp. 221-331.
- Tredici, M.R., Carlozzi, P., Chini Zitelli, G., Materassi, R., 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 38, pp. 153-159.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2007. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, pp. 4021–4028 .
- Usui, N., Ikenouchi, M., 1997. The Biological CO₂ Fixation and Utilization Project by RITE (1). Highly-effective Photobioreactor System. *Energy Conversion and Management*, 38, pp. S487-S492.
- Vonshak, A, y Guy, R., 1992. Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue green alga *Spirulina platensis*, grown outdoors. *Plant Cell&Environent*, 15, pp. 613-616.

CAPITULO 3

OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

3.1. Objetivos y justificación del trabajo

El aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera supone un problema ambiental y económico a nivel mundial. Para aminorar sus efectos, muchos países se han comprometido a reducir sus emisiones de gases de efecto invernadero, entre ellos España. Los mayores focos emisores de CO₂ son las centrales térmicas basadas en combustibles fósiles, principalmente las de carbón y fuel. Frente a los cultivos vegetales, las microalgas son los únicos organismos fotosintéticos capaces de tolerar y aumentar su productividad a mayores concentraciones de dióxido de carbono que la atmosférica. Por ello, una de las vías de reducción de emisiones consiste en la biofijación de CO₂ procedente de estos gases de escape, inyectándolos directamente en un cultivo de microalgas. Sin embargo, para evitar el coste de almacenamiento y traslado del gas es fundamental que este sistema funcione en las condiciones ambientales del lugar donde se ha de aplicar. La biofijación de CO₂ con microalgas se presenta como la alternativa más natural y respetuosa con el medio ambiente de todas las que han sido propuestas.

En vista de esta situación, el objetivo general de la presente investigación tiene como finalidad el aislamiento de una o varias especies de microalgas autóctonas, adecuadas para su aplicación en el sistema de fijación de CO₂ descrito anteriormente. El objetivo general planteado en este trabajo de tesis, se alcanzará por medio de los siguientes objetivos específicos:

- Aislar especies autóctonas resistentes a altas inyecciones de CO₂ puro y con capacidad potencial para su aplicación en cultivos a gran escala.
- Estudiar la respuesta fotosintética de la especie seleccionada como estimación de los límites máximos de crecimiento en función de la intensidad de luz que llega a la célula.
- Búsqueda de las condiciones de crecimiento para la especie seleccionada que condicionan una mayor fijación de CO₂.

- Establecer el paso de escala mediante el cultivo de la especie seleccionada en un fotobiorreactor planta piloto, determinando las mejores condiciones de operación del reactor para alcanzar la mayor fijación de CO₂ posible.

3.2. Metodología general

Para abordar el cada uno de los objetivos propuestos y conseguir el objetivo general planteado, se ha establecido la metodología de trabajo descrita en el esquema de la figura 3.1. Cada fase de la investigación ha sido estructurada en un capítulo diferente.



Figura 3.1. Esquema de la metodología global establecida para alcanzar los objetivos planteados.

La primera fase del trabajo experimental consiste en el aislamiento de microalgas y cianobacterias de aguas dulces encontradas en muestras de aguas no salinas recogidas en entornos naturales o residuales, en la provincia de León. Las especies aisladas serán sometidas a altas inyecciones de CO₂ en su medio de cultivo. De entre las especies que

resistan este tratamiento selectivo se escogerá aquella con mayor velocidad de crecimiento y capacidad de fijación de CO₂ en cultivos másicos.

Una vez seleccionada la especie con mayor capacidad para la fijación de CO₂, será necesario determinar su respuesta fotosintética, con el fin de conocer su velocidad específica de crecimiento máxima y a partir de qué intensidad de luz la especie comienza a fotoinhibirse. Estos dos parámetros, velocidad de crecimiento máxima y límite de intensidad de luz son fundamentales porque determinan la capacidad potencial de fijación de CO₂ de la especie seleccionada y la resistencia a las altas irradiancias que normalmente se alcanzan a medio día en cultivos exteriores.

El paso siguiente requiere el estudio conjunto de los parámetros que más influyen en su velocidad de crecimiento, como el pH, temperatura o intensidad de luz, para así determinar un punto de operación que permita obtener la máxima fijación de CO₂ posible con la especie seleccionada. La determinación del punto óptimo se llevará a cabo mediante el uso de herramientas estadísticas, como el diseño experimental y aplicación de la metodología de análisis de superficie de respuesta.

Pero para poder afirmar que la especie seleccionada es adecuada para ser utilizada extensivamente en un sistema de fijación fotosintética de CO₂, es necesario conocer su comportamiento a mayor escala. Como paso intermedio entre el laboratorio y una instalación real se cultivará la especie seleccionada en un fotobiorreactor escala planta piloto. Por su sencillez y versatilidad, el tipo de reactor será una columna de burbujeo, cuyas características hidrodinámicas deben ser caracterizadas a fin de establecer si la columna es adecuada para el cultivo de microorganismos fotótrofos. A continuación serán determinadas las condiciones de operación de la columna, así como el modo de cultivo que permitan obtener la mayor cantidad biomasa o fijación de CO₂.

Como fase final y recopilando todos los resultados obtenidos en el presente estudio encaminados a conseguir la mayor fijación de CO₂ posible, se determinará la fijación de CO₂ por la especie seleccionada cuando ésta se cultiva en el fotobiorreactor escala piloto, en las condiciones de cultivo óptimas y en el modo de cultivo y condiciones de operación del reactor mejores.

CAPITULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

4.1. Métodos analíticos

Los métodos analíticos están orientados fundamentalmente a la observación y control del crecimiento del microorganismo fotosintético, de forma indiferente para microalgas y cianobacterias. La observación de un cultivo abarca desde medidas inmediatas como el pH, oxígeno disuelto, temperatura, intensidad de luz recibida por las células, conteo celular o absorbancia, a medidas no inmediatas, que ofrecen una información más precisa sobre la cantidad de biomasa o los procesos que acontecen en el interior de la célula y que corroboran o explican las observaciones directas. Las medidas no inmediatas realizadas para el seguimiento del cultivo son la determinación del peso seco, del carbono orgánico total, de la clorofila-a y de la viabilidad de células.

4.1.1. Medida del pH, concentración de oxígeno disuelto (DO) y temperatura

Los tres parámetros fueron determinados con un medidor portátil multiparamétrico modelo *sensionTM 156* (Hach Company, Loveland, USA). El equipo incorpora un electrodo de pH y uno de oxígeno disuelto (DO), cada uno con su sonda de temperatura, que pueden estar conectados al mismo tiempo, permitiendo recoger la terna de valores pH-DO-temperatura para un mismo instante. La medida de DO se realiza por tecnología de luminiscencia que permite una medida rápida y precisa, condiciones necesarias para la correcta determinación de la $k_L a$ (ANEXO II). El valor de temperatura se tomó siempre de la lectura que proporciona la sonda de pH, ya que en ella el termosensor está más cerca del punto en el que se toma la medida de pH o DO. Las medidas se obtienen sumergiendo las sondas a la vez unos 5 cm en el cultivo.

En los casos en los que se realizaron medidas en continuo con registro de datos, se usó otro medidor multiparamétrico, el modelo HQ d40 (Hach Company, Loveland, EEUU), que incorpora sondas de pH y DO idénticas al modelo anteriormente indicado.

4.1.2 Medida de la intensidad de luz

La luz con la que se irradiaron los cultivos se midió con un radiómetro esférico, modelo *QSL-2100* (Biospherical Instruments Inc., San Diego, USA). El medidor permite determinar la irradiancia escalar cuántica (número de fotones que inciden sobre un punto desde todas las direcciones) fotosintéticamente activa, es decir, la radiación de longitudes de onda que las plantas pueden utilizar en la fotosíntesis, normalmente entre 400 y 700 nm. El radiómetro mide, tanto luz incidente sobre la superficie de un reactor, como la que existe en el seno de un cultivo, aplicando un coeficiente de inmersión. La ventaja de este medidor es que proporciona medidas reales de la luz con la que está siendo irradiado un cultivo y de la que está recibiendo una célula en el interior del cultivo, en ambos casos, desde todas las direcciones. La figura 4.1 muestra los diferentes modos de medición de la luz con el radiómetro.

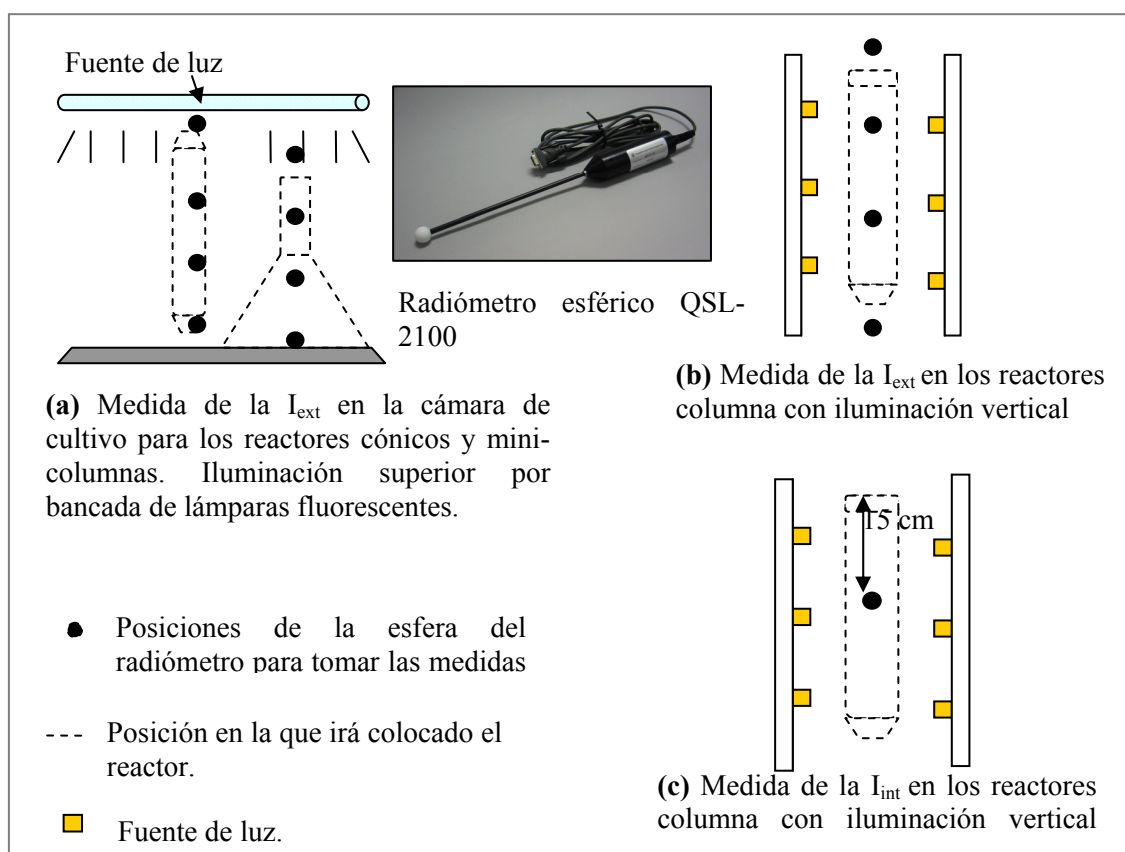


Figura 4.1. Radiómetro esférico SQL-2100 y modo de medición de la intensidad de luz exterior e interior en los diferentes dispositivos experimentales.

Dado el diferente diseño y disposición de los reactores e iluminación en los montajes experimentales con los que se ha trabajado en este estudio, las medidas de intensidad de luz se realizan de diferente modo. En el dispositivo experimental con reactores columna de 0,5 litros (detallado en el capítulo 5), instalado dentro de una cámara de cultivo solo se han realizado medidas de la intensidad de luz incidente sobre la superficie de los reactores (I_{ext}). Por razones de espacio limitado las medidas se han tomado con el radiómetro en posición horizontal (*Fig. 4.1a*) sobre el punto central donde estará colocado el reactor (de geometría cónico o columna). Dicha medida se lee a varias alturas, igualmente espaciadas, abarcando toda la altura del reactor, ya sea de forma cónica o cilíndrica. Así, son determinados cuatro valores, por duplicado. El valor de la medida será el promedio de las ocho mediciones.

En los montajes de columnas con iluminación individual, las medidas de la luz irradiada sobre el reactor (I_{ext}) se realizaron colocando el radiómetro en posición vertical y siguiendo mismo procedimiento que en la cámara de cultivo (*Fig. 4.1b*). Las medidas de irradiancia sumergida o la intensidad de luz interior (I_{int}), solo realizada en reactores tipo columna con iluminación individual y en el reactor escala piloto, se introduce la sonda desde la parte superior de la columna 15 cm en el cultivo. La lectura se toma en el centro de la columna (*Fig. 4.1c*). Como es obvio, en este caso no se pueden realizar medidas a diferentes alturas, pero se comprobó que la iluminación incidente sobre la superficie es uniforme a lo alto del reactor, por lo que también lo será en el interior del reactor, siempre que el cultivo esté bien agitado.

4.1.3. Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa puede estimarse en función de la absorbancia, como densidad celular, realizando un contaje o determinando el peso seco de la suspensión de peso seco.

a) Densidad celular (contaje celular)

La medida de la densidad celular o contaje celular se realizó sobre una cámara de recuento tipo Thoma (*Brand GmbH, Germany*). El método consiste en colocar una gota de cultivo sobre la cámara, que tiene serigrafiada en su superficie un cuadrado de área

conocida ($0,0025 \text{ mm}^2$). La zona donde se coloca la gota es una depresión de profundidad conocida, de forma que al colocar un cubre-objetos sobre la gota, se conoce el grosor de la lámina de cultivo entre la cámara y el cubre-objetos (para cámara Thoma, 0,1 mm) y por tanto el volumen contenido entre la cámara y la placa. La preparación se coloca en el microscopio, se esperan cinco minutos para la estabilización de la muestra, y se cuentan las células presentes en dicho área. El valor de densidad celular, expresado en número de células por mililitro, se calcula como indica la ecuación 4.1 Cuando la densidad es elevada, la muestra se diluye con agua destilada hasta facilitar su conteo.

$$\text{cel/ml} = n^\circ \text{ de células contadas} / (0,0025 \times 0,1 \text{ mm}^3 \times 10^3] \quad (4.1)$$

b) Medida de absorbancia por espectroscopía visible

La cantidad de luz absorbida por una suspensión celular depende de su densidad celular o concentración de biomasa: éstas aumentan a mayor cantidad de luz absorbida. La absorbancia de un cultivo o suspensión celular se midió a 750 nm en un espectrofotómetro visible-ultravioleta (*BECKMAN SU640, EEUU*). Existe cierta controversia sobre cuál es la longitud de onda más adecuada para evaluar el crecimiento celular, ya que cada especie presenta unas longitudes de onda características en las que la absorción es máxima y que son función de su contenido en pigmentos. En este trabajo, sin embargo, se ha seleccionado como longitud de onda 750 nm, en la que se asume que no existe absorción por pigmentos, y por tanto, la absorbancia estará relacionada de forma directa únicamente con la biomasa (*Miyairi, 1995*).

El valor de absorbancia no es una medida real de biomasa, pero sí permite observar los cambios de concentración de un cultivo con el tiempo. Midiendo los pares de valores absorbancia-peso seco o absorbancia-contaje, e incluso absorbancia-TOC, es posible establecer una buena relación matemática entre estos parámetros, normalmente lineal. Por ello, la absorbancia, que es una medida rápida e inmediata, ofrece mucha información del cultivo si se conocen estas relaciones entre parámetros. No obstante, ha de verificarse regularmente que se siguen cumpliendo estas relaciones, ya que podrían cambiar si cambia el estado fisiológico de las células (tamaño, pigmentos, formación de agregados, sustancias excretadas, etc).

c) Determinación del peso seco como concentración de biomasa (Cb)

La concentración de biomasa se mide como peso seco de los sólidos presentes en una suspensión, en este caso la suspensión es el cultivo microalgal. En la presente memoria de tesis, cuando se especifique el parámetro de concentración de biomasa (Cb) será el calculado como peso seco. Así, la concentración de biomasa fue determinada por filtración de 10 ml de cultivo sobre un filtro de fibra de vidrio (*Wathman GF/A, Alemania*) de 0,45 micras. La biomasa retenida sobre el filtro se lavó con 20 ml 0,5 M de HCl, para eliminar restos de sales presentes en el cultivo o que hayan podido precipitar durante el filtrado. A continuación, el filtro se lava con otros 10 ml de agua destilada y se seca a 105° C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el filtro permanece en un desecador durante una hora antes de ser pesado. La concentración de biomasa se determina por diferencia de pesada y se expresa en gramos de biomasa por litro de cultivo (g/l).

d) Determinación del Carbono Orgánico Total (TOC)

La cuantificación de la cantidad de carbono orgánico total (TOC) que hay en un volumen es una medida directa de la cantidad de CO₂ fijado fotosintéticamente por las células. La determinación del TOC se realizó en un analizador automático *TOC-5000, de Simadzu Corporation*. En este analizador, la muestra es inyectada en un horno a alta temperatura (680° C) donde en presencia de un catalizador, el carbono orgánico se oxida completamente a CO₂, y éste se cuantifica mediante un detector gas por infrarrojos. Los valores de TOC indican masa de carbono fijado presente en un volumen de muestra.

La determinación de TOC no se realiza a continuación de la extracción de la muestra, sino que éstas deben conservarse hasta su análisis. Para minorizar las pérdidas de biomasa por respiración celular hasta el momento de análisis, se toman 1,5 ml de muestra en viales que son sometidos a una congelación rápida a -80° C. Una vez congelados, se conservan en cámaras a -10° C. En el momento de su análisis, los viales se descongelan lentamente en baños a 0° C. En el caso de que en la muestra hubiera formas resistentes al proceso de congelación, no podrían realizar ningún proceso metabólico ya que por debajo de 4° C queda inhibida toda actividad enzimática.

4.1.4. Determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo.

La citometría de flujo es un método rápido de medida cuantitativa de células individuales moviéndose en un fluido. Las células de microalgas son ideales para el empleo de esta técnica por ser células individuales y contener pigmentos auto-fluorescentes cuando son excitados con luz azul (Pouneva, 1997).

La determinación de viabilidad celular en *Synechocystis sp.* se basa en una tinción con colorantes fluorescentes que diferencia entre células vivas y muertas. Esta técnica, además de proporcionar información precisa del número de organismos en una muestra, determina también si las células son viables o no, es decir, si están vivas y activas o no. El fluorocromo utilizado para la determinación de viabilidad fue diacetato de fluoresceína, FDA, cuya diferenciación se basa en la integridad de la membrana citoplasmática celular. Cuando se añade FDA, sustancia no fluorescente, a una muestra de células, ésta penetra en el interior de las células donde es hidrolizada por las esterasas para formar fluoresceína, sustancia fluorescente. La fluoresceína es hidrofílica y queda retenida en el interior de las células viables, emitiendo fluorescencia cuando es excitada. Pero esto no ocurre en las no viables y el descenso de la fluorescencia de fluoresceína indica pérdida de la integridad de la pared celular (Stauber *et al.*, 2002). El citómetro de flujo hace pasar miles de células individuales de una en una delante de una lámpara láser emitiendo fluorescencia. La dispersión y las propiedades de la radiación fluorescente son recogidas y analizadas simultáneamente.

Para la medida de viabilidad por citometría de flujo el fluorocromo diacetato de fluoresceína, FDA (*Molecular ProbesTM*, Eugene, Oregon, EEUU) se usó en disolución de acetona al 0,1%. La suspensión de microalgas no debe tener una concentración superior a $1 \cdot 10^6$ células por ml, ya que las células deben “pasar una a una” por delante de la lámpara de fluorescencia. A concentraciones mayores, las células podrían pasar en grupos. A 1 ml de la suspensión diluida de microalgas se le añaden 50 μ l de la dilución FDA al 0,1 %. Tras esperar 5 minutos la muestra se pincha en el citómetro de flujo (Beckton Dickinson FACSort, EEUU).

4.1.5. Determinación de la concentración de exopolisacáridos .

La determinación de la concentración de exopolisacáridos excretados al medio de cultivo por las células se realizó siguiendo el método descrito por *Dubois et al, (1956)*. Según este procedimiento, se toman dos mililitros de cultivo de microalgas a los que se les añaden 0,1 ml de una solución acuosa de fenol al 80%. A continuación se añaden rápidamente 5 ml de H₂SO₄ concentrado, directamente sobre la muestra, no dejando que descienda por las paredes del tubo. Después de 10 minutos se agitan y se colocan en un baño térmico a temperatura entre 25 y 30° C. La absorbancia se mide a 490 nm. La concentración de exopolisacáridos se determina por referencia a una curva de calibrado. Los patrones para la curva de calibrado se preparan del mismo modo, substituyendo los dos mililitros de cultivo por 2 ml de disoluciones de diferente concentración de sacarosa en agua.

4.2. Método de aislamiento de microalgas, conservación de cepas y cultivo de inóculos monoalgales.

Para la realización del presente estudio se ha trabajado con diferentes especies de microalgas y cianobacterias. La mayoría son especies autóctonas aisladas en entornos naturales o industriales de la provincia de León, pero también hemos contado con especies catalogadas procedentes de colección. Los procedimientos para la recolección y obtención de aislados han sido detallados en el capítulo 5. Aquí se han descrito únicamente los protocolos establecidos para la conservación de cepas y mantenimiento de inóculos monoalgales.

4.2.1 Esterilización y preparación de materiales.

Todos los materiales y medios de cultivo utilizados para la conservación de cepas, resiembra y mantenimiento de cultivos monoalgales fueron esterilizados previamente en autoclave a 121° C, 1,2 bares de sobrepresión durante 20 minutos. Para la limpieza y esterilización de superficies de trabajo se usó etanol.

Así mismo, todos los recipientes utilizados para el cultivo de microalgas, los reactores columna de 0,5 y 1 litro, medios de cultivo, conducciones y válvulas de aire, filtros biológicos para gases o cualquier material que haya entrado en contacto con el cultivo fueron autoclavados previamente. Las sondas de medición introducidas en el interior del cultivo fueron esterilizadas con etanol.

4.2.2 Aislamiento de especies de microalgas.

El aislamiento de microalgas ha sido necesario para la clasificación e identificación de las diversas especies presentes en aguas naturales o residuales de la zona. El método empleado es el de aislamiento sobre placa *Petri* (Andersen, 2005). El procedimiento, esquematizado en la figura 4.2, fue el siguiente: se toma un mililitro de cultivo de microalgas y se dispersa en la superficie de una placa *Petri* con agar nutritivo específico para el crecimiento de algas (*Algae Agar, Scharlaub*). Tras el crecimiento en masa por toda la superficie de la placa, se recoge con el asa de siembra biomasa de la superficie y se dispersa en agua destilada estéril. A continuación, se sumerge el asa de siembra en esta suspensión y, tras la llama, el asa de siembra es arrastrada sobre el agar de una nueva placa. Esta forma de aislamiento se conoce como la técnica de “arrastre” (*streaking*), que permite el crecimiento de colonias separadas unas de otras y sin que haya contacto posible entre ellas, ya que se encuentran fijadas a un medio sólido.

Las placas se cultivan a 24° C en cámara de cultivos vegetales, con una intensidad de luz de 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, procedente de lámparas fluorescentes, en ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Cuando se observa crecimiento de microalgas en colonias separadas, se toman con el asa de siembra varias colonias individuales, para llevar cada una de ellas a otra placa, permitiendo de nuevo su crecimiento en colonias individuales. El número de colonias transferidas a una nueva placa dependerá del número de especies que contenga el cultivo que debe separarse. El proceso se repite hasta que se compruebe, tras su dispersión en agua destilada y observación en el microscopio, que se trata de un cultivo monoalgal. Todo este proceso se ha esquematizado en la figura 4.2.

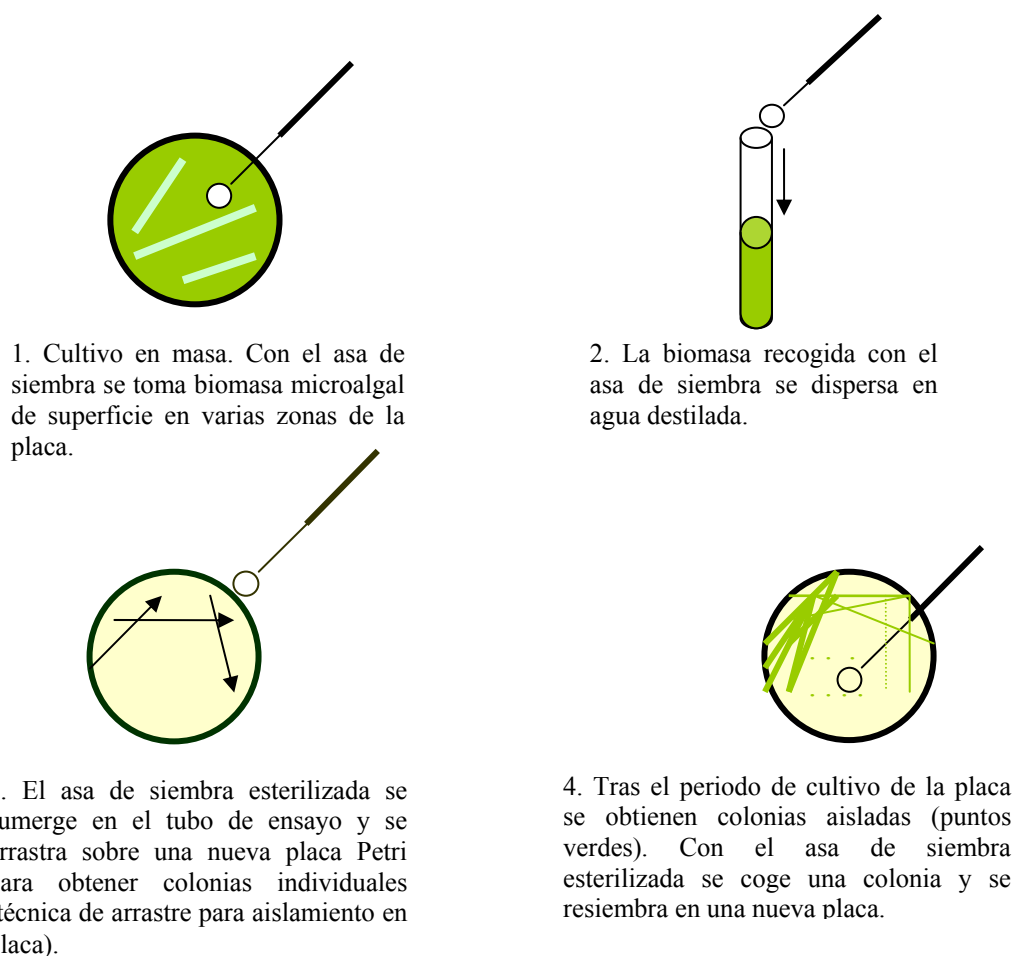


Figura 4.2. Pasos seguidos en el aislamiento de microalgas sobre placa Petri, según la técnica de arrastre.

4.2.3. Conservación de cepas.

Las cepas de microalgas y/o cianobacterias aisladas han sido conservadas por resiembra de cultivos en placa petri, sobre soporte sólido de agar específico para microalgas (*Algae Agar, Scharlaub, Alemania*). El protocolo de resiembra seguido fue el siguiente: las placas se reinoculan en ambiente estéril de campana de flujo laminar, tomando con un asa de siembra células de una sola colonia de una placa cultivada y arrastrándola sobre una placa nueva. Para evitar el rápido secado del agar y la intrusión de otros microorganismos, las placas se cierran con parafilm y a continuación son cultivadas dentro de una cámara de cultivos vegetales (*Fig. 4.3a*). Las condiciones de la cámara de cultivo son: 25° C, iluminación por bancada de 6 lámparas fluorescentes de 36 W (*Philipp's Master TLD, Francia*) y ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad a intensidad de luz de 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Tras 3 ó 4 días puede observarse la aparición de pequeñas

colonias, que se dejan crecer otros 4 ó 5 días. En la figura 4.3b puede verse el aspecto de una placa con colonias que han crecido perfectamente. A continuación se guardan en oscuridad a 5° C, donde pueden permanecer de dos a tres meses. Pasado este tiempo, se repite el proceso de reinoculación.

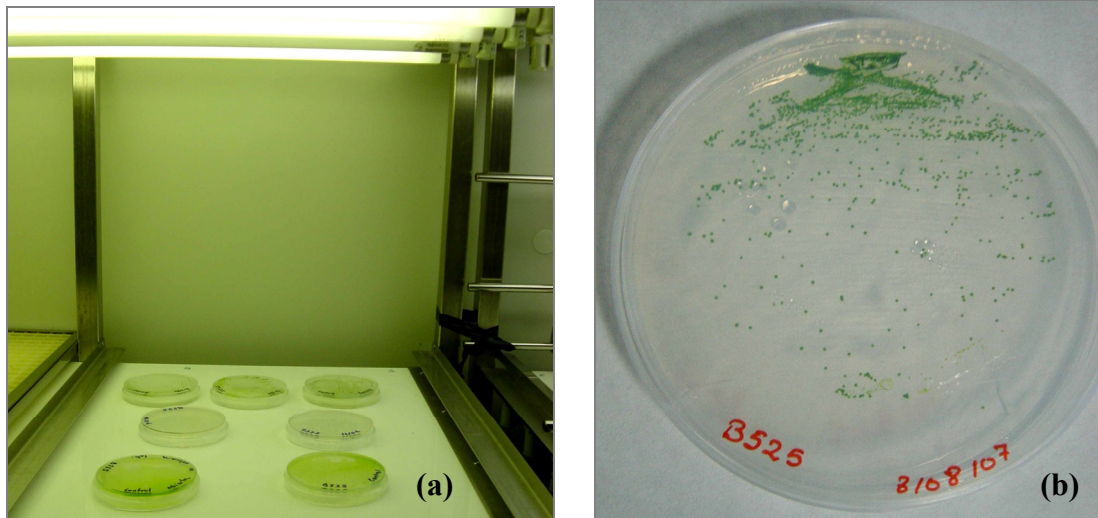


Figura 4.3. (a) Cámara de crecimiento para mantenimiento de inóculos de microalgas y cianobacterias. (b) Placa con cultivo monoalgal del aislado B525 (*Synechocystis* sp.) donde puede observarse el crecimiento de colonias individuales.

4.2.4 Cultivo de inóculos monoalgales.

Todos los inóculos utilizados para cada uno de los cultivos experimentales realizados en este trabajo han sido obtenidos partiendo de células de una sola colonia crecida sobre placa petri. Este proceso se realiza siempre en ambiente estéril de cámara de cultivo con flujo laminar. La colonia debe estar perfectamente separada de otras colonias que han crecido sobre la placa y no debe observarse sobre ella crecimientos de bacterias o levaduras, que también son capaces de colonizar este tipo de agar si no se trabaja de forma estéril. Si no ha habido contaminación externa, todas las células de una colonia han crecido por la división de una sola célula inoculada, por ello todas pertenecen a una única especie de microalga o cianobacteria.

El paso de cultivo en placa a cultivo en suspensión se realiza tomando una colonia con el asa de siembra esparciéndola en un matraz de 100 ml con medio de cultivo *Mann&Myers* (*Mann and Myers, 1968*), cuya composición ha sido detallada en el la

tabla 4.1. El medio debe ser autoclavado previamente. A continuación se pone un tapón hermético que contiene una conducción para posibilitar el burbujeo del matraz desde el fondo, tal como indica la figura 4.4.

Tabla 4.1. Composición química del medio de cultivo Mann and Myers.

<i>macronutrientes</i>	<i>gramos por litro de agua destilada</i>
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
NaNO ₃	1
CaCl ₂	0,3
K ₂ HPO ₄	0,1
<i>micronutrientes</i>	
Na ₂ EDTA	0,03
H ₃ BO ₃	0,006
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002
MnCl ₂	0,0014
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,00033
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,000007
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,000002

El matraz se lleva a la cámara de cultivos vegetales, donde se cultiva a las mismas condiciones de luz y temperatura que las placas petri, pero con burbujeo constante de aire. Los inóculos crecen mejor si se aportan pequeñas cantidades de CO₂. Esto se hace a intervalos, abriendo automáticamente la válvula del CO₂ durante 1 minuto cada 10 minutos, con una concentración del 5% de CO₂ en aire. La corriente de aire/CO₂ entra a través de un filtro de 0,45 µm y sale a través de un filtro de algodón estéril. Para evitar posibles contaminaciones, el reactor debe permanecer perfectamente cerrado hasta que el inóculo vaya a usarse. También puede guardarse durante unos días a 4° C y oscuridad.

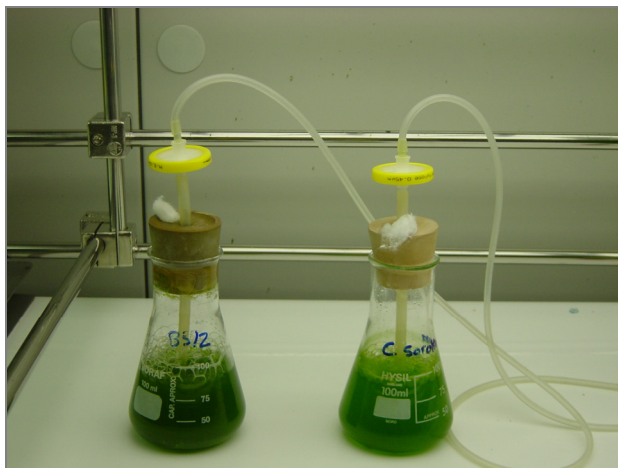


Figura 4.4. Crecimiento de inóculos de microalgas en cámara de cultivos vegetales con burbujeo constante de aire e inyección intermitente de CO_2 .

4.3. Limpieza y desinfección de la columna de burbujeo escala planta piloto.

Para la limpieza del reactor columna a escala piloto se desarrolló un método de esterilización eficaz, rápido y sencillo. El cultivo prolongado en el tiempo de microalgas suele provocar el depósito estable de material biológico en las paredes. El ensuciamiento puede llegar a ser tan severo que vuelve totalmente opacas al paso de la luz las paredes del reactor. Cuando esto ocurre se debe parar el cultivo para proceder al lavado de la columna.

Se comprobó que en caso de ensuciamiento severo de las paredes, como el que puede apreciarse en la figura 4.4, el lavado con una disolución de hipoclorito de sodio al 1%, con agitación vigorosa en la columna burbujeando 5 l/min de aire durante una hora, se consigue retirar la capa de biomasa pegada a las paredes. Cuando se utiliza hipoclorito sódico es necesario su neutralización ya que retirar por lavado con agua los restos de hipoclorito es difícil y supondría llenar, mantener en agitación y vaciar varias veces la columna. La neutralización se realiza con HCl 1 N hasta pH 5. De este modo el hipoclorito pasa a cloro gas, que es desorbido durante el burbujeo. Tras burbujear 30 minutos después del neutralizado, la columna se vacía y se realiza un aclarado con agua destilada previamente esterilizada. El aclarado, con agitación por flujo de aire de 5 l/min dura otros 20-30 minutos.

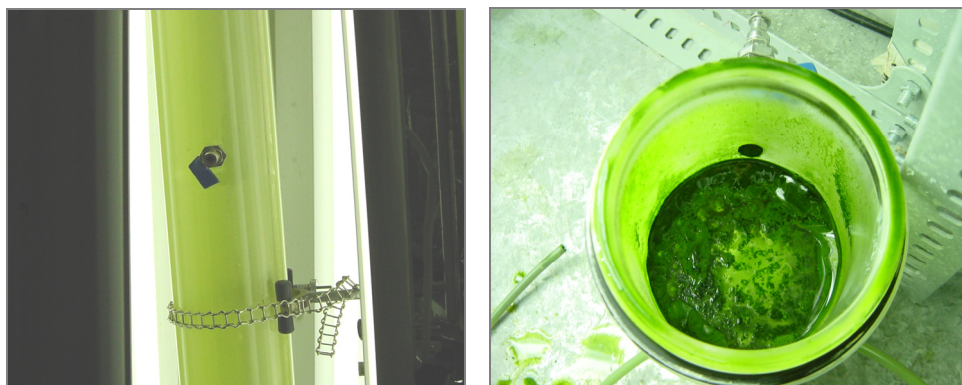


Figura 4.5. Ensuciamiento de las paredes (izquierda) y placa difusora (derecha) del reactor columna de burbujeo después de un cultivo en continuo sin interrupción de larga duración

Las conducciones y recipientes de cosecha y medio de cultivo necesarios para la operación de la columna en modo continuo son lavados y esterilizados a la vez que la columna, haciendo recircular las soluciones de lavado y aclarado por todos ellos.

Después del aclarado con agua destilada el reactor y elementos auxiliares están limpios y desinfectados, listos para la carga de medio de cultivo e inoculación. El proceso de limpieza se concluye en dos horas.

El mismo protocolo de limpieza puede llevarse a cabo cuando no haya biomasa pegada a las paredes pero se quiera desinfectar la columna, por ejemplo, para el comienzo de un nuevo cultivo o cambio de especie a cultivar. En este procedimiento de lavado no podemos decir que se consiga esterilización, ya que eso supone la ausencia total de microorganismos y que solo se consigue por el autoclavado. Cuando se utiliza hipoclorito sódico pueden existir bacterias resistentes a este producto, y por ello hablamos de desinfección, que significa reducción a un nivel bajo los microorganismos presentes. Ha de notarse que la desinfección con hipoclorito de sodio al 1% asegura la eliminación de cualquier tipo de microalga (Richmond, 2004).

Durante el periodo de cultivo es fundamental la existencia de un filtro biológico de venteo con tamaño de poro de 0,2 micras (Millex[®]-FG₅₀, Millipore) para el aire de

entrada a la columna, ya que se comprobó que este sencillo filtro evita la invasión del cultivo de *Synechocystis sp.* por rotíferos. La limpieza exhaustiva de todos los elementos que entraban en contacto con el cultivo, e incluso la desinfección de la cámara de cultivo no consiguieron evitar la invasión de rotíferos, pero si la instalación de este filtro a la entrada del aire de burbujeo.

Durante el cultivo, todos los materiales que entran en contacto con él, como sondas de medición o recipientes para la adicción de medio fresco son esterilizados con etanol.

4.4. Bibliografía

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, n° 3, pp. 350-356.

Miyairi, S., 1995. CO₂ assimilation in a thermophilic cyanobacterium. *Energy conversion and management*, 36, n° 6-9, pp. 763-766.

Mann, J.E. and Myers, J., 1968. On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Phycology*, 4, pp. 349–355.

Pouneva, I., 1997. Evaluation of algal culture viability and physiological state by fluorescent microscopic methods. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23 n° 1-2, pp.67-76.

Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK.

Stauber, J.L., Franklin, N.M., Adams, M.S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *Trends in Biotechnology*, 20, n° 4, pp. 141-143.

CAPITULO 5

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROALGAS AUTÓCTONAS PARA LA BIOFIJACIÓN DE CO₂

5.1. Introducción

Desde que comenzaron las investigaciones para la aplicación de microalgas como sumideros de CO₂ procedentes de gases de combustión, uno de los principales objetivos se centró en la búsqueda de especies adaptadas o que consiguieran adaptarse a las extremas condiciones que imponen dichos gases, bajo las cuales debían además, desarrollar altas tasas de crecimiento y productividad.

Los gases de combustión procedentes de la quema de carbón o fuel contienen del 10 al 15% de CO₂ y entre 100 y 300 ppm de NO_x y SO₂ (Lee et al., 2002). Las temperaturas de salida de estos gases son elevadas, rondando los 120° C. Un alga que tolere altas temperaturas y concentraciones de CO₂, se considera que es adecuada para reducir estas emisiones (Hanagata, 1992) y por ello las primeras investigaciones se centraron en la búsqueda de microalgas que cumpliesen dichas características. Los resultados de aquellos primeros estudios concluyen que diversas especies presentan una buena velocidad de crecimiento a concentraciones hasta del 15% de CO₂ (Hanagata et al., 1992, Kodama et al., 1993, Sung et al., 1999). En cuanto a la resistencia a altas temperaturas, los autores revelan que existen algunas microalgas capaces de crecer en condiciones termófilas (>42° C), como ciertas especies del género *Chlorella* (Sakai et al., 1995, Sung et al., 1999) y por ello son propuestas como adecuadas a la biofijación de CO₂.

Sin embargo, en la línea de investigación seguida en la presente tesis, la resistencia a altas temperaturas no debe ser un requisito a cumplir para la biofijación de CO₂, ya que enfriar los gases, por un lado, no resulta una operación muy costosa y por otro, los gases calientes ofrecen la ventaja de servir de aporte térmico a los reactores cuando las temperaturas ambientales sean bajas. En cuanto al problema de toxicidad adicional por sus contenidos en SO_x y NO_x, en la bibliografía puede encontrarse que muchas especies son capaces de soportar altas concentraciones de estos gases por separado (Yanagi, et al. 1995, Kurano et al., 1995) pero fallan en cuanto estos gases tóxicos se presentan a la vez (Yanagi et al. 1995, Kurano et al., 1995). Actualmente, la resistencia a altas concentraciones de SO_x y NO_x ya no cobra tanta importancia, puesto que los modernos sistemas de combustión están obligados a la instalación de equipos que reduzcan las

emisiones de dichos gases (DOCE-278, 2002, BOE-260, 2002, BOE-157, 2002). Por otro lado, las futuras centrales están siendo diseñadas para emitir CO₂ prácticamente puro, sin otro tipo de gases tóxicos ni diluyentes. Es por ello que la tendencia actual en la búsqueda y selección de una especie de microalga adecuada a la fijación de CO₂ debe centrarse fundamentalmente en la resistencia y alta productividad bajo la inyección de CO₂ puro.

