

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA, LUZ Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN EN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE LAS MICROALGAS.

Grado en Biotecnología



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



Alejandro Egea Mullor

Tutor: José María Fernández Sevilla

Cotutor: Ana Sánchez Zurano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	8
2.	OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	17
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.	Microorganismos y medios de cultivo	17
3.1.1.	Medio de cultivo para <i>Scenedesmus almeriensis</i>	19
3.1.2.	Medio de cultivo para clon <i>T-ISO</i>	19
3.1.3.	Medio de cultivo para <i>S.platensis</i>	20
3.2.	Columnas de burbujeo a escala de laboratorio	20
3.2.1.	Regulación del pH del cultivo	21
3.2.2.	Control de la iluminación	22
3.2.3.	Agitación del cultivo.....	22
3.3.	Sistema de respirometría	22
3.4.	Medidas de fotosíntesis y respiración	23
3.4.1.	Porcentaje de oxígeno.....	25
3.4.2.	Temporizador.....	25
3.4.3.	Irradiancia	25
3.5.	Concentración del cultivo.....	25
3.5.1.	Métodos indirectos: Absorbancia	26
3.5.2.	Métodos directos: Peso seco.....	26
3.6.	Análisis estadístico	27
4.	PLAN EXPERIMENTAL	27
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1.	Ensayos con <i>Scenedesmus almeriensis</i>	28
5.2.	Ensayos con <i>Isochrysis galbana</i> (clon T-ISO).....	33
5.3.	Ensayos con <i>Spirulina Platensis</i>	36
6.	CONCLUSIONES	41
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotobiorreactor externo tipo Raceway (izquierda) y tipo Thin Layer (derecha)	9
Figura 2. Fotobiorreactor tipo tubular	10
Figura 3. Evolución de la temperatura en un fotobiorreactor tipo Raceway a lo largo de un día durante las primavera, verano, otoño e invierno	11
Figura 4. Evolución de la temperatura en un fotobiorreactor tubular durante 24 horas en 4 estaciones diferentes.	12
Figura 5. Curva sigmoideal del modelo de Molina para correlacionar datos experimentales	15
Figura 6. Curva Fotosíntesis neta-Irradiancia.....	16
Figura 7. Fases de crecimiento de una microalga cultivada en discontinuo.....	18
Figura 8. Cultivo semicontinuo de <i>Spirulina platensis</i> . El ciclo de cosechado y dilución se repite una y otra y otra y otra vez.	18
Figura 9. Sistema de columnas de burbujeo a escala de laboratorio.	21
Figura 10. Intercambiador frio/calor utilizado en los ensayos.....	21
Figura 11. Sistema de respirometría	23
Figura 12. Lámparas LED Sicom que proporcionan iluminación necesaria al cultivo	23
Figura 13. Funcionamiento de los ciclos luz- oscuridad del sistema de respirometría.....	24
Figura 14. Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis	26
Figura 15. Sistema de filtración.....	27
Figura 16. Resumen del plan experimental.....	28
Figura 17. Curva P-I <i>S.almeriensis</i> para ensayos a 15 y 20 °C	29
Figura 18. Curva P-I <i>S.almeriensis</i> para ensayos a 30 y 40 °C	¡Error! Marcador no definido.
Figura 19. Valor de PO_{2max} en los ensayos con <i>S. almeriensis</i> a cada temperatura y tiempo de exposición	32
Figura 20. Valor I_k en los ensayos con <i>S.almeriensis</i> a cada temperatura y tiempo de exposición	32
Figura 21. Curva P-I T-ISO para 10 y 20 °C.....	33
Figura 22. Curva P-I T-ISO para 30 y 40 °C.....	34
Figura 23. Variación de la PO_{2max} promedio de T-ISO a cada temperatura y tiempo de exposición	36
Figura 24. Variación de la I_k promedio de T-ISO a cada temperatura y tiempo de exposición.....	36
Figura 25. Variación de la PO_{2max} promedio de <i>Spirulina</i> a cada temperatura y tiempo de exposición	39
Figura 26. Variación de la I_k promedio de <i>Spirulina</i> a cada temperatura y tiempo de exposición	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición medio de cultivo Arnon.....	19
Tabla 2. Composición medio de cultivo A T-ISO.....	19
Tabla 3. Composición de medio de cultivo B T-ISO.....	19
Tabla 4. Composición medio Arnon para cultivo de Spirulina	20
Tabla 5. Concentración del cultivo de <i>S.almeriensis</i> durante el ensayo a 15 °C.....	29
Tabla 6. Concentración del cultivo de <i>S.almeriensis</i> durante el ensayo a 40 °C.....	31
Tabla 7. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 10 °C	33
Tabla 8. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 20 °C	34
Tabla 9. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 30 °C.....	35
Tabla 10. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 40 °C	35
Tabla 11. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 10 °C.....	37
Tabla 12. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 20 °C.....	38
Tabla 13. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 30 °C.....	38
Tabla 14. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 40 °C.....	38

AGRADECIMIENTOS

*Al director José María Fernández,
A la codirectora Ana Sánchez Zurano por toda su ayuda
Y a todo el personal del IFAPA*

RESUMEN

Las microalgas son microorganismos unicelulares eucariotas con capacidad para realizar la fotosíntesis. Al poseer una tasa de crecimiento más elevada que las plantas superiores, generan biomasa más rápidamente. Esta biomasa está constituida por productos de alto valor añadido que van desde pigmentos carotenoides a sustancias con alto contenido proteico. Para poder llevar un cultivo de microalgas a gran escala y obtener así una producción masiva de estos productos de interés y alto valor económico se deben realizar ensayos previos a pequeña escala, en condiciones de laboratorio. De esta manera, se obtiene información que hace posible optimizar factores clave para el cultivo masivo de microalgas como pH, temperatura, intensidad de luz, concentración adecuada de nutrientes, etc. La forma más útil de presentar la caracterización cinética de una microalga son los modelos de crecimiento y de fotosíntesis en cultivos de microalgas. Estos modelos son ecuaciones que permiten obtener la velocidad de crecimiento o generación de oxígeno de las microalgas. Los modelos de crecimiento son útiles para observar cómo afectan estas diferentes condiciones ambientales al crecimiento del cultivo y a su respuesta fotosintética y por lo tanto son esenciales en el diseño de fotobiorreactores y en la adecuada gestión de cultivos masivos en condiciones externas.

En este trabajo se va a observar la influencia de la luz, la temperatura y tiempo de exposición sobre la actividad fotosintética de tres especies diferentes de microalgas. La productividad neta de oxígeno permite estimar la productividad de biomasa generada en los cultivos de las microalgas. Con este fin, se van a realizar una serie de experimentos donde se exponen las cepas de microalgas seleccionadas a diferentes temperaturas (10, 20,30, 40 y 50°C) y valores de irradiancia (50,200, 350, 600, 800, 1200, 1500 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) durante un período de tiempo determinado. Para evaluar la actividad fotosintética neta, se empleará un equipo conocido como respirómetro, el cual permite cuantificar la curva de producción de oxígeno bajo condiciones de luz, y la curva de consumo de oxígeno en oscuridad (relativa a la respiración celular). En este trabajo, se realizan ensayos con tres especies diferentes: *Scenedesmus almeriensis*, *Isochrysis galbana* (clon T-ISO) y *Spirulina platensis*. Se obtuvieron medidas de fotosíntesis y respiración de muestras tomadas a tiempos 0,2,4,6 horas. Estas medidas y datos aplicados a modelos matemáticos de crecimiento permitirán predecir y optimizar la productividad de las cepas de microalgas evaluadas, cuando son producidas en condiciones externas, en las cuales aparecen importantes fluctuaciones de luz y temperatura a lo largo del día y entre las distintas estaciones del año.

ABSTRACT

Microalgae are eukaryotic unicellular microorganisms with the capacity to realize photosynthesis. Due to their higher growth rate, they generate biomass faster than terrestrial plants. This biomass is constituted by high value products ranging from carotenoids pigments to molecules with huge protein content. With the aim of developing microalgae culture at large scale and to obtain a massive production of these interesting and high economic value products, it is necessary to do laboratory-scale assays before. In this way, it is easier to modify key factors for the microalgae massive culture such as pH, temperature, luminous intensity, and an adequate nutrient concentration. The most useful way to present the kinetic characterization of a microalgae are growth and photosynthesis models of microalgae cultures. These models are equations that allow to obtain the growth rate or the oxygen generation rate in these microorganisms. These models are useful to observe how these environmental variations affect the culture growth rate and photosynthetic efficiency. What it is done in this work is to observe the influence of light, temperature, and exposure time over net photosynthesis activity of three different microalgae strains. Net oxygen productivity allows to determine the biomass productivity in a microalgae culture. With this purpose, some series of experiments will be conduct, where we will submit our microalgae strains at different temperature (10,20,30,40 and 50 °C) and different irradiance values (50,200, 350, 600, 800, 1200, 1500 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) during a determinate exposure time. To evaluate the net photosynthesis rate, it will be used a system known as a respirometer, which allows to quantify the culture oxygen production curve under light conditions, and the oxygen consumption curve under dark conditions (related to cell respiration). In this project, the three strains used to conduct the experiments are: *Scenedesmus almeriensis*, *Isochrysis galbana* (clon T-ISO) and *Spirulina platensis*. We obtained photosynthesis and respiration measurements at times 0,2,4 and 6 hours. These measurements and data applied to mathematical growth models let us to predict and optimize the productivity of the strains studied, when produced in outdoor conditions, in which appear several fluctuations of light and temperature along the day and among different seasons of the year.

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos eucariotas fotosintéticos que presentan una gran diversidad en cuanto a color, forma, tamaño y capacidad de adaptación a distintos ambientes. Presentan una gran diversidad taxonómica, y su ubicuidad les permite encontrarse ampliamente distribuidos por la biosfera, pero mayoritariamente en ambientes acuáticos. Junto con las cianobacterias representan alrededor del 1-2 % de la biomasa de carbono fijada en el mundo (Paz et al., 2011).

Las microalgas constituyen unos de los organismos con un crecimiento más rápido de toda la biosfera. Hasta un 90 % de su contenido está constituido por carbohidratos, grasas y proteínas. Además, son también ricas en otros compuestos como pigmentos, vitaminas y compuestos biológicamente activos (José Resina Rueda et al., 2019). Por esta serie de razones, son un objeto fundamental de estudio al igual que la manera de optimizar su producción.

El interés por las microalgas apareció desde hace varios siglos. Hay testimonios que afirman el uso de las microalgas como alimento por parte de poblaciones indígenas. De hecho, cianobacterias como *Nostoc* o *Arthrospira (Spirulina)* han sido cosechadas con fines alimenticios durante miles de años en sitios como China, Sudamérica y África donde crecían naturalmente en lagos (Paz et al., 2011). Sin embargo, el cultivo de microalgas tal y como lo conocemos hoy es relativamente nuevo y se remonta a principios de los años 50, debido a predicciones por escasez en el consumo de alimentos proteicos (Borowitzka, 1999). Junto con el cultivo de microalgas, se empezó a iniciar el estudio sistemático de las microalgas para extraer sustancias biológicamente activas, y es de esta forma como empieza a aparecer el concepto que hoy conocemos como biotecnología de microalgas. En general, la biotecnología se puede definir como un área del conocimiento moderno que combina de manera innovadora la biología y la ingeniería de procesos que, aplicados sobre organismos vivos, sus tejidos, células o partes generan bienes, servicios o conocimientos que promoverán el bienestar de la humanidad (Hernández Fonseca, 2010). Teniendo en cuenta esta definición inicial acerca de qué es la biotecnología podríamos definir el concepto de biotecnología de microalgas como “cualquier aplicación de estos organismos o sus derivados con el fin de generar bienes o servicios”. Durante los últimos años se han ido desarrollando diversas aplicaciones en el sector biotecnológico que utilizaban las microalgas como protagonistas.

No obstante, para cualquiera que sea el propósito del empleo de las microalgas es necesario proceder a su cultivo en diferentes tipos de biorreactores a gran escala donde hay que tener en cuenta una serie de parámetros para que el cultivo funcione con éxito. Entre estos parámetros se encuentran: concentración de nutrientes, luz, pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc. Hoy en día, en los sistemas de producción de microalgas es posible controlar el pH mediante la inyección a demanda de CO₂, el oxígeno disuelto mediante la inyección de aire, y la concentración de nutrientes (especialmente nitrógeno y fósforo) a través del medio de entrada (Acién et al., 2016). Sin embargo, regular o cambiar las condiciones de luz y temperatura en cultivos a gran escala es complicado y muy caro, por lo que resulta inviable para la mayoría de las aplicaciones de las microalgas.

Actualmente, Almería se ha convertido en un referente en la producción de microalgas para distintos fines industriales, desde la producción de biomasa para generar productos de alto valor añadido como para otras aplicaciones de menor valor, como el desarrollo de productos para la agricultura (bioestimulantes y biopesticidas) y para acuicultura. En concreto, en el Instituto de investigación y formación agraria (IFAPA), se ha desarrollado una instalación a escala piloto, en la cual distintos tipos de microalgas y cianobacterias son producidas anualmente. En el Centro, se utilizan diferentes tipos de fotobiorreactores en función del uso que vaya a tener la biomasa producida (Figura 1). Si se están utilizando en proyectos que involucran productos de poco valor añadido como la producción de biofertilizantes o la depuración de aguas residuales, que se corresponden con productos a granel, se cultivan en reactores que operan bajo condiciones abiertas al aire libre donde el control de ciertos parámetros del reactor es más difícil, así como el control de agentes contaminantes. En el centro de investigación IFAPA los fotobiorreactores (FBRs) abiertos se corresponden con FBRs de tipo Raceway y de tipo Thin-Layer. El primero consiste en un canal de recirculación fabricado con fibra de vidrio de 3 mm de grosor, de aproximadamente 30 cm de profundidad donde el cultivo es agitado mediante el empleo de una rueda de paleta. Posee forma de U en los extremos (Carreño-Zagarra et al., 2019). En segundo lugar, están los fotobiorreactores tipo Thin Layer el cual está caracterizado como su propio nombre indica por ser un reactor plano de poca profundidad que comprende un intervalo entre 0,5 y 5 cm, el cual presenta recirculación que genera una pendiente adecuada del 1-2 % (Morillas-España et al., 2020). Ambos fotobiorreactores cuentan con inyección de aire y CO₂ a demanda para regular el oxígeno disuelto y el pH, respectivamente.



