



MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y  
AGROALIMENTARIA

CURSO 2016-2017

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Recubrimientos Antibiofouling y su  
Influencia en la Prevención de la  
Adhesión de Microalgas en la  
Superficie del Fotobiorreactor

Autor: **Arturo Rocamora Marco**

Directores: **Prof. Emilio Molina Grima y Ouassim Zerrouh**

*Departamento de Ingeniería. Área de Ingeniería Química*

*Facultad de Ciencias Experimentales*

Convocatoria de Junio 2017



# **ÍNDICE**

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Resumen y abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	5
2.1 Inóculo .....	5
2.2 Diseño fotobiorreactor .....	5
2.3 Preparación del medio de cultivo .....	6
2.4 Evolución del cultivo .....	6
2.4.1. <i>Correlación entre absorbancia a 540 nm y concentración celular en g/L ...</i>	8
2.4.2. <i>Medidas del ratio <math>F_v/F_m</math> y uso de la técnica RLC</i> .....	8
2.4.3. <i>Cálculo de <math>\mu_{max}</math></i> .....	8
2.5 Cambio de modo discontinuo a continuo .....	9
2.6 Pinturas .....	9
2.7 Pintado de portaobjetos .....	10
2.8 Limpieza de portaobjetos .....	10
2.9 Portaobjetos dentro del fotobiorreactor .....	11
2.10 Ensuciamiento de los portaobjetos .....	12
2.11 Efectos de la exposición a las pinturas .....	14
2.12 Determinación de la concentración de cobre.....	15
<b>3. Resultados</b> .....	16
3.1. Crecimiento .....	16
3.2. Ensuciamiento .....	17
3.3. Pérdida del estado estacionario .....	19
<b>4. Discusión</b> .....	21
<b>5. Conclusiones</b> .....	24
<b>6. Bibliografía</b> .....	25

## **ABREVIATURAS**

$\alpha$	Tasa fotosintética en la región de luz límite
C	Pintura C
D	Velocidad de dilución
$E_k$	Radiación saturante
ETR	<i>Electron Transport Rate</i>
ETR <sub>max</sub>	Tasa relativa máxima de transporte de electrones
FDA	Diacetato de fluoresceína
Fm	Fluorescencia máxima de las clorofilas en condiciones de oscuridad
Fv	Fluorescencia variable máxima de las clorofilas en condiciones de oscuridad
J	Pintura J
$\mu_{max}$	Velocidad de crecimiento máxima de la biomasa
PAM	<i>Pulse Amplitude Modulator</i>
PAR	<i>Photosynthetic Active Radiation</i>
R	Pintura R
RLC	<i>Rapid Light Curve</i>
TBT	ter-butil estaño
V	Portaobjetos no pintados o vidrios

## **RESUMEN**

La bioincrustación marina es un problema a nivel global que produce enormes pérdidas económicas. Afecta principalmente a embarcaciones, pero también encontramos este problema en los fotobiorreactores utilizados para el cultivo de microalgas, afectando a la productividad de biomasa y originando contaminaciones indeseadas. Aprovechando el gran desarrollo en el ámbito de las pinturas anti bioincrustación promovido por la industria naval, se ha decidido estudiar la idoneidad de tres pinturas de uso náutico de última generación como recubrimiento para los fotobiorreactores. Usando un fotobiorreactor de tipo panel plano a escala de laboratorio, un monocultivo de *Nannochloropsis gaditana* y portaobjetos cubiertos con estas pinturas, se ha estudiado y comparado el ensuciamiento de los portaobjetos dentro del fotobiorreactor para determinar si los recubrimientos podrían ser usados en el interior de los fotobiorreactores. De los resultados de la investigación llevada a cabo, se puede concluir que las pinturas que contengan  $\text{Cu}_2\text{O}$  son altamente desaconsejables para este propósito, mientras que las basadas en el uso de hidrogel y silicona podrían ser candidatos potenciales a falta de más pruebas.

## **ABSTRACT**

Marine biofouling is a global problem that produces huge economic losses. It mainly affects boats, but we also find this problem in the photobioreactors used for the cultivation of microalgae, affecting the productivity of biomass and causing unwanted contaminations. Taking advantage of the great development in the field of antibiofouling paintings promoted by naval industry, we have studied the suitability of three last generation nautical paintings as a coating for the photobioreactors. Using a laboratory-scale flat-panel photobioreactor, a monoculture of *Nannochloropsis gaditana* and coated glass slides with these paintings, it has been compared the fouling between these surfaces with the purpose of determining if these coatings could be used inside photobioreactors. From the results of the research carried out, it can be concluded that paintings containing  $\text{Cu}_2\text{O}$  are highly inadvisable for this aim, whereas those based on the use of hydrogel and silicone could be potential candidates considering these proofs.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

La bioincrustación marina se puede definir como la indeseable acumulación de microorganismos, plantas y animales sobre las superficies y estructuras creadas por el hombre que se encuentran inmersas en agua de mar.

Éste es un fenómeno que ocurre en tres etapas: adhesión molecular, microincrustación y macrioncristación (1-3). En la adhesión molecular se unen compuestos inorgánicos y macromoléculas orgánicas como polisacáridos y polipéptidos a la superficie en cuestión. La microincrustación se puede dividir en dos fases, llamadas colonización primaria y secundaria. Primeramente se unen bacterias, microalgas y diatomeas y a continuación las esporas de las algas y los protozoos. En la tercera etapa se unen las plantas y los animales invertebrados. Es la etapa más importante debido a la gran modificación que produce en la superficie afectada, tanto en su peso como en su forma (4, 5).

La bioincrustación marina es un problema global con gran impacto a nivel económico y medioambiental. Afecta a embarcaciones y estructuras fijas como boyas, anclajes y tuberías (1, 6). En el caso de las embarcaciones, los problemas causados son muy conocidos, empezando por el aumento de peso de la nave debido a la acumulación de organismos en el casco. Esto produce un notable incremento de resistencia a la fricción, lo que se traduce en la disminución de la velocidad punta, reducción de la maniobrabilidad, pérdida de eficiencia energética y una elevación del consumo de combustible que puede llegar al 40% (4, 7). La necesidad de retirar estos organismos del casco de las embarcaciones obliga a llevarlas a dique seco. El proceso de limpieza es difícil ya que la unión entre estos organismos y el casco de los barcos es muy fuerte. Todo lo que se ha mencionado se traduce en un alto impacto económico debido al consumo de tiempo, mano de obra y frecuencia (en algunos casos cada 9 meses) con la que han de acudir las embarcaciones al dique seco, llegando a gastarse anualmente en todo el mundo miles de millones de euros a causa de este fenómeno (4). Además, a nivel ambiental, el aumento en el consumo de combustible implica un aumento en la liberación de gases de combustión altamente contaminantes; el tráfico marítimo global favorece la propagación de especies fuera de su entorno pudiendo desplazar a otras especies autóctonas de algunas localizaciones; y la limpieza de los cascos genera un gran volumen de agua residual con alta concentración de tóxicos (7).

El desarrollo de mecanismos contra la bioincrustación marina suele estar asociado al aumento del transporte marítimo de personas y mercancías. Se ha documentado el uso de diferentes sistemas anti incrustación desde los tiempos de los fenicios y cartagineses (700 a.C.) (4, 7).

Desde que se descubrieron a mediados del siglo XX las propiedades anti incrustantes de los compuestos organoestánicos, especialmente las del ter-butil estaño (TBT), diferentes recubrimientos que contenían este compuesto se fueron desarrollando y utilizando masivamente, estimándose que el 70% de la flota mundial en los años noventa llevaba este tipo de recubrimiento. En 2003 la Organización Marítima Internacional prohibió su uso debido a su elevada toxicidad a altas concentraciones, baja degradabilidad y alto poder como disruptor endocrino a dosis subletales. Este hecho ha obligado a buscar nuevas soluciones igualmente eficaces pero más respetuosas con el medio ambiente. En la búsqueda por nuevos tipos de pinturas y recubrimientos se ha probado con matrices que vayan auto desprendiéndose con el tiempo, que contengan enzimas que eviten la adhesión molecular, que contengan ZnO, Cu<sub>2</sub>O, TiO<sub>2</sub> o Ag, o que simulen los

mecanismos anti incrustantes que encontramos en la naturaleza como los de la hoja de nenúfar (4, 8).

El objetivo de desarrollar estas nuevas pinturas no es otro que alargar el tiempo de operatividad de embarcaciones y estructuras entre cada limpieza, ahorrando costes y disminuyendo su impacto ambiental.

En nuestro caso, las nuevas pinturas anti incrustantes heredadas de la industria naval quieren ser estudiadas como una posible solución al problema de bioincrustación que se produce en los fotobiorreactores, ya sean tubulares, de panel plano, o de canal abierto, usados para cultivar microalgas marinas. En estos fotobiorreactores, la indeseada bioincrustación que se produce sobre las superficies dificulta la adecuada entrada de luz al interior de los mismos, lo cual disminuye la productividad de la biomasa debido a la baja eficiencia fotosintética de las microalgas en estas condiciones. Además, esta bioincrustación favorece la contaminación del cultivo por organismos invasores, lo que obliga a tener tiempos de cultivo más cortos, y de esta forma, se reduce la vida útil de los equipos. Todo esto implica un aumento en los ya de por sí elevados costes de producción en este tipo de sistemas. Por suerte en los fotobiorreactores se suele trabajar con monocultivos. Esto supone una gran ventaja en cuanto al tipo de bioincrustación que se produce en sus superficies respecto a la que se produce en los cascos de los barcos, ya que en el caso de los fotobiorreactores solo se produciría la colonización primaria, relativamente más fácil de eliminar (9).