De este modo el primer paso para establecer una línea de investigación para el desarrollo de un sistema de biofijación basado en microalgas, consiste en encontrar una o varias especies, que en este caso se requiere que sean autóctonas, que cumplan los objetivos de alta resistencia al CO₂ puro. En el presente estudio se ha propuesto un método a seguir, resumido en la figura 5.1, para encontrar especies que se ajusten a los objetivos propuestos. Este método consiste en recoger especies autóctonas, comprobar su resistencia a altas concentraciones de CO₂ y seleccionar de entre las especies que superen el primer criterio, aquella o aquellas capaces de fijar mayor cantidad de CO₂ en unas condiciones cercanas a sus óptimos de crecimiento.

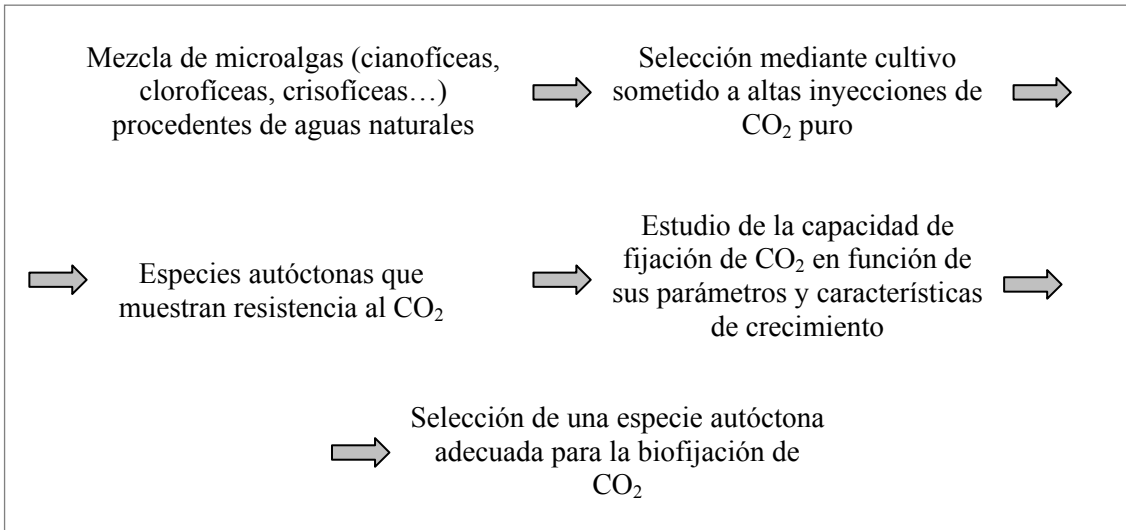


Figura 5.1. Fases propuestas para la búsqueda de una especie de microalga apta para sistemas de biofijación de CO₂.

Para las especies aisladas siguiendo el primer criterio, han de fijarse condiciones de cultivo adecuadas que permitan desarrollar un crecimiento cercano a su máximo, y así intuir la capacidad potencial de esa especie para la biofijación de CO₂. De forma general, las condiciones de crecimiento óptimas para las microalgas caen dentro de

ciertos rangos, como puede extraerse de la bibliografía, especialmente para el pH, temperatura y concentración de CO₂ en el aire. Así se observa que los pHs de crecimiento óptimos para las microalgas suelen estar por encima de 6,5 y normalmente entre 7 y 9 (*Chini-Zittelli, 1999, Degen, 2001, Sánchez, 2008*), salvo casos concretos de algunas especies que sobreviven solo en ambientes ácidos.

Por otro lado, en una instalación real de bio-fijación de CO₂ con microorganismos fotótrofos no sería necesario ni rentable trabajar con altas inyecciones de CO₂ que acidifiquen el medio y que requieran especies específicas de ambientes ácidos, sino que se operará en las condiciones que normalmente favorecen el crecimiento del microorganismo. Y aunque es cierto que ciertas especies experimentan sus crecimientos óptimos por encima del 5% como *Chlorella sp.* RK-1, al 10% (*Sung et al., 1999*) o *Chlorococcum littorale*, al 20% (*Kurano et al., 1995*), se ha comprobado que las microalgas desarrollan sus mayores tasas de crecimiento entre 1 y 5% de CO₂ y que concentraciones por encima del 5% afectan a su velocidad de crecimiento (*Nielsen, 1995, Myers, 1953*). En cuanto a las temperaturas de cultivo varias especies comunes de microalgas como *Scenedesmus* y *Chlorella* crecen mejor en el rango de 25 a 35° C, algunas mostrando sus óptimos incluso a 40° C (*Hanagata et al., 1992, Watanabe et al., 1992, Maeda et al., 1995, Chang y Yang, 2003, Yue y Chen, 2005*).

La capacidad de biofijación de CO₂ encontrada para las especies autóctonas debe ser contrastada con los que ofrecen otras especies de microalgas comúnmente referenciadas para este fin. Muchas de las especies que fueron estudiadas y que resultaron ser adecuadas para su cultivo con gases de combustión pertenecen al género *Chlorella* (*Yanagi et al., 1995, Maeda et al., 1995, Sakai et al., 1995, Sung et al., 1999, Lee et al., 2002, Jeong et al., 2003, Yue, 2005, Greque y Vieira, 2007*). Las chlorellas son microalgas de pequeño tamaño (2-10 µm), esféricas, que muestran velocidades máximas de crecimiento celular (µ) relativamente altas como 0,13 h⁻¹ para *Chlorella sp.* KR-1 (*Lee et al. 2002*) o 0,24 h⁻¹ para *Chlorella sorokiniana* (*Sakai et al., 1995*). Estos estudios concluyen que las productividades máximas desarrolladas por *Chlorella sp.* KR-1 fueron de 1,66 g de biomasa/l/d (reactores de 125 ml, iluminación de 450 µE/m²/s), y de 1,1 g de biomasa/l/d por *Chlorella sorokiniana* (reactor plano de 40 l, iluminación de 150 µE/m²/s). Estas productividades de biomasa equivalen a fijaciones

de CO₂ de 2,74 g/l/d y 1,81 g/l/d, calculado en base a un contenido medio de 45% de carbono en la biomasa.

El presente trabajo de investigación tiene por finalidad aislar una o varias especies de microalgas autóctonas (provincia de León), que cumplan los criterios aquí especificados para ser consideradas como candidatas a un sistema de fijación fotoautótrofa de CO₂. Estos criterios son una elevada resistencia a la inyección de CO₂ puro en su medio de cultivo y buena capacidad de biofijación de CO₂. Para valorar capacidad de las especies autóctonas como fijadoras de CO₂, éstas serán contrastadas frente a una especie de referencia en función su velocidad específica de crecimiento (μ), productividad de biomasa (P) y fijación de CO₂ (F). Como especie catalogada de referencia se ha escogido *Chlorella sorokiniana*. Todas ellas han sido cultivadas en modo discontinuo durante siete días y en condiciones que, de forma general, favorecen su crecimiento (Andersen, 2005).

5.2. Material y métodos

5.2.1 Recolección y obtención de especies de microalgas autóctonas

Las muestras de aguas fueron tomadas en diversos lugares de la provincia de León, como depuradoras de aguas residuales, depuradoras de purines, el punto de toma de agua de refrigeración de una central térmica, charcas naturales, fuentes, reactores anaerobios, etc, hasta un total de 20 muestras. Las muestras se trasladaron al laboratorio donde fueron cultivadas con medio *Mann&Myers* en matraces de 250 y 500 ml continuamente agitados sobre placa orbital (Fig. 4.2). Las condiciones de cultivo fueron: temperatura ambiente, luz artificial de intensidad de 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ y ciclo de iluminación de 12/12 horas luz/horas oscuridad. Las muestras se mantienen en cultivo hasta observarse proliferación de microalgas. Si no hay crecimiento en 15 días, la muestra es desechada.



Figura 5.2. Cultivo en el laboratorio de las muestras recogidas en ambientes naturales en medio Mamn&Myers y agitación orbital.

5.2.2. Resistencia al CO₂ y aislamiento.

Como método de selección de especies resistentes al CO₂, un inóculo compuesto por el mismo número de células de cada una de las muestras naturales que resultaron en crecimiento microalgal positivo, se cultivó en matraces cónicos de 1 litro, con un flujo continuo de 0,5 l/min/l de CO₂ puro de bombona (N48, Air Liquide, España) durante cinco días. El inóculo fue sometido a un proceso de adaptación previa con flujos crecientes de CO₂ 100%. El CO₂ se inyectó únicamente durante el periodo iluminado. Para contrastar el efecto del CO₂ sobre el crecimiento microalgal, el mismo cultivo fue realizado burbujeando 0,5 l/min/l de aire, que en realidad contiene una cantidad de CO₂ del 0,038% (IPCC, 2007). Ambos tratamientos se hicieron por duplicado. El gas de burbujeo sirve además de agitación del cultivo. Las condiciones de temperatura e iluminación fueron las mismas del apartado anterior.

Durante el cultivo se realizó un seguimiento diario del pH. El crecimiento microalgal fue evaluado por aumento en la densidad celular, determinada como conteo y siguiendo la metodología descrita en el capítulo 4. Todas estas medidas, se realizaron cuatro horas después de comenzar la fase luminosa.

Las especies que presentaron crecimiento a inyecciones de 0,5 l/min/l de CO₂ puro, fueron aisladas, siguiendo el método de aislamiento por arrastre sobre placa *Petri* (ver capítulo 4.2.2).

5.2.3 Selección de la especie con mayor potencial para la fijación de CO₂

Las especies que resistieron las condiciones extremas de inyección de CO₂ fueron cultivadas en condiciones adecuadas para su crecimiento con el propósito de estudiar y seleccionar una especie en función de su capacidad de fijación de CO₂. Esta capacidad será contrastada con la experimentada por la microalga de referencia *Chlorella sorokiniana*. Aunque las condiciones óptimas de esta especie son conocidas, para poder comparar resultados entre ésta y los aislados autóctonos, todas deberán cultivarse exactamente en las mismas condiciones de pH, temperatura, porcentaje de CO₂ en aire y operación del reactor.

Las especies autóctonas fueron las aisladas en nuestro laboratorio según especifica el apartado anterior. La microalga *Chlorella sorokiniana* ha sido cedida por el Departamento de Química y Ciencias de los Materiales, de la Universidad de Huelva (España).

Los inóculos de aislados y especie de referencia fueron adaptados previamente con burbujeo de aire conteniendo 5% CO₂ y en las mismas condiciones de temperatura e irradiancia, durante tres días. Todas las especies fueron cultivadas por triplicado en reactores tipo columna de burbujeo de 0,5 litros, mostrados en la figura 5.3, durante siete días en régimen discontinuo. Un esquema del montaje experimental puede observarse en la figura 5.4.



Figura 5.3. Bancada de reactores de 0,5 litros, tipo columna de burbujeo, para el cultivo de las diferentes especies estudiadas.

Los reactores fueron inoculados con inóculo de cada especie procedente de los cultivos previamente adaptados al 5% de CO₂, en fase exponencial de crecimiento y enrasados a 500 ml con medio de cultivo *Mann&Myers*. La concentración inicial para todos los cultivos se fijó en 0,01 g/l. La temperatura de la cámara de cultivo se ajustó a 25° C, de esta forma la temperatura en el interior de los reactores se mantiene a 25° C durante la fase no iluminada (*noche*) y alcanza los 30±1° C en la fase iluminada (*día*) debido al calor desprendido por las lámparas y al efecto invernadero en el interior de los reactores de vidrio. La iluminación fue provista por una bancada de 6 lámparas fluorescentes (*Phillips TLD 36W, Francia*), a intensidad media de 300 μE/m²/s sobre la pared de los reactores, en fotoperiodo de 8/16 horas. El aire burbujeado en cada columna fue de 0,4 l/min/l.

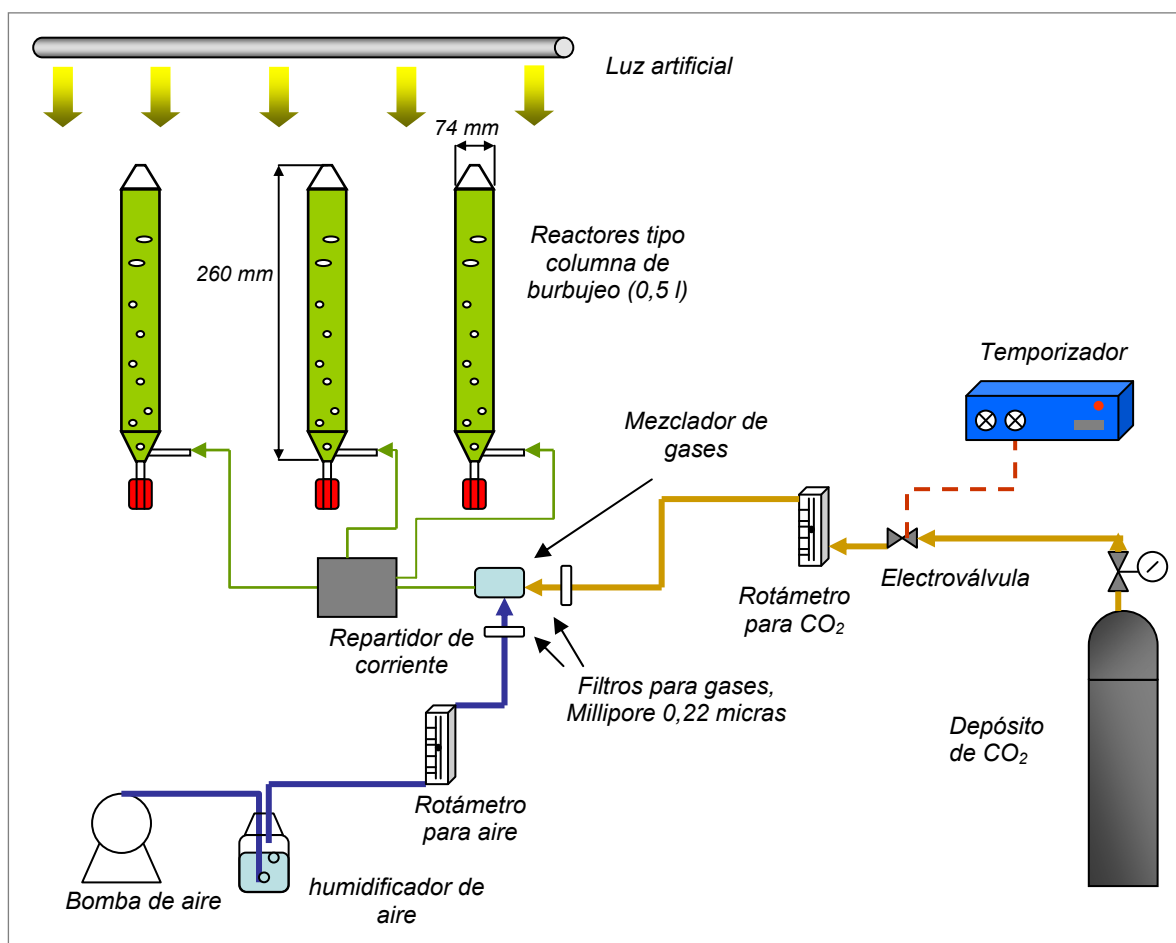


Figura 5.4. Montaje experimental a escala laboratorio en el que se llevó a cabo el presente estudio.

El pH inicial se fijó en 7. El aumento del pH debido a la fijación del CO₂ del medio por las microalgas fue controlado mediante la inyección automática de un flujo de CO₂ al 5% (vol CO₂/vol aire) a intervalos, regulando el paso de CO₂ con una electroválvula controlada por un temporizador. La frecuencia mínima de inyección de CO₂ fue 1 minuto de paso de gas cada 10 y la máxima, 1 minuto cada 3 minutos. La frecuencia de inyección fue reducida o incrementaba manualmente una vez al día según el pH, de forma que éste se mantuvo entre 7 y 8 a lo largo de todo el cultivo.

Los parámetros físicos pH y temperatura se midieron diariamente en el momento de la toma de muestra, cuatro horas después del encendido de lámparas. Para seguir la evolución de los cultivos de cada especie, se midió la densidad celular y la concentración de biomasa según se ha detallado en el capítulo anterior.

La caracterización de la biomasa de cada especie se realizó por análisis elemental (carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre), siguiendo las normas ASTM D-5373 y ASTM D-4239 (ASTM, 1995).

Parámetros cinéticos del crecimiento microbiano y fijación de CO₂.

Para comparar la velocidad de crecimiento y capacidad de fijación entre las especies estudiadas, se ha recurrido a los siguientes parámetros:

- *Velocidad específica de crecimiento* (μ_i en h⁻¹), entre días consecutivos de cultivo (del día *i-1* al día *i*), se calculó según la siguiente expresión (Andersen, 2005):

$$\mu = \frac{\text{Ln}(N_i) - \text{Ln}(N_{i-1})}{t_i - t_{i-1}} \quad (5.1)$$

donde, N_i es la densidad celular en cel/ml, en el instante de tiempo t_i , en horas o días, según se especifique.

La velocidad específica de crecimiento puede ser calculada también en función de la concentración de biomasa, sustituyendo los valores de densidad celular (N) por la concentración de biomasa (C_b) en el mismo instante de tiempo. La velocidad específica de crecimiento máxima, μ_{\max} es la mayor de las obtenidas en los siete días de cultivo.

- *Tiempo de generación* ($d_{t,i}$, horas). Es el tiempo necesario para la división de una célula. Se calcula a partir de la velocidad específica de crecimiento para el instante i , μ_i , según (Andersen, 2005):

$$d_{t,i} = \text{Ln}(2) / \mu_i \quad (5.2)$$

El tiempo de generación mínimo es el calculado a partir de la μ_{\max} .

- *Densidad celular acumulada* (en células/mililitro) Es el número de células por mililitro generadas durante el tiempo total de cultivo. Se calcula como la diferencia entre la densidad celular al final del cultivo y la del inicio del cultivo.
- *Biomasa acumulada* (en g/l). Es la cantidad de biomasa acumulada desde el inicio del cultivo, expresada en gramos de biomasa por litro.
- *Productividad diaria* (P_i , en g/l/d). Es la biomasa producida entre el día $i-1$ y el día i :

$$P_i = \frac{(Cb_i - Cb_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})} \quad (5.3)$$

donde, Cb_i es la concentración de biomasa para el día i . La productividad máxima (P_{max}) es la mayor de las obtenidas en los siete días de cultivo.

- *Fijación de CO₂* (F_i). La fijación de CO₂ se calculó a partir de la productividad de biomasa y el contenido en carbono de cada especie (% C), mediante la expresión (Kajiwara et al., 1996):

$$F_i = P_i \times \%C \times \frac{44}{12} \quad (5.4)$$

donde, F_i es la fijación de CO₂ para el día i y P_i la productividad obtenida para el día i , en cultivos discontinuos. La fijación de CO₂ máxima (F_{max}) es la calculada a partir de P_{max} .

Análisis estadístico.

Los resultados de los experimentos presentados en este capítulo han sido analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre los parámetros de cada especie fueron determinadas por el test de Tukey, a un nivel de significación del 95% ($p=0,05$).

5.3. Resultados y discusión.

5.3.1. *Recolección y obtención de especies de microalgas autóctonas*

Las muestras de aguas recogidas fueron cultivadas en el laboratorio, como se indicó anteriormente. Transcurrido un tiempo entre una a dos semanas, en la mayoría de los cultivos se detecta crecimiento microalgal y en el microscopio pueden apreciarse varios tipos de microalgas, siendo predominantes las clorofíceas. En total se observó crecimiento de microalgas en 16 muestras.

5.3.2 *Resistencia al CO₂ y aislamiento.*

La figura 5.5 muestra la evolución del crecimiento en función de la densidad celular y el pH del cultivo, para el inóculo compuesto por la mezcla de todas las especies encontradas, sometido a dos tratamientos diferentes: uno aporte continuo de 0,5 l/min/l CO₂ y el otro, sin aporte de CO₂ es decir, burbujear aire. Cada valor de densidad celular y pH es el promedio de las dos réplicas, mostrando la desviación estándar. El aumento de biomasa revela que existe crecimiento microalgal bajo la inyección de 0,5 l/min/l de CO₂ puro y que las células crecen mejor en estas condiciones que solo con aire.

El pH de ambos cultivos se ajustó inicialmente a 7. En el cultivo burbujear con 0,5 l/l/l al 100% de CO₂, el pH cae hasta valores en torno a 4,5 en las primeras 24 horas del cultivo, debido a la disolución del gas en el medio, y se mantiene prácticamente constante durante los siguientes días de cultivo. Esto significa que el aporte de CO₂ es muy superior al que es consumido por las células, por lo que la concentración de CO₂ disuelto es casi constante a lo largo del cultivo. En cambio, el pH aumenta en el cultivo sin aporte de CO₂, porque las microalgas están consumiendo el que se encuentra disuelto en su medio, modificando los equilibrios del ácido carbónico y haciendo que el pH aumente.

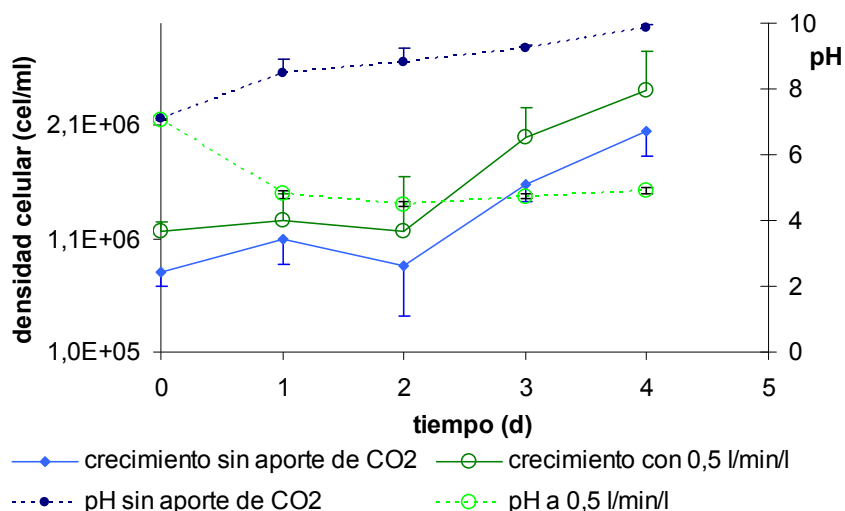


Figura 5.5. Curvas de crecimiento y pH para los cultivos con aporte externo de CO₂ (0,5 l/min/l, 100% CO₂) y sin aporte externo (CO₂ en el aire 0,038% CO₂).

Tras las pruebas de crecimiento con altas inyecciones de CO₂ puro, se observó que solamente unas pocas especies sobrevivieron a dichas condiciones. En el proceso de aislamiento se obtuvieron tres especies diferentes, siguiendo los criterios de discriminación: forma, tamaño y modo de agrupación. Los aislados fueron nombradas como *A521*, *A513* y *B525* y posteriormente identificados por la CCAP (*Culture collection of Algae and Protozoa, Reino Unido*) a nivel de género. El aislado *A521* fue clasificado como *Scenedesmus* sp., el *A513*, como *Chlorogonium* sp., el *B525* pertenece al género *Synechocystis*. El aspecto de cada una de las especies aisladas puede apreciarse en las fotografías tomadas al microscopio de la figura 5.6.

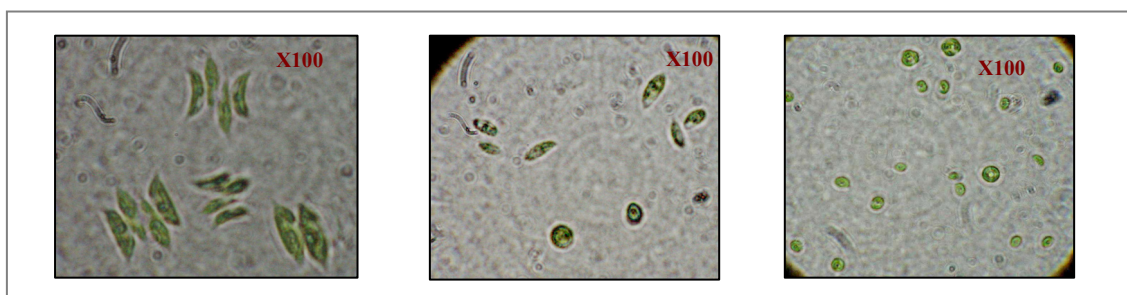


Figura 5.6. Fotografías tomadas al microscopio (x100) de las tres especies aisladas. De izquierda a derecha: *Scenedesmus* sp. (*A521*), *Chlorogonium* sp. (*A513*) y *Synechocystis* sp. (*B525*).

Las especies *Scenedesmus sp.* y *Chlorogonium sp.* son microalgas, microorganismos unicelulares eucariotas acuáticos y fotoautótrofos. El aislado *Synechocystis sp.* es una cianobacteria, también un microorganismo unicelular acuático y fotoautótrofo, pero procariota. Aunque genética y morfológicamente microalgas y cianobacterias son sensiblemente diferentes, poseen el mismo mecanismo fotosintético que les otorga la capacidad de transformar carbono inorgánico más energía luminosa en biomasa y por ello, ambas, cianobacterias y microalgas son adecuadas a nuestro objetivo.

5.3.3. Selección de la especie con mayor potencial para la fijación de CO₂

Las tres especies autóctonas *Synechocystis sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Chlorogonium sp.*, aisladas e identificadas en el apartado anterior y la microalga catalogada *Chlorella sorokiniana*, fueron cultivadas en condiciones, que en general, favorecen el crecimiento de microorganismos fotoautótrofos, determinándose diferentes parámetros a fin de caracterizar su capacidad de fijación de CO₂.

Las curvas de crecimiento de cada especie han sido expresadas en función de la densidad celular y de la concentración de biomasa, como puede verse en la figura 5.7. Cada punto de las curvas es el valor promedio de tres réplicas y las barras de error indican la desviación estándar entre réplicas. Los valores de densidad celular están a escala logarítmica para poder apreciar mejor la fase exponencial de crecimiento, que se extiende a lo largo del primer tramo lineal de mayor pendiente, comprobándose que todas las especies muestran una fase temprana de crecimiento exponencial, alargándose hasta el tercer día de cultivo, como se aprecia en la figura 5.7a. A continuación, el crecimiento es más lento porque el aumento de la densidad celular impide la penetración de la luz al interior del cultivo por el llamado *efecto de autoensombrecimiento*. Esta fase de crecimiento lento no debe considerarse como una fase estacionaria, puesto que no hay escasez de nutrientes y los cultivos están aumentando su población celular, sino como una fase de crecimiento exponencial lento por limitación de luz (Andersen, 2005).

La ausencia de fase *lag* o fase de latencia indica una buena adaptación previa a las condiciones del ensayo (Schimidell et al., 2001), especialmente a la inyección de CO₂ (Greque y Viera, 2007). Los resultados ponen de manifiesto que para las especies

estudiadas solamente son necesarios tres días de cultivo previo con 5% de CO₂ para adaptarse a dichas condiciones y no desarrollar fase de latencia

Las medidas de densidad celular muestran que la cianobacteria *Synechocystis sp.* es la que presenta las mayores densidades de celulares a lo largo de todo el cultivo, y la microalga *Scenedesmus sp.*, la que menos (Fig. 5.7a). Sin embargo, todas las especies alcanzan similares concentraciones de biomasa e incluso un poco mayores para *Scenedesmus sp.* (Fig. 5.7b). Esta aparente contradicción encuentra su explicación en el tamaño celular de cada especie. La observación de las especies al microscopio revelan que *Synechocystis sp.* tiene un tamaño en torno a 4-6 micras, sin embargo, una célula de *Scenedesmus* en tamaño adulto puede ser 3 y hasta 4 veces mayor que la cianobacteria. *Chlorella sorokiniana* y *Chlorogonium sp.* presentan tamaños intermedios entre éstos. Por ello, aunque haya muchas más células de *Synechocystis sp.* que de *Scenedesmus sp.*, la cantidad de biomasa es similar.

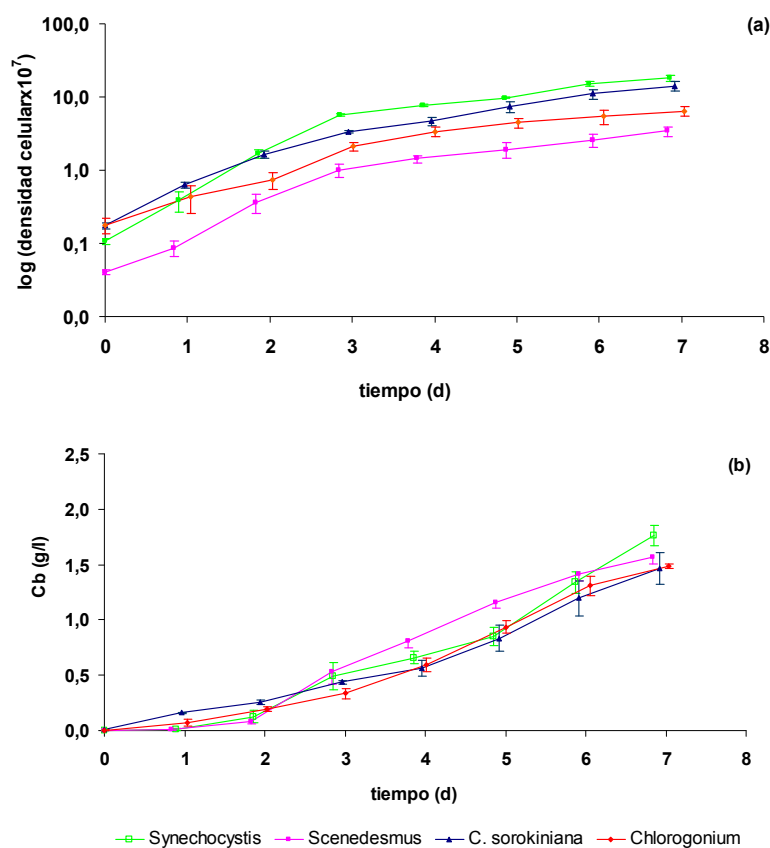


Figura 5.7. Curvas de crecimiento para las diferentes especies estudiadas, en función de la densidad celular (a) y de la concentración de biomasa (b). Cada punto representa los valores medios y la desviación estándar entre las tres réplicas.

Tabla 5.1. Velocidades específicas de crecimiento máximas (μ_{\max} , en horas^{-1} y días^{-1}) y tiempos de generación mínimos ($d_{t,\min}$ en horas) para cada especie estudiada.

Especie	día de cultivo	μ_{\max} (h^{-1})	μ_{\max} (d^{-1})	$d_{t,\min}$ (h)
<i>Synechocystis</i> sp.	2	0,073 a	1,75 a	9,5 a
<i>Scenedesmus</i> sp.	2	0,060 ab	1,44 ab	11,5 ab
<i>C. Sorokiniana</i>	1	0,052 ab	1,248 ab	13,3 ab
<i>Chlorogonium</i> sp.	3	0,045 b	1,08 b	15,4 b

La velocidad de crecimiento máxima para la cianobacteria *Synechocystis* sp., $0,073 \text{ h}^{-1}$ es estadísticamente diferente y mayor que las desarrolladas por las otras especies de microalgas. *Chlorogonium* sp. muestra la menor velocidad de crecimiento y no existen diferencias significativas en este parámetro entre *Scenedesmus* sp y *C. sorokiniana*. Sin embargo, a pesar de existir diferencias significativas, éstas no son muy acusadas, lo que indica que las cuatro especies tienen un comportamiento similar en las condiciones de cultivo impuestas en este ensayo, tendencia que ya se observaba en las curvas de crecimiento de la figura 5.7. El tiempo de generación mínimo varía entre las 9,5 h para *Synechocystis* sp., a las 15,4 h para *Chlorogonium* sp.

Synechocystis sp. fue la especie que mayor velocidad de crecimiento ha mostrado, con una velocidad específica de crecimiento máxima de $0,073 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo mínimo de generación de 9,5 h. Este resultado es incluso mejor que el mostrado por *Chlorella sorokiniana*: μ_{\max} $0,052 \text{ h}^{-1}$ y tiempo mínimo de generación 13,3 h. Para esta especie de referencia se esperaban mayores velocidades de crecimiento, ya que ha sido considerada como uno de los organismos fotoautótrofos más rápidos por mostrar velocidades de crecimiento específicas máximas de $0,24 \text{ h}^{-1}$, siendo capaces de duplicarse en menos de 3 horas (Sakai et al., 1995). Los valores publicados por Sakai et al. (1995) fueron obtenidos tras el estudio de sus condiciones óptimas de crecimiento (medio de cultivo MC, $500 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, pH no especificado, 20% CO_2 y $40 \text{ }^\circ\text{C}$). Sin embargo en las condiciones generales de nuestro estudio su μ_{\max} es solamente el 21% de su óptima. Esto significa que también la velocidad específica de crecimiento de la cianobacteria autóctona podría aumentarse estudiando sus condiciones óptimas de crecimiento. Cabe resaltar que, aún sin conocer sus condiciones óptimas, *Synechocystis* sp. tarda solamente

tres veces más en duplicarse que *Chlorella sorokiniana* en sus condiciones óptimas. Y si comparamos nuestra *Synechocystis* sp. con otras especies seleccionadas para su aplicación en la fijación de CO₂, ésta supera a las Chlorellas NTU H-15 y H-25 caracterizadas por Yang *et al* (2003), con $\mu_{\max}=0,013 \text{ h}^{-1}$ en sus mejores condiciones o la *Spirulina* sp. de Morais y Vieira (2007) que creció a una μ_{\max} de $0,014 \text{ h}^{-1}$.

Los parámetros acumulados y máximos obtenidos para cada especie durante el crecimiento en discontinuo están representados en la figura 5.8. La concentración de biomasa y densidad celular acumulada permiten comparar el comportamiento de cada especie de forma global y no según puntos máximos (Fig. 5.8, a y b). Según estos resultados, existen diferencias significativas en cuanto a la densidad celular pero no en la concentración de biomasa acumulada, es decir, al final del cultivo discontinuo todas las especies han generado similares cantidades de biomasa, pero *Synechocystis* y *Chlorella sorokiniana* han necesitado reproducirse más veces para generar la misma biomasa, dado su menor tamaño. Tampoco se han encontrado diferencias significativas en la producción máxima de biomasa (Fig. 5.8c), que está entre los 0,346 y 0,475 g de biomasa por litro y día. Una diferencia reseñable es el momento del cultivo en el que ocurren las máximas productividades: en el día 7 para *Synechocystis* sp., en el 6 para *Chlorogonium* sp. y *Chlorella sorokiniana*, y en el día 2 para *Scenedesmus* sp. Ésta última desarrolló su mayor productividad cuando aún la luz no era limitante.

Los resultados del análisis elemental de la biomasa celular han sido recogidos en la tabla 5.2. El porcentaje en carbono influye en la mayor o menor capacidad de fijación de CO₂ para cada especie.

La fijación de CO₂ máxima se ha calculado a partir de la productividad máxima de biomasa y el contenido en carbono para cada especie indicado en la tabla 5.2. El porcentaje de carbono en la biomasa celular ronda el 50% para todas las especies, siendo una característica que no va a ser determinante en la elección de la especie más adecuada para la fijación de CO₂. Y tal y como se puede apreciar en la figura 5.8d, no existen diferencias significativas entre los valores máximos de fijación de CO₂, que van de los 0,650 a 0,953 gramos de CO₂ fijado por litro de cultivo y día.

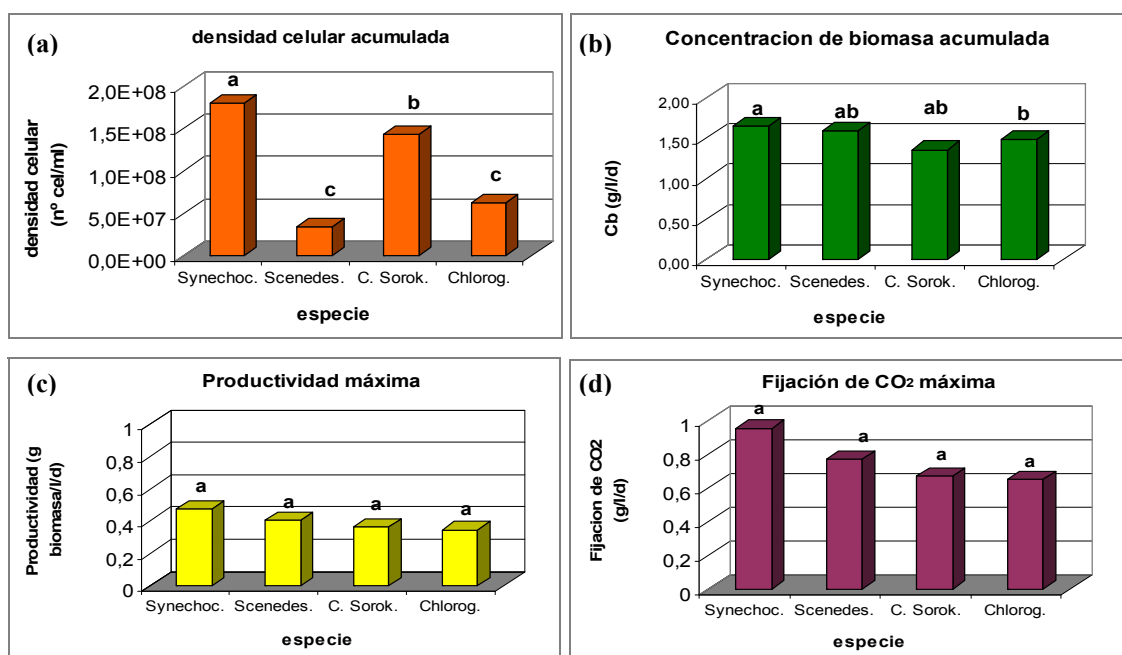


Figura 5.8. Densidades celulares (a) y concentraciones de biomasa (b) acumuladas en los 7 días de cultivo batch. Productividades (c) y fijaciones de CO₂ (d) máximas para cada especie estudiada. Letras diferentes en los mismos parámetros indican valores estadísticamente distintos a un nivel de significación del 95%.

La fijación de CO₂ máxima se ha calculado a partir de la productividad máxima de biomasa y el contenido en carbono para cada especie indicado en la tabla 5.2. El porcentaje de carbono en la biomasa celular ronda el 50% para todas las especies, siendo una característica que no va a ser determinante en la elección de la especie más adecuada para la fijación de CO₂. Y tal y como se puede apreciar en la figura 5.8d, no existen diferencias significativas entre los valores máximos de fijación de CO₂, que van de los 0,650 a 0,953 gramos de CO₂ fijado por litro de cultivo y día.

Tabla 5.2. Análisis elemental de la biomasa (% bs: porcentaje en base seca).

Especie	Carbono (% bs)	Hidrógeno (% bs)	Nitrógeno (% bs)	Azufre (% bs)
<i>Synechocystis</i> sp.	49,8	7,2	9,6	0,75
<i>Scenedesmus</i> sp.	50,7	7,7	8,7	0,61
<i>C. Sorokiniana</i>	50,2	7,5	9,9	0,78
<i>Chlorogonium</i> sp.	49,9	7,2	7,9	0,71

Synechocystis sp. muestra claramente el mejor resultado en cuanto a densidad celular acumulada en los siete días de cultivo batch, en base a su mayor velocidad de

crecimiento. Sin embargo, sus parámetros de concentración de biomasa acumulada, de productividad máxima y de fijación de CO₂ máxima no son mejores que los de las otras especies, ya que sus células, de menor tamaño, acumulan menor cantidad de biomasa que las células de *Scenedesmus sp.*, por ejemplo. Por tanto, según los resultados de este estudio, aunque *Synechocystis sp.* presente mayores velocidades de crecimiento, no fija más dióxido de carbono que *Scenedesmus sp.*, *Chlorogonium sp.* o *Chlorella sorokiniana* y cualquiera de ellas puede ser adecuada para su utilización en sistemas de bio-fijación de CO₂ fotosintética.

El resultado del estudio de los parámetros de crecimiento y fijación de dióxido de carbono no parece haber sido concluyente para selección de la especie más adecuada a nuestro objetivo y deben buscarse otras características de tipo práctico para determinar la selección. Para empezar, el tamaño celular de *Scenedesmus sp.* y *Chlorogonium sp.* es similar (en torno a 5-10 micras) y su flotabilidad en reposo se ha observado que es menor que para la cianobacteria *Synechocystis sp.*, y que ésta presenta alta resistencia a la sedimentación. Esto significa que *Synechocystis sp.* necesita menor gasto de energía de agitación para mantener las células en suspensión homogénea, facilitando el acceso de la luz y nutrientes a las mismas. Por otro lado, *Synechocystis sp.* mostró su mayor valor de fijación de CO₂, 0,953 g CO₂/l/d en el día 7 de cultivo, cuando menor era la disponibilidad de luz, mientras que para el resto de especies la fijación en ese día se redujo bastante respecto a su máximo: un 26% menor para *Chlorella sorokiniana.*, un 49% para *Chlorogonium sp.* y un 63% menor para *Scenedesmus sp.*

Esto indica que *Synechocystis sp.* es capaz de aprovechar mejor la luz cuando ésta es limitante, y la razón podría estar relacionada con su forma esférica y pequeño tamaño, que aportan una mayor superficie de recepción de luz para una misma concentración de biomasa (*Spektorova, et al., 1986*). Así mismo, su menor tamaño parece facilitar una mayor penetración de luz al interior del cultivo cuando la densidad celular es alta. En cambio, las células de mayor tamaño suponen un mayor obstáculo al paso de la luz, como ilustra la figura 5.9, y los cultivos presentan foto-limitación a menores concentraciones, disminuyendo su productividad y capacidad de fijación de CO₂ a altas densidades celulares, tal como reflejan los resultados aquí obtenidos.

