



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

**ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA
TEMPERATURA EN LA RESPUESTA
FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE
NANNOCHLOROPSIS GADITANA BAJO
REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.**

Analysis of the influence of temperature on the photosynthetic response of *Nannochloropsis gaditana* cultures under continuous light regimes.

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

María José Resina Rueda

Tutoras: Cynthia Victoria González López, Celeste Elena Brindley Alías

Septiembre, curso 2019-2020

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Microalgas y sus fundamentos	6
1.1.1. Generalidades	6
1.1.2. Biotecnología de microalgas: aplicaciones	6
1.1.3. <i>Nannochloropsis gaditana</i>	7
1.2. Crecimiento microalgal y fotosíntesis	7
1.2.1. El proceso fotosintético	7
1.2.2. Tasa de crecimiento y tasa fotosintética	9
1.3. Fotobiorreactores	10
1.3.1. Generalidades y tipos de fotobiorreactores	10
1.3.2. Factores que afectan al crecimiento de las microalgas	10
1.3.3. Diseño de fotobiorreactores	13
2. OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL	18
2.1. Objetivo	18
2.2. Plan experimental	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Microorganismo, medio de cultivo y sistema de cultivo	19
3.1.1. Microalga	19
3.1.2. Medio de cultivo	19
3.1.3. Sistema de cultivo	20
3.2. Metodología de los ensayos	21
3.3. Medida de la concentración de biomasa	24
3.4. Polinomios de calibrado y determinación de las velocidades de fotosíntesis y respiración	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Medida de la respuesta fotosintética frente a la irradiancia a diferentes temperaturas: <i>curvas P-I</i>	24
4.2. Modelado de las <i>curvas P-I</i>	27
4.3. Modelado de la dependencia de la respuesta fotosintética con la temperatura	38

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

5. CONCLUSIONES	49
6. BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	56

RESUMEN

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que se caracterizan por ser fuente de biomoléculas y metabolitos de elevada importancia biológica y presentar unas características metabólicas novedosas. Por ello, su estudio por parte de la biotecnología microalgal va en aumento y adquiere cada día más relevancia. Los modelos de crecimiento y de fotosíntesis se utilizan para estudiar el crecimiento en masa de las microalgas en función de las variables características del régimen de luz, con objeto de diseñar fotobiorreactores más adecuados para maximizar la productividad y disminuir el costo del proceso. La presente investigación se centra en estudiar la influencia de la irradiancia y de la temperatura en la velocidad fotosintética de cultivos diluidos de *Nannochloropsis gaditana* en regímenes de luz continua. Para ello, se han realizado una serie de experimentos a cuatro temperaturas (15, 20, 25 y 28 °C) y valores de irradiancia incidente entre 45 y 3105 $\mu\text{mol fotones}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, midiendo la tasa fotosintética mediante la evolución del oxígeno disuelto en el medio de cultivo, y se han obtenido *curvas P-I* que muestran la relación existente entre el crecimiento microalgal y la irradiancia incidente a cada temperatura ensayada. El análisis de las *curvas P-I* se ha realizado mediante el ajuste de los datos experimentales a dos modelos de fotosíntesis, un modelo sigmoideo de tipo ecuación de Hill de tres parámetros y el modelo mecanístico propuesto por Camacho Rubio *et al.* (2003), y a un modelo de crecimiento, el propuesto por Molina *et al.* (1994). Los valores de los parámetros de estos modelos, que muestran un elevado grado de ajuste, se encuentran dentro de los rangos de valores habituales publicados en bibliografía para los mismos. Los parámetros P_m y μ_{max} , que representan la velocidad de fotosíntesis y de crecimiento máximas, respectivamente, presentan valores máximos a la temperatura de 20 °C, mientras que los parámetros I_k y α , que representan la afinidad de la microalga por la luz, presentan valores mínimos a la temperatura de 25 °C, por lo que se estima que el intervalo de temperaturas óptimo para el cultivo de esta microalga se encuentra entre 20 y 25 °C. Para estudiar la dependencia de la respuesta fotosintética con la temperatura se han realizado regresiones no lineales de los parámetros P_m y μ_{max} , obtenidos con los modelos anteriores, a las ecuaciones de tipo Arrhenius propuestas por Topiwala y Sinclair (1971) y Esener *et al.* (1983). Los parámetros P_m y μ_{max} han demostrado presentar una clara influencia de la temperatura y su ajuste al modelo de Topiwala y Sinclair ha sido satisfactorio, aunque se recomienda recopilar un mayor set de *curvas P-I* y a un rango de temperaturas más amplio con el fin de obtener resultados con mayor significación estadística.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microscopic organisms characterized for being a source of biomolecules and metabolites of high biological importance and novel metabolic characteristics. Therefore, the study of microalgae by microalgal biotechnology is growing rapidly and becoming each day more relevant. Growth and photosynthesis models are used for studying the mass growth of microalgae as a function of the light regime characteristic variables, in order to design photobioreactors that can maximize productivity and reduce the cost of the process. This research focuses on studying the influence of irradiance and temperature on the photosynthetic rate of dilute cultures of *Nannochloropsis gaditana* under continuous light. These series of experiments have been conducted at four different temperatures (15, 20, 25 y 28 °C) and irradiance values ranging from 45 to 3105 $\mu\text{mol photons}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, by measuring the photosynthetic rate based on the evolution of dissolved oxygen in the culture medium, and *P-I curves* have been obtained showing the relationship between microalgal growth and incident irradiance at each of the temperatures tested. The analysis of the *P-I curves* was done by fitting the experimental data to two photosynthesis models, a sigmoidal model with a Hill-type function of three parameters and a mechanistic model proposed by Camacho Rubio *et al.* (2003), and to a growth model proposed by Molina *et al.* (1994). The values obtained for the parameters of the models, which all show fairly good fits, lie within the usual ranges described for these parameters in the literature. For the parameters P_m and μ_{max} , which represent the maximum values of the photosynthesis and growth rates, respectively, the maximum value was obtained at $T = 20$ °C, while for the parameters I_k y α , which represent the affinity of the microalgae for light, the minimum value was obtained at $T = 25$ °C, so for this microalga the optimum temperature interval is 20 to 25 °C. To study the dependence of the photosynthetic response with the temperature, nonlinear regressions of the parameters P_m and μ_{max} , obtained with the previous models, to the Arrhenius-type equations proposed by Topiwala and Sinclair (1971) and Esener *et al.* (1983) were performed. The results show that the parameters P_m and μ_{max} have a clear dependence on temperature and the fit of these data to the model by Topiwala and Sinclair is satisfactory, although collecting a larger set of *P-I curves* at a wider temperature range is recommended in order to obtain results that are statistically relevant.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microalgas y sus fundamentos

1.1.1. Generalidades

Las microalgas son organismos microscópicos unicelulares, típicamente fotosintéticos, procariotas o eucariotas, que constituyen un grupo polifilético. Presentan una gran diversidad taxonómica, y su ubicuidad permite que se encuentren ampliamente distribuidas en la biosfera, encontrándose mayoritariamente en ambientes acuáticos, pero también terrestres y extremos, y expuestas a un diverso abanico de condiciones ambientales (Mata *et al.*, 2010).

Las algas son algunos de los organismos de más rápido crecimiento en el planeta, con hasta el 90% de su peso compuesto de carbohidratos, proteínas y grasas. Además, también son ricas en otros compuestos de alto valor, como vitaminas, pigmentos y compuestos biológicamente activos (Olaizola, 2003; Richmond y Hu, 2013). Actualmente, con un número estimado de 30000 - 1000000 de especies, las microalgas representan un recurso natural prometedor al combinar numerosas ventajas como metabolismos de composición química variada, crecimiento rápido, alta eficiencia fotosintética, no competencia por tierras de cultivo y tolerancia a las aguas residuales durante el cultivo (Rumin *et al.*, 2020).

1.1.2. Biotecnología de microalgas: aplicaciones

El primer uso que se conoce de los organismos microalgales por humanos se remonta 2000 años en la región de China, donde se empleó la cianobacteria *Nostoc* para sobrevivir durante la hambruna (Jensen *et al.*, 2001). Sin embargo, la biotecnología de microalgas y su cultivo solo comenzó a desarrollarse a mediados del siglo pasado (Borowitzka, 1999). Se entiende por biotecnología de microalgas “toda aplicación tecnológica que emplee estos organismos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”. La alta diversidad que presentan las microalgas como grupo hace que estas tengan aplicación como fuente de moléculas de alto valor añadido y en diversas industrias, tales como la industria de la alimentación humana y animal, especialmente el ámbito de la acuicultura, nutrición, cosmética, farmacéutica, como combustibles, como fertilizantes en industrias agrícolas, y en biorremediación de ambientes, como en depuradoras de aguas residuales y capturando el carbono de los gases de combustión industriales u otros contaminantes en cualquier (Junior *et al.*, 2020; Kusmayadi *et al.*, 2020; Priyadarshani y Rath, 2012; Spolaore *et al.*, 2006).

Aunque actualmente solo unas pocas especies de microalgas, incluidas las cianobacterias, se emplean en cultivo masivo, el potencial de expansión es enorme, considerando los cientos de miles de especies y subespecies existentes, en las cuales un gran acervo genético ofrece un potencial significativo para muchos nuevos productores (Richmond y Hu, 2013). Los autores Pulz y Gross (2004) afirman que “la biotecnología de microalgas [...] puede verse como una puerta de entrada a una industria multimillonaria. Acaba de comenzarse a aprovechar el enorme recurso biológico y el potencial

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

fisiológico de las especies de microalgas”. El análisis bibliográfico llevado a cabo por Rumin *et al.* (2020) determinó que son seis los campos en que esta disciplina está aumentando considerablemente: la producción de biocombustibles, bioplásticos, biofertilizantes, nutracéuticos, farmacéuticos y cosméticos.

1.1.3. *Nannochloropsis gaditana*

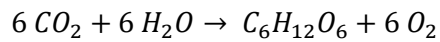
Las microalgas del género *Nannochloropsis* son eustigmatofitos marinos fotosintéticos de gran interés, especialmente para los sectores de la bioenergía y la acuicultura, debido a su capacidad para acumular eficientemente biomasa y lípidos para su utilización en combustibles de transporte renovables, piensos para la acuicultura y otros bioproductos útiles (Starkenburger *et al.*, 2014). Radakovits *et al.* (2012) sostienen que “*N. gaditana* tiene altas tasas de producción de biomasa fotoautotrófica y lipídica y puede crecer a altas densidades ($>10 \text{ gL}^{-1}$), al tiempo que tolera una amplia gama de condiciones con respecto al pH, temperatura y salinidad”. Tanto sus capacidades productoras como la resistencia que presenta a cambios en las condiciones ambientales hacen de esta microalga una de las más prometedoras en el campo de la biotecnología de microalgas.

1.2. Crecimiento microalgal y fotosíntesis

1.2.1. El proceso fotosintético

Aunque las microalgas pueden asumir muchos tipos de metabolismo, la mayoría de las microalgas empleadas con fines biotecnológicos, entre ellas la empleada en el desarrollo de los presentes ensayos, son de tipo fotoautótrofo. Estos organismos obtienen la energía que necesitan a través de la absorción de energía luminosa, para la reducción del CO_2 y la oxidación de sustratos (generalmente H_2O), con la liberación de O_2 . Este proceso es conocido como fotosíntesis.

La fotosíntesis es uno de los procesos biológicos que mayor importancia presenta. Mediante la liberación de oxígeno molecular a la atmósfera, los organismos fotosintéticos transformaron el planeta Tierra en el medio ambiente que es actualmente. La luz solar habría jugado un papel clave tanto en la aparición como en el desarrollo de la vida en el planeta. Es más, casi toda la energía que el ser humano ha venido consumiendo a lo largo de la mayor parte de su historia procede, en último término, de la radiación solar que los organismos fotosintéticos (en particular, las plantas y algas verdes) captan, transforman y almacenan en forma de material rico en energía química útil o biomasa (de la Rosa Acosta, 2003). En la fotosíntesis, la energía de la luz absorbida se convierte en energía química utilizable (NADPH y ATP reducidos) por las células para mantener su crecimiento y desarrollo. Las reacciones secundarias forman glucosa y otros compuestos reducidos del dióxido de carbono (Lam *et al.*, 1986). La fotólisis del agua se realiza mediante el concurso del pigmento clorofila, cuando se encuentra fotoexcitado. La fotosíntesis oxigénica, por tanto, se puede expresar como una reacción redox promovida por la energía de la luz, en la que el dióxido de carbono y el agua se convierten en carbohidratos y oxígeno. La reacción estequiométrica de la fotosíntesis es la siguiente:



Ecuación 1. Estequiometría de la fotosíntesis.

El proceso fotosintético ocurre en complejos enzimáticos inmersos en los tilacoides. En las cianobacterias, los tilacoides se encuentran libres en el citoplasma mientras que en otras algas están separados en membranas formando cloroplastos. Solo los eventos primarios de la fotosíntesis requieren luz como fuerza impulsora, mientras que las reacciones posteriores pueden tener lugar en ausencia de luz (Lam *et al.*, 1986).

1.2.1.1. Cadena de transporte de electrones. Fase luminosa

La primera etapa del proceso fotosintético es promovida por luz, hecho del que deriva su nombre: Fase luminosa. En primer lugar, la luz sería recolectada por un sistema de pigmentos que actúan como antenas y dirigen la energía absorbida hacia los centros de reacción, donde tienen lugar las reacciones fotoquímicas. El proceso fotosintético comienza cuando una molécula de clorofila *a* absorbe un fotón. Este pigmento se excita desde un estado fundamental estable S_0 a un estado excitado S_1 , haciendo su potencial redox más negativo y permitiendo entonces extraer electrones de una molécula de agua y cederlos a aceptores con un nivel energético superior, iniciando así la cadena de transporte de electrones. Este paso depende exclusivamente de la longitud de onda característica del fotón incidente (Carvalho *et al.*, 2011), es decir, el cambio fotoquímico inicial provoca un desequilibrio de carga eléctrica y una diferencia de potencial de concentración de protones entre ambos lados de la membrana. Finalmente, y debido a esta diferencia de potencial, se produce la fosforilación de ADP en ATP, mediada por una ATP sintasa de membrana, mediante el transporte de protones desde donde existe una concentración superior a una inferior. Además, también se produce poder reductor en forma de NADPH y ferredoxina reducida.

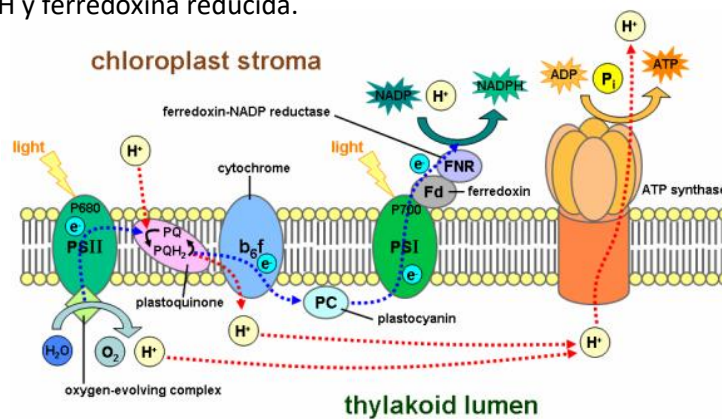


Figura 1. Cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis (Alonso *et al.*, 2020).

Lam *et al.* (1986) describieron el proceso fotosintético como un transcurso de dos etapas en la cadena de transporte de electrones. Se requiere la acción secuencial de dos sistemas fotoexcitables que fueron denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) (Hill y Bendall, 1960). Ambos fotosistemas tienen clorofilas como compuestos transductores. El primero en la cadena es el PSII, cuya clorofila es activada por luz de longitudes de onda inferiores a 677 nm, mientras que la clorofila del PSI es activada a 700 nm. Ambos fotosistemas se diferencian en que el primero está asociado con la evolución de

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO RÉGIMENES DE LUZ CONTINUA.

oxígeno y a un transporte de electrones no cíclico, mientras que el segundo transporta electrones, tanto de forma cíclica como no cíclica, y está asociado a la reducción de NADP^+ a NADPH . Este último también, mediante la fotofosforilación cíclica, produce ATP sin reducción neta de un aceptor de electrones o evolución de oxígeno. El complejo de citocromos *b6f*, anclado a la membrana, y dos transportadores móviles, la plastoquinona y la plastocianina, serán los encargados de suministrar los electrones desde el PSII, donde se obtienen de la rotura de una molécula de H_2O , hasta el PSI. El transporte de electrones además conlleva un bombeo de protones al interior del tilacoide, generando un gradiente electroquímico que, por acción de una ATPasa de membrana, genera energía química en forma de ATP (Lam *et al.*, 1986). En la *Figura 1* se muestra de forma conjunta la cadena de transporte de electrones, así como las moléculas que intervienen en ella y, esquemáticamente, las reacciones que tienen lugar en el transcurso de la misma.

1.2.1.2. Fase oscura de la fotosíntesis

La fase oscura de la fotosíntesis comprende una segunda etapa donde se obtienen compuestos reducidos de alto peso molecular (carbohidratos, lípidos, proteínas...) mediante el empleo de las moléculas obtenidas en la fase previa, como el poder reductor y el poder energético. Además, en esta etapa se produce la reducción asimilatoria de bioelementos, tales como (CH_2O) , NH_3 o H_2S entre otros (Lam *et al.*, 1986).

1.2.2. Tasa de crecimiento y tasa fotosintética

En el estudio de fotobiorreactores, se pueden utilizar diferentes parámetros para monitorear el crecimiento de un cultivo. Para evaluar los efectos del régimen de luz del cultivo se suelen emplear dos estrategias de seguimiento. La primera consiste en realizar una estimación de la respuesta celular midiendo la tasa de fotosíntesis. Para ello, se cuantifica la tasa de fijación de carbono monitoreando el CO_2 o bien siguiendo la evolución del O_2 como sustituto del CO_2 . Puesto que las microalgas consumen CO_2 para convertirlo en carbohidratos, liberando O_2 como subproducto, la evolución de estos gases en el medio de cultivo se puede emplear como indicador de la actividad fotosintética de las células (Hancke *et al.*, 2008a; Nedbal *et al.*, 1996; Terry, 1986; Vejrazka *et al.*, 2013; Vejrazka *et al.*, 2015). Sin embargo, la tasa de fijación de carbono no es una medida intrínseca y debe normalizarse mediante una cantidad de biomasa específica. La segunda estrategia se basa en medir parámetros que permiten evaluar los efectos a largo plazo del régimen de luz del cultivo. En este caso, el parámetro monitorizado puede ser la densidad óptica, el peso seco o el recuento celular, que posteriormente se utiliza para calcular la velocidad de crecimiento específica (Janssen *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2001; Wu y Merchuk, 2001). La tasa de crecimiento tiene en cuenta, además de la velocidad fotosintética, otros factores importantes que influyen en el crecimiento de la biomasa como son la fluido-dinámica en el reactor, la distribución de la luz en el mismo, la transferencia de materia y el grado de mezcla. Por otro lado, la tasa fotosintética depende solo de las condiciones de temperatura y del régimen de luz presentes en la cubeta o fotobiorreactor donde se realice la medición, así como del estado de aparato fotosintético de las microalgas (Brindley *et al.*, 2010).

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Las características implícitas de ambos métodos derivan en una serie de ventajas e inconvenientes: Por un lado, las medidas de la tasa de crecimiento serán más próximas a la realidad de los cultivos masivos en fotobiorreactores, ya que tienen en cuenta más variables que afectan al crecimiento. Sin embargo, estos experimentos tienen más inconvenientes para simular regímenes de luz precisos, ya que los cultivos suelen ser densos o insuficientemente diluidos, son largos, y no permiten estudiar los factores que afectan a las tasas de crecimiento de forma independiente. En contraposición, las mediciones de la tasa fotosintética son muy rápidas, lo cual permite programar un diseño experimental amplio con una precisión superior y trabajar en ausencia de esterilidad sin que los experimentos se vean afectados (Brindley *et al.*, 2010). La actividad fotosintética en sistemas acuáticos se podría estimar mediante el estudio de la cinética de fluorescencia del PSII, la asimilación de ^{14}C , o la evolución del O_2 disuelto producido por el cultivo, siendo este último el considerado más preciso debido a la baja solubilidad del oxígeno, lo que permite su fácil detección, y a la efectividad y rapidez de los métodos voltamperométricos (Colijn *et al.*, 1983; Brendel y Luther, 1995), y es el que será empleado en los presentes ensayos.

1.3. Fotobiorreactores

1.3.1. Generalidades y tipos de fotobiorreactores

La optimización del crecimiento de microorganismos fotosintéticos en reactores industriales es un proceso complejo al involucrar gran cantidad de variables interrelacionadas, tales como fluidodinámica, actividad fotosintética, distribución de irradiancias dentro del fotobiorreactor, etc., a lo que además se suman unas condiciones ambientales cambiantes, las características propias de cada microalga y del fotobiorreactor empleado, así como el uso final que se vaya a dar al producto o a la biomasa obtenidos. Estos factores han ralentizado el desarrollo de la biotecnología de microalgas. Los sistemas de producción de algas deben mejorar para ser más competitivos y económicamente factibles. La mejora de la productividad de las microalgas requiere una comprensión profunda de estos aspectos (Luo y Al-Dahhan, 2004; Spolaore *et al.*, 2006; Richmond, 2000; Mérida *et al.*, 2013). Existen dos diseños básicos para la producción de microalgas: los sistemas abiertos y cerrados, y además gran cantidad de subtipos con unas características óptimas en función de los factores anteriormente mencionados (Grobbelaar, 2000; Flores *et al.*, 2003; Mérida *et al.*, 2013).