En este trabajo se han utilizado diferentes pinturas anti incrustantes de nueva generación para determinar cuál de ellas es más eficaz y si se ensucian más o menos que una superficie no pintada.

El entorno de experimentación elegido ha sido el interior de un fotobiorreactor de tipo panel plano, a escala de laboratorio, en el que se ha hecho crecer un monocultivo de *Nannochloropsis gaditana*. El uso de este tipo de entorno permite controlar muchas de las variables del proceso y hacerlo reproducible. Debido a las concentraciones de biomasa alcanzadas, las cinéticas de ensuciamiento se aceleran y permiten obtener datos en pocas semanas. Haciendo uso de técnicas espectroscópicas se ha ido cuantificando la cantidad de células adheridas a las superficies. Así mismo, se han llevado a cabo pruebas complementarias para entender y verificar algunos datos obtenidos durante la fase experimental.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 2.1. Inóculo

Se ha trabajado con un monocultivo de la microalga *Nannochloropsis gaditana*. Ésta microalga se obtuvo a partir de un inóculo (se refresca cada 10 días) que posee el Área de Ingeniería Química perteneciente al Departamento de Ingeniería de la Universidad de Almería. El inóculo se hizo crecer fotoautotróficamente en un matraz redondo de fondo plano de 1 L con 700 mL de medio de cultivo, iluminado 12 horas al día y a temperatura ambiente controlada de 26 °C. La iluminación fue suministrada con tubos fluorescentes de 58 W que proporcionaban  $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  de media, medidos en el interior del matraz. La agitación era proporcionada por una columna de burbujeo de aire filtrado, suministrado por un compresor y esparcido con un aireador, con un caudal de  $0,5 \text{ v} \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . La composición del medio se detalla en la **Tabla 1**. Un inóculo de 5 L en pleno estado de crecimiento exponencial se utiliza para inocular el reactor. Los 5 L de inóculo se traspasan al reactor y se añaden 8 L de agua de mar filtrada y autoclavada con nutrientes para 13 L.

### 2.2. Diseño del fotobiorreactor

El fotobiorreactor utilizado es del tipo panel plano de vidrio, con un volumen total de 15,60 L. Su diseño está basado en otro fotobiorreactor plano de similares proporciones, formado por una bolsa de plástico contenida en un armazón de acero (10). Como muestra la **Figura 1**, las dimensiones internas son: 8,0 cm de espesor, 50,0 cm de altura y 39,0 cm de largo. El espesor de los paneles de vidrio varía de 6 a 9 mm. El volumen de trabajo se fijó en 13,50 L, obteniéndose una altura de líquido de 43 cm. El volumen se mantuvo más o menos constante a lo largo de la primera etapa de crecimiento (13 primeros días), añadiendo manualmente la cantidad de agua destilada necesaria para compensar la pérdida por evaporación y por la extracción de muestras, sin aumentar la cantidad de nutrientes. La iluminación tenía un periodo de 12 horas (de 9:00 a 21:00 horas). Durante los 3 primeros días se utilizaron 3 bombillas a cada lado para evitar la fotoinhibición del cultivo y el resto del tiempo se operó con 12 bombillas por lado (OsramDulux PRO Mini Twist 23W-840 E27, China), suministrando  $300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  de media. La temperatura se controlaba mediante una corriente de agua circulante que atravesaba un intercambiador de calor (Polystat Control cc2, Huber, Alemania) formado por un serpentín plano de 2,63 m de longitud y 6,4 mm de diámetro interno, utilizado los 27 primeros días. El resto de días se controlaba mediante un climatizador que regulaba la temperatura de la sala, manteniéndose en ambos casos el cultivo a 26 °C. La agitación se realizaba mediante una columna de burbujeo producida por un aireador con 2 orificios, colocado en fondo del fotobiorreactor en posición central, alimentado por un compresor que suministraba un caudal de  $0,5 \text{ v} \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , regulado mediante un rotámetro de  $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  (Key Instruments, EEUU). El pH del cultivo se regulaba gracias a un controlador (Transmitter pH220-R1, Crison Instruments, S.A., España) que usaba como sonda un pH-metro y como operador una electroválvula (Bürkert, Alemania) que inyectaba CO<sub>2</sub> al cultivo por el sistema de aireación, manteniendo valores de  $8,00 \pm 0,05$ . El CO<sub>2</sub> era suministrado por una botella de gas comprimido y el caudal de entrada a la electroválvula se controlaba con un rotámetro de  $0,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ . La composición del medio se puede ver en la **Tabla 1**.



**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo utilizado para la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Nombre	Fórmula	Concentración (mg/L)
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	1200
Fosfato monosódico monohidratado	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	24
Citrato férrico monohidratado	Fe(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) · H <sub>2</sub> O	18
Molibdato sódico dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,6
Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,48
Cloruro de zinc	ZnCl <sub>2</sub>	1,08
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,096
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,18
EDTA dihidratado	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O	18
Hidrocloruro de tiamina	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS · HCl	1,92
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0,072
Cianocobalamina	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	0,024

### 2.3. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo se preparaba a partir de un stock concentrado, añadiendo 12 mL de éste por cada litro de agua del Mar Mediterráneo filtrada (membrana de poliéter sulfona (PES) de 0,2 µm Nalgene Rapid Flow, Thermo Fisher Scientific) y autoclavada. La preparación del stock se hace manualmente, pesando cada componente por separado y disolviéndolos en agua destilada. La esterilización se hace también mediante autoclavado, lo cual obliga a preparar diferentes fracciones de distinta composición a fin de que no reaccionen unos componentes con otros. En el caso de las vitaminas, su esterilización se realiza mediante filtrado a través de una filtro de jeringa de 0,2 µm (Fisherbrand®, China) para evitar su degradación por temperatura. Una vez esterilizada cada fracción, se mezcla en un frasco de 1 L y se envuelve en papel de aluminio para proteger las vitaminas de la fotodegradación. El stock se conserva en el frigorífico a una temperatura de 7 °C.

### 2.4. Evolución del cultivo

El crecimiento de la biomasa se seguía diariamente haciendo medidas de absorbancia a 540 nm (Synergy Mx, BioTek Instruments, Inc, EEUU) y medidas de citometría de flujo (Cell Lab Quanta™ SC, Beckman Coulter, EEUU). El estado fisiológico de las células fue determinado como el rendimiento fotosintético máximo del fotosistema II, estimado como la relación entre la fluorescencia variable máxima y la fluorescencia máxima de la clorofila (Fv/Fm) tras un periodo de aclimatación a la oscuridad de 30 min. También se llevó a cabo la técnica RLC (del inglés *Rapid Light Curve*) para medir las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la luz. Para estas dos técnicas se usó un fluorímetro modulador de la amplitud de pulso (en adelante fluorímetro PAM, del inglés *Pulse Amplitude Modulator*, PAM-2500, Walz, Alemania). Todas las medidas se hicieron por triplicado.

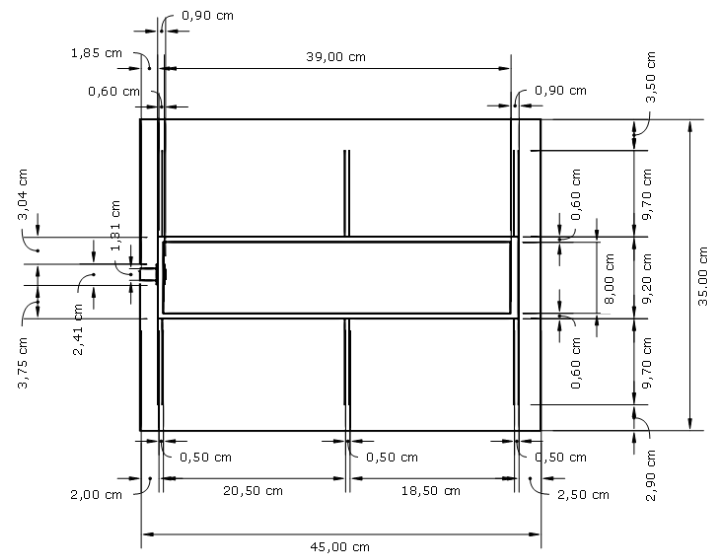
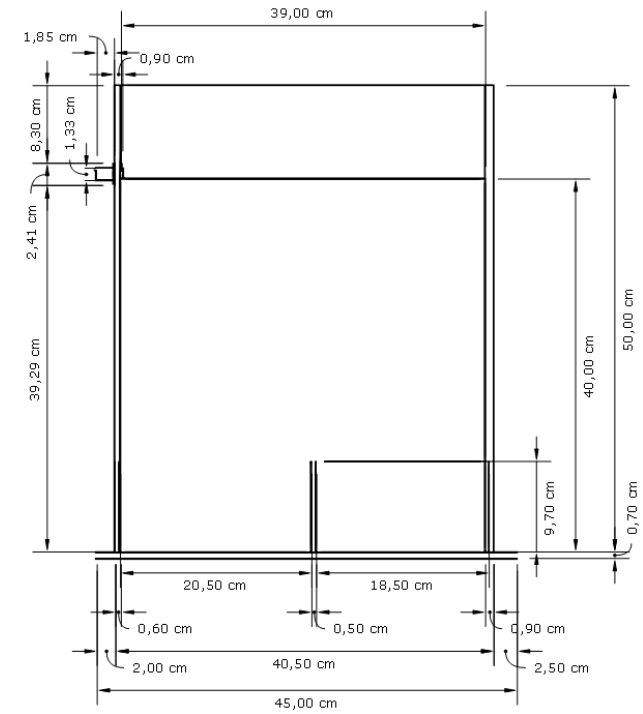
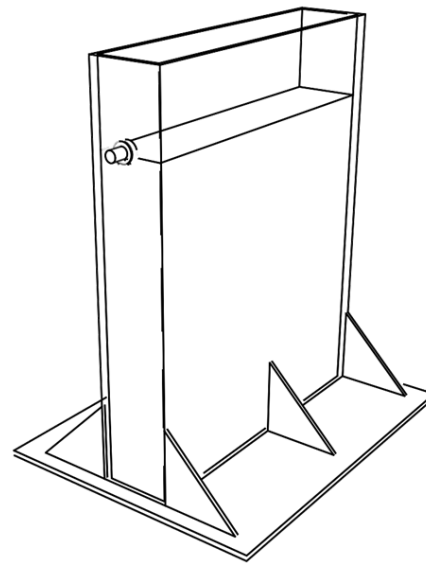
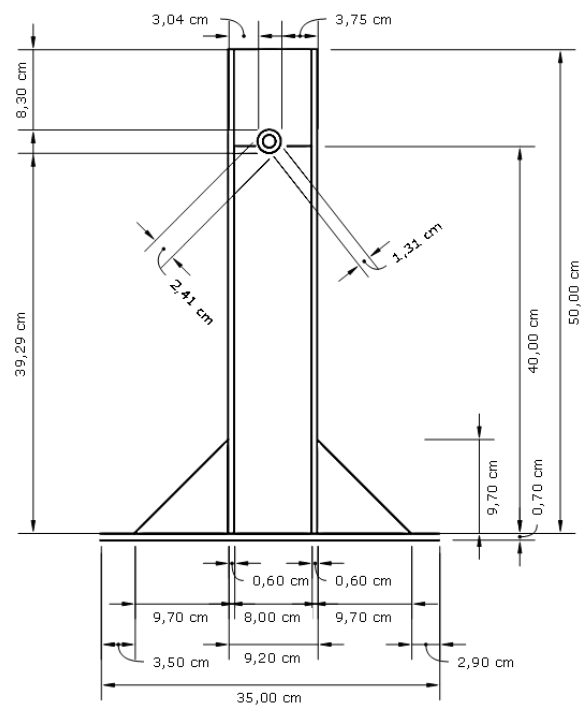