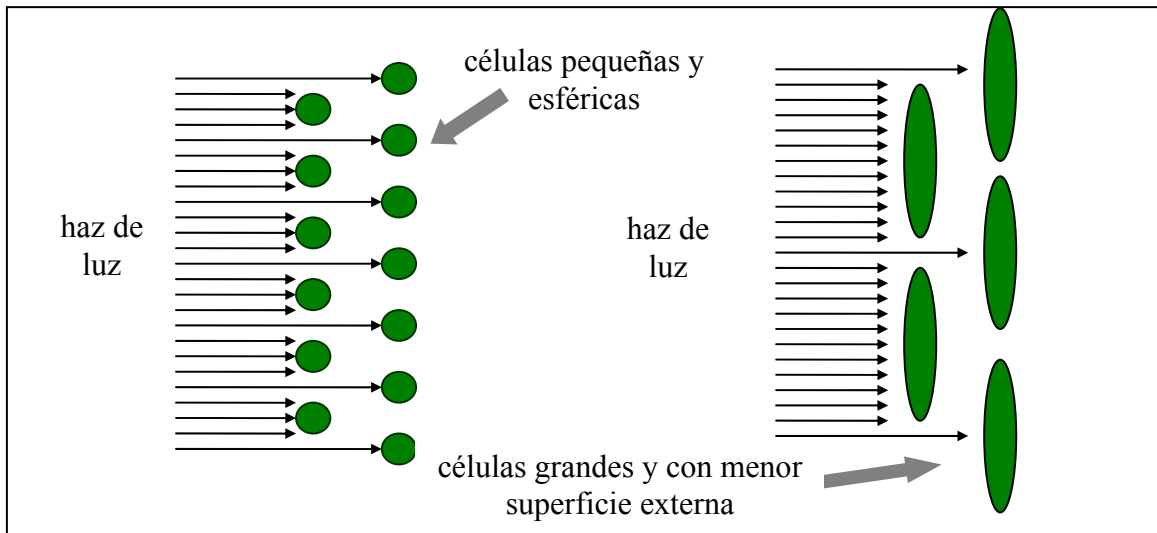


Figura 5.9. Efecto del tamaño y forma celular sobre la distribución de luz en cultivo con alta densidad celular o concentración de biomasa.

La importancia de trabajar con cultivos densos radica en dos motivos. El primero es que, si los sistemas de cultivo son fotobioreactores, normalmente se necesitan concentraciones por encima de 1 g/l (Ugwu *et al.*, 2005, García-Malea *et al.*, 2006, Chisti, 2008, Sánchez *et al.*, 2008) o en torno a 0,5 g/l en sistemas de estanques con circulación (Chisti, 2008) para obtener buenas productividades y facilitar el cosechado de la biomasa (Chisti, 2007.). El segundo es que, en cultivos exteriores sometidos a las altas intensidades de luz de medio día, que fácilmente pueden superar los 2000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, una densidad elevada reduce la penetración de altas intensidades de luz al interior del cultivo, evitando o amortiguando el efecto de fotoinhibición y la consiguiente desactivación del fotosistema II (Richmond, 2004). Por tanto, entre *Synechocystis sp.* y *Scenedesmus sp.*, que mostraron similares parámetros máximos de crecimiento y fijación de CO_2 , la primera es potencialmente más adecuada para ser utilizada en sistemas destinados a la biofijación, por presentar sus máximas productividades a densidades altas.

5.4. Conclusiones

Durante este estudio, se han encontrado, aislado e identificado tres especies de microalgas autóctonas que presentan alta resistencia a la inyección de CO₂ puro en el medio de cultivo, característica que las convierten en especies potencialmente adecuadas para la biofijación de CO₂. Tras estudiar sus parámetros de crecimiento y capacidad de fijación de CO₂ y compararlos entre sí y con los obtenidos para *Chlorella sorokiniana*, especie de referencia, se concluye que *Synechocystis sp.* es el aislado autóctono que mayor velocidad específica de crecimiento presenta y que su μ_{\max} de 0,073 h⁻¹ supera a algunas de las microalgas referenciadas para la biofijación de CO₂. En cuanto a la máxima cantidad de CO₂ fijada en un día, no se encontraron diferencias significativas entre las especies, obteniéndose valores que oscilan entre los 0,650 a los 0,953 g de dióxido de carbono por litro y día.

Los parámetros de comparación definidos no han sido determinantes para la selección de una de las especies autóctonas, sin embargo *Synechocystis sp.* ha mostrado una característica que la propone como más adecuada para sistemas de cultivo másicos:, que es su mayor capacidad de aprovechar la luz en cultivos de alta densidad.

5.5. Bibliografía

- Ación-Fernández, F.G., Hall, D.O., Cañizares-Gerrero, E., Krishna-Rao, K., Molina-Grima, E., 2003. Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biothecnology*, 103, pp. 137-152.
- Andersen R. A., 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Elsevier Inc. Burlington, MA, EEUU.
- ASTM, 1995. Active standard D-4239. Test methods for sulphur in the analysis sample of coal and coke using high temperature tube furnace combustion methods.
- ASTM, 1995. Active standard D-5373. Test method for instrumental determination of carbon, hydrogen and nitrogen in laboratory samples of coal and coke.

- BOE-260, 2002. Real Decreto 1073/2002, de 18 de octubre, sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente en relación con el dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, óxidos de nitrógeno, partículas, plomo, benceno y monóxido de carbono. (BOE nº 260, de 30.10.02).
- BOE-157, 2002. Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación (BOE núm. 157, de 2 de julio de 2002).
- Chang, E.-H., and Yang, S.-S. 2003. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, pp. 43-52.
- Chini Zittelli, G., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfo, L., Vincenzini, M., Tredici, M.R., 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Progress in Industrial Microbiology*, 35, pp. 299-312.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25, pp. 294-306.
- Chisti, Y., 2008. Production of microalgae for energy - an introduction. Jornada técnica internacional "Producción y uso de las microalgas con fines energéticos". Madrid, noviembre de 2008.
- Degen, J. Uebele, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U., Trösch, W., 2001. A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*, 19, pp. 89-94.
- DOCE-278, 2002. Decisión 2001/744/CE de la Comisión, de 17 de octubre de 2001, por la que se modifica el anexo V de la Directiva 1999/30/CE del Consejo relativa a los valores límite de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en el aire ambiente (DOCE nº L 278, de 23.10.01).
- García-Malea, M.C., Acién, F.G., Fernández, J.M., Cerón, M.C., Molina, E., 2006. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, pp. 981-989.
- Greque, M. y Vieira, J.A., 2007. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biological fixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, 48, 2169-2173.
- Hanagata, N., Takeuchi, T., Fukuju, Y., Barnes, D. J., Karube, I., 1992. Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature. *Phytochemistry*, 31 (10) pp.3345-3348.

- Jeong, M.L, Gillis, J.M., Hwang, J.-Y., 2003. Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis. *Bulletin of Corean Chemical Society*, 24, n° 12, pp. 173-176.
- Kajiwara, S., Yamada, H., Ohkuni, N., Ohtaguchi, K., 1996. Design of the biorreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Conversion Managenet*, 38, S529-S532.
- Kurano, N., Ikemoto, H., Miyashita, H., Hasegawa, T., Hata, H., Miyachi, S., 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy conversion and Management*, 6-9, pp. 689-692.
- Lee, J.-S., Kim, D.-K, Lee, J.-P., Park, S.-C., Koh, J.-H., Cho, H.-S., Kim, S.W., 2002. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. *Bioresource Technology*, 82, pp. 1-4.
- Maeda, K., Owada, M., Kimura, N., Omata, K., Karube, I. 1995. CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management*, 36, n° 6-9, pp. 717-720.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., Karube, I., 2000. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 263-267.
- Morita , M., Watanabe, Y., Saiki, H., 2002. Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditions. *Biothecnology and Bioengineering* , 77, n° 2, pp. 155-162.
- Myers, J., 1953. Growth characteristis of microalgae in relation to the problems of mass culture. *Algal culture*, pp 37-54. Carnegie Institution of Washington, Washington DC.
- Nielsen, S., 1995. Carbon dioxide as carbon source and narcotic in photosynthesis and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Physisologia Plantarum*, 8, pp. 317-335.
- Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK.
- Sakai, N., Sakamoto, Y., Kishimoto, N., Chihara, M., and Karube, 1995. Chlorella strains from hot springs to high temperature and high CO₂. *Energy Conversion and Management*, 36 n° 6-9, pp 693-696.
- Sánchez, J.F, Fernández, J.M, Ación, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra J., Molina, E., 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43, pp. 398-405.

- Schimidell, W., Lima, A.U., Aquarone, E., Borzani, W., 2001. Industrial Biotechnology, vol. 2. Edgar Blütcher LDTA. Sao Paulo, Brasil.
- Spektorova, L.V., Goronkova, O.I., Nosova, L.P., Albitskaya, O.N., Danilova, G.Y., 1986. High density culture of marine microalgae-promising items for mariculture. III. Mass culture of *Monochrysis lathery* droop. *Aquaculture*, 55, pp. 231-240.
- Sung, K.D., Lee, J.-S., Shin, C.-S., Park, S.-C., Choi, M.-J., 1999. CO₂ fixation by *Chlorella* KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresource Technology*, 68, pp. 269-273.
- Ugwu, C.U., Ogbona, J.C., Tanaka, H., 2005. Characterization of light utilization and biomass yields of *Chlorella sorokiniana* in inclined tubular photobioreactors equipped with static mixers. *Process Biochemistry*, 40, pp. 3406-3411.
- Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H. 1992. Isolation and determination of cultural characteristics of microalgae which functions under CO₂ enriched atmosphere. *Energy Conversion and Management*, 33, nº 5-8, pp. 545-552.
- Wright, D.H., Folsome, C.E., Obenhuber, D., 1985. Competition and efficiency in closed freshwater algal systems: tests of ecosystem design principles. *Biosystems*, 17, 233-239.
- Yanagi, M., Watanabe, Y., Saiki, H., 1995. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. *Energy Conversion and Management*, 36, nº 6-9, pp713-716.
- Yue, L., Chen, W., 2005. Isolation and determination of cultural characteristics of a newly CO₂ tolerant fresh water microalgae. *Energy Conversion and Management*, 46, pp.1868-1876.

CAPITULO 6

RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. A LA INTENSIDAD DE LUZ

6.1. Introducción

La velocidad de crecimiento de un organismo fotosintético, depende fundamentalmente de la cantidad de luz que le llega (*ver apartado 2.2.1*), que es el sustrato cuya aportación a un cultivo es más complicada. En cambio, conseguir que un cultivo no esté limitado por nutrientes es cuestión únicamente de disolver sales en exceso en el medio de cultivo. En cuanto al CO₂, éste no será limitante si se inyecta automáticamente al aumentar el pH. En cultivos fotoautotrófos de microalgas con aporte en exceso de nutrientes minerales y un suministro controlado de la demanda de CO₂, la luz es el principal factor que limita el crecimiento.

El aporte de luz al cultivo debe ser constante, porque no hay modo de almacenarla. En cultivos poco densos, puede considerarse que la distribución de luz es homogénea y alcanza por igual a todas las células. Sin embargo, a medida que aumenta la densidad celular (por ejemplo, en cultivos discontinuos), las células comienzan a hacerse sombra unas a otras, es lo que se conoce como efecto de *autoensombrecimiento*. Entonces la energía lumínica no llega a todas por igual y empieza a ser limitante. En este caso, la disponibilidad de luz puede mejorarse, hasta cierto límite, variando la profundidad de penetración de la luz en el cultivo o longitud del paso de luz, el grado de agitación, la densidad celular y la irradiancia incidente (*Molina-Grima et al., 1996*).

Debido al acentuado gradiente de luz existente desde la parte externa del cultivo al interior, las células están sometidas a cambios continuos en la intensidad que reciben, siendo estos cambios más o menos rápidos en función del grado de mezcla. En este caso es difícil definir la actividad fotosintética en función de la intensidad de luz, ya que ésta no es constante, sino que varía según el gradiente de intensidad existente y de la velocidad con la que las células se mueven de un extremo a otro, es decir, las células están sometidas a un determinado “régimen de luz” (*Richmond, 1986*). Parece ser que la actividad fotosintética, y por consiguiente, la velocidad de crecimiento, dependen de la intensidad de la luz incidente y el régimen de luz establecido en el cultivo (*Molina-Grima et al, 1999, Janssen et al., 2002*).

De este modo, aparece la necesidad definir una intensidad de luz promedio, I_{av} , calculada, tal como indica *Molina-Grima et al. (1996)*, a partir de las intensidades locales que inciden en cada elemento de volumen en los que se divide el volumen total del cultivo. En un cultivo bien agitado, I_{av} es la intensidad de luz disponible para cada célula moviéndose aleatoriamente en un cultivo denso, donde existe una distribución de luz heterogénea causada por el efecto de autoensombrecimiento (*Acién-Fernández et al, 1998*). Sin embargo esta definición solo tiene en cuenta la longitud de las zonas iluminada y oscura, pero no la frecuencia con la que la célula pasa de una a otra (*light/dark cycle*). Esta frecuencia depende del grado de agitación y del tipo de circulación establecida en un determinado reactor.

Pero si lo que se pretende es conocer I_{av} en el interior de un cultivo en función de la irradiancia incidente sobre su superficie y la densidad celular, a un grado de agitación constante, podemos dejar de lado el comportamiento dinámico de las células y entonces la definición dada por *Molina-Grima et al., (1996)* es adecuada para estudiar la velocidad de crecimiento en función de I_{av} . Por tanto, ya que I_{av} definirá la intensidad de luz incidente sobre las células, la respuesta fotosintética del cultivo y la velocidad de crecimiento observada, dependerán de ella. El estudio y optimización del parámetro I_{av} para cada caso particular (tipo de especie, irradiancia, tipo de fotobiorreactor) es fundamental en la optimización de la productividad.

La curva de respuesta fotosintética frente a la intensidad de luz incidente, comentada en el *apartado 2.2.1*, muestra cómo para cada organismo fotosintético existe un nivel de irradiancia en el que la respuesta es máxima y a partir del cual, comienza a disminuir. La curva refleja el comportamiento de cultivos de baja densidad, donde puede asumirse que la luz irradiada sobre la superficie es la misma que la que llega a la célula. En el caso de cultivos densos la luz incidente va a ser atenuada, pero para una misma concentración celular, a mayor irradiación sobre la superficie, mayor intensidad en el interior del cultivo. Por ello, para buscar la intensidad de luz promedio en el interior del cultivo (I_{av}) que maximiza la respuesta fotosintética de un microorganismo autótrofo, habrá que irradiarlo en un rango amplio de intensidades y observar su respuesta, ya sea como actividad fotosintética, velocidad de crecimiento o productividad. Según bibliografía, las máximas velocidades fotosintéticas para microalgas verdes

(clorofíceas) aparecen en un rango muy amplio de intensidades I_{av} que van desde 345 a 1125 $\mu E/m^2/s$ (Benson y Rusch, 2006).

El objetivo del presente capítulo consiste en estudiar cómo influye la intensidad de luz accesible a células de *Synechocystis sp.*, I_{av} , sobre su velocidad de crecimiento, al irradiar los cultivos con diferentes intensidades de luz exteriores llegando a intensidades próximas a las máximas solares que comúnmente se alcanzan a medio día. Además se buscarán los modelos matemáticos que mejor expliquen el comportamiento fotosintético de esta especie en función de la intensidad de luz sobre la pared del cultivo (I_{ext}) y la disponible para las células (I_{av}). La modelización de la respuesta fotosintética en función de variables de operación puede ser una herramienta útil para estimar la productividad y viabilidad de los procesos.

6.2. Modelos de velocidad de crecimiento en función de la intensidad promedio (I_{av}) y concentración de biomasa (C_b).

La luz que recibe cada célula se va atenuando desde el exterior hacia el interior del cultivo, tal como explica la ley de Lambert-Beer para luz monocromática:

$$I(\lambda) = I_0 \cdot e^{[-K_a(\lambda) \cdot p \cdot C_b]} \quad (6.1)$$

Donde,

$I(\lambda)$	intensidad de luz a la longitud de onda, λ , en el interior del cultivo, $\mu E/m^2/s$
C_b	concentración de biomasa en el cultivo, kg/m^3
I	intensidad en el interior del cultivo atenuada a una profundidad p , $\mu E/m^2/s$
P	profundidad donde se mide la atenuación, m
I_0	intensidad de luz a la misma distancia p cuando $C_b=0$, $\mu E/m^2/s$
K_a	coeficiente de extinción, kg/m^2
λ	longitud de onda de la luz monocromática, nm

Asumiendo luz monocromática, la constante K_a , se determina por ajuste lineal de los valores experimentales de atenuación (A_t) a diferentes concentraciones de biomasa:

$$A_t = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = K_a \cdot p \cdot C_b \quad (6.2)$$

Y conocida K_a , ya se puede determinar la intensidad promedio de luz en el interior de un cultivo, I_{av} , a una determinada profundidad p desde la superficie del reactor y a una concentración de biomasa determinada (*Molina-Grima, et al., 1994*):

$$I_{av} = \frac{I_0}{K_a \cdot p \cdot C_b} \cdot [1 - \exp(-K_a \cdot p \cdot C_b)] \quad (6.3)$$

Donde, I_{av} intensidad de luz promedio accesible para una célula, $\mu E/m^2/s$

El resto de los parámetros, según definición previa.

Sin embargo la ley de Lambert-Beer solo permite calcular la atenuación asumiendo las condiciones siguientes: (1) luz es monocromática, (2) la dirección de la luz no cambia al atravesar el cultivo y (3) que el efecto de dispersión de luz por partículas es despreciable frente la absorción (*Acién-Fernández et al., 1997*). Sin embargo, en un cultivo de microalgas no pueden ser asumidas estas premisas, primero porque la luz no es monocromática, pero principalmente porque no puede despreciarse el efecto de dispersión de luz, ya que ésta se propagará en todas las direcciones cada vez que incida en una célula. A mayor densidad celular, mayor efecto de dispersión. Por ello, la ley de Lambert-Beer, que predice bien la intensidad atenuada en cultivos poco densos ($C_b < 0,2 \text{ g/l}$) (*Acién-Fernández et al., 1997*), no es adecuada para calcular la atenuación en cultivos densos (*Pruvost et al., 2002, Jeon et al., 2005*). Diversos autores han propuesto modelos basados en comportamientos físicos de la luz, que intentan adecuar la ley de Lambert-Beer a la realidad y superar estas dos restricciones. Sin embargo la utilización de estos modelos implica cálculos largos y tediosos. Por ello la solución propuesta por *Acién-Fernández et al., (1997)* es la más sencilla, ya que no intenta explicar los fenómenos físicos que acontecen en la atenuación de luz, sino aproximar los valores experimentales, mediante una relación sencilla, donde la atenuación (A_t) depende de la concentración de biomasa (C_b) y una constante (K_{at}):

$$At = \ln(I_0 / I) = \frac{At_{\max} \cdot Cb}{K_{at} + Cb} \quad (6.4)$$

Donde,

At	atenuación de luz, sin unidades
At _{max}	atenuación máxima posible (cuando Cb es máxima), sin unidades
K _{at}	constante de atenuación, kg/m ³
Cb	concentración de biomasa, kg/m ³
I	intensidad de luz en el interior del cultivo a p=0, μE/m ² /s
I ₀	intensidad de luz en el interior del cultivo a p=0 cuando Cb=0, μE/m ² /s

La posición p=0, es el punto donde confluyen todos los haces de luz incidente. La ecuación describe un comportamiento hiperbólico de la atenuación respecto a Cb, frente al comportamiento lineal de la ley de Lambert-Beer. La constante K_{at} se calcula por ajuste de los valores experimentales de atenuación a la ecuación 6.4. Los valores de At_{max} y K_{at} que da el ajuste, permiten calcular un nuevo coeficiente de extinción ficticio, K_a' :

$$K_a' = \frac{1}{p} \cdot \frac{At_{\max}}{K_{at} + Cb} \quad (6.5)$$

Donde, K_a' coeficiente de extinción ficticio, kg/m²

El resto de los parámetros, han sido definidos previamente.

El uso del coeficiente de extinción ficticio K_a' para calcular intensidades locales (ec. 6.1) en el centro de un reactor cilíndrico reproduce mejor los valores experimentales que la constante K_a (Acién-Fernández et al., 1997).

Desde las teorías cinéticas publicadas por Michaelis y Menten en 1913, muchos son los modelos desarrollados que predicen la velocidad específica de crecimiento (μ) en función de la intensidad interior promedio (I_{av}) (Tamiya et al, 1953, Molina-Grima, et al., 1994, Jeon et al., 2005), algunos incluso válidos en los casos en los que existe

fotoinhibición (*Molina-Grima et al, 1996, Muller-Feuga, 1999, Bensony Rusch, 2006, García-Malea et al., 2006*). Entre éstos últimos se han seleccionado dos, que a pesar de describir ambos modelos la fotoinhibición, predicen comportamientos diferentes a altas intensidades. El primer modelo descrito en la ecuación 6.6 (*García-Malea, et al., 2006*), muestra una relación hiperbólica de la velocidad de crecimiento (μ), respecto a I_{av} , de forma que la respuesta aumenta con I_{av} hasta un cierto valor donde se hace máxima y ya no varía con I_{av} mayores:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot I_{av}^{(a+b \cdot I_0)}}{(c+d)^{(a+b \cdot I_0)} + I_{av}^{(a+b \cdot I_0)}} \quad (6.6)$$

Donde μ_{\max} , en s^{-1} , es la velocidad específica de crecimiento máxima característica de cada microorganismo y las constantes a, b, c y d son parámetros de ajuste no lineal, que modulan la variación de la velocidad de crecimiento con I_{av} y el efecto de fotoinhibición, que se considera función de la intensidad incidente (tanto en magnitud como en forma).

El segundo modelo, propuesto por *Muller-Feuga, (1999)*, en cambio, reproduce un valor máximo de la respuesta a una determinada I_{av} (ec. 6.7). A esa intensidad de luz se considera que el fotosistema ha alcanzado su punto de saturación y está recibiendo toda la energía lumínica que puede procesar. Si la I_{av} aumenta por encima del punto de saturación, el fotosistema colapsa por exceso de luz y la velocidad de crecimiento disminuye.

$$\mu = \frac{2 \cdot \mu_s \cdot \left(1 - \frac{I_e}{I_s}\right) \cdot \left(\frac{I_{av}}{I_s} - \frac{I_e}{I_s}\right)}{\left(1 - \frac{I_e}{I_s}\right)^2 \cdot \left(\frac{I_{av}}{I_s} - \frac{I_e}{I_s}\right)^2} \quad (6.7)$$

Donde,

- I_e intensidad de luz de compensación de energía, por debajo de este valor, la célula pierde peso; $\mu E/m^2/s$
- I_s intensidad de saturación, $\mu E/m^2/s$
- μ_s velocidad de crecimiento específica en el punto de saturación, s^{-1}
- I_{av} intensidad promedio en el interior del cultivo, $\mu E/m^2/s$

6.3. Material y métodos

6.3.1. Preparación del inóculo

El inóculo de la cianobacteria *Synechocystis sp.* procede de cultivos conservados en el laboratorio como describe el capítulo 4. El medio de cultivo utilizado en este estudio es Mann&Myers.

6.3.2 Montaje y metodología experimental

Los cultivos de *Synechocystis sp.* a diferentes intensidades de luz se llevaron a cabo en columnas de burbujeo, de vidrio (80 mm de diámetro, 400 mm de altura) de 1 litro, en régimen discontinuo durante 7 días. La figura 6.1 muestra el esquema del montaje experimental y los elementos auxiliares necesarios para el burbujeo constante de aire, control de pH y aporte controlado de CO₂. El burbujeo de aire fue de 0,4 l/min por litro de cultivo. La inyección de CO₂ y la regulación de pH fueron controladas por un sistema tipo PID, de forma que al detectarse un aumento del valor de consigna del pH, se abre la válvula que inyecta CO₂ en la corriente de aire hasta que el pH vuelve su valor de consigna. La concentración de CO₂ en aire se fijó en un 10%. Los reactores fueron iluminados con lámparas fluorescentes de 33 W (2150 lúmenes), montadas verticalmente sobre un reflector semicilíndrico (unidad de iluminación). Las diferentes intensidades sobre la pared del reactor se consiguieron variando la distancia y número de unidades de iluminación, alcanzándose así intensidades sobre las paredes del reactor, I_{ext} , de de 400, 800, 1200, 1600, 2000 y 2400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, medidas como se indica en el capítulo 4.

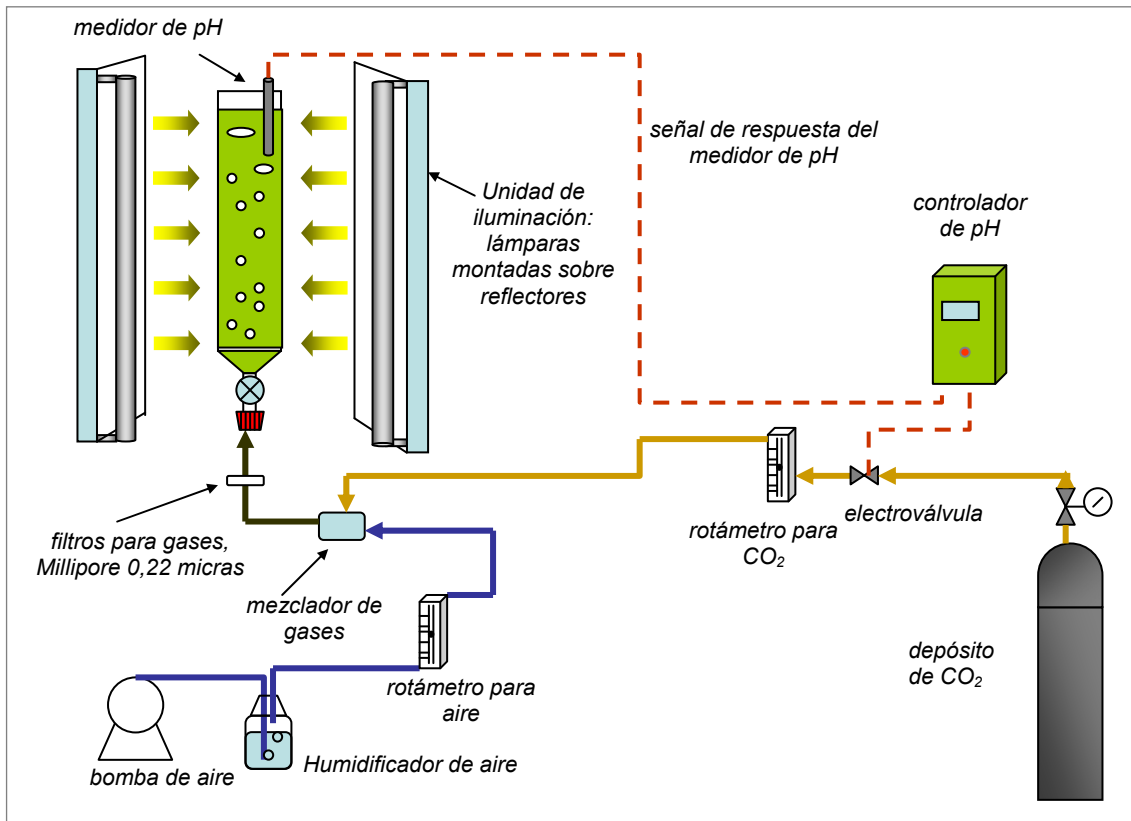


Figura 6.1. Diagrama esquemático del montaje experimental para el estudio de la influencia de diferentes intensidades de luz irradiadas sobre la superficie del reactor columna en el crecimiento de *Synechocystis sp.*

Los cultivos se iluminaron con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. El dispositivo experimental se instaló en el interior de una cámara termostatzada a 22° C, si bien la temperatura de los cultivos varía entre 27 y 32° C, dependiendo de la luz irradiada, debido al calor aportado por las lámparas. Durante las horas de oscuridad, la temperatura se iguala a la seleccionada para la cámara (22° C). El pH se mantuvo a 8 durante todo el cultivo, bajando ligeramente (7,8-7,9) en los periodos no iluminados. Diariamente y a la misma hora, se recogen 50 ml de muestra homogénea y se mide la irradiancia en el interior del cultivo, I_{int} , (ver capítulo 4). La medida se toma en el centro del reactor, que es el punto donde confluyen los haces de luz procedentes de las lámparas que rodean al reactor. La intensidad I_0 en el punto central del reactor se midió antes de inocular cada cultivo.

6.3.3. Métodos analíticos.

Diariamente se midió la densidad celular, peso seco y TOC, siguiendo los métodos indicados en Material y Métodos Generales (capítulo 4). Todas las medidas se realizan por triplicado.

A partir de las medidas experimentales se determinó la velocidad de crecimiento específica, μ , en función de la concentración de biomasa (ecuación 5.1), y la productividad diaria, P_i , calculada como indica la ecuación 5.3. La fijación de CO_2 diaria, F_i , se calcula a partir de las medidas de TOC, según:

$$F_i = \frac{TOC_i - TOC_{i-1}}{(t_i - t_{i-1})} \cdot \frac{44}{12} \quad (6.8)$$

Donde, TOC_i , concentración de carbono orgánico total en el instante i , g/l
 t_i tiempo en el instante i , h o d, según se indique

Al tratarse de cultivos discontinuos, la concentración de biomasa e intensidad interior, $I_{int,i}$ varían con el tiempo, por lo que la intensidad interior en el punto central asociada a la velocidad de crecimiento determinado para el instante i , μ_i , se estimó como el valor medio:

$$I_{int,m,i} = I_{int,i} - I_{int,i-1} \quad (6.7)$$

Donde, $I_{int,m,i}$ intensidad media interior en el punto central asociada a, μ_i ,
 $\mu E/m^2/s$

6.3.4. Análisis estadístico

Las correlaciones no lineales para el ajuste de las variables a los modelos descritos se realizaron mediante el software *Origin 6.1*.

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Influencia de la intensidad de luz sobre la pared del cultivo (I_{ext}) en el crecimiento de *Synechocystis sp.*

La figura 6.2.a recoge las curvas de crecimiento de *Synechocystis sp.* durante los cultivos discontinuos a las diferentes intensidades de luz irradiadas sobre la pared del reactor. Las mayores concentraciones de biomasa acumulada a lo largo del cultivo se registran para los cultivos a 1200 y 1600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, donde se alcanzaron los 4,42 y 4,53 g/l respectivamente. Éstas fueron menores para 2000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y en los cultivos a 2400 y 800 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ la acumulación de biomasa es prácticamente la misma. A 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ la concentración de biomasa al día 6 es la más baja: 1,67 g/l, indicando que el crecimiento a esta irradiancia ha estado limitado por escasez de luz.

Las velocidades específicas de crecimiento para cada intensidad y día de cultivo están representadas en la figura 6.2b. Todos los cultivos, a diferentes intensidades de luz siguen la misma tendencia: velocidades altas los dos primeros días de cultivo, cuando las concentraciones de biomasa son bajas (menores de 1 g/l), pero a medida que avanza el cultivo y la densidad celular aumenta, el crecimiento se ralentiza, reduciéndose a valores muy similares para todos ellos. En esta zona de concentraciones bajas es donde observó la máxima velocidad de crecimiento específica de $0,095 \text{ h}^{-1}$ ($2,2 \text{ d}^{-1}$), que fue registrada a 1600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y $C_b=0,67 \text{ g/l}$.

En cambio, los crecimientos más lentos a bajas concentraciones, corresponden a las intensidades más altas (2000 y 2400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) y más bajas (400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Este comportamiento hace pensar que incluso a las densidades biomásicas más bajas, 400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ no son suficientes para saturar el sistema fotosintético y la actividad fotosintética expresada por las células irradiadas exteriormente con esta intensidad de luz cae dentro de la zona de limitación de la curva dosis respuesta P/I (*apartado 2.2.1, Fig. 2.5*). El efecto contrario producen las intensidades de luz más altas, donde las velocidades de crecimiento son un 25 % menores que la máxima, descenso que puede ser atribuido a la fotoinhibición. Una vez que las altas concentraciones celulares

provocan que la intensidad de luz en el interior del cultivo se reduzca considerablemente, deja de haber fotoinhibición y las velocidades son similares a las de los cultivos que no parecen estar inhibidos.

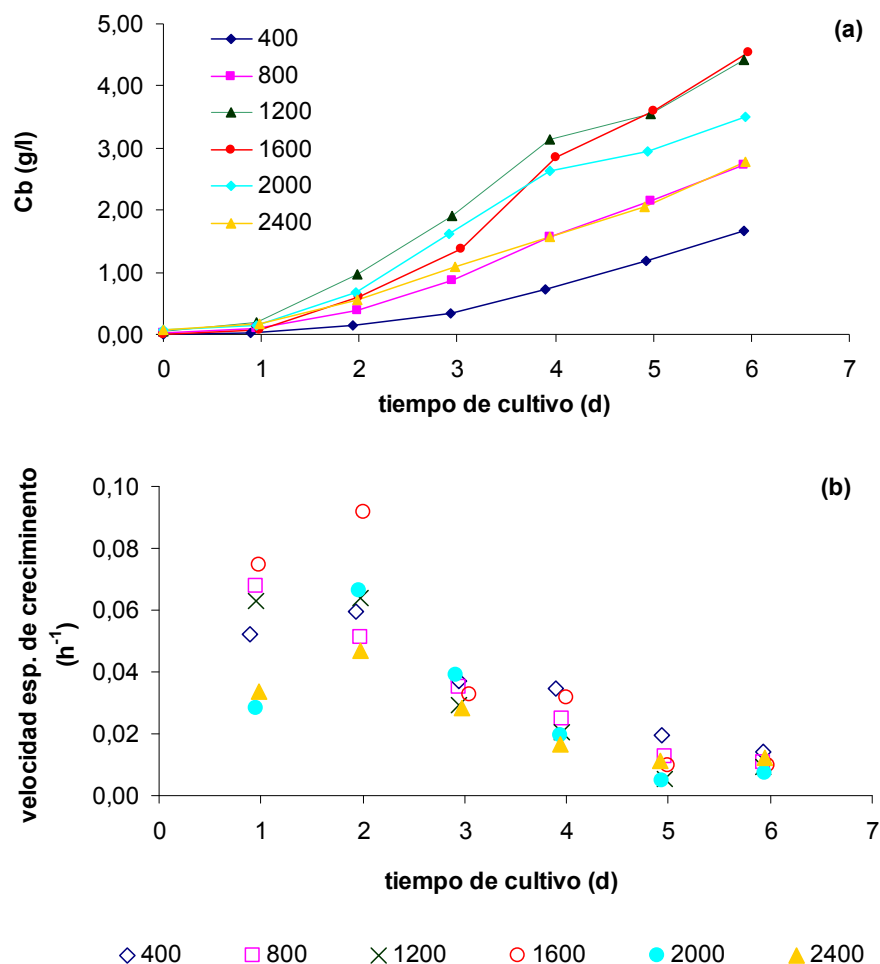


Figura 6.2. (a) Curvas de crecimiento y (b) velocidad específica de crecimiento de *Synechocystis* sp. en los cultivos discontinuos, a diferentes intensidades de luz sobre la pared del reactor, I_{ext} , en $\mu E/m^2/s$.

Las comparaciones entre las productividades y CO_2 fijado diarios para los cultivos discontinuos a diferentes intensidades de luz, se han establecido en función de los valores máximos observados. Al contrario que las máximas velocidades específicas de crecimiento (μ_{max}), las productividades y fijaciones de CO_2 máximas aparecen a altas concentraciones celulares en todos los casos, por encima de 0,9 g/l. Los resultados, mostrados en la figura 6.3, revelan que la productividad y fijación de CO_2 aumentan con la intensidad de luz irradiada hasta 1600 $\mu E/m^2/s$, alcanzándose los valores máximos de

1,56 g de biomasa/l/d y 1,96 g de CO₂ fijado/l/d. A intensidades de luz mayores, *Synechocystis sp.* reduce su productividad y fijación diaria. Estos resultados refuerzan la idea que ya reflejaba el análisis de la velocidad específica de crecimiento: la intensidad de luz por debajo de 1600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ limita el crecimiento de *Synechocystis sp.* e intensidades mayores causan cierto grado de fotoinhibición. Debe notarse que la fotoinhibición no es severa y que no parece provocar la desactivación irreversible de los complejos captadores de luz, en cuyo caso el cultivo colapsaría y dejaría de crecer. Por ello, podría decirse que por encima de 1600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ las intensidades irradiadas sobre la pared del cultivo causan cierto grado de fotoinhibición, pero en el momento en que las células se mueven hacia zonas más interiores, la intensidad se reduce y hasta llega a ser limitante. En este momento las células son capaces de regenerar su fotosistema, continuando con la fotosíntesis. De este modo, en el interior del cultivo están ocurriendo simultáneamente los procesos de fotoinhibición y fotolimitación que provocan una ralentización del crecimiento, pero que no lo anulan. Este fenómeno es característico de cultivos densos y ya fue observado por *Molina-Grima* y colaboradores (1996) en cultivos continuos de *Isochrysis galvana*. Por tanto, la cianobacteria *Synechocystis sp.*, en las condiciones aquí descritas, presenta un máximo de productividad en torno a 1600 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.

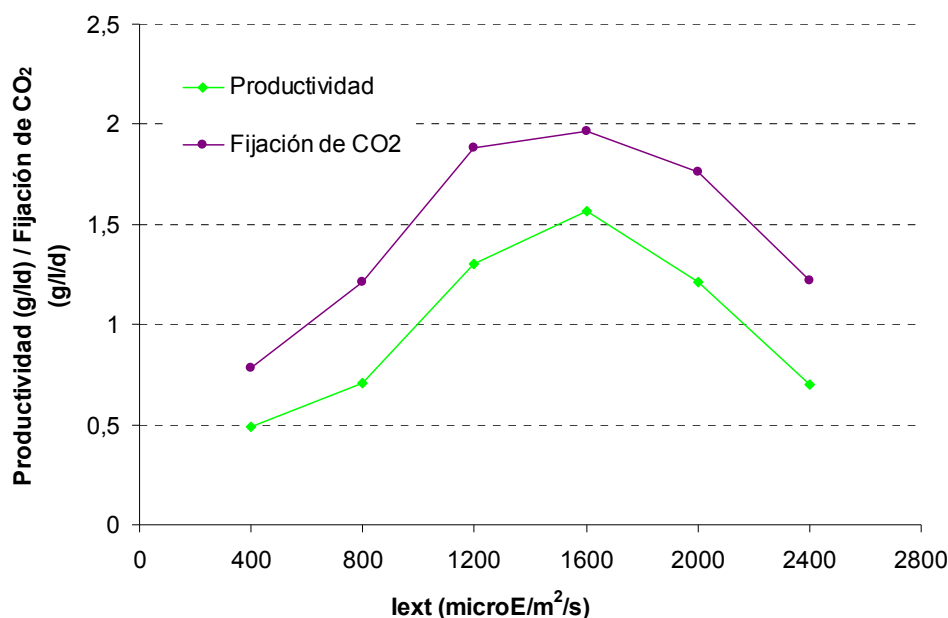


Figura 6.3. Productividad de biomasa y fijación de CO₂ diarias máximas alcanzadas en los cultivos discontinuos irradiados con diferentes intensidades de luz.

6.4.2. Modelos de ajuste de la velocidad de crecimiento a la intensidad de luz interior promedio (I_{av}).

La figura 6.4a representa los pares de valores velocidad de crecimiento e intensidad de luz interior media en el centro del reactor durante la rampa de crecimiento, μ_i - $I_{int,m,i}$, observados para la serie de cultivos de *Synechocystis sp.* Según la gráfica, las velocidades de crecimiento podrían agruparse en tres franjas de intensidades de luz disponible: (I) entre 0 y 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con crecimientos por debajo de 0,04 h^{-1} , expresados a concentraciones alta de biomasa, (II) entre 300 y 800 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, con crecimientos entre 0,04 y 0,07 h^{-1} y (III) entre 800 y 1200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ donde las velocidades de crecimiento son muy diferentes variando entre 0,028 y 0,092 h^{-1} , que es el valor máximo de velocidad de crecimiento alcanzada en este estudio. Al igual que se observó con las intensidades de luz exteriores, la velocidad de crecimiento específica de *Synechocystis sp.* aumenta con la intensidad de luz disponible hasta un valor máximo, en torno a los 950 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y a mayores I, el crecimiento se ralentiza.

Los valores de intensidad interior $I_{int,i}$ medidos en cada instante de tiempo son el resultado de la atenuación causada por las diferentes concentraciones de biomasa y como se aprecia en la figura 6.4b, la atenuación no sigue una relación lineal con la biomasa.

Aplicando la ley de Lambert-Beer, se estima el coeficiente de extinción K_a a cada concentración de biomasa (ec. 6.2), con $p=0,4$ m, que es el paso de luz en el centro del reactor. Una vez determinada K_a , puede ser estimada la intensidad promedio, I_{av} , en el interior del reactor según la ecuación. 6.3.