1.3.2. Factores que afectan al crecimiento de las microalgas

Los factores que afectan al crecimiento microalgal son diversos. La luz suele ser el factor limitante tanto en el medio natural como en reactores industriales, aunque también tienen gran influencia la temperatura, la transferencia de masa entre la fase líquida y la gaseosa, la concentración celular del cultivo, el pH, la salinidad, la composición del medio de cultivo, el grado de mezcla, etc. (Flores *et al.*, 2003; Mérida *et al.*, 2013; Edding *et al.*, 2006; Richmond y Hu, 2013). En el presente Trabajo Fin de Grado nos centraremos en estudiar la influencia de la irradiancia y de la temperatura en el cultivo.

1.3.2.1. Disponibilidad de luz

En la actualidad, posiblemente el mayor cuello de botella en el desarrollo de la biotecnología microalgal es la utilización de la irradiancia incidente. De hecho, la luz supone en la gran mayoría de los casos el factor limitante de la productividad (Richmond, 2000). La irradiancia (I) se mide típicamente en $\text{mol fotonos} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ y se define como la magnitud utilizada para describir la potencia incidente por unidad de superficie de todo tipo de radiación electromagnética. La radiación solar o la radiación proveniente de cualquier fuente de luz está compuesta por un flujo de fotones que contienen una energía y masa asociadas. Los procesos fotobiológicos, concretamente, se desarrollan en el intervalo del espectro visible, recibiendo el nombre de *radiaciones fotosintéticamente activas* (PAR), que agrupa todos los fotones con una longitud de onda de entre 400 y 720 nm. Sin embargo, no toda la irradiancia incidente es aprovechada por las microalgas: se ha demostrado que estas solo absorben una fracción del flujo fotónico dependiendo de la concentración celular del cultivo, sus propiedades ópticas, la longitud de onda de la radiación incidente, etc. La luz debe ser proporcionada con la intensidad, duración y longitud de onda adecuadas para su eficaz aprovechamiento (Carvalho *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 1986).

En un cultivo, la densidad celular aumentará hasta que todos los fotones fotosintéticamente activos disponibles hayan sido absorbidos y, a partir de entonces, la concentración de biomasa aumentará a una velocidad constante hasta que se den condiciones de limitación de nutrientes o presencia de sustancias inhibitoras, que provocarán el descenso de la concentración microalgal como consecuencia de la detención del crecimiento y el comienzo de la respiración celular. Este fenómeno será explicado a nivel cinético en el apartado 1.3.2.1.1. *Curvas P-I* del presente documento. La interacción entre la luz y las microalgas es compleja y cambia a lo largo de la duración del cultivo. Al comienzo, la suspensión celular es translúcida y la luz penetra en todo el fotobiorreactor, suministrando energía a todas las células. A medida que el cultivo crece las células absorben más luz, lo que da como resultado la formación de un gradiente de luz en el cultivo cada vez más denso. El sombreado mutuo de las células acorta la profundidad de penetración de la luz dentro del cultivo y, como resultado, las zonas más próximas a la superficie iluminada reciben más luz mientras que las zonas hacia el interior del cultivo reciben cada vez menos luz. Este perfil de luz creado es heterogéneo y afecta al crecimiento de las células. El movimiento de las células en el cultivo debido a la agitación da lugar a que éstas estén expuestas a un perfil de irradiancias fluctuante. Dichos patrones de luz fluctuantes se denominan comúnmente ciclos de luz-oscuridad y se describen mediante tres parámetros fundamentales: la irradiancia incidente, la frecuencia del ciclo y la proporción de período iluminado a período total del ciclo.

Se han descrito cuatro tipos de respuestas del cultivo microalgal a la interacción con luz: fotolimitación, fotoinhibición, fotooxidación y fotorrespiración. La fotoinhibición del crecimiento celular típicamente se produce por acumulación de O_2 en el cultivo o por una irradiancia alta que daña el aparato fotosintético de las microalgas, provocando una disminución en el crecimiento. Si estos factores provocan daños permanentes, se produce el fenómeno de fotooxidación. Cuando la irradiancia incidente es inferior a la irradiancia de saturación decimos que el cultivo se encuentra fotolimitado, y

el fotobiorreactor no será eficiente. Finalmente, la fotorrespiración es un proceso análogo a la fijación de carbono que compite con el mismo cuando el ratio O_2/CO_2 es elevado, provocando una disminución de la tasa fotosintética.

1.3.2.1.1. Curvas P-I

Las *curvas P-I (photosynthesis-irradiance)* son representaciones gráficas donde se establece una relación entre la respuesta fotosintética de las células expuestas a luz continua (determinada, en este caso, por la producción de O_2 medido por sensor, en $\text{mol } O_2 \cdot (\text{g biomasa} \cdot \text{s})^{-1}$) y la intensidad de la luz (I , en $\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$) cuando se supone que la luz es el único factor limitante. Se trata de una relación con forma normalmente hiperbólica. En los experimentos realizados en el desarrollo del presente TFG se han obtenido *curvas P-I* a partir de las medidas de concentración de oxígeno disuelto (DO_2) del cultivo, calculando la velocidad de fotosíntesis o tasa fotosintética, que es directamente proporcional a la productividad de la biomasa, como se desprende de la estequiometría de las reacciones fotosintéticas.

La pendiente de las medidas de DO_2 (cuyas unidades son $\text{mol } O_2 \cdot \text{m}^{-3}$) frente al tiempo (t , en s) proporciona una medida de acumulación volumétrica de oxígeno (RO_2 , $\text{mol } O_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$). Conociendo la concentración del cultivo, C_b ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$), es posible calcular la velocidad de fotosíntesis o P neta y bruta ($\text{mol } O_2 \cdot (\text{g biomasa} \cdot \text{s})^{-1}$) (Jassby y Platt, 1976; Platt y Jassby, 1976). Las ecuaciones para la obtención de RO_2 y P son las siguientes:

$$DO_2 = (DO_2)_{t=0} + RO_2 \cdot t$$

Ecuación 2.

$$P \text{ neta} = \frac{RO_2}{C_b}$$

Ecuación 3.

$$P \text{ bruta} = \frac{RO_2 - (RO_2)_{I_0=0}}{C_b}$$

Ecuación 4.

La representación gráfica de la *curva P-I* tiene la forma que observamos en la *Figura 2*. Para valores de irradiancia bajos, la velocidad de fotosíntesis es nula. I_c es el punto de compensación, la irradiancia a la cual la velocidad de fotosíntesis es igual a la velocidad de respiración, por lo tanto el crecimiento neto es nulo. Si aumenta la irradiancia la velocidad de fotosíntesis se acelera hasta alcanzar la irradiancia de saturación, donde el crecimiento microalgal se mantiene constante a niveles máximos (P_{max}). En este punto, aumentar la intensidad de la luz puede resultar contraproducente pues puede provocar fotoinhibición en el cultivo (Richmond, 2000).

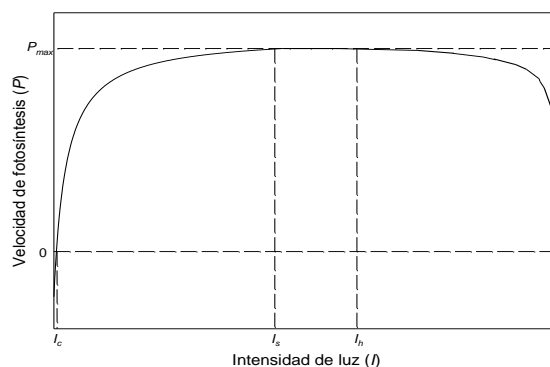


Figura 2. Curva P-I.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

La irradiancia incidente en los ensayos es máxima y constante para todas las células del cultivo debido a que este está muy diluido, evitando un sombreado mutuo, que provocaría una atenuación de luz en las zonas del fotobiorreactor alejadas de la superficie iluminada (Tamiya, 1957). La máxima productividad del cultivo se consigue a la irradiancia de saturación, a la temperatura óptima, y habiendo suplido los requerimientos nutricionales del cultivo.

1.3.2.2. Temperatura

La temperatura es el factor limitante más importante, después de la luz, para el cultivo de algas. Los efectos de la temperatura para muchas especies de microalgas en el laboratorio están bien documentados, pero la magnitud de los efectos de la temperatura en la producción anual de biomasa en el exterior aún no está suficientemente reconocida. Muchas microalgas pueden tolerar fácilmente temperaturas de hasta 15 °C más bajas que su temperatura óptima, pero exceder la temperatura óptima en solo 2-4 °C puede resultar en la pérdida total del cultivo (Mata *et al.*, 2010). En el caso de *Nannochloropsis gaditana*, la temperatura óptima ronda los 25 °C (Rodríguez, 2014).

1.3.3. Diseño de fotobiorreactores

El diseño óptimo de los fotobiorreactores, así como el modo de operación y el control de los parámetros ambientales, son imprescindibles para el éxito del cultivo masivo de microalgas. El diseño óptimo de un reactor para microalgas requiere un conocimiento preciso de los factores que influyen (y cómo lo hacen) sobre estos organismos. Sin embargo, la bibliografía y metodología existentes es ambigua y cualquier parámetro podría afectar al cultivo de una forma significativa (Brindley *et al.*, 2010; Camacho-Rodríguez *et al.*, 2020).

1.3.3.1. Modelos cinéticos

Los modelos cinéticos son modelos matemáticos que permiten relacionar variables o parámetros, medibles o no, relacionados con la velocidad de las reacciones, para estudiar la influencia que tienen entre sí. Son especialmente útiles en diversos ámbitos, en el que nos concierne el diseño de reactores industriales, con el objetivo de maximizar la productividad. Distinguiremos entre modelos de crecimiento, de fotosíntesis, y aquellos que estudian la influencia de la temperatura en la velocidad de fotosíntesis o de crecimiento.

1.3.3.1.1. Modelos de crecimiento

La cinética del crecimiento de microalgas en reactores depende de una gran cantidad de variables que interaccionan con el proceso fotosintético, tales como la fluido-dinámica, distribuciones de irradiancia en el reactor, etc., que se tienen en cuenta en este tipo de modelos. Sin embargo, los experimentos necesarios para medir velocidades de crecimiento son más complejos y dificultosos ya que requieren más tiempo y no son capaces de explicar fenómenos en función de variables independientes (Brindley *et al.*, 2010). En estos modelos se estudia el parámetro μ o velocidad específica de crecimiento, que se

halla a partir de la concentración de biomasa (C_b) del cultivo. Este parámetro está controlado por la irradiancia media incidente y aumenta de forma proporcional a la misma hasta alcanzar un valor de máximo en su crecimiento, μ_{max} , a partir del cual un aumento en la intensidad de luz que recibe el cultivo no produciría una productividad de biomasa superior. Son varios los modelos cinéticos descritos que relacionan la velocidad específica de crecimiento con la irradiancia. Algunos ejemplos son las Ecuaciones 5-8 (Tamiya *et al.*, 1953; Steele, 1977; Bannister, 1979; Aiba, 1982; Molina *et al.*, 1994).

$$\mu = \frac{\alpha * \mu_{max} * I}{\mu_{max} + \alpha * I}$$

Ecuación 5. Modelo de Tamiya *et al.* (1953).

$$\mu = \frac{\mu_{max} * I}{I_{max}} * e^{(1 - \frac{I}{I_{max}})}$$

Ecuación 6. Modelo de Steele (1977).

$$\mu = \frac{\mu_{max} * I}{(K_i^m + I^m)^{\frac{1}{m}}}$$

Ecuación 7. Modelo de Bannister (1979).

$$P = \frac{\mu_{max} * I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_i}}$$

Ecuación 8. Modelo de Aiba (1982).

En el presente TFG se realizará un ajuste de los datos al modelo de Molina *et al.* (1994), de carácter sigmoideo, al que denominaremos modelo "Molina". Este modelo de semisaturación tiene la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\mu_{max} * I^n}{I_k^n + I^n}$$

Ecuación 9. Modelo "Molina".

Donde μ se corresponde con la velocidad específica de crecimiento, μ_{max} es la velocidad específica de crecimiento máxima, I_k es la irradiancia que hace $\mu = \mu_m / 2$. Molina *et al.* (1994) modificaron el modelo hiperbólico de tipo Monod mediante un exponente, n , similar al empleado por Moser para modificar el modelo de Monod en cultivos con limitación de nutrientes, y análogo al "parámetro de forma" de Bannister (Ecuación 7) que describe la brusquedad en la transición desde regiones poco iluminadas a regiones con una irradiancia muy alta. La intensidad de fotosíntesis se puede relacionar con la velocidad específica de crecimiento mediante la estequiometría de la reacción de fotosíntesis (Ecuación 1).

1.3.3.1.2. Modelos de fotosíntesis: Estáticos y dinámicos

El diseño de fotobiorreactores para la producción de microalgas se aborda frecuentemente empleando modelos de crecimiento de limitación por luz o modelos de fotosíntesis. La limitación por luz no es una hipótesis, sino que es una realidad experimental, y la intensidad de la respuesta fotosintética se correlaciona con la disponibilidad de luz. Normalmente, no se puede aumentar la irradiancia promedio (I_{av}) por encima de $2500 \mu\text{mol foton}\cdot(\text{m}^2\text{s})^{-1}$, como consecuencia del límite impuesto por la naturaleza de la radiación solar, fenómenos de fotoinhibición en el cultivo, etc. Consecuentemente, los modelos

cinéticos planteados en el diseño de fotobiorreactores tienen en cuenta la irradiancia incidente como el factor limitante del proceso de crecimiento.

Los modelos que relacionan la velocidad de fotosíntesis con la irradiancia pueden ser de dos tipos: estáticos o dinámicos. Los modelos estáticos se basan en el ajuste de la *curva P-I* de forma empírica o semiempírica. Se trata de modelos sencillos que son comúnmente empleados por su simpleza y que, aunque presentan un ajuste correcto, no tienen en cuenta las respuestas fotoadaptativas de las microalgas, y sus parámetros son difíciles de relacionar con los mecanismos de la fotosíntesis. En ellos se tiene en cuenta la irradiancia promedio en base al volumen del cultivo, sin tener en cuenta la naturaleza dinámica de la luz o fenómenos como la mencionada fotoadaptación, la inactivación del aparato fotosintético por fotoinhibición, etc. (Gaviria Zapata, 2006; Perner-Nochta y Posten, 2007). Los modelos estáticos, por tanto, aunque útiles, carecen de generalidad. En respuesta a estas limitaciones diversos autores (Eilers y Peeters, 1988; Zonneveld, 1998; Camacho Rubio *et al.*, 2003; Luo y Al-Dahhan, 2004) han desarrollado modelos dinámicos más realistas. Estos modelos buscan establecer una relación no solo experimental sino fisiológica entre la velocidad de fotosíntesis y la irradiancia, es decir, consideran los distintos mecanismos fotosintéticos del cultivo en el modelo cinético. Incluyen al menos una etapa de captura de energía, consecuencia de la absorción de un fotón, y otra etapa de consumo metabólico, empleando ecuaciones diferenciales que modelan cada etapa, además de etapas adicionales en las que se tienen en cuenta respuestas adaptativas del cultivo a la luz. Estos modelos, sin embargo, son difíciles de implementar al necesitar información sobre los movimientos celulares o las series temporales de irradiancia, como frecuencias del ciclo luz-oscuridad que debe experimentar el cultivo que, a día de hoy, no se han descrito con la claridad requerida (Brindley *et al.*, 2010; Amaya Silva, 2019). En el presente documento emplearemos un modelo de fotosíntesis estático con función sigmoide de semisaturación, que responde a la ecuación de Hill de 3 parámetros y que será denominado abreviadamente modelo "sigmoideo Hill 3-p":

$$P = \frac{P_m * I^n}{I_k^n + I^n}$$

Ecuación 10. Modelo "sigmoideo Hill 3-p".

En esta ecuación, P corresponde con la velocidad de fotosíntesis en cada punto, P_m es la velocidad de fotosíntesis máxima, I_k es la irradiancia que hace $P = P_m / 2$, y n es un parámetro variable que define la forma de la curva.

Los modelos dinámicos típicamente emplean el concepto *Photosynthetic Factory*, o fábrica fotosintética, que asume dos estados (abierto y cerrado) o tres, si se tiene en cuenta el fenómeno de fotoinhibición (estado inhibido), de forma que el paso de un estado a otro representa las distintas reacciones enzimáticas que se dan en cada caso (reacciones de fase lumínica, fase oscura e inhibición). Estos modelos, aunque complejos, resultan de interés al tener en cuenta la fotoinhibición. Uno de los principales modelos propuestos que desglosa el proceso fotosintético corresponde al modelo de Camacho Rubio *et al.* (2003), un modelo mecanístico que diferencia dos etapas principales: la captura del fotón y las etapas de consumo metabólico. Este modelo presenta como ventajas que incluye respuestas fotoadaptativas, la fotoinhibición y el efecto de la luz intermitente. En el desarrollo del

presente documento nos referiremos a él como “Camacho-Rubio LC”, ya que trabajaremos con la ecuación que proponen los autores para la modelización de los datos experimentales habiendo trabajado con luz continua.

$$\frac{P}{P_m} = \frac{I}{2\alpha} * \left[\left(1 + \kappa + \frac{\alpha}{I} \right) - \sqrt{\left(1 - \kappa - \frac{\alpha}{I} \right)^2 + 4\kappa} \right]$$

Ecuación 11. Ecuación de productividad fotosintética bajo luz continua del modelo de Camacho Rubio et al., (2003).

En este caso, las variables P e I y el parámetro P_m son análogos a los del modelo sigmoideo Hill 3-p anterior (Ecuación 10), pero aquí se consideran además los parámetros α , similar al parámetro I_k del anterior modelo, y κ , un factor de forma que tiene relación con las reacciones enzimáticas de consumo de energía. Este modelo responde de forma elíptica e hiperbólica y se considera más correcto que el anterior para el diseño de fotobiorreactores al tener, en general, un mejor ajuste y tener en cuenta más aspectos desde un punto de vista fundamental.

1.3.3.1.3. Modelo cinético para la temperatura: Ecuación de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius es un modelo matemático que se utiliza universalmente para expresar la dependencia de una constante cinética de velocidad, en este caso la velocidad de fotosíntesis y la velocidad de crecimiento, con respecto a la temperatura. La ecuación de Arrhenius tiene la siguiente expresión:

$$k = A * e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Ecuación 12. Ecuación de Arrhenius.

donde k es la constante cinética de velocidad dependiente de la temperatura (T , K), E_a es la energía de activación de la reacción correspondiente, expresada en $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$, R es la constante universal de los gases, expresada en $\text{J}\cdot(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$, y A es el factor pre-exponencial o factor de frecuencia. El empleo del modelo de *Arrhenius* para estudiar la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de microorganismos fue introducido por Topiwala y Sinclair (1971) para la bacteria *Aerobacter aerogenes*, actualmente conocida como *Enterobacter aerogenes*. Se trata de un modelo de tipo Arrhenius que incluye dos términos: un primer término de signo positivo, donde se incluyen los parámetros que activan el proceso de velocidad de crecimiento específica o lo hacen favorable, y un segundo de signo negativo, donde estarían implícitos los parámetros que perjudican o hacen desfavorable el crecimiento del microorganismo:

$$\mu_{max} = A_1 * e^{\left(\frac{-E_{a1}}{RT}\right)} - A_2 * e^{\left(\frac{-E_{a2}}{RT}\right)}$$

Ecuación 13. Ecuación del modelo de tipo Arrhenius propuesta por Topiwala y Sinclair (1971).

donde A_1 y A_2 son características constantes relacionadas con la formación de sustancias activas que conducen a procesos favorables y desfavorables respectivamente, y E_{a1} y E_{a2} son las energías de activación para cada uno de éstos.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Franks *et al.* (1980) fueron de los primeros autores en describir la influencia de la temperatura en un cultivo a nivel cinético para *Streptococcus cremoris* HP y en proponer un modelo mecánico de crecimiento. En la *Figura 3* podemos observar la dependencia obtenida entre, en este caso, la velocidad específica de crecimiento y la temperatura. Estos mismos autores realizaron una distinción entre cuatro regiones en función del comportamiento que tomen los distintos parámetros. En la *Figura 3* la región I es denominada región de Arrhenius, la región II es la región de sub-Arrhenius, la región III es la súper-óptima y la región IV es la región súper-máxima.