Figura 1. Fotobiorreactor externo tipo Raceway (izquierda) y tipo Thin Layer (derecha)

Si, por el contrario, las microalgas en cuestión se están cultivando para obtener productos con un alto valor añadido como pueden ser productos de alimentación con un alto valor nutricional o productos cosméticos, se hace uso de fotobiorreactores cerrados como las columnas de burbujeo y los reactores tubulares (Figura 2).



Figura 2. Fotobiorreactor tipo tubular

Las columnas de burbujeo se corresponden con sistemas de forma cilíndrica en los que se introduce gas desde la parte inferior por lo que tampoco presentan agitación mecánica perjudicial para los microorganismos mientras que los reactores tubulares consisten en tubos de vidrio pyrex o material de plástico conectados en serie donde el cultivo circula a través de ellos gracias al impulso proporcionado por sistemas de flujo de aire “airlift” que también se encargan de purgar el exceso de oxígeno en el reactor (Eriksen, 2008). Esta es una ventaja respecto a los sistemas abiertos que utilizan agitación mecánica como los Raceways, ya que dañan las células. Ambos sistemas presentan inyección de CO₂ para controlar el pH, y mantener un valor óptimo para el crecimiento de la especie de microalga o cianobacteria objeto de producción.

Como se puede observar, la elección de un tipo de reactor u otro va a depender principalmente de la utilidad que se le quiera dar a los productos generados. Además, cada sistema de producción presenta sus ventajas y desventajas. Los reactores de tipo cerrado presentan ciertas ventajas a la hora de controlar ciertos parámetros y fenómenos perjudiciales como podría ser el efecto de sombreado, el daño por agitación mecánica o la contaminación de agentes patógenos al no estar expuestos al exterior. Sin embargo, tanto los de este tipo como los abiertos no están exentos de las variaciones ambientales.

Se ha visto que ambos tipos de sistemas poseen herramientas para controlar tanto el pH como el porcentaje de oxígeno disuelto. No obstante, hay dos fenómenos ambientales a tener muy en cuenta como son la luz y la temperatura. Dichos factores son los más cruciales a la hora de influir sobre el crecimiento celular y la productividad de las microalgas, y ambos son muy complicados de regular y controlar tanto en sistemas abiertos como cerrados. Generalmente para que el cultivo de microalgas y cianobacterias sea sostenible, se usa la luz solar frente a la iluminación artificial. Aunque en alguna

ocasión pueden aparecer fenómenos de fotoinhibición en el crecimiento, no suele representar ningún problema la exposición a distintas intensidades de luz para la mayoría de las microalgas y cianobacterias. Además, La luz es el nutriente que proporciona la energía a las microalgas para que puedan llevar a cabo la generación de nueva biomasa y es por tanto el motor del crecimiento. La luz es siempre el nutriente limitante en un fotobiorreactor bien diseñado, ya que los demás nutrientes se pueden añadir en exceso. Sin embargo, la luz es limitada y además es difícil hacerla penetrar en el fotobiorreactor. Por otra parte, la temperatura resulta ser un parámetro crucial para el cultivo de estos microorganismos, ya que temperaturas extremas llegan a dañar gravemente las células, retrasar su crecimiento e incluso provocar la muerte (Ras et al., 2013).

A continuación, se muestran gráficos relativos a la temperatura alcanzada en un sistema abierto tipo Raceway durante un día cualquiera de cada estación del año en Almería (Figura 3).

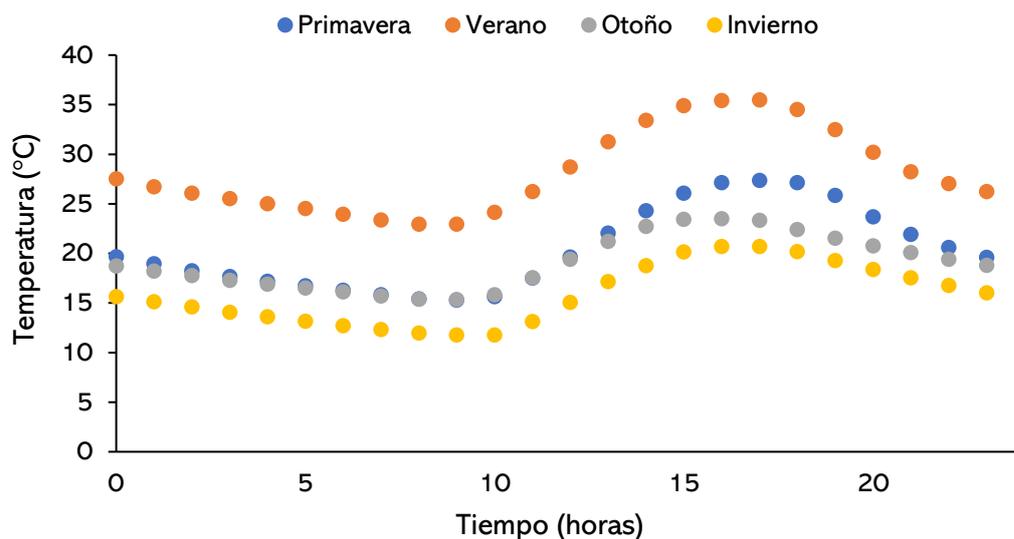


Figura 3. Evolución de la temperatura en un fotobiorreactor tipo Raceway a lo largo de un día durante las primavera, verano, otoño e invierno

En esta otra figura se muestra cómo evoluciona la temperatura en un fotobiorreactor de tipo tubular (tipo cerrado) durante un día cualquiera de cada estación del año en Almería (Figura 4).

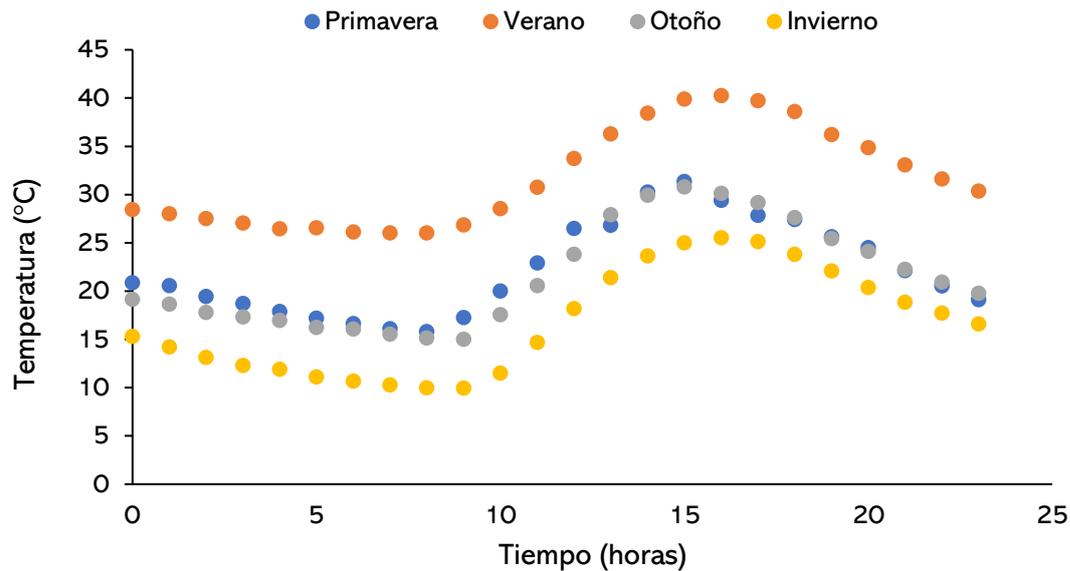


Figura 4. Evolución de la temperatura en un fotobiorreactor tubular durante 24 horas en 4 estaciones diferentes.

Cómo se puede observar en estas figuras, hay grandes fluctuaciones de temperatura a lo largo del año, e incluso durante las 24 horas del día. Durante los meses de verano se alcanzan altas temperaturas que se mantiene varias horas a lo largo día. Por ejemplo, en los reactores tubulares la temperatura dentro del fotobiorreactor se mantiene entre 35 y 40 °C durante unas 6 horas. Mientras que, en invierno, los cultivos bajan hasta 10-15 °C y permanecen varias horas a estas temperaturas. Como consecuencia, es indispensable tener en cuenta el factor temperatura cuando se van a producir microalgas y cianobacterias, además de evaluar cual es el rango de temperatura al cual muestran actividad las cepas de interés industrial que se vayan a producir. Por tanto, previamente a la producción de microalgas a gran escala en exteriores, es importante someter a estos microorganismos de metabolismo fotosintético, con toda la maquinaria celular que comprende, a las temperaturas a las que se van a encontrar en los los FBRs durante las diferentes épocas del año. Así podremos evaluar este efecto sobre la actividad de los microorganismos y decidir cuándo es idóneo llevar a cabo el cultivo de una especie y cuando por el contrario es contraproducente ya que la microalga no está teniendo apenas actividad fotosintética neta o incluso no tiene porque se ha producido la muerte celular. Una vez que se tiene una idea de cómo se desarrolla el cultivo de microalgas a gran escala y de los factores y contratiempos a los que está expuesto, se pueden introducir especies de microalgas y cianobacterias de elevado interés industrial y que serán objeto de estudio en este trabajo. Cada especie tiene sus condiciones óptimas de cultivo, donde la mayoría son controlables y regulables, menos la temperatura, la luz que reciben y su tiempo de exposición. Por tanto, es necesario saber cómo reaccionan las siguientes especies a escala de laboratorio antes de meternos de lleno en su producción masiva.

Scenedesmus almeriensis

Esta especie fue aislada de un reactor de agua dulce en un invernadero localizado en la provincia de Almería, de ahí su denominación como especie independiente dentro del género *Scenedesmus*, que se engloba dentro del grupo de las *Chlorophyceae*. El hábitat acuático en el que se encontraba *Scenedesmus* recibía una irradiancia promedio de $2000 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y 45°C , lo que indica la robustez de esta especie a la hora de soportar altas irradiancias incidentes y temperaturas elevadas. (Sánchez et al., 2008). Las dimensiones de sus células presentan $3 \mu\text{m}$ diámetro por $6 \mu\text{m}$ de largo, con una morfología ovalada. Las células se pueden agrupar en *clusters* de 6 o 10 células.

Scenedesmus almeriensis, debido a esta robustez que se comenta, es ampliamente utilizada en la depuración de aguas residuales donde quizás otra especie con unos requerimientos más específicos y más débil a la hora de soportar ciertas condiciones ambientales no sería muy buena candidata para ello. La composición de estas aguas podría equivaler a la composición de los medios de cultivo empleados en el crecimiento de las microalgas. En concreto, las aguas residuales son ricas en amonio, nitrato y fosfato, sustratos que aportan el nitrógeno y el fósforo que necesitan para su crecimiento. En el IFAPA, esta especie es utilizada en la línea de trabajo relacionada con la depuración de efluentes de aguas residuales y se lleva a cabo en fotobiorreactores externos como el Thin Layer o el Raceway ya que su finalidad no es la obtención de productos con alto valor añadido.

Sin embargo, no es únicamente útil para estos procesos de depuración, sino que también es considerada como una gran fuente de luteína. Este es un compuesto químico que pertenece al grupo de las xantofilas recomendado para la prevención de ciertos tipos de cáncer, el cual es ampliamente utilizado como suplemento alimenticio, mayoritariamente en los Estados Unidos (Sánchez et al., 2008).

***Isochrysis galbana* (clon T-ISO)**

La microalga *I. galbana* es una especie de aguas salinas perteneciente a la clase de los *Haptophyceae*. Poseen formas ovoides con diámetros que van desde los 3 a los $6 \mu\text{m}$ provistas de flagelos móviles. Hay gran cantidad de cepas que pertenecen al género de *Isochrysis*, pero en este caso vamos a trabajar con una de las que se usa más comúnmente: *Isochrysis aff. galbana* Green "Tahiti" (T-ISO), la cual es una de las más utilizadas debido a su perfil bioquímico. Esta cepa presenta una ventaja para su uso en la industria de la acuicultura ya que ha sido una de las microalgas marinas más utilizadas en este sector durante los últimos años (He et al., 2018). Esto se debe a que su contenido en PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) es muy alto en la biomasa seca. Estos ácidos grasos están involucrados en procesos antiinflamatorios, ya que reducen los niveles de triglicéridos y colesterol que se depositan en las paredes arteriales. Los mayores representantes de este grupo son DHA (ácido docosahexaenoico) y omega 3.

Por tanto, la aplicación de estos en la alimentación para peces contribuirá positivamente al perfil lipídico de estos organismos y por defecto a sus características organolépticas, las cuales son de interés para el consumidor.

Spirulina 'Arthospira' platensis

Las cianobacterias son un *phylum* de microorganismos relacionado con las bacterias debido a su naturaleza procariota. Sin embargo, debido a su capacidad de realizar la fotosíntesis se les engloba generalmente dentro del grupo de las microalgas, siendo conocidas como algas verdes-azuladas. Las

dos especies más conocidas dentro del género de la Spirulina son *Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima* (Lafarga et al., 2020). En este caso vamos a trabajar con la especie *Arthrospira platensis*. Su rango de pH óptimo para su crecimiento se sitúa entre los valores de 8.5 y 10, pero puede tolerar valores que van desde 7,5 hasta 11,5. Además, se presenta como una especie salina que posee una gran tolerancia a los ambientes salinos debido a su alta capacidad de ajuste osmótico, ya que es capaz de llevar a cabo a la acumulación intracelular de glycosyl-glicerol el cual es un carbohidrato de bajo peso molecular lo que lo hace apto para la tarea de la regulación.

Es una de las especies con más proyección de futuro a la hora de obtener suplementos alimenticios, debido a su alto valor nutricional ya que presenta un gran contenido en proteínas en porcentaje de materia seca. Su producción puede ser de mayor utilidad en países de Asia o África donde un gran porcentaje de la población padece de malnutrición debido a la falta de recursos.