Sin embargo, como se comentó anteriormente, K_a no predice bien los valores de atenuación experimental, sobre todo a altas densidades celulares, por ello se realizó el ajuste de los valores de atenuación, A_t , a cada concentración de biomasa según la ecuación 6.4. El ajuste no lineal ($R^2=0,947$) estima el coeficiente de atenuación, K_{at} en 1.535 ± 22 g/m^3 y la atenuación máxima, $A_{t,max}$ en $10,30 \pm 0,65$ (Fig. 6.4b). Con los parámetros K_{at} y $A_{t,max}$ y la ecuación 6.5 se calculó el coeficiente de extinción ficticio, K_a' a cada concentración de biomasa. Y así la intensidad promedio, I'_{av} , se calcula

sustituyendo K_a por K_a' en la ecuación 6.3. La discriminación de qué coeficiente de extinción, K_a y K_a' reproduce mejor las observaciones experimentales será justificado por el mejor ajuste de los pares de valores $\mu_i-I_{av,i}$ y $\mu_i-I'_{av,i}$ a los modelos empíricos de crecimiento propuestos por *García Malea et al., (2006)* y *Muller-Feuga (1999)* de las (ec 6.6 y 6.7).

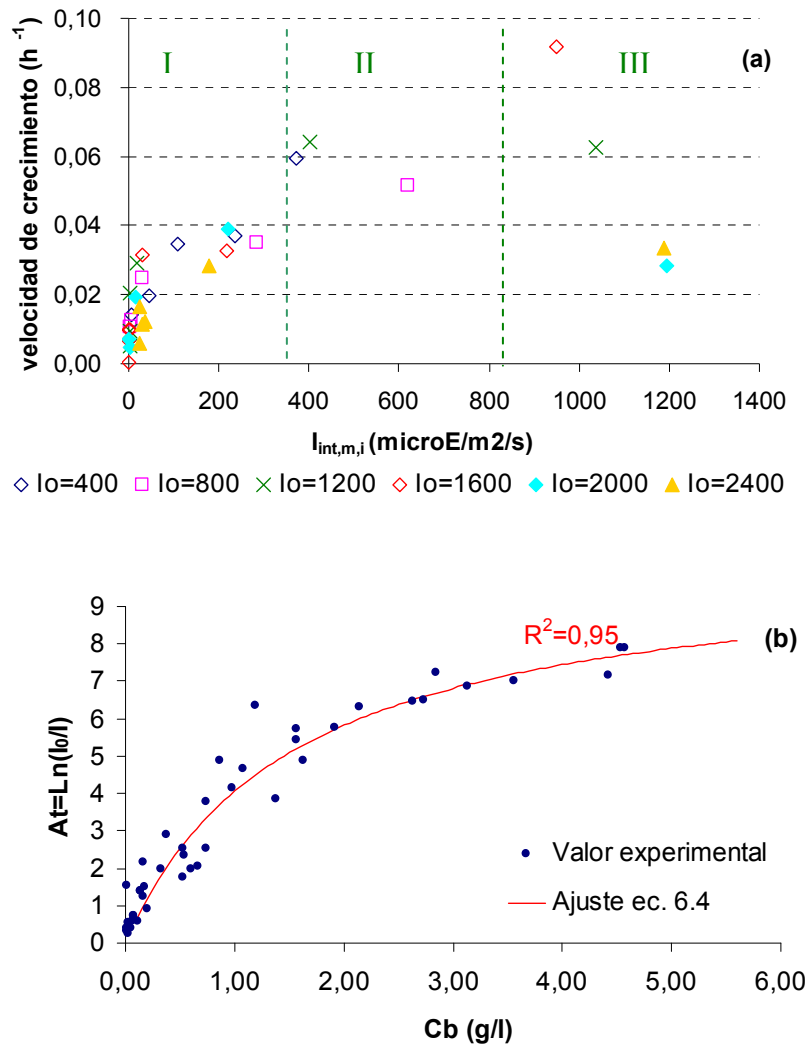


Figura 6.4. (a) Velocidades específicas de crecimiento (μ_i, h^{-1}) observadas a las intensidades de luz medias para la rampa de crecimiento, $I_{int,m,i}$. (b) Relación hiperbólica de la concentración de biomasa (C_b) con la atenuación de luz observada y su ajuste a la ecuación 6.4.

La bondad de los ajustes por regresión no lineal de los valores experimentales de crecimiento e I_{av} o I'_{av} a las ecuaciones 6.6 y 6.7 se ha expresado mediante el sus

coeficientes de regresión no lineal, R^2 , recogidos en la tabla 6.1. Los coeficientes de regresión no lineal, R^2 , indican que los ajustes con I'_{av} son en todos los casos mejores que con I_{av} , y que en algunas series experimentales con I_{av} no es posible el ajuste (la iteración no converge). De este modo queda comprobado que K_a' predice mejor que K_a el efecto de atenuación por la biomasa y a partir de aquí la intensidad promedio siempre se referirá a la calculada con K_a' .

Tabla 6.1. Coeficiente de regresión no lineal para los ajustes de los valores experimentales a los dos modelos de velocidad de crecimiento considerados.

$I_{ext} \mu E/m^2/s$	MODELO			
	Ecuación 6.6, García-Malea et al., 2006		Ecuación 6.7, Muller-Feuga, 1999	
	R^2		R^2	
	con I_{av}	con I'_{av}	con I_{av}	con I'_{av}
400	0,878	0,906	0,884	0,911
800	0,964	0,981	0,944	0,980
1200	0,965	0,968	0,703	0,958
1600	no ajuste	0,898	0,823	0,927
2000	no ajuste	0,884	0,707	0,782
2400	no ajuste	0,952	no ajuste	0,945

La figura 6.5 muestra la curvas de ajuste de la velocidad específica de crecimiento a las intensidades promedio I'_{av} según los modelos anteriormente descritos (ecs. 6.6 y 6.7) y con los ajustes indicados en la tabla 6.1. En cuanto a qué modelo predice mejor el comportamiento de *Synechocystis sp.*, el coeficiente de ajuste no lineal no indica una tendencia predominante por un modelo u otro y en los casos en los que el ajuste es bueno para un modelo, también lo es para el otro. De este modo, a juzgar por los coeficientes R^2 , podemos decir que tanto el modelo propuesto por *García-Malea et al.*, (2006) como el de *Muller-Feuga (1999)* resultan aptos para predecir las velocidades de crecimiento observadas en los cultivos discontinuos a diferentes irradiancias. Sin embargo, ha de puntualizarse que el primer modelo no explica la ralentización del crecimiento a altas intensidades de luz, una vez superado un valor máximo, efecto que se observa claramente en los cultivos a 400, 1600 y 2000 $\mu E/m^2/s$ (Fig. 6.4a) y que podría atribuirse a la fotoinhibición. Por tanto en este caso, parece que el modelo de *Muller-Feuga, (1999)* representa mejor la respuesta fotosintética observada para *Synechocystis sp.* frente a la intensidad promedio I'_{av} .

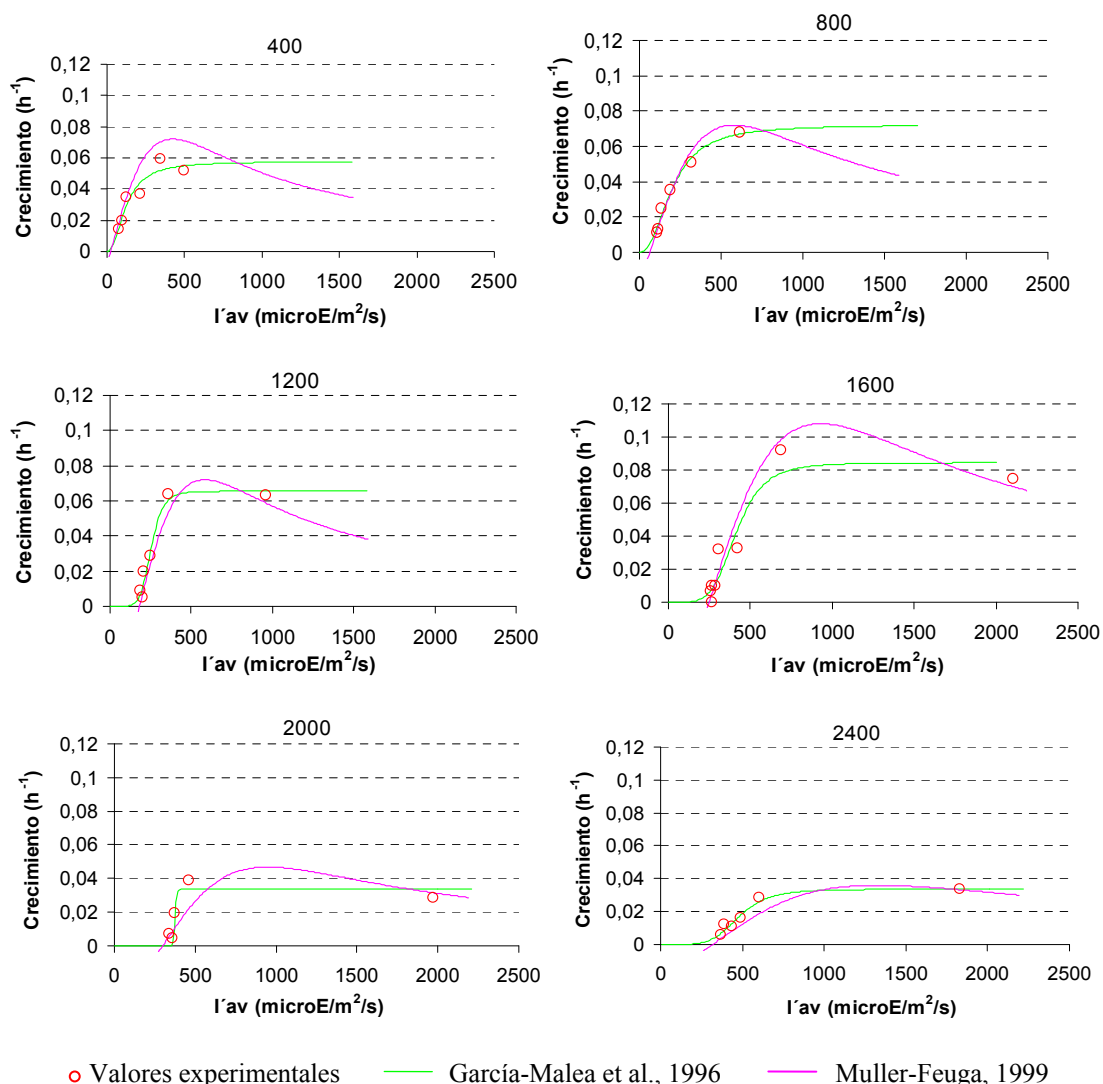


Figura 6.5. Gráficos de ajuste la velocidad de crecimiento específica (μ , h^{-1}) medida para *Synechocystis sp.* según la intensidad de luz promedio I'_{av} , a los modelos descritos por García-Malea et al., (2006) y Muller-Feuga, (1999).

El modelo de Muller-Feuga, (1999) que parece seguir *Synechocystis sp.* en crecimiento discontinuo, fue desarrollado para explicar las tres reglas fundamentales del metabolismo de un sustrato por un organismo, que son: (1) la pérdida de peso (crecimiento negativo) en ausencia de sustrato suficiente, (2) existencia de una dosis de saturación en la que el crecimiento es máximo y (3) existencia de un rango de dosis óptima localizada entre la dosis de saturación y la que causa crecimiento negativo. El hecho de que esta caída de crecimiento a partir de una irradiancia de saturación no haya sido observada en otros estudios, cuyos resultados se ajustan bien a un modelo hiperbólico, similar al de García-Malea et al, (2006) (Molina-Grima, 1994, Molina-

Grima 1996, Acién-Fernández, 1998, Jeon et al., 2005) puede ser debido a que en estos ensayos las medidas de la velocidad específica de crecimiento a sus respectivas intensidades promedio fueron realizadas tras un tiempo de adaptación del cultivo a cada intensidad de luz. Este proceso es conocido como foto-aclimatación e implica fundamentalmente cambios en los contenidos de pigmentos y otros mecanismos de protección que consiguen reducir la cantidad de energía que llega al centro de reacción PSII (*Richmond, 2004*). Los cultivos analizados en el presente estudio fueron realizados en modo discontinuo partiendo de concentraciones de biomasa de 0,01 g/l, donde en los primeros días las irradiancias promedio fueron tan intensas que podrían haber saturado sus centros fotosintéticos, causando la ralentización de los crecimientos observada.

Los parámetros de ajuste por regresión no lineal de los valores experimentales al modelo de *Muller-Feuga (1999)* están recogidos en la tabla 6.2. El modelo predice velocidades específicas de saturación que van aumentando con la intensidad promedio, desde 423 ± 11 a 930 ± 22 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, donde se alcanza la velocidad de crecimiento máxima de $0,108 \pm 0,03$ h^{-1} , a una intensidad promedio de 930 ± 22 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. A partir de la intensidad de saturación de 930 ± 22 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ la velocidad de crecimiento comienza a disminuir: a las intensidades de 947 ± 93 y 1328 ± 25 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ la velocidad de crecimiento se ha reducido a $0,047 \pm 0,1$ h^{-1} y $0,036 \pm 0,4$ h^{-1} , respectivamente. Este descenso de crecimiento es atribuido al efecto de fotoinhibición.

Durante los cultivos llevados a cabo en el presente estudio, valores tan altos de intensidad promedio similares a la máxima posible, es decir de 930 ± 22 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ solo se han alcanzado al comienzo del cultivo cuando las concentraciones eran bajas. En cultivos densos (> 2 g/l) serían necesarias intensidades exteriores muy altas, mayores de 2400 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ para encontrar una intensidad interior promedio en torno a 930 ± 22 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ o superior, siendo difícil que en un cultivo denso de la cianobacteria *Synechocystis sp.* se encuentre fotoinhibición, claro está, siempre y cuando la agitación sea adecuada. Esto significa que *Synechocystis sp.*, además de aprovechar mejor la luz que otras especies, como se encontró en el capítulo anterior, muestra resistencia a altas irradiancias, propiedad deseable en cultivos exteriores.

Lo cierto es que la fotoinhibición en cultivos exteriores densos en pocos casos ha sido observada claramente. Tal vez el caso más representativo donde sí se ha documentado inhibición por luz es el de *Molina-Grima et al.*, (1996), que encuentra este efecto en cultivos de *Isochrysis galbana* a $I_{\text{ext}}=3270 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ e intensidades interiores promedio (I_{av}) entre unos 400 y 1360 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ a concentraciones de biomasa entre 1,35 y 0,59 g/l respectivamente. Sin embargo, los 1360 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidad promedio corresponden una concentración estacionaria de biomasa de 0,59 g/l, que no se considera un cultivo denso. De todos modos, la fotoinhibición detectada por *Molina-Grima* y colaboradores (1996) en ningún caso conduce al lavado completo del cultivo, indicando que la desactivación del fotosistema II solo ocurre en una pequeña región del reactor, la externa, y se va regenerando cuando la célula se mueve al interior.

Tabla 6.2. Parámetros calculados por el ajuste no lineal de los valores experimentales de μ_i e $I'_{\text{av},i}$ al modelo propuesto por Muller-Feuga, 1999.

PARAMETROS DE AJUSTE, MULLER-FEUGA, 1999				
I_{ext} $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	μ_s h^{-1}	I_e $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	I_s $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	R^2
400	0,068±0,01	24±4	423±11	0,911
800	0,072±0,08	65±2	577±8	0,980
1200	0,075±0,02	180±10	584±16	0,958
1600	0,108±0,03	248±22	930±22	0,927
2000	0,047±0,01	299±20	947±93	0,882
2400	0,036±0,04	319±30	1328±25	0,945

El parámetro I_e , que representa la intensidad promedio mínima necesaria para que la célula comience a realizar la fotosíntesis y obtenga energía de la luz en vez de por consumo interno de sus reservas, es un parámetro característico para cada especie. En vista de los valores que da el modelo para I_e (ver tabla 6.2), se aprecia que éste no es constante, sino que va aumentando según aumenta la irradiancia sobre la pared del reactor. La explicación podemos encontrarla de nuevo en el proceso foto-aclimatación. En los cultivos discontinuos estudiados, las intensidades promedio bajas se encuentran a altas densidades celulares, es decir, cuando ya han pasado varios días de cultivo y las células se han ido adaptado a las diferentes intensidades de luz. Así los cultivos

irradiados con intensidades bajas se han adaptado a una baja disponibilidad de luz, de forma que con menos energía lumínica son capaces de poner en marcha sus mecanismos fotosintéticos. Del mismo modo, cuando la célula ha estado recibiendo altas intensidades de luz en los primeros días de cultivo, está adaptada para disipar parte de la energía lumínica que le llega, y por tanto, su umbral mínimo, aumenta. Si se desean cultivos de alta concentración de biomasa, este razonamiento induce a pensar en la necesidad de adaptar un inóculo a bajas intensidades de luz, en vez de a altas, porque aprovechará mejor la energía disponible cuando sea limitante, como ocurre en el interior del cultivo, mejorando su eficiencia fotosintética. Para evitar un tiempo prolongado a las altas intensidades de la zona exterior del cultivo se precisa una correcta agitación.

Ha de puntualizarse, sin embargo, que este estudio no debe considerarse como un resultado definitivo de velocidades y fijaciones de CO₂ máximas, sino como paso previo analizando el comportamiento fotosintético de la cianobacteria *Synechocystis sp.* a un amplio rango de estados fotosintéticos, concentraciones de biomasa e intensidades promedio. Por tanto, es requerido un estudio posterior en el que exista una adaptación previa a la irradiancia incidente, donde el cultivo se encuentre en estado estacionario.

6.5. Conclusiones.

La respuesta fotosintética y capacidad de fijación de CO₂ para la cianobacteria *Synechocystis sp.* ha sido estudiada mediante la realización de una serie de cultivos en modo discontinuo a diferentes irradiancias sobre la superficie del reactor.

Los resultados muestran un valor máximo de velocidad específica de crecimiento de 0,092 h⁻¹ y una fijación máxima de CO₂ de 1,96 g por litro de cultivo y día, que aparecen cuando el cultivo se irradia con una intensidad de luz de 1600 μE/m²/s. Sin embargo, esta intensidad lumínica no es la disponible para las células en el interior del reactor, que cambia en función de su posición en el reactor y de la concentración de biomasa en ese momento. Por ello, para determinar cómo varía la velocidad de crecimiento de *Synechocystis sp.* en respuesta a la intensidad de luz disponible, fue determinada la intensidad promedio en el interior del cultivo. Se ha comprobado cómo los resultados aquí observados para *Synechocystis sp.* se explican bien por el modelo

propuesto por *Muller-Feuga (1999)*. El ajuste de los datos experimentales a este modelo arroja una velocidad máxima de crecimiento de $0,108 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, observada a $930 \pm 22 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidad promedio en el interior del reactor.

6.6. Bibliografía.

- Acién-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Sánchez-Pérez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 1997. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 55, nº 5, pp 701-710.
- Acién-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Sánchez-Pérez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 1998. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, nº 6, pp 605-616.
- Benson B.C. y Rusch, K.A., 2006. Investigation of the light dynamics and their impact on algal growth rate in a hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor. *Aquacultural Engineering*, 35, pp.122-134.
- García-Malea, M.C, Acién, F.G., Fernández, J.M., Cerón, M.C., 2006. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, pp 981-989.
- García-Malea, M.C., Brindley, C., Del Río, E., Acién, F.G., Fernández, J.M., Molina, E., 2005. Modelling of growth and acumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochemical Engineering Journal*, 26, pp. 107-104
- Janssen, M, Tramper, J., Mur, L.R., Wilffels, R.H., 2002. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale up and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, nº 2, pp. 193-210.
- Jeon, Y.C, Cho, C.W, Yun, Y.S., 2005. Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal*, 27, pp. 127-131.
- Michaelis, L., y Menten, M. L., 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 4, pp. 334-336.

- Molina-Grima E., Sánchez-Pérez, J.A., García-Camacho, F., García-Sánchez, J.L., López-Alonso, D., 1993. *n*-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, pp. 599-605.
- Molina-Grima, Ación-Fernández, F.G., García Camacho, F., Chisti, Y., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 231-247.
- Molina-Grima, E. Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez-Pérez, J.A., García-Camacho, F., 1999. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, pp 59-69.
- Molina-Grima, E., García,F., Sánchez,J.A., Ación, F.G., Fernández, J.M., 1997. Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, pp. 375-381.
- Muller-Feuga, A., 1999. Growth as a function of rationing: a model applicable to fish and microalgae. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 236, pp. 1-13.
- Pruvost, J., Legrand, J., Legentilhomme, P., 2002. Simulation of microalgae growth in limiting light conditions: flow effect. *Bioengineering, food and natural products*, 48, nº 5, pp.1109-1119.
- Richmond, A.E., 1986. Microalgaculture. Reprinted from the *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 4, nº 4, pp. 369-438. CRC Press Inc.
- Tamiya, H. Hase, E., Shibata, K., Iwamura, A., Morimura, Y., 1953. Kinetic of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and temperature. In.: *Algal culture: From laboratory to pilot plant*. Burlew Carnegie Institute. Washington Publications, 60, pp. 76-84.

CAPITULO 7

OPTIMIZACIÓN DE LA FIJACIÓN DE CO₂ POR Synechocystis sp. CON METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

7.1. Introducción

Entre los factores que afectan al metabolismo fotótrofo de microalgas y a su tasa de fijación de CO₂, los más importantes son la disponibilidad de luz, el acceso a una fuente de carbono inorgánico, el pH, la temperatura y cantidades suficientes de nutrientes inorgánicos disueltos en su medio (*Benemann y Tillet, 1987*). La maximización de la fijación de CO₂ por un cultivo microalgal implica operar en los puntos óptimos de cada uno de estos factores. Como se comentó anteriormente, el aporte óptimo de nutrientes no es difícil de conseguir, basta con disolverlos adecuadamente en exceso en el medio de cultivo, y mantener el cultivo agitado homogéneamente (*Weissman et al., 1988*). En cuanto al carbono inorgánico, un aporte adecuado se consigue controlando el pH con la inyección de CO₂, tal como demostró *Camacho-Rubio et al., (1999)*. Las condiciones óptimas térmicas y fóticas y la tolerancia que los organismos acuáticos presentan, dependen de las características fisiológicas, propias de cada organismo y que están relacionadas con factores ambientales de su hábitat natural (*Talbot et al., 1991*). Por último, la importancia del pH radica en la capacidad de cada organismo acuático para mostrar un crecimiento óptimo a un pH determinado (*apartado 2.3.1*). De este modo, fijando las condiciones de cultivo en estos óptimos propios de cada especie, los crecimientos van a ser máximos (*Richmond, 2005, Sánchez et al., 2008*). Conocer las condiciones de cultivo óptimas, en particular las asociadas a parámetros físicos y químicos, es de gran importancia para el desarrollo de cualquier proceso, debido a su impacto sobre la economía y aplicación real del mismo.

En la búsqueda de las condiciones óptimas de cualquier proceso tradicionalmente se ha seguido un método experimental monodimensional, variando sucesivamente los factores estudiados. Los métodos simples de optimización de variables no solamente son largos, sino que además pueden llevar a establecer conclusiones erróneas a partir de los resultados, especialmente porque las interacciones entre los diferentes factores pueden quedar encubiertas (*Abdel-Fattah et al., 2005*). Los diseños experimentales estadísticos se caracterizan por minimizar el error asociado a la determinación de los efectos atribuidos a cada parámetro y esto facilita una variación simultánea, sistemática y eficiente de todos los parámetros. La optimización estadística mediante el diseño de experimentos permite

encontrar las condiciones óptimas de un proceso, tras establecer las relaciones existentes entre factores y las respuestas estimadas por el modelo (Kwak *et al.*, 2006). Una de las opciones más utilizadas para la optimización estadística de procesos es la metodología de superficie de respuesta (SRM, *surface response methodology*)

Un diseño experimental requiere establecer una región experimental de estudio dentro de la cual, existen indicios de encontrarse el punto óptimo (Gutiérrez y de la Vara, 2004). *Synechocystis sp.* es una especie recientemente aislada y solo identificada a nivel de género, por lo que no se tienen indicios de su comportamiento frente a los factores intensidad de luz, pH y temperatura y entonces deben aproximarse unos límites de experimentación. En el capítulo anterior ya se observó cómo la intensidad de luz influía en el crecimiento, existiendo un rango en el que ésta era máxima. El mismo estudio previo sería necesario en el caso de pH y temperatura, permitiendo fijar unos rangos en los que se pudiera encontrar este óptimo. Sin embargo, dado que el tiempo necesario para establecer estos rangos es elevado, resulta conveniente considerar una segunda opción, que consiste en hacer uso de la bibliografía. Tal como vimos en el capítulo 5, la bibliografía aporta amplia información sobre los mejores intervalos de pH y temperatura para el cultivo de microalgas y cianobacterias. Así, puede comprobarse que para especies de ambientes no extremos, las temperaturas óptimas suelen situarse en el intervalo de 25 a 35° C y el rango de mejores pHs suele estar entre 7,5 y 8,5, o cercanos a estos valores (ver apartado 5.1).

El objetivo del presente estudio consiste en encontrar las condiciones óptimas de los factores pH, temperatura y disponibilidad de luz que maximizan la fijación de CO₂ mediante el cultivo autótrofo de la cianobacteria *Synechocystis sp.* Para ello se utilizó la herramienta estadística de metodología de superficie de respuesta.

7.2. Diseños factoriales y metodología de superficie de respuesta.

La metodología de superficie de respuesta permite realizar predicciones y optimizar procesos según las variables de interés o los factores escogidos por el investigador. Los datos obtenidos de un diseño experimental son usados para establecer inferencias sobre el proceso investigado (Cuetos, *et al.*, 2007).

Debido a que las relaciones entre las variables (x_i) y la respuesta (y) son desconocidas se asumen aproximaciones polinomiales de orden variable hasta encontrar el modelo que se ajuste a los datos experimentales.

La ecuación para los modelos de segundo orden y 3 factores corresponde al polinomio siguiente:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1 x_2 + \beta_{13}x_1 x_3 + \beta_{23}x_2 x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 \quad (7.1)$$

Donde, β_0 término independiente
 β_i coeficientes lineales de efectos principales
 β_{ij} coeficientes cuadráticos, responsables de las interacciones entre los términos cuadráticos puros

La ecuación 7.1 se puede escribir en forma matricial como:

$$\hat{Y} = \beta_0 + x'b + x'Bx \quad (7.2)$$

Donde, b vector formado por los coeficientes de la parte lineal (efectos principales)
 B matriz que contiene los coeficientes correspondientes a las interacciones entre los términos cuadráticos puros.

El máximo se calcula resolviendo el sistema dado por la ecuación:

$$\partial\hat{Y}/\partial x = b + 2Bx = 0 \quad (7.3)$$

Y el punto estacionario, x_s , se calcula como:

$$x_s = -(1/2)B^{-1}b \quad (7.4)$$

Los valores propios (λ_i) de la matriz B determinarán si el punto estacionario es un máximo, un mínimo o un punto de silla. En el caso de que la solución del sistema de ecuaciones de la ecuación 6.3 dé lugar a un punto de silla y que no sea posible trasladar la región experimental (debido a limitaciones técnicas en el montaje experimental, por ejemplo), obligan a la determinación no del punto óptimo, sino del punto de mejor operabilidad. Este punto se calcula mediante la aplicación del análisis de cordillera, que consiste en la búsqueda del punto de mejor operabilidad situado a un radio R desde el centro del diseño. La utilización del análisis de Lagrange permite la ubicación del punto estacionario dado por:

$$(B - \eta I)x = -b/2 \quad (7.4)$$

Donde, I matriz identidad
 η multiplicador de Lagrange.

El proceso iterativo de resolver esta ecuación consiste en asumir un valor para η mayor y próximo al valor más alto obtenido para los valores propios de la matriz B (λ_i). Este proceso se repite hasta que se obtiene el punto que da el mayor valor de la respuesta, situado siempre dentro de la región experimental. Este punto suele localizarse dentro de la esfera de radio mayor (*Gutiérrez y de la Vara, 2004*).

En este estudio se aplica un diseño central compuesto 2^3 para determinar el efecto que ejercen sobre la variable de respuesta (fijación de CO₂ por la cianobacteria *Synechocystis sp*) los factores de cultivo pH, temperatura y disponibilidad de luz.

7.3. Materiales y métodos.

7.3.1. Montaje y metodología experimental

El inóculo de *Synechocystis sp.* fue preparado siguiendo la metodología descrita anteriormente (capítulo 4) y el medio de cultivo utilizado en todos los experimentos fue *Mann&Myers*. La concentración inicial de biomasa para todos los experimentos fue fijada $0,5 \pm 0,1$ g/l.

Todos los cultivos se realizaron en régimen semicontinuo durante 7 días, diluyendo diariamente el volumen necesario para ajustar la concentración inicial diaria a 0,5 g/l. En un cultivo semicontinuo, cada día las células parten de una misma concentración de biomasa con una misma disponibilidad de luz, que se va reduciendo a medida que las células se dividen con el tiempo. Si el resto de las condiciones de cultivo no varían, cada día las células repetirán esta misma rampa de crecimiento y reducción de luz. Cuando se observa la repetición de un patrón de comportamiento, tanto en la rampa de crecimiento como en la rampa de intensidad de luz en el interior del cultivo en días consecutivos, se entiende que el cultivo se ha estabilizado. Una vez estabilizado se toman medidas de tres días consecutivos que son consideradas pseudoréplicas de cada experimento.

Los cultivos de *Synechocystis sp.* se llevaron a cabo en columnas de burbujeo fabricadas en vidrio (80 mm de diámetro, 400 mm de altura) y de 1 litro de volumen de trabajo (Fig. 7.1). El esquema y descripción del montaje experimental ha sido descrito en el capítulo anterior (ap. 6.3.2). El burbujeo de aire fue de 0,4 l/min por litro de cultivo. El aporte necesario de carbono inorgánico y regulación de pH se realizaron por inyección de “CO₂ a demanda”, al 10% en aire. Los reactores fueron iluminados con lámparas fluorescentes de 33 W (*Philips Master, 865, 2150 lúmenes*), montadas verticalmente sobre un reflector semicilíndrico al que nos referimos como unidad de iluminación. Las diferentes intensidades sobre la pared del reactor (I_{ext}) se consiguieron variando la distancia y número de unidades de iluminación.

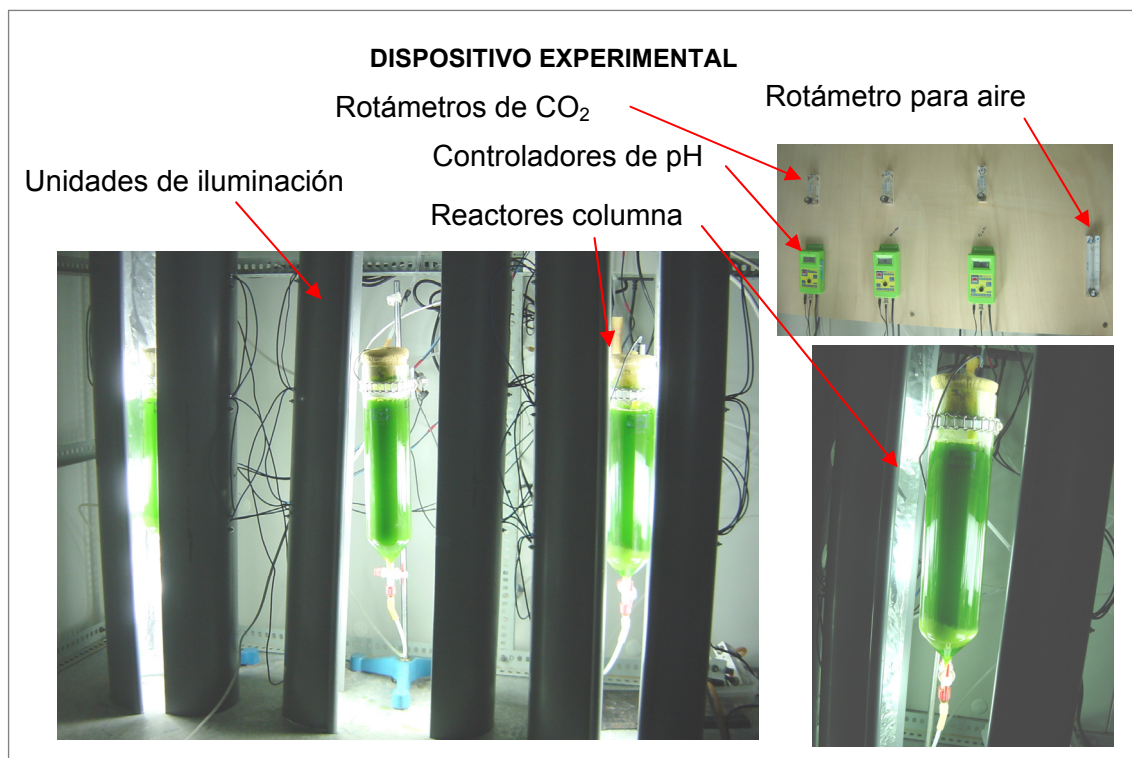


Figura 7.1. Montaje experimental para la realización del presente estudio.

El fotoperiodo diario se fijó en 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. El dispositivo experimental se instaló en el interior de una cámara termostatzada. El control de temperatura se consiguió variando la temperatura de la cámara y disponiendo ventiladores alrededor de los reactores en caso necesario. Durante las horas de oscuridad, la temperatura se iguala a la seleccionada para la cámara (entre 20 y 25° C, según el experimento). Diariamente y a la misma hora, se recogieron 50 ml de muestra homogénea y se midió la irradiancia en el interior y centro del cultivo ($I_{int,i}$) según se ha descrito en el capítulo 3. La medida se toma en el centro del reactor. La intensidad I_0 en el punto central del reactor se midió antes de inocular cada cultivo.

7.3.3. Métodos analíticos.

El peso seco y TOC fueron determinados diariamente, siguiendo los métodos indicados anteriormente en el capítulo 4. Todas las medidas se realizan por triplicado.

A partir de las medidas experimentales se determinaron la velocidad de crecimiento específica, μ_i , en función de la concentración de biomasa y la fijación de CO₂ diaria, F_i ,

que se calcula a partir de las medidas de TOC según la ecuación (6.8). La intensidad promedio en el interior del reactor, I_{av} , fue determinada a partir de la ecuación (6.3) con los valores de K_{at} y At_{max} obtenidos en el capítulo anterior.

En los cultivos semicontinuos el crecimiento se mide como el crecimiento de rampa diaria desde una concentración inicial de 0,5 g/l hasta la concentración final determinada por sus condiciones de operación. Por tanto, la intensidad promedio en el interior del cultivo interior, I'_{av} varía con el tiempo entre un valor máximo y mínimo al comienzo, instante $i-1$ y final de la rampa, instante i . Por tanto, la intensidad promedio para la rampa de crecimiento, $I'_{av,r,i}$, asociada a la fijación de CO₂ que se encuentra para esa misma rampa, F_i , se estimó como:

$$I'_{av,r,i} = \frac{I'_{av,i-1} - I'_{av,i}}{2} \quad (7.5)$$

7.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico.

La respuesta de la variable *fijación de CO₂* (y) fue evaluada mediante los factores *iluminación exterior*, I_{ext} , (x_1), *pH* (x_2) y *temperatura*, T , (x_3). Los rangos en los que se varían los factores para definir la región experimental (*Tabla 7.1*) han sido escogidos según los resultados del capítulo anterior y la revisión bibliográfica.

Tabla 7.1. Niveles de los factores que definen el los límites de la región experimental a partir de los que se va a construir el diseño de composición central 2^3 .

	Límite inferior	Límite superior
x_1 : I_{ext} ($\mu E/m^2/s$)	1200	2000
x_2 : pH	7,5	8,5
x_3 : T ($^{\circ}C$)	25	35

La tabla 7.2 muestra el diseño de composición central 2^3 con tres repeticiones al centro. El diseño de composición central consta de una porción factorial, correspondiente al diseño factorial completo 2^3 (número de experimentos: 2^3), una parte central, que son las repeticiones al centro (en este caso, 3) y una parte axial, donde el nivel de cada factor varía

una distancia α del punto central (número de experimentos: 2×3). El número de experimentos y distancias al centro (α) han sido elegidos de forma que se cumplan las condiciones de diseño ortogonal y rotatable (Gutiérrez y de la Vara, 2004). En total, el diseño consta de 17 experimentos.

El análisis por regresión múltiple de la serie de datos experimentales obtenidos para la variable de respuesta se ha realizado mediante el software *Origin 6.1*. El proceso iterativo para el cálculo del punto óptimo fue llevado a cabo mediante el programa *Matlab R12*.

Tabla 7.2. Diseño factorial 2^3 de composición central. Niveles que toma cada factor en cada corrida experimental.

exp n°	x_1 (I _{ext})	x_2 (pH)	x_3 (T)		
1	1200	7,5	25		
2	2000	7,5	25		
3	1200	7,5	35		
4	2000	7,5	35		
5	1200	8,5	25	Parte factorial	
6	2000	8,5	25		
7	1200	8,5	35		
8	2000	8,5	35		
9	1600	8	30		Repeticiones al punto central
10	1600	8	30		
11	1600	8	30		
12	2240	8	30		Parte axial
13	1600	8	22		
14	1600	8,8	30		
15	960	8	30		
16	1600	8	38		
17	1600	7,2	30		

7.4 Resultados y discusión.

La figura 7.2 muestra el caso más representativo (experimento n° 4) de la evolución los 17 cultivos semicontinuos realizados para este estudio. El resto de los experimentos han sido adjuntados en el Anexo I. Como indica la figura 7.2, los cuatro primeros días se consideran periodo de aclimatación. Durante este periodo, el cultivo se ha lavado un mínimo de 2 veces el volumen del reactor, según la necesidad de dilución impuesta por la concentración de partida de 0,5 g/l. Tras este periodo se observan rampas de crecimiento diarias similares, por lo que se entiende que las células se han aclimatado a las condiciones impuestas y que el cultivo está estabilizado. La fijación de CO₂ se mide en los tres últimos días de cultivo. Cada valor de fijación de CO₂ alcanzado tras la rampa de crecimiento diaria se considera como una pseudorréplica. Así, para cada experimento se tienen tres valores de fijación de CO₂ en condiciones estables. Los resultados presentados en la tabla 7.3 son los valores medios de estas tres pseudorréplicas.

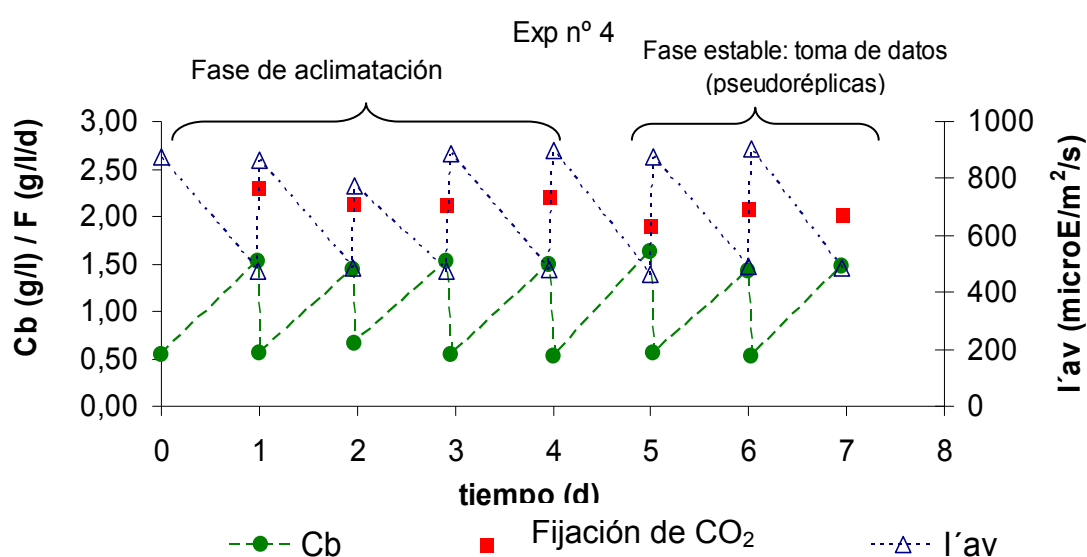


Figura 7.2. Cultivo semicontinuo de siete días de duración realizado en las condiciones descritas para el experimento número 4, mostrando la evolución de la concentración de biomasa, intensidad promedio y fijación de CO₂.

Como se observa en la figura 7.2, la concentración de biomasa en el experimento número 4 en un día pasa de 0,50 g/l de partida a 1,50 g/l al día siguiente. De forma general para todos

los experimentos realizados, la concentración alcanzada al día siguiente será diferente en función de cada tratamiento, pero varía en un pequeño margen, que en el caso más desfavorable será de entre 0,90 y 1,60 g/l. Esto significa que a radiaciones externas constantes, el incremento de concentración a lo largo de un día da lugar a que las intensidades de luz promedio en el interior del reactor, I_{av} , varíen entre un valor máximo, justo tras la dilución y un valor mínimo que se presenta 24 horas después, como queda reflejado en la figura 7.2. En el capítulo anterior vimos que la intensidad de luz promedio en el interior del reactor iluminado a una radiación externa constante, depende fundamentalmente de la concentración de biomasa. Puesto que la concentración de biomasa varía diariamente de forma similar en todos los experimentos, todos los experimentos están igualmente atenuados y la I_{av} incrementa o disminuye en la misma proporción que la I_{ext} de cada tratamiento. Por tanto, el efecto que cause I_{av} en la velocidad de crecimiento y fijación de CO_2 será debido a la intensidad exterior y todos los experimentos son comparables entre sí. Por ello el estudio de optimización se ha realizado teniendo en cuenta la intensidad externa. El análisis de la influencia de I_{av} sobre la fijación de CO_2 se realizará en el apartado siguiente.

