

INFLUENCIA DE LA ESTRATIFICACIÓN DE LA LUZ EN EL CULTIVO DE MICROALGAS EN FOTOBIOREACTORES

Ibañez, Manuel V.^A

^A*Grupo de Innovación en Ingeniería de Bioprocesos – INTEC-CONICET
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - UNL*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: Microalga, Fotosíntesis, Bioreactor

INTRODUCCIÓN

La producción a gran escala de cultivos de microalgas ha logrado acaparar grandes cantidades de atención desde mediados del siglo XX, debido a su potencialidad para la producción de sustancias con alto valor agregado para la acuicultura, cosmética y alimentación, así como para la fabricación de fármacos, fuente de proteínas, compuestos precursores de Biodiesel, y remoción de impurezas residuales en el tratamiento de aguas (Mata, 2010). A la hora de realizar un cultivo a gran escala de microalgas, el factor limitante con mayor preponderancia es la elección de un sistema abierto o cerrado, lo que trae enormes implicancias en el diseño del bioreactor a emplear (Gebremariam, 2012).

Los bioreactores a cielo abierto (Open Ponds) son aquellos en los cuales el contexto de crecimiento del cultivo simula un escenario con ligeras diferencias respecto del contexto nativo en el que se desarrollan las cepas de microalgas naturalmente, pero como es de esperar, presentan dificultades a la hora de plantear un control preciso sobre las variables operativas. Esto último afecta en gran medida a la producción de Biomasa. Si bien es cierto que la contribución de diversos factores en la merma de la producción pueden ser tolerados gracias a la generación de compuestos con alto valor agregado, para la mayoría de los demás usos, los reactores cerrados ofrecen mayores bondades. Eficiencia en la utilización de la fuente de carbono natural, reducción en los niveles de contaminación y mayor control de variables operativas, son algunas de las cualidades que se imponen, pero de toda aquella ventaja que podamos citar, la más destacable resulta ser la posibilidad de controlar la calidad de luz suministrada, ya que el mayor requerimiento nutricional que limita el crecimiento de una microalga es la luz. Presentado de ésta manera, este enfoque ambicioso brinda la capacidad de estudiar el proceso de cultivo a un nivel mucho más detallado, y es de este estudio exhaustivo que surge la posibilidad de generar herramientas predictivas que permitan obtener modelos para la proyección y optimización de técnicas de cultivos a gran escala de diferentes especies, o para comprender la biología de las cepas de microalgas de manera más amplia en su interacción con el entorno en el que se desarrollan las mismas.

Proyecto: “Procesos biológicos empleando microorganismos fotosintéticos: desarrollo de una plataforma biotecnológica para la producción de biomasa y metabolitos derivados”. Proyecto de Investigación Plurianual (PIP). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (2012, CONICET).

Director del proyecto: Dr. Horacio A. Irazoqui

Director del becario/tesista: Dr. Josué Miguel Heinrich

Modelar la producción de microalgas en el interior de un bioreactor implica realizar suposiciones (Heinrich, 2012). La mayoría de los trabajos existentes que exponen modelos se basan generalmente en que las células se encuentran expuestas a radiación continua en estado estacionario. Esta suposición podría aplicarse a cultivos de microalgas en recipientes poco profundos y diluidos. En este escenario debe pensarse a la microalga realizando cortos desplazamientos en el tiempo a lo largo de la superficie iluminada del medio de crecimiento, en el cual no habría grandes diferencias en el flujo de fotones incidentes entre la captación inicial de la fuente luminosa para realizar un ciclo fotosintético y la captación subsiguiente. Una suposición de éste tipo, culmina en general con la conclusión de que la tasa de producción de la cepa es independiente de la profundidad de la superficie iluminada. Ahora bien, transferir estas suposiciones a otros sistemas cerrados podría conducir a discrepancias en las predicciones, ya que pensar en reactores profundos y de mayor volumen, sometidos a regímenes de mezclado recaería en la necesidad de asumir que las células no se encuentran sometidas a regímenes de radiación continua, lo que de hecho es lo que se observa. La acción de corrientes erráticas en el medio de cultivo producto de la agitación o burbujeo de aire, sumado a una reducción en la profundidad de la superficie iluminada (debido a la aparición de zonas alejadas de la fuente de luz), provocarían en principio que se establezca un ciclo de luz-oscuridad en el cual las microalgas no se encontrarían sometidas a radiación continua sino a una intermitencia de flashes sucesivos.