Figura 1. Planos y dimensiones del fotobiorreactor utilizado en este trabajo.

#### 2.4.1. Correlación entre absorbancia a 540 nm y concentración celular en g/L

Las medidas de absorbancia obtenidas en el lector de placas se han procesado para poder obtener la concentración celular expresada como g de células/L. Para ello se ha utilizado la fórmula descrita en la **Ecuación 1**:

$$[C] \text{ g/L} = (Abs_{540nm} - b) * k * FD \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde b es el la medida del blanco, hecha con agua de mar filtrada. El factor k es un multiplicador que incluye coeficiente de extinción molar y un factor de correlación entre las medidas obtenidas con el lector de placas y las obtenidas con el espectrofotómetro en el que se hizo la recta de calibrado. FD es el factor de dilución.

#### 2.4.2. Medidas del ratio Fv/Fm y uso de la técnica RLC

Para hacer la determinación del ratio Fv/Fm y la técnica RLC se tomaban muestras del fotobiorreactor de 1 mL y se dejaban aclimatar en oscuridad durante al menos 30 minutos. Seguidamente y trabajando en condiciones de semi-oscuridad, una alícuota de 600 µL se introducía en la cubeta del fluorímetro PAM y se hacían las medidas, obteniéndose el valor de Fv/Fm y la curva de respuesta de la fotosíntesis a la luz. El análisis de esta curva permite calcular la actividad fotosintética como una medida de la tasa de transporte de electrones (en adelante ETR, del inglés *Electron Transport Rate*) a radiaciones de luz cada vez mayores, denominadas PAR (del inglés *Photosynthetic Active Radiation*). La curva ETR vs PAR se ajustó al modelo de Eilers y Peeters (10, 11) mostrado en la **Ecuación 2**:

$$ETR = \frac{PAR}{x_1 \cdot PAR^2 + x_2 \cdot PAR + x_3} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  son los parámetros de ajuste del modelo. Los parámetros fotosintéticos  $\alpha$  (tasa fotosintética en la región de luz límite),  $E_k$  (radiación saturante) y  $ETR_{max}$  (tasa relativa máxima de transporte de electrones) se determinan a partir de los parámetros de ajuste mostrados en las **Ecuaciones 3, 4 y 5**, siendo:

$$\alpha = \frac{1}{x_3} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$ETR_{max} = \frac{1}{x_2 + 2 \cdot \sqrt{x_1 \cdot x_3}} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$E_k = \frac{x_3}{x_2 + 2 \cdot \sqrt{x_1 \cdot x_3}} \quad (\text{Ec. 5})$$

#### 2.4.3. Cálculo de $\mu_{max}$

El cálculo de la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) se realizó a partir de los datos de concentración celular obtenidos en la fase de crecimiento exponencial. Para obtener el valor de éste parámetro se representó el logaritmo neperiano de la concentración celular partido de la concentración celular inicial en función del tiempo, tal como describe la fórmula de la **Ecuación 6**:



Por otro lado, la pintura R tiene una matriz que la hace más dura, y basa su mecanismo de acción en las propiedades del óxido cuproso como molécula anti incrustante (12), además de otros componentes.

## 2.7. Pintado de los portaobjetos

Partiendo de portaobjetos de microscopio nuevos y limpios (con bordes esmerilados, Normax, Portugal), el protocolo de pintado para el caso de las pinturas C y J consiste en verter, con ayuda de una jeringuilla de plástico, entre 1 y 2 mL de pintura en uno de los bordes cortos del portaobjetos así como en el centro, y extenderla a lo largo de la superficie del portaobjetos, hasta el otro extremo, con la ayuda de una barra de aplicación espiral como la que se muestra en la **Figura 3**. El uso de esta herramienta permite aplicar la pintura de manera uniforme y controlar el espesor de la capa de pintura aplicada, teniendo ésta un espesor medio en húmedo de 150  $\mu\text{m}$ . Después del secado, el espesor final puede variar entre 100 y 120  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

En el caso de la pintura R no se pudo usar el mismo sistema de pintado por la elevada viscosidad de la pintura. Para esta pintura, el sistema elegido fue la inmersión de los portaobjetos dentro del bote de pintura, en posición vertical, y su posterior extracción retirando la pintura de una de las superficies. El espesor medio de la capa de pintura resultante es de 600  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.** Sistema de esparcimiento de pintura compuesto por una varilla de aplicación espiral y una superficie de pruebas.

## 2.8. Limpieza de portaobjetos

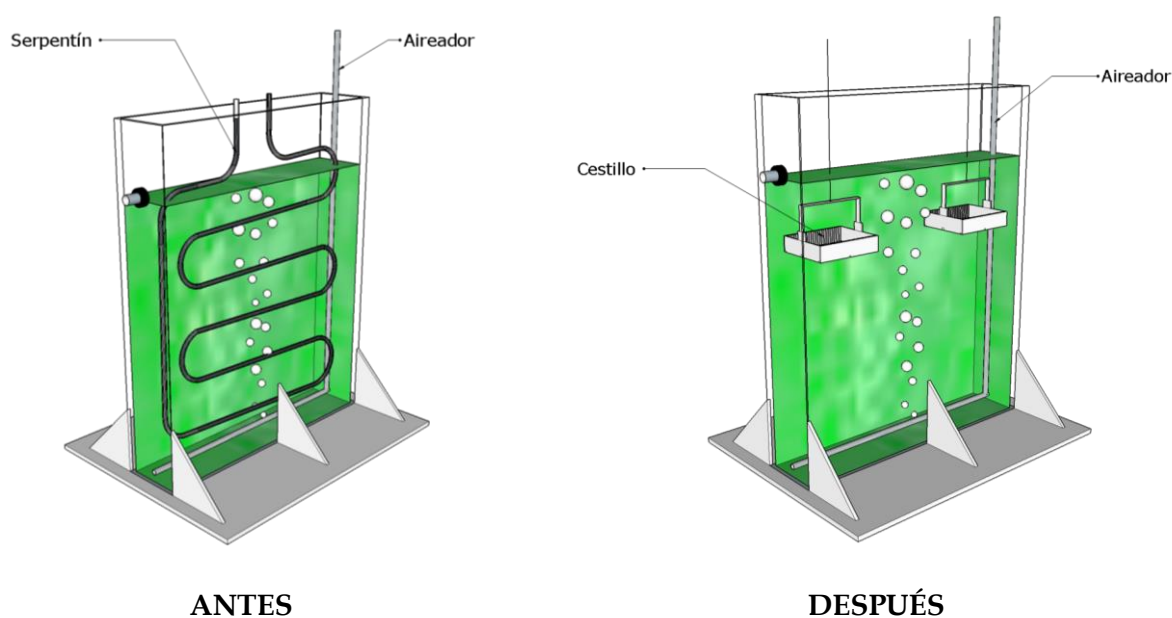
Dependiendo de qué portaobjetos estemos limpiando, véase pintado o no pintado, usamos protocolos diferentes. En el caso de los portaobjetos no pintados, el protocolo de limpieza utilizado consta de varios pasos, empezando por sumergir los portaobjetos durante al menos 5 horas en ácido clorhídrico al 10% v/v. A continuación, se lavan con agua desionizada para retirar el ácido. Seguidamente, los portaobjetos se sumergen en una solución de Alconox® al 1% dentro de un vaso de precipitados que a su vez se introduce en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Esta operación se repite 2 veces más cambiando la solución de Alconox® por etanol al 96% v/v en primer lugar, y después por acetona. Finalmente, se vuelven a enjuagar con agua desionizada y por último se ponen a secar en estufa a 50 °C durante al menos 24 horas.