La tabla 7.3 muestra los resultados obtenidos para cada experimento. El mejor tratamiento corresponde al experimento número 4, a $2000 \mu E/m^2/s$, pH 7,5 y $35^\circ C$, donde se consigue una fijación de CO_2 de $1,90 \pm 0,9$ g/l/d. Los resultados de la tabla 7.3 indican que la fijación de CO_2 aumenta con la temperatura, en iguales condiciones de irradiancia y pH, como se ve en los experimentos 5 y 7, que al pasar la temperatura de 25 a $35^\circ C$, la fijación de CO_2 aumenta un 33% o entre el 2 y el 4, que el mismo incremento de temperatura aumenta la respuesta en un 80%. Sin embargo a pHs altos, 8,5, y temperaturas bajas, $25^\circ C$, aparece cierta inhibición con el aumento de irradiancia, como se observa comparando los experimentos 5 y 6. De forma general parece que las fijaciones de CO_2 más bajas se muestran a las temperaturas e irradiancias más bajas. En el caso del pH, la fijación de CO_2 es mejor a pHs bajos combinados con temperaturas altas.

Tabla 7.3. Fijación de CO₂ observada para cada experimento. Valores medios y desviación estándar calculados a partir de las tres pseudoréplicas.

Exp n°	X ₁ (I _{ext})	X ₂ (pH)	X ₃ (T)	Fijación de CO ₂ observada (g/l/d)
1	1200	7,5	25	0,59 ± 0,13
2	2000	7,5	25	1,05 ± 0,04
3	1200	7,5	35	1,32 ± 0,29
4	2000	7,5	35	1,90 ± 0,09
5	1200	8,5	25	0,97 ± 0,15
6	2000	8,5	25	0,75 ± 0,13
7	1200	8,5	35	1,27 ± 0,16
8	2000	8,5	35	1,43 ± 0,17
9	1600	8	30	1,22 ± 0,16
10	1600	8	30	1,11 ± 0,15
11	1600	8	30	1,35 ± 0,10
12	2240	8	30	1,16 ± 0,15
13	1600	8	22	0,78 ± 0,15
14	1600	8,8	30	1,15±0,18
15	960	8	30	0,80 ± 0,21
16	1600	8	38	1,85 ± 0,18
17	1600	7,2	30	1,41 ± 0,17

El análisis por regresión múltiple de los resultados de fijación de CO₂ estima los coeficientes lineales y cuadráticos que definen el polinomio de respuesta. La tabla 7.4 muestra el resultado del análisis por regresión múltiple especificando los coeficientes y efectos de factores e interacciones. El coeficiente de correlación múltiple, R², fue de 0,974, indicando que los datos ajustan bien al modelo. Sin embargo, en casos como el presente, en el que el modelo tiene muchos términos, el coeficiente R² es incrementado por efecto de la suma de términos, aunque éstos no sean significativos, y por ello, el coeficiente de determinación ajustado (R²_{adj}) es más adecuado para explicar la calidad del modelo (Gutiérrez y de la Vara, 2004). Según este coeficiente, el ajuste sigue siendo bueno e indica que el 93,5% de la variabilidad de la respuesta es causada por el efecto de los factores y solamente el 6,5% de la respuesta no puede ser explicada por el modelo. La

validez de la regresión múltiple de los datos experimentales sugiere la siguiente ecuación polinomial de segundo orden:

$$y = -10,661 + 0,007x_1 + 0,673x_2 + 0,205x_3 - 6,84 \cdot 10^{-4}x_1x_2 + 3,10 \cdot 10^{-5}x_1x_3 - 0,023x_2x_3 - 6,16 \cdot 10^{-7}x_1^2 + 0,074x_2^2 + 7,93 \cdot 10^{-4}x_3^2 \quad (7.6)$$

El análisis de varianza, mostrado en la tabla 7.4, determina qué coeficientes son estadísticamente significativos ($p < 0,05$), es decir, influyen en el valor de la respuesta. Cuanto menor es el valor p , mayor es el efecto de ese término sobre la respuesta (Gutiérrez y de la Vara, 2004). Vemos que los coeficientes lineales de todos los factores son estadísticamente significativos e influyen en el valor de la respuesta. También lo son los coeficientes de las interacciones de la intensidad-pH, de pH-temperatura y de intensidad-intensidad. Los factores que más influyen en la fijación de CO_2 por *Synechocystis sp.* son la temperatura y la intensidad de luz. El valor cercano a 0,05 de la interacción pH-temperatura indica que este término de la ecuación polinomial va a modificar en menor grado la respuesta que los otros factores e interacciones.

Llama la atención no observar en los resultados la existencia de interacción entre la intensidad exterior y temperatura ($p = 0,076 > 0,05$). Varios estudios confirman que el efecto de la intensidad de luz y la temperatura están relacionados (Raven, J.A. y Geider, R.J., 1990, Talbot et al., 1991). Por un lado, a temperaturas bajas, un valor de irradiancia alto puede causar una fotoinhibición, que no ocurriría a temperaturas mayores (Richmond, 2004). Además, Ugwu et al., (2007) observan que, cuando la intensidad de luz está en su valor óptimo, existe un efecto adverso en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* al variar la temperatura. Por otro lado, Sánchez et al., (2008) concluye que la productividad de *Scenedesmus almeriensis* a altas intensidades disminuye drásticamente a partir de 33° C. A irradiancias bajas este efecto es mucho menos acusado y la productividad varía poco en el mismo rango de temperatura. En el presente estudio, el hecho de no observar esta interacción no significa que no exista sino que no se han realizado pruebas a temperaturas o intensidades de luz suficientemente altas. Prueba de ello es que en experiencias previas se observó cómo un aumento de la temperatura hasta 45° C durante un cultivo a 2200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y baja concentración de biomasa (0,20 g/l) provocó una caída irreversible de la actividad fotosintética en solamente cinco horas (ver Anexo III). Este efecto de la

intensidad de luz sobre el estrés térmico ya ha sido observado previamente en la especie *Synechocystis* sp. PCC 6803 por *Asadulghani* y colaboradores (2003). De hecho, temperaturas por encima de 45° C se consideran letales para la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Lehel, et al, 1993*).

Tabla 7.4. Resultados arrojados por el análisis ANOVA en la regresión múltiple: efecto de los factores sobre la respuesta.

Factores	Coefficientes	p
constante	-10,660	<0,0001 ^a
I _{ext}	0,007	0,002 ^a
pH	0,672	0,029 ^a
T	0,205	<0,0001 ^a
I _{ext} pH	-6,84·10 ⁻⁴	0,003 ^a
I _{ext} T	3,10·10 ⁻⁵	0,076
pHT	-0,030	0,042 ^a
I _{ext} I _{ext}	-6,16·10 ⁻⁷	0,010 ^a
pHpH	0,074	0,515
TT	7,93·10 ⁻⁴	0,555
R ²	0,974	
R ² _{adj}	0,935	

^a Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

Las superficies de respuesta tridimensionales han sido representadas de dos en dos factores, manteniendo uno de ellos fijos en su punto central (*Fig. 7.3*). Las curvas muestran el gran efecto que causan la intensidad de luz (*Fig. 7.3a*) y la temperatura (*Fig. 7.3c*) especialmente a bajos pHs, la sobre la respuesta. La respuesta presenta un máximo de intensidad de luz, cuyo patrón se observa en todo el rango de temperaturas, y no existe interacción aparente entre la intensidad de luz y la temperatura (*Fig. 7.3b*), como estimó el valor p (tabla 6.5). El efecto del pH sobre la respuesta es poco acusado a bajas intensidades de luz y temperaturas, pero se torna importante especialmente a altas intensidades de luz (*Fig. 7.3c*).

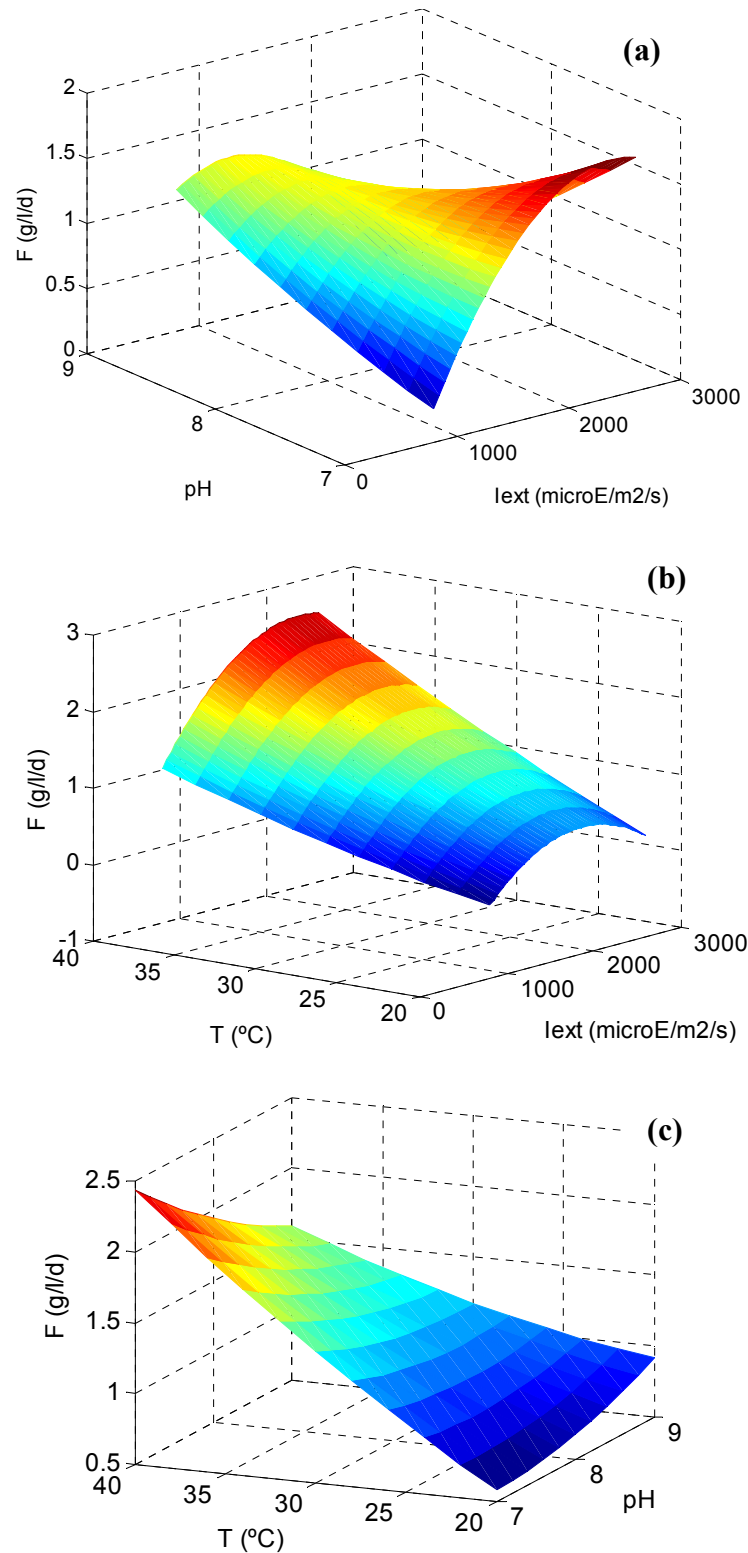


Figura 7.3. Representación tridimensional de las superficies de respuesta estimadas por el modelo cuadrático de la fijación de CO₂ por la cianobacteria *Synechocystis sp.*

La respuesta de superficie está caracterizada por el signo de los valores propios obtenidos según la ecuación 7.4, usando el polinomio de factores codificados. Los valores propios encontrados fueron: $\lambda_1=-1,6321$, $\lambda_2=1,2189$ y $\lambda_3=1,3759$. Como ya se intuía por la forma de las superficies de respuesta, los valores propios indican que en la región experimentada no hay un óptimo, sino un punto de silla. Tras realizar el análisis de cordillera se encuentra el punto de mejor operabilidad teórico a $I_{ext}=1807$, $\mu E/m^2/s$, $pH=7,20$ y $T=35,3^\circ C$, con una fijación máxima de CO₂ de 2,01 g/l/d.

El análisis de la superficie de respuesta da un valor óptimo de crecimiento, dentro de la región experimental a la temperatura de 35,3° C, un poco por encima de lo que suele ser normal en microalgas, indicando que nuestra *Synechocystis sp.* es una especie con cierta tolerancia térmica, que la hace especialmente adecuada para cultivos exteriores, donde a medio día se llegan a alcanzar elevadas temperaturas. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros autores que caracterizan a *Synechocystis* PCC 6803 como una cianobacteria mesófila con un óptimo de temperatura a 32° C, capaz de crecer entre 15 y 45° C. Fuera de este rango el crecimiento se ve severamente reducido (*Stanier et al. 1971*, *Inoue et al. 2001*). Y según la figura 673b y 7.3c, parece que un aumento de temperatura favorece su fijación de CO₂. Otra *Synechocystis*, la *aqualitis*, se ha cultivado en reactores exteriores controlando su temperatura a $40 \pm 3^\circ C$ (*Zang et al., 2001*). También debe tenerse en cuenta que una baja temperatura supondría una reducción importante en la fijación de CO₂, por lo que en estos casos sería rentable utilizar algún sistema de aporte de calor al cultivo. La fijación de CO₂ con microalgas está orientada a grandes industrias como cementeras, centrales térmicas, etc donde suele haber fuentes calor residual de baja potencia no aprovechado. Un cultivo de microalgas sería un aprovechamiento rentable de este calor residual.

Las condiciones de pH de 7,2 requieren una alta intensidad de luz para incrementar la respuesta, ya que a intensidades bajas, la fijación de CO₂ se ve fuertemente limitada (Fig. 7.3a). LA figura 7.3c permite observar que el valor de pH óptimo para la región experimental investigada depende también fuertemente de la temperatura de operación (Fig. 7.3c). Esta figura refleja también que la relación entre el pH y la temperatura es inversa: las fijaciones mayores se consiguen a temperaturas altas y pHs bajos. En cambio a bajas temperaturas, un pH alto es mejor. La mejora de la respuesta a pHs bajos combinados

con temperaturas altas podría encontrar su explicación en que *Synechocystis sp.* prefiere una concentración de carbono inorgánico disuelto baja, ya que a altas temperaturas y bajos pHs el CO₂ se disuelve menos que a bajas temperaturas y altos pHs. La inyección de CO₂ al 10% en bajas temperaturas y altos pHs podría hacer que la concentración de carbono inorgánico disuelta fuera demasiado alta. Sin embargo, en ambientales naturales, donde los recursos de carbono inorgánico suelen ser escasos, las cianobacterias prefieren medios alcalinos (Brock, 1973). Esto lleva a pensar que la característica que influye en la respuesta no es el pH, sino la concentración de carbono inorgánico disuelto en su medio, determinado por la alcalinidad.

La validez de la estimación del punto de mejor operabilidad en la región experimental se comprobó realizando un experimento adicional en las condiciones de mejor operabilidad calculadas en el análisis de cordillera. La evolución de los últimos tres días de este cultivo puede observarse en la figura 7.4. Tras la realización de este cultivo se obtuvo una fijación de CO₂ de $2,07 \pm 0,04$ g/l/d. Este valor de fijación experimental es muy próximo a los 2,01 g/l/d estimados por el modelo en el punto de mejor operabilidad y confirma la validez del modelo polinomial para explicar la respuesta de fijación de CO₂ en función de los factores estudiados.

La determinación de las condiciones mejores de operabilidad en la región experimental estudiada supone una mejora en la capacidad de fijación de CO₂ de la cianobacteria *Synechocystis sp.* de un 9% respecto al mejor tratamiento. Si se observa el comportamiento de las curvas de superficie fuera de la región experimental investigada (Fig. 7.3b), podemos ver que el modelo predice valores de la respuesta en torno a 2,5 g/l/d a temperaturas alrededor de los 40° C e intensidades exteriores de a 2500 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Aunque solo se puede asegurar que el modelo es válido dentro de la región experimentada, éste indica una dirección de nueva búsqueda del punto óptimo, que se encontrará, posiblemente, a mayores temperaturas e irradiancias de las aquí investigadas.

Los resultados obtenidos tras el estudio de las superficies de respuesta y la determinación de las condiciones de mejor operabilidad deben ser analizados también según la intensidad promedio en el interior del cultivo. La intensidad de luz óptima en la región experimental se ha estimado en 1807 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, que se refiere a la intensidad con la que debe irradiarse la

superficie de un reactor con una concentración variando entre 1 y 1,5 g/l para obtener una fijación máxima. Para que este resultado pueda compararse y aplicarse a cualquier tipo de reactor, concentración y modo de operación, éste debe referirse a intensidad promedio en el interior del reactor, I'_{av} . La intensidad promedio puede calcularse, como describe la ecuación (6.3), conociendo la concentración de biomasa, la intensidad en el centro del reactor a $C_b=0$ (I_0) y las constantes K_{at} y K_{max} estimadas para *Synechocystis sp.* De este modo ha sido determinada la intensidad promedio, I'_{av} , para el instante inicial y final de las rampas de crecimiento obtenidas en este último experimento, realizado en las mejores condiciones de operabilidad dadas por el modelo. La figura 7.4 representa dichas rampas para la concentración de biomasa y de intensidad promedio para los días de cultivo estabilizado: 5, 6 y 7. La intensidad promedio asociada a cada valor de fijación de CO₂ durante la rampa, $I'_{av,r,i}$, ha sido calculada según la ecuación 7.5. Así se obtiene que la $I'_{av,r}$ en condiciones de mejor operabilidad es $686 \pm 70 \mu E/m^2/s$, valor que se encuentra dentro de la zona de no saturación por luz, donde la velocidad de crecimiento aumenta con la intensidad de luz, como quedó reflejado en el capítulo anterior (apartado 6.4).

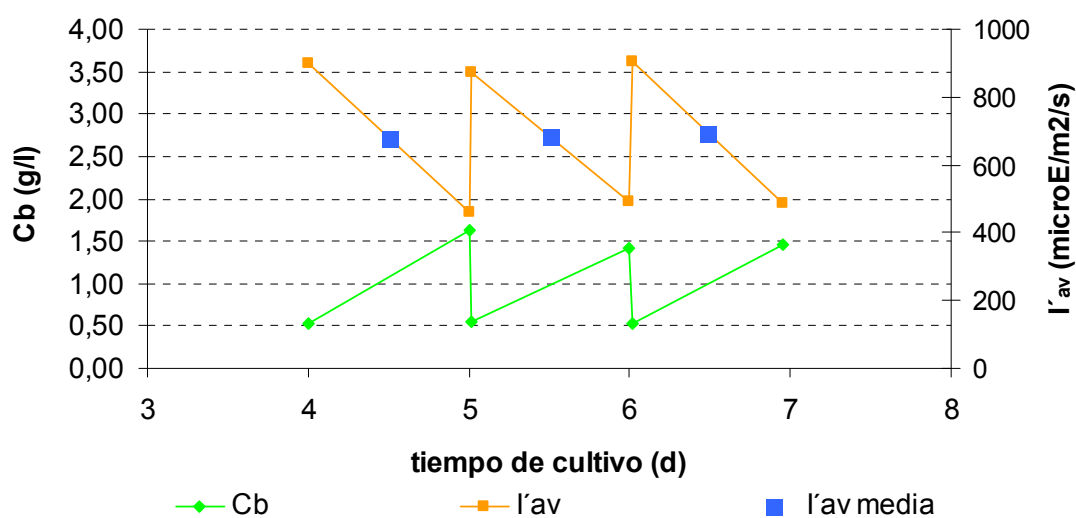


Figura 7.4. Rampas de crecimiento y de intensidad de luz promedio en el experimento realizado para determinar la fijación de CO₂ a las condiciones de mejor operabilidad.

A la vista de este resultado y dado que la intensidad de mejor operabilidad en la región experimental es menor que la máxima encontrada para *Synechocystis sp.* y que la curva dosis respuesta P/I indica mayores tasas fotosintéticas a mayores intensidades accesibles a la célula, I_{av} , puede fácilmente intuirse que la irradiancia exterior debe ser incrementada

para seguir mejorando la tasa de fijación de CO₂. Esta misma dirección de búsqueda es la que ya predijo el modelo desarrollado en este estudio: el punto óptimo estará fuera de la región experimental a intensidades mayores. Por tanto el modelo reafirma las conclusiones encontradas en el capítulo anterior.

Comparar el resultado de intensidad promedio de mejor operabilidad obtenido en el presente estudio, se vuelve complicado tanto si tomamos el valor de I_{ext} como el de I'_{av} y por diferentes motivos. Como se mencionó anteriormente, el valor de I_{ext} solo es comparable para la misma especie, concentración de biomasa y diseño del reactor. Por el contrario, el valor de I_{av} , que sí es comparable, es difícil de encontrar en estudios de *Synechocystis sp.* Si se compara con otras especies, el valor de I_{av} óptimo estimado duplica o triplica los divulgados para otras especies: 391 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ para *Selenastrum capricornutum* (Benson y Rush, 2006), entre 170 y 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ para *Haematococcus pluvialis* (García-Malea et al., 2005) o entre 200 y 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ para *Phaeodactylum tricornutum* (Acién-Fernández, et al, 1998), todas estas especies siendo microalgas. De aquí puede concluirse que la cianobacteria presenta una buena tolerancia a altas irradiancias externas, característica que le confiere robustez para su aplicabilidad en cultivos exteriores.

7.5. Conclusiones

La metodología de superficie de respuesta ha sido utilizada como una herramienta que permite determinar cómo afectan diferentes parámetros de crecimiento a la capacidad de fijación de CO₂ por *Synechocystis sp.* Los parámetros estudiados han sido el pH, la temperatura y la intensidad de luz accesible a cada célula.

El modelo de superficie de respuesta establece un punto de mejor operabilidad dentro de la región experimental a pH de 7,2, temperatura de 35,3° C y 686 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidad promedio en el interior, donde predice una fijación de 2,01 g de CO₂/l/d. La validez del modelo quedó demostrada tras la experimentación en las condiciones de mejor operabilidad, obteniéndose una fijación de CO₂ de 2,07 g/l/d, comparable a la estimada por el modelo.

La dirección de búsqueda del punto óptimo sugerida por el modelo va hacia mayores temperaturas e intensidades de luz de las de la región experimental. Por ello según el modelo, puede predecirse que la cianobacteria autóctona *Synechocystis sp.* exhibe una buena tolerancia a altas irradiancias y temperaturas. La combinación de ambas propiedades justifican que la cianobacteria *Synechocystis sp.*, recientemente aislada, sea una especie potencialmente adecuada para su cultivo en sistemas externos.

7.6 Bibliografía

- Abdel-Fattah, Y.R., Saeed, H.M., Gohar, Y.M., El-Baz, M.A., 2005. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa uricase* by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Process Biochemistry*, 40, n° 5, pp. 1707-1714.
- Acién-Fernández, F.G., García-Camacho, F., Sánchez-Pérez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 1998. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, n° 6, pp 605-616.
- Asadulghani, Suzuki, Y. and Nakamoto, H., 2003. Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, pp. 872–879.
- Benemann, J. and Tillet, D.M., 1987. Effects on fluctuating environments on the selection of high yielding microalgae. Final report to the Solar Energy Research Institute.
- Benemann, J.R., 2003. Biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae: Technology Roadmap. Final Report submitted to the U.S. Department of Energy National Energy Laboratory and to the Steering Committee of the International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae.
Disponible en [www. http://www.co2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm](http://www.co2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm)
- Benson B.C. y Rusch, K.A., 2006. Investigation of the light dynamics and their impact on algal growth rate in a hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor. *Aquacultural Engineering*, 35, pp.122-134.
- Brock, T. D. 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. *Science*, 179, pp. 480–483.

- Camacho-Rubio, F., Ación-Fernández, F.G., Sánchez-Pérez, J.A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., 1999. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 62, pp. 71-86.
- Cuetos, M.J., Gómez, X., Escapa, A., Morán, A., 2007. Evaluation and simultaneous optimization of biohydrogen production using 3^2 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*, 169, pp. 131-139.
- García-Malea, M.C., Brindley, C., Del Río, E., Ación, F.G., Fernández, J.M., Molina, E., 2005. Modelling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochemical Engineering Journal*, 26, pp. 107-104.
- Gutiérrez, H., de la Vara, R., 2004. *Análisis y diseño de experimentos*. Ed. McGraw Hill/Interamericana. México.
- Lehel, C., Gombos, Z., Török, Z. and Vigh, L., 1993. Growth temperature modulates thermotolerance and heat shock response of cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, pp. 81-88.
- Raven, J.A. y Geider, R.J., 1990. Temperature and algal growth. *New Phytology*, 110, pp. 441-461.
- Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK.
- Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Ación, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., Molina-Grima, E., 2008. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43, nº 4, pp. 298-405.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green alga (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35, pp. 171-205.
- Talbot, P., Thébault, J.M., Dauta, A., de la Noüe, J. 1991. A comparative study and mathematical modelling of temperature, light and growth of three potentially useful for wastewater treatment. *Water Resources*, 25, nº 4, pp. 465-472.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2007. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration and temperature on the growth of *Chlorella sorkiniana*. *Photosynthetica*, 45, nº 2, pp. 309-311.

Ugwu, C.U., Ogbona, J.C., Tanaka, H., 2005. Characterization of light utilization and biomass yields of *Chlorella sorokiniana* in inclined tubular photobioreactors equipped with static mixers. *Process Biochemistry*, 40, pp. 3406-3411.

Weissman J.C., Goebel, R.P., Benemann, J.R., 1988. Photobioreactor design, mixing, carbon utilization and oxygen accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*. 36, pp. 336-344.

Zang, K., Miyachi, S., Kurano, N., 2001. Photosynthetic performance of a cyanobacterium in a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor microalgal production and fixation of CO₂. *Biotechnology letters*, 23, n° 21, pp. 21-26.

CAPITULO 8

***CULTIVO Y FIJACIÓN DE CO₂ POR LA
CIANOBACTERIA Synechocystis sp. EN UN
FOTOBIORREACTOR COLUMNA DE BURBUJEO
EN PLANTA PILOTO***

8.1. Introducción

Con el objetivo de encontrar una especie de microalga autóctona adecuada para la fijación de CO₂ residual mediante su cultivo fotoautótrofo, la cianobacteria *Synechocystis sp.* ha sido aislada. Esta especie ha demostrado resistencia a altas inyecciones de CO₂ y ser competitiva con otras microalgas (ver capítulo 5). Además se ha comprobado que no solamente presenta alta tolerancia a elevadas irradiancias y temperaturas, uno de los principales límites en sistemas de producción en condiciones ambientales, sino que su fijación de CO₂ mejora significativamente en dichas condiciones (ver capítulos 6 y 7). Todo ello permite afirmar que *Synechocystis sp.* es una especie de gran interés para su uso en sistemas de fijación de CO₂.

Una vez identificada esta especie con una aplicación de interés, el siguiente paso consistirá en desarrollar los procesos que permitan establecer un puente de unión entre investigación y comercialización (*Fig. 8.1*). Para ello, el diseño y optimización de un fotobiorreactor, que permita establecer un modo de producción constante para su cultivo a mayor escala es el paso fundamental requerido para dar una salida comercial de los estudios realizados a escala laboratorio (*Barbosa, 2003a*).

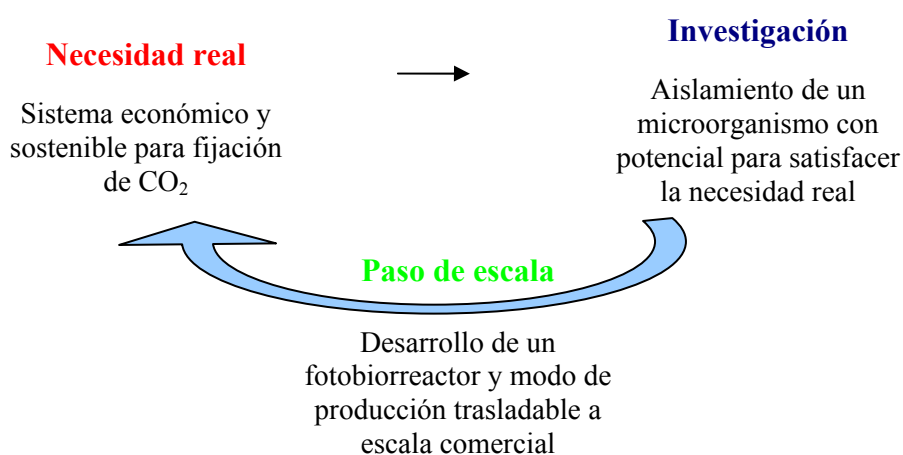


Figura 8.1. Importancia del paso de escala para la aplicabilidad de una investigación de base en el laboratorio.

El conocimiento y optimización de los parámetros de cultivo y cinéticas de crecimiento de un microorganismo permite establecer su productividad máxima (*Fig. 8.2*). Sin

embargo, cuando esa productividad ha de materializarse en un reactor complejo de mayor escala, los parámetros de operación y escalado son los que van a determinar la productividad real de microorganismo (*Grobbelaar, 2000*). Los parámetros más críticos en la operación y paso de escala de un fotobiorreactor son: luz, transferencia de materia, grado de mezcla y esfuerzo cortante hidrodinámico. Estos parámetros están íntimamente relacionados por el ciclo de luz/oscuridad y determinan la productividad y eficiencia de un sistema.

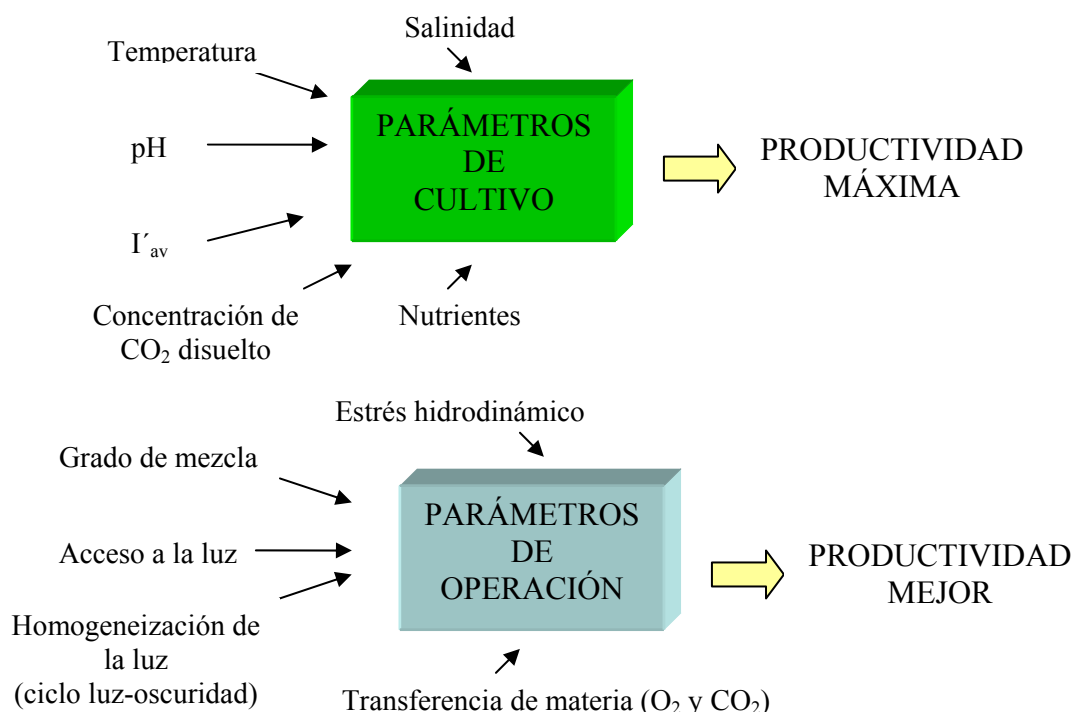


Figura 8.2. Parámetros de cultivo y operación en un cultivo de microalgas que determinan la productividad máxima y la alcanzable en un sistema mayor escala.

El tipo de reactor seleccionado para el paso de escala va a depender del tipo de producto final deseado y de las características fisiológicas de la especie de microalga o cianobacteria. Si lo que se pretende es sintetizar un producto de alto valor o farmacéutico se necesitará un sistema cerrado que evite la contaminación del cultivo por otros microorganismos. El presente estudio se centra únicamente en la etapa de producción de biomasa fijando la máxima cantidad de CO_2 . El uso de la biomasa no está definido, así que a priori, son válidos ambos: sistemas abiertos y cerrados. En esta primera fase del paso de escala, nos interesa un reactor sencillo en su construcción y operación, de gran versatilidad, que permita reproducir condiciones de operación en un

amplio margen con cambios o variaciones estructurales sencillas. Una columna de burbujeo satisface estos requerimientos, permitiendo una alta transferencia de materia y bajos periodos de circulación en el interior, o lo que es lo mismo, altas frecuencias luz/oscuridad.

En un reactor columna de burbujeo, todos los parámetros de operación indicados en la figura 8.2 dependen básicamente del grado de turbulencia creado en el interior, determinado por el flujo de aire introducido y el tamaño de burbuja. Tal como afirma *Molina-Grima et al., 2001*, un régimen turbulento mejora la productividad de biomasa frente a un régimen laminar. Este incremento de la productividad es debido a que la turbulencia mejora la homogeneidad de nutrientes, la transferencia de materia en la disolución del CO₂ y desorción del O₂ (*Doran, 1995*) y la frecuencia del ciclo luz/oscuridad (*Molina-Grima et al., 2001, Barbosa et al., 2003b, Brindley-Alias et al., 2004, Richmond, 2004*), pero hasta cierto límite, ya que a altas turbulencias el grado de esfuerzo hidrodinámico (*shear stress*) puede dañar las células, reduciendo la productividad si el daño es sub-letal o incluso haciendo inviable el cultivo si la célula queda dañada de forma irreversible (*Gudin y Chaumont, 1991, Barbosa et al, 2003c, Trujillo Roldán y Valdez-Cruz, 2006*). El flujo de aire inyectado junto a la geometría de la columna y el tamaño de burbuja definirán las condiciones hidrodinámicas del reactor o grado de turbulencia.

Además, en este estudio se investigarán las causas que provocan la aparición de bioflóculos. Este fenómeno ha sido observado en la columna de burbujeo a escala piloto, durante experimentos preliminares con cultivos en régimen continuo de *Synechocystis* sp. El fenómeno de biofloculación consiste en la agregación de las células individuales para formar grandes partículas apreciables a simple vista, que sedimentan de forma natural, arrastrando la mayor parte de la biomasa de una suspensión. Según *Schryver et al., 2008*, los flóculos microbianos se componen de microorganismos, polímeros orgánicos, partículas coloide, cationes y células muertas. Los mecanismos para la formación de flóculos en comunidades microbianas son complejos y no muy bien conocidos. En el proceso de formación intervienen fenómenos físicos, químicos y biológicos. Existen dos factores fundamentales que se cree que juegan un papel importante en el proceso de biofloculación microbiana: la presencia de polisacáridos (*Cammarota y Sant'Anna, 1998, Sobek y Higgins, 2002, La-Motta et al., 2003*) y de

electrolitos en el medio de cultivo (*Steiner et al., 1976*). Los polisacáridos son los principales componentes orgánicos que se pueden encontrar en un flóculo y son comúnmente excretadas por las células microbianas al medio. Se cree que estas sustancias, moléculas de cadena larga, forman una matriz polimérica encapsulando células y manteniendo unido el flóculo. La presencia de electrolitos en el medio de cultivo, especialmente los cationes Ca^{2+} , pero también Mg^{2+} o Cu^{2+} , intervienen en el proceso de floculación, formando puentes de unión entre las cadenas de polímeros y ayudando a la consolidación y crecimiento del flóculo (*Bruss et al., 1992, Sobeck y Higgins, 2002*).

Se considera que la biofloculación es un efecto adverso en el crecimiento, ya que las células que se quedan en el interior del flóculo no tienen acceso ni a luz ni a nutrientes. Por otro lado, esta característica de agregación y consecuente sedimentación del cultivo en reposo puede ser una gran ventaja para el cosechado de la biomasa, un proceso crítico en la economía del proceso (*Benemann, J.R., 2003, Molina-Grima et al., 2004*). Por tanto, resulta conveniente conocer en qué condiciones aparece este fenómeno, cómo evitarlo y cómo reproducirlo, para poder utilizar dicha característica en beneficio de la productividad y reducción de costes.

El presente estudio describe la caracterización hidrodinámica y puesta en marcha de un reactor columna de burbujeo diseñado para el cultivo a escala piloto de *Synechocystis sp.* El efecto que las condiciones hidrodinámicas establecidas a diferentes flujos de entrada de aire, ejercen sobre la fijación de CO_2 y la aparición del fenómeno de biofloculación, ha sido estudiado en varios modos de cultivo.

Finalmente se ha realizado un cultivo a escala piloto para determinar la fijación de CO_2 según las mejoras sugeridas por los resultados obtenidos a lo largo de cada capítulo de la presente memoria de tesis.

8.2. Material y métodos

8.2.1 Descripción del reactor y sistemas auxiliares

El fotobiorreactor consiste en una columna transparente de 1,7 m de altura total, con un diámetro interno de 0,092 m. La superficie transversal de la columna son $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ y la capacidad total del reactor, 11,3 litros. El volumen de operación de la columna se mantiene en 10 litros, ocupando el líquido una altura de 1,51 m. La zona que queda por encima de esta altura hasta la altura total del reactor es la zona de desorción de gases o zona de desgasificación, cuya amplitud variará en función del flujo de gas introducido. La figura 8.3 muestra el esquema general del reactor con sus equipos auxiliares. El reactor dispone de control y registro de pH, así como registro de temperatura y está iluminado por lámparas fluorescentes colocadas verticalmente abarcando toda la superficie exterior de la columna. Los dispositivos de iluminación variarán en número de lámparas y proximidad a la pared del reactor según la intensidad deseada.

A la entrada de aire se colocó un filtro biológico de venteo con tamaño de poro de 0,2 micras (*Millex-FG₅₀, Millipore*). El aire inyectado atraviesa una placa perforada con 22 orificios de 2 mm de diámetro, situada 20 mm por encima del orificio de inyección (*Fig. 8.4*). En la cabeza del reactor se ha practicado una rosca para el acople del pHmetro y dos orificios, permanente abiertos, que posibilitan la salida de gases. Estos dos orificios permiten además la introducción eventual o continua de las sondas de oxígeno disuelto e intensidad de luz. A lo largo de la columna existen cinco válvulas con conexión de enchufe rápido. Estas válvulas permiten la recogida de muestra en diferentes alturas del reactor cuando se opera en discontinuo o semicontinuo. En modo continuo, la válvula del extremo inferior se utiliza de entrada de medio fresco y la del extremo superior, de salida de cosecha, ambas corrientes impulsadas por una bomba peristáltica (*Watson Marlon Ltd., 505S, Cornwall, Inglaterra*) temporizada según el ciclo luz/oscuridad diario.

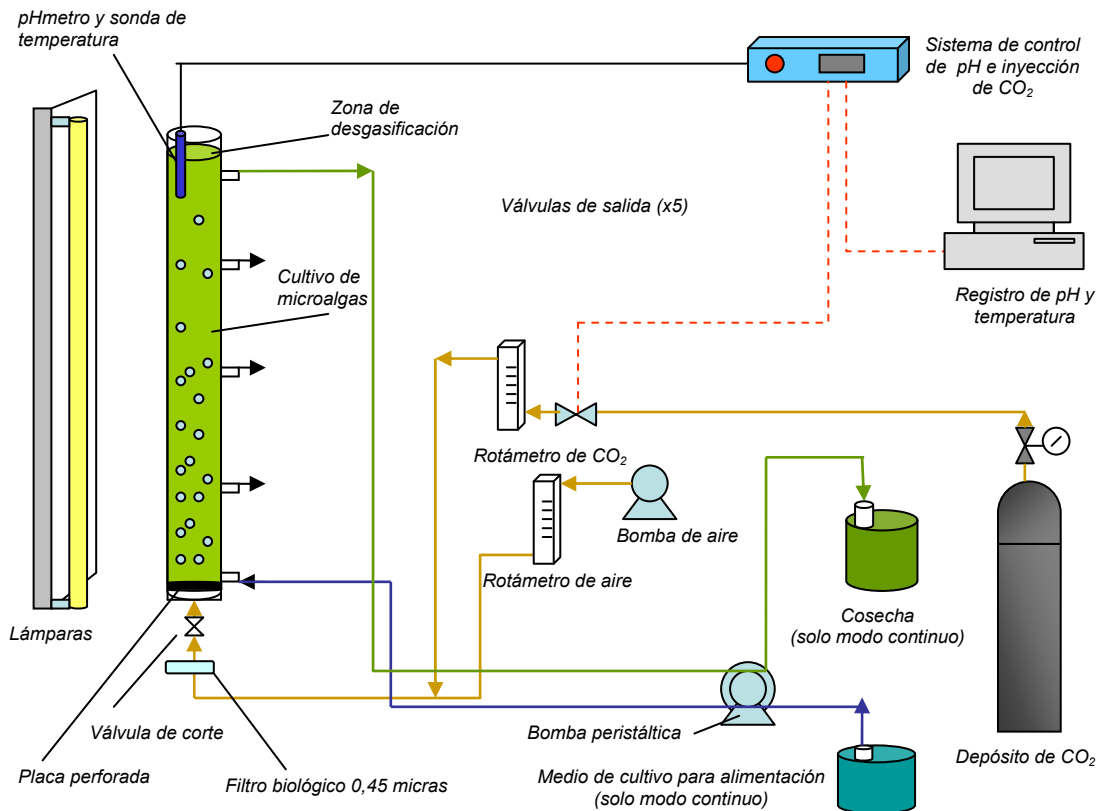


Figura 8.3. Esquema del montaje del fotobiorreactor tipo columna de burbujeo y sistemas auxiliares.