Debido al elevado interés industrial de estas cepas, es de vital importancia evaluar las condiciones óptimas de crecimiento, con el fin de poder predecir su comportamiento durante las diferentes condiciones ambientales y operaciones que pueden aparecer a lo largo del año. Generalmente, cuando se quiere llevar a cabo el estudio del crecimiento de microalgas y cianobacterias, y su posterior modelado, se realizan ensayos a nivel de laboratorio en modo batch exponiéndolas a diferentes intensidades de luz bajo las condiciones deseadas. Con estos estudios, es posible obtener la tasa específica de crecimiento de la especie estudiada a diferentes intensidades de luz, y bajo las condiciones de temperatura deseadas. Una vez que se obtienen estos datos experimentales, se lleva a cabo el modelado del crecimiento.

Hay una gran variedad de ecuaciones relativas a los modelos de crecimiento, pero vamos a centrarnos en uno de los modelos más extendidos en biotecnología de microalgas, que se corresponde con el de Molina Grima (Grima et al., 1994). Este se utiliza para casos donde aparece una limitación del crecimiento por la disponibilidad de luz. La ecuación de dicho modelo se corresponde con la siguiente:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \quad \text{Ecuación 1}$$

En dicho modelo la tasa específica de crecimiento viene determinada por 3 parámetros hallados de forma experimental:

- μ_{max} : Tasa de crecimiento máxima para nuestra microalga bajo ciertas condiciones experimentales. Sus unidades se corresponden con h^{-1} .
- I_k : Constante que viene determinada por el valor de irradiancia para el cual la tasa de crecimiento es la mitad de la máxima. Es un parámetro análogo a la constante de Michaelis-Menten en la cinética de la velocidad de una reacción enzimática. Sus unidades se corresponden con $\mu E/m^2 \cdot s$.
- n : Se corresponde con un parámetro responsable de la forma sigmoideal en la curva de crecimiento (figura 5), esto es así siempre que su valor sea superior a 1. Es adimensional.

La principal ventaja de este modelo es que incluye una parte experimental, en la cual se puede calcular la constante I_k y el parámetro n correspondiente para cada especie de microalga. Esto nos permitirá obtener una simulación del crecimiento en futuras ocasiones (Cortés Conde et al., 2013). La utilidad de esto se corresponde con la posibilidad de saber a priori si, llevar a cabo el cultivo de cualquier especie, será rentable o no según las condiciones ambientales presentes. En la Figura 5 se muestra este modelo utilizado para correlacionar datos de tasas específicas de crecimiento de una microalga, obtenidos experimentalmente.

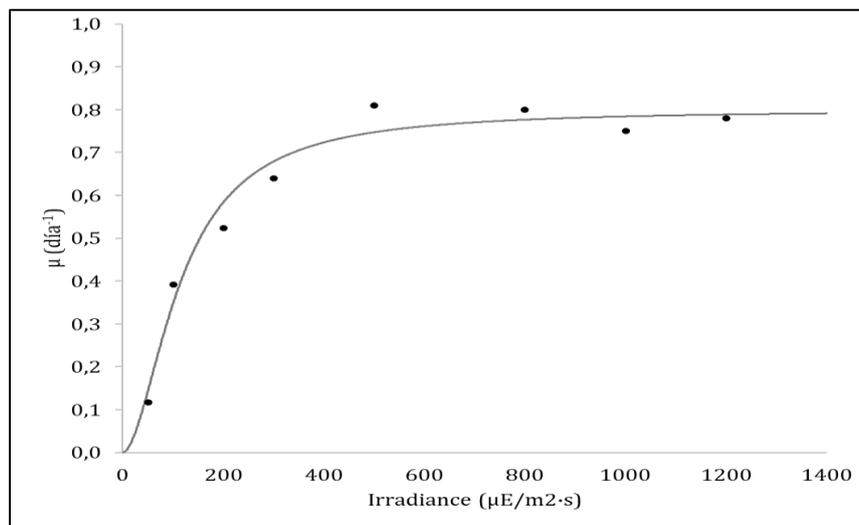


Figura 5. Curva sigmoide del modelo de Molina para correlacionar datos experimentales

Sin embargo, estos ensayos en batch implican bastante tiempo experimental y sus correspondientes costes. Para obtener valores de la velocidad específica de crecimiento de cada microorganismo se necesita, como mínimo, 10 días de ensayos con un modo de operación en discontinuo (Tang et al., 2014). Como no siempre se dispone del suficiente tiempo ni recursos, cada vez se está extendiendo más la realización de experimentos foto-respirométricos en los cuales se determina la fotosíntesis neta de la especie de interés bajo determinadas condiciones estudio específicas (Tang et al., 2014). El uso de las técnicas foto-respirométricas permiten determinar la actividad fotosintética midiendo la tasa de producción de oxígeno (TPO) en condiciones de luz y la tasa de consumo de oxígeno (TCO) en la oscuridad. Estas medidas, que se basan en la producción / consumo de oxígeno, son rápidas y fáciles de obtener. Se entrará en más detalle con esto en el apartado 3.4. de materiales y métodos. Esta metodología permite determinar el efecto de los parámetros de cultivo sobre la actividad de las microalgas y medir parámetros cinéticos como las constantes de saturación de los nutrientes. Seguidamente, la fotosíntesis realizada por las microalgas y cianobacterias se puede correlacionar posteriormente con la tasa específica de crecimiento (μ), ahorrando bastantes días de trabajo.

En este trabajo, utilizando las tres especies mencionadas anteriormente se van a realizar ensayos para medir la producción neta de oxígeno bajo diferentes condiciones de luz y temperatura (fotosíntesis neta). Además, se estudiará como afectan diferentes tiempos de exposición, desde 0 a 6 horas de

exposición, a una determinada temperatura a la fotosíntesis neta de las tres especies seleccionadas. El valor de fotosíntesis neta se define como la diferencia entre el carbono fijado durante la fotosíntesis y las pérdidas debidas a la respiración y fotorrespiración (Pérez & Carril, 2009). Esto se consigue mediante la alternancia de periodos de luz-oscuridad de una misma duración cada uno. Gracias a estos datos experimentales se podrá obtener lo que se conoce como curva P-I (Figura 6), que se corresponde con una representación gráfica no lineal entre la tasa fotosintética neta y la irradiancia como variable independiente.

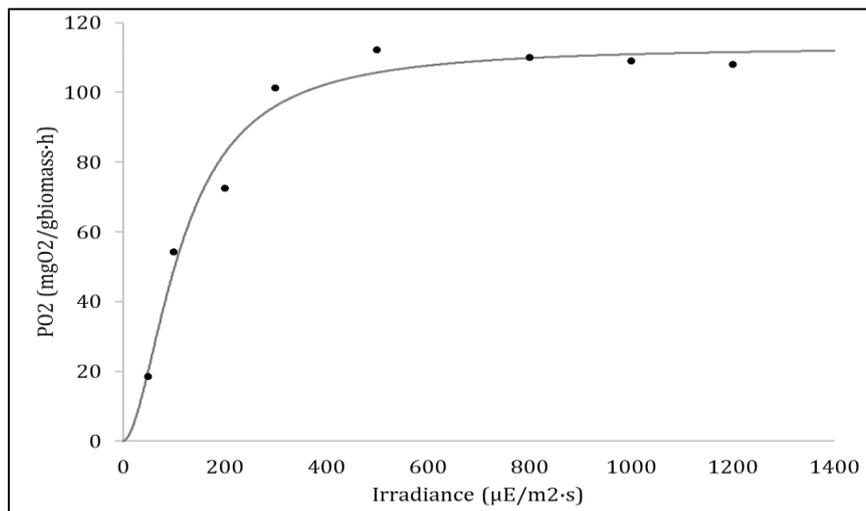


Figura 6. Curva Fotosíntesis neta-Irradiancia

En las curvas P-I se representan los valores de producción de oxígeno neta obtenidos tras la exposición de la cepa de estudio a distintos valores de irradiancia. Por otro lado, se procede a ajustar los datos experimentales obtenidos a una ecuación matemática que describa la producción de oxígeno en función de la irradiancia. Una de las ecuaciones matemáticas más ampliamente aceptadas en el cultivo de microalgas, es la ecuación de Molina (1994) (Ecuación 2).

$$PO2 = \frac{PO2_{max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde la variable tasa específica de crecimiento sería sustituida por la producción neta de oxígeno, la cual vendrá expresada en mgO₂/L · h. A partir de esta ecuación se obtiene una curva no lineal que abarcará todos los valores de irradiancia existentes entre 0 y 1500, no únicamente valores puntuales como se obtienen en los ensayos experimentales.

Para poder ajustar los datos experimentales obtenidos a la ecuación seleccionada, se empleará un programa informático-estadístico que permite realizar una regresión no lineal de los datos experimentales para ver como ajustan a dicho modelo. Esta regresión proporcionará los valores de los parámetros característicos de la ecuación como PO_{2max} e I_k a cada tiempo y temperatura de la especie en cuestión.

Tras la obtención de estos valores, se desea ver cómo afectan estas variables temperatura y tiempos de exposición a los valores de productividad máxima de oxígeno (PO_{2max}) y a los valores de I_k . Dichas variaciones nos servirán para identificar los momentos más idóneos en cuanto a productividad del cultivo se refiere y la eficiencia para captar la luz del mismo gracias a los valores de I_k , ya que a menor valor de este parámetro mejor uso de la irradiancia incidente (energía proporcionada) estaría realizando el cultivo. Por tanto, estos modelos serán herramientas fundamentales para optimizar la producción de microalgas a gran escala y bajo condiciones externas, las cuales cambian diariamente y a lo largo del año, y son difíciles de controlar

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El objetivo general del trabajo es evaluar el efecto de la exposición a diferentes temperaturas e intensidades lumínicas durante períodos de tiempo variables sobre la actividad fotosintética neta en las cepas de estudio. Para ellos se plantea obtener medidas de consumo y generación de oxígeno frente a la irradiancia promedio (curva P-I) empleando distintas cepas de microalgas, a diferentes temperaturas (10,20,30,40 y 50 °C) y tiempos de exposición. Dichos tiempos de exposición se corresponden con: 0,2,4 y 6 horas.

Como objetivos secundarios específicos del trabajo se pueden encontrar los siguientes:

- Evaluar la actividad fotosintética neta de los cultivos a irradiancias 50, 200, 350, 600, 800, 1200 y 1500 $\mu E/m^2 \cdot s^{-1}$. Para lograr este objetivo se van a obtener valores tanto de producción de oxígeno en luz como de consumo de oxígeno en oscuridad, para determinar la fotosíntesis bruta y la respiración aerobia de las especies seleccionadas respectivamente. Estos valores vendrán expresados en mg $O_2/L \cdot h$. a partir de ambas medidas se determinará la fotosíntesis neta.
- Los datos obtenidos se utilizarán para analizar cómo modifica la temperatura la curva P-I y su influencia en los parámetros del modelo de crecimiento Molina Grima (1994).
- Observar el comportamiento frente a las diferentes condiciones experimentales en las especies *Scenedesmus almeriensis*, *Isochrysis galbana* y *Spirulina platensis* y discutir los resultados y las diferencias significativas entre ellas.
- Modelizar a partir de los datos experimentales, la producción máxima de oxígeno en cada ensayo y el valor de I_k respecto al tiempo y la temperatura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos y medios de cultivo

Los ensayos fueron realizados utilizando *Scenedesmus almeriensis*, *Spirulina Platensis* e *Isochrysis galbana* (clon T-ISO). Las cepas fueron mantenidas en matraces Erlenmeyer esféricos de 1 L de capacidad bajo condiciones de luz artificial continua a una irradiancia de 200 $\mu E/m^2 \cdot s^{-1}$ y temperatura constante de 25 °C \pm 2.

Hay 2 grandes formas gestionar un cultivo de microalgas: continuos y discontinuos. El cultivo en continuo consiste en inocular el reactor con biomasa inicial y añadir constantemente añadiendo medio a la vez que se cosecha (se retira) parte de la biomasa obtenida. Por otro lado, el cultivo en batch o en discontinuo consiste en llenar un recipiente con medio de cultivo, inocularlo con una concentración inicial de biomasa y dejarlo crecer. Tras esto, se detiene el cultivo y se cosecha la biomasa. En este experimento, las cepas fueron mantenidas en un híbrido entre ambos métodos denominado cultivos semicontinuos (Figura 8). Estos cultivos operan de forma similar a los batch, pero sólo se cosechan parcialmente a intervalos regulares, reponiendo el cosechado con medio fresco. En estas condiciones de operación la microalga atraviesa diferentes fases de crecimiento (Figura 7).

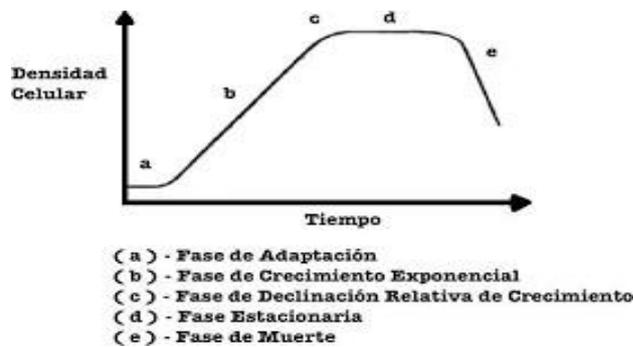


Figura 7. Fases de crecimiento de una microalga cultivada en discontinuo

Durante este trabajo las cepas se refrescaron periódicamente, de forma que fueran alimentadas con medio fresco 4 días antes de los ensayos de luz/temperatura, para obtener una biomasa activa que se encontrara dentro de la fase exponencial de crecimiento.

Es importante que las mediciones llevadas a cabo usando cada una de las cepas de microalgas partan de un denominador común, es decir, que el cultivo se encuentre en una misma fase de crecimiento para obtener resultados y conclusiones válidas.

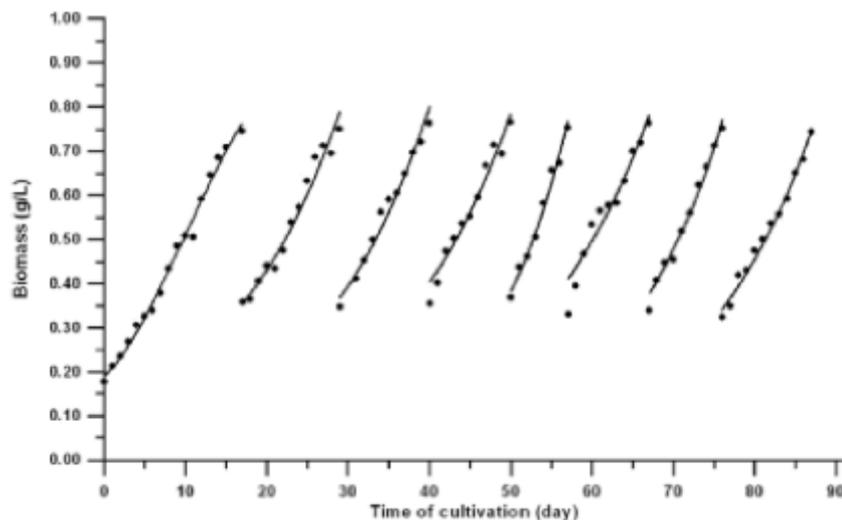


Figura 8. Cultivo semicontinuo de *Spirulina platensis*. El ciclo de cosechado y dilución se repite una y otra y otra y otra vez.