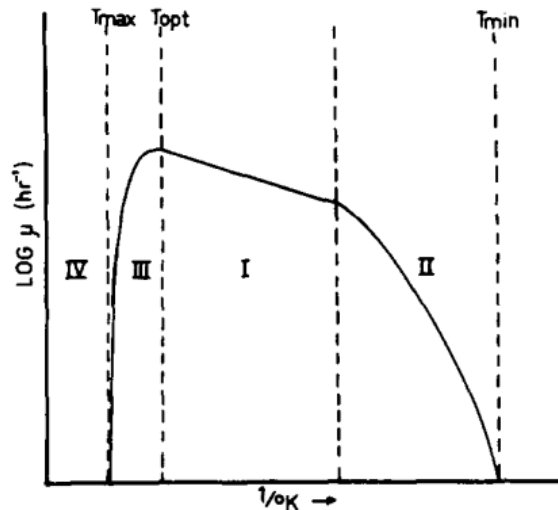


Figura 3. Dependencia entre $\log \mu$ y T^{-1} (Franks *et al.*, 1980).

Otro modelo derivado a partir de la ecuación de Arrhenius fue publicado por Esener *et al.* (1983), cuya expresión es la siguiente:

$$\mu_{max} = \frac{A' * e^{(-\Delta H_1^*/RT)}}{1 + K * e^{(-\Delta H_2/RT)}}$$

Ecuación 14. Ecuación tipo Arrhenius propuesta por Esener *et al.* (1983).

siendo μ_{max} la velocidad específica de crecimiento máxima, A' una constante cinética del modelo, ΔH_1^* la entalpía de activación para la reacción limitante del crecimiento ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R la constante de los gases ($\text{kJ}\cdot(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$), T la temperatura absoluta (K), K es la constante de equilibrio para la reacción de inactivación enzimática y ΔH_2 el incremento de entalpía para la reacción de inactivación enzimática ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Los modelos de temperatura basados en la expresión de Arrhenius también se han aplicado con éxito en los cultivos de microalgas (Sánchez *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015; García-Cubero *et al.*, 2017).

2. OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL

2.1. Objetivo

La presente investigación tiene como principal objetivo estudiar la influencia de la temperatura y de la intensidad de luz en la velocidad de fotosíntesis de *Nannochloropsis gaditana* en ensayos empleando luz continua. En cada ensayo tanto la concentración de biomasa como la intensidad de luz se fijan de forma que el régimen de luz esté bien definido; así mismo, la temperatura está controlada. Este estudio tendría utilidad en diversos ámbitos científicos, aunque en este marco de trabajo destacaría la optimización del diseño de fotobiorreactores para permitir una mayor productividad en masa de las microalgas.

Las fluctuaciones de temperatura a las que estaría sometido un cultivo por su localización, cambios meteorológicos, e incluso los cambios diurnos-nocturnos son amplios y, por tanto, susceptibles de generar cambios abruptos en el crecimiento de las microalgas y en la productividad del fotobiorreactor. Se manifiesta, de esta manera, la necesidad de estudiar el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano, en este caso empleando una medida indirecta que permite acortar significativamente la duración de los experimentos; la velocidad de fotosíntesis. La temperatura afecta en gran medida al crecimiento de cualquier ser vivo (Schügerl y Bellgardt, 2000), incluidos los cultivos microalgales, por ejemplo, estudios realizados por Sánchez et. al. (2008) y García-Cubero et al. (2017) muestran la relación de dependencia entre la productividad de biomasa y la temperatura en cultivos continuos de *Scenedesmus almeriensis* y *Scenedesmus vacuolatus*, respectivamente.

La investigación recogida en la presente memoria fue realizada en las instalaciones de la Universidad de Almería y se enmarca en una línea de trabajo que desarrolla el Grupo de Investigación “Desalación y Fotosíntesis” del Departamento de Ingeniería Química de esta misma universidad.

2.2. Plan experimental

En cuanto al plan experimental desarrollado, este consiste en un total de 40 ensayos cortos e independientes de determinación de la velocidad de fotosíntesis. Los 40 ensayos completan cuatro series experimentales que corresponden a las temperaturas de 15, 20, 25 y 28 °C. Para cada temperatura se ensayaron 10 intensidades de luz en el rango de 45 a 3105 $\mu\text{mol fotones}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$.

El método empleado para medir la velocidad de fotosíntesis se basa en el seguimiento de la evolución del oxígeno disuelto en fase líquida (Brindley et al., 2010) y consiste en la transferencia de alícuotas desde un cultivo en un fotobiorreactor a un tanque donde se realizan ensayos en los que se mide la respuesta fotosintética de las células a un régimen de luz bien definido, empleando concentraciones constantes, y solo los valores de irradiancia y/o temperatura serán diferentes en cada ensayo. Con las medidas de O_2 disuelto posteriormente se determina la velocidad de fotosíntesis para construir las curvas *P-I* (Producción bruta de O_2 (o velocidad de fotosíntesis bruta) vs. Irradiancia) a cada temperatura. Ajustar los datos a un modelo de fotosíntesis o a un modelo de crecimiento será útil para

la extrapolación del comportamiento de este sistema a otras condiciones de luz diferentes a las ensayadas. Además, se realizará el ajuste de los datos de velocidad de fotosíntesis frente a la temperatura mediante el empleo de la ecuación de Arrhenius.

Finalmente, se realizará una comparación con datos bibliográficos de velocidades de fotosíntesis en ensayos realizados a diferentes temperaturas, ya sea en cultivos muy diluidos (como es el caso) o densos (donde existe atenuación de la luz por sombreo mutuo de las células). Por otro lado, se estimará la velocidad específica de crecimiento para compararla con datos de cultivos masivos y diluidos en fotobiorreactores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismo, medio de cultivo y sistema de cultivo

3.1.1. Microalga

En la presente investigación se ha empleado la microalga *Nannochloropsis gaditana* Lubián CCMP 527, una microalga de clase *Eustigmatophyceae* aislada de la Bahía de Cádiz. Como describe Lubián (1982), esta *Nannochloropsis*, inicialmente conocida como cepa B-3, se caracteriza por ser bastante robusta y tener una composición interesante para múltiples aplicaciones (Ledda *et al.*, 2015; Sepúlveda *et al.*, 2015; Simionato *et al.*, 2011), lo que la hace una gran candidata para realizar estos ensayos. Además, ha quedado demostrado que tolera un amplio rango de salinidades y que la intensidad saturante de luz en su caso es bastante baja en comparación con otras microalgas. Respecto a otros microorganismos del género *Nannochloropsis*, *N. gaditana* se diferencia en que, sometida a unas mismas condiciones, su morfología varía y además es capaz de producir α -caroteno, además del β -caroteno que ya producen también *N. oculata* y *N. salina* (Lubián, 1982).

3.1.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado es el medio comercial ALGAL (Bionovo, Santiago de Compostela, España) modificado. Se trata de un medio de cultivo salino cuya base en macronutrientes son nitrato de potasio (KNO_3) y fosfato monosódico (NaH_2PO_4), así como diversos micronutrientes, cuyas concentraciones están representadas en la tabla inferior. Para su preparación se ha empleado agua de mar sintética, preparada siguiendo la formulación propuesta por Kester *et al.* (1967).

Composición Macronutrientes	g·L⁻¹
KNO_3	100.7813
NaH_2PO_4	6.7188
Composición Micronutrientes	g·L⁻¹
Citrato férrico	2.6018
Molibdato sodico	0.2874
Cloruro de manganeso	0.2106
Cloruro de zinc	0.1561

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Cloruro de cobalto	0.0248
Sulfato de cobre	0.0372
EDTA	2.3540
Tiamina	0.5204
Biotina (2%)	0.3370
Cianocobalamina (1%)	0.4708

Tabla 1. Composición del medio de cultivo ALGAL modificado.

Con el fin de evitar la precipitación de los nutrientes del medio, se preparan los macronutrientes y micronutrientes por separado en agua destilada, de forma que pueden ser almacenados en cámara fría durante meses en disolución stock. Siguiendo esta receta, para preparar el medio de cultivo se tomarían 8 mL de la disolución de macronutrientes y 4 mL de la disolución de micronutrientes en un volumen final de 1 L empleando agua de mar.

Es importante en medios de cultivo salinos tener en cuenta que la salinidad afectará a la solubilidad del oxígeno en la fase líquida, por lo que será necesario determinar un factor de corrección para tenerlo en cuenta durante el tratamiento de datos. Además, será necesario corregir la solubilidad de oxígeno para en cuenta el efecto de la temperatura.

La conductividad eléctrica de cualquier medio acuoso está directamente relacionada con la concentración de sales disueltas en el mismo. La relación existente entre ambos a una temperatura de 25 °C se ajusta aproximadamente a la siguiente conversión:

$$TDS (ppm) = 0.64 \cdot CE \left(\frac{\mu S}{cm} \right) = 640 \cdot CE \left(\frac{dS}{m} \right)$$

Ecuación 15. Relación existente entre la concentración de sólidos totales y la conductividad eléctrica.

La conductividad eléctrica del medio de cultivo se midió con un conductímetro CRISON EC-Metro BASIC 30, y con la Ecuación 15 se determinó que la salinidad del medio era aproximadamente de 35 g·L⁻¹.

En el cálculo del factor de corrección de solubilidad de oxígeno en agua se ha empleado el programa online DOTABLES, de USGS (DOTABLES, 2020), que genera valores de solubilidad de oxígeno disuelto y tablas de factores de corrección teniendo en cuenta la salinidad, la temperatura y la presión. Los valores introducidos son: presión barométrica (760 mm Hg) y salinidad (35 g·L⁻¹), siendo el valor de temperatura el único parámetro variable: 15, 20, 25 y 28 °C. Los valores corregidos de solubilidad de O₂ en mg·L⁻¹ proporcionados por el programa DOTABLES se presentan en el Anexo 1.

3.1.3. Sistema de cultivo

Previamente a la realización de los ensayos para determinar la velocidad de fotosíntesis, la biomasa ha sido cultivada en un fotobiorreactor fabricado en vidrio PYREX de tipo columna de burbujeo de 0.08 m de diámetro interno y 0.4 m de altura y con un volumen de operación de 1.8 L. En la parte superior se sitúa un cabezal con tres orificios cuyas funciones son la inyección de medio, introducción de un electrodo combinado de pH y sonda de medición de oxígeno disuelto, y rebosadero. Por otro lado, es en la zona inferior donde se sitúa una abertura que permite la entrada de gases mediante un

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

burbujeador y un orificio para la toma de muestra. En este reactor, la microalga se cultiva empleando el mismo medio ALGAL preparado sobre agua de mar sintética, y recibe exposición a luz continua procedente de 3 lámparas fluorescentes de bajo consumo Phillips TLD W/54 durante 12 horas diarias, con una intensidad máxima de $1000 \mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$. El fotobiorreactor opera en modo continuo y dispone de control de pH y de temperatura. El pH se controla mediante un sistema automático que inyecta CO_2 a demanda cuando el pH supera la consigna impuesta de 8.0. La temperatura del cultivo se fija a la misma que la de la *serie P-I* correspondiente, alcanzándose a cada temperatura el estado estacionario para el cultivo del fotobiorreactor antes de comenzar los ensayos de la serie *P-I* correspondiente. La concentración de la biomasa en el estado estacionario variaba en función de la temperatura, oscilando entre aproximadamente $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. La velocidad de dilución era de 0.5 d^{-1} y el caudal de aire era de 0.5 v/v/min en todos los casos.

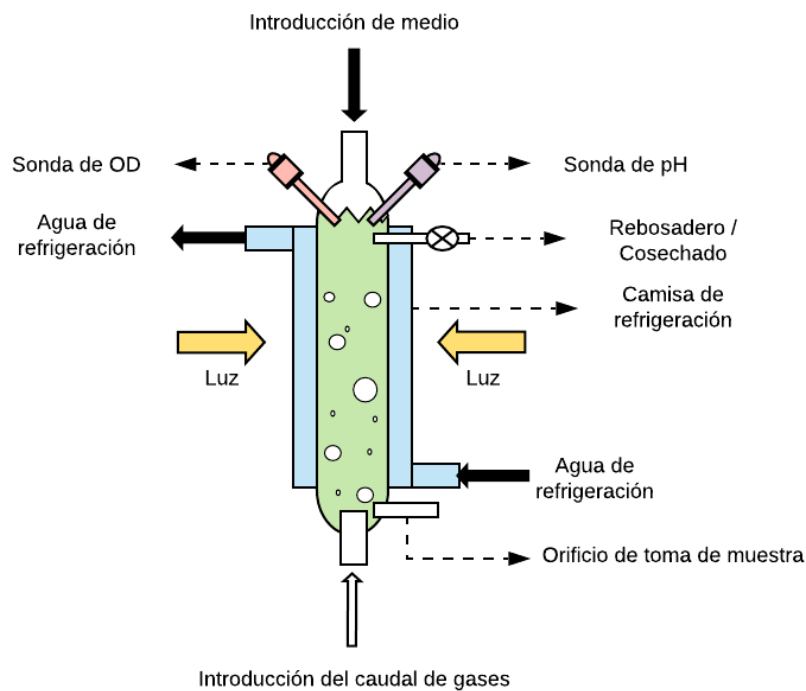


Figura 4. Esquema general del fotobiorreactor empleado en el cultivo de *Nannochloropsis* realizado con el programa en línea Lucidchart.

3.2. Metodología de los ensayos

El estudio de la tasa fotosintética de *Nannochloropsis gaditana* implicaría el traspaso de una pequeña fracción de la biomasa procedente del cultivo en estado estacionario del fotobiorreactor a otro dispositivo con la configuración adecuada para realizar la medición de la tasa fotosintética y que permita modificar y controlar parámetros como la irradiancia o la temperatura.

A modo de resumen, los ensayos consisten en someter a la microalga *Nannochloropsis gaditana* a unas determinadas condiciones de iluminación, empleando luz continua, y temperatura a lo largo de cada

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

ensayo, con el fin de medir la evolución de oxígeno disuelto durante los 20 minutos que dura cada ensayo. Los datos obtenidos permiten deducir la velocidad específica de fotosíntesis siguiendo el método descrito por Brindley *et al.* (2010).

Cada ensayo se lleva a cabo en una cámara con las siguientes dimensiones: 0.02 m de anchura, 0.1 m de altura y 0.1 m de longitud. Esta cámara está provista de una tapadera de caucho con orificios para insertar distintos accesorios: 1) un embudo para introducir el cultivo y el medio fresco, 2) un sensor de oxígeno disuelto amperométrico (6050, Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain), y 3) un agitador de varilla (RW11 Schott), que opera a 1000 min^{-1} y cuyas funciones son mantener las células en suspensión y facilitar el intercambio gaseoso entre el cultivo y el sensor polarográfico. Existen dos cámaras adyacentes a la central de medida que dejan pasar agua procedente de una unidad de refrigeración (F250, Julabo GmbH), y permiten ajustar la temperatura del cultivo mediante un sistema de regulación de temperatura por contacto indirecto. El régimen de luz se genera mediante dos paneles con LEDs blancos y una fuente de luz controlada mediante un trazador de curvas programable (TG4001, Thurlby Thandar Instruments Ltd., Huntingdon, UK). La irradiancia se midió con un sensor esférico 4π de radiación omnidireccional (QSL-100; Biospherical Instruments Inc., San Diego, CA). Para seguir la actividad fotosintética, se midió el oxígeno disuelto en el cultivo de la cámara por medio del sensor de oxígeno disuelto, que estaba conectado a un transmisor Mettler Toledo O_2 (4100 Mettler-Toledo S.A.E., Barcelona, Spain) que transfiere los datos a una tarjeta de adquisición de datos (LabJack U12, LabJack Ltd., Lakewood, US).

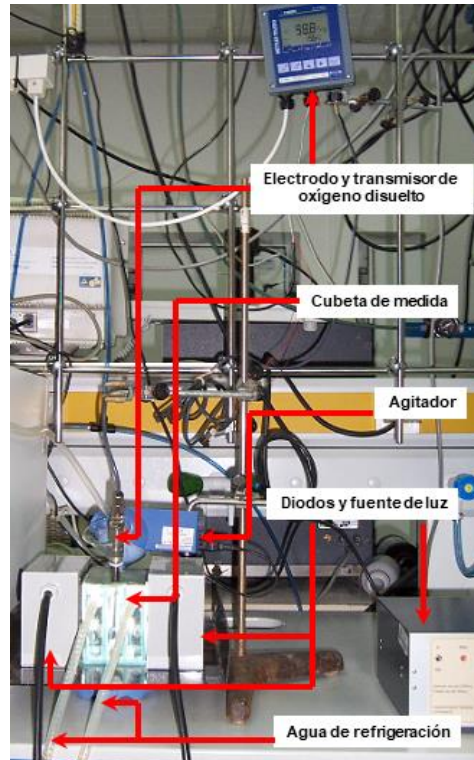


Figura 5. Sistema para la medida de la velocidad de fotosíntesis: cámara de medida, diodos y fuente de luz, sonda y transmisor de oxígeno disuelto, y agitador.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO RÉGIMENES DE LUZ CONTINUA.

El protocolo que fue llevado a cabo durante los ensayos para medir la velocidad de fotosíntesis neta fue el siguiente:

- En primer lugar se enciende el baño de recirculación de agua y se fija la temperatura deseada.
- Colocar los paneles de diodos alrededor de la cubeta en posición, habiéndose obtenido previamente la relación de calibrado entre voltaje e irradiancia.
- Abrir el programa de adquisición de datos (DAQFactory Lite; AzeoTech, Inc., Ashland, OR), habiendo conectado la tarjeta de adquisición de datos labjack al ordenador portátil.
- Conectar el generador de curvas a la fuente de luz y encender la misma.
- Seleccionar las condiciones experimentales del régimen de luz, sin iniciar la ejecución.
- Nombrar el archivo donde se registrarán los datos de DO_2 .

Después de unos 15 minutos para permitir que el sistema alcance la temperatura seleccionada, ya estaría listo para comenzar los ensayos. El siguiente paso sería tomar la muestra del reactor y, empleando el mínimo tiempo posible, trasvasar una alícuota de la misma a la cubeta para comenzar de inmediato el experimento. El volumen de la alícuota debe seleccionarse en función de la concentración de biomasa de estado estacionario del fotobiorreactor, de forma que, mediante dilución con medio fresco, la concentración en la cubeta sea inferior a $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Brindley *et al.*, 2010). La dilución se realiza con medio de cultivo a la misma temperatura del ensayo.

- Introducir la muestra en la cubeta con ayuda de un embudo.
- Comenzar el registro de datos: se ejecuta el registro de datos, anotando el tiempo de comienzo, y seguidamente se ejecuta el encendido de los diodos, anotando el tiempo de inicio del mismo.

Mientras prosigue el ensayo, el resto de la muestra tomada se emplea para determinar la concentración de biomasa en un colorímetro (CM-3500D, Minolta Co. Ltd., Japón), diluyendo, si fuera necesario, para que las medidas se encuentren dentro de la zona lineal de la relación de calibrado. Es necesario conocer este valor para poder obtener la velocidad específica de producción de O_2 (en $\text{mol}\cdot(\text{g}\cdot\text{s})^{-1}$) de cada ensayo.

- Finalmente, el ensayo se detiene a los 20 minutos de registro de datos.

Al final del ensayo, se vacía la cubeta a través de un orificio situado en la base de la misma. Para asegurar que no se acumule biomasa en la cubeta de un experimento a otro se enjuaga ésta con agua del grifo 2 o 3 veces. De esta forma, el siguiente experimento podrá iniciarse directamente, cambiando la intensidad de luz y/o la temperatura y empleando una muestra fresca del cultivo procedente del fotobiorreactor, ya que cada muestra es empleada para un único ensayo.

La velocidad de respiración se obtiene de forma semejante a como se ha explicado para la velocidad de fotosíntesis neta, salvo que estos ensayos se realizan en la oscuridad. La preparación y duración de estos ensayos por tanto es idéntica a la de los ensayos con luz de los que se obtiene la velocidad de fotosíntesis neta.

3.3. Medida de la concentración de biomasa

Para medir la concentración de biomasa del sistema de cultivo se ha empleado un colorímetro (CM-3500D, Minolta Co. Ltd., Japón). En este caso, el colorímetro mide la luminosidad de negro a blanco, L , que es un parámetro adimensional que se puede correlacionar con la concentración celular. Este parámetro ha proporcionado un mejor ajuste para las muestras de esta microalga en comparación al resto de parámetros que mide el colorímetro (a y b del espacio de color Lab). La recta de calibrado empleada, válida para valores de L entre 72 y 93, responde a la *Ecuación 16*. Periódicamente se realizan medidas de peso seco con objeto de comprobar la veracidad de las medidas de C_b obtenidas mediante el colorímetro.

$$C_b, g \cdot L^{-1} = \frac{L + 33.26}{96.39}$$

Ecuación 16. Recta de calibrado para la medida de la concentración de biomasa.