Medida y registro de pH y temperatura

El pH y la temperatura interior del cultivo son medidos continuamente mediante la sonda de pH, que incorpora un sensor de temperatura (*JUMO tecLine pH, Jumo Control, España*). El punto de medición se encuentra a 20 cm por debajo de la cabeza del reactor. La homogeneidad del pH ha sido previamente comprobada, por lo que puede decirse que el valor tomado en la cabeza es representativo. El par de valores pH-temperatura se registra según el intervalo elegido mediante una aplicación de software creada específicamente por el fabricante (*Bioprocess Technology, España*), para este sistema de control.

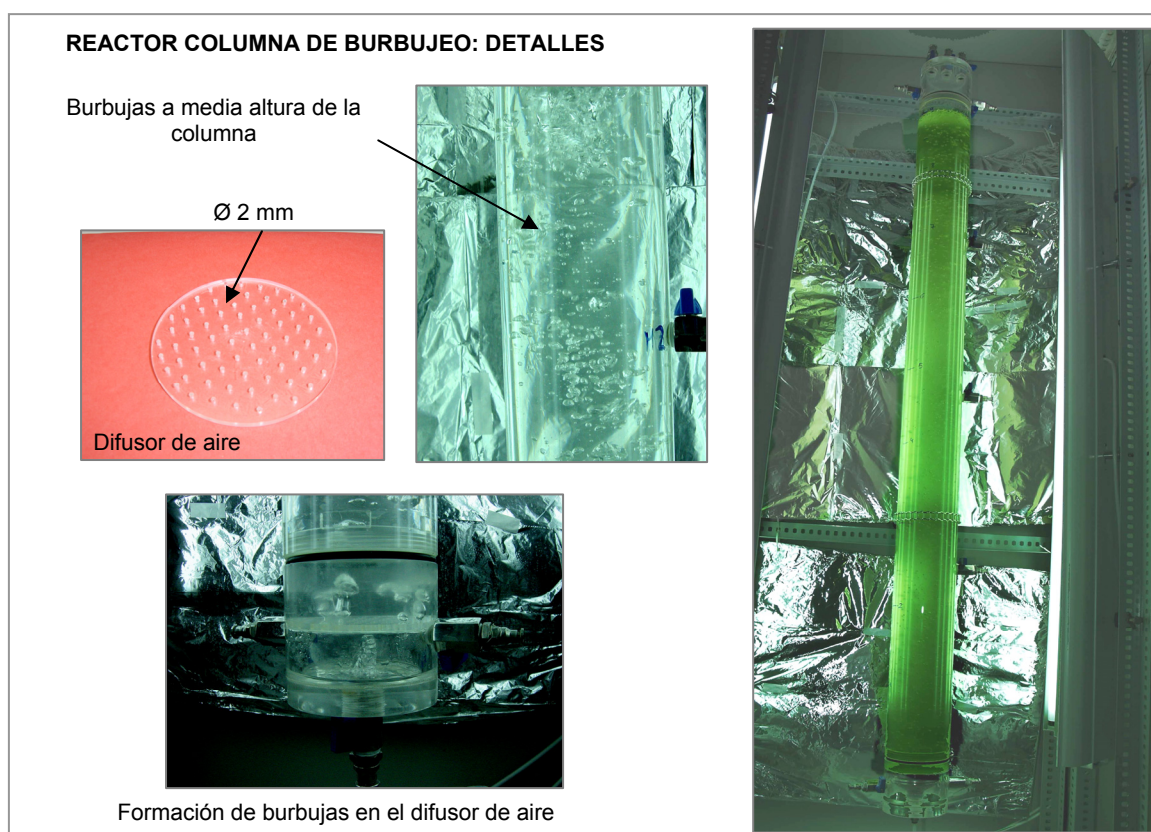


Figura 8.4. Izquierda: Detalles del difusor de aire y formación de burbujas. Derecha: Reactor columna de burbujeo al comienzo de un cultivo discontinuo.

Control de pH y aporte de CO₂

La regulación de pH se realiza mediante la inyección controlada de CO₂ procedente de una bombona comercial (N48, 99% pureza, Air liquide, España). El controlador de pH es de tipo PID (acción proporcional-integral-derivativa) y regula el pH mediante la inyección de CO₂ “a demanda”, según el punto de consigna.

Agitación y desgasificación

La agitación del reactor se lleva a cabo mediante la inyección de aire comprimido desde la parte inferior de la columna. Tanto el flujo de aire como el de CO₂ están regulados mediante rotámetros calibrados para las condiciones de presión de aire a la salida del compresor y de CO₂ a la salida de la bombona. La intensidad de agitación del cultivo se regula mediante la entrada de flujo de aire, entre 0 a 10 l/min. El rotámetro de CO₂

permite establecer diferentes concentraciones de CO₂ en aire, con flujos de 0 a 150 ml/min.

Medida de oxígeno disuelto e intensidad de luz en el interior del cultivo

La concentración de oxígeno disuelto en el seno del cultivo se mide de forma discontinua, introduciendo la sonda (*JUMO tecLine pH, Jumo Control, España*) por uno de los orificios de la cabeza del reactor. Al igual que para el pH, la concentración de oxígeno disuelto es homogénea en la columna, por lo que puede decirse que no existe acumulación en la parte inferior del reactor y que el valor tomado en la cabeza es representativo.

La intensidad de luz disponible para las células se mide en el interior y en el centro del cultivo introduciendo el medidor de irradiancia (*Quantum Scalar Laboratory PAR Irradiance Sensor QSL-2100, Biospherical instruments, EEUU*) por el orificio central superior. La medida es discontinua y se realiza en el centro del reactor, 25 cm por debajo del orificio de cabeza. Se considera que la intensidad de luz incidente sobre las paredes del cultivo es homogénea en toda la superficie de la columna, ya que las lámparas que la rodean han sido distribuidas uniformemente con la altura.

8.2.2 Determinación del grado de mezcla de la columna

El grado de mezcla de un fotobiorreactor comúnmente ha sido determinado mediante el coeficiente de dispersión axial, tiempo de mezcla, tiempo de circulación, etc (*Poulsen e Inversen, 1998, Baquerisse et al, 1999, Babcock, et al., 2002, Sánchez-Mirón et al, 2004*). Sin embargo se sabe que en una columna de burbujeo, comparada con otro tipo de reactores como airlift o tubulares, el grado de mezcla es bueno y las células se mueven rápidamente de pared a pared del reactor, aunque este movimiento no sea ordenado (*Sánchez-Mirón et al, 2004, Luo, et al., 2003*). Teniendo en cuenta estas observaciones, no se va estudiar el grado de dispersión axial en el reactor, sino que se asumirá la hipótesis de mezcla perfecta. Para comprobar si la hipótesis es cierta se va a medir la homogeneidad de varios parámetros en el interior del reactor extrayendo muestras de diferentes zonas y alturas del reactor.

La homogeneidad de la columna fue determinada en función de la concentración de biomasa, pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto (DO). Durante la prueba, el flujo de aire fue el menor de operación en la columna, es decir, 0,5 l/min, de forma que si se comprueba la hipótesis de mezcla perfecta con el menor flujo de aire se podrá asegurar que se va a cumplir también para flujos mayores. Estos parámetros se midieron extrayendo cuidadosamente muestras de cada una de las cinco tomas de muestra de las que dispone la columna y una más de la zona de desgasificación (figura 8.3). Las muestras se tomaron al mismo tiempo y en la misma hora del día durante tres días diferentes de cultivo. Las medidas de pH, temperatura y DO se realizaron inmediatamente después de la extracción de muestra. Para evitar el error por cambio de temperatura en el contacto de la muestra con el recipiente de toma de muestras, éstos se mantuvieron a la temperatura de la cámara de cultivo. Como parámetro indicador de la concentración de biomasa se midió la absorbancia.

El grado de homogeneidad ha sido determinado por *García et al, (1993)* como la desviación estándar entre los valores experimentales tomados para cada parámetro en zonas diferentes de la columna. Para poder comparar la homogeneidad entre los parámetros medidos, se ha definido una nueva ecuación que estima la diferencia en tanto por ciento entre las zonas de toma de muestra de la columna.

$$\% \text{ Diferencia} = S/M \times 100 \quad (8.1)$$

Donde, S es la desviación estándar
M el valor medio de los parámetros medidos en seis zonas de la columna.

8.2.3 Caracterización hidrodinámica de la columna de burbujeo

Velocidad superficial del gas, retención de gas, número de Reynolds, potencia comunicada al fluido.

La velocidad superficial del gas (v_g), con la corrección de presión hidrostática de la columna de agua, se calculó mediante la expresión (*Babcock, et al., 2002*):

$$v_g = \frac{F_g}{A} \cdot \frac{P_{atm}}{P_{1,5m}} \quad (8.2)$$

Donde,	v_g	velocidad superficial del gas, m/s
	F_g	flujo de entrada de aire, m ³ /s
	A	área transversal de la columna, m ²
	P_{atm}	presión atmosférica, Pa
	$P_{1,5m}$	presión existente bajo una la columna de agua de 1,5 metros de altura., Pa

El aumento de volumen en la columna al introducir el aire de burbujeo determina la cantidad de gas que hay en el interior, es decir, la retención de gas, ε . La cantidad de gas presente influye en la velocidad de transferencia de materia y en el grado de turbulencia. La retención de gas ha sido determinada por la diferencia de altura alcanzada en la columna cuando no se burbujea gas (H_L) y con burbujeo de gas (H_L+H_G), como indica *Doran (1995)*:

$$\varepsilon = \frac{H_L}{H_L + H_G} = \frac{V_L}{V_L + V_G} \quad (8.3)$$

Donde,	H_L	altura del líquido cuando el flujo de aire es nulo, m
	H_G	altura en la columna causada por la retención de gas, m
	V_L	volumen del líquido cuando el flujo de aire es nulo, m^3
	V_G	volumen en la columna causada por la retención de gas, m^3

La velocidad de ascensión del líquido, v_L , en una columna de burbujeo con diámetro entre 0,1 y 7,5 m y $0 < v_g < 0,4$ m/s puede calcularse por la relación dada por *Doran, (1995)*:

$$v_L = 0,9 \cdot (g \cdot d_c \cdot v_g)^{0,33} \quad (8.4)$$

Donde,	v_L	velocidad de ascensión del líquido, m/s
	d_c	diámetro de la columna, m
	v_g	velocidad superficial del gas, m/s

El grado de turbulencia dentro de la columna está caracterizado por el número de Reynolds, Re, que se define como el cociente entre las fuerzas de inercia y las fuerzas viscosas:

$$Re = \frac{v_L \cdot d_c \cdot \rho}{\mu_v} \quad (8.5)$$

Donde, Re número adimensional de Reynolds
 d_c es el diámetro de la columna, *m*
 ρ densidad del líquido, *kg/m³*
 μ_v viscosidad del fluido, *Pa·s*

Para sistemas en los que la agitación se consigue únicamente por el burbujeo de aire, la potencia comunicada al fluido, W, se calcula como (Doran, 1995):

$$W = \rho \cdot g \cdot v_g \quad (8.6)$$

Donde, W potencia comunicada al fluido, *w/m³*
 g constante de aceleración de la gravedad, *m/s²*

Todos estos parámetros fueron determinados para el reactor columna de burbujeo conteniendo agua destilada.

Coefficiente de transferencia de materia, k_La

Los flujos de transferencia de materia entre la fase gas y la fase líquida para el CO₂ y el O₂ se definen mediante las ecuaciones siguientes:

$$N_{CO_2} = k_{L,CO_2} \cdot a \cdot (CO_{2,L}^* - CO_{2,L}) \quad (8.7)$$

$$N_{O_2} = k_{L,O_2} \cdot a \cdot (O_{2,L}^* - O_{2,L}) \quad (8.8)$$

Donde, N flujo de transferencia de materia entre fases para cada soluto, *mol/s*
 k_L coeficiente de transferencia para cada soluto, *s⁻¹m⁻¹*

- a diámetro de burbuja, m
- $CO_{2,L}^*$ concentración de CO_2 de equilibrio (o saturación) líquido-gas, mol/m^3
- $O_{2,L}^*$ concentración de O_2 de equilibrio (o saturación) líquido-gas, mol/m^3
- $CO_{2,L}$ las concentraciones de CO_2 disuelto en el líquido, mol/m^3
- $O_{2,L}$ las concentraciones de O_2 disuelto en el líquido, mol/m^3

La constante k_L define la velocidad de la transferencia entre fases y de ella va a depender el proceso. k_L normalmente se determina de forma experimental junto al parámetro a , de modo que el coeficiente $k_L a$ determina la velocidad de la transferencia del CO_2 y el O_2 entre fases, que depende del grado de turbulencia y del tamaño de burbuja.

Si consideramos la transferencia de CO_2 y O_2 como procesos físicos puros, es decir, sin tener en cuenta la producción y consumo de los mismos en un cultivo fotoautótrofo (*Baquerisse et al., 1999*), sus respectivos coeficientes de transferencia de materia están relacionados por las difusividades en medio acuoso según la relación propuesta por *Livansky y Doucha (1999)*:

$$K_{L,a,CO_2} = K_{L,a,O_2} \cdot (D_{CO_2}/D_{O_2})^{1/2} \quad (8.9)$$

La raíz de la relación entre difusividades ha sido estimada como 0,90 (*Molina-Grima et al., 1999*), por lo que solamente será necesario determinar uno de los dos coeficientes. La determinación experimental de estos coeficientes requiere un método de medición rápido y preciso de la concentración de O_2 y CO_2 disueltos. El coeficiente de transferencia del oxígeno ha sido determinado en agua destilada, medio de cultivo *Mann&Myers* y en cultivos de *Synechocystis sp.* con concentraciones de biomasa entre 0,5 y 1,5 g/l, utilizando el método dinámico descrito en *Doran, 1995* (ver Anexo II).

8.2.4. Preparación del inóculo y modos de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en los experimentos de crecimiento descritos en este capítulo fue *Mann&Myers*. El reactor fue inoculado, con biomasa procedente de cultivos obtenidos en el laboratorio como se ha descrito en el apartado 4.2.4, a una concentración de 0,1 g/l y se deja crecer en modo discontinuo durante tres días. El cuarto día el cultivo se diluye a $0,5 \pm 0,1$ g/l, que es la concentración inicial de biomasa para todos los experimentos en cada uno de los modos de cultivo.

En cada modo de cultivo se probaron diferentes flujos de inyección de aire entre 0,5 y 5 l/min. El pH fue fijado en 7,5 y la intensidad de luz sobre la pared del reactor fue de $600 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, en cambio, en el interior del reactor, a $C_b=0$, la intensidad alcanzada fue de $740 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Todos los cultivos se realizaron en fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Modo semicontinuo a 1 día. El régimen de cultivo semicontinuo fue establecido por dilución diaria (*semicontinuo 1*) del volumen de cultivo necesario para fijar la concentración de biomasa de partida a 0,5 g/l. De este modo se realizaron diferentes cultivos a 1, 3 y 5 l/min. La estabilización del cultivo se alcanza cuando se observan productividades similares durante tres días seguidos. La productividad y fijación de CO₂ diarias se calculan de acuerdo a las ecuaciones 5.3 y 6.8, respectivamente.

Modo semicontinuo a 2 días. Este modo de cultivo consiste en llevar a cabo un cultivo discontinuo a partir de una concentración de biomasa inicial durante un cierto periodo de tiempo para a continuación diluir la suspensión a la concentración de partida. En este caso el cultivo se dejó crecer en discontinuo durante dos días seguidos (*semicontinuo 2*) a diferentes flujos de aire de entrada (1, 2, 3 y 4 l/min). La productividad y fijación de CO₂ fueron estimadas, de acuerdo con las ecuaciones 5.3 y 6.8 entre los puntos iniciales y finales del cultivo (i =momento inicial, $i+1$ =momento final del cultivo discontinuo).

Modo continuo. Los cultivos en modo continuo fueron realizados por adición continua medio de cultivo y extracción de suspensión de biomasa. La velocidad de dilución fue fijada en $0,014 \text{ h}^{-1}$, es decir, 3,5 litros cada 24 horas, diluyendo únicamente durante el periodo iluminado. Durante este modo de cultivo se estudiaron las productividades a

flujos de gas de 0,5, 1, 3 y 5 l/min. Para sistemas que operan en continuo a una velocidad de dilución, D , determinada, la productividad, P , se calculó como el producto de la velocidad de dilución por la concentración de biomasa en estado estacionario, $C_{b_{estac}}$, (Acién-Fernández *et al*, 2003). Del mismo modo, y a partir del valor de TOC diario puede determinarse la fijación de CO_2 , F :

$$P = D \cdot C_{b_{estac}} \quad (8.10)$$

$$F = D \cdot TOC \cdot \frac{44}{12} \quad (8.11)$$

El estado estacionario se alcanza cuando se ha intercambiado un volumen de medio de cultivo igual a 2,5 veces el volumen del reactor.

8.2.5. Métodos analíticos.

Las medidas de la concentración de biomasa y TOC fueron realizadas a partir de muestras homogéneas tomadas cada día a la misma hora. La concentración de biomasa y TOC se midieron según se ha indicado en el capítulo 4. El daño por estrés de cizalla o hidrodinámico fue determinado mediante medidas de viabilidad celular por citometría de flujo (ver capítulo 4, Material y Métodos). El contenido de exopolisacáridos excretados (EPS) por las células al medio de cultivo fue determinado como se indicó en el capítulo 4, Material y Métodos Generales.

La densidad y viscosidad de la suspensión de biomasa fueron determinados a 25° C mediante una balanza de Mohr-Westphal y un viscosímetro de Oswald.

Análisis estadístico.

Los resultados del experimento han sido analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre los parámetros de cada especie fueron determinadas por el test de Tukey, a un nivel de significación del 95% ($p=0,05$).

Para la determinación de los parámetros de ajuste a ecuaciones no lineales se utilizó el software *Origin 6.1*.

8.3. Resultados y discusión.

8.3.1. Puesta en marcha del reactor

La figura 8.5 muestra la diferencia porcentual entre los valores de los parámetros pH, DO y absorbancia medidos en seis zonas o alturas de la columna, calculada según la ecuación 8.1. Existe muy poca diferencia entre los valores de pH y temperatura, siendo la mayor del 3%, indicando que pH y temperatura son homogéneos en toda la columna. En cambio las diferencias para la concentración de oxígeno y absorbancia son mayores, mostrando diferencias del 9% como máximo entre diferentes puntos de la columna. Las medidas en cada punto de toma revelan que la absorbancia disminuye con la altura y que el DO suele ser mayor en la zona inferior. Estas diferencias son razonables, ya que un cultivo es una suspensión de células que por su peso, siempre mostrarán tendencia a acumularse en la parte inferior del reactor, siendo la inyección de aire lo que las impulsa hacia las partes altas. La acumulación de oxígeno en las partes bajas se debe a la dificultad de difusión del gas hacia la zona de desorción.

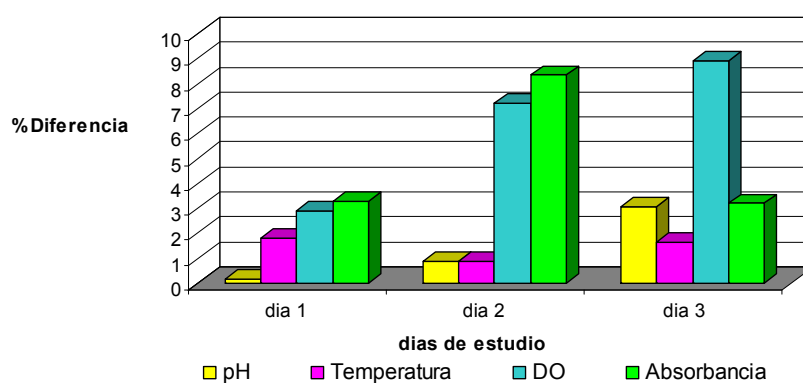


Figura 8.5. Diferencia porcentual que define el grado de homogeneidad en el reactor columna de burbujeo de 9 litros.

A la vista de estos resultados puede concluirse que la columna es homogénea en cuanto a pH y temperatura y que existe un pequeño grado de heterogeneidad, con diferencias máximas del 9% en cuanto al DO y a la concentración de biomasa. Por tanto, a la vista de estos resultados se asume la hipótesis de mezcla completa.

8.3.2. Comportamiento hidrodinámico del reactor

En la figura 8.6a se han representado la velocidad del líquido (v_L) y la retención de gas (ϵ), y en la 8.6b, el número de Reynolds (Re) y potencia comunicada al fluido (W), todos ellos en función de la velocidad superficial del gas (v_g) correspondiente a los flujos de aire inyectados en la columna de 0 a 5 l/min. Como se puede ver en la figura 8.6, para los flujos probados, v_g varía entre 0 y 0,0110 m/s. Estas velocidades del gas son bajas respecto a las publicadas en estudios de columnas de burbujeo (*Poulsen e Iversen, 1998, Babcock et al., 2002, Barbosa et al., 2003c, Sanchez-Mirón et al., 2004*), sin embargo, la turbulencia observada se estimó suficiente para la agitación del cultivo y no se continuó aumentando el flujo de aire.

El valor de la retención de gas, determinado a la mayor velocidad superficial de operación, 0,0110 m/s, es de 0,05, seis veces menor que el máximo teórico calculado para columnas de burbujeo (*Chisti, 1989*). La retención de gas parece aumentar linealmente con la velocidad del gas. Sin embargo, según *Van't Riet y Tramper, (1991)* la retención del gas para columnas de burbujeo puede calcularse conociendo la velocidad superficial de gas, según la ecuación siguiente:

$$\epsilon = 0,6 \cdot v_g^{0,7} \quad (8.12)$$

En la figura 8.6a puede verse cómo los valores experimentales de retención de gas correlacionan bien ($R^2=0,93$) con la ecuación de *Van't Riet y Tramper, (1991)* (ec. 8.12) a v_g bajas pero se distancia de ese comportamiento a las mayores velocidades del gas probadas. Posteriormente *Babcock et al., (2002)* encontró que sus datos experimentales no se ajustaban bien a la ecuación de *Van't Riet y Tramper (1991)* a v_g mayores de 0,018 m/s, pero sí se ajustaban a una relación lineal. Del mismo modo, los valores aquí encontrados ajustan mejor a una ecuación lineal que exponencial del tipo de la ecuación 8.12. La regresión lineal de los datos experimentales estima un ajuste del 98% de los datos experimentales a la ecuación siguiente:

$$v_g = 3,1618\epsilon + 0,0014 \quad (8.13)$$

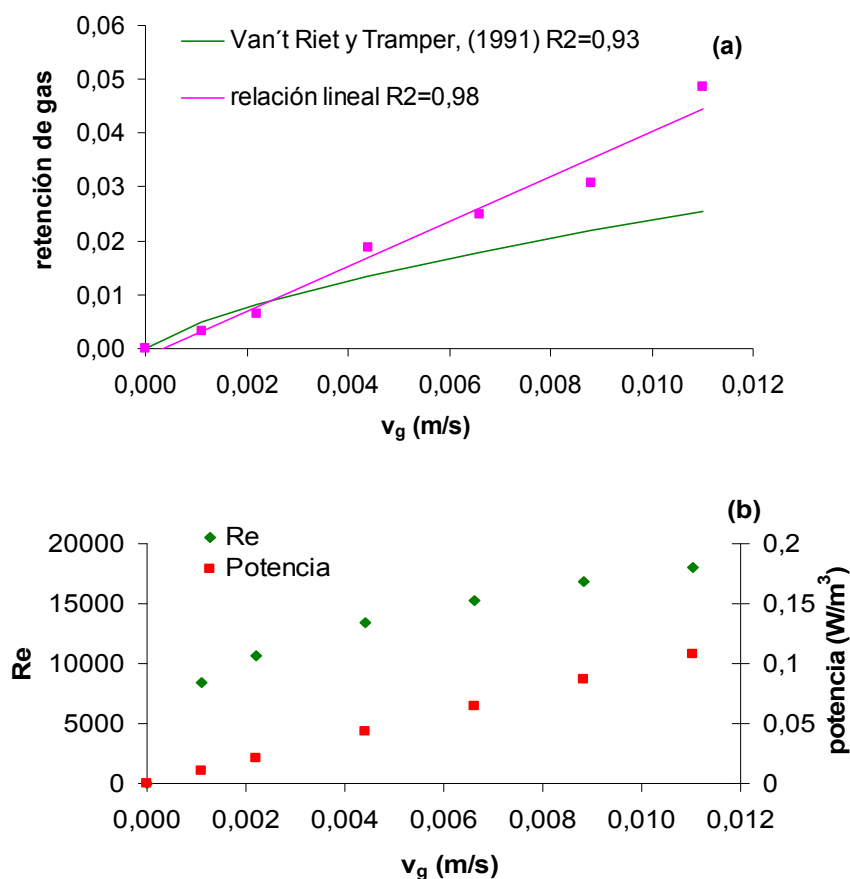


Figura 8.6. Parámetros hidrodinámicos característicos para el reactor columna de burbujeo en función de la velocidad superficial del gas, v_g . (a) Retención de gas. (b) Número de Reynolds y potencia comunicada al fluido.

En cuanto al grado de turbulencia definido por el número de Reynolds, calculado para el agua destilada, se muestra en la figura 8.6b. Según *Babcock et al., 2002*, para $Re > 3000$ el régimen de flujo es turbulento en columnas de burbujeo. El aumento de la turbulencia con la velocidad del gas es más acusado a bajas velocidades superficiales, por debajo de 0,0066 m/s, donde pequeños cambios en v_g producen grandes cambios en el grado de turbulencia. En cambio, la potencia comunicada al fluido sigue una relación lineal con v_g indicando un aumento de potencia que no genera el aumento proporcional del grado de turbulencia. Por lo que a este nivel de turbulencia, velocidades superficiales por encima de 0,0066 m/s el flujo inyectado ya no va a mejorar de forma sustancial la agitación del fluido.

Los coeficientes de transferencia de materia para el oxígeno, determinados en agua destilada, medio *Mann&Myers* y cultivo de biomasa de *Synechocystis* sp. (a 25° C

$\rho=993 \text{ kg/m}^3$ y $\mu_v=1,21 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) a diferentes velocidades superficiales del gas se han recogido en la figura 8.7, donde puede apreciarse que apenas existen diferencias entre la transferencia de materia en agua destilada y en medio de cultivo, pero cuando ésta se mide en la suspensión de cultivo celular la transferencia de materia se ve fuertemente incrementada.

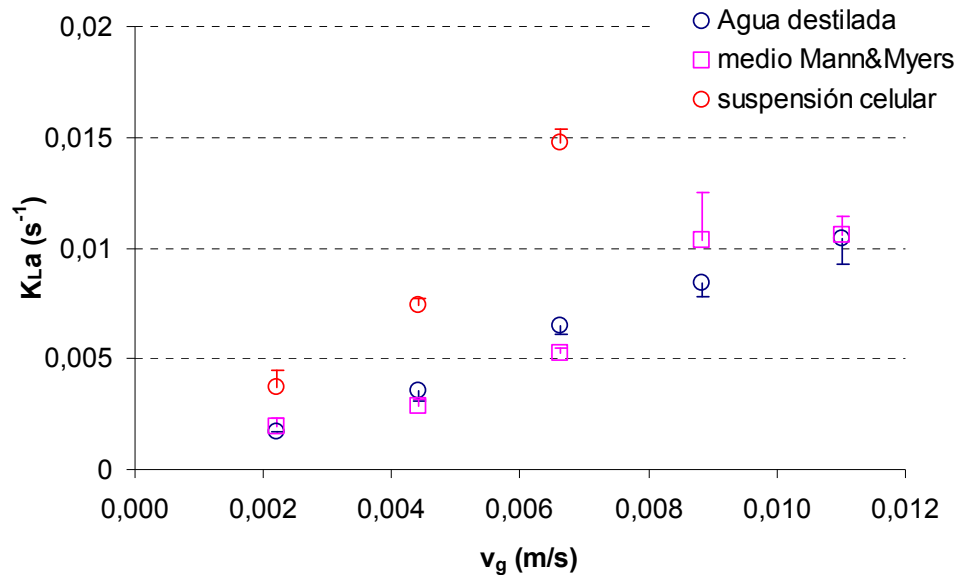


Figura 8.7. Coeficiente de transferencia de materia para el agua destilada, medio de cultivo Mann&Myers y suspensión de biomasa, medidos a velocidades superficiales del gas entre 0,022 y 0,011 m/s.

Los coeficientes de transferencia de materia para el oxígeno en la columna de burbujeo en el rango de velocidades superficiales de operación entre 0,002 y 0,011 m/s para el agua destilada van desde $2,20 \cdot 10^{-3}$ a $9,20 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y para el medio M&M desde $2,20 \cdot 10^{-3}$ a $10,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos por *Babcock et al.*, (2002) en una columna de burbujeo con agua destilada, pero necesitando mayores velocidades superficiales del gas: sus valores máximos de k_{La} para el oxígeno fue en torno a $0,022 \text{ s}^{-1}$ cuando la v_g era tres veces superior de la mayor aquí probada. *Merchuck et al.*, (2000) que trabajaron con velocidades superficiales del gas más cercanas a las de este estudio, en una columna de burbujeo de 13 litros, encuentra un valor de k_{La} de $4,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a v_g de 0,008 m/s para agua destilada. Para la misma velocidad superficial del gas, en este estudio se ha encontrado una k_{La} , de casi el doble, $8,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ en agua destilada. Comparando nuestros datos con los de estos autores, los

valores de $k_L a$ mostrados en la figura 8.7 son mayores o se alcanzan a velocidades superficiales del gas menores.

Los valores de $k_L a$ para la suspensión de biomasa son difíciles de comparar, ya que no suelen ser determinados en cultivos reales. Sin embargo, el hecho de que los coeficientes de transferencia de materia aquí encontrados para agua destilada sean mayores que los obtenidos por otros autores para sistemas de cultivo de microalgas, permite poder afirmar que la transferencia de materia en la columna de burbujeo escala piloto es adecuada para facilitar el intercambio de O₂ y CO₂ que requiere un cultivo de microalgas.

Para un burbujeador rígido como el utilizado en el presente estudio, varios autores (*Buckhart y Deckwer, 1976, Heijnen, y van't Riet, 1984, Poulsen e Iversen, 1998*) han propuesto correlaciones matemáticas para calcular los coeficientes de transferencia de materia en función de v_g , que al igual que la retención del gas, siguen una relación exponencial del tipo:

$$k_L a = a \cdot v_g^b \quad (8.14)$$

Donde, a y b parámetros estimados por la regresión no lineal de los datos experimentales.

Las ecuaciones de ajuste a la ecuación 8.14 de los coeficientes de transferencia de materia experimentales para agua destilada, medio de cultivo y suspensión de biomasa se han recogido en la tabla 8.1. Se comprobó que los datos experimentales de $k_L a$ para agua destilada y medio M&M, ajustan bien a este tipo de ecuación, tal como indican los coeficientes de regresión. Debido a la dificultad que entraña la medida de $k_L a$ en un cultivo de biomasa en crecimiento, solo se midió para tres velocidades del gas (Fig. 8.7) y se buscaron sus parámetros de ajuste al modelo propuesto. El ajuste para los datos experimentales de $k_L a$ medidos en la suspensión de biomasa, descrito por la ecuación 8.17, permitirá disponer del coeficiente de transferencia de materia en el rango de velocidades utilizadas sin necesidad de realizar la medida experimental.

Tabla 8.1. Modelo y coeficiente de regresión para obtenidos en el ajuste de los datos experimentales de k_{La} medidos en la columna de burbujeo.

Modelo	R ²	Ecuación de ajuste	
Agua destilada	0,97	$k_{La}=2,72 \cdot v_g^{1,21}$	(8.15)
Medio M&M	0,91	$k_{La}=1,10 \cdot v_g^{1,07}$	(8.16)
Suspensión de biomasa	0,97	$k_{La}=17,00 \cdot v_g^{1,40}$	(8.17)

($\rho=993 \text{ kg/m}^3$, $\mu_v=1,21 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$)

La tabla 8.2 resume los resultados del cálculo y estimación de los coeficientes de transferencia del O₂ y CO₂, teniendo en cuenta la relación $K_{LaCO_2}=0,90 K_{LaO_2}$, para los flujos de aire o velocidades del gas de 0,002 a 0,011 m/s, correspondientes a flujos de entrada de aire en la columna de 1 a 5 l/min.

Tabla 8.2. Coeficientes de transferencia de materia obtenidos en el presente estudio para velocidades superficiales del gas entre 0,002 y 0,011 m/s.

Tipo líquido	$k_{La,O_2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{La,CO_2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Agua destilada	$1,16 \cdot 10^{-3} - 11,6 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \cdot 10^{-3} - 11,4 \cdot 10^{-3}$
Medio de cultivo	$1,58 \cdot 10^{-3} - 8,85 \cdot 10^{-3}$	$1,40 \cdot 10^{-3} - 7,96 \cdot 10^{-3}$
Suspensión de biomasa	$3,10 \cdot 10^{-3} - 29,6 \cdot 10^{-3}^*$	$2,80 \cdot 10^{-3} - 26,6 \cdot 10^{-3}^*$

($\rho=993 \text{ kg/m}^3$ y $\mu_v=1,21 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$)

*Valores calculados según ecuación 8.17.

Aunque algunos autores consideran que estas expresiones no son muy útiles, en realidad son una herramienta rápida para calcular, solamente en función del flujo de aire, si la transferencia de materia (ec. 8.7 y 8.8) del oxígeno y dióxido de carbono, es suficiente o limitante para alcanzar una productividad teórica estimada según la intensidad de luz disponible en función de la configuración del reactor (*Babcock et al., 2002, Molina-Grima, et al, 1999*).

8.3.3. Cultivos de *Synechocystis sp.* en el fotobiorreactor escala piloto.

Una vez que se conoce el comportamiento hidrodinámico del reactor columna de burbujeo, se estudió el efecto que los diferentes grados de turbulencia causan sobre la fijación de CO₂. El estudio se realizó en régimen continuo, con concentraciones de biomasa estacionarias entre 0,5 y 1,5 g/l. A estas concentraciones de biomasa la densidad y viscosidad, medidos a 25° C, son constantes e iguales a 993±1 kg/m³ y 1,21±0,11 10⁻³ Pa·s, respectivamente. A densidad y viscosidad constantes, el grado de turbulencia depende únicamente de la velocidad del gas en la columna, o lo que es lo mismo, del flujo de entrada de aire. La figura 8.8 muestra la fijación de CO₂ por *Synechocystis sp.* a diferentes velocidades superficiales del gas, correspondientes a los flujos de aire entre 0,05 y 0,5 l/min por litro de cultivo. Cada punto representa el valor medio y desviación estándar de tres réplicas. Las letras sobre los valores medios de fijación de CO₂ diaria indican valores estadísticamente diferentes (p<0,05). Los resultados reflejan que la fijación de CO₂ máxima tiende a aumentar al aumentar la velocidad superficial del gas hasta v_g de 0,0066 m/s o 3 l/min, donde se obtiene una fijación de CO₂ de 0,703±0,128 g/l/d. A velocidades superficiales mayores el aumento de turbulencia no produce diferencias significativas en la fijación de CO₂. Por ello, puede afirmarse que aumentos en la velocidad de superficial del gas por encima de v_g=0,0066 m/s o 3 l/min no mejorarán la fijación de CO₂.

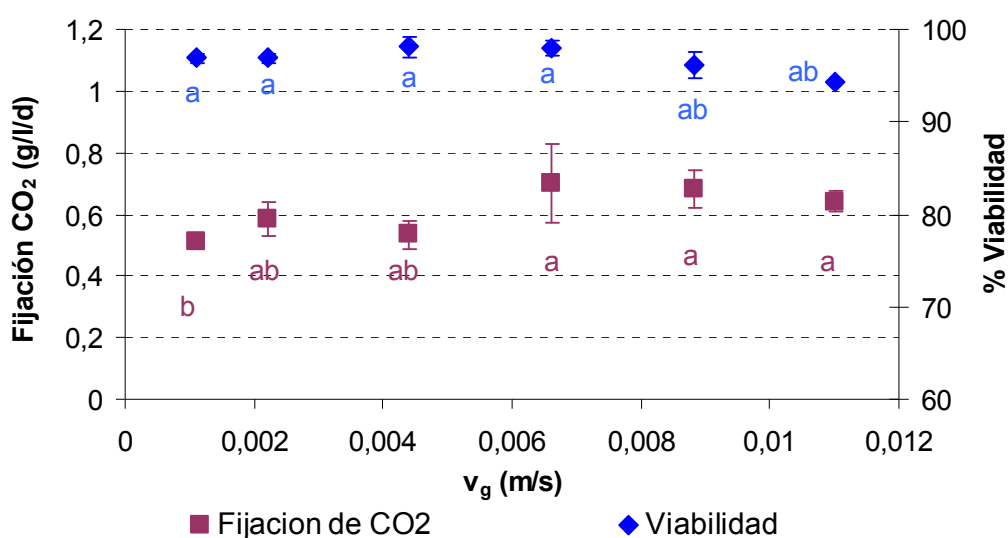


Figura 8.8. Fijación de CO₂ por *Synechocystis sp.* y viabilidad celular en función de la velocidad superficial del gas, para cultivos en régimen continuo.

Sin embargo, el hecho de que la fijación de CO₂ no aumente con la turbulencia a partir de $v_g=0,0066$ m/s puede estar relacionado con el estrés hidrodinámico que lleguen a sufrir por las células de *Synechocystis sp.* a estas altas turbulencias. Los resultados de viabilidad celular, mostrados en la figura 8.8, reflejan el porcentaje de células intactas en el total de la muestra, observándose que no existen diferencias significativas claras en la viabilidad celular, aunque parece que a altas turbulencias la viabilidad desciende un poco. Para todas las velocidades, la viabilidad se mantuvo entre el 94 y 98 %. Las muestras observadas al microscopio presentaban una pared celular definida, corroborando las medidas de viabilidad. Este resultado ya se esperaba porque las células de *Synechocystis sp.* son robustas debido a su forma esférica y pequeño tamaño. El daño por estrés hidrodinámico está relacionado con la teoría de Kolmogorov y la disipación de energía en micro-remolinos (Trujillo-Roldán, et al., 2006). A mayor potencia de burbujeo, mayor energía por disipación de turbulencia y menor es el tamaño de los micro-remolinos producidos por la turbulencia. Cuando el tamaño de los remolinos es similar al tamaño celular, pueden romper la pared celular. Brindley-Álías y colaboradores (2004) comprobaron que, en columnas de burbujeo con velocidades superficiales del gas de hasta 0,035 m/s, muy superior a la máxima aquí utilizada (0,011 m/s), el menor tamaño de los micro-remolinos fue de 40 μm , que es entre 10 y 20 veces el tamaño de una célula de *Synechocystis sp.* Por tanto, queda descartado que las altas turbulencias de los mayores flujos o v_g en la columna de burbujeo causen la rotura de la pared celular, es decir, un daño celular irreversible.

Pero que no haya rotura de la pared celular, no implica que no exista un daño subletal por estrés hidrodinámico, que podría estar relacionado con la formación de agregados celulares o fenómeno de biofloculación encontrada durante los ensayos en continuo. La figura 8.9 muestra el aspecto de los agregados a simple vista y a escala microscópica. Parece que las células se unen por fuerzas débiles, ya que la agitación hace desaparecer los agregados o los reduce a un tamaño no detectable a simple vista. En cuanto la biomasa se queda en reposo, comienza de nuevo a agregarse, observándose que después de 20 minutos en reposo, el 70 % de la biomasa había precipitado. En cambio, mientras permanecen en el reactor, los agregados son más pequeños o no se detectan directamente.

Una forma de detectar un estado de estrés en cianobacterias consiste en la observación de su producción de polisacáridos, ya que se ha documentado que la secreción de polisacáridos por cianobacterias ocurre cuando se dan condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento (Moreno *et al.*, 1998). Además, la presencia de polisacáridos en el medio facilitaría la formación de la matriz polimérica que constituye y une el flóculo. En un medio altamente turbulento las células podrían sufrir estrés hidrodinámico y comenzar a excretar polisacáridos como mecanismo de protección (Schryver, *et al.*, 2008). Así, la célula que se encuentre en el interior está protegida del esfuerzo de corte que provoca un régimen turbulento. De este modo, el incremento de polisacáridos en el medio indicaría estrés hidrodinámico.

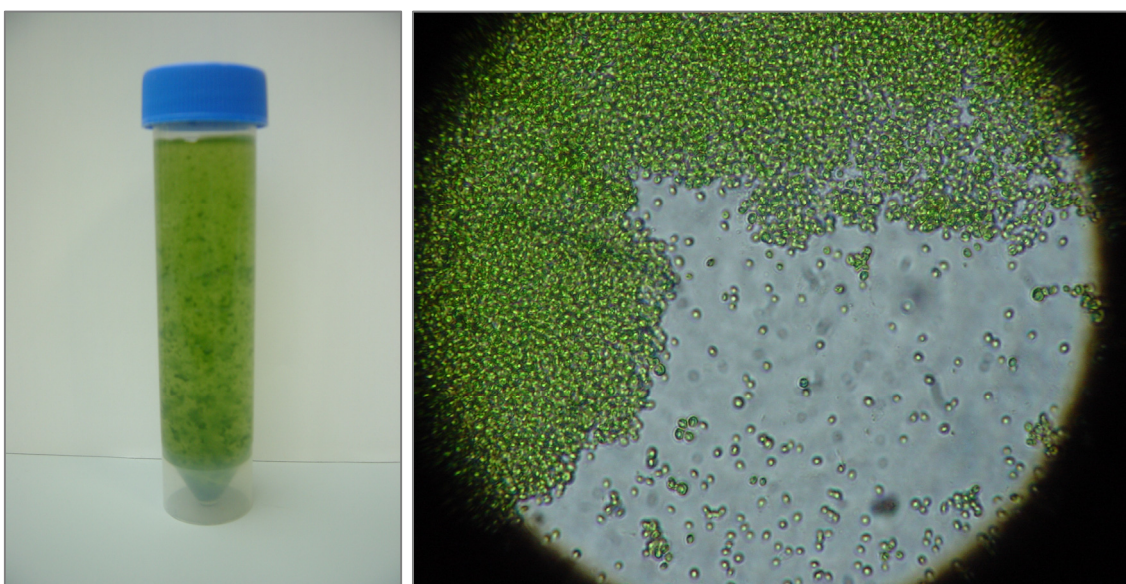


Figura 8.9. Biofloculación de células de *Synechocystis sp.* durante su cultivo en modo continuo en el reactor columna de burbujeo. Izquierda: formación de bioflóculos instantes después de la toma de muestra. Derecha: fotografía de un agregado tomada al microscopio (x40).