En el caso de los portaobjetos pintados, el lavado es menos intenso para evitar dañar las superficies. Este lavado consiste en, primeramente, sumergir los portaobjetos durante 10 segundos en etanol al 96% v/v. Luego, sacar y dejar que el etanol se evapore un poco. Inmediatamente después, sumergir en una solución con lejía comercial al 10% v/v durante 10 minutos, y finalmente, lavar con agua desionizada. Estos portaobjetos se dejan secar a temperatura ambiente.

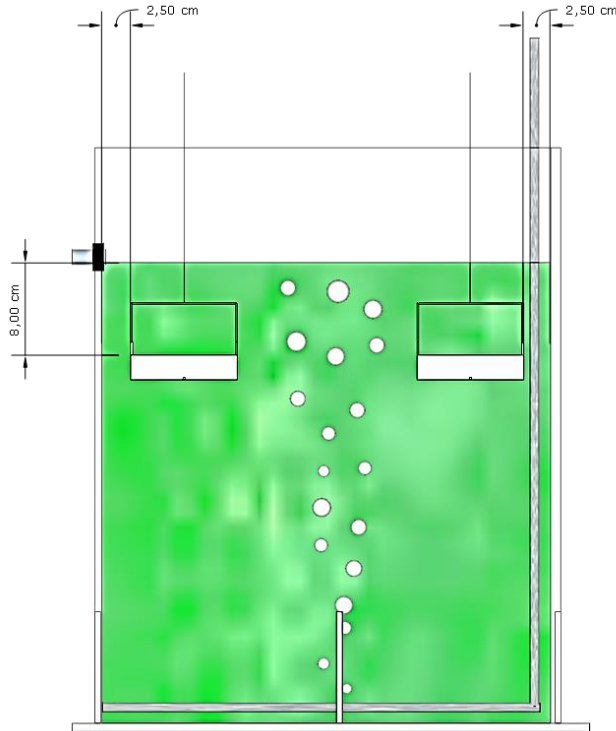
En ambos casos, los portaobjetos fueron colocados en cestillos de vidrio para cubetas de tinción durante todo el procedimiento, de modo que no fuesen manipulados uno por uno para asegurar que todo el proceso sea homogéneo.

## 2.9. Portaobjetos dentro del fotobiorreactor

Los portaobjetos pintados así como los no pintados se introdujeron dentro del fotobiorreactor en unos cestillos de plástico para tinción con capacidad de albergar hasta 25 portaobjetos (Modelo 191100, Deltalab, España). Al ser situados en la posición que describen las **Figuran 4 y 5**, hubo que retirar el serpentín. Previamente, fueron lavados como se ha descrito anteriormente (ver apartado 2.8), y fueron colocados de tal manera que la superficie pintada estuviese orientada hacia el centro del fotobiorreactor, donde se encontraba la columna de burbujeo. Además, fueron rotulados de forma que su identificación así como su orientación resultase inequívoca, y colocados en posiciones ordenadas dentro de cada cestillo. El orden de cada portaobjeto dentro de los cestillos, así como su variación a lo largo de los días se muestra en la **Tabla 2**. La separación entre cada portaobjetos es de 3,6 mm, lo que favorece que el flujo en contacto con la superficie de éstos sea de régimen laminar.



**Figura 4.** Configuración del fotobiorreactor antes y después de meter los cestillos con las pinturas.



**Figura 5.** Detalle de la posición de los cestillos dentro del fotobiorreactor.

## 2.10. Ensuciamiento de los portaobjetos

El seguimiento del ensuciamiento de los portaobjetos se hizo midiendo la fluorescencia de la clorofila de las células adheridas a la superficie de los mismos, excitando a 480 nm y midiendo la emisión a 685 nm con el mismo equipo usado para determinar la concentración celular por absorbancia. Para ello, en una placa de 96 pocillos de color negro (Nunclon, Nunc, Dinamarca) se perforó el fondo de un total de 24 pocillos dispuestos en conformación rectangular, abarcando 3 filas y 8 columnas, tal y como muestra la **Figura 6**. De esta forma se podía colocar el portaobjetos en la base de la placa, pegado con cinta de color negro que cubre completamente el portaobjetos, y realizar las medidas sobre la superficie en contacto con los agujeros. Por cada pocillo se hacían 13 medidas, de manera que por cada portaobjetos se obtenían 312 lecturas repartidas por toda la superficie del mismo, midiéndose hasta el 44% de la superficie total del portaobjetos.

Los portaobjetos se sacaban de los cestillos de plástico cada 2 días y se sustituían por otros portaobjetos, ya fuesen pintados, no pintados o una mezcla de todos, con el objetivo de no modificar la fluidodinámica entre cada medida. El proceso se hacía manualmente, y conforme se sacaban los portaobjetos del biorreactor, eran colocados en cestillos de vidrio y sumergidos en 750 mL de agua de mar filtrada, dentro de un vaso de precipitados de 2 L. Las muestras se mantenían en agua de mar hasta realizar la medida para evitar la deshidratación.

**Tabla 2.** Distribución de los portaobjetos dentro de los cestillos. La posición 1 es la más externa y la 24 la más interna.

		<b>Posición</b>																							
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>
<b>I</b>	Vi1	Ji1	Ci1	Ci2	Vi2	Ji2	Ji3	Ci3	Vi3	Vi4	Ci4	Ji4	Ci5	Ji5	Vi5	Ji6	Vi6	Ci6	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	Cd1	Jd1	Vd1	Cd2	Jd2	Vd2	Cd3	Jd3	Vd3	Cd4	Jd4	Vd4	Cd5	Jd5	Vd5	Cd6	Jd6	Vd6	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 1 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	Ri1	Ri2	Ri3	Ci2	Vi2	Ji2	Ji3	Ci3	Vi3	Vi4	Ci4	Ji4	Ci5	Ji5	Vi5	Ji6	Vi6	Ci6	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	Rd1	Rd2	Rd3	Cd2	Jd2	Vd2	Cd3	Jd3	Vd3	Cd4	Jd4	Vd4	Cd5	Jd5	Vd5	Cd6	Jd6	Vd6	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 3 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	Ri2	Ri3	C	V	J	Ji3	Ci3	Vi3	Vi4	Ci4	Ji4	Ci5	Ji5	Vi5	Ji6	Vi6	Ci6	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	V	Rd2	Rd3	C	J	V	Cd3	Jd3	Vd3	Cd4	Jd4	Vd4	Cd5	Jd5	Vd5	Cd6	Jd6	Vd6	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 5 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	V	Ri3	C	V	J	Ji9	Ci9	Vi9	Vi4	Ci4	Ji4	Ci5	Ji5	Vi5	Ji6	Vi6	Ci6	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	V	V	Rd3	C	J	V	Cd9	Jd9	Vd9	Cd4	Jd4	Vd4	Cd5	Jd5	Vd5	Cd6	Jd6	Vd6	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 7 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	V	V	C	V	J	Ji9	Ci9	Vi9	V	V	V	Ci5	Ji5	Vi5	Ji6	Vi6	Ci6	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	V	V	V	C	J	V	Cd9	Jd9	Vd9	V	V	V	Cd5	Jd5	Vd5	Cd6	Jd6	Vd6	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 9 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	V	V	C	V	J	Ji9	Ci9	Vi9	V	V	V	V	V	V	Ji6	Vi6	Ci6	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	V	V	V	C	J	V	Cd9	Jd9	Vd9	V	V	V	V	V	V	Cd6	Jd6	Vd6	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 11 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	V	V	C	V	J	Ji9	Ci9	Vi9	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Vi7	Ji7	Ci7	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	V	V	V	C	J	V	Cd9	Jd9	Vd9	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Cd7	Jd7	Vd7	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 13 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	V	V	C	V	J	Ji9	Ci9	Vi9	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Ji8	Vi8	Ci8	
<b>D</b>	V	V	V	C	J	V	Cd9	Jd9	Vd9	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	Cd8	Jd8	Vd8	
<b>Día 15 de ensuciamiento</b>																									
<b>I</b>	V	V	V	C	V	J	Ji9	Ci9	Vi9	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<b>D</b>	V	V	V	C	J	V	Cd9	Jd9	Vd9	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<b>Día 17 de ensuciamiento</b>																									

I=Cestillo izquierdo; D=Cestillo derecho; C=Portaobjetos con pintura C; J=Portaobjetos con pintura J; R=Portaobjetos con pintura R; V=Portaobjetos no pintado (vidrio)





**Figura 6.** Placa perforada de 96 pocillos utilizada para cuantificar el ensuciamiento de los portaobjetos como una medida de fluorescencia.

Antes de realizar la medida en la placa de 96 pocillos del modo descrito anteriormente, los cestillos de vidrio se agitaban suavemente dentro de los vasos de precipitados, (en el eje Z, realizando siempre el mismo movimiento), para despegar las microalgas débilmente adheridas a las superficies de los portaobjetos.