3.4. Determinación de las velocidades de fotosíntesis y respiración

La evolución de la medida de oxígeno disuelto proporciona la velocidad de fotosíntesis, o, en su caso, la velocidad de respiración (células en oscuridad). Para ello, previamente se habrán establecido, mediante calibración, las relaciones recogidas en el *Anexo 2* como polinomios de calibrado. El coeficiente volumétrico global de transferencia de oxígeno para la fase líquida, $K_L a_L$, se había determinado previamente para este mismo sistema de cámara de medida con agitador de varilla (Brindley *et al.*, 2010) y su valor se ha empleado durante el tratamiento de datos para corregir las tasas de acumulación de oxígeno medidas, para el cálculo de la velocidad de fotosíntesis neta y de la velocidad de respiración. Tanto la velocidad de fotosíntesis neta (P_{neta}) como la velocidad de respiración (R) se obtienen a partir de la variación de la concentración de oxígeno disuelto por unidad de tiempo, siguiendo el procedimiento descrito en Brindley *et al.* (2010). Finalmente, la velocidad de fotosíntesis global o bruta, P , se obtiene como la diferencia entre la velocidad de fotosíntesis neta y la velocidad de respiración (ésta última adquiere valores negativos), $P = P_{neta} - R$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Medida de la respuesta fotosintética frente a la irradiancia a diferentes temperaturas: *curvas P-I*

La optimización del diseño de fotobiorreactores supone un proceso complejo dada la gran cantidad de factores que influyen en el cultivo. Los modelos cinéticos de crecimiento y fotosíntesis buscan establecer una relación entre los parámetros que afectan al cultivo y a los parámetros biocinéticos o fisiológicos con el objetivo último de construir reactores industriales de elevada productividad a un coste de instalación bajo (Richmond, 2004). En el desarrollo del presente documento se busca establecer una relación entre la velocidad de fotosíntesis en función de la irradiancia y la temperatura

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

que pueda ser empleada para el diseño de fotobiorreactores industriales. Para ello, se estudiará la respuesta fotosintética frente a la irradiancia de luz continua en cultivos diluidos de *Nannochloropsis gaditana* a diferentes temperaturas, analizando las *curvas P-I* obtenidas mediante la obtención de los parámetros cinéticos de diferentes modelos matemáticos.

Para la obtención de las *curvas P-I* se ha medido la evolución del porcentaje de saturación de O₂ disuelto en el cultivo de la cámara de medida con el tiempo, obteniendo la tasa fotosintética a distintas irradiancias. A partir de los valores de DO₂ (concentración de oxígeno disuelto) en función del tiempo se ha obtenido la velocidad de fotosíntesis específica, *P*, siguiendo el procedimiento descrito por Brindley *et al.* (2010) que, en líneas generales, consiste en realizar transformaciones matemáticas similares a las descritas en el apartado 1.3.2.1.1. *Curvas P-I*. La medida de la concentración celular del cultivo, *C_b*, es necesaria para obtener la velocidad de fotosíntesis específica (*P*, mol O₂·(g biomasa·s)⁻¹) a partir de la acumulación volumétrica de oxígeno (*RO₂*, mol O₂·(m³·s)⁻¹), consiguiendo así medidas intrínsecas que sí son comparables. Además de la medida de la tasa fotosintética, se ha realizado la medida de la tasa de respiración o mantenimiento de las células (*R*, mol O₂·(g biomasa·s)⁻¹) en la oscuridad (*I* = 0 μmol fotones·(m²·s)⁻¹). El valor del *K_{La}*, empleado para estimar la desorción de O₂ del medio de cultivo en la cámara de medida, se ve poco influenciado por la temperatura (Vogelaar *et al.*, 2000), por lo que se ha empleado el mismo valor en todos los ensayos.

En la *Tabla 2* se pueden observar los valores obtenidos de la velocidad de fotosíntesis neta (*P* neta) frente a la irradiancia a cada una de las temperaturas ensayadas.

T, °C	<i>I</i> , μmol fotones (m ² ·s) ⁻¹	<i>P</i> neta, mol O ₂ (g biomasa·s) ⁻¹	T, °C	<i>I</i> , μmol fotones (m ² ·s) ⁻¹	<i>P</i> neta, mol O ₂ (g biomasa·s) ⁻¹
15	509.15	3.140·10 ⁻⁷	25	279.93	7.893·10 ⁻⁷
	249.26	3.199·10 ⁻⁷		157.93	7.122·10 ⁻⁷
	118.60	1.184·10 ⁻⁷		77.99	4.471·10 ⁻⁷
	1796.13	2.583·10 ⁻⁷		998.13	9.917·10 ⁻⁷
	64.27	3.385·10 ⁻⁸		536.67	9.695·10 ⁻⁷
	984.01	2.639·10 ⁻⁷		240.25	7.496·10 ⁻⁷
	381.84	2.588·10 ⁻⁷		776.89	9.222·10 ⁻⁷
	1410.22	2.475·10 ⁻⁷		45.29	1.517·10 ⁻⁷
	753.18	2.512·10 ⁻⁷		410.21	8.529·10 ⁻⁷
	3104.29	2.475·10 ⁻⁷		1643.97	7.359·10 ⁻⁷
20	279.93	1.084·10 ⁻⁶	28	509.15	3.748·10 ⁻⁷
	157.93	1.016·10 ⁻⁶		249.26	2.537·10 ⁻⁷
	77.99	4.388·10 ⁻⁷		118.60	2.914·10 ⁻⁸
	998.13	1.247·10 ⁻⁶		1796.13	2.072·10 ⁻⁷
	45.29	-1.101·10 ⁻⁷		64.27	-8.643·10 ⁻⁸
	536.67	1.246·10 ⁻⁶		984.01	3.879·10 ⁻⁷
	240.25	1.130·10 ⁻⁶		381.84	4.589·10 ⁻⁷
	776.89	1.110·10 ⁻⁶		1410.22	4.191·10 ⁻⁷
	410.21	1.018·10 ⁻⁶		753.18	4.258·10 ⁻⁷
	1643.97	1.084·10 ⁻⁶		3104.29	2.639·10 ⁻⁷

Tabla 2. Medidas de velocidad de fotosíntesis neta de *Nannochloropsis gaditana* a diferentes irradiancias y temperaturas.

En la *Tabla 3* se ha representado la velocidad de respiración de las células en la oscuridad.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

T, °C	I, $\mu\text{mol fotonos (m}^2\cdot\text{s)}^{-1}$	R, mol O ₂ (g biomasa·s) ⁻¹
15	0	-7.618·10 ⁻⁸
20	0	-1.770·10 ⁻⁷
25	0	-1.064·10 ⁻⁷
28	0	-9.131·10 ⁻⁸

Tabla 3. Medidas de velocidad de respiración de *Nannochloropsis gaditana* a cada temperatura ensayada.

Las *P* globales o brutas se obtienen como la diferencia entre *P* neta y la velocidad de respiración, *R*, en cada caso. De esta forma, mientras la tasa fotosintética neta tiene en cuenta solamente la cantidad aparente de producto de la fotosíntesis, la tasa fotosintética bruta considera también las pérdidas de producto debido al mantenimiento celular.

La medida de la respuesta fotosintética frente a la irradiancia finalmente se muestra en la *Figura 6*, donde se presentan las cuatro *curvas P-I* obtenidas a las diferentes temperaturas de ensayo. La forma de las *curvas P-I* es de carácter sigmoidea o hiperbólica, donde existe una progresión desde unos niveles bajos o nulos al inicio, hasta alcanzar un nivel máximo en el que la curva se aplana y *P* se mantiene constante. Este comportamiento es adoptado por las cuatro curvas representadas en la *Figura 6*, donde la diferencia más clara observable entre ellas es la altura de la curva, es decir, es el valor que alcanzan de *P_m*. Aproximadamente a un valor de *I* de 500 $\mu\text{mol fotonos}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ todas las curvas han alcanzado sus correspondientes valores de *P_m*. Sin embargo, en fotobiorreactores, la irradiancia incidente requerida suele tener un valor superior a 500 $\mu\text{mol fotonos}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, obteniéndose una mejor comparación con la irradiancia promedio, *I_{av}*, debido a que la densidad de los cultivos es bastante superior a la concentración microalgal empleada en el desarrollo de los presentes ensayos.

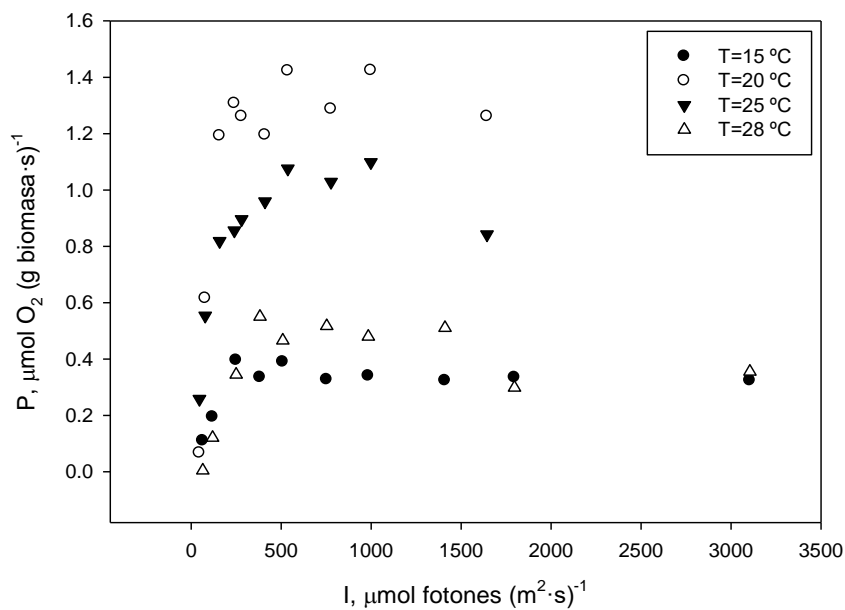


Figura 6. Curvas *P-I* obtenidas a las distintas temperaturas de ensayo.

4.2. Modelado de las curvas *P-I*

Una vez obtenidas las curvas se pretende determinar un modelo matemático que establezca la relación que existe entre la irradiancia y la tasa fotosintética. En el presente trabajo se sugiere el uso de dos modelos diferentes, los cuales han sido introducidos previamente: un modelo sigmoideo de tipo ecuación de Hill de tres parámetros, y el modelo mecanístico de fotosíntesis propuesto por Camacho Rubio *et al.* (2003). En primer lugar, se estudiará el ajuste de los datos experimentales al primer modelo, referido aquí como modelo "sigmoideo Hill 3-p", que responde a la siguiente expresión:

$$P = \frac{P_m * I^n}{I_k^n + I^n}$$

Ecuación 10. Modelo "sigmoideo Hill 3-p".

Dada la forma sigmoidea de las curvas *P-I*, se ha propuesto realizar el ajuste de los datos a este modelo con objeto de conseguir el mejor ajuste posible así como parámetros biocinéticos útiles en aplicaciones de biotecnología de microalgas. Se trata de un modelo, como se ha indicado, de tres parámetros: P_m , I_k y n . P_m es el valor máximo de velocidad de fotosíntesis para la microalga en determinadas condiciones, I_k corresponde a la irradiancia para la cual $P = P_m / 2$, se conoce como la constante de saturación de luz y representa la afinidad de las algas por la luz, y el exponente n es un parámetro de forma que describe cómo de abrupta es la transición en la curva *P-I* de regiones poco iluminadas (tramo ascendente) a regiones muy iluminadas (tramo horizontal). Para la realización de la regresión no lineal de los datos obtenidos experimentalmente se ha empleado el programa Sigmaplot (versión 11), utilizando una de las ecuaciones pertenecientes a la librería del programa, categoría de ecuaciones sigmoideas, denominada "Hill 3 parámetros". Las simulaciones resultantes de realizar las regresiones no lineales son las siguientes:

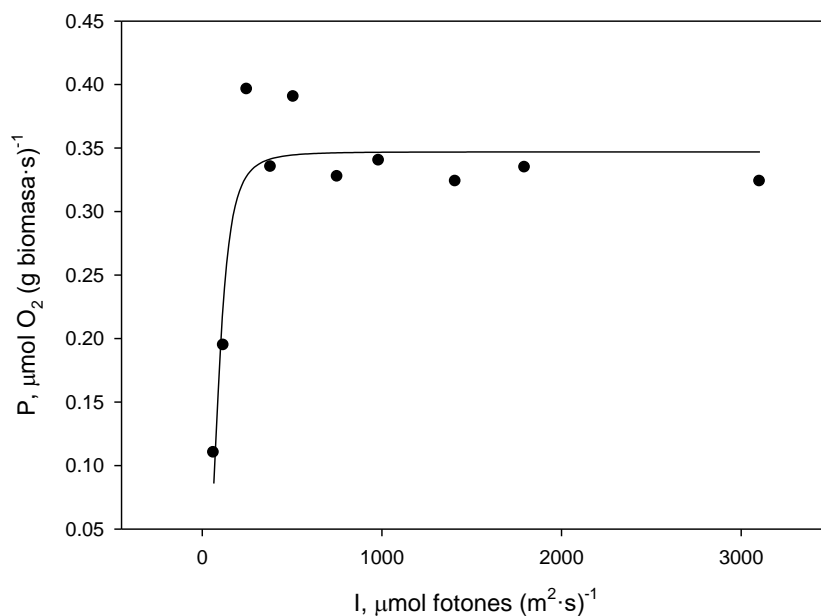


Figura 7. Curva *P-I* obtenida a $T = 15$ °C: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "sigmoideo Hill 3-p" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

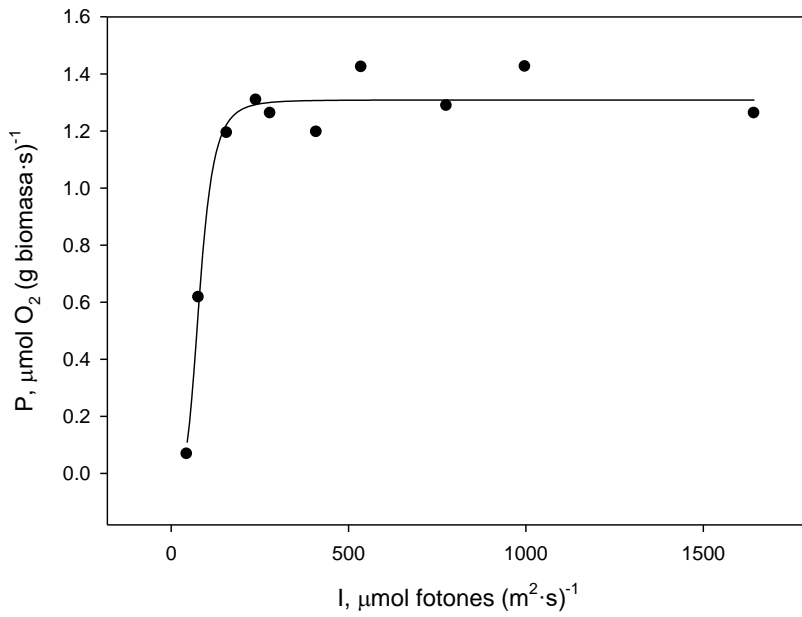


Figura 8. Curva P-I obtenida a $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "sigmoideo Hill 3-p" representada por línea sólida.

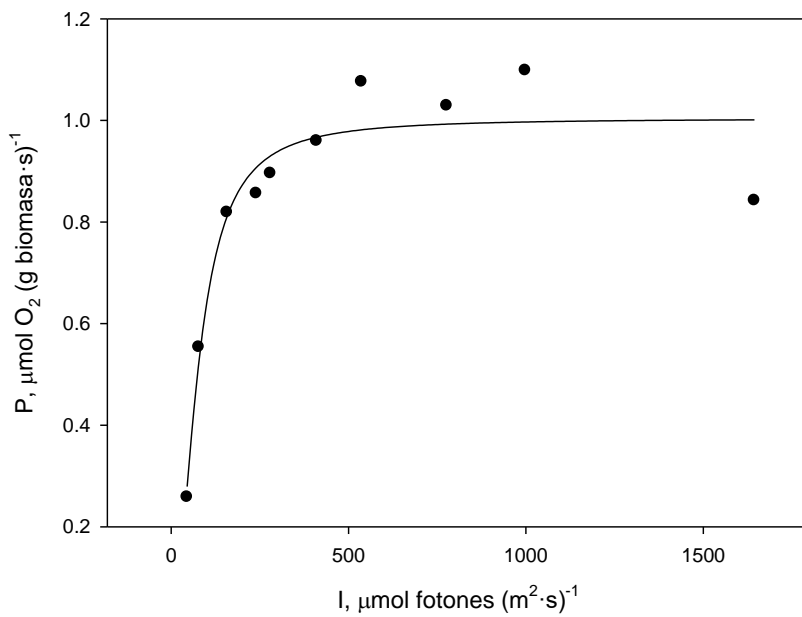


Figura 9. Curva P-I obtenida a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "sigmoideo Hill 3-p" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

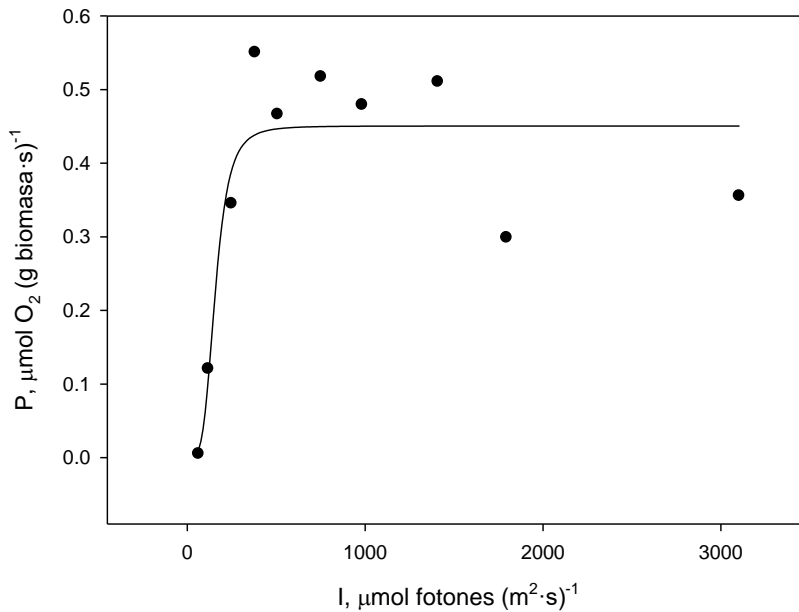


Figura 10. Curva P-I obtenida a T = 28 °C: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "sigmoideo Hill 3-p" representada por línea sólida.

Las Figuras 7-10 representan las cuatro regresiones de las curvas P-I al modelo "sigmoideo Hill 3-p". Los tres parámetros del modelo, a cada una de las temperaturas, obtenidos para el mejor ajuste de los datos experimentales toman los valores representados en la Tabla 4. Sigmaplot realiza el ajuste de curvas empleando el algoritmo de Marquardt-Levenberg, que proporciona los valores de los parámetros que minimizan la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores observados y los valores predichos para la variable dependiente (Marquardt, 1963). Se trata de un proceso iterativo en el que el ajuste comienza a partir de unos valores propuestos al inicio para los parámetros, para los cuales Sigmaplot comprueba cómo de bien ajusta la ecuación, y después continúa modificando los valores hasta que las diferencias entre la suma de cuadrados de los residuos no disminuyan de forma significativa, lo que se conoce como convergencia.

T, °C	P_m , $\mu\text{mol O}_2$ (g biomasa·s) ⁻¹	I_k , $\mu\text{mol fotones (m}^2\cdot\text{s)}^{-1}$	n
15	0.3470	93.8582	2.9398
20	1.3086	81.5565	4.0953
25	1.0039	74.5201	1.9151
28	0.4505	157.4206	4.0780

Tabla 4. Valores de los parámetros del modelo "sigmoideo Hill 3-p" a cada una de las temperaturas ensayadas.

Los estimadores estadísticos proporcionados por Sigmaplot indican que el ajuste de esta modelo a los datos experimentales resulta satisfactorio (ver Tabla 5 adjunta), alcanzando el coeficiente de determinación, R², valores en torno a 0.9.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Ajuste	Valores de R ²
Curva P-I a T = 15 °C	0.8533
Curva P-I a T = 20 °C	0.9717
Curva P-I a T = 25 °C	0.9146
Curva P-I a T = 28 °C	0.8102

Tabla 5. Valores de R² de la regresión no lineal de los datos experimentales al modelo "sigmoideo Hill 3-p".

La forma de la *curva P-I* se ha descrito frecuentemente como hiperbólica. El modelo dinámico propuesto por Camacho Rubio *et al.* (2003) es un modelo mecanístico que describe de forma muy precisa esta forma hiperbólica, por lo que se ha realizado el ajuste de este modelo a los datos experimentales. Dicho modelo es muy completo, ya que reproduce todas las circunstancias relativas a la interacción entre las células y la luz (respuestas fotoadaptativas, fotoinhibición y efecto de la luz intermitente). El modelo se basa en un balance de centros fotosintéticos que se activan de forma proporcional a la luz disponible, *I*, y se desactivan al ser consumida la energía lentamente en reacciones mediadas enzimáticamente, siguiendo una cinética hiperbólica de tipo Michaelis-Menten. La velocidad de la reacción de captura de luz también depende de la concentración de unidades fotosintéticas (PSUs) en estado desactivado, según la ecuación:

$$r_1 = K_a I (a - a^*)$$

Ecuación 17. Ecuación de la velocidad de reacción de captura de luz del modelo de Camacho Rubio *et al.* (2003).

donde K_a es el coeficiente de absorción, a es la concentración total de PSUs y a^* la concentración de PSUs en estado activado. Si para la reacción de consumo de energía se considera una única etapa enzimática que controla la velocidad de consumo, ésta se puede expresar según la ecuación:

$$r_2 = \frac{r_m^* a^*}{K_s^* + a^*}$$

Ecuación 18. Ecuación de la velocidad de reacción de consumo de energía del modelo de Camacho Rubio *et al.* (2003).