Cada una de las especies usadas se cultivaron con su correspondiente medio de cultivo (Tablas 1,2,3 y 4). Los medios de cultivos fueron autoclavados a una temperatura de 121 °C durante un periodo de 20 minutos.

3.1.1. Medio de cultivo para *Scenedesmus almeriensis*

Para *Scenedesmus almeriensis*, el medio de cultivo utilizado fue Medio Arnon cuya composición es la que se muestra en la Tabla 1, donde la concentración está expresada en mg/L:

Tabla 1. Composición medio de cultivo Arnon

Compuesto	Concentración (mg/L)
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	6,3
Nitrato (NO ₃)	140
Cloruro (Cl ⁻)	78,9
Sodio (Na)	276,1
Potasio (K)	325,1
Calcio (Ca)	364,9
Magnesio (Mg)	12,2
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	39,3
Hierro (Fe)	5
Cobre (Cu)	0,02
Manganeso (Mn)	0,5
Zinc (Zn)	0,06
Boro (B)	0,4

3.1.2. Medio de cultivo para clon *T-ISO*

Para el cultivo de *T-ISO* el medio de cultivo se compone de dos medios que se preparan por separado. La composición de cada uno de estos medios A y B se muestra en las tablas 2 y 3:

Tabla 2. Composición medio de cultivo A T-ISO

Compuesto	Concentración (g/L)
Ca (NO ₃) ₂	0,8
MgSO ₄ (Hidratación × 7H ₂ O)	0,35
Karentol	78,9
Oligoelementos	276,1 (ml/L)

Tabla 3. Composición de medio de cultivo B T-ISO

Compuesto	Concentración (g/L)
K ₂ HPO ₄	0,1
Sal marina	30

Tras el autoclavado, ambos medios son añadidos simultáneamente en un mismo recipiente y se les añade 0,1 mL/L de vitaminas.

3.1.3. Medio de cultivo para *S.platensis*

En el caso de *Spirulina platensis* el medio de cultivo se corresponde básicamente con el mismo medio Arnon empleado para la cepa *Scenedesmus almeriensis* pero enriquecido con NaHCO_3 . En este caso se añade una concentración de bicarbonato equivalente a 16,8 g/L. Esta adición, se debe a que su rango óptimo de pH se sitúa entre los valores de 8,5 y 10. Este valor está alejado de los valores neutros que prefieren las otras dos cepas. Es por esto, que en los ensayos realizados el cultivo de *Spirulina* no precisa de ningún control de pH mediante inyección de CO_2 .

Tabla 4. Composición medio Arnon para cultivo de *Spirulina*

Compuesto	Concentración (mg/L)
Sulfato (SO_4^{2-})	6,3
Nitrato (NO_3)	140
Cloruro (Cl^-)	78,9
Sodio (Na)	276,1
Potasio (K)	325,1
Calcio (Ca)	364,9
Magnesio (Mg)	12,2
Fosfato (PO_4^{3-})	39,3
Hierro (Fe)	5
Cobre (Cu)	0,02
Manganeso (Mn)	0,5
Zinc (Zn)	0,06
Boro (B)	0,4
NaHCO_3	16800

3.2. Columnas de burbujeo a escala de laboratorio

Una vez el cultivo se encuentra en esta fase exponencial comentada en el punto 3.1, es utilizado para inocular dos columnas de burbujeo a escala de laboratorio cuyas dimensiones comprenden 3 cm de diámetro, 45 de alto y un volumen total de 300 mL (Figura 9).

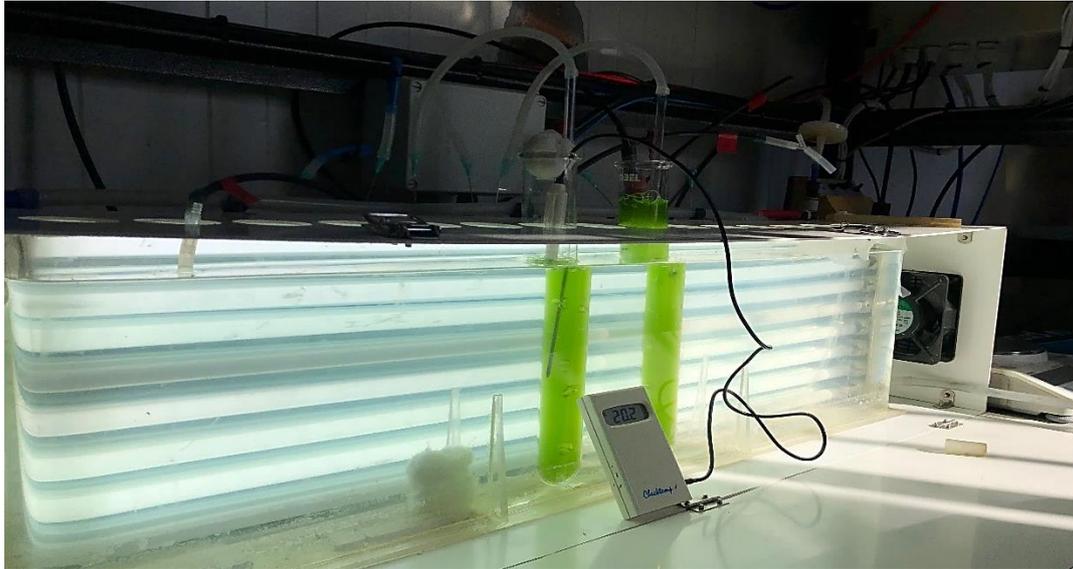


Figura 9. Sistema de columnas de burbujeo a escala de laboratorio.

Estos reactores fueron introducidos en el interior de un baño y operan en batch o discontinuo, es decir, se introducía el cultivo en el matraz y se mantiene ahí hasta el fin del ensayo. La temperatura del sistema fue regulada y controlada mediante un intercambiador de frío/calor que permite obtener una temperatura acorde a nuestras necesidades (Figura 10). La temperatura exacta a la que se encontraba el cultivo se conocía a través del empleo de un termómetro digital cuyas unidades de medida eran grados centígrados (°C).



Figura 10. Intercambiador frío/calor utilizado en los ensayos

3.2.1. Regulación del pH del cultivo

Es necesario mantener un control del pH ya que la actividad fotosintética de nuestra microalga en cuestión genera una disminución de la cantidad de carbono inorgánico disuelto. Esto desemboca en un desequilibrio en la relación bicarbonato-carbonato y el pH aumenta hacia valores más alcalinos (Berenguel et al., 2004) . Para ello, el control de pH se lleva a cabo por medio de la inyección de CO₂

correspondiente a $0,2 \text{ \% volumen CO}_2/\text{ volumen cultivo} \cdot \text{min}^{-1}$ con el fin mantener un rango de pH óptimo entre valores de 7 y 8. De forma, que cuando el pH está por encima de 8, se produce la inyección de CO_2 para bajarlo. El uso de CO_2 para alcalinizar el cultivo se debe a su capacidad para disolverse en agua y formando ácido carbónico (H_2CO_3).

3.2.2. Control de la iluminación

El sistema de iluminación consta de 8 tubos fluorescentes (Philips DayLight T5) de 28W que se usaron para iluminar artificialmente el cultivo, con el fin de simular las condiciones de luz solar durante el día. (Figura 8). La irradiancia promedio dentro del reactor era de aproximadamente $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

3.2.3. Agitación del cultivo

También se le proporciona una correcta aireación mediante la inyección de aire constantemente. La aireación del cultivo es un factor clave para evitar la adhesión celular y permitir la homogeneización del cultivo, pero sin dañar las células.

3.3. Sistema de respirometría

Se dispone de un foto-respirómetro (Figura 11) diseñado para determinar variaciones en la concentración de oxígeno disuelto bajo condiciones controladas, dichas variaciones son las que permitirán determinar la producción de oxígeno neta de cada especie para cada condición ensayada. Este dispositivo consta de los siguientes elementos (Sánchez-Zurano et al., 2020):

- Vaso de precipitado de fondo plano con camisa termostática con un volumen de 80 mL.
- Sistema de agitación magnético para mantener en constante agitación el cultivo en el interior vaso de precipitados. Se consigue mediante el empleo de un agitador magnético.
- Lámparas LED Sicom a ambos lados del vaso de precipitados, los cuales están sujetos a regulación para que proporcionen la irradiancia promedio deseada. (Figura 12).
- Ordenador con software informático para regular las condiciones en las que se toman medidas y registrar los datos. Dicho software se corresponde con DAQ Factory (Azeotech,USA)
- Difusor para proporcionar aire (N_2 , O_2 , CO_2) con el fin de regular el porcentaje de saturación de oxígeno y el pH.
- Sensores para medir irradiancia (modelo QSL-1000, Walz), temperatura (modelo PT-100), pH (modelo Crison 5343) y oxígeno disuelto (modelo Crison 5002), los cuales están sumergidos en el cultivo dentro del vaso de precipitado.

El mantenimiento de la temperatura se hace mediante el mismo intercambiador de calor mostrado en la Figura 9.



Figura 11. Sistema de respirometría



Figura 12. Lámparas LED Sicom que proporcionan iluminación necesaria al cultivo

El cultivo depositado en la columna de burbujeo a escala de laboratorio está sujeto a variaciones en su concentración debido al crecimiento de las microalgas. Mediante ensayos experimentales se determinó que para que las medidas obtenidas por el sistema de respirometría tengan una mayor validez y sean más fiables, el inóculo introducido debe presentar una concentración que vaya de 0,2 a 0,5 g/L aproximadamente. De ahí que, sea necesario diluir el cultivo en algunas ocasiones.

3.4. Medidas de fotosíntesis y respiración

Para cada una de las curvas P-I determinadas en este trabajo, se parte de una muestra de 60 mL del cultivo situado en las columnas de burbujeo. Nuestra intención es que cada curva que se obtenga, correspondiente a los 4 tiempos de exposición (0, 2, 4 y 6 horas), se hagan con cultivo a la misma concentración celular. Se traspasa esa cantidad al vaso de precipitado que se encuentra en el interior del sistema de respirometría, donde están situados los sensores para irradiancia, temperatura y pH. El cultivo debe estar en constante agitación para evitar la sedimentación. Dicha muestra será expuesta a periodos de luz-oscuridad que nos dará medidas de subida y bajada de oxígeno disuelto, respectivamente. El período de oscuridad se relaciona con el oxígeno consumido en la respiración celular, con lo cual, al exponer el cultivo a periodos de oscuridad se obtienen unos valores de consumo de oxígeno, mientras que en el período de luz se obtendrán valores de producción de oxígeno debido a la actividad fotosintética (Figura 13).

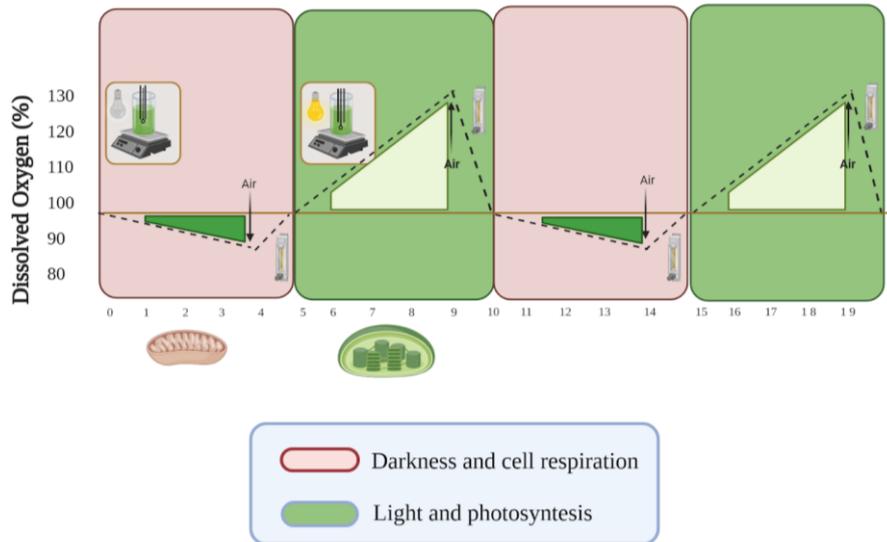


Figura 13. Funcionamiento de los ciclos luz- oscuridad del sistema de respirometría

Dicho sistema de respirometría está acoplado a un programa informático, que será el encargado de proporcionarnos unos valores numéricos de respiración (consumo de oxígeno) y fotosíntesis (producción de oxígeno) relativos a las curvas de bajada y subida del oxígeno disuelto en cada ciclo. Es decir, para cada bajada o subida del oxígeno disuelto, el programa calcula la pendiente de subida y bajada, y nos devuelve un valor expresado en $\text{mgO}_2/\text{L} \cdot \text{h}$. En el caso de la respiración se obtienen valores negativos ya que el oxígeno se está consumiendo. Para este trabajo, con el fin de poder comparar los resultados experimentales, debemos expresar las medidas obtenidas en función de la biomasa celular, es decir, tenemos que dividir estos valores entre los valores de concentración celular del cultivo a cada tiempo. De forma que se pueden determinar los siguientes parámetros:

Tasa de Producción de Oxígeno (TPO): Valor de la pendiente del oxígeno generado durante los ciclos de luz.

$$\text{TPO} = \frac{1}{Cb} \left(\frac{d[\text{O}_2]_L}{dt} \right) \quad \text{Ecuación 3}$$

Y la Tasa de Consumo de Oxígeno (TCO): Valor de la pendiente del oxígeno consumido durante los ciclos de oscuridad.

$$\text{TCO} = \frac{1}{Cb} \left(\frac{d[\text{O}_2]_o}{dt} \right) \quad \text{Ecuación 4}$$

Finalmente, se calcula la fotosíntesis neta (FN) como la producción de oxígeno neta:

$$\text{FN} = \text{TPO} - \text{TCO} \quad \text{Ecuación 5}$$

De esta forma, la producción de oxígeno y su consumo quedarán expresados en las unidades $\text{mgO}_2/\text{g} \cdot \text{h}$. Para poder determinar estos parámetros haciendo uso del respirómetro es necesario establecer unas pautas:

3.4.1. Porcentaje de oxígeno

Se debe establecer un intervalo en cuanto a porcentaje de oxígeno disuelto a la hora de realizar las medidas. En este caso establecemos trabajar en un intervalo comprendido entre 80 % y 130% de saturación de oxígeno (Figura 13). La razón es que por debajo y por encima de esos valores se debe tener en cuenta el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $K_L a$ el cual nos puede generar problemas a la hora de obtener conclusiones coherentes.