El tratamiento de datos de estas medidas consiste en sumar la fluorescencia de las 312 lecturas y dividirla entre la superficie total medida, que es el resultado de multiplicar el área de cada pocillo ( $A$ ) por los 24 pocillos medidos como muestran las **Ecuaciones 7 y 8**:

$$A = \pi \frac{d^2}{4} \equiv \pi \frac{(0,66 \text{ cm})^2}{4} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$24 \cdot A = 8,211 \text{ cm}^2 \quad (\text{Ec. 8})$$

### 2.11. Efectos de la exposición a las pinturas

Para hacer el estudio de exposición de las microalgas a las pinturas se utilizaron un total de 8 vasos de precipitados de 250 mL, de polipropileno (forma baja, Endo Plasticware), a los que se vertieron 100 mL de medio de cultivo con una concentración celular de 0,1 g/L. A los vasos utilizados como control no se les hizo ningún tratamiento interno. Únicamente se forraron externamente, cubriendo todo el perímetro con cinta negra, de modo que no entrase luz lateral al interior del vaso. Al resto de vasos se les hizo una abrasión interna que dejó la superficie áspera y desgastada. Posteriormente, fueron pintados internamente con cada una de las pinturas (2 vasos por pintura) hasta la marca de 150 mL, usando una brocha del nº 12. Se dejaron secar durante 40 horas, se lavaron y después se añadieron los 100 mL de cultivo con 0,1 g de células/L a cada vaso. El trabajo con las células se hizo dentro de una campana de flujo laminar para minimizar la contaminación eventual durante el experimento. La boca de los vasos fue cubierta con papel film, evitando la formación de arrugas, y se perforaron con una aguja para que se pudiesen intercambiar gases con la atmósfera exterior.

Una vez preparado el experimento, los vasos fueron colocados en un agitador orbital (OL30-HE, Ovan, España) que giraba constantemente a 130 rpm. Los vasos estaban iluminados con 4 tubos fluorescentes de 21 W (T5 21W G5, gsc® evolution, España) que proporcionaban una intensidad lumínica media de  $175 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 12 horas. El experimento duró más de 20 días naturales y se fueron tomando muestras cada 3 o 4 días. A éstas muestras se les analizó la absorbancia a 540 nm, el ratio  $F_v/F_m$ ,

la curva ETR *vs* PAR y la cantidad de células totales y viables por citometría de flujo usando como marcador FDA (diacetato de fluoresceína,  $\lambda_{ex}=485$  nm,  $\lambda_{em}=525$  nm). Los equipos y métodos utilizados fueron los mismos que los mencionados en el apartado 2.4.

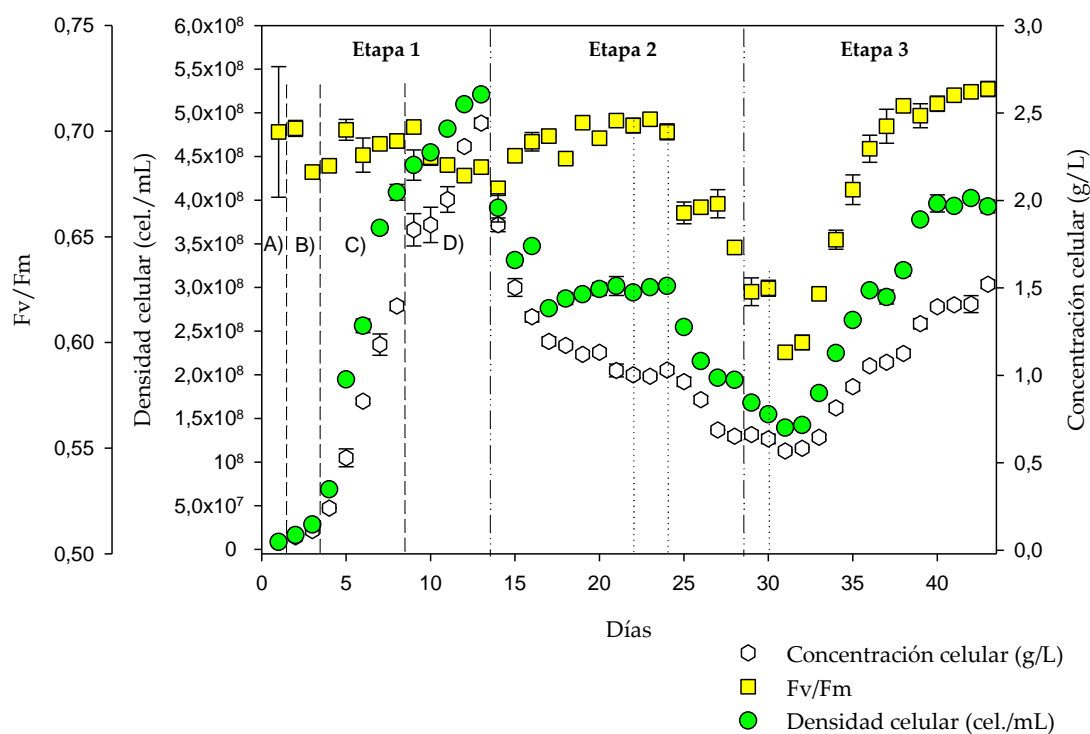
## 2.12. Determinación de la concentración de cobre

Se ha determinado la cantidad de cobre presente en el medio de cultivo y en la biomasa mediante la técnica de IPC-MS. Para llevar a cabo estas medidas, se tomaban 2 muestras del contenido del fotobiorreactor. Una de ellas era centrifugada a 4120 g durante 8 minutos (Sigma 4-15, rotor 11150, soportes 13215, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Alemania) para recoger el sobrenadante. Éste, posteriormente se filtrado con un filtro para jeringa de 0,2  $\mu$ m y recogido en un tubo falcon nuevo y limpio. La segunda muestra se enviaba tal cual a los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Almería, junto con el sobrenadante filtrado de la primera muestra. Allí, a la segunda muestra se le hacía una digestión ácida en horno microondas para eliminar la interferencia de la materia orgánica en las medidas. Finalmente, ambas muestras se analizaban mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS modelo X serie 2, Thermo Scientific, EEUU). Este proceso se repitió en diferentes días para seguir la variación de la concentración de cobre con el tiempo. La concentración de cobre en la biomasa se calculaba por diferencia entre el contenido de cobre de la segunda muestra y la primera.

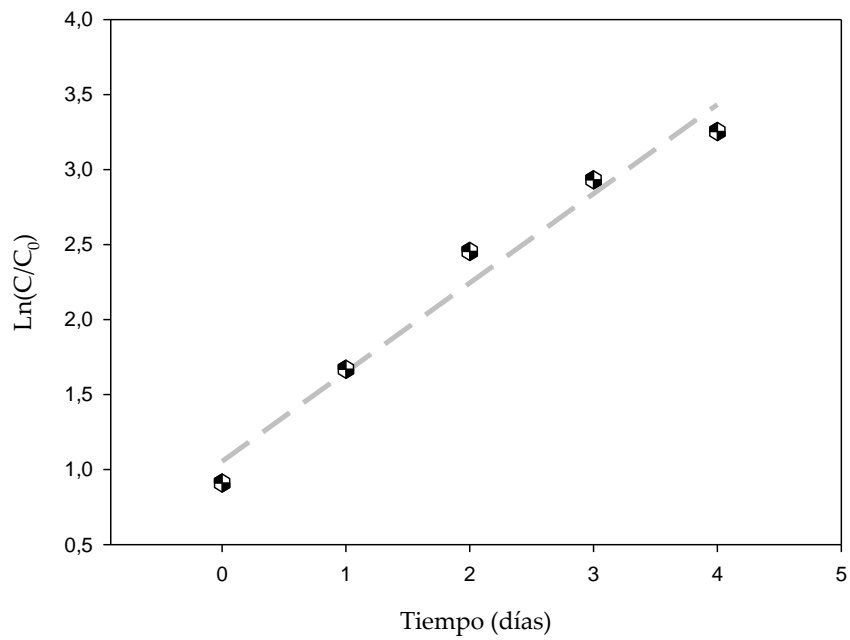
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Crecimiento

En la **Figura 7** se han representado los parámetros de crecimiento de la biomasa. Se pueden distinguir 3 etapas de crecimiento en función del modo de operación del fotobiorreactor. En la etapa 1 el fotobiorreactor funcionaba en modo discontinuo, y se pueden apreciar las distintas fases de crecimiento en este modo, a saber: A) fase lag, donde la biomasa se adapta al nuevo entorno, B) aceleración del crecimiento, C) fase de crecimiento exponencial, a partir de la cual se obtiene la velocidad máxima de crecimiento (**Figura 8**) y D) desaceleración, donde se ralentiza el crecimiento por falta de algún nutriente esencial. En la etapa 2, el reactor se puso a trabajar en modo continuo con una velocidad de dilución ( $D$ ) de  $0,32 \text{ días}^{-1}$ . Para ello, diariamente se añadían 4 L de medio de cultivo fresco, libre de células. Mientras, el volumen de medio en el interior del fotobiorreactor se mantenía constante, dejando escapar el cosechado por el rebosadero, sin recuperar la biomasa. El día 22 se introdujeron los cestillos con 8 triadas de portaobjetos cada uno, formadas por 2 portaobjetos pintados con las pinturas C y J, así como un portaobjetos no pintado. El día 24 se extrajo de cada cestillo la triada más alejada del centro del fotobiorreactor y ambas se sustituyeron por otras constituidas únicamente por portaobjetos pintados con la pintura R (ver **Tabla 2**). El rápido decremento en la concentración de la biomasa acontecido los días posteriores a la introducción de los portaobjetos con pintura R obligó a bajar la velocidad de dilución a  $0,16 \text{ días}^{-1}$  para evitar el lavado celular, entrando de este modo en la etapa 3 del crecimiento. El día 30 se produjo la extracción del último par de portaobjetos con pintura R. En los días posteriores se observa una cinética de crecimiento de la biomasa similar a la vista en la etapa 1.