Siendo r_m^* la velocidad máxima de consumo de energía y K_s^* representa la concentración de PSU activas que producen una tasa fotosintética igual a la mitad de la tasa máxima.

El balance para la concentración de PSUs es el siguiente:

$$\frac{da^*}{dt} = K_a I (a - a^*) - \frac{r_m^* a^*}{K_s^* + a^*}$$

Ecuación 19. Balance de la concentración de PSUs del modelo de Camacho Rubio (2003).

La reacción de captura de luz es mucho más rápida que las subsiguientes reacciones mediadas enzimáticamente, por lo que productividad fotosintética es proporcional al consumo de energía. Para el caso de luz continua, la solución del modelo es una ecuación algebraica que proporciona la productividad del estado estacionario de un cultivo limitado por luz y creciendo bajo luz continua de intensidad I , en función de los parámetros P_m , κ y α :

$$\frac{P}{P_m} = \frac{I}{2\alpha} * \left[\left(1 + \kappa + \frac{\alpha}{I} \right) - \sqrt{\left(1 - \kappa - \frac{\alpha}{I} \right)^2 + 4\kappa} \right]$$

Ecuación 11. Ecuación de productividad fotosintética bajo luz continua del modelo de Camacho Rubio et al. (2003).

El parámetro P_m determina el máximo valor de la relación $P-I$, pero no su forma. Esto último lo determinan los parámetros κ y α . El valor del parámetro κ determina cómo de abrupta es la transición de la región de baja iluminación de la curva a la región de alta iluminación, mientras que el valor del parámetro α representa el valor de irradiancia a partir del cual el cultivo no está limitado por luz. En el presente documento se realizará el ajuste de las curvas $P-I$ a la ecuación propuesta para el caso de luz continua (Ecuación 11), referida aquí como modelo "Camacho-Rubio LC". Para la regresión no lineal se ha empleado también el programa Sigmaplot. En las Figuras 11-14 se observa el ajuste del modelo para las cuatro curvas $P-I$. También se han presentado los valores de los parámetros P_m , α y κ a las cuatro temperaturas que proporcionan el mejor ajuste (Tabla 6).

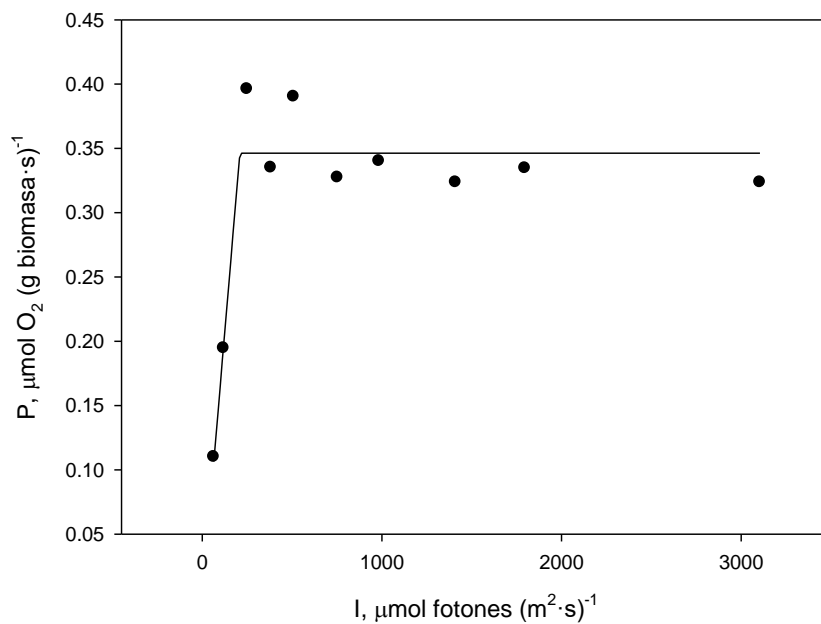


Figura 11. Curva $P-I$ obtenida a $T = 15$ °C: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Camacho-Rubio LC" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

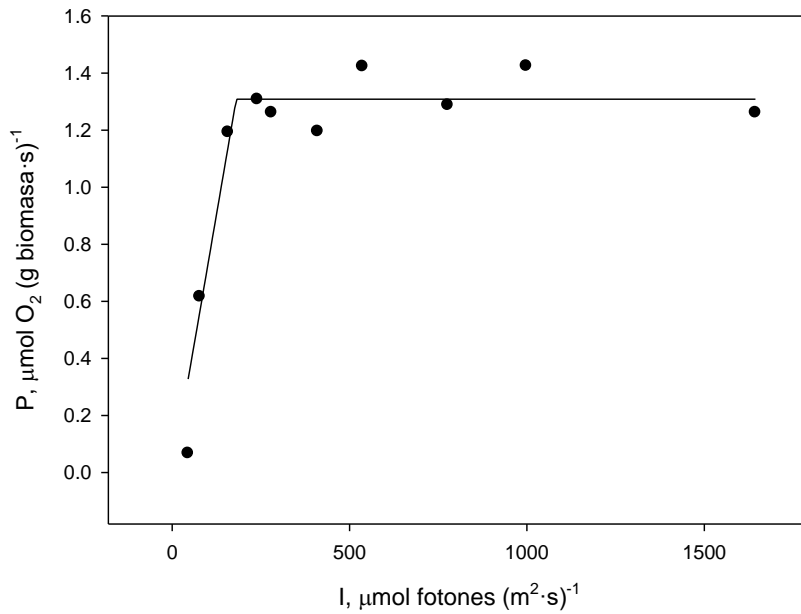


Figura 12. Curva P-I obtenida a T = 20 °C: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Camacho-Rubio LC" representada por línea sólida.

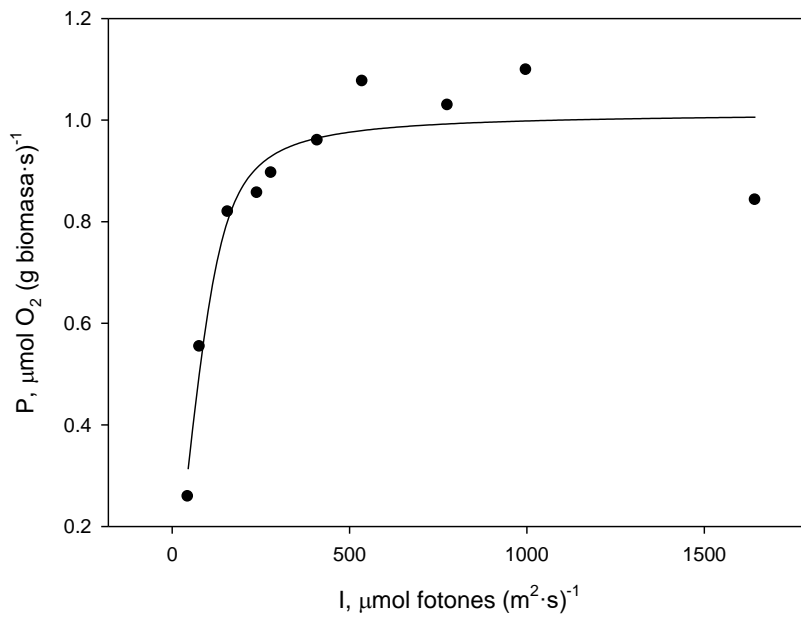


Figura 13. Curva P-I obtenida a T = 25 °C : datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Camacho-Rubio LC" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

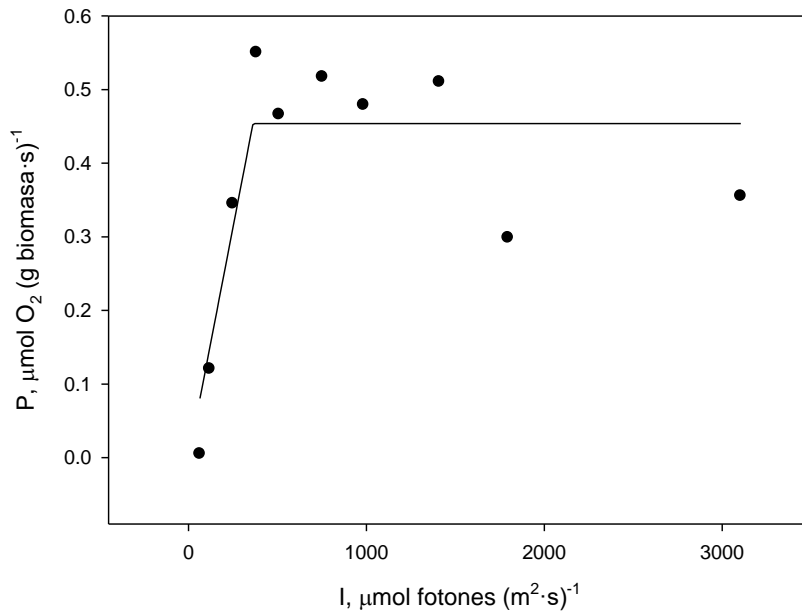


Figura 14. Curva P-I obtenida a T = 28 °C: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Camacho-Rubio LC" representada por línea sólida.

T, °C	P_m , $\mu\text{mol O}_2$ (g biomasa·s) ⁻¹	α , $\mu\text{mol fotones (m}^2\cdot\text{s)}^{-1}$	K
15	0.3463	209.0005	$1.2413 \cdot 10^{-12}$
20	1.3085	180.7741	$8.2924 \cdot 10^{-11}$
25	1.1420	157.6319	0.1241
28	0.4538	362.3963	$1.51069 \cdot 10^{-10}$

Tabla 6. Valores de los parámetros del modelo de "Camacho-Rubio LC" a cada una de las temperaturas ensayadas.

En la *Tabla 7* se indica el valor del coeficiente de determinación R² proporcionado para el ajuste del modelo "Camacho-Rubio LC" a cada *curva P-I* a una temperatura.

Ajuste	Valores de R ²
Curva P-I a T = 15 °C	0.9125
Curva P-I a T = 20 °C	0.9089
Curva P-I a T = 25 °C	0.9058
Curva P-I a T = 28 °C	0.8019

Tabla 7. Valores de R² de la regresión no lineal de los datos experimentales al modelo "Camacho-Rubio LC".

En este caso, los valores de ajuste obtenidos también son próximos a 0.9, por lo que podemos considerar que el modelo de fotosíntesis de Camacho Rubio *et al.* (2003) describe de forma adecuada el comportamiento de las células expuestas a una determinada intensidad de luz continua y, por lo tanto, es susceptible de ser empleado para el diseño de fotobiorreactores.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Con el fin de comparar los valores obtenidos con los datos publicados, también se ha considerado de interés modelar la velocidad específica de crecimiento. Para ello, se ha estimado ésta a partir de la velocidad de fotosíntesis neta mediante la *Ecuación 20*. Los datos de μ - I tabulados a las cuatro temperaturas quedan recogidos en el *Anexo 3*.

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = P \text{ neta} \left(\frac{\text{mol O}_2}{\text{g biomasa} \cdot \text{s}} \right) * \frac{1 \text{ mol CO}_2}{1 \text{ mol O}_2} * \frac{1 \text{ mol C}}{1 \text{ mol CO}_2} * \frac{12 \text{ g C}}{\text{mol C}} * \frac{\text{g C}}{0.45 \text{ g biomasa}} * \frac{3600 \text{ s}}{\text{h}}$$

Ecuación 20. Estimación de μ a partir de la tasa fotosintética.

Se realizará un ajuste empleando un modelo cinético de crecimiento: el de Molina *et al.* (1994), previamente introducido en el apartado 1.3.3.1.1. *Modelos de crecimiento, Ecuación 9*, y referido aquí como modelo "Molina". Este modelo cuenta con tres parámetros cinéticos: μ_{max} (velocidad específica de crecimiento máxima), I_k (irradiancia a la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima) y n (parámetro de forma de la curva). Se ha realizado la regresión no lineal de cada una de las curvas μ - I con el programa Sigmaplot, empleando la misma función sigmoide "Hill 3 parámetros" de la librería del programa, y pueden observarse los resultados en las *Figuras 15-18* a cada temperatura. Los valores de los tres parámetros del modelo que proporcionan el mejor ajuste han sido hallados también con el mismo programa y se ven reflejados en la *Tabla 8*. El ajuste de los datos a las regresiones es satisfactorio (*Tabla 9*).

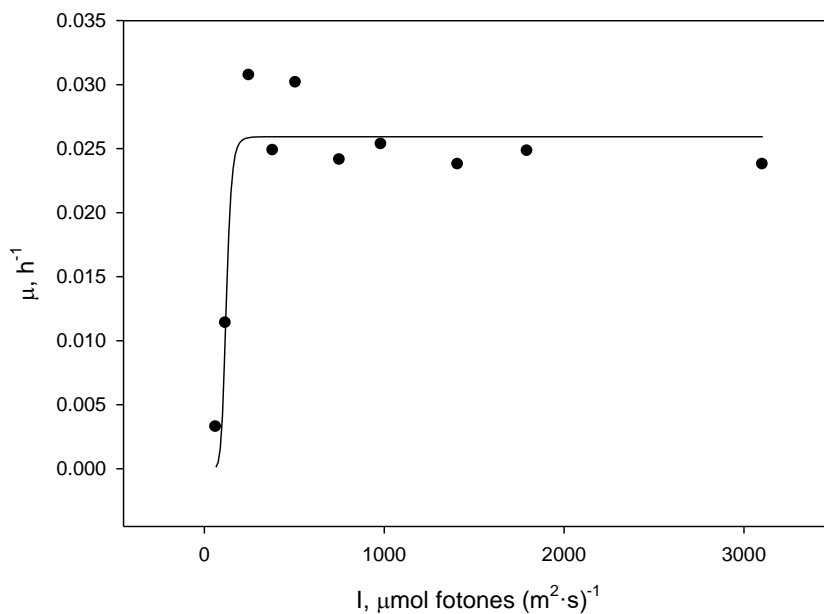


Figura 15. Curva P-I obtenida a $T = 15 \text{ }^\circ\text{C}$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Molina" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO RÉGIMENES DE LUZ CONTINUA.

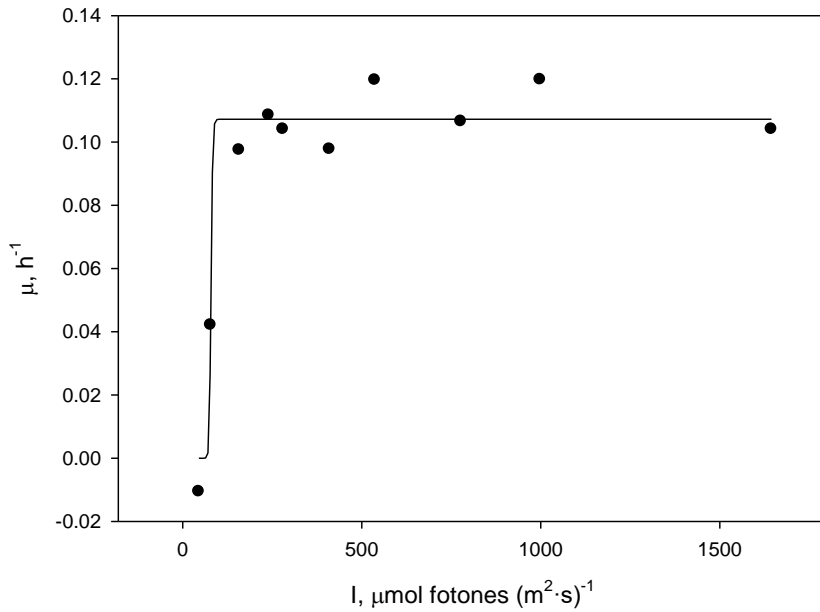


Figura 16. Curva P-I obtenida a $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Molina" representada por línea sólida.

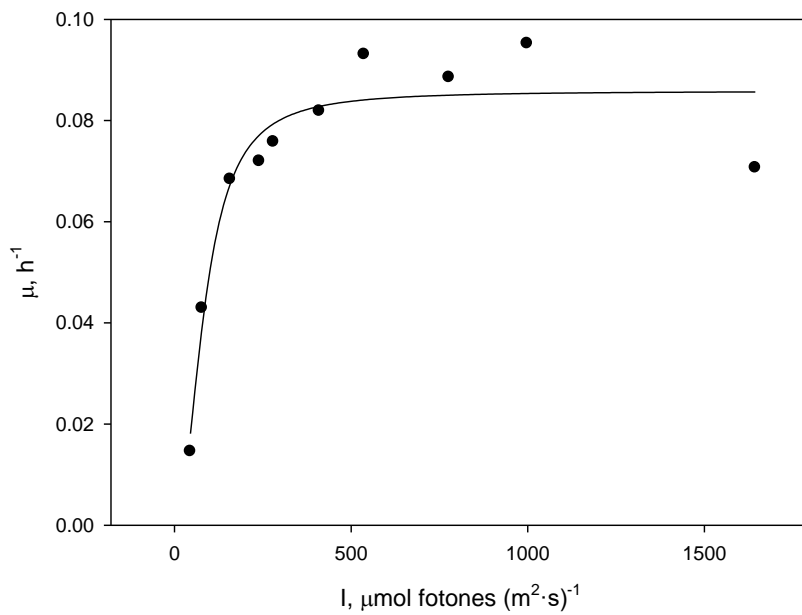


Figura 17. Curva P-I obtenida a $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Molina" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

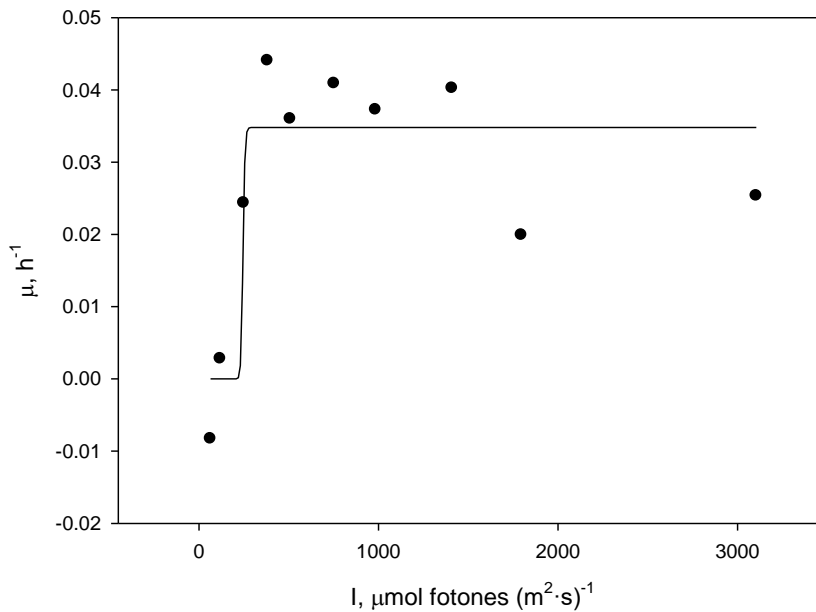


Figura 18. Curva P-I obtenida a T = 28 °C: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Molina" representada por línea sólida.

T, °C	μ_{max}, h^{-1}	$I_k, \mu mol\ fotones\ (m^2 \cdot s)^{-1}$	n
15	0.0259	121.9200	8.3808
20	0.1072	78.9431	35.8015
25	0.0858	84.9202	2.0987
28	0.0348	244.8869	47.7899

Tabla 8. Valores de los parámetros del modelo "Molina" a cada una de las temperaturas ensayadas.

Ajuste	Valores de R ²
Curva μ -I a T = 15 °C	0.8966
Curva μ -I a T = 20 °C	0.9589
Curva μ -I a T = 25 °C	0.9119
Curva μ -I a T = 28 °C	0.7994

Tabla 9. Valores de R² de la regresión no lineal de los datos experimentales al modelo "Molina".

Los parámetros que tienen significado físico directo son P_m en los modelos "sigmoideo Hill 3-p" y "Camacho-Rubio LC", μ_{max} en el modelo "Molina", I_k en los modelos "sigmoideo Hill 3-p" y "Molina", y α y κ en el modelo "Camacho-Rubio LC". El parámetro n es un parámetro que determina la forma de la curva.

El parámetro P_m en ambos modelos de fotosíntesis toma valores bastante similares entre sí, variando exclusivamente algo más la tasa fotosintética máxima alcanzada a 25 °C. La intensidad máxima de fotosíntesis se ha alcanzado a una temperatura de 20 °C en ambos modelos, con un valor de 1.3086 $\mu mol\ O_2 \cdot (g\ biomasa \cdot s)^{-1}$ y 1.3085 $\mu mol\ O_2 \cdot (g\ biomasa \cdot s)^{-1}$ con los modelos "sigmoideo Hill 3-p" y "Camacho-Rubio LC", respectivamente. Los valores de P_m son considerados adecuados al presentar un

buen ajuste a cada uno de los modelos. Además, la comparación con bibliografía es similar en cuanto a los valores obtenidos. Por ejemplo, el valor descrito por Brindley *et al.* (2016) para P_m empleando cultivos de *Scenedesmus almeriensis* a 33 °C, empleando el mismo método de medida y sistema de medida, y realizando el ajuste con el modelo "Camacho Rubio LC", es de $2.3160 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g biomasa s})^{-1}$, con un intervalo de confianza, para un nivel de confianza del 95%, de $(1.675-3.063) \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g biomasa s})^{-1}$. El valor obtenido en el presente documento es algo inferior, lo cual se atribuye a que se trata de una microalga distinta, cultivada a una temperatura diferente. Utilizando el modelo "sigmoideo Hill 3-p" para el ajuste, de nuevo empleando *Scenedesmus almeriensis* a 33 °C, Brindley *et al.* (2011) obtuvieron un valor de $P_m = 2.2483 \mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g biomasa} \cdot \text{s})^{-1}$.