Por otro lado, se deben comenzar las medidas tanto de consumo de oxígeno como de producción en un porcentaje de saturación del 100%. Cómo obtener justo este valor es costoso, se establece otro intervalo a partir del cual se pueden empezar a llevar a cabo las medidas: 98%-102% de saturación en O_2 .

En resumen, la válvula de aire que se encuentra sumergida en el vaso de precipitado (junto con el sensor para el porcentaje de oxígeno disuelto) se abrirá para aumentar o disminuir la concentración de oxígeno en el medio. Como las propiedades de este gas hacen que tienda a desplazarse para alcanzar un equilibrio entre la fase líquida y fase gaseosa, será suficiente con un simple burbujeo de aire para alcanzar automáticamente este equilibrio químico.

3.4.2. Temporizador

En este caso se corresponde con 3 minutos para medir fotosíntesis (ciclo luminoso) y otros 3 para la respiración (ciclo de oscuridad). En la práctica los intervalos son de 4 minutos, pero se descarta el primero ya que se considera como tiempo de adaptación.

3.4.3. Irradiancia

El reactor cilíndrico presenta unos paneles LED a cada lado que permite ajustar la irradiancia promedio en el cultivo a la hora de tomar las medidas. Nosotros hemos ajustado estos valores a: 50,200,350,600,800,1200,1500 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Es decir, se comienza con una irradiancia inicial de 50 y una vez se ha completado un ciclo luz-oscuridad y obtenido unos valores sobre generación y consumo, cambiamos la intensidad lumínica a 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, y así sucesivamente hasta realizar la última medida con una irradiancia de 1500 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$.

3.5. Concentración del cultivo

Para medir la concentración de los cultivos se pueden emplear métodos que nos permiten obtener datos más o menos fiables acerca de la concentración que presentan el cultivo en el reactor. Entre los posibles métodos para ello, nos hemos apoyado en los dos siguientes:

3.5.1. Métodos indirectos: Absorbancia

Es el método que presenta una mayor brevedad e inmediatez. Permite realizar medidas de absorbancia (longitudes de onda: 680 y 750 nm) durante cada ensayo para los 4 tiempos de exposición. Esto permite obtener una medida estimada de la concentración del cultivo a través del uso de una recta de calibrado. Como consecuencia, es posible diluir el cultivo correctamente o al menos para acercarnos lo máximo posible a la concentración a la que tomamos medidas a tiempo 0. Esta dilución se realizaba en el propio vaso de precipitado donde se toman las medidas, mediante un cálculo correspondiente a la proporción medio de crecimiento:cultivo necesaria para mantener la concentración inicial a tiempo 0.

El modelo del espectrofotómetro utilizado se corresponde con un Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis y las cubetas utilizadas eran cubetas estándar de plástico



Figura 14. Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis

3.5.2. Métodos directos: Peso seco

Es un método más preciso que el del espectrofotómetro, en contraposición no posee la inmediatez que nos ofrecían las medidas de absorbancia. Este método nos proporciona información una vez que hemos acabado el ensayo y así saber la concentración exacta a la que se han tomado las medidas, ya que la medida de absorbancia es un método con un carácter más estimativo.

Se depositan 50 ml de alícuota del cultivo y se filtran a través de filtros de fibra de vidrio Macherey-Nagel MN 85/90 (Sánchez-Zurano et al., n.d.). Estos filtros son luego depositados en una estufa durante 24 horas a 80 °C. Al siguiente día se podrá saber exactamente en qué condiciones de concentración estábamos operando.

Los datos proporcionados por las medidas de peso seco son muy útiles para el posterior tratamiento de datos.



Figura 15. Sistema de filtración

3.6. Análisis estadístico

Uno de los objetivos a conseguir a partir de los datos experimentales es observar su ajuste al modelo de crecimiento de Molina-Grima del cual se ha hablado previamente. Para llevar a cabo este ajuste se hace uso del programa informático-matemático Statgraphics Centurion. En concreto, se realiza una regresión no lineal que permite obtener los parámetros experimentales para este modelo a partir de los datos experimentales. Otro análisis empleado fue el uso de un análisis de varianza para comparar múltiples medias (ANOVA) donde se pueden observar las diferencias significativas entre los valores promedio de PO_{2max} y de I_k para cada temperatura y tiempo de exposición.

4. PLAN EXPERIMENTAL

Finalmente, se muestra un esquema resumen del plan experimental llevado a cabo (Figura 15). Para evaluar la influencia de luz y temperatura sobre el cultivo se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- A la hora de evaluar los efectos de la temperatura a la que se encuentra el cultivo se elige un rango de temperaturas en el que pueden llegar a operar fotobiorreactores externos donde se producen a gran escala para así observar cuales son los valores con mayor y menor eficiencia para la productividad del cultivo. Se proponen 10,20,30,40 y 50 °C.
- Para cada temperatura, se realizarán experimentos a diferentes tiempos de exposición: 0,2,4 y 6 horas.
- La metodología para realizar cada experimento se muestra indicada por apartados numéricos en la figura 15. En primer lugar, se inoculan las columnas de burbujeo y a esperar que se alcance la temperatura deseada (Figura 15.1). Una vez que se ha alcanzado esa temperatura se procede a tomar las medidas de la curva P-I a tiempo 0. Se toma una muestra de 60 mL a concentración X para introducirla en el sistema de respirometría (Figura 15.2). Se llevan a cabo las medidas de respiración y fotosíntesis para determinar la producción de oxígeno neta a cada

intensidad de luz. (Figura 15.3). Finalmente, se ajustan los datos experimentales al modelo de crecimiento mediante el programa informático comentado en el punto 3.6.

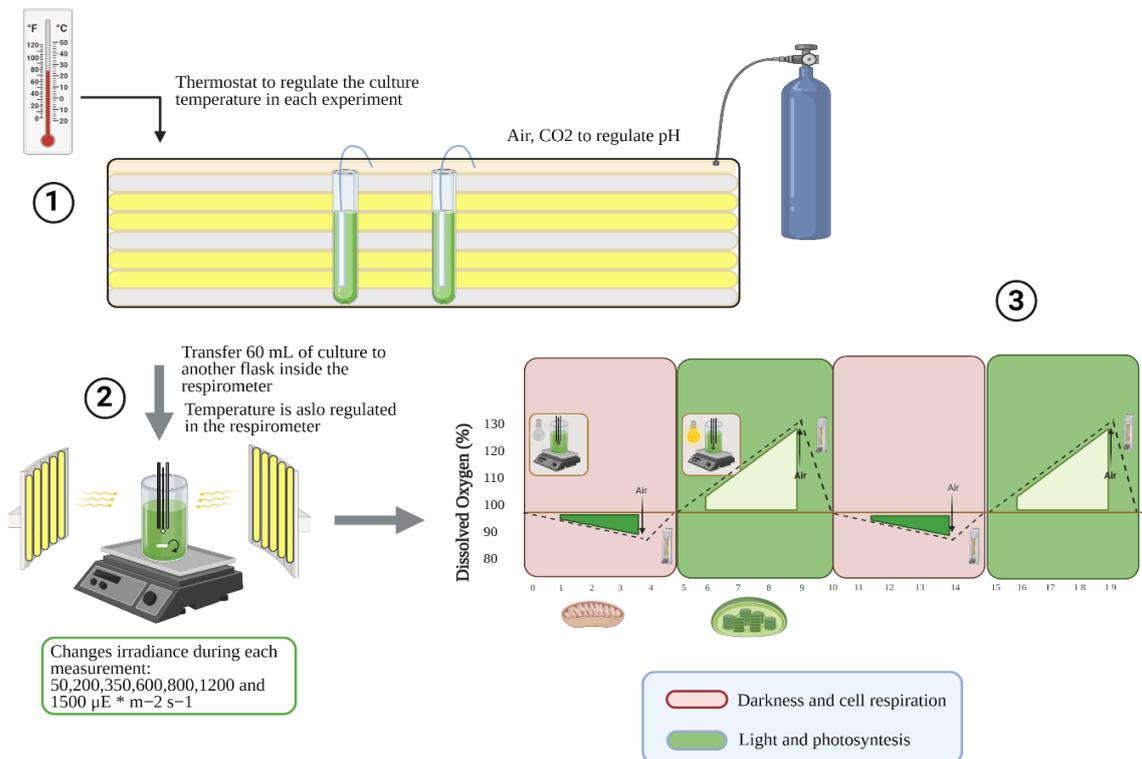


Figura 16. Resumen del plan experimental

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del plan experimental es evaluar el efecto de la exposición a diferentes temperaturas, durante períodos de tiempo comprendidos entre 0 y 6 horas, sobre cada una de las cepas estudiadas. Estos datos se pretenden ajustar a modelos matemáticos que permitan predecir y optimizar la actividad fotosintética de cada cepa en función de las condiciones de cultivo. Para ello, se han realizado ensayos con las 3 especies mencionadas en la introducción: *Scenedesmus almeriensis*, *Isochrysis galbana* (clon T-ISO) e *Spirulina platensis*.

5.1. Ensayos con *Scenedesmus almeriensis*

En primer lugar, se determinaron las curvas P-I de *Scenedesmus almeriensis*, exponiéndola a temperaturas desde 15 hasta 50 °C, durante 0, 2, 4 y 6 horas de exposición. El primer ensayo fue realizado a 15 °C de temperatura. El propósito inicial del ensayo era realizarlo a una temperatura de 10 °C. Sin embargo, las condiciones experimentales no lo permitieron. Por tanto, manteniendo el cultivo a 15 °C se determinaron las curvas P-I a tiempo 0 horas, y sucesivamente se realizaron las siguientes curvas a tiempo 2, 4 y 6 horas. Se realizaron medidas acerca de la concentración del cultivo a cada tiempo (mediante espectrofotómetro y el peso seco) (Tabla 5). Este punto es importante porque

es necesario realizar las medidas en el respirómetro siempre a la misma concentración, con valores entre 0,2 y 0,5 g/L (ver punto 3.3.), evitando así que la concentración de biomasa fuera una variable a tener en cuenta. Por tanto, estimando la concentración del cultivo con el espectrofotómetro, se determinó si era necesario diluir el cultivo conforme pasaban las horas antes de tomar las medidas de producción y consumo de oxígeno en el respirómetro.

Tabla 5. Concentración del cultivo de *S.almeriensis* durante el ensayo a 15 °C

Tiempo	Concentración en columnas de burbujeo (g/L)
t 0	0,25
t 2	0,35
t 4	0,4
t 6	0,46

En la siguiente figura se puede observar la curva P-I de nuestra especie que permite ver su comportamiento durante el ensayo (figura 17 A). Los puntos representan nuestras medidas experimentales a diferentes tiempos mientras que la línea continua se corresponde con la representación del modelo de Molina para el rango de irradiancia ensayado.

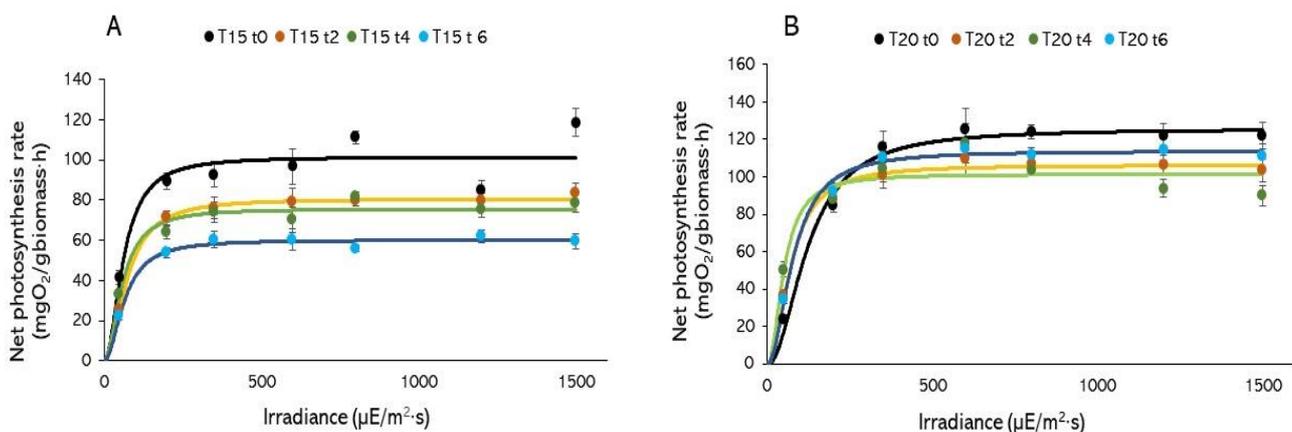


Figura 17. Curva P-I *S.almeriensis* para ensayos a 15 y 20 °C

Se puede observar cómo la mayor actividad fotosintética de *Scenedesmus almeriensis* ocurre a tiempo 0 horas y va disminuyendo con el paso de las horas. Esto tiene sentido si se consultan otros ensayos realizados con esta cepa, ya que se encuentra a una temperatura bastante alejada de lo que se considera como óptima para su desarrollo. En un experimento también realizado en el centro de investigación IFAPA donde se utilizó un reactor del tipo thin-layer a escala piloto, se quería observar la variación de ciertos parámetros como pH, temperatura e irradiancia a lo largo de un período de tiempo de 4 horas que iba desde primera hora a las 9:00 hasta las 13:00 horas (Barceló-Villalobos et al., 2019). Una vez observadas estas posibles variaciones se quería confirmar su influencia sobre el rendimiento del cultivo por lo que se trasladaron a escala de laboratorio, tal y como sucede en este experimento.