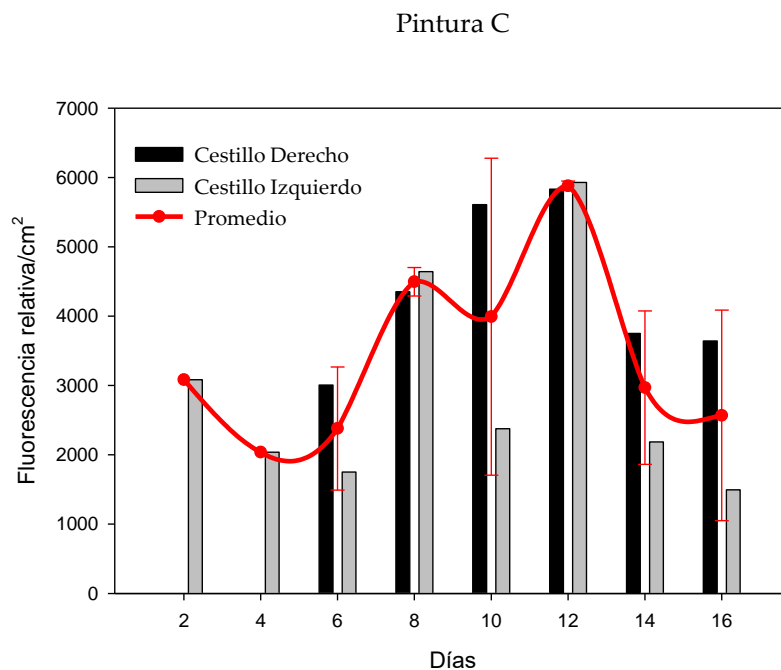
**Figura 7.** Representación gráfica de los datos de crecimiento. Las líneas de puntos marcan los días 22, 24 y 30.



**Figura 8.** Representación gráfica del cálculo de  $\mu_{\max}$ . Pendiente = 0,5949 días<sup>-1</sup>. R<sup>2</sup> = 0,9709.

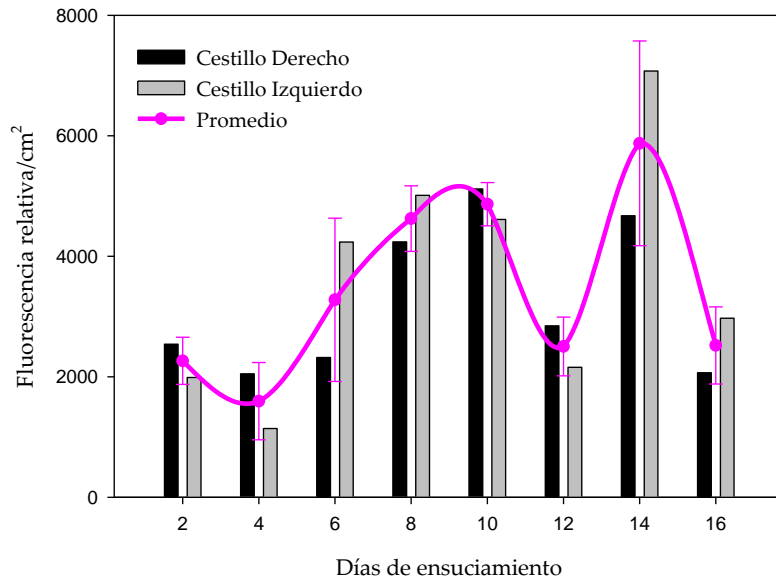
### 3.2. Ensuciamiento

Las medidas de ensuciamiento así como el posterior tratamiento de datos se realizaron conforme a lo descrito en el apartado 2.10. Las **Figuras 9, 10 y 11** son una representación de esos datos de ensuciamiento obtenidos para las pinturas C y J así como para los portaobjetos no pintados.



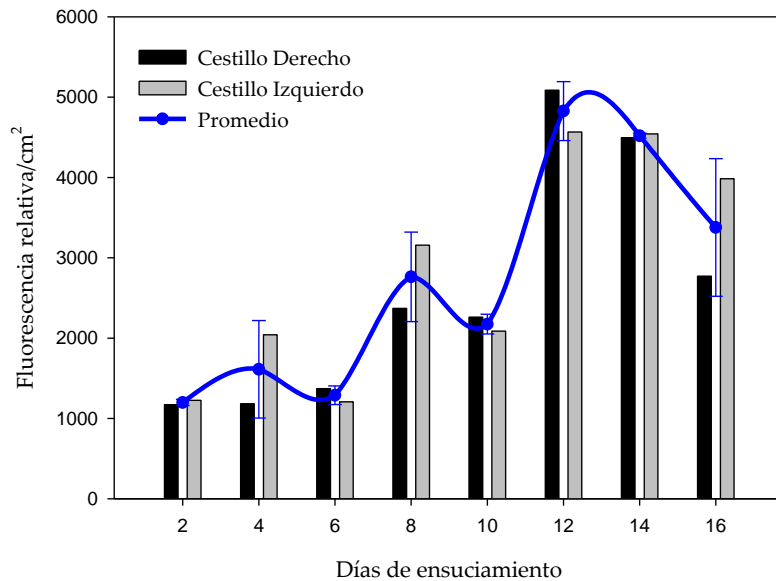
**Figura 9.** Datos de ensuciamiento de la pintura C.

### Pintura J



**Figura 10.** Datos de ensuciamiento de la pintura J.

### Vidrios (portaobjetos no pintados)



**Figura 11.** Datos de ensuciamiento de los portaobjetos no pintados o vidrios.

De la pintura R sólo se pudieron obtener 3 medidas (datos no mostrados) debido a que el cultivo disminuyó en concentración celular cuando se insertaron los portaobjetos con esta pintura en el fotobiorreactor, y sospechando que este recubrimiento era el causante del problema, se decidió no exponer las microalgas a esta pintura por más tiempo. Además, la pintura R presenta autofluorescencia a la misma longitud de onda que las clorofilas (685 nm), lo que podría estar falseando las lecturas realizadas. En consecuencia, no se pueden extraer conclusiones sobre el ensuciamiento de estos portaobjetos basadas en los datos experimentales.

Atendiendo a los diferentes gráficos de la **Figuras 9, 10 y 11**, se puede observar que las pinturas C y J se ensucian antes y en mayor cantidad que la superficie no pintada, aunque finalmente, la acumulación de microalgas en los portaobjetos pintados resulta menor que en los portaobjetos no pintados, no pudiéndose apreciar cuál de las dos pinturas es menos propensa a ensuciarse o tiene un sistema de autolimpieza mejor.

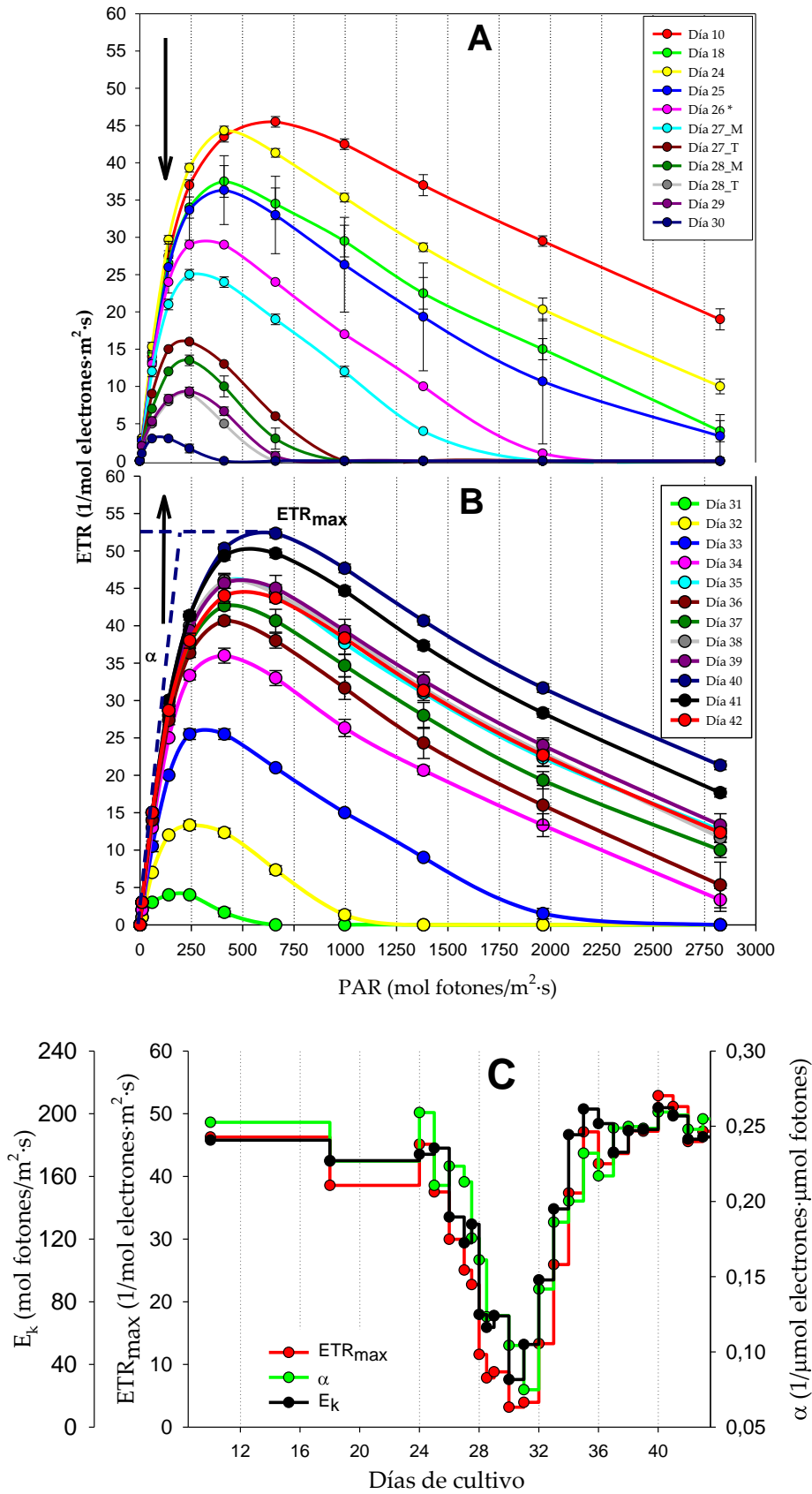
### 3.3. Pérdida del estado estacionario