La aparición de agregados fue presente en todos los flujos de aire, excepto para el menor: 0,5 l/min o v_g de 0,0011 m/s. Para establecer si existe relación entre el fenómeno de agregación con el estrés hidrodinámico se estudió la presencia en el medio de cultivo de polisacáridos excretados (exopolisacáridos, EPS) por *Synechocystis sp.*, a diferentes estados de turbulencia del cultivo continuo. En la figura 8.10 ha sido representada la producción de EPS a diferentes velocidades superficiales del gas y su efecto sobre la

fijación de CO_2 en el cultivo continuo, anteriormente presentado. La figura 8.10 muestra cómo la cantidad de exopolisacáridos por gramo de biomasa disminuye con la velocidad superficial del gas, al contrario que la fijación de CO_2 y no se observan diferencias en el cambio de régimen laminar a turbulento.

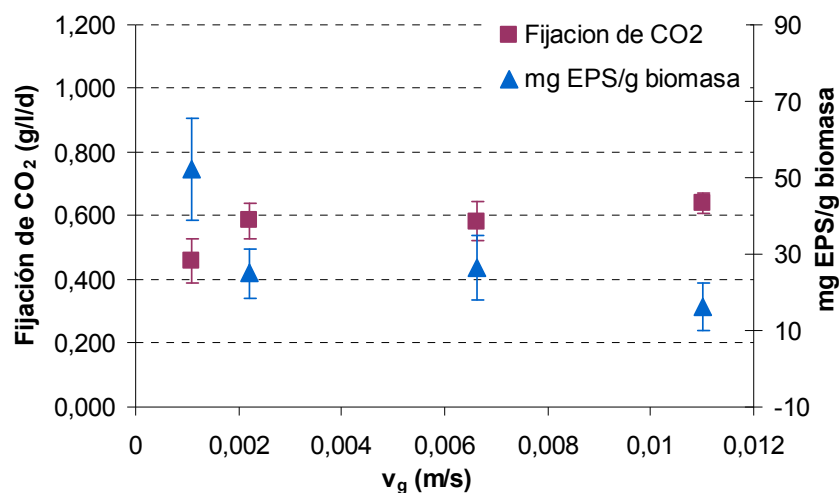


Figura 8.10. Fijación de CO_2 (g/l/d) y gramos de exopolisacáridos por gramo de biomasa a diferentes velocidades superficiales del gas (0,0011, 0,0022, 0,0066 y 0,011 m/s).

Estos resultados indican la tendencia contraria a lo que se esperaba y la cianobacteria parece estar produciendo menos EPS con el aumento de turbulencia. Además, *Moreno et al., 1998*, encontraron concentraciones de EPS en cultivos continuos de *Anabaena sp.* ATCC 3347, de hasta 14 g/l, mucho mayores que las aquí encontradas para *Synechocystis sp.*, cuyos valores máximos en estado estacionario es de 0,03 g/l, donde no se observó el fenómeno de agregación, a pesar de que utilizaron flujos de aire mayores que en este estudio. Por tanto, debe concluirse que no se puede establecer una relación entre la producción de EPS y la existencia de agregación por dos razones. Por un lado, la aparición de bioflóculos se desvincula de la producción de polisacáridos, puesto que a la velocidad superficial del gas donde no apareció biofloculación es donde la cantidad de polisacáridos es mayor. Y por otro lado, la cianobacteria no responde al mayor grado de turbulencia segregando polisacáridos.

Una vez comprobado que el fenómeno de floculación, que aparece tanto en régimen laminar como en turbulento de cultivos continuos de *Synechocystis sp.*, no está

aparentemente relacionado con la producción de EPS, se estudió cómo los diferentes modos de cultivo en el reactor columna afectan a la fijación de CO₂ y a la aparición de agregados. Los diferentes modos de cultivo fueron analizados tanto en régimen laminar, a v_g 0,0022 m/s, como turbulento, a 0,0066 m/s, correspondiendo a flujos de entrada de aire de 1 y 3 l/min. Los resultados de fijación de CO₂ encontrados para los diferentes modos de cultivo y flujos de entrada de aire han sido reflejados en la figura 8.11. Cada punto representa el valor medio y desviación estándar de tres réplicas. Las letras sobre los valores medios de fijación de CO₂ diaria indican valores estadísticamente diferentes tras el análisis de varianza entre los modos de cultivo a cada una de las velocidades ensayadas.

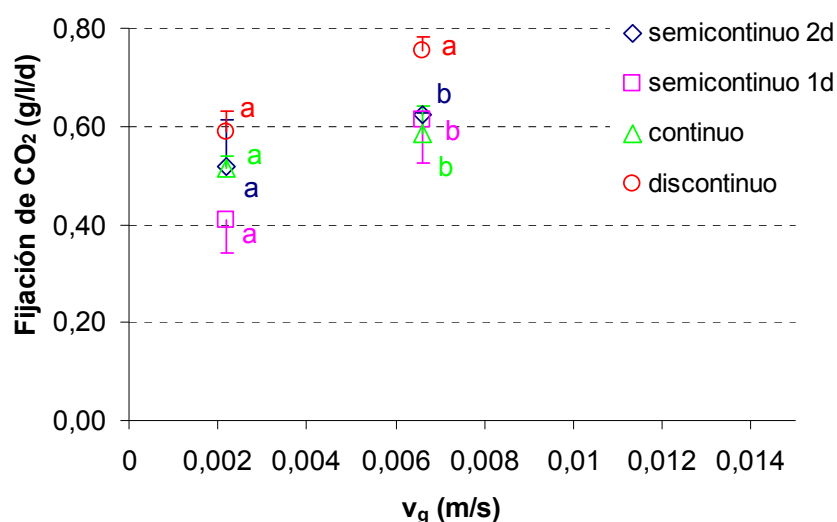


Figura 8.11. Fijación de CO₂ diaria (g/l/d) por *Synechocystis* sp. en diferentes modos de cultivo, realizados en el reactor columna de burbujeo escala piloto.

En cuanto a la aparición de agregados, en todos los modos de cultivo que implicaban una extracción de cosecha y adición de nuevo medio de cultivo, incluso cada dos días, se encontraron agregados. Únicamente el cultivo discontinuo transcurre sin que exista biofloculación. Por tanto, únicamente en modo discontinuo se evita la formación de agregados, obteniéndose como consecuencia una mejora en el crecimiento y cantidad de CO₂ fijado. Este resultado corrobora las afirmaciones que se expusieron al principio del capítulo, argumentando que el fenómeno de agregación disminuye la capacidad fotosintética y metabólica del microorganismo cultivado, por lo que debe evitarse.

El hecho de que no aparezcan agregados en cultivos discontinuos ha tener relación con el intercambio de medio de cultivo. Si las células crecen en un cultivo discontinuo, todas las sustancias que puedan segregarse se acumularán en el medio de cultivo, entre ellas los exopolisacáridos. Todas estas sustancias junto a la biomasa celular acumulada durante el cultivo pueden hacer que las propiedades de éste cambien, especialmente su viscosidad. Según la definición del número de Reynolds (ec. 8.5), el grado de turbulencia se reduce al aumentar la viscosidad. Como se ha comprobado en este estudio, la viscosidad de cultivos de *Synechocystis sp.* entre 0,5 y 1,5 g/l, fue prácticamente constante alrededor del valor de $1,21 \cdot 10^{-3}$ Pa·s, indicando que a una velocidad de dilución de $0,014 \text{ h}^{-1}$ la viscosidad del cultivo no varía. Por tanto, para poder esclarecer las causas de la floculación serían necesarias investigaciones adicionales que comprueben la veracidad de estos razonamientos. En este caso la ayuda de la bibliografía no ha sido muy útil ya que no se han encontrado estudios que reflejen este fenómeno en cultivos de microalgas unicelulares.

La mayor fijación conseguida en el reactor escala piloto, $1,02 \pm 0,16 \text{ g/l/d}$ para el cultivo sin presencia de agregados, se queda casi a la mitad de los $2,07 \text{ g/l/d}$ encontradas en los reactores escala laboratorio de 1 litro (capítulo 7). Estas diferencias son debidas principalmente a la cantidad de luz disponible, que en estos ensayos ha sido mucho menor. Teniendo en cuenta que las concentraciones de biomasa durante todos los ensayos aquí presentados ha variado entre un mínimo de $0,5 \text{ g/l}$ y un máximo de $1,5 \text{ g/l}$, la I_{av} para las células, calculada con K_{at} y K_{max} estimadas para *Synechocystis sp.* en el capítulo 5, estará entre 110 y $215 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$, frente a los $686 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ de media para la mejor fijación alcanzada en los ensayos del capítulo 5.

8.3.4. Cultivo de *Synechocystis sp.* en las mejores condiciones obtenidas a lo largo del presente trabajo.

Las condiciones de cultivo encontradas en el capítulo 7 que proporcionaron la mayor fijación de CO_2 en la región experimentada se reprodujeron en la columna de burbujeo escala piloto, imitando el modo de cultivo, semicontinuo, y velocidad de dilución establecidas para los cultivos a escala laboratorio de 1 litro de capacidad. Las condiciones de mejor operabilidad obtenidas en el capítulo anterior fueron: pH 7,2, $35,3^\circ \text{ C}$ de temperatura y $1807 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ de intensidad exterior, I_{ext} , o $686 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ de

intensidad de rampa interior promedio ($I'_{av,r}$), condiciones con las que se consiguió la mejor fijación de CO₂ encontrada durante este estudio para la cianobacteria autóctona *Synechocystis* sp.: 2,07 g CO₂ por litro de cultivo y día.

La evolución de este cultivo semicontinuo en la columna de burbujeo se ha presentado en la figura 8.12. En esta ocasión, se ha dejado dos días más para la estabilización del cultivo, que comprende el periodo desde el comienzo del cultivo al día 6. Los tres días siguientes (7, 8 y 9), es el periodo de cultivo estabilizado, variando entre concentraciones iniciales y finales en torno a 0,5 y 1,0 g/l respectivamente y donde se toman los datos para calcular la fijación correspondiente para las mejores condiciones de operación encontradas. Cada uno de estos tres días se considera un pseudoréplica para cálculos estadísticos.

Como puede verse en la figura 8.12, al final del cultivo semicontinuo se cambia a modo discontinuo durante los días 10, 11 y 12, donde podemos apreciar cómo la concentración de biomasa aumenta hasta 1,90 g/l. Para el modo discontinuo, la fijación de CO₂ está representada por los símbolos triangulares huecos. La evolución de la intensidad de luz interior promedio, I'_{av} , para cada día del cultivo semicontinuo y discontinuo, así como la intensidad media de rampa de crecimiento, $I'_{av,r}$ también se han incluido en el gráfico de la figura 8.12. Para el periodo estabilizado, varían entre 700 y 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ desde el principio al final de la rampa de crecimiento diaria. Durante estos tres crecimientos, la intensidad media de rampa fue de $575 \pm 29 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, a pesar de que la intensidad exterior, I_{ext} , sí se fijó en las condiciones óptimas de $1807 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Esta diferencia puede ser debida a cambios en la composición de la suspensión de biomasa respecto a los cultivos escala laboratorio, que ha hecho variar el coeficiente de extinción K'_a .

La productividad y fijación media conseguida en estas condiciones para el cultivo semicontinuo fue de $0,43 \pm 0,04 \text{ g}/\text{l}/\text{d}$ y $0,76 \pm 0,07 \text{ g}$ de CO₂ por litro y día de cultivo, respectivamente. El cultivo en discontinuo se obtuvo una mejora del 9% respecto al semicontinuo, alcanzando una productividad de $0,46 \pm 0,01 \text{ g}/\text{l}/\text{d}$ y una fijación de $0,84 \pm 0,3 \text{ g}$ de CO₂/l/d. Debe apuntarse que durante el cultivo semicontinuo se observó la presencia de agregados. Al pasar de régimen semicontinuo a discontinuo, los agregados fueron siendo cada vez de menor tamaño hasta que al final de este cultivo,

día 12, no se observan agregados y la biomasa se mantiene en suspensión. Por ello, esta mejoría en la fijación de CO₂ del 9% es atribuida al crecimiento de las células individuales en vez de en agregados. Por tanto, en este cultivo, se ha cuantificado el efecto del fenómeno de agregación: reduce la productividad y fijación de CO₂ en un 9%.

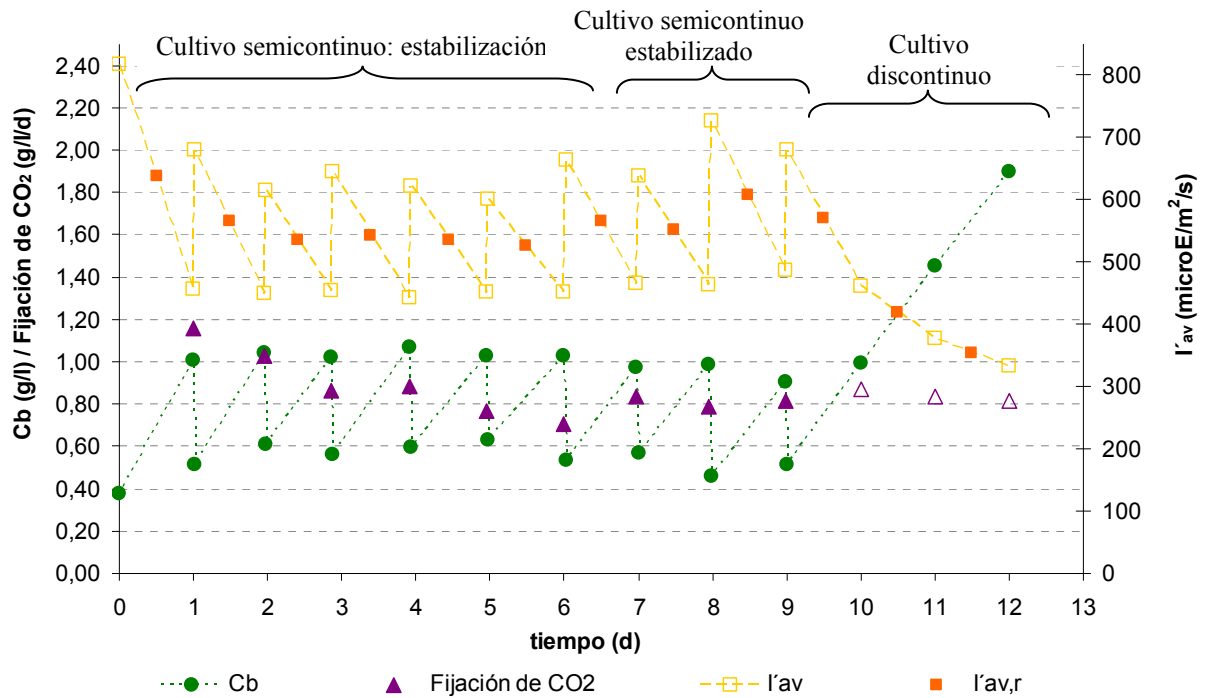


Figura 8.12. Evolución del cultivo en la columna de burbujeo en las mejores condiciones conocidas hasta el momento para *Synechocystis sp.* Los diferentes periodos y modos de operación se ha especificado en el gráfico.

El resultado alcanzado tras el estudio y mejora de las condiciones de cultivo, pH, temperatura e intensidad de luz, suponen un aumento de la productividad en escala piloto de $0,61 \pm 0,90$ g/l/d (ver figura 8,10) a $0,76 \pm 0,07$ g/l/d, es decir del 22%. Si comparamos cultivos semicontinuos tenemos un aumento en la fijación de CO₂ de $0,75 \pm 0,27$ (ver figura 8,10) a $0,84 \pm 0,3$ g/l/d, es decir, de un 10 %.

La productividad y fijación de CO₂ por *Synechocystis sp.* aquí obtenida para el reactor columna de burbujeo a escala piloto, $0,46 \pm 0,01$ g/l/d y $0,84 \pm 0,3$ g/l/d respectivamente, son comparables e incluso mejores que las publicadas por otros autores para este tipo de reactores. En las referencias siguientes se ha calculado la fijación de CO₂ a partir de la productividad, considerando un contenido en carbono del 45% de la biomasa. Así, en el

cultivo de la cianobacteria *Isochrysis galbana* en una columna de burbujeo de 5 litros, *Molina-Grima* y colaboradores (1997) obtienen una productividad de 0,36 g/l/d correspondiente a una fijación de CO₂ de 0,57g/l/d, *Sánchez-Mirón et. al*, (1999) en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* en una columna de burbujeo de 60 litros estima una productividad de 0,33 g/l/d o 0,55 g de CO₂/l/d (4 g/l en 12 días) y *Barbosa et al.*, (2003c) consigue 0,36 g de biomasa por litro y día o 0,59 g de CO₂/l/d para la microalga *Dunaliella tertiolecta* CCAP en una columna de burbujeo de 65 litros.

8.4. Conclusiones

El fotobiorreactor utilizado presenta unas condiciones hidrodinámicas, en cuanto a su grado de mezcla, de turbulencia y transferencia de materia mayores que las publicadas por otros autores para el cultivo de microalgas en sistemas similares, por lo que se consideran adecuadas para el cultivo de organismos fotoautótrofos.

Los diferentes cultivos llevados a cabo en el fotobiorreactor escala piloto determinan que la fijación de CO₂ aumenta con la velocidad superficial del gas hasta un valor de 0,0066 m/s, correspondiente a un flujo de 3 l/min. A mayores velocidades del gas y turbulencias, la fijación de CO₂ no mejora sensiblemente. En cuanto al modo de cultivo, la fijación de CO₂ es mejor en cultivos discontinuos. En cambio, en los cultivos llevados a cabo en el presente estudio, en cualquier modo que implique el intercambio de medio de cultivo, la fijación de CO₂ es menor y las células se agregan formando bioflóculos, capaces de precipitar la mayor parte de la biomasa. Esta reducción en el crecimiento y fijación de CO₂ podría estar relacionada con el estrés hidrodinámico que pueda sufrir *Synechocystis* sp. a los niveles de turbulencia establecidos en el reactor.

La combinación de los resultados obtenidos tras el estudio de las mejores condiciones de operación, en cuanto a velocidad superficial del gas y modo de cultivo, junto a la determinación de las mejores condiciones de crecimiento para la especie *Synechocystis* sp. respecto al pH, temperatura e intensidad de luz, permite conseguir una la fijación de CO₂ de 0,84 g/l/d a escala planta piloto.

8.5. Bibliografía

- Acién-Fernández, F.G., Hall, D.O., Cañizares-Guerrero, E., Krishna-Rao, K., Molina-Grima, E., 2003. Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology*, 103, pp. 137-152.
- Babcock, R.W., Malda, J., Radway, C., 2002. Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 14, pp. 169-184.
- Baquerisse, D., Nouals, S., Isambert, A., Ferreira-dos Santos, P., Durand, G., 1999. Modelling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production. *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 335-342.
- Barbosa M.J. G.V., 2003a. Microalgal photobioreactors: Scale up and optimisation. Ph. D. Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Barbosa M.J. G.V., Janssen, M., Ham, N., Tramper, J., Wijffels, 2003b. Microalgae cultivation in air-lift reactors: modelling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, pp. 170-179.
- Barbosa M.J., Hadiyanto G.V., Wijffels, R.H., 2003c. Overcoming shear stress of microalgae cultures in sparged photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 85, nº 1, pp.78-85.
- Benemann, J.R., 2003. Biofixation of CO₂ and greenhouse gas abatement with microalgae. Technology Roadmap. Final Report submitted to the U.S. Department of Energy National Energy Laboratory and to the Steering Comitee of the International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae.
Disponible en: [www. http://www.co2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm](http://www.co2captureandstorage.info/networks/Biofixation.htm)
- Brindley-Alias, C., García-Malea, M.C., Acién-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., García-Sánchez, J.L., Molina-Grima, E., 2004. Influence of power supply in the feasibility of the *Phaeodactylum tricornutum* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, nº 6, pp. 723-733.
- Bruss, J.H., Nielsen, P.H., Keiging, K., 1992. On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. *Water resource*, 26, nº 12, pp. 1597-1604.

- Buckhart, R, Deckwer, W.D., 1976. Der einfluss der Betriebsbedingungen und die Wirkung von Elektrolytzusätzen auf den Sauerstoffübergang in Bläsensäulen. *Verfahrenstechnik*, 10, pp. 429-423.
- Cammarota, M.C. y Sant'Anna, G.L., 1998. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. *Biotechnology Letters*, 20, n° 1, pp. 1-4.
- Chisti, M.Y., 1989. *Airlift bioreactors*. Elsevier Science Publishers Ltd. Essex, England.
- Doran, P.M., 1995. *Bioprocess engineering principles*. Academic Press Limited. London.
- De-Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 227, pp. 125-137.
- García, A.I, García, L.A., Mario, D., 1993. Mixing in unstirred batch fermenters. *Chemical Engineering Journal*, 51, pp. B57-B61.
- Grobbelaar, J.U., 2000. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 201-206.
- Heijnen, J.J., van't Riet, K., 1984. Mass transfer, mixing and heat transfer phenomena in low viscosity bubble column reactors. *Chemical Engineering Journal*, 28, pp. B21-B42.
- La-Motta, E.J., Jiménez, J.A., Josse, J.C., Manrique, A., 2003. The effect of air induced velocity gradient and dissolved oxygen on biofloculation in the trickling filter/solids contact process. *Avances in Environmental Research*, 7, pp. 441-451.
- Livansky, K. y Doucha, J., 1999. Liquid mass transfer coefficients KL for O₂ and CO₂ desorption from open thin layer microalgal cultures into atmosphere. *Arch Hydrobiol. Suppl.* 127, pp. 109-132.
- Merchuck, J.C., Gluz, M., Mukmenev, I., 2000. Comparison of photobioreactors for cultivation of the microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75, 1119-1126.
- Molina-Grima, E., Ación, F.G., García Camacho, F., Chisti, Y., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 231-274.
- Molina-Grima, E., Fernández, J., Ación, F.G., Chisti, Y., 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92, pp. 113-131.

- Molina-Grima, Acién-Fernández, Robles-Medina, 2004. Downstream Processing of Cell-mass and Products. In: Handbook of microalgal culture. Ed. Amos Richmond. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK
- Moreno, J., Vargas, M.A., Olivares, H., Rivas, J., Guerrero, M.G., 1998. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena sp.* ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*, 60, pp. 157-182.
- Poulsen, B.R. e Iversen, J.J.L., 1998. Characterization of gas transfer and mixing in a bubble column equipped with a rubber membrane diffuser. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, n° 6, pp. 633-641.
- Richmond, A. (Ed.), 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Ed. Blackwell Science Ltd. UK.
- Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M.C., García Camacho, F., Molina-Grima, E., 1999. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology*, 31, pp. 1015-1023.
- Sobeck D.C. y Higgins, M.J., 2002. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced biofloculation. *Water Research*, 36, pp. 527-538.
- Steiner, A.E., Mc Laren D.A., Foster F.C., 1976. The nature of activated sludge flocs. *Water Resource*, 10, pp. 23-30.

CAPITULO 9

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones

Las conclusiones generales derivadas de los resultados de la presente memoria de tesis se exponen a continuación.

1. En el presente trabajo se han encontrado, aislado e identificado tres especies de microalgas autóctonas que presentan alta resistencia a la inyección de CO₂ puro en el medio de cultivo, característica que las convierten en especies potencialmente adecuadas para la biofijación de CO₂. Tras estudiar sus parámetros de crecimiento se concluye que la cianobacteria *Synechocystis sp.* es el aislado autóctono que mayor velocidad específica de crecimiento presenta, superando incluso a algunas de las microalgas referenciadas para la biofijación de CO₂. La propiedad diferencial de *Synechocystis sp.*, que la convierte en una especie con alto potencial para sistemas de cultivo másicos es un aprovechamiento eficiente de la luz en cultivos densos.
2. La respuesta fotosintética de *Synechocystis sp.* fue estudiada en función de la intensidad de luz. El ajuste de los datos experimentales a un modelo matemático que predice la velocidad de crecimiento en función de la intensidad de luz accesible para las células, permite estimar una velocidad específica de crecimiento máxima de $0,108 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ a una intensidad de luz accesible a las células de $930 \pm 22 \text{ } \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Por tanto, el modelo predice una buena resistencia a altas intensidades de luz, propiedad deseable en cultivos exteriores.
3. El modelo de superficie de respuesta calcula las mejores condiciones de cultivo para *Synechocystis sp.*, dentro de la región experimental estudiada, a pH 7,2, temperatura de 35,3° C y $686 \text{ } \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ de intensidad promedio en el interior. En estas condiciones la superficie de respuesta predice una fijación de 2,01 g de CO₂/l/d. La validez del modelo quedó demostrada tras el cultivo de *Synechocystis sp.* en las mejores condiciones de pH, temperatura e intensidad de luz, obteniéndose una fijación de CO₂ de 2,07 g/l/d, comparable a la estimada por el modelo. La mayor fijación de CO₂ ocurre a temperaturas e irradiancias altas, indicando que *Synechocystis sp.* exhibe una buena tolerancia a altas irradiancias y temperaturas. La suma de ambas propiedades justifican

que la cianobacteria autóctona *Synechocystis sp.* sea una especie de interés para la fijación de CO₂ en sistemas externos.

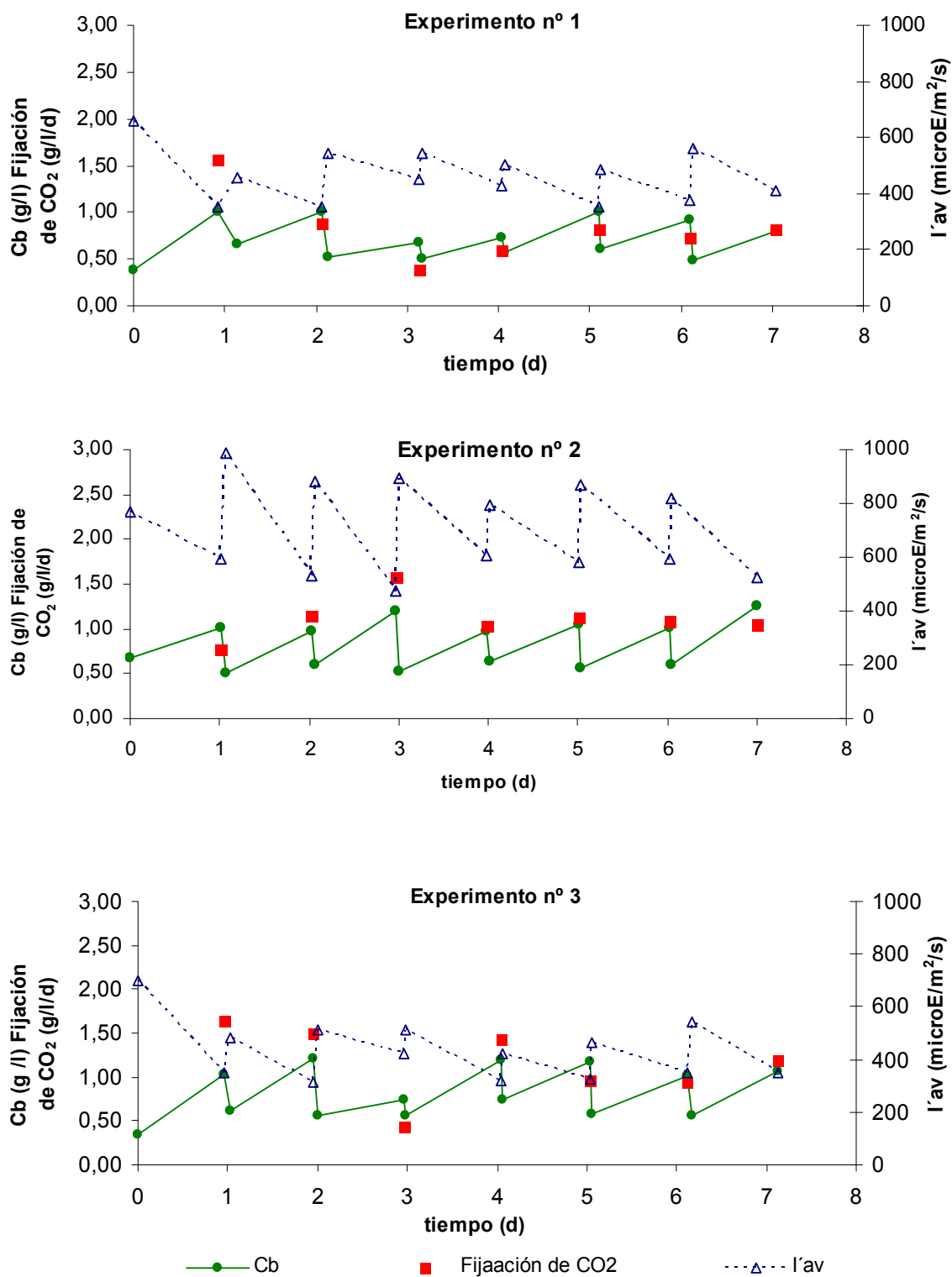
4. En la columna de burbujeo, la fijación de CO₂ aumenta con la velocidad superficial del gas hasta a 0,0066 m/s. A mayores velocidades del gas y turbulencias, la fijación de CO₂ no mejora sensiblemente. En cuanto al modo de cultivo, la fijación de CO₂ es mejor en cultivos discontinuos. En cambio, en cualquier modo que implique un intercambio de medio de cultivo, la fijación de CO₂ es menor y las células se agregan formando bioflóculos, capaces de precipitar la mayor parte de la biomasa. Parece que esta reducción en el crecimiento y fijación de CO₂ está relacionado con el estrés hidrodinámico que pueda sufrir *Synechocystis sp.* en los niveles de turbulencia establecidos en el reactor.
5. La combinación de los resultados obtenidos tras el estudio de las mejores condiciones de operación, en cuanto a velocidad superficial del gas y modo de cultivo, junto a la determinación de las mejores condiciones de crecimiento para la especie *Synechocystis sp.* respecto al pH, temperatura e intensidad de luz, permite conseguir una fijación de CO₂ de 0,84 g/l/d a escala planta piloto.

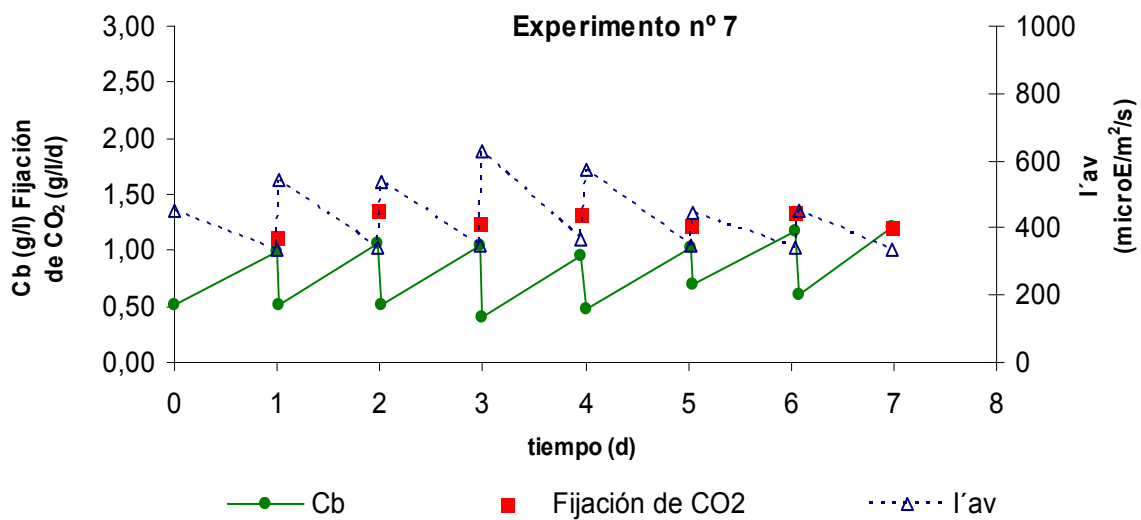
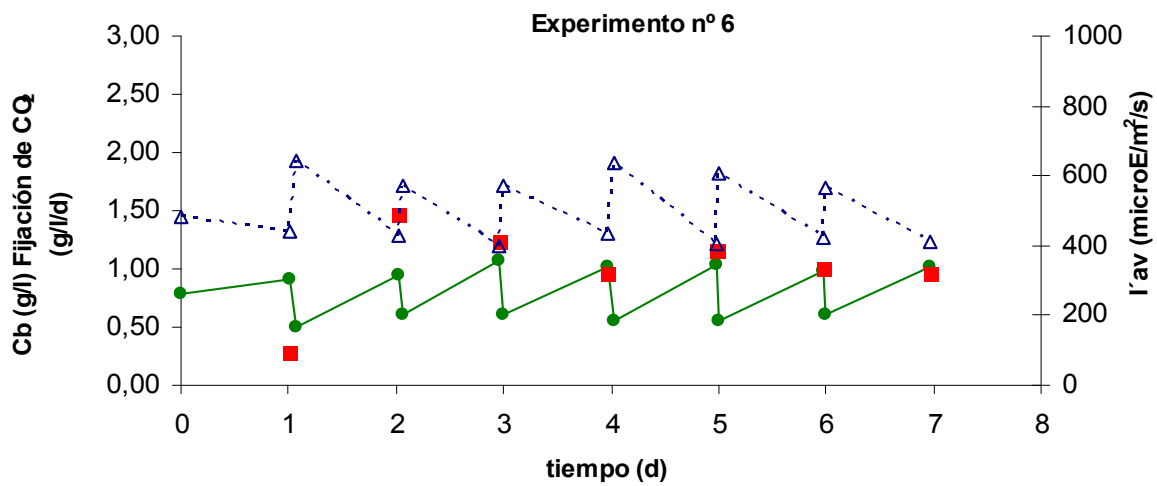
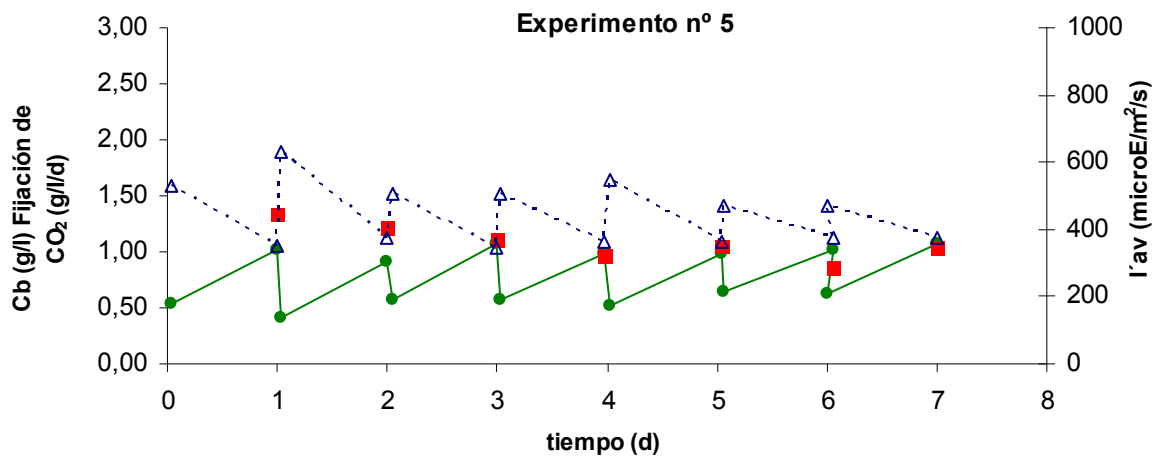
Trabajos futuros

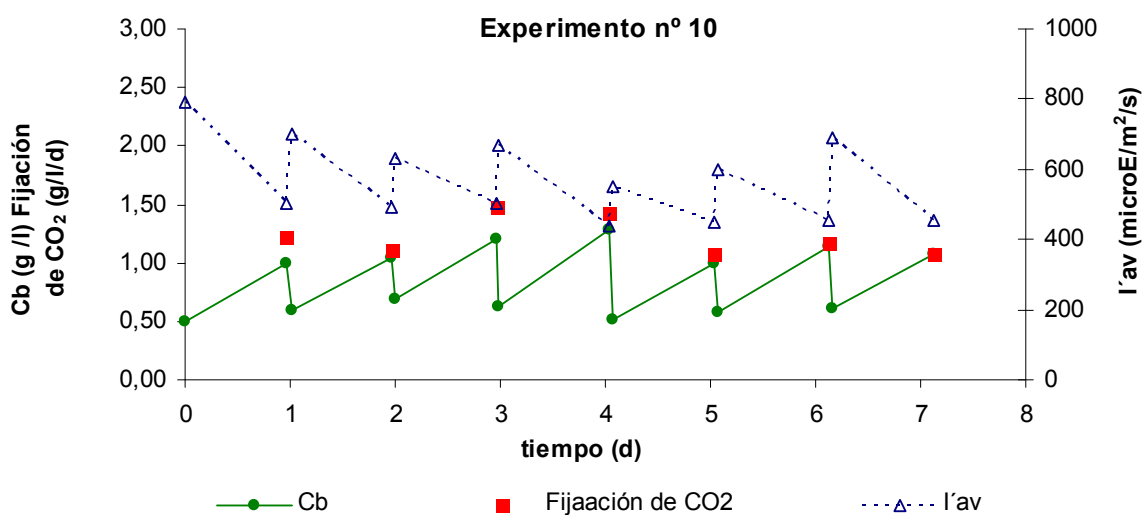
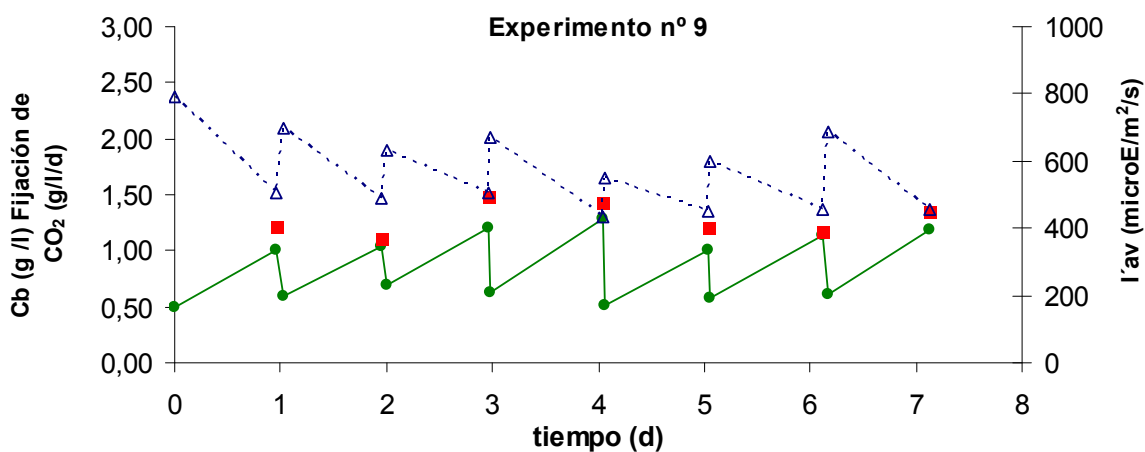
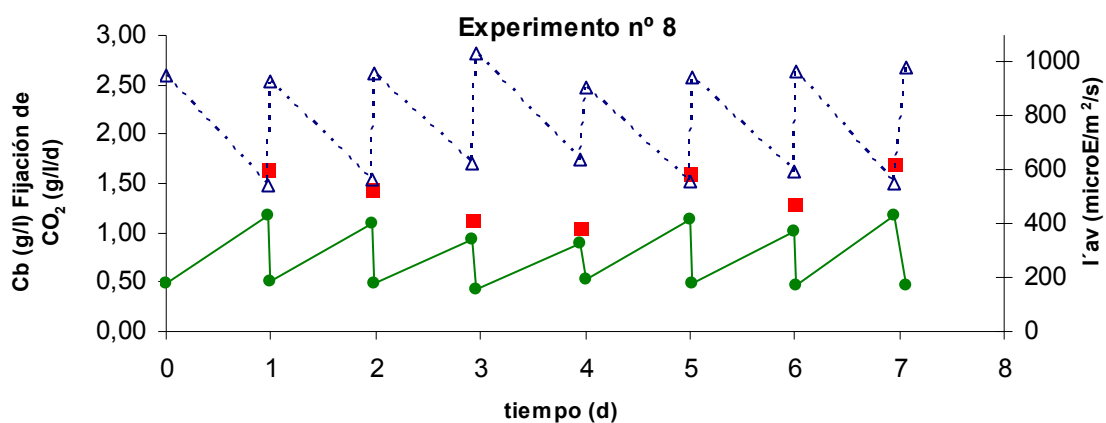
1. Determinación de las causas y condiciones que resultan en la aparición de bioflóculos. Investigar la posibilidad de fijación de CO₂ con *Synechocystis sp.* en un sistema de producción en línea cultivando en condiciones que eviten la floculación para posteriormente forzar su aparición en la fase de cosechado.
2. Comprobación de la existencia de estrés hidrodinámico y su relación con el fenómeno de biofloculación.
3. Experimentación de *Synechocystis sp.* en otro tipo de fotobiorreactores que permitan menores grados de estrés hidrodinámico, incluso en estanques abiertos, ya que éstos que se caracterizan por bajas turbulencias.