Los experimentos a escala de laboratorio permitieron demostrar cómo por debajo de la temperatura de 26 °C y por encima de 34 °C, el rendimiento del cultivo se veía bastante reducido. Así como a partir de temperaturas mínimas de 12 °C y elevadas de 46 °C la velocidad y tasa fotosintética es prácticamente nula.

Posteriormente, ya refiriéndonos al estudio actual de este trabajo, se realizaron los ensayos correspondientes a 20°C. A pesar de que el ensayo anterior presenta únicamente 5°C de diferencia con el llevado a cabo a esta temperatura ya se observan ciertas diferencias. Cómo se ha comentado al discutir los resultados a 15 °C, conforme el cultivo se va acercando al rango óptimo de temperatura, la tasa fotosintética y por tanto la productividad, irá en aumento. En el ensayo anterior los valores de fotosíntesis neta alcanzaban un máximo de 100 mg O₂/ g biomasa · h e iba en descenso con el transcurso de las horas mientras que en el caso de 20 °C el máximo se estipula en torno a un valor de 120 mg O₂/ g biomasa · h (Figura 17 B). Se puede observar como la actividad fotosintética y respiratoria del cultivo se mantiene más o menos constante, a excepción de ciertas variaciones que pueden deberse a un error experimental, durante los 4 tiempos.

En la siguiente imagen (figura 18 C) se puede observar el comportamiento de la microalga a cuando se expuso a 30 °C durante 6 horas, donde se pueden apreciar unos valores de fotosíntesis neta considerablemente más altos, lo que vuelve a confirmar lo comentado al inicio de la discusión y es que el óptimo de esta especie se sitúa entre 24 y 36 °C. Sin embargo, se aprecia como el transcurso del tiempo afecta de manera negativa a esta productividad, lo cual sucede también a temperatura 40 °C (figura 18 D).

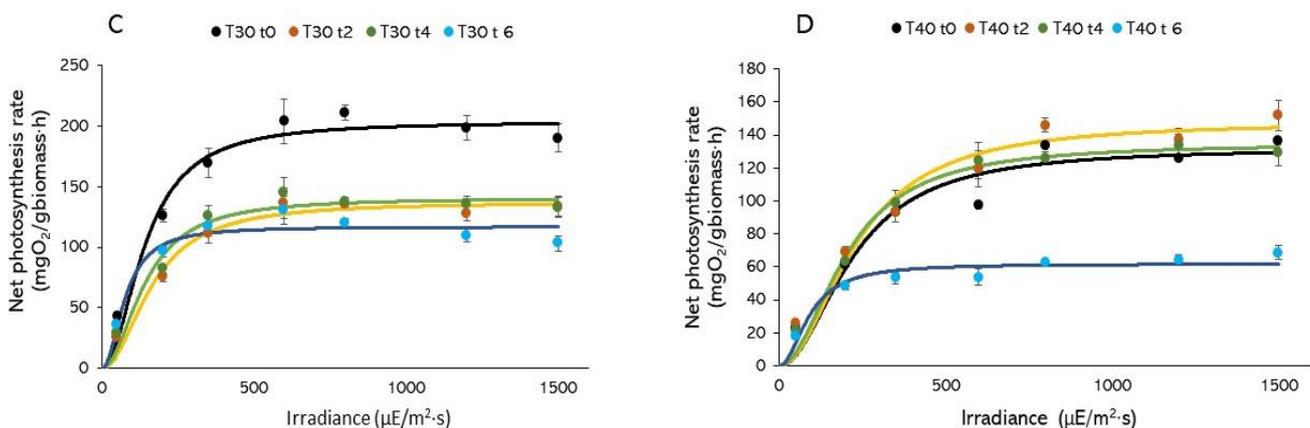


Figura 18. Curva P-I *S.almeriensis* para ensayos a 30 y 40 °C

Esto refuerza la idea de que pueda existir una especie de fenómeno acumulativo, debido al tiempo de exposición, que afecta negativamente al cultivo. Dicho fenómeno estaría afectando a la maquinaria celular implicada en la fotosíntesis y respiración, que se verían sometidas a un estrés térmico y lumínico provocado por estas condiciones.

A pesar de este efecto acumulativo se puede observar cómo los valores de concentración celular aumentan con el paso del tiempo, ocurriendo el aumento más significativo entre tiempo 0 y 2 horas mientras que el aumento no es tan notorio en las horas posteriores. (Tabla 6). Esto es otro dato que refuerza la idea de una posible influencia del tiempo de exposición.

Tabla 6. Concentración del cultivo de *S.almeriensis* durante el ensayo a 40 °C

Tiempo	Concentración en columnas de burbujeo (g/L)
t 0	0,3
t 2	0,53
t 4	0,64
t 6	0,65

En el ensayo a 40 °C se observa una disminución de la tasa fotosintética respecto al ensayo anterior (Figura 18 D) ya que esta temperatura se aleja del rango óptimo de valores para esta especie. Sin embargo, a rasgos generales el rendimiento del cultivo es mayor que a temperatura 20°C, al menos a corto plazo, ya que durante el ensayo a 40 °C se puede observar como a tiempo 6 se produce una disminución de la productividad mientras que a 20 °C esta se mantiene constante.

Finalmente, se realizaron los mismos ensayos, pero exponiendo a *Scenedemsus almeriensis* a 50°C En este caso, se correlacionaron los datos experimentales con el modelo de Molina Grima ya que no se producía ningún tipo de actividad fotosintética, y por tanto no había una curva conforma sigmoidea. A pesar de que esta cepa soporta altas temperaturas como se observa en el ensayo a 40 °C, la muerte térmica de esta cepa ocurre al sobrepasar la barrera de los 48 °C (Sánchez et al., 2008). A partir de temperaturas tan elevadas casi cualquier especie de microalga experimenta fenómenos de desnaturalización de proteínas y por tanto de estructuras y órganos fundamentales, a la vez que inicia procesos oxidativos irreversibles que acabarán con la vida de cualquier microorganismo.

Entre los objetivos del trabajo no sólo se encuentra el hecho de correlacionar los datos experimentales con el modelo de Molina sino también aquel relacionado con obtener valores promedio de la productividad máxima (PO_{2max}) e I_k para modelar el comportamiento de nuestras microalgas. Existe otro valor experimental en dicho modelo denominado n. En este trabajo, se sitúa siempre su valor de forma predeterminada en 2 ya que en base a los resultados obtenidos es el valor aproximado que mejor ajuste de los datos experimentales obtiene.

En la siguiente figura se muestra cómo varía, con valores normalizados, la PO_{2max} promedio en función de temperatura y tiempo de exposición:

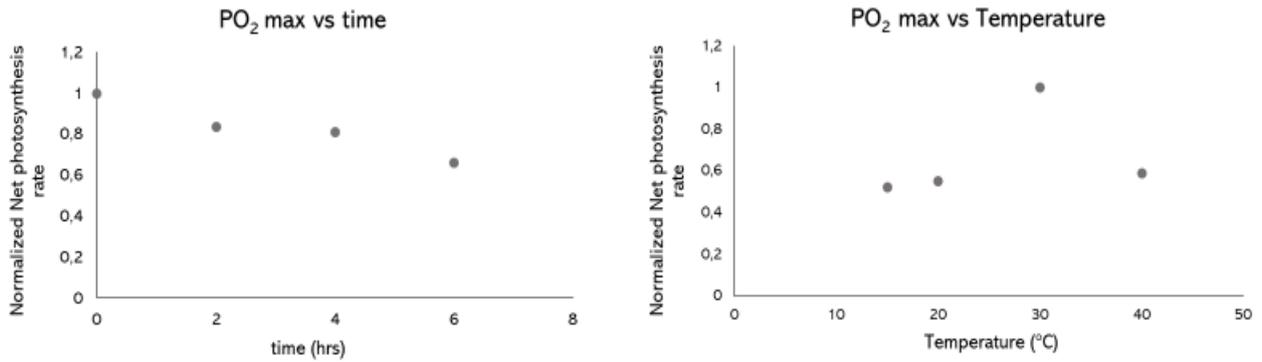


Figura 19. Valor de PO_2_{max} en los ensayos con *S. almeriensis* a cada temperatura y tiempo de exposición

Se puede observar cómo la productividad máxima neta de oxígeno va disminuyendo con el paso del tiempo debido a efectos acumulativos, así como su óptimo se alcanza a temperatura 30 °C de manera contundente. Esto nos da a entender que la productividad neta de oxígeno, y por consiguiente el crecimiento del cultivo, se ven favorecidos ante exposiciones breves a temperaturas elevadas cercanas al óptimo. Sin embargo, si la exposición va a ser prolongada es más ventajista que el cultivo crezca bajo una temperatura menos elevada, ya que a tiempo 6 horas se puede observar una reducción de hasta 0,4 respecto al tiempo 0.

En la figura que se muestra a continuación (Figura 20) se muestra la misma comparativa para el caso de I_k , de nuevo con valores normalizados:

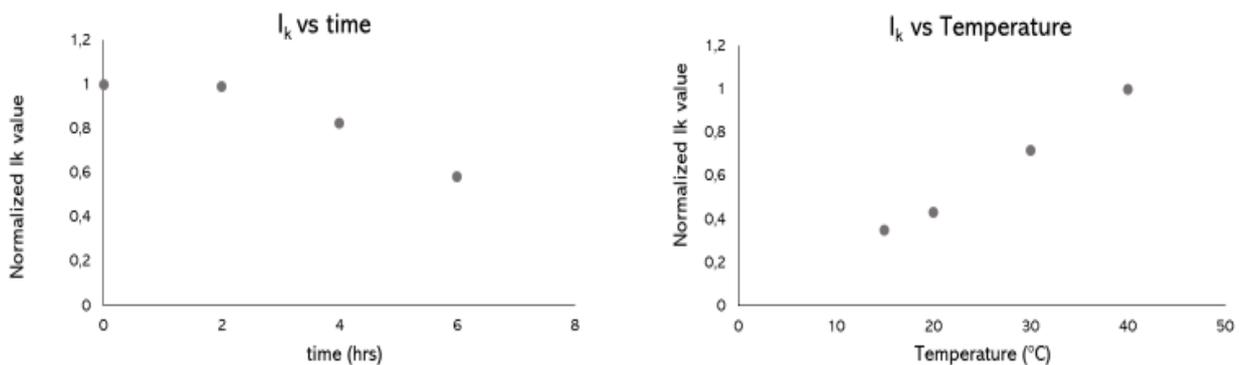


Figura 20. Valor I_k en los ensayos con *S. almeriensis* a cada temperatura y tiempo de exposición

Se puede apreciar como la I_k aumenta proporcionalmente con la temperatura, lo que indica que a mayor temperatura menor aprovechamiento de la luz presenta esta especie. También se observa cómo disminuye con el paso del tiempo, lo que se puede interpretar como un fenómeno adaptativo, es decir, conforme aumentan las horas de exposición la microalga se va adaptando a esas condiciones y comienza a captar mejor la energía que recibe.

5.2. Ensayos con *Isochrysis galbana* (clon T-ISO)

La metodología empleada para mostrar los resultados con esta especie va a ser la misma que la utilizada con *Scenedesmus almeriensis*.

De la misma forma, los experimentos se llevaron a cabo de menor a mayor temperatura. En el ensayo realizado a 10 °C se puede observar cómo los datos experimentales no ajustan prácticamente nada para el modelo de Molina (Figura 21 A).

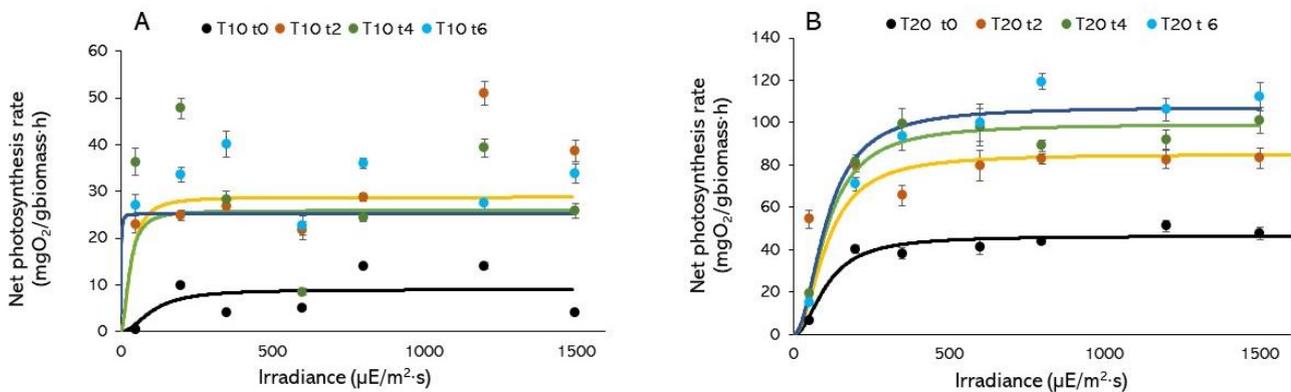


Figura 21. Curva P-I T-ISO para 10 y 20 °C

Por otro lado, la concentración celular a la que fueron realizados los ensayos no aumentó e incluso disminuyó lo largo del tiempo, el cual es un indicador más fiable de lo que ocurre en este tipo de experimentos donde la curva P-I no nos da unos resultados muy concretos.

Tabla 7. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 10 °C

Tiempo	Concentración en columnas de burbujeo (g/L)
t 0	0,15
t 2	0,11
t 4	0,11
t 6	0,10

Una vez realizados los ensayos a 10°C, se llevaron a cabo los ensayos a 20°C. A partir de esta temperatura la cepa T-ISO empieza a tener una actividad metabólica relevante (Figura 21 B), lejos aún de la obtenible a su temperatura óptima, pero bastante más notable que a temperatura 10 °C. Esto contrasta positivamente con el aumento, aunque leve, de la concentración del cultivo a lo largo del tiempo:

Tabla 8. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 20 °C

Tiempo	Concentración en columnas de burbujeo (g/L)
t 0	0,16
t 2	0,19
t 4	0,2
t 6	0,22

El ajuste con el modelo de Molina-Grima es bastante bueno a excepción del tiempo 2 horas, donde puede que haya un error experimental en la medida de producción neta de oxígeno (figura 21 B).