La variación en la densidad celular que se produjo durante las etapas 2 y 3 del crecimiento estuvo muy cerca de acabar con la biomasa cultivada. Como se ha mencionado anteriormente, desde el principio se sospechó que el causante de esta cinética de muerte celular eran los portaobjetos con la pintura R, ya que el estado estacionario se mantuvo inalterado durante los 2 días que estuvieron solamente los portaobjetos con las pinturas C y J dentro del fotobiorreactor. Sin embargo, a las 24 horas de haber metido los portaobjetos con la pintura R se empezó a observar la disminución en la concentración de biomasa. En ese momento se decidió hacer medidas de ETR todos los días y averiguar qué componente de la pintura R o de las otras pinturas podría estar causando este problema. La **Figura 12** muestra las diferentes curvas de ETR vs PAR obtenidas a lo largo de los días. Se puede observar cómo los parámetros definitorios de estas curvas ( $ETR_{max}$ ,  $a$  y  $E_k$ ) van disminuyendo a la vez que lo hacen la concentración celular y el valor de la razón  $F_v/F_m$ .

Por otro lado, la composición de óxido cuproso ( $Cu_2O$ ) en la pintura R es alta (de un 25% a un 50% en peso), así como otras moléculas con cobre e incluso cobre elemental. Se decidió por tanto analizar la cantidad de cobre presente en el medio de cultivo del fotobiorreactor, en la biomasa expuesta a los portaobjetos con pintura R y en la biomasa no expuesta a la pintura R (sacada de un reactor de referencia). La **Tabla 3** muestra los datos obtenidos para cada muestra y día. A simple vista se puede apreciar la gran cantidad de cobre que libera la pintura R en el medio de cultivo. En el estudio de exposición de las microalgas a las pinturas (datos no mostrados) se observó que tras 24 horas de exposición a la pintura R, todas las células estaban muertas, mientras que para el resto de superficies, tras más de 20 días, las microalgas seguían creciendo con normalidad (Control: una superficie de polipropileno sin pintar). Conscientes de estos hechos, se decidió reducir la velocidad de dilución y no introducir más portaobjetos con pintura R en el fotobiorreactor.

**Tabla 3.** Concentración de cobre (Cu) hallada en las muestras analizadas.

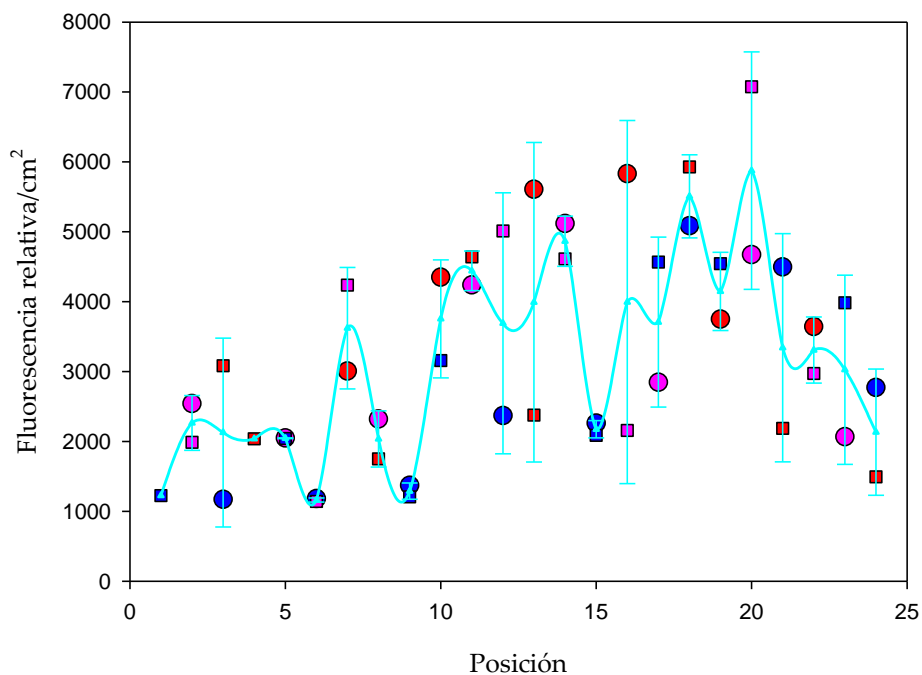
		$\mu\text{g Cu/L}$	$\mu\text{g Cu/mg biomasa seca}$
<b>Medio fresco teórico</b>		45,81	-
<b>Medio fresco real</b>		54,52	-
<b>Medio reactor no expuesto</b>		71,25	-
<b>Biomasa reactor no expuesto</b>		-	0,1329
Día 28	<b>Medio</b>	436,26	-
	<b>Biomasa</b>	1556,1	1,7165
Día 32	<b>Medio</b>	417,03	-
	<b>Biomasa</b>	780,86	0,6243



**Figura 12.** A) Curvas de ETR vs PAR decrecientes. \* El día 26 sólo se midió una vez. Las otras medidas son por triplicado. B) Curvas de ETR vs PAR crecientes. C) Representación de los parámetros definitorios de las curvas de ETR vs PAR.

## 4. DISCUSIÓN

La relación entre la presencia de los portaobjetos con pintura R, el aumento en la cantidad de cobre dentro del fotobiorreactor y la inhibición del crecimiento de las microalgas que muestran los resultados es más que evidente. En otros estudios se ha comprobado que un aumento en la cantidad de cobre en el medio de cultivo utilizado para las microalgas, produce en éstas una disminución en la tasa de crecimiento (12), ya que la presencia de este elemento reduce la producción de ATP por afectar directamente al aparato fotosintético de las microalgas y dificulta la captación de nutrientes (13). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo, dando explicación a la caída en el ratio  $F_v/F_m$  así como la de las curvas de ETR *vs* PAR. En consecuencia, el uso de la pintura R, así como el de otras pinturas basadas en el empleo de óxido cuproso como método anti bioincrustación, teniendo como objetivo eliminar este problema de las superficies de los fotobiorreactores, es absolutamente desaconsejable, por muy bajos que puedan ser los datos de ensuciamiento obtenidos. De otra manera, cualquier intento de cultivar microalgas en un fotobiorreactor cubierto con este tipo de pinturas será en vano. Pese a todo, el fotobiorreactor utilizado para realizar este trabajo sigue funcionando tras 2 meses de haber sido sembrado, sin mostrar actualmente indicios de contaminación o estrés celular.



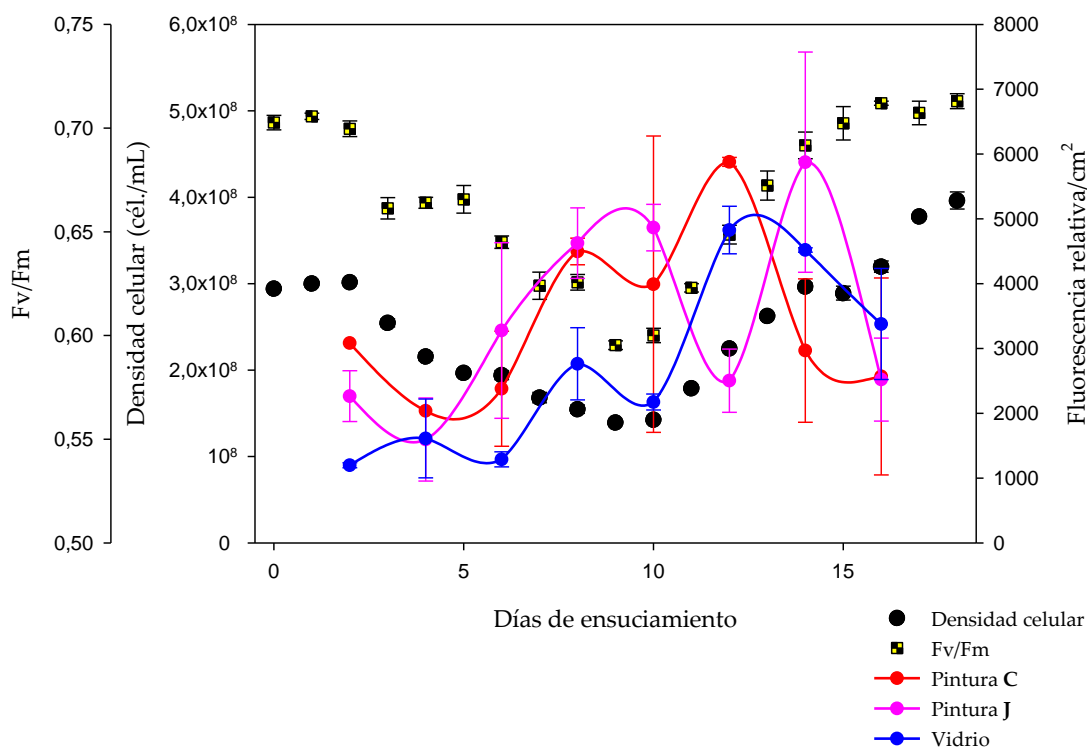
**Figura 13.** Datos de ensuciamiento de los portaobjetos en función de la posición relativa a la columna de burbujeo. Los cuadrados son para los datos del lado izquierdo, mientras que los círculos son para los del lado derecho. Código de colores: Rojo = Pintura C; Rosa = Pintura J; Azul = Vidrios.