Por otro lado, I_k adopta valores que difieren más entre los modelos "sigmoideo Hill 3-p" y "Molina", pero aun así mantienen valores similares para la mayoría de las temperaturas, difiriendo principalmente en las temperaturas máxima y mínima ensayadas. Como se interpreta a partir de la definición de este parámetro, cuanto menor sea su valor mayor será la eficiencia fotosintética de las microalgas, considerándose que los valores inferiores a $100 \mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ corresponden a eficiencias elevadas. Con el modelo "sigmoideo Hill 3-p" el valor más bajo de I_k se alcanza cuando la temperatura del ensayo es de 25 °C, mientras que en el modelo "Molina" lo hace a 20 °C. Aun así, ambos valores resultan muy próximos entre sí y bastante inferiores a los obtenidos a las temperaturas de 15 °C y 28 °C, lo que sugiere que la temperatura óptima se encontraría entre los 20 °C y los 25 °C, al menos para este parámetro. Brindley *et al.* (2011) obtienen un valor para I_k de $148.7 \mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ empleando el modelo "sigmoideo Hill 3-p" para la microalga *Scenedesmus almeriensis* cultivada a 33 °C. Empleando el modelo "Molina", San Pedro *et al.* (2013) describieron un valor de I_k para *Nannochloropsis gaditana* de $26.18 \mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$, considerablemente inferior al de otros organismos fotosintéticos como *Tetraselmis chuii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis suecica*, con valores de I_k de 36.26, 61.59 y $41.96 \mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$, respectivamente, y muy inferior al valor más bajo de los obtenidos en este trabajo con cualquiera de los dos modelos sigmoideos usados. I_k es un parámetro que depende fuertemente del régimen de luz del cultivo y de las condiciones de operación, ya que repercuten directamente sobre el estado fotosintético de las células. Una posible explicación para entender las discrepancias entre el valor obtenido por San Pedro *et al.* y los valores de I_k del presente trabajo sería precisamente las diferencias en las condiciones de cultivo de los fotobiorreactores en ambos estudios. Sin embargo, no se puede descartar alguna causa adicional relacionada con cómo se determina el régimen de luz, especialmente el valor de I_{av} , en cultivos densos como los de San Pedro *et al.*, mientras que en el presente trabajo, al emplear cultivos diluidos en un fotobiorreactor plano, se puede asegurar que el régimen de luz (I) se ha medido con gran precisión y que el propio método de medida de P está validado y es de elevada fiabilidad.

Finalmente, α es un parámetro que aparece en el modelo "Camacho-Rubio LC" y tiene un significado similar al mencionado para I_k , puesto que su valor delimita las irradiancias no saturantes y las irradiancias saturantes: cuando $I < \alpha$, la etapa de absorción de luz controla la velocidad de los procesos metabólicos subsiguientes y la velocidad de fotosíntesis depende fuertemente de la irradiancia, mientras que cuando $I > \alpha$ hay suficiente energía disponible como para que los procesos metabólicos

se saturan y la velocidad de fotosíntesis ya no tiene una fuerte dependencia con la irradiancia. Por ello, este parámetro alcanza valores superiores a los alcanzados para I_k , de hecho, para cada temperatura el valor de α es aproximadamente igual al doble de I_k , tanto con un modelo sigmoideo como con el otro. Dicho de otro modo, el valor de α es menor donde se intuye que se encuentra la temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo, y el menor valor se alcanza a 25 °C, siendo $\alpha = 157.63 \mu\text{mol foton}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$. En bibliografía, empleando este modelo, se han descrito valores de α de $312.0 \mu\text{mol foton}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, con un intervalo de confianza (95%) de $221.8\text{--}402.1 \mu\text{mol foton}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ (Brindley *et al.*, 2016), y de $899 \mu\text{mol foton}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ empleando datos de Nedbal *et al.* (1996) (Camacho Rubio *et al.*, 2003).

Los valores obtenidos en las *curvas P-I* y $\mu\text{-I}$ también son similares a los datos bibliográficos. En los trabajos de Brindley *et al.* (2011) y Brindley *et al.* (2016) para *Scenedesmus almeriensis* quedan representada la forma típica de las *curvas P-I* con los ajustes realizados a los modelos "Molina" y "Camacho-Rubio LC". En San Pedro *et al.* (2013) se establecen las *curvas $\mu\text{-I}$* para cuatro microalgas diferentes y trabajando en continuo, entre ellas *Nannochloropsis gaditana*. En todos los casos se puede observar que tanto la forma de la *curva P-I* o $\mu\text{-I}$, en su caso, como los valores reflejados en el eje de ordenadas y de abscisas presentan gran similitud con los obtenidos en este trabajo (*Figuras 11-14 en P-I y 15-18 para $\mu\text{-I}$*).

Ma *et al.*, 2014 describen la cinética de crecimiento de nueve distintas especies de *Nannochloropsis*. San Pedro *et al.* (2013) describen un valor de μ_{max} para *Nannochloropsis gaditana* de 0.0683 h^{-1} , obtenido con el modelo "Molina", y que es algo menor a los descritos por los mismos autores para otras microalgas como son *Tetraselmis chunii* ($\mu_{max} = 0.0775 \text{ h}^{-1}$), *Phaeodactylum tricornutum* ($\mu_{max} = 0.0825 \text{ h}^{-1}$) y *Tetraselmis suecica* ($\mu_{max} = 0.0792 \text{ h}^{-1}$). Cabe destacar que con el modelo "Molina" los valores alcanzados de μ_{max} para las temperaturas de 20 y 25 °C en este trabajo son comparables e incluso superiores al dato de San Pedro *et al.* (2013), así como con los valores para las otras especies de microalgas.

4.3. Modelado de la dependencia de la respuesta fotosintética con la temperatura

Una vez ajustados los datos experimentales a los modelos cinéticos propuestos y habiendo obtenido resultados satisfactorios con todos ellos, se llevará a cabo el análisis y la modelización de la dependencia de la respuesta fotosintética con la temperatura. La relación habitualmente descrita consiste en una influencia positiva sobre el crecimiento conforme aumenta la temperatura hasta un valor de temperatura óptimo, que se encuentra entre 20-25 °C para la mayoría de las microalgas (excluyendo aquellas psicrófilas y termófilas), a partir del cual el crecimiento comienza a disminuir de forma abrupta (Esener *et al.*, 1983; Davison, 1991). Franks *et al.* (1980) introdujeron el estudio de la influencia de la temperatura a nivel de la cinética del metabolismo de la bacteria *Streptococcus cremoris HP*, proponiendo un modelo mecanístico de crecimiento. En la *Figura 3*, presentada previamente en la sección de introducción, se puede observar la relación de dependencia obtenida entre la velocidad específica de crecimiento y la temperatura.

En un principio se describieron cuatro regiones para la denominada “representación de Arrhenius generalizada” (Shaw, 1967), y posteriormente una de estas regiones fue subdividida en dos regiones más (Van Uden y Madeira-Lopes, 1976). Franks *et al.* (1980) consideraron las cuatro regiones representadas en la *Figura 3*: a grandes rasgos, en la Región I, denominada región de Arrhenius, se sigue la ley de Arrhenius para reacciones bimoleculares elementales; la Región II se conoce como la región sub-Arrhenius y se caracteriza por presentar la velocidad de crecimiento un descenso más rápido de lo que se esperaría según la ley de Arrhenius; la Región III se denomina la región súper-óptima y está delimitada por la temperatura óptima del cultivo y la temperatura máxima que permite un crecimiento equilibrado; finalmente, la Región IV o región de temperatura súper-máxima es aquella en la que no es posible conseguir un crecimiento continuo y equilibrado del cultivo. Este estudio, llevado a cabo para bacterias lácticas, se ha demostrado que es extensible al crecimiento de todo tipo de microorganismos (Schügerl y Bellgardt, 2000), incluidos los fotosintéticos (Sánchez *et al.*, 2008; García-Cubero *et al.*, 2017).

Las *Figuras 19-21* describen el comportamiento de cada uno de los parámetros, obtenidos con cada uno de los tres modelos cinéticos, frente a la temperatura.

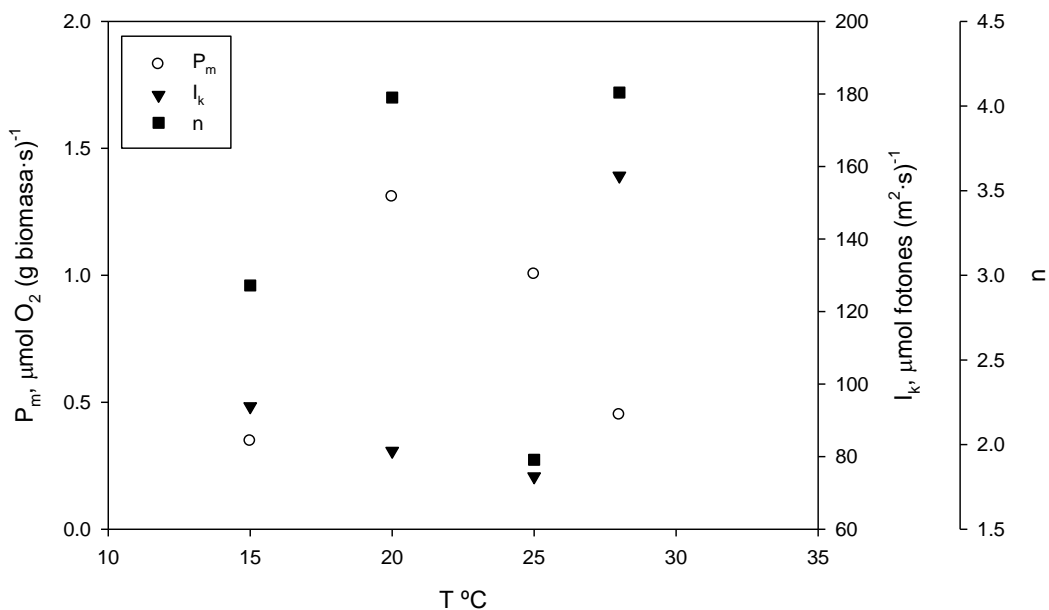


Figura 19. Representación de los parámetros P_m , I_k y n (obtenidas con el modelo "sigmoideo Hill 3-p") frente a T .

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

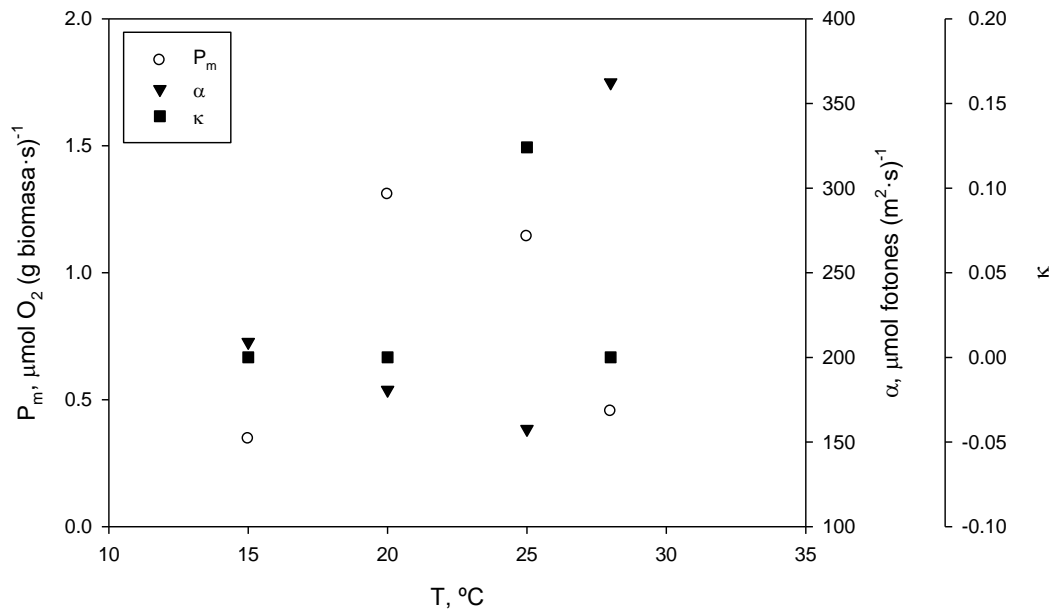


Figura 20. Representación de los parámetros P_m , α y κ (obtenidas con el modelo "Camacho-Rubio LC") frente a T .

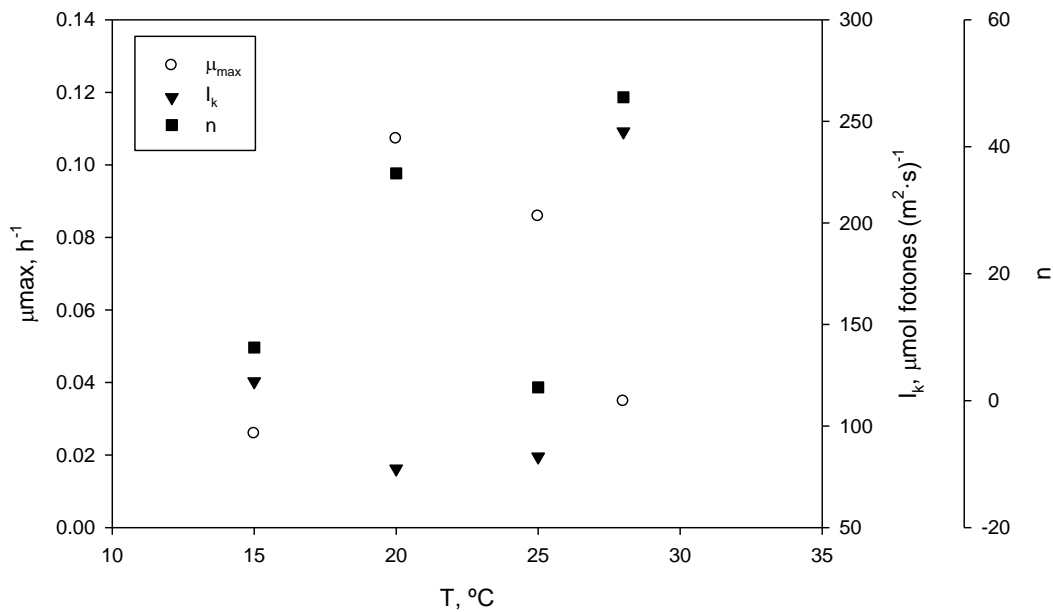


Figura 21. Representación de los parámetros μ_{max} , I_k y n (obtenidas con el modelo "Molina") frente a T .

En las tres figuras anteriores se observa una dependencia para los parámetros P_m y μ_{max} con la temperatura que sigue la forma de la curva que ha sido descrita previamente por diversos autores (Schügerl y Bellgardt, 2000; Richmond, 2000; Sánchez *et al.*, 2008; García-Cubero *et al.*, 2017). Esto tiene sentido puesto que, de los parámetros modelados, P_m y μ_{max} presentan relación directa con la velocidad de crecimiento, que es la variable para la cual habitualmente se ha descrito esta dependencia, pero no exclusivamente ya que Hancke *et al.* (2008b) analizaron la dependencia de un parámetro análogo a P_m con la temperatura, mientras que Esener *et al.* (1983) o Topiwala y Sinclair (1971) modelaron la relación entre μ_{max} y la temperatura. En este trabajo se procederá a modelar el

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

parámetro P_m , que representa indirectamente el crecimiento del microorganismo a partir de la velocidad fotosintética exclusivamente teniendo en cuenta la irradiancia incidente y la temperatura, e independientemente de otros efectos externos (grado de mezcla, densidad del cultivo, etc.) que sí afectan a los datos de velocidad de crecimiento en cultivos masivos. De esta manera se puede tener una mayor fiabilidad de la dependencia exclusiva de P_m con la temperatura.

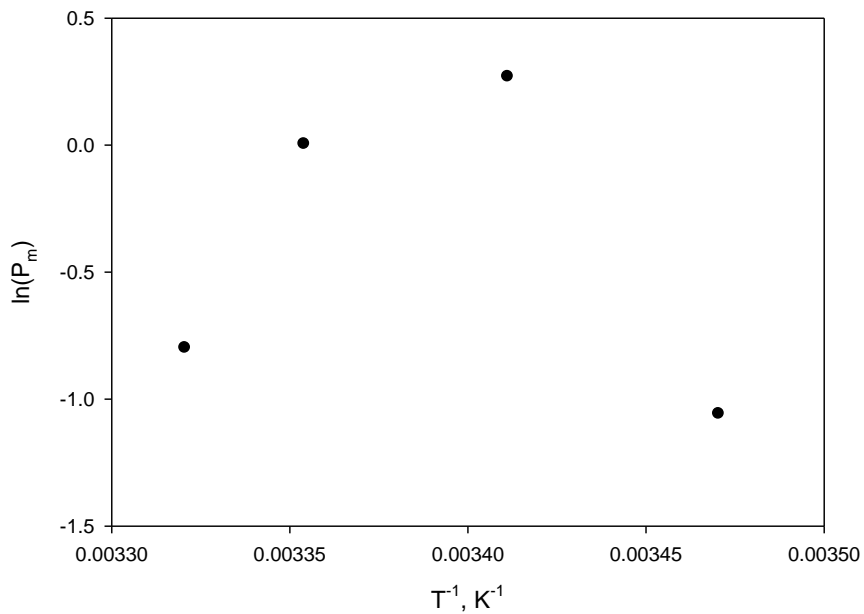


Figura 22. Representación de $\ln(P_m)$ (modelo "sigmoideo Hill 3-p") frente a la inversa de T .

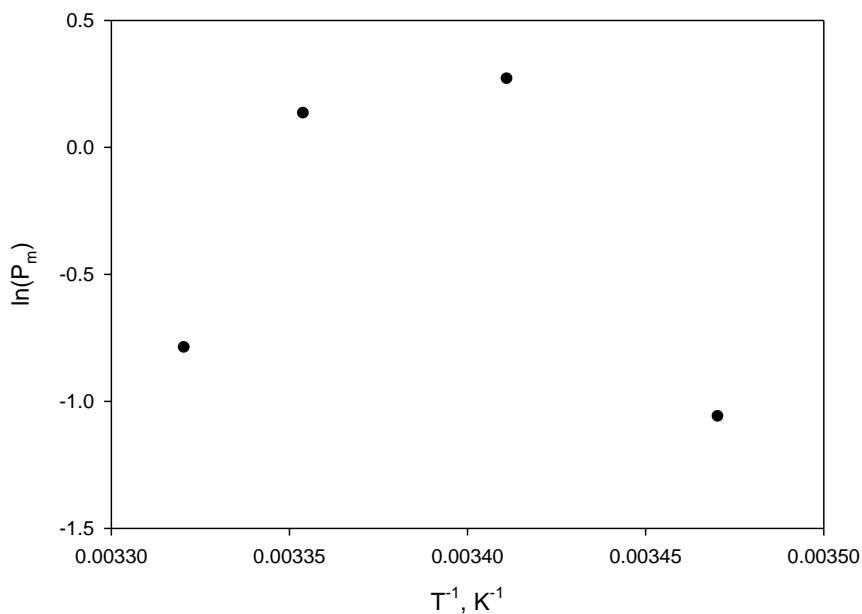


Figura 23. Representación de $\ln(P_m)$ (modelo "Camacho-Rubio LC") frente a la inversa de T .

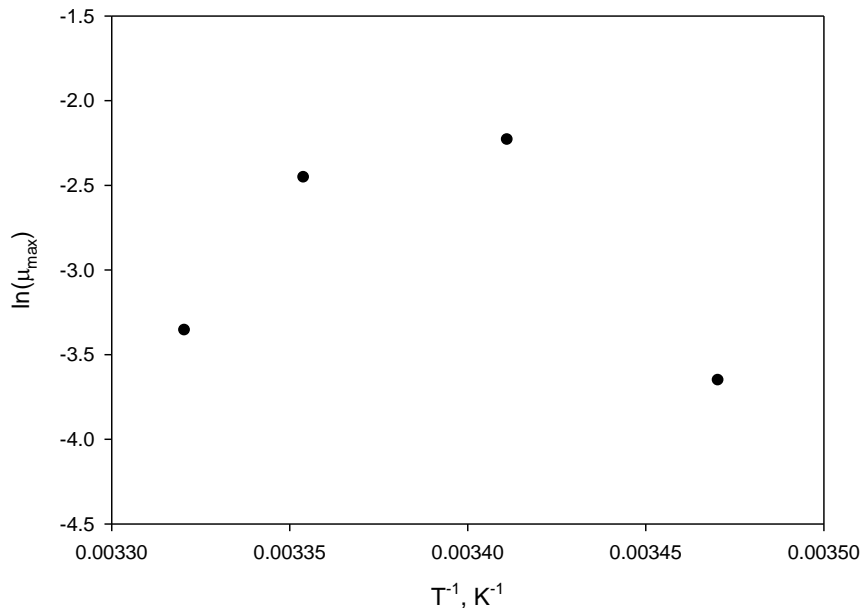


Figura 24. Representación de $\ln(\mu_{max})$ (modelo "Molina") frente a la inversa de T .