El hecho de que el desplazamiento errático de las microalgas provoque que las mismas visiten de forma intermitente zonas de alta irradiancia en cuestión de milisegundos y zonas que no poseen esta condición, en principio lideraría la idea de que existe una condición en la cual la velocidad del proceso fotosintético no diferiría demasiado de la velocidad del proceso respiratorio, conduciendo probablemente a un aprovechamiento más eficiente de la energía luminosa suministrada. Ésta idea recae en el hecho de que la exposición a flashes de corta duración proveería fotones capaces de ser captados por los complejos antena, brindando la energía suficiente para realizar un ciclo fotosintético, sin provocar la saturación de los mismos, y en los instantes de tiempo en que las microalgas vagan por las zonas de menor intensidad lumínica, el conjunto de reacciones químicas que lidera la fotosíntesis habría tenido un lapso suficiente para regenerar los complejos antena, dejando a los microorganismos listos para captar energía nuevamente.

Buscando optimizar la tasa de crecimiento de las microalgas es que se aborda a un fenómeno que es de interés modelar en el interior de un sistema cerrado, y que posee relación directa con cultivos de alta densidad, como lo es *la atenuación de la luz en el medio de cultivo*. Pensar el interior del medio de cultivo en condiciones axénicas, es pensar en un medio acuoso de composición homogénea, en el cual en condiciones de iluminación simétricas, la intensidad y calidad de luz en todos los puntos interiores del volumen es comparable. Es lo mismo que hablar entonces de un medio No participativo, en el cual la luz atraviesa el medio sin encontrar mayores retos que Reflejarse o Refractarse. La presencia de organismos fotosintéticos plantea en esa dirección un escenario más exigente en cuanto a su análisis, ya que podemos pensar a las microalgas como partículas capaces de provocar absorción de luz y al mismo tiempo, ser capaces de dispersarla. Ésta absorción y dispersión, son en esencia la *atenuación de la luz*, que permite apreciar que lejos de las inmediaciones de las zonas de alta irradiancia, donde aún existen zonas en que la cantidad y calidad de luz es homogénea, se generan otras zonas en donde el bioreactor no puede considerarse homogéneamente iluminado. Podemos pensar entonces que la atenuación provoca *la Estratificación de la Luz*. El efecto inmediato de que la distribución de la luz no sea homogénea, es la aparición de zonas oscuras aleatorias, o en la posibilidad de generación de zonas extremadamente iluminadas. Ambos efectos son antagonistas a

la tasa de crecimiento, ya que contribuyen a la desactivación de la energía absorbida en forma de calor o lideran ciclos fotosintéticos ineficientes.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la estratificación en un cultivo de la microalga verde *Scenedesmus quadricauda*, manteniendo la cantidad de fotones entregados al reactor en un régimen constante, empleando como fuente lumínica tiras de luces LED, y variando la disposición de las mismas a través de la superficie del vaso del reactor, o sea cambiando la región de iluminación del reactor y por ende alterando la distribución espectral del campo de energía radiante en el interior del mismo.

METODOLOGÍA

Selección de la especie de microalga

La cepa de *S. quadricauda* fue adquirida desde “Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)- SAMS Research Services Ltd – United Kingdom”. El crecimiento autotrófico de las microalgas simplifica los requerimientos nutricionales que debe ofrecer un medio de cultivo. Se ha optado por la elección del medio BBM (Bold Basal Medium) para los cultivos en FBRs. Dicho medio fue explorado por los integrantes que componen el grupo de trabajo, y validada su aptitud para el crecimiento de la cepa.

Escalado del Inoculo

Es necesario para la inoculación de los FBRs contar con un cultivo concentrado, para ello se realizó un escalado operando de la siguiente manera:

1. Vertido de un tubo de ensayo que contenía la cepa *S. quadricauda* en un frasco Erlenmeyer de 500ml/1000ml con 200 ml de medio BBM estéril. El escalado se realizó por duplicado.
2. Ambos frascos Erlenmeyer fueron colocados en una cámara iluminada a fin de lograr condiciones óptimas para el crecimiento de la microalga, y los mismos fueron agitados mediante agitadores orbitales a 150 rpm hasta lograr turbidez considerable.
3. Tras el ensamblaje del bioreactor (ver sección 2.4), se procedió a inocular un volumen de 200 mL de uno de los cultivos propagados en 3 L de medio de cultivo BBM fresco colocados previamente en el FBR. La inoculación con un volumen de un cultivo denso de microalgas reduce los riesgos de contaminación.

EL FBR empleado es un bio-reactor comercial automatizado, el modelo “Labfors 3” de INFORS-HT. Este reactor posee un vaso de vidrio autoclavable de 3 litros de volumen útil y un centro de control y registro automatizado de temperatura, pH, presión de O₂, nivel de líquido, alimentación de soluciones y toma de muestra, inyección de aire filtrado y agitación. El aire es suministrado a través de un compresor de aire y es esterilizado con un filtro de nylon de 0.4 micras antes de ingresar al reactor a través del difusor.