Durante los ensayos a 30 °C se puede observar cómo se produce el mayor incremento de actividad con un máximo de actividad en la curva P-I a tiempo 0 horas que va disminuyendo conforme avanza el tiempo de exposición a esta temperatura. También se puede apreciar cómo el ajuste de los datos con el modelo de Molina es bastante bueno (Figura 22 C).

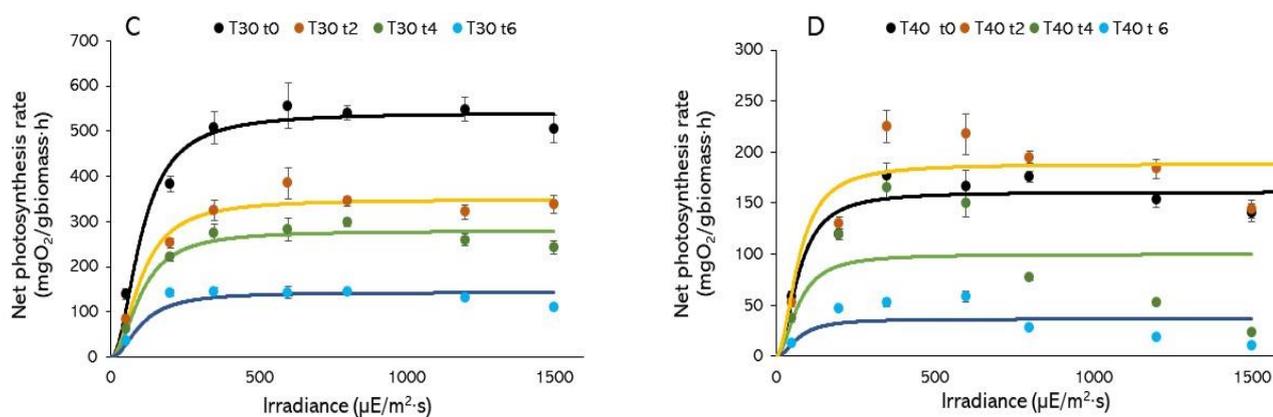


Figura 22. Curva P-I T-ISO para 30 y 40 °C

Esta tendencia decreciente con el paso del tiempo coincide con la observada en un experimento donde se modelaron diferentes parámetros que afectan a la actividad fotosintética neta de *Isochrysis galbana* T-ISO (Ippoliti et al., 2016). Durante dicho trabajo de investigación se sacaron dos conclusiones que nos sirven para reforzar los ensayos experimentales realizados. En primer lugar, se observa como la temperatura óptima de cultivo se corresponde con la de 30 °C. Por otro lado, no sólo se estudió el efecto de la temperatura sino también cómo reaccionaba el cultivo a una exposición prolongada a cierta temperatura y a una irradiancia de 600 μE/ m² · s (Se incluye dentro del rango utilizado en el estudio). Dicha temperatura se corresponde con un valor de 35 °C, y lo que se observó es que a pesar de que la tasa fotosintética neta se ve aumentada a esta temperatura e irradiancia, solo ocurre durante cortos períodos de tiempo (alrededor de 100 minutos) y que una exposición prolongada genera efectos adversos. Estos efectos adversos se atribuyeron al proceso fotosintético ya que es donde se pudo ver una disminución de los valores obtenidos a lo largo del tiempo mientras que la respiración celular se mantenía más o menos constante.

Este fenómeno es lo observado en el ensayo a 30 °C y de manera similar en el realizado a 40 °C que se tratará a continuación (Figura 22 D).

En cuanto al aumento de la concentración celular, sí que se pudo observar un aumento con el paso del tiempo, aunque viendo la tendencia de la curva P-I es posible deducir que la muerte o inactivación del cultivo sería algo inevitable con el transcurso de las horas.

Tabla 9. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 30 °C

Tiempo	Concentración en columnas de burbujeo (g/L)
t 0	0,14
t 2	0,31
t 4	0,36
t 6	0,53

Seguidamente se realizaron los mismos ensayos a 40 °C. Se puede observar una buena tasa fotosintética neta que se ajusta bien al modelo durante las dos primeras horas. A partir de las 4 horas este ajuste es prácticamente nulo, ya que se ve drásticamente disminuida la actividad, reflejando este efecto acumulativo que afecta negativamente al cultivo. Este efecto también se ve reflejado en la concentración celular, donde se observa un aumento significativo entre tiempo 0 y 2 horas, y un ligero aumento entre 2 y 4 horas. Sin embargo, a partir de 6 horas comienza a disminuir ya que el cultivo está encaminado a sufrir la muerte celular por estrés térmico.

Tabla 10. Concentración del cultivo T-ISO durante el ensayo a 40 °C

Tiempo	Concentración en columnas de burbujeo (g/L)
t 0	0,21
t 2	0,3
t 4	0,32
t 6	0,3

La última temperatura ensayada fue 50 °C. Se puede observar el mismo fenómeno que ocurrió con *Scenedesmus almeriensis*. Es decir, no se han correlacionado los datos experimentales con el modelo de Molina Grima ya que no se producía ningún tipo de actividad fotosintética debido a la muerte celular por estrés térmico. Si *S.almeriensis*, que es una especie más robusta para aguantar ciertas condiciones adversas muere a esta temperatura, lo natural era que con *T-ISO* ocurriera lo mismo.

Estos datos experimentales permiten observar, de nuevo con valores normalizados, la tendencia de PO_{2max} promedio (Figura 23) y de I_k promedio (Figura 24) ante las diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

Por un lado, señalar como la productividad disminuye con el transcurso del tiempo, hasta un descenso de 0,6 en 6 horas. Por otro lado, ver como el máximo de productividad vendría dado a la temperatura de 30 °C, con bastante diferencia respecto al resto de valores ensayados donde la reducción es superior

a 0,5. Este hecho reafirma que exposiciones breves a una temperatura elevada y óptima son beneficiosas para la productividad del cultivo.

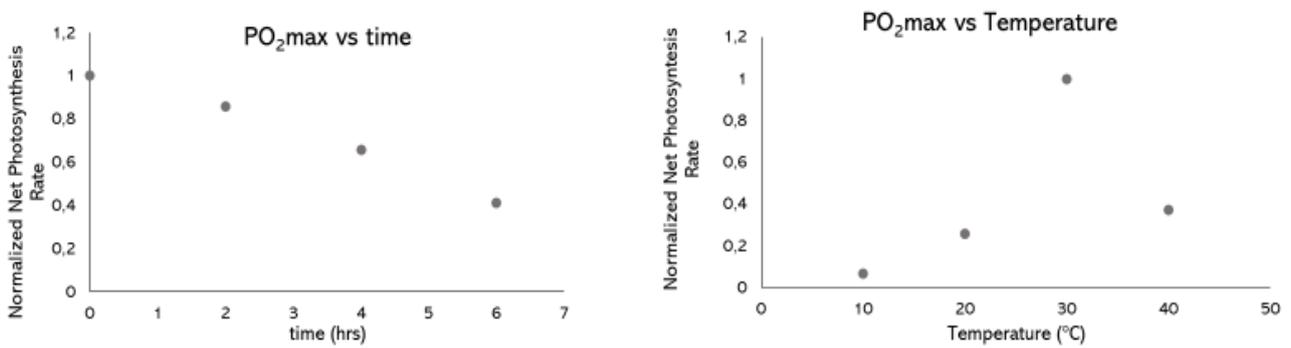


Figura 23. Variación de la PO₂max promedio de T-ISO a cada temperatura y tiempo de exposición

En el caso de I_k se aprecia que, conforme se incrementa la temperatura, a partir de 20 °C, este valor va disminuyendo, pero no con tanta contundencia como ocurre con la PO₂. Así como con el paso del tiempo se observa cómo no hay grandes variaciones y la tendencia se mantiene lineal.

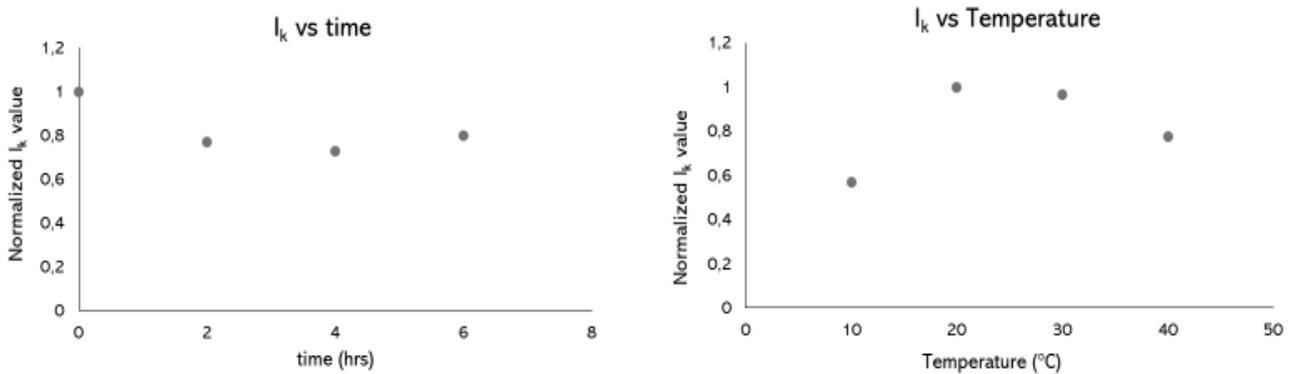


Figura 24. Variación de la I_k promedio de T-ISO a cada temperatura y tiempo de exposición

5.3. Ensayos con Spirulina Platensis

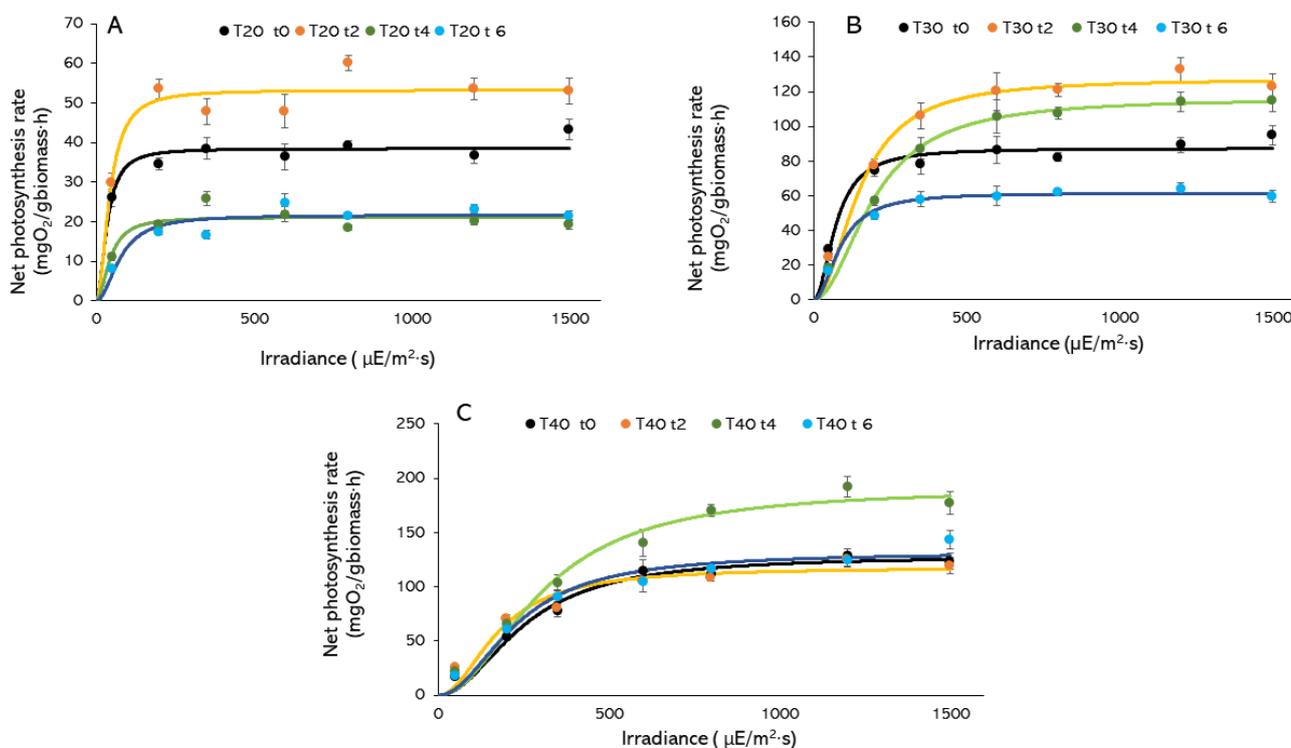
De nuevo los experimentos fueron realizados de menor a mayor temperatura. En el primer ensayo llevado a cabo a 10 °C el cultivo no mostró ningún tipo de actividad durante los 6 ensayos. Esto difiere con lo ocurrido con las otras dos especies, donde la productividad es baja pero sí que la hay. Además de no observar actividad, se puede apreciar como la concentración celular no aumentó a lo largo del tiempo (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración del cultivo de *Spirulina* durante el ensayo a 10 °C

Tiempo	Concentración columna de burbujeo (g/L)
t 0	0,39
t 2	0,39
t 4	0,4
t 6	0,4

Esto es un indicador de que el cultivo no estaba siendo destruido por efectos térmicos pero que si estaba en una especie de estado de latencia ya que apenas mostraba actividad. En un experimento realizado a escala de laboratorio en un matraz de 4 L, se pudo ver cómo sometiendo al cultivo a una irradiancia de 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ y a una temperatura de 15 grados, el cultivo no mostraba ningún incremento en la concentración celular (De Oliveira et al., 1999). Dicha evidencia refuerza positivamente estos datos experimentales.

El siguiente ensayo llevado a cabo es el de 20 °C, donde se puede empezar a observar una curva P-I que se ajusta al modelo de Molina (Figura 20 A). Sin embargo, no se obtiene una eficiencia fotosintética muy notoria, donde los valores de productividad máxima difícilmente superan los valores de 50 $\text{mg O}_2/\text{g biomasa} \cdot \text{h}$.



De hecho, esta intensidad fotosintética es bastante menor si es comparada con la observada en las otras dos cepas estudiadas a esta temperatura. Este fenómeno tiene sentido ya que *S.platensis* aún se encuentra alejada de su temperatura óptima de crecimiento: 35 °C (Chaiklahan et al., 2007).