En las Figuras 22 y 23 se ha representado $\ln(P_m)$ vs. T^{-1} y en la Figura 24 se ha representado $\ln(\mu_{max})$ vs. T^{-1} para los parámetros obtenidos con los modelos empleados en el apartado anterior, con objeto de comprobar la correspondencia con las secciones de la Figura 3 (Franks *et al.*, 1980) que abarcan estos datos. Como puede observarse, atendiendo a las regiones descritas por Franks *et al.* (1980), el presente estudio abarca la región de Arrhenius, la región súper-óptima y la región sub-Arrhenius. Los modelos cinéticos que se usarán, por tanto, para describir esta dependencia, serán de tipo Arrhenius. Concretamente, en primer lugar se analizarán los datos mediante el modelo de tipo Arrhenius propuesto por Topiwala y Sinclair (1971) (Ecuación 13), modificándolo para adaptarlo al parámetro P_m , y que aquí será referido como modelo "Topiwala y Sinclair".

$$P_m = A_1 * e^{\left(\frac{-E_{a1}}{RT}\right)} - A_2 * e^{\left(\frac{-E_{a2}}{RT}\right)}$$

Ecuación 21. Modelo de tipo Arrhenius "Topiwala y Sinclair".

Siendo A_1 y A_2 los factores pre-exponenciales de la ecuación de Arrhenius, y que se interpretan como constantes cinéticas relacionadas con la formación de sustancias activas, que favorecen el crecimiento microalgal, o perjudiciales, que lo disminuyen, respectivamente, y E_{a1} y E_{a2} son las energías de activación para que se inicie cada uno de estos procesos en favor o en detrimento del crecimiento (Sánchez *et al.*, 2008; Topiwala y Sinclair, 1971). Se empleará el programa Sigmaplot para la regresión no lineal: de los valores del parámetro P_m , obtenidos en el apartado anterior mediante los dos modelos de fotosíntesis presentados previamente, a la Ecuación 21, y de los valores del parámetro μ_{max} , obtenidos con el modelo "Molina", a la Ecuación 13. Se puede apreciar en las Figuras 22 a 24 que las curvas obtenidas en la relación $\ln(P_m)$ vs. T^{-1} y $\ln(\mu_{max})$ vs. T^{-1} tienen una zona de pendiente positiva y una zona de pendiente negativa, por lo que será conveniente ajustar al modelo "Topiwala y Sinclair", que permite el estudio de ambas zonas de forma simultánea.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Las gráficas resultantes de los ajustes de los datos de P_m , obtenidos con los modelos "sigmoideo Hill 3-p" y "Camacho-Rubio LC" al modelo "Topiwala y Sinclair" quedan reflejadas en las Figuras 25 y 26, estando los valores de los parámetros obtenidos en dichos ajustes recogidos en la Tabla 10, y los estimadores estadísticos para la bondad de los ajustes en la Tabla 11.

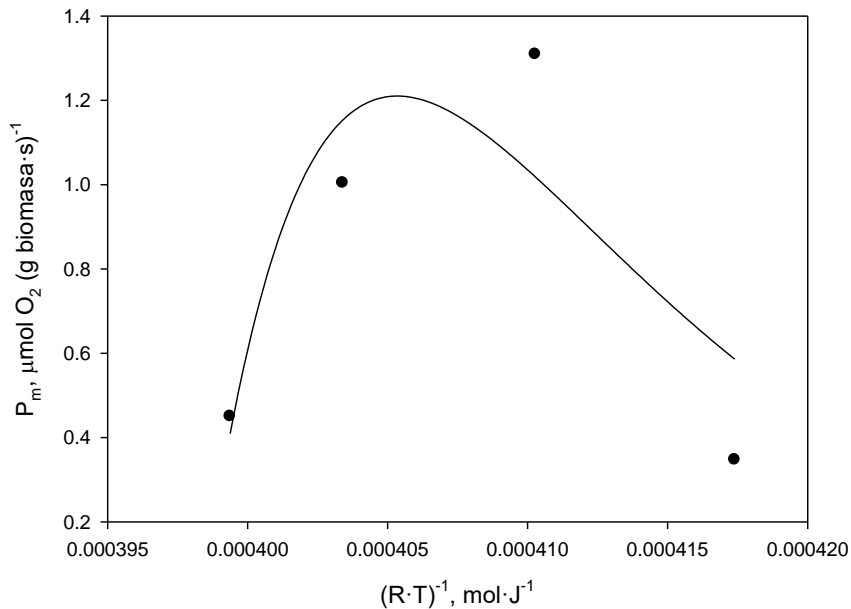


Figura 25. Representación de P_m (modelo "sigmoideo Hill 3-p") frente a la inversa de $R \cdot T$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Topiwala y Sinclair" representada por línea sólida.

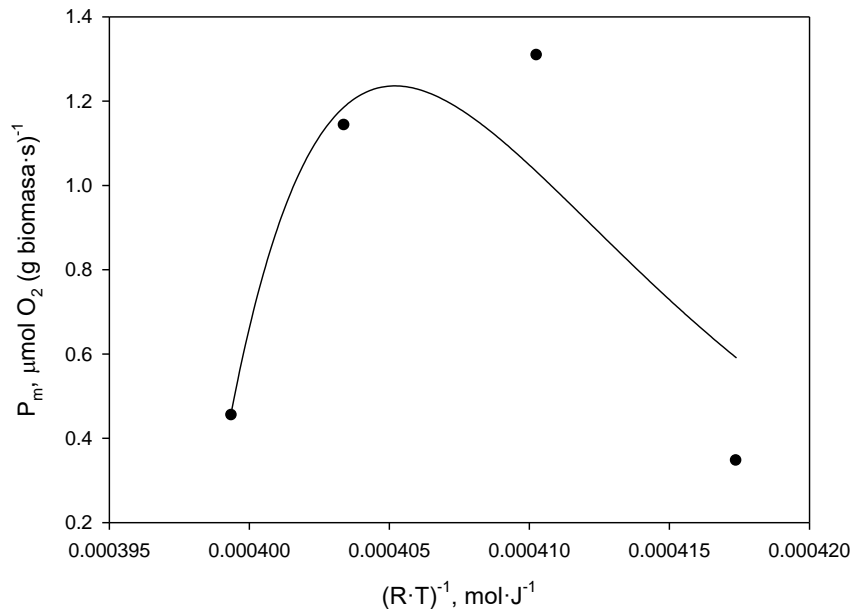


Figura 26. Representación de P_m (modelo "Camacho-Rubio LC") frente a la inversa de $R \cdot T$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo "Topiwala y Sinclair" representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

P_m -modelo de fotosíntesis	$A_1, \mu\text{mol O}_2 \text{ (g biomasa}\cdot\text{s)}^{-1}$	$A_2, \mu\text{mol O}_2 \text{ (g biomasa}\cdot\text{s)}^{-1}$	$E_{a1}, \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$E_{a2}, \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$
P_m del modelo "sigmoideo Hill 3-p"	$6.966\cdot 10^{27}$	$8.230\cdot 10^{27}$	143289	143707
P_m del modelo "Camacho-Rubio LC"	$6.966\cdot 10^{27}$	$8.230\cdot 10^{27}$	143289	143707

Tabla 10. Valores de los parámetros del modelo "Topiwala y Sinclair" para los ajustes de los datos de P_m procedentes de los dos modelos de fotosíntesis estudiados.

Ajuste	Valores de R^2
P_m del modelo "sigmoideo Hill 3-p"	0.7359
P_m del modelo "Camacho-Rubio LC"	0.8019

Tabla 11. Valor de R^2 de la regresión no lineal del parámetro P_m al modelo "Topiwala y Sinclair".

Se puede apreciar que empleando los datos de P_m obtenidos con el modelo "Camacho-Rubio LC" se obtiene un ajuste al modelo "Topiwala y Sinclair" que es ligeramente mejor que para los datos del modelo sigmoideo, aunque los valores de los parámetros obtenidos son casi idénticos en ambos casos (nota: en la Tabla 10 no se pueden apreciar las diferencias debido al redondeo), lo cual es de esperar teniendo en cuenta que los valores de P_m de los dos modelos eran muy similares también.

El mismo tipo de tratamiento se ha realizado con los datos de μ_{max} obtenidos empleando el modelo "Molina", pero empleando la Ecuación 13 en lugar de la Ecuación 21 para la regresión no lineal de los datos: Figura 27, Tabla 12. El valor de R^2 obtenido ha sido de 0.7591.

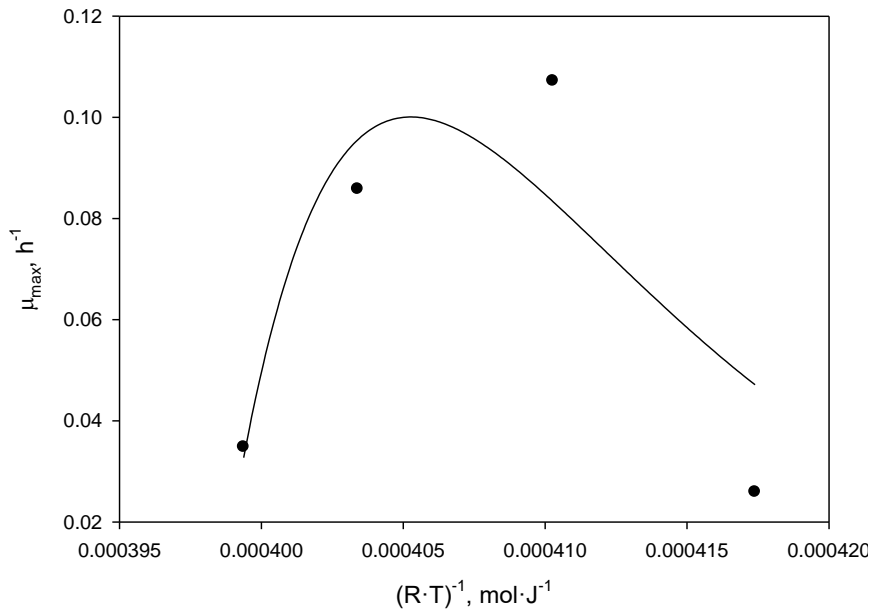


Figura 27. Representación de μ_{max} (modelo "Molina") frente a la inversa de $R\cdot T$: datos experimentales representados por puntos; simulación empleando el modelo de Topiwala y Sinclair (1971) (Ecuación 13) representada por línea sólida.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

A_1, h^{-1}	A_2, h^{-1}	$E_{a1}, \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$	$E_{a2}, \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$
$7.305\cdot 10^{24}$	$7.452\cdot 10^{26}$	140596	152204

Tabla 12. Valores de los parámetros de la Ecuación 13 para el ajuste de los datos de μ_{max} (modelo "Molina").

En resumen, habiendo comprobado que P_m y μ_{max} presentan influencia por la temperatura, se ha recurrido a un modelo cinético que estudie dicha dependencia: el modelo tipo Arrhenius "Topiwala y Sinclair". En cuanto a bibliografía, los valores obtenidos en el trabajo realizado por García-Cubero *et al.* (2017) para *Scenedesmus vacuolatus* son: $A_1 = 2\cdot 10^7 \text{ d}^{-1}$, $A_2 = 7.56\cdot 10^{13} \text{ d}^{-1}$, $E_{a1} = 4.09\cdot 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $E_{a2} = 8.05\cdot 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$, y los referenciados en Sánchez *et al.* (2008) con *S. almeriensis* corresponden a $A_1 = 1.33\cdot 10^4 \text{ h}^{-1}$, $A_2 = 6.00\cdot 10^{10} \text{ h}^{-1}$, $E_{a1} = 3.75\cdot 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $E_{a2} = 7.85\cdot 10^4 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$. Los valores de E_{a1} y E_{a2} obtenidos en el presente trabajo son superiores en un orden de magnitud a los de bibliografía, lo cual podría ser debido a que ambas microalgas son similares entre sí, de la especie *Scenedesmus*, y diferentes a la del presente estudio, aunque también habría que tener en cuenta la calidad del ajuste de los datos de P_m al modelo "Topiwala y Sinclair". Por otra parte, el valor de E_{a2} del trabajo original de Topiwala y Sinclair (1971) sí es del mismo orden que el hallado en este trabajo.

Los datos de P_m que mejor se ajustan al modelo "Topiwala y Sinclair" son los del modelo "Camacho-Rubio LC", pero el ajuste con los datos procedente del modelo "sigmoideo Hill 3-p" es muy similar, así como también lo es el ajuste con los datos de μ_{max} procedentes del modelo "Molina" para la Ecuación 13. Sin embargo, los resultados obtenidos no resultan del todo satisfactorios debido a que la bondad del ajuste es en todos los casos de $R^2 \approx 0.8$. Por ello, se propone realizar el ajuste de los datos de P_m procedentes del modelo "sigmoideo Hill 3-p" a un modelo de tipo Arrhenius alternativo para describir la relación entre éste y la temperatura. El modelo elegido es el publicado por Esener *et al.* (1983) (Ecuación 14), modificado para ajustar P_m (Ecuación 22), al que llamaremos modelo "Esener":

$$P_m = \frac{A' * e^{(-\Delta H_1^*/RT)}}{1 + K * e^{(-\Delta H_2/RT)}}$$

Ecuación 22. Modelo de tipo Arrhenius "Esener".

De este modelo, el parámetro A' sería una constante de reacción comparable al parámetro A_1 del modelo de Topiwala y Sinclair, mientras que los parámetros ΔH_1^* y ΔH_2 serían magnitudes termodinámicas comparables a los parámetros E_{a1} y E_{a2} , respectivamente. Empleando el programa Sigmaplot se ha realizado la regresión no lineal de los datos de P_m , sin embargo, el resultado no es satisfactorio debido al mal ajuste obtenido, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.1139$. Comparar los parámetros obtenidos con bibliografía (Sánchez, 2008; y García-Cubero *et al.*, 2017) resulta en mucha disparidad, probablemente producto de la alta dependencia de este parámetro al microorganismo empleado. En este punto, cabe destacar el parámetro ΔH_2 del presente modelo "Esener". Esener *et al.* (1983) indican que "si la tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos está limitada por la tasa de una reacción enzimática específica en una secuencia compleja (como postula el modelo de crecimiento Monod), se puede buscar una relación matemática entre la temperatura absoluta y la tasa de crecimiento máxima". Esta afirmación puede extrapolarse

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO RÉGIMENES DE LUZ CONTINUA.

a microalgas, donde la limitación es la luz en la gran mayoría de los casos (Richmond, 2000), pues la fotosíntesis es, al fin y al cabo, un proceso enzimático en el que intervienen gran cantidad de sistemas y se dan numerosas reacciones.

Las expresiones de tipo Arrhenius, funciones de P_m o μ_{max} , según el caso, permiten estudiar la influencia de la temperatura en la velocidad de fotosíntesis o la velocidad específica de crecimiento, pero son aplicables dentro de un rango limitado. El modelo "Esener" ha tenido en cuenta el efecto negativo que ejerce una temperatura superior a la máxima sobre la cadena de transporte de electrones o sobre los procesos enzimáticos subsiguientes, es decir, sobre la velocidad de fotosíntesis. En dicho modelo se ha supuesto que la enzima tiene dos configuraciones posibles: forma activa e inactiva, y que el efecto de la temperatura podría evaluarse estudiando el equilibrio activación-inactivación, que responde a la *Ecuación 23*:

$$f_I = f_A * K * e^{(-\Delta H_2/RT)}$$

Ecuación 23. Relación de equilibrio inactivación-activación en el modelo "Esener".

Siendo f_I y f_A las fracciones de la cantidad total de enzima inactivada y activada, respectivamente, y ΔH_2 el cambio de entalpía para la reacción de inactivación. Con esta definición no es extraño equiparar este parámetro al previamente definido E_{a2} del modelo "Topiwala y Sinclair. El valor del parámetro ΔH_2 en el modelo de Esener *et al.* (1983) es de 287780 J·mol⁻¹ (con unos niveles del 95% de confianza estadística en el intervalo de valores agrupados entre 188330 y 387230 J·mol⁻¹), mientras que los valores obtenidos de E_{a2} han sido, con los parámetros de los modelos de fotosíntesis, es decir, "sigmoideo Hill 3-p" y "Camacho-Rubio LC", de 143707 J·mol⁻¹ en ambos, y con los del modelo "Molina" de 152204 J·mol⁻¹. Como puede observarse, el orden de magnitud es muy similar en todos los casos. Esener *et al.* (1983) realizaron estos estudios en la bacteria aeróbica *Enterobacter aerogenes*, mientras que los valores de E_{a2} han sido todos obtenidos en este documento a partir de datos experimentales obtenidos con la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

Cabe plantear la pregunta de si es adecuado realmente comparar los resultados obtenidos en este estudio con los datos publicados por Sánchez *et al.* (2008) o García-Cubero *et al.* (2017), debido a la no coincidencia de los mismos en la relación al modelo de Arrhenius. Los datos obtenidos a partir de cultivos densos están influenciados por más factores, además del régimen de luz y la temperatura, y se sabe que el propio régimen de luz de un cultivo denso es cambiante y complejo, como se ha explicado en la introducción. Por ello, aunque se haga una estimación de μ a partir de valores de P medidos en el presente estudio, las únicas variables que realmente influyen en los resultados obtenidos son las del régimen de luz y la temperatura, de modo que se podrían explicar las discrepancias con los valores de μ medidos en cultivos densos.

El desarrollo del presente documento no muestra claramente la idoneidad de descartar alguno de estos modelos, ya que según este estudio todos presentan alguna carencia. En cuanto a los resultados con unos y otros modelos, se observan similitudes no esperadas en un caso (ΔH_2 de bacteria y E_{a2} de microalga), y en otros casos en los que cabría esperar mayores semejanzas éstas no se dan (E_{a1} y E_{a2}).

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

Por otro lado, el modelo de Esener *et al.* (1983), no pudo validarse estadísticamente debido a la insuficiencia de datos experimentales, por lo que es necesario tomar sus valores con cautela.

En vista de los resultados obtenidos empleando parámetros de los diferentes modelos de fotosíntesis y crecimiento y empleando diferentes modelos de tipo Arrhenius para estudiar la dependencia con la temperatura, el mejor ajuste de los cuatro realizados ha resultado ser el ajuste del modelo "Topiwala y Sinclair" a los datos de P_m obtenidos con el modelo "Camacho-Rubio LC". La bondad de dicho ajuste queda representada en la *Figura 28*.

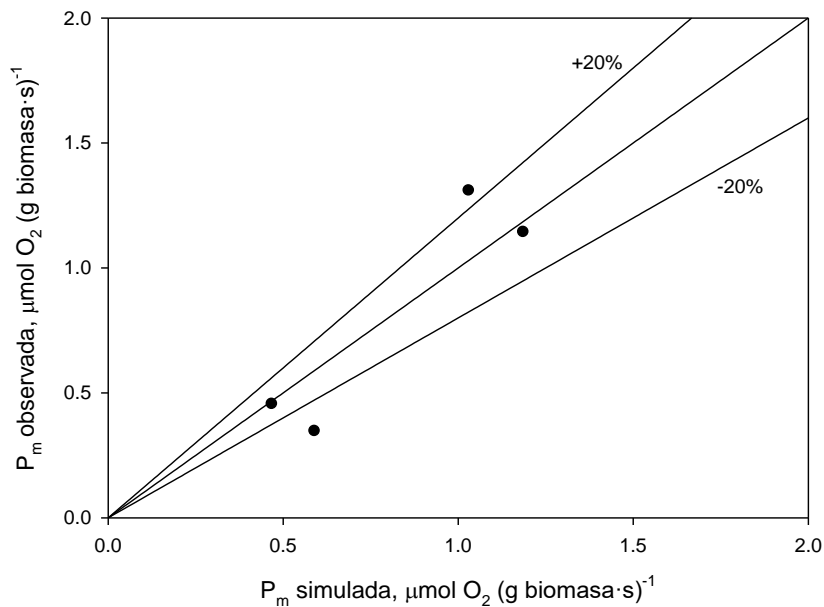


Figura 28. Representación de P_m observada (obtenida con el modelo "Camacho-Rubio LC") frente a P_m simulada mediante el modelo "Topiwala y Sinclair". La línea sólida central indica coincidencia exacta.