Condiciones de cultivo en el FBR



Fig : Disposición de tiras LED Concentradas

Condiciones Ensayadas		Concentración	
		0,5 g células/L	1 g células/L
Perfil de Luz	Concentrado	Condición 1	Condición 2
	Equiespaciado	Condición 3	Condición 4



Fig : Disposición de tiras LED Equiespaciadas

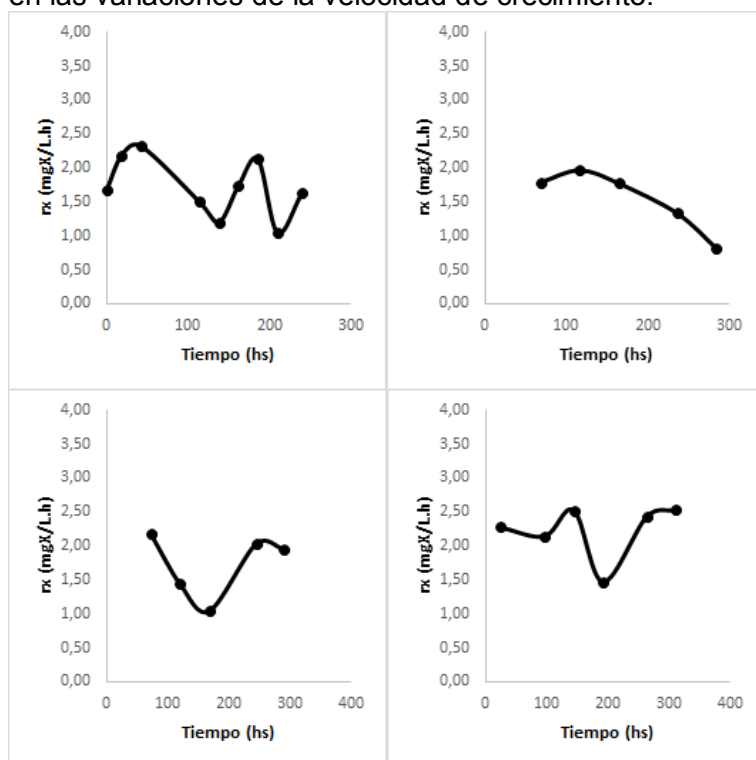
Seguimiento del crecimiento de *S. quadricauda* en el FBR

La variable seleccionada para realizar el seguimiento del cultivo fue la determinación de los sólidos suspendidos totales (SST) mediante metodología gravimétrica. La técnica consiste en la centrifugación de un volumen conocido de microalgas y su pasaje a un tubo dco previamente pesado. Se procede a su secado en estufa durante un lapso de 24-48 hs a 90°C en posición inclinada para lograr mayor superficie de contacto. A continuación se colocan los tubos en desecador y se espera el tiempo suficiente para la estabilización de la medida, registrada en balanza analítica. Por diferencia de pesos se obtiene el valor de SST.

RESULTADOS

Velocidad de Crecimiento de los Microorganismos (r_x)

De la estimación de la Biomasa producida en lapsos de tiempos definidos, surge la posibilidad de calcular las velocidades de crecimiento para las microalgas en dichos lapsos. De las Figuras a-d se desprende la progresión en el tiempo de duración de cada condición ensayada, del r_x para la cepa de *S. quadricauda*. Se eligió mostrar mediante líneas que no representan una regresión matemática, una cierta tendencia en las variaciones de la velocidad de crecimiento.



	Promedio (mg X/L.h)
Fig a	1,83
Fig b	1,78
Fig c	2,22
Fig d	1,87

Tabla 1: Promedio de las series de mediciones de cada disposición de luces LED ensayadas

De los resultados obtenidos, puede verificarse que el efecto de la estratificación de la luz no resulta ser significativo respecto de la velocidad de crecimiento. Posiblemente, las condiciones de agitación provocan que el mezclado en el interior del reactor es muy eficiente, lo que culmina en enmascarar el efecto de la estratificación de la luz, al asegurar que todas las microalgas estén igualmente iluminadas, independientemente de la disposición de la fuente luminosa. Resta evaluar si en condiciones de agitación menores puede verificarse alguna influencia, o si realmente el efecto es poco significativo frente a los fenómenos de mezclado.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Mata, M., Martins, A., Caetano, N., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14 (2010) 217–232.
- Heinrich, M., Niizawa, I., Irazoqui, H., 2012. Analysis and Design of Photobioreactors for Microalgae Production. Photochemistry and Photobiology, 88, 952–960.
- Gebremariarn, A., Zarmi, Y., 2012. Synchronization of fluid-dynamics related and physiological time scales and algal biomass production in thin flat-plate bioreactors. 111, 034904