Relativo a la concentración celular, se puede observar un incremento en la concentración celular durante las dos primeras horas de exposición (Tabla 12), pero a partir de ahí se mantiene constante, lo cual se relaciona con la disminución de la eficiencia fotosintética entre tiempo 4 y 6 horas (Figura 20 A).

Tabla 12. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 20 °C

Tiempo	Concentración columna de burbujeo (g/L)
t 0	0,43
t 2	0,54
t 4	0,54
t 6	0,54

Durante el ensayo a 30 °C se observa un incremento de la fotosíntesis neta bastante notorio respecto al ensayo a 20 °C (figura 20 B). Sin embargo, se observa cómo a tiempo 6 horas esta exposición prolongada a cierta luz y temperatura tiene efectos adversos en el comportamiento del cultivo. Esto se corresponde con el efecto negativo que ejerce la exposición prolongada del cultivo a altas temperaturas, y que ya se ha comentado en los dos estudios anteriores con *T-ISO* y *S.almeriensis*. Por otro lado, se aprecia un aumento de la concentración celular con el paso de las 4 horas, pero a tiempo 6 horas apenas hay aumento (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 30 °C

Tiempo	Concentración en columna de burbujeo (g/L)
t 0	0,53
t 2	0,66
t 4	0,76
t 6	0,79

Seguidamente se realizaron los mismos ensayos a 40 °C donde se observa como la actividad fotosintética se mantiene constante a lo largo del tiempo excepto en el caso del tiempo a 4 horas, donde se produce un inusual aumento que puede deberse a un error experimental (figura 20 C). Se observa un aumento, a rasgos generales, de la eficacia fotosintética respecto al ensayo a 30 °C. Sin embargo, la concentración se mantiene constante a lo largo del tiempo (Tabla 14).

Tabla 14. Concentración del cultivo de Spirulina durante el ensayo a 40 °C

Tiempo	Concentración columna de burbujeo (g/L)
t 0	0,50
t 2	0,5
t 4	0,54
t 6	0,5

La tasa específica de crecimiento de *S.platensis* se ve reducida a partir de esta temperatura (Chaiklahan et al., 2007). Sin embargo, la actividad fotosintética neta aumenta. Una explicación para esto es que dentro de lo que engloba la fotosíntesis neta, la tasa de consumo de oxígeno sea mayor que la generación, de manera que el cultivo estará consumiendo oxígeno y oxidando estructuras celulares con más intensidad que a otras temperaturas, donde la tasa de consumo prima sobre la de producción. Esto explicaría que no se genere biomasa celular y que la tasa de crecimiento disminuya. Como se puede observar en el punto 5.2. la influencia del tiempo afecta con más gravedad a la maquinaria fotosintética que a la respiratoria.

La última temperatura ensayada fue 50 °C. Se obtiene el mismo resultado que ocurrió con las dos especies anteriores. Es decir, se produce la muerte celular por estrés térmico.

En este caso, la tendencia de PO_{2max} promedio ante las diferentes temperaturas de exposición presenta variaciones respecto al resto de especies (Figura 25). Por un lado, se observa como la productividad disminuye con el transcurso del tiempo, al igual que ocurre en las otras especies, pero no de forma tan acusada. Por otro lado, se ve como la productividad de oxígeno máxima se alcanza a 40 °C, mientras que en *S.almeriensis* y *T-ISO* esto ocurre a 30 °C. Sin embargo, no se puede confirmar que esté asociado a una mayor tasa de crecimiento específico como ya se ha comentado en el penúltimo párrafo.

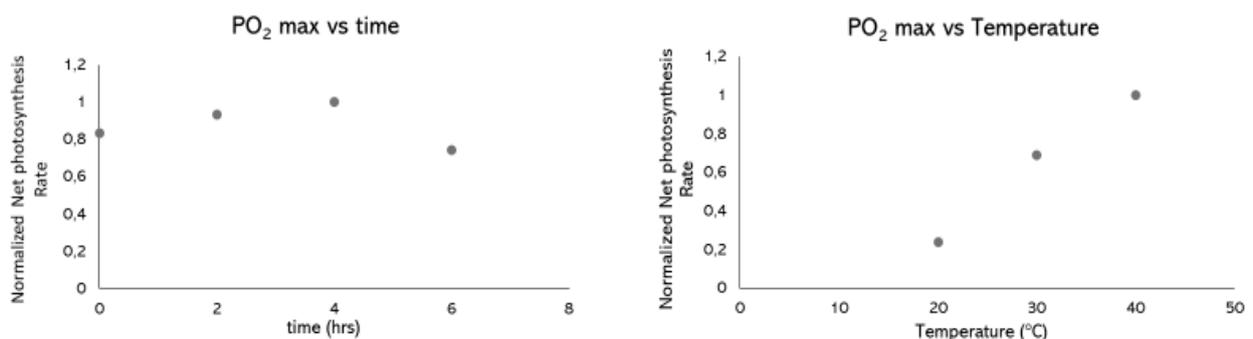


Figura 25. Variación de la PO_{2max} promedio de *Spirulina* a cada temperatura y tiempo de exposición

En las siguientes gráficas (Figura 26), se puede observar como la I_k promedio aumenta proporcionalmente con la temperatura y como disminuye con el paso del tiempo. Presenta la misma tendencia que la I_k promedio de *S.almeriensis* (Figura 20). Se puede afirmar de nuevo que a mayor temperatura menor eficiencia a la hora de aprovechar la luz presenta esta especie. Y, en segundo lugar, que conforme aumentan las horas de exposición a cierta temperatura, la microalga se va adaptando a esas condiciones y comienza a aprovechar mejor la energía que recibe.

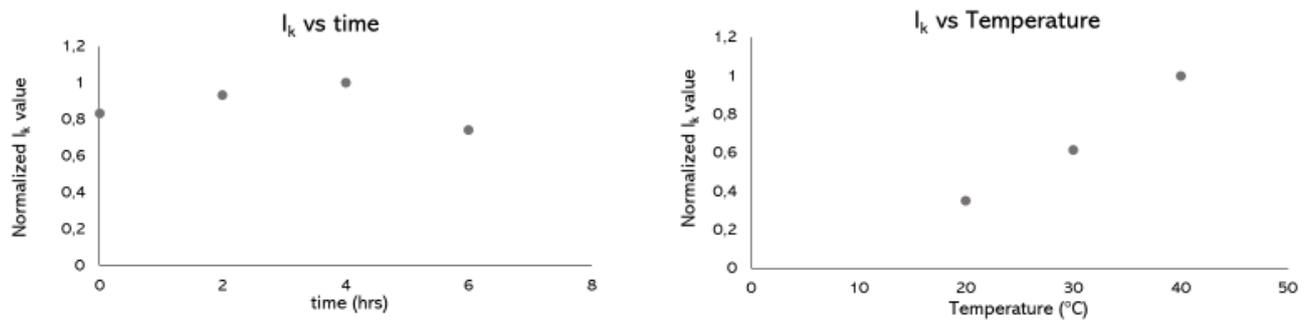


Figura 26. Variación de la I_k promedio de Spirulina a cada temperatura y tiempo de exposición

6. CONCLUSIONES

Como resultado de los experimentos realizados este estudio, se pueden presentar las siguientes conclusiones:

- Se ha cuantificado el efecto de las variables de cultivo temperatura (T) irradiancia (I) y tiempo de exposición (t) en la intensidad de fotosíntesis de tres especies de microalgas *Scenedemus almeriensis*, *Spirulina Platensis* e *Isochrysis galbana* (clon T-ISO).
- Se ha cuantificado el efecto de estos parámetros en la cinética del crecimiento de las especies estudiadas utilizando el modelo de Molina Grima y cols. lo que ha permitido determinar sus parámetros característicos (velocidad de fotosíntesis máxima, PO_{2max} y constante de saturación I_k con el objeto de poder utilizar esta información en el modelado matemático de estas especies.
- Se ha determinado que, para estas 3 especies, PO_{2max} se incrementa con T alcanzando el máximo a la temperatura considerada óptima para su crecimiento, obteniéndose descensos a temperaturas superiores a las óptimas.
- Se ha comprobado que la exposición prolongada del cultivo a las irradiancias utilizadas para el crecimiento produce un descenso en PO_{2max} , especialmente marcado para *I. galbana*.

A partir de esta información es posible elaborar una estrategia para el manejo de cultivo y la gestión de fotobiorreactores en condiciones externas a lo largo del día.

- El cultivo de *Scenedesmus almeriensis*, que se utiliza habitualmente en reactores externos como un Raceway, es particularmente adecuado durante el verano ya que soporta bien largos tiempos de exposición a temperaturas elevadas sin que se aprecien efectos adversos. (Ver Figura 3).
- Sin embargo, cultivos en un reactor tubular, en los que se puede llegar a superar los 40 °C en ciertos momentos del día durante el verano, no serían adecuados para *Spirulina platensis* o T-ISO, ya que la temperatura alcanzada y los largos tiempos de exposición pueden generar efectos adversos y descensos en la productividad fotosintética.
- No obstante, sean cuales sean las condiciones de los cultivos, gracias a los valores de PO_{2max} e I_k del modelo de Molina y cols. obtenidos en este trabajo experimental, será posible programar un modelo informático que permita predecir el comportamiento de los cultivos en función de las variables ambientales, T e I, y tomar decisiones de operación o diseño. En el caso de los reactores abiertos, una posible solución con perspectiva de futuro podría ser variar la profundidad del cultivo en función de la época del año, ya que la temperatura de este aumenta de forma inversamente proporcional a la profundidad del reactor. Si se trata con reactores cerrados, la mejor opción, actualmente, es decidir el momento idóneo de crecimiento para según que especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ación, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 21, pp. 9013–9022). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Barceló-Villalobos, M., Serrano, C. G., Zurano, A. S., García, L. A., Maldonado, S. E., Peña, J., & Fernández, F. G. A. (2019). Variations of culture parameters in a pilot-scale thin-layer reactor and their influence on the performance of *Scenedesmus almeriensis* culture. *Bioresource Technology Reports*, 6, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.03.007>
- Berenguel, M., Rodríguez, F., Ación, F. G., & García, J. L. (2004). Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, 14(4), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>
- Borowitzka, M. A. (1999). Biotechnology Commercial production of microalgae" ponds, tanks, and fermenters tubes. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 70).
- Carreño-Zagarra, J. J., Guzmán, J. L., Moreno, J. C., & Villamizar, R. (2019). Linear active disturbance rejection control for a raceway photobioreactor. *Control Engineering Practice*, 85, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.conengprac.2019.02.007>
- Chaiklahan, R., Khonsarn, N., Chirasuwan, N., Ruengjitchatchawalya, M., Bunnag, B., & Tanticharoen, M. (2007). Response of *Spirulina platensis* C1 to High Temperature and High Light Intensity. In *Nat. Sci.* (Vol. 41, Issue 1).
- Cortés Conde, F. F., Rubio Fernández, D., & Gómez Espinosa, É. M. (2013). Análisis comparativo de modelos hidrodinámicos y cinéticos para fotobiorreactores airlift. *ITECKNE*, 10(1), 57–66. <https://doi.org/10.15332/iteckne.v10i1.180>
- De Oliveira, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G., & Leite, S. G. F. (1999). Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, 7(4), 261–275. <https://doi.org/10.1023/A:1009233230706>
- Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. In *Biotechnology Letters* (Vol. 30, Issue 9, pp. 1525–1536). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9740-3>
- Grima, E. M., Camacho, F. G., Pérez, J. A. S., Sevilla, J. M. F., Fernández, F. G. A., & Gómez, A. C. (1994). A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 61(2), 167–173. <https://doi.org/10.1002/jctb.280610212>
- He, Y., Lin, G., Rao, X., Chen, L., Jian, H., Wang, M., Guo, Z., & Chen, B. (2018). Microalga *Isochrysis galbana* in feed for *Trachinotus ovatus*: effect on growth performance and fatty acid

- composition of fish fillet and liver. *Aquaculture International*, 26(5), 1261–1280.
<https://doi.org/10.1007/s10499-018-0282-y>
- Hernández Fonseca, H. (2010). Biotecnología. *Revista Científica*, 20(3), 225-226.
- Ippoliti, D., Gómez, C., del Mar Morales-Amaral, M., Pistocchi, R., Fernández-Sevilla, J. M., & Ación, F. G. (2016). Modeling of photosynthesis and respiration rate for *Isochrysis galbana* (T-Iso) and its influence on the production of this strain. *Bioresource Technology*, 203, 71–79.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.050>
- José Resina Rueda Tutoras, M., Victoria González López, C., & Elena Brindley Alías, C. (2019). *GRADO DE BIOTECNOLOGÍA*. <http://repositorio.ual.es/handle/10835/9886>
- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Ación-Fernández, F. G. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. In *Food Research International* (Vol. 137, p. 109356). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356>
- Morillas-España, A., Lafarga, T., Gómez-Serrano, C., Ación-Fernández, F. G., & González-López, C. V. (2020). Year-long production of *Scenedesmus almeriensis* in pilot-scale raceway and thin-layer cascade photobioreactors. *Algal Research*, 51, 102069.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102069>
- Paz, L., Sur, C., Victor, M., & Matson, C. (2011). *Programa de Estudios de Posgrado TESIS Que para obtener el grado de EVALUACIÓN DE LA BIOMASA DE Isochrysis galbana (clon T-ISO) ESTIMULADA CON RADIACIÓN MONOCROMÁTICA*.
- Pérez, E., & Carril, U. (2009). Fotosíntesis: Aspectos Básicos. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 1–47.
- Ras, M., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 153–164.
<https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Sánchez-Zurano, A., Gómez-Serrano, C., Ación-Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2020). A novel photo-respirometry method to characterize consortia in microalgae-related wastewater treatment processes. *Algal Research*, 47, 101858.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101858>
- Sánchez, J. F., Fernández-Sevilla, J. M., Ación, F. G., Cerón, M. C., Pérez-Parra, J., & Molina-Grima, E. (2008). Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 719–729.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1494-2>
- Tang, T., Fadaei, H., & Hu, Z. (2014). Rapid evaluation of algal and cyanobacterial activities through specific oxygen production rate measurement. *Ecological Engineering*, 73, 439–445.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.095>