Según se aprecia en la figura anterior, de los cuatro datos de P_m obtenidos con el modelo "Camacho-Rubio LC" en el apartado anterior (P_m observada) solo dos quedan dentro del margen de $\pm 20\%$ del valor de P_m predicho mediante el modelo "Topiwala y Sinclair" (P_m simulado), es decir, solo un 50% de los datos predichos se encuentran dentro del límite del 20% del valor real, por lo que no resultaría conveniente emplear el modelo "Topiwala y Sinclair" para predecir valores de P_m . Sin embargo, se ha empleado con resultados muy satisfactorios, atendiendo a los resultados de Sánchez *et al.* (2008) y García-Cubero *et al.* (2017), por lo que se trata de un modelo validado. Es posible que los errores de predicción observados en este trabajo pudieran derivar de una acumulación de errores, empezando por el error experimental de las medidas de P , ya que, aunque el método de medida de velocidad de fotosíntesis es de elevada fiabilidad, en bibliografía se han publicado valores de desviación estándar relativa de las medidas de entre un 8 y un 10% (Brindley *et al.*, 2010; Brindley *et al.*, 2011; Fernández-Sevilla *et al.*, 2018), pudiendo este error acumularse en el tratamiento de los datos subsiguiente: modelado de las medidas con el modelo mecanístico de Camacho Rubio *et al.* (2003), que también está validado y es de elevada fiabilidad, pero posiblemente introduce un pequeño error adicional, y

finalmente, modelado de los parámetros empleando el modelo de tipo Arrhenius, con su correspondiente error. Por otra parte, el set de datos empleado en el ajuste de P_m frente a la temperatura es algo reducido, de tan solo cuatro puntos para el ajuste. Este hecho podría introducir un error de mayor magnitud que la acumulación de errores descrita anteriormente y, además, reduce la significación estadística de los resultados. El problema podría radicar aquí entonces. Sería conveniente, como propuesta para trabajos futuros, ampliar el set de datos ampliando el rango y el número de temperaturas ensayadas, de forma que se pudiera realizar el ajuste final con al menos de 5 a 7 puntos, lo que supone obtener de 5 a 7 *curvas P-I* completas para 5 a 7 temperaturas diferentes. Otro aspecto de mejora podría ser el software empleado para realizar las regresiones no lineales, ya que programa Sigmaplot tiene la ventaja de ser un software sencillo de manejar e intuitivo, pero tiene la desventaja de que su potencia de cálculo es más limitada en comparación con la de otros tipos de software de simulación, como por ejemplo el programa de simulación Matlab. Además, el tipo de función a ajustar, con varios términos de tipo exponencial como tienen los modelos de tipo Arrhenius presentados, presenta mayores problemas de convergencia durante el ajuste debido a que si existen varias soluciones óptimas que corresponden a mínimos locales de la función, un software con limitada potencia de cálculo, como Sigmaplot, tiene menos recursos en cuanto a algoritmos de optimización se refiere, mientras que otros tipos de software de simulación que sean programables sí podrían solventar este inconveniente y converger en una solución óptima más adecuada.

Finalmente, cabe destacar la utilidad que podría presentar la ampliación del set de datos en otro sentido al comentado en el apartado anterior si se emplea el modelo mecanístico de fotosíntesis propuesto por Camacho Rubio *et al.* (2003). La velocidad de fotosíntesis máxima o P_m es un parámetro físico que se corresponde con la asíntota de la *curva P-I*, como queda reflejado en la *Figura 2*. Por tanto, podría resultar de menor peso para este parámetro utilizar el modelo "sigmoideo Hill 3-p" o el modelo "Camacho-Rubio LC", al tener ambos un ajuste muy bueno y similar. Sin embargo, como introducen Camacho Rubio *et al.* (2003), además de la ampliación del número de *curvas P-I* de 5 a 7 a diferentes valores de temperatura podría resultar, de cara al diseño de fotobiorreactores, una opción muy interesante si se completara el set de datos experimentales con ensayos de luz intermitente a las mismas temperaturas, lo cual permitiría la obtención de un cuarto parámetro, β , que se obtiene en la solución del modelo para el caso de luz intermitente, y este parámetro permitiría mejorar las posibles aplicaciones en el diseño de reactores industriales para el cultivo de microalgas por la relación que guarda con la fluido-dinámica y la configuración del sistema, y con la frecuencia y/o el movimiento de las células en el interior del reactor. β es la frecuencia característica del sistema y representa la tasa máxima específica de fotosíntesis. Su definición se corresponde con la *Ecuación 24*.

$$\beta = \frac{r_m^*}{a^*}$$

Ecuación 24. Definición del parámetro β en Camacho Rubio *et al.* (2003).

Más concretamente, se estima que este estudio podría ser especialmente útil en el diseño de fotobiorreactores de tipo raceway o en fotobiorreactores planos con *Nannochloropsis gaditana*. Las ecuaciones propuestas por Camacho Rubio *et al.* (2003) resultan bastante complejas de resolver, ya

que presentan ecuaciones diferenciales. Por ello, se plantea como un campo de trabajo para el futuro, el empleo de una versión simplificada de este modelo (*Ecuación 25*), publicada por Fernández-Sevilla *et al.* (2018), con la que se estima sería suficiente un conjunto de 10 a 15 ensayos de luz intermitente por temperatura ensayada, lo cual supone un esfuerzo extra mínimo con un enorme rendimiento analítico posterior.

$$\frac{P}{P_m} = \frac{\nu}{\beta} * (1 - e^{-\frac{\beta * I_{av}}{\nu * \alpha}})$$

Ecuación 25. Simplificación del modelo de Camacho Rubio *et al.* (2003) propuesta por Fernández-Sevilla *et al.* (2018) para el caso de luz intermitente.

El modelo propuesto es una ecuación algebraica simple que permite obtener el parámetro β por regresión no lineal de los datos experimentales de productividad fotosintética o de P vs. frecuencia, ν . El valor de este cuarto parámetro completaría el conjunto de valores de los parámetros que se han obtenido durante el desarrollo del presente TFG con el modelo de Camacho Rubio *et al.* (2003): P_m , α y κ .

5. CONCLUSIONES

A partir del desarrollo del presente trabajo experimental cabe destacar las siguientes conclusiones:

1. Se ha comprobado que para describir la respuesta fotosintética de las microalgas frente a la irradiancia de luz continua se pueden emplear tanto el modelo “sigmoideo Hill 3-p” como el modelo “Camacho Rubio LC”. El ajuste de las *curvas P-I* obtenidas con cultivos diluidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana* a diferentes temperaturas empleando estos modelos ha demostrado ser adecuada.
2. Los valores obtenidos para el parámetro P_m de los modelos “sigmoideo Hill 3-p” y “Camacho-Rubio LC” son similares entre sí. *Nannochloropsis gaditana* presenta un máximo para P_m a la temperatura de 20 °C, siendo éste igual a 1.31 $\mu\text{mol O}_2 \cdot (\text{g biomasa} \cdot \text{s})^{-1}$; en cuanto al parámetro I_k del modelo “sigmoideo Hill 3-p”, se obtienen valores inferiores a 100 $\mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ en el intervalo de temperaturas de 20-25 °C; para el parámetro α del modelo “Camacho-Rubio LC” se obtienen valores que son aproximadamente el doble de los valores de I_k a cada una de las temperaturas ensayadas, encontrándose el valor mínimo para estos dos parámetros a la temperatura de 25 °C.
3. La regresión no lineal de los datos de μ (obtenidos por estimación a partir de P) al modelo “Molina” ha resultado adecuada y, en cuanto a los valores obtenidos para los parámetros del modelo, los valores de μ_{max} se comparan muy bien con los publicados en trabajos realizados con cultivos densos de la misma microalga, mientras que los valores de I_k son muy similares a los valores de I_k del modelo “sigmoideo Hill 3-p”, aunque son bastante superiores a los de bibliografía, por lo que los resultados obtenidos con cultivos diluidos no son necesariamente extrapolables a cultivos densos.

4. El análisis de la dependencia de la respuesta fotosintética con la temperatura ha demostrado que los parámetros directamente dependientes de la misma son P_m y μ_{max} , pues la representación de los mismos frente a la temperatura se ajusta bien a la descripción general para la dependencia del crecimiento de microorganismos en función de la temperatura.

5. El rango de temperaturas estudiado se ha comprobado que abarca las conocidas como región de Arrhenius, región súper-óptima y región sub-Arrhenius. Por ello, se han empleado modelos de tipo Arrhenius para describir este comportamiento, con los siguientes resultados: 1) El modelo propuesto por Topiwala y Sinclair (1971) en su versión original se ha usado para la dependencia de μ_{max} con la temperatura, mientras que una versión modificada, considerando el parámetro P_m en lugar de μ_{max} , se ha usado para P_m , obteniéndose ajustes suficientemente satisfactorios, aunque se ha considerado que el set de datos empleado es algo reducido y sería conveniente ampliarlo. Cuando se compara el ajuste de los datos de P_m obtenidos con el modelo "sigmoideo Hill 3-p" con el ajuste de los datos de P_m obtenidos con el modelo "Camacho-Rubio LC", se prefiere el segundo. 2) En cuanto al modelo propuesto por Esener *et al.* (1983), el ajuste de los datos de P_m presentaba unos estimadores estadísticos inaceptables, por lo que se ha descartado su uso en el presente estudio.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aiba S. (1982). Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv. Biochem. Eng.* 23: 85-156

Alonso, S., Babino, Á., Pellegrino, V. (2020). Fotosíntesis. Recuperado de: <http://repositorio.cfe.edu.uy/bitstream/handle/123456789/751/Fotosintesis.pdf?sequence=2>

Amaya Silva, E. R. (2019). *Sustentabilidad de la PTAR El Salitre y fotobiorreactores evaluados con energía en modelos dinámicos* (Tesis doctoral inédita). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/11349/23860>

Bannister, T. T. (1979). Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. *Limnol. Oceanogr.* 24: 76-96.

Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. En *Progress in industrial microbiology* (Vol. 35, pp. 313-321). Elsevier.

Brendel, P. J., Luther, G. W. I. (1995). Development of a gold amalgam voltammetric microelectrode for the determination of dissolved Fe, Mn, O₂, and S(-II) in porewaters of marine and freshwater sediments. *Environmental Science & Technology*, 29(3), 751-761.

Brindley, C., Ación, F. G., Fernández-Sevilla, J. M. (2010). The oxygen evolution methodology affects photosynthetic rate measurements of microalgae in well-defined light regimes. *Biotechnology and bioengineering*, 106(2), 228-237.

Brindley, C., Fernández, F. A., Fernández-Sevilla, J. M. (2011). Analysis of light regime in continuous light distributions in photobioreactors. *Bioresource technology*, 102(3), 3138-3148.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

- Brindley, C., Jiménez-Ruíz, N., Acién, F. G., Fernández-Sevilla, J. M. (2016). Light regime optimization in photobioreactors using a dynamic photosynthesis model. *Algal research*, 16, 399-408.
- Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M. C., González-López, C. V., López-Rosales, L., Contreras-Gómez, A., Molina-Grima, E. (2020). Use of continuous culture to develop an economical medium for the mass production of *Isochrysis galbana* for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 1-13.
- Camacho Rubio, F., García Camacho, F., Fernández Sevilla, J. M., Chisti, Y., Molina Grima, E. (2003). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnology and bioengineering*, 81(4), 459-473.
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1275-1288.
- Colijn, F., Gieskes, W. W. C., Zevenboom, W. (1983). The measurement of primary production: problems and recommendations. *Hydrobiological Bulletin*, 17(1), 29-51.
- de la Rosa Acosta, M. Á. (2005). *La luz en Biología: Aplicaciones de interés industrial y agrícola* (No. 18). Universidad de Sevilla.
- Davison, I. R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of phycology*, 27(1), 2-8.
- Edding, M., Tala, F., Vásquez, J. (2006). Fotosíntesis, productividad y algas marinas. *Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena*, 1-39.
- Eilers, P. H. C., Peeters, J. C. H. (1988). A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological modelling*, 42(3-4), 199-215.
- Esener, A. A., Roels, J. A., Kossen, N. W. F. (1983). Theory and applications of unstructured growth models: kinetic and energetic aspects. *Biotechnology and bioengineering*, 25(12), 2803-2841.
- Fernández-Sevilla, J. M., Brindley, C., Jiménez-Ruíz, N., Acién, F. G. (2018). A simple equation to quantify the effect of frequency of light/dark cycles on the photosynthetic response of microalgae under intermittent light. *Algal research*, 35, 479-487.
- Flores, C. C., Castro, J. M. P., Cotera, L. B. F., Villanueva, R. O. C. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8), 450-456.
- Franks, P. A., Hall, R. J., Linklater, P. M. (1980). Mechanistic model of the growth of *Streptococcus cremoris* HP at super optimal temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(7), 1465-1487.
- García-Cubero, R., Moreno-Fernández, J., García-González, M. (2017). Modelling growth and CO₂ fixation by *Scenedesmus vacuolatus* in continuous culture. *Algal Research*, 24, 333-339.
- Gaviria Zapata, E. D. J. (2006). Evolución de los modelos explicativos de la fotosíntesis a través de las representaciones externas. González, J., Pastenes, C., Horton, P. (2001). Efecto de la temperatura, el

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

estrés hídrico y luminoso sobre la heterogeneidad del fotosistema II en cuatro variedades de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista chilena de historia natural*, 74(4), 779-791.

Grobbelaar, J. U. (2000). Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 201-206.

Hancke, T.B., Hancke, K., Johnsen, G., Sakshaug, E. (2008a). Rate of O₂ production derived from pulse-amplitude-modulated fluorescence: Testing three bio-optical approaches against measured O₂-production rate. *Journal of Phycology*, 44, 803–813.

Hancke, K., Hancke, T. B., Olsen, L. M., Johnsen, G., Glud, R. N. (2008b). Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and 14C assimilation. *Journal of Phycology*, 44(2), 501-514.

Hill, R., Bendall, F. A. Y. (1960). Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature*, 186(4719), 136-137.

Janssen, M., Kuijpers, T. C., Veldhoen, B., Ternbach, M. B., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. H. (1999). Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13–87 s. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 35, pp. 323-333). Elsevier.

Janssen, M., Slenders, P., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. (2001). Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4-5), 298-305.

Jassby, A. D., Platt, T. (1976). Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and oceanography*, 21(4), 540-547.

Jensen, G. S. (2001). Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 3, 24-30.

Junior, W. G. M., Gorgich, M., Corrêa, P. S., Martins, A. A., Mata, T. M., Caetano, N. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, 735562.

Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N., Pytkowicz, R. M. (1967). Preparation of artificial seawater. *Limnology and oceanography*, 12(1), 176-179.

Kusmayadi, A., Suyono, E. A., Nagarajan, D., Chang, J. S., Yen, H. W. (2020). Application of computational fluid dynamics (CFD) on the raceway design for the cultivation of microalgae: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(4-5), 373-382.

Lam, H. L. Y., Bungay, H. R., Culotta, L. G. (1986). An engineer looks at photosynthesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 13(1), 37-73.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

- Ledda, C., Villegas, G. R., Adani, F., Fernández, F. A., Grima, E. M. (2015). Utilization of centrate from wastewater treatment for the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana* biomass at pilot-scale. *Algal research*, 12, 17-25.
- Lubián, L. M. (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa*, 4, 287-293.
- Luo, H. P., Al-Dahhan, M. H. (2004). Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnology and bioengineering*, 85(4), 382-393.
- Ma, Y., Wang, Z., Yu, C., Yin, Y., Zhou, G. (2014). Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. *Bioresource technology*, 167, 503-509.
- Marquardt, D. W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the society for Industrial and Applied Mathematics*, 11(2), 431-441.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Mérida, L. G. R., Lopes, E. J., Zepka, L. Q. (2013). Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias. *Revista Ciencia y Tecnología*, 6(2), 9-19.
- Molina Grima, E., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J. A., Fernández-Sevilla, J. M., Acien Fernández, F. G., Contreras Gómez, A. (1994). A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 167-173.
- Nedbal, L., Tichý, V., Xiong, F., Grobbelaar, J. U. (1996). Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *Journal of Applied Phycology*, 8(4-5), 325-333.
- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, 20(4-6), 459-466.
- Perner-Nochta, I., Posten, C. (2007). Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 131(3), 276-285.
- Platt, T., Jassby, A. D. (1976). The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton 1. *Journal of Phycology*, 12(4), 421-430.
- Priyadarshani, I., Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89-100.
- Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648. doi:10.1007/s00253-004-1647-x
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Fuerstenberg, S. I., Tae, H., Settlage, R. E., Boore, J. L., Posewitz, M. C. (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature communications*, 3(1), 1-11.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

- Richmond, A. (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 441-451.
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. In *Asian pacific phycology in the 21st Century: Prospects and challenges* (pp. 33-37). Springer, Dordrecht.
- Richmond, A., Hu, Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*: Second edition. John Wiley & Sons.
- Rodríguez, J. C. (2014). Determinación de los requerimientos nutricionales, optimización de las condiciones de cultivo y estabilidad de la biomasa microalgal de *Nannochloropsis gaditana* para su uso en acuicultura (Tesis doctoral, Universidad de Almería).
- Rumin, J., Nicolau, E., de Oliveira, R. G., Jr., Fuentes-Grünwald, C., Picot, L. (2020). Analysis of scientific research driving microalgae market opportunities in europe. *Marine Drugs*, 18(5) 264.
- San Pedro, A., González-López, C. V., Acien, F. G., Molina-Grima, E. (2013). Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource technology*, 134, 353-361.
- Sánchez, J. F., Fernández-Sevilla, J. M., Acien, 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.
- Schügerl, K., Bellgardt, K. H. (2000). *Bioreaction Engineering. Modeling and Control*. Ed. Springer.
- Sepúlveda, C., Acien, F. G., Gómez, C., Jiménez-Ruiz, N., Riquelme, C., Molina-Grima, E. (2015). Utilization of centrate for the production of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Research*, 9, 107-116.
- Shaw, M. K. (1967). Effect of abrupt temperature shift on the growth of mesophilic and psychrophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*, 93(4), 1332-1336.
- Simionato, D., Sforza, E., Carpinelli, E. C., Bertucco, A., Giacometti, G. M., Morosinotto, T. (2011). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: effects on lipids accumulation. *Bioresource technology*, 102(10), 6026-6032.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Starkenburg, S. R., Kwon, K. J., Jha, R. K., McKay, C., Jacobs, M., Chertkov, O., Twary, S., Rocap, G., Cattolico, R. A. (2014). A pangenomic analysis of the *Nannochloropsis* organellar genomes reveals novel genetic variations in key metabolic genes. *BMC genomics*, 15(1), 212.
- Steele, J. H. (1977). *Microbial kinetics and dynamics in chemical reactor theory*. Lapidus, L., Amundson, N. R. (Eds.), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp: 405-483.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO REGÍMENES DE LUZ CONTINUA.

- Tamiya, H., Iwamura, T., Shibata, K., Hase, E., Nihei, T. (1953). Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochimica et biophysica acta*, 12(1-2), 23-40.
- Tamiya, H. (1957). Mass culture of algae. *Annual Review of Plant Physiology*, 8(1), 309-334.
- Terry, K. L. (1986). Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(7), 988-995.
- Topiwala, H., Sinclair, C. G. (1971). Temperature relationship in continuous culture. *Biotechnology and bioengineering*, 13(6), 795-813.
- Van Uden, N., & Madeira-Lopes, A. (1976). Yield and maintenance relations of yeast growth in the chemostat at superoptimal temperatures. *Biotechnology and bioengineering*, 18(6), 791-804.
- Vejrazka, C., Janssen, M., Benvenuti, G., Streefland, M., Wijffels, R. H. (2013). Photosynthetic efficiency and oxygen evolution of *Chlamydomonas reinhardtii* under continuous and flashing light. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(4), 1523-1532.
- Vejrazka, C., Streefland, M., Wijffels, R. H., Janssen, M. (2015). The role of an electron pool in algal photosynthesis during sub-second light–dark cycling. *Algal research*, 12, 43-51.
- Vogelaar, J. C. T., Klapwijk, A., Van Lier, J. B., Rulkens, W. H. (2000). Temperature effects on the oxygen transfer rate between 20 and 55 C. *Water research*, 34(3), 1037-1041.
- Water.usgs.gov. 2020. *DOTABLES*. [online] *DOTABLES* website: <<https://water.usgs.gov/water-resources/software/DOTABLES/>> [Fecha de acceso: 1 de Junio de 2020].
- Wu, X., Merchuk, J. C. (2001). A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chemical engineering science*, 56(11), 3527-3538.
- Zhang, D., Dechatiwongse, P., del Rio-Chanona, E. A., Maitland, G. C., Hellgardt, K., Vassiliadis, V. S. (2015). Modelling of light and temperature influences on cyanobacterial growth and biohydrogen production. *Algal Research*, 9, 263-274.
- Zonneveld, C. (1998). A cell-based model for the chlorophyll a to carbon ratio in phytoplankton. *Ecological Modelling*, 113(1-3), 55-70.

ANEXOS

Anexo 1. Valores de solubilidad de oxígeno a T = 15, 20, 25, 28 °C y salinidad de 35 g·L⁻¹

Temperatura (°C)	Solubilidad de O ₂ , mg·L ⁻¹
15	8.13
20	7.39
25	6.77
28	6.44

Tabla 13. Valores de solubilidad de oxígeno a distintas temperaturas y para una salinidad de 35 g·L⁻¹.

Anexo 2. Polinomios de calibrado