Enfocando la atención al ensuciamiento de las pinturas C y J así como el de los portaobjetos no pintados, nos vemos obligados a plantearnos la procedencia de la gran variación entre las medidas. Se ha barajado la hipótesis de que éste error provenga de la diferencia en la posición relativa entre dos portaobjetos con las mismas características respecto a la columna de burbujeo. En la **Figura 13** se han representado por parejas los datos de ensuciamiento frente a la posición relativa de los portaobjetos, siendo 1 el valor asignado a los más alejados de la columna y 24 a los que estaban más cerca. Al analizar



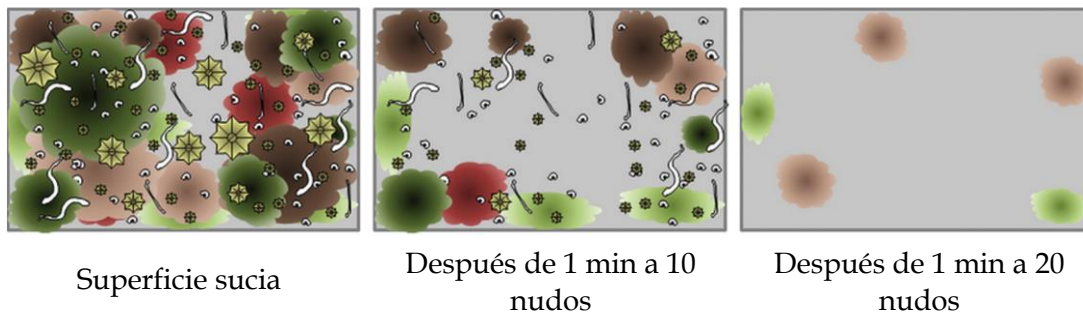
el gráfico no se observa una clara dependencia entre el ensuciamiento y la posición del portaobjetos. Este resultado es totalmente lógico, pues la máxima diferencia de distancia entre dos portaobjetos adyacentes respecto a la columna de burbujeo es de tan solo 4 mm, y cualquier pequeña variación en la posición de los cestillos producida al sacarlos e introducirlos en el fotobiorreactor durante los días que se hacían medidas de ensuciamiento, habría sido mayor que el hecho de que un portaobjetos esté en una posición o en la de al lado. La hipótesis más probable que explicaría estas diferencias es que no todas las superficies presentan exactamente el mismo perfil de relieve (fueron pintadas a mano) y que la columna de burbujeo no tiene siempre la misma forma.

Por otro lado, si examinamos los datos de ensuciamiento y los superponemos con los datos de crecimiento (**Figura 14**), en el caso de la pintura C y de los portaobjetos no pintados, sí parece haber cierta relación. Se puede intuir que el nivel de ensuciamiento depende en cierta medida de la densidad celular, pues durante los primeros días de ensuciamiento, los niveles cayeron al igual que los de densidad celular, mientras que se registraban aumentos en el ensuciamiento si también aumentaba la velocidad de crecimiento de las microalgas. De hecho, son muy reveladores en este sentido los datos obtenidos los días 10 y 12. El día 9 de ensuciamiento es el día que se registró menos densidad celular de todas las etapas de crecimiento. Un día después, el día 10, se hizo la medida de ensuciamiento y los niveles de éste habían bajado respecto al día 8, tanto para la pintura C como para los portaobjetos no pintados. Durante los 2 días siguientes la biomasa estaba creciendo a la velocidad máxima, y cuando se registró el nivel de ensuciamiento se obtuvieron los niveles más altos. Para cuando se hicieron las medidas de los días 14 y 16, el aumento de la densidad celular no era tan rápido y los niveles de ensuciamiento descendieron.



**Figura 14.** Datos de ensuciamiento de los portaobjetos, Fv/Fm y densidad celular (cél./mL) en función de los días dentro del fotobiorreactor.

Los datos de ensuciamiento de la pintura J parecen tener la misma forma que los de la pintura C y los de los portaobjetos no pintados, aunque con un desfase temporal, lo cual no nos permite hacer la misma asociación causal que para los otros casos. De cualquier modo, el nivel de ensuciamiento final es comparable al obtenido para las otras superficies. Estos resultados son bastante prometedores, pues el comportamiento de las pinturas observado en nuestras condiciones de trabajo era de esperar. Otros autores han estudiado también el comportamiento de este tipo de recubrimientos y han comprobado que a bajas velocidades de flujo las superficies pintadas se comportan igual que las no pintadas, pudiéndose observar su efecto de manera más evidente sometiendo la superficie a mayor esfuerzo cortante, es decir, a velocidades de flujo superiores. La **Figura 15**, tomada de este mismo artículo (14), ilustra perfectamente este hecho. Se entiende que al aumentar la velocidad de flujo se favorece el desprendimiento de las pinturas y por tanto la limpieza de las superficies.



**Figura 15.** Ejemplo de como sería el comportamiento de las pinturas C y J sometidas a mayor estrés hidrodinámico. Figura obtenida de Lejars, M., et al. (2012).

En cualquier caso, es conveniente seguir estudiando el comportamiento de estas pinturas eliminando factores como la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento y variaciones en la densidad celular, para así obtener conclusiones más sólidas. Estos experimentos ya se están llevando a cabo en nuestro laboratorio, pero a priori, el sistema anti bioincrustación de las pinturas C y J parece un buen candidato para ser utilizado en los fotobiorreactores debido a que no afecta al cultivo y que permitiría limpiar las superficies afectadas aumentando la velocidad de flujo.

## **6. CONCLUSIONES**

---

- La pintura R a base de cobre no es adecuada para prevenir el problema de la bioincrustación en los fotobiorreactores.
- Los altos niveles de cobre afectan a la maquinaria fotosintética de las microalgas, lo cual implica una menor tasa de crecimiento de las mismas. Después de 24 h de exposición a la pintura R la eficiencia fotosintética fue nula, demostrando que todas las células estaban muertas.
- Las pinturas C y J a base de silicona e hidrogel no son tóxicas para los cultivos de microalgas.
- Conceptualmente, las pinturas C y J son prometedores candidatos para ser utilizadas como recubrimiento anti bioincrustación en los fotobiorreactores. Las velocidades de corte alrededor de  $600 \text{ s}^{-1}$  existentes en los fotobiorreactores tubulares de microalgas pueden prevenir o evitar la adhesión de las células en estos reactores en caso de estar recubiertos internamente con las mismas.
- Se ha conseguido mantener el cultivo libre de microorganismos invasores y con una población sana por más de dos meses.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Al-Naamani, L., Dobretsov, S., Dutta, J., and Burgess, J. G. (2017) Chitosan-zinc oxide nanocomposite coatings for the prevention of marine biofouling, *Chemosphere* 168, 408-417.
2. Dobretsov, S. (2009) Inhibition and Induction of Marine Biofouling by Biofilms, In *Marine and Industrial Biofouling* (Flemming, H.-C., Murthy, P. S., Venkatesan, R., and Cooksey, K., Eds.), pp 293-313, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
3. Magin, C. M., Cooper, S. P., and Brennan, A. B. (2010) Non-toxic antifouling strategies, *Materials Today* 13, 36-44.
4. Selim, M. S., Shenashen, M. A., El-Safty, S. A., Higazy, S. A., Selim, M. M., Isago, H., and Elmarakbi, A. (2017) Recent progress in marine foul-release polymeric nanocomposite coatings, *Prog. Mater. Sci.* 87, 1-32.
5. Silverman, H. G., and Roberto, F. F. (2007) Understanding Marine Mussel Adhesion, *Marine Biotechnology* 9, 661-681.
6. Sudha, P. N., Gomathi, T., Venkatesan, J., and Kim, S.-K. (2015) Marine Biomaterials as Antifouling Agent, In *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (Kim, S.-K., Ed.), pp 1181-1192, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
7. Yebra, D. M., Kiil, S., and Dam-Johansen, K. (2004) Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings, *Progress in Organic Coatings* 50, 75-104.
8. Zhang, P., Lin, L., Zang, D., Guo, X., and Liu, M. (2017) Designing Bioinspired Anti-Biofouling Surfaces based on a Superwettability Strategy, *Small* 13, n/a.
9. Zerrouh, O., Reinoso-Moreno, J. V., López-Rosales, L., Cerón-García, M. d. C., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., and Molina-Grima, E. (2017) Biofouling in photobioreactors for marine microalgae, *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-18.
10. Zerrouh, O., Reinoso-Moreno, J. V., López-Rosales, L., Sierra-Martín, B., Cerón-García, M. C., Sánchez-Mirón, A., Fernández-Barbero, A., García-Camacho, F., and Molina-Grima, E. (2017) A methodological study of adhesion dynamics in a batch culture of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*, *Algal Research* 23, 240-254.
11. Eilers, P. H. C., and Peeters, J. C. H. (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton, *Ecological Modelling* 42, 199-215.
12. Yan, H., and Pan, G. (2002) Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species, *Chemosphere* 49, 471-476.
13. Cid, A., Herrero, C., Torres, E., and Abalde, J. (1995) Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters, *Aquatic Toxicology* 31, 165-174.
14. Lejars, M., Margailan, A., and Bressy, C. (2012) Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings, *Chemical Reviews* 112, 4347-4390.