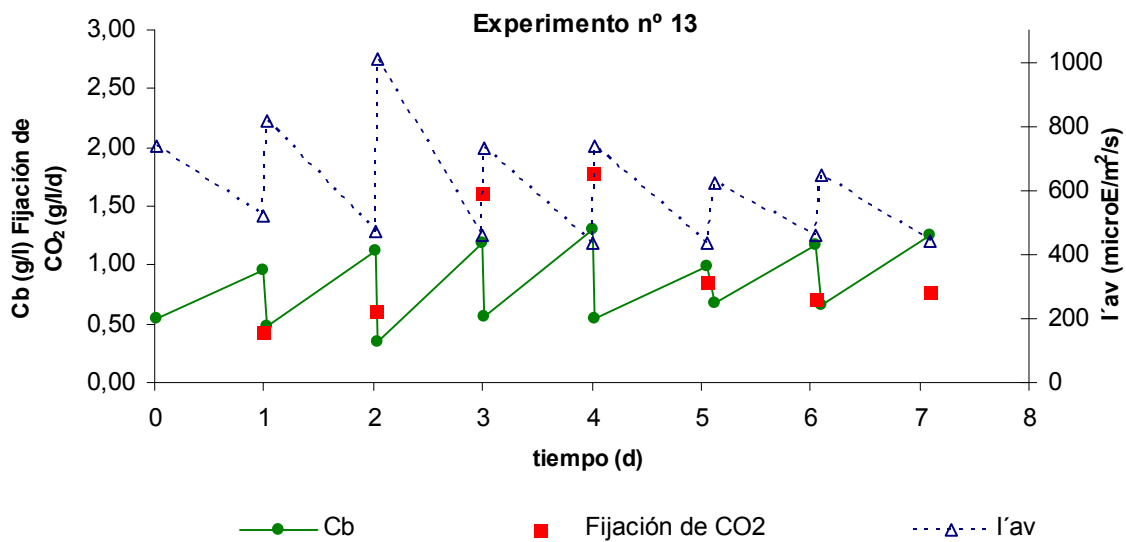
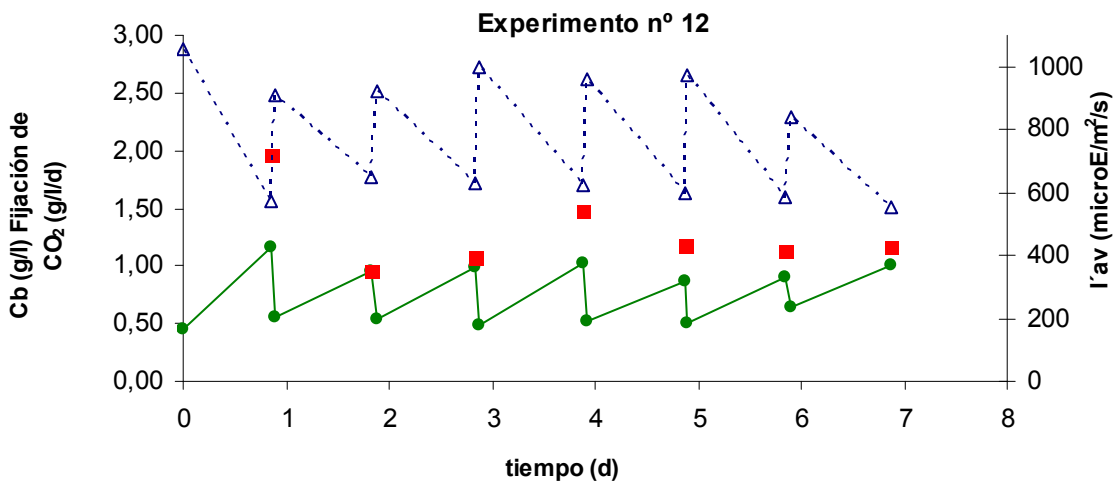
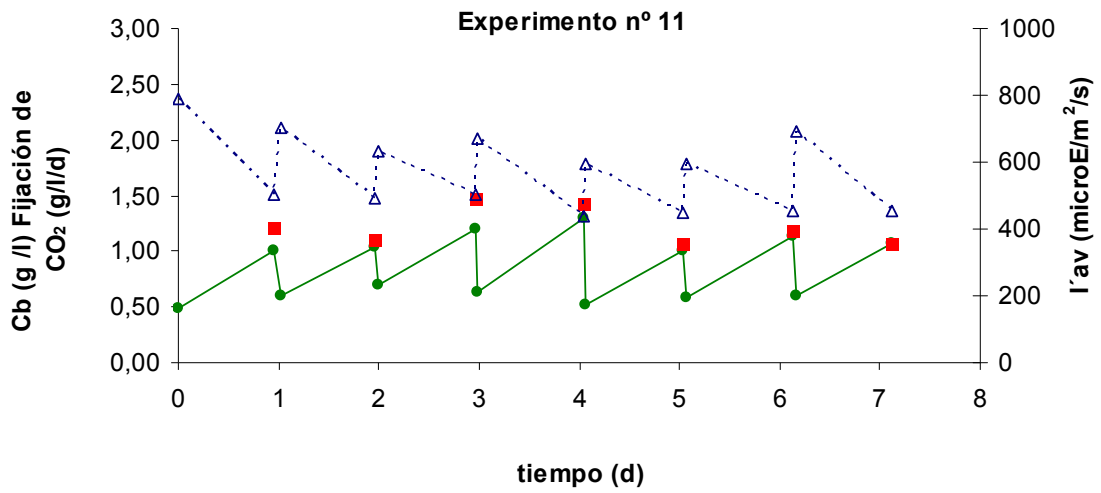
ANEXO I

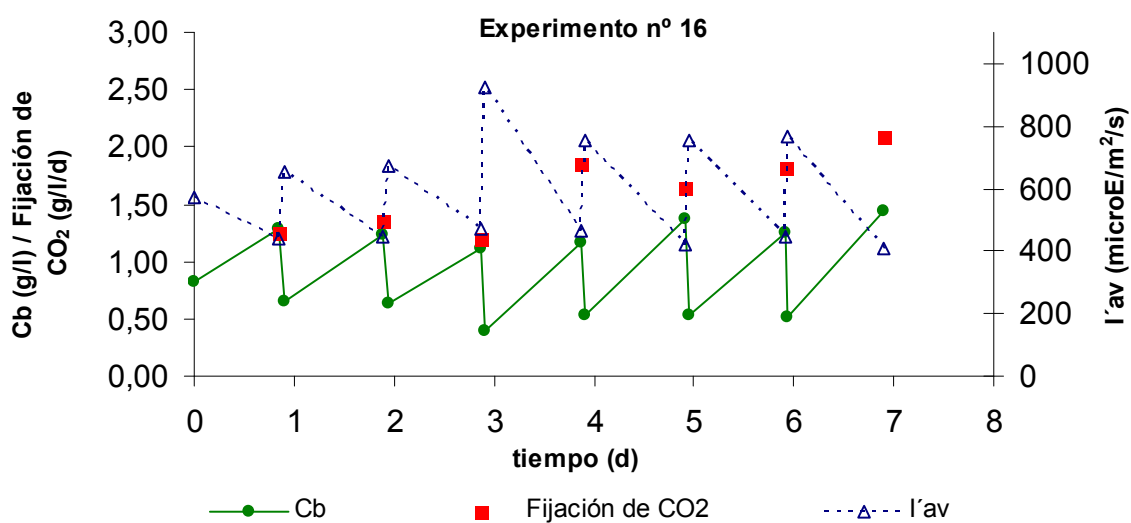
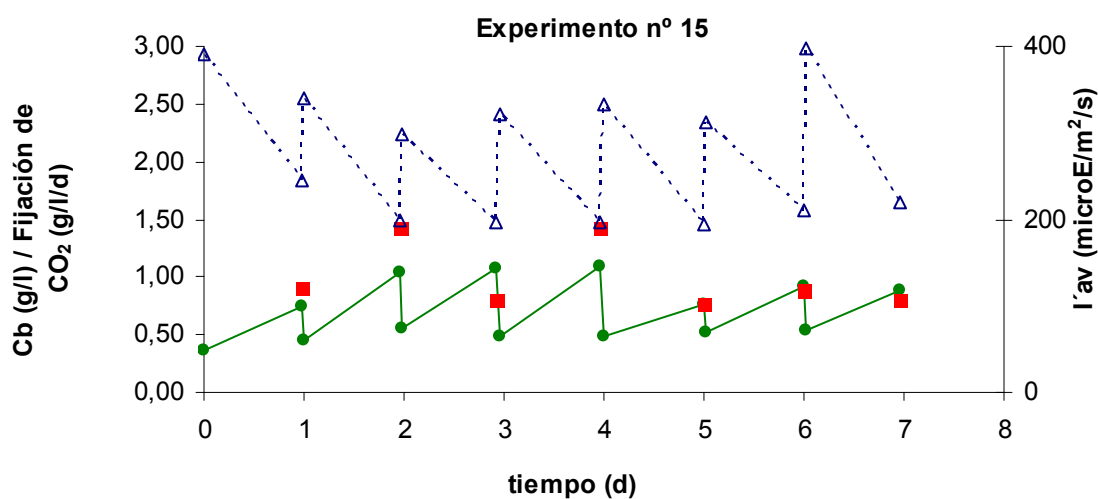
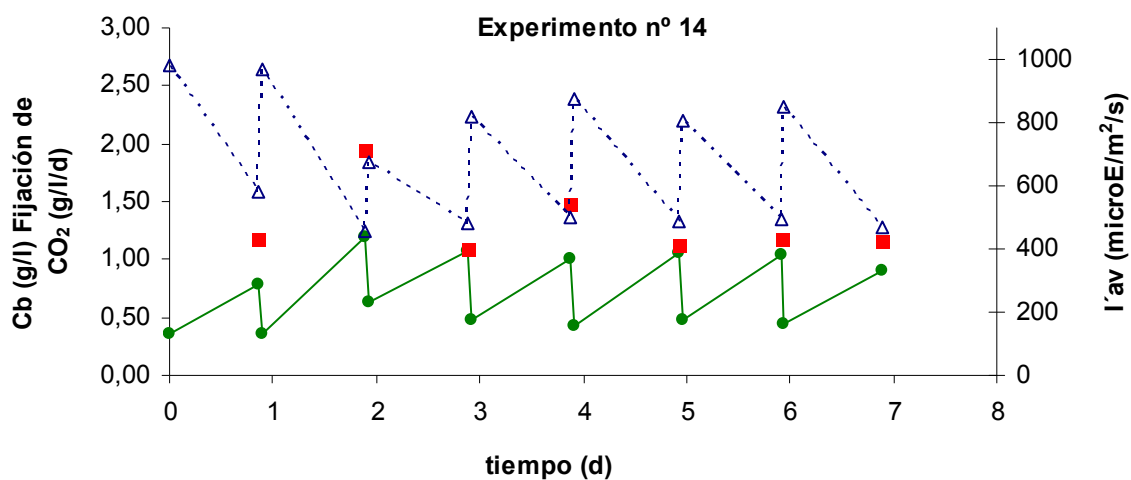
Anexo I. Evolución de los experimentos realizados para la optimización de las condiciones de cultivo, según el diseño experimental

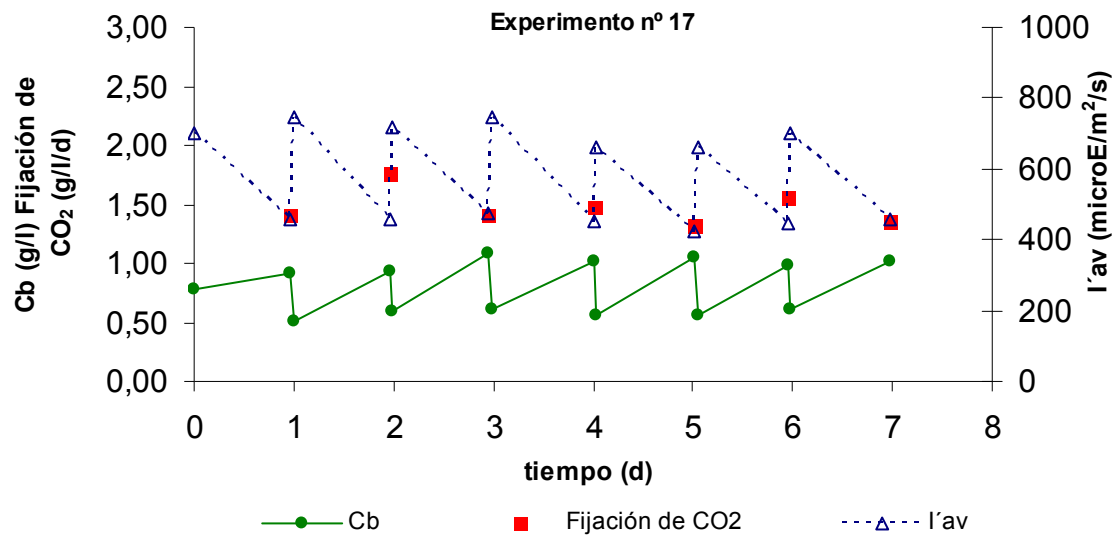












ANEXO II

Anexo II. Determinación del coeficiente de transferencia de materia, $k_L a$ para el oxígeno

En el presente estudio, el coeficiente de transferencia de materia para el oxígeno ha sido determinado en agua destilada, medio de cultivo *Mann&Myers* y en cultivos de *Synechocystis sp.* con concentraciones de biomasa entre 0,5 y 1,5 g/l, utilizando el método dinámico referenciado en el capítulo 8. El método se basa en la medida frente al tiempo de la variación de la concentración de oxígeno disuelto entre dos concentraciones de oxígeno disuelto suficientemente separadas como para poder medir su variación en el tiempo. Para conseguir esta variación de concentración de O_2 , se parte de una concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con el aire y se reduce mediante el burbujeo de nitrógeno, que arrastra el O_2 disuelto. Una vez alcanzada una concentración por debajo del 50% de saturación, se interrumpe el burbujeo de nitrógeno e inmediatamente comienza el burbujeo de aire, aumentando la concentración de oxígeno hasta su valor de saturación en equilibrio con el aire. La velocidad con la que aumenta la concentración de oxígeno depende del flujo de aire burbujeado.

Este proceso se ha ilustrado en la figura AII.1, que corresponde al burbujeo de aire con flujo de 6 l/min, donde puede observarse cómo desciende rápidamente la concentración de oxígeno disuelto, $C_{O_2,L}$, durante el burbujeo de nitrógeno, para volver a recuperar la concentración de equilibrio al burbujear aire de un caudal constante. Durante esta rampa se mide la $C_{O_2,L}$ en función del tiempo.

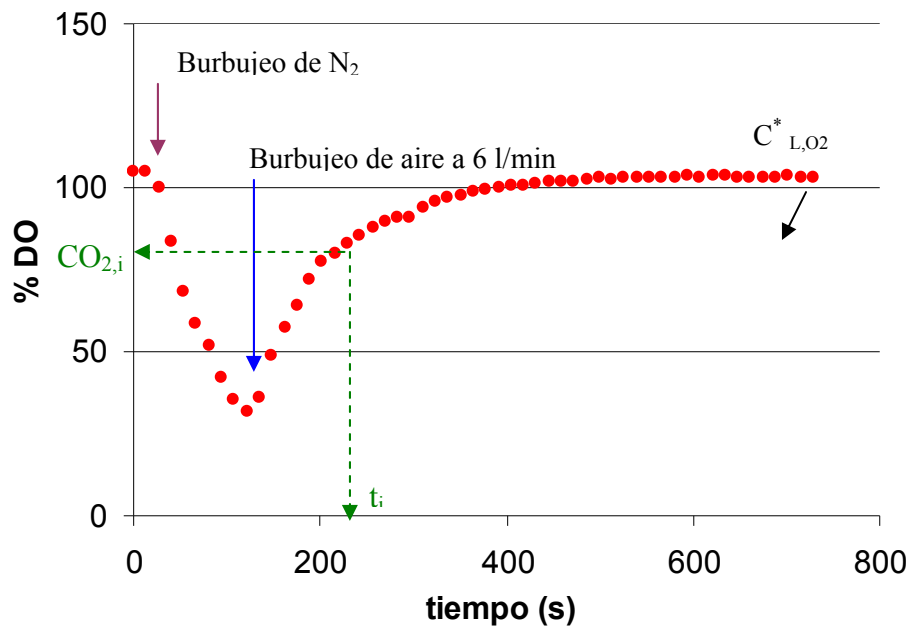


Figura AII.1. Concentración de oxígeno disuelto determinado para el cálculo de k_La por el método dinámico cuando se burbujea aire con flujo de 6 l/min.

Aunque se trata de organismos fotoautótrofos y siempre existe una tasa de respiración celular que consume O_2 , se considera que este consumo será despreciable. El nivel de O_2 disuelto alcanzará en unos minutos un valor final de estado estacionario $C^*_{O_2,L}$. A cada valor de concentración de oxígeno i ($C_{O_2,L,i}$), le corresponde un tiempo i (t_i) y el coeficiente de transferencia de materia, k_La , puede calcularse en función de los datos experimentales según la expresión:

$$K_La = \frac{\ln\left(\frac{C^*_{O_2,L} - C_{O_2,L,i-1}}{C^*_{O_2,L} - C_{O_2,L,i}}\right)}{t_i - t_{i-1}} \quad (AII.1)$$

donde, la concentración de oxígeno se mide en % de saturación y el tiempo en segundos.

La ecuación indica que k_La es la pendiente de la recta de regresión que relaciona los pares de valores $\ln[(C^*_{O_2,L} - C_{O_2,L,i-1}) / (C^*_{O_2,L} - C_{O_2,L,i})]$ frente a $(t_i - t_{i-1})$, como indica la figura AII.2, durante el proceso de reoxigenación a flujo 6 l/min, mostrado en la figura AII.1.

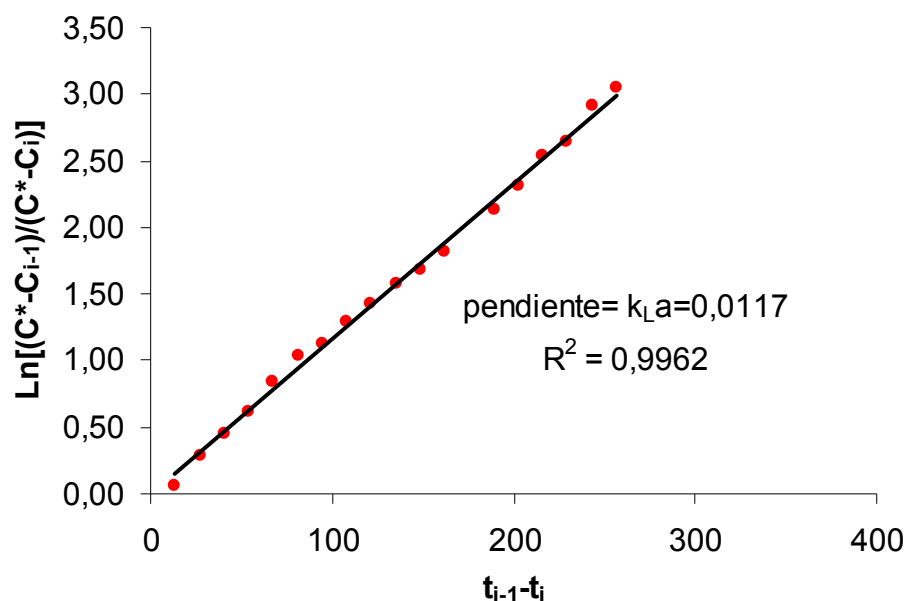


Figura AII.2. Cálculo de $k_L a$ por regresión lineal determinado a partir de los valores de concentración de oxígeno disuelto en la rampa de reoxigenación a 6 l/min, según la ecuación (8.8).

El tiempo de retraso para el electrodo de O_2 utilizada en la determinación de la $k_L a$ es de 45 s y la constante de tiempo de $0,2 \text{ s}^{-1}$. Estos parámetros fueron obtenidos tras la realización de tres ensayos según el método descrito por *Van't Riet, 1979*. La corrección de los valores de oxígeno disuelto medidos por el electrodo aplicando las constantes obtenidas no generó variaciones en la estimación de los parámetros $k_L a$ debido a que la constante de tiempo del electrodo es despreciable respecto a la dinámica de la transferencia de materia [*Casas-López, 2004*].

AII. Bibliografía

Casas-López, J.L., 2004. Producción de lovastatina a partir de *Aspergillus terreus* en un reactor de lecho fluidizado. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Almería. España.

Doran, P.M., 1995. Bioprocess engineering principles. Academic Press Limited. London.

Van't Riet K (1979). Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*. 18, nº 3, pp. 357 – 364.

ANEXO III

Anexo III. Efecto combinado de altas intensidades y temperaturas sobre la actividad fotosintética de *Synechocystis sp.*

La figura siguiente (Fig., AIII.1) muestra el seguimiento de pH, temperatura y oxígeno disuelto (DO) frente al tiempo. El cultivo se realizó a alta irradiancia sobre la pared del reactor, $2400 \mu E/m^2/s$, alcanzándose elevadas temperaturas, que como muestra la figura, se mantienen a un valor medio de $44,4^\circ C$ llegando a picos de temperatura de $45,5^\circ C$. La iluminación fue continua. La concentración de oxígeno disuelto es un indicador de la actividad fotosintética. En las primeras horas de crecimiento, la DO aumenta hasta saturación del 140%, es decir, hay actividad fotosintética. Sin embargo, transcurrido un tiempo de alrededor de 5 horas, la actividad fotosintética comienza a disminuir, hasta que se vuelve prácticamente nula. Si se observa el pH, se llega a la misma conclusión. Así en las primeras cinco horas, se observa una oscilación del pH, consecuencia del aumento de pH en el cultivo y apertura de la válvula de CO_2 , que lo rebaja a su valor de consigna. En cambio, transcurrido ese tiempo, el pH se mantiene constante o desciende ligeramente. Esto significa que las microalgas no están consumiendo CO_2 y que por tanto, se ha inhibido la actividad fotosintética.

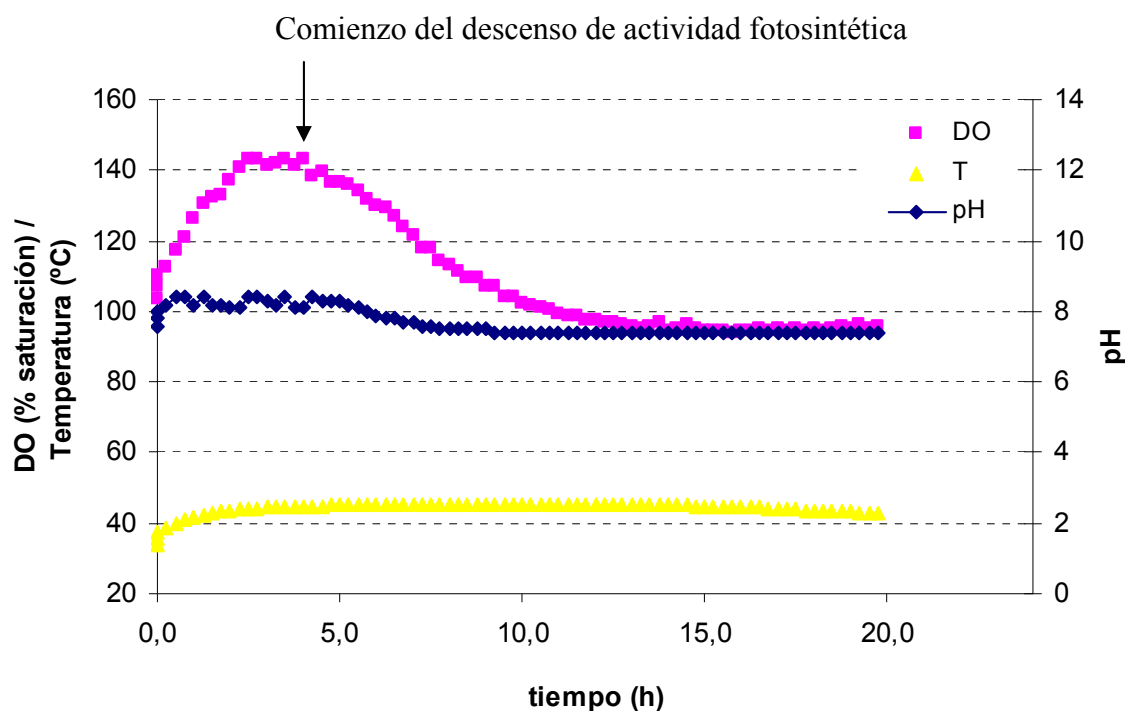


Figura AIII.1. Evolución de un cultivo de *Synechocystis sp.*, en función del pH, DO y temperatura a altas intensidades de luz, $2400 \mu E/m^2/s$, y altas temperaturas.

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº página

CAPITULO 1

- Figura.1.1.** *Correspondencia entre el consumo primario de energía y las emisiones de dióxido de carbono. (a) Consumo mundial de energía primaria (EJ/año), distribuida por sectores desde el año 1971 a 2001. (b) Emisiones de CO₂ (Mt/año) correspondientes a cada sector, desde 1971 a 2001. Fuente: IPCC, 2005* 4
- Figura 1.2.** *Consumo mundial de energía primaria anual (Cuatrillones de Btu/año, 1 cuatrillón=1015 Btu) por las diferentes fuentes, desde 1970 a 2001 y su predicción hasta 2025. Fuente: International Energy Outlook 2003.*..... 5

CAPITULO 2

- Figura 2.1.** *Instalación comercial de Cyanotech Corporation para la producción de microalgas, en estanques tipo race-way, en Hawaii. Los estanques de color verde son de Spirulina y los rojos, de Hematococcus pluvialis*..... 18
- Figura 2.2.** *Esquema, publicado por la empresa Algenol Biofuels (www.algenoilbiofuels.us) que representa la estrategia de producción de bioetanol a partir de cianobacterias* 19
- Figura 2.3.** *(a) Detalles de la estructura interna del cloroplasto, mostrando cómo los repliegues de las membranas del tilacoide, definen un espacio interno llamado estroma y forman apilamientos llamados grana. (b) Unidad fotosintética y su centro de reacción*..... 21

Figura 2.4. *Esquema "Z" que describe las reacciones para la captación de energía en la fotosíntesis.* 22

Figura 2.5. *Curva dosis-respuesta que describe la actividad fotosintética de una célula frente a la intensidad lumínica que recibe. La constante I_k viene dada por la intersección entre la pendiente de la curva P/I en su tramo lineal con la actividad fotosintética máxima (P_{max}).* 24

Figura 2.6. *Recorrido de las células, desde la zona exterior, con saturación de luz, a la zona interior, fotolimitada, en fotobiorreactores tubulares de diferente diámetro.* 29

Figura 2.7. *Dos tipos de fotobiorreactores abiertos: (a) sistemas circulares y (b) tipo raceway.* 31

Figura 2.8. *Dos tipos de fotobiorreactores cerrados exteriores. (a) Reactor tubular horizontal y (b) reactor plano inclinado.* 33

Figura 2.9. *Diferentes tipos de Fotobiorreactores: (a) plano con iluminación interior utilizado para investigación, (b) plano inmerso en estanque de agua, (c) tubular horizontal impulsado por columna airlift.* 34

CAPITULO 3

Figura 3.1. *Esquema de la metodología global establecida para alcanzar los objetivos planteados.* 46

CAPITULO 4

Figura 4.1. *Radiómetro esférico SQL-2100 y modo de medición de la intensidad de luz exterior e interior en los diferentes dispositivos experimentales.* 52

Figura 4.2.	<i>Pasos seguidos en el aislamiento de microalgas sobre placa Petri, según la técnica de arrastre.....</i>	59
Figura 4.3.	<i>(a) Cámara de crecimiento para mantenimiento de inóculos de microalgas y cianobacterias. (b) Placa con cultivo monoalgal del aislado B525 (Synechocystis sp.) donde puede observarse el crecimiento de colonias individuales.</i>	60
Figura 4.4.	<i>Crecimiento de inóculos de microalgas en cámara de cultivos vegetales con burbujeo constante de aire e inyección intermitente de CO₂.....</i>	62
Figura 4.5.	<i>Ensuciamiento de las paredes (izquierda) y placa difusora (derecha) del reactor columna de burbujeo después de un cultivo en continuo sin interrupción de larga duración</i>	63
CAPITULO 5		
Figura 5.1.	<i>Fases propuestas para la búsqueda de una especie de microalga apta para sistemas de biofijación de CO₂.....</i>	68
Figura 5.2.	<i>Cultivo en el laboratorio de las muestras recogidas en ambientes naturales en medio Mann&Myers y agitación orbital.....</i>	71
Figura 5.3.	<i>Bancada de reactores de 0,5 litros, tipo columna de burbujeo, para el cultivo de las diferentes especies estudiadas.</i>	73
Figura 5.4.	<i>Montaje experimental a escala laboratorio en el que se llevó a cabo el presente estudio.</i>	74
Figura 5.5.	<i>Curvas de crecimiento y pH para los cultivos con aporte externo de CO₂ (0,5 l/min/l, 100% CO₂) y sin aporte externo (CO₂ en el aire 0,038% CO₂).</i>	78

Figura 5.6.	<i>Fotografías tomadas al microscopio (x100) de las tres especies aisladas. De izquierda a derecha: Scenedesmus sp. (A521), Chlorogonium sp. (A513) y Synechocystis sp. (B525).</i>	78
Figura 5.7.	<i>Curvas de crecimiento para las diferentes especies estudiadas, en función de la densidad celular (a) y de la concentración de biomasa (b). Cada punto representa los valores medios y la desviación estándar entre las tres réplicas.</i>	80
Figura 5.8.	<i>Densidades celulares (a) y concentraciones de biomasa (b) acumuladas en los 7 días de cultivo batch. Productividades (c) y fijaciones de CO² (d) máximas para cada especie estudiada. Letras diferentes en los mismos parámetros indican valores estadísticamente distintos a un nivel de significación del 95%.</i>	83
Figura 5.9.	<i>Efecto del tamaño y forma celular sobre la distribución de luz en cultivo con alta densidad celular o concentración de biomasa.</i>	85
CAPITULO 6		
Figura 6.1.	<i>Diagrama esquemático del montaje experimental para el estudio de la influencia de diferentes intensidades de luz irradiadas sobre la superficie del reactor columna en el crecimiento de Synechocystis sp.</i>	100
Figura 6.2.	<i>(a) Curvas de crecimiento y (b) velocidad específica de crecimiento de Synechocystis sp. en los cultivos discontinuos, a diferentes intensidades de luz sobre la pared del reactor, I_{ext} en μE/m²/s</i>	103
Figura 6.3.	<i>Productividad de biomasa y fijación de CO₂ diarias máximas alcanzadas en los cultivos discontinuos irradiados con diferentes intensidades de luz.</i>	104

Figura 6.4. (a) *Velocidades específicas de crecimiento (μ_i, h^{-1}) observadas a las intensidades de luz medias para la rampa de crecimiento, $I_{int,m,i}$. (b) Relación hiperbólica de la concentración de biomasa (C_b) con la atenuación de luz observada y su ajuste a la ecuación 6.4.106*

Figura 6.5. *Gráficos de ajuste la velocidad de crecimiento específica (μ, h^{-1}) medida para *Synechocystis sp.* según la intensidad de luz promedio I'_{av} , a los modelos descritos por García-Malea et al., (2006)] y Muller-Feuga, (1999).108*

CAPITULO 7

Figura 7.1. *Montaje experimental para la realización del presente estudio.122*

Figura 7.2. *Cultivo semicontinuo de siete días de duración realizado en las condiciones descritas para el experimento número 4, mostrando la evolución de la concentración de biomasa, intensidad promedio y fijación de CO_2125*

Figura 7.3. *Representación tridimensional de las superficies de respuesta estimadas por el modelo cuadrático de la fijación de CO_2 por la cianobacteria *Synechocystis sp.*.....130*

Figura 7.4. *Rampas de crecimiento y de intensidad de luz promedio en el experimento realizado para determinar la fijación de CO_2 a las condiciones de mejor operabilidad.133*

CAPITULO 8

Figura 8.1. *Importancia del paso de escala para la aplicabilidad de una investigación de base en el laboratorio.....141*

Figura 8.2.	<i>Parámetros de cultivo y operación en un cultivo de microalgas que determinan la productividad máxima y la alcanzable en un sistema mayor escala.</i>	142
Figura 8.3.	<i>Esquema del montaje del fotobiorreactor tipo columna de burbujeo y sistemas auxiliares.</i>	146
Figura 8.4.	<i>Izquierda: Detalles del difusor de aire y formación de burbujas. Derecha: Reactor columna de burbujeo al comienzo de un cultivo discontinuo.</i>	147
Figura 8.5.	<i>Diferencia porcentual que define el grado de homogeneidad en el reactor columna de burbujeo de 9 litros.</i>	155
Figura 8.6.	<i>Parámetros hidrodinámicos característicos para el reactor columna de burbujeo en función de la velocidad superficial del gas, vg. (a) Retención de gas. (b) Número de Reynolds y potencia comunicada al fluido.</i>	157
Figura 8.7.	<i>Coefficiente de transferencia de materia para el agua destilada, medio de cultivo Mann&Myers y suspensión de biomasa, medidos a velocidades superficiales del gas entre 0,022 y 0,011 m/s.</i>	158
Figura 8.8.	<i>Fijación de CO₂ por Synechocystis sp. y viabilidad celular en función de la velocidad superficial del gas, para cultivos en régimen continuo.</i>	161
Figura 8.9.	<i>Biofloculación de células de Synechocystis sp. durante su cultivo en modo continuo en el reactor columna de burbujeo. Izquierda: formación de bioflóculos instantes después de la toma de muestra. Derecha: fotografía de un agregado tomada al microscopio (x40).</i>	163

Figura 8.10. *Fijación de CO₂ (g/l/d) y gramos de exopolisacáridos por gramo de biomasa a diferentes velocidades superficiales del gas (0,0011, 0,0022, 0,0066 y 0,011 m/s).....*164

Figura 8.11. *Fijación de CO₂ diaria (g/l/d) por Synechocystis sp. en diferentes modos de cultivo, realizados en el reactor columna de burbujeo escala piloto.....*165

Figura 8.12. *Evolución del cultivo en la columna de burbujeo en las mejores condiciones conocidas hasta el momento para Synechocystis sp. Los diferentes periodos y modos de operación se ha especificado en el gráfico.*168

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

N° página

CAPITULO 1

Tabla 1.1. <i>Emisiones de CO₂ procedentes de la combustión de fuentes de energía fósiles, según el sector donde se producen, en 2001. Fuente: IPCC, 2005.</i>	5
Tabla 1.2. <i>Compromisos de reducción de emisiones por los países firmantes del Protocolo de Kyoto. Fuente: Protocolo de Kyoto, 1998.</i>	7

CAPITULO 4

Tabla 4.1. <i>Composición química del medio de cultivo Mann and Myers.</i>	61
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPITULO 5

Tabla 5.1. <i>Velocidades específicas de crecimiento máximas (μ_{max}, en horas⁻¹ y días⁻¹) y tiempos de generación mínimos ($d_{t,min}$ en horas) para cada especie estudiada.</i>	81
Tabla 5.2. <i>Análisis elemental de la biomasa (% bs: porcentaje en base seca).</i>	83

CAPITULO 6

Tabla 6.1. <i>Coefficiente de regresión no lineal para los ajustes de los valores experimentales a los dos modelos de velocidad de crecimiento considerados.</i>	107
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabla 6.2. *Parámetros calculados por el ajuste no lineal de los valores experimentales de μ_i e $I'_{av,i}$ al modelo propuesto por Muller-Feuga, 1999.*.....110

CAPITULO 7

Tabla 7.1. *Niveles de los factores que definen el los límites de la región experimental a partir de los que se va a construir el diseño de composición central 2^3 .*.....123

Tabla 7.2. *Diseño factorial 2^3 de composición central. Niveles que toma cada factor en cada corrida experimental.*124

Tabla 7.3. *Fijación de CO_2 observada para cada experimento. Valores medios y desviación estándar calculados a partir de las tres pseudoréplicas.*.....127

Tabla 7.4. *Resultados arrojados por el análisis ANOVA en la regresión múltiple: efecto de los factores sobre la respuesta.*129

CAPITULO 7

Tabla 8.1. *Modelo y coeficiente de regresión para obtenidos en el ajuste de los datos experimentales de k_{La} medidos en la columna de burbujeo.*..... 160

Tabla 8.2. *Coefficientes de transferencia de materia obtenidos en el presente estudio para velocidades superficiales del gras entre 0,002 y 0,011 m/s.*..... 160

NOMENCLATURA

Nomenclatura

At	atenuación de luz
At _{max}	atenuación máxima, cuando Cb es máxima
Cb _{estac}	concentración de biomasa en estado estacionario, g/l
Cb _i	concentración de biomasa, g/l
CO _{2,L}	concentraciones de CO ₂ disuelto en el líquido, mol/m ³
CO _{2,L} [*]	concentraciones de CO ₂ de equilibrio (o saturación), mol/m ³
D	velocidad de dilución, h ⁻¹
DO	concentración de oxígeno disuelto, % de saturación
d _c	diámetro de la columna, m
D _{CO2}	difusividad en medio acuoso para el CO ₂ , m ² /h
D _{O2}	difusividad en medio acuoso para el O ₂ , m ² /h
d _t	tiempo de generación celular, horas o días (según se especifique)
EU ETS	mercado europeo de emisiones
F _g	flujo de entrada de aire, l/min o m ³ /s, según se especifique
F _i	fijación de CO ₂ diaria de biomasa en el día i, g/l/d
F _{max}	fijación de CO ₂ diaria máxima, g de CO ₂ /l/d
GHG	gases de efecto invernadero
H _G	altura en la columna debido al gas retenido, m
H _L	altura que alcanza el líquido en la columna en ausencia de burbujeo, m
I(λ)	intensidad de luz monocromática con longitud de onda λ en el interior del cultivo atenuada a una profundidad determinada profundidad, μE/m ² /s
I _{av}	intensidad promedio calculada utilizando el coeficiente de extinción ficticio, K _a , μE/m ² /s
I _{av,r,i}	intensidad promedio para la rampa de crecimiento, calculada con coeficiente de extinción ficticio, μE/m ² /s
I ₀	intensidad de luz en el centro del reactor cuando Cb=0 g/l, μE/m ² /s
I _{av}	intensidad de luz promedio, μE/m ² /s
I _e	intensidad de luz en el punto de compensación de energía, μE/m ² /s
I _{ext}	intensidad sobre la pared del reactor, μE/m ² /s

$I_{int,i}$	intensidad de luz en el interior del cultivo ($C_b \neq 0$) medida en su punto central en el instante i , $\mu E/m^2/s$
$I_{int,m,i}$	intensidad interior en el punto central asociada a la velocidad de crecimiento determinada para el instante i , μ_i , $\mu E/m^2/s$
I_s	intensidad de luz en el punto de saturación, $\mu E/m^2/s$
K_a	coeficiente de extinción de la ley de Lambert-Beer, g/m^2
K_a'	coeficiente de extinción ficticio, g/m^2
K_{at}	constante de atenuación, kg/m^3
k_{L,a,CO_2}	coeficiente de transferencia para el dióxido de carbono, s^{-1}
k_{L,a,O_2}	coeficiente de transferencia para el oxígeno
NAP	plan nacional de asignaciones
N_{CO_2}	flujo de transferencia de materia entre fases para cada soluto, $mol/m^2/s$
N_i	densidad celular en el instante i , $células/ml$
N_{O_2}	flujo de transferencia de materia entre fases para cada soluto, $mol/m^2/s$
$O_{2,L}$	concentraciones de O_2 disuelto en el líquido, mol/m^3
$O_{2,L}^*$	concentraciones de CO_2 de equilibrio (o saturación), mol/m^3
p	profundidad del paso de luz, m
$P_{1,5m}$	presión existente bajo una columna de agua de 1,5 metros de altura, $kg/m^2/s$
P_{atm}	la presión atmosférica, $kg/m^2/s$
PBR	fotobiorreactor
P_i	productividad diaria de biomasa en el día i , $g/l/d$
P_{max}	productividad diaria de biomasa máxima, $g/l/d$
Re	número de Reynolds
t_i	tiempo en el instante i , <i>horas</i> o <i>días</i> (según se especifique)
SRM	metodología de superficie de respuesta
TOC	carbono orgánico total, g/l
v_g	velocidad superficial del gas, m/s
v_L	velocidad de ascensión del líquido, m/s
W	potencia comunicada al fluido, w/m^3
x_i	factores de la ecuación polinomial que determinan el comportamiento de la respuesta y
y	variable de respuesta en la ecuación polinomial

β_0	término independiente de la ecuación polinomial
β_i	coeficientes lineales de efectos principales de la ecuación polinomial
β_{ij}	coeficientes cuadráticos de la ecuación polinomial, responsables de las interacciones entre los términos cuadráticos puros
ε	retención de gas
λ_i	valores propios de la ecuación polinomial obtenidos usando el polinomio de factores codificados
μ_i	velocidad específica de crecimiento, h^{-1} o d^{-1} (según se especifique)
μ_{max}	velocidad específica de crecimiento máxima, h^{-1} o d^{-1} (según se especifique)
μ_s	velocidad de crecimiento específica en el punto de saturación, h^{-1}
μ_v	viscosidad de un fluido, $Pa \cdot s$
ρ	densidad de un fluido, kg/m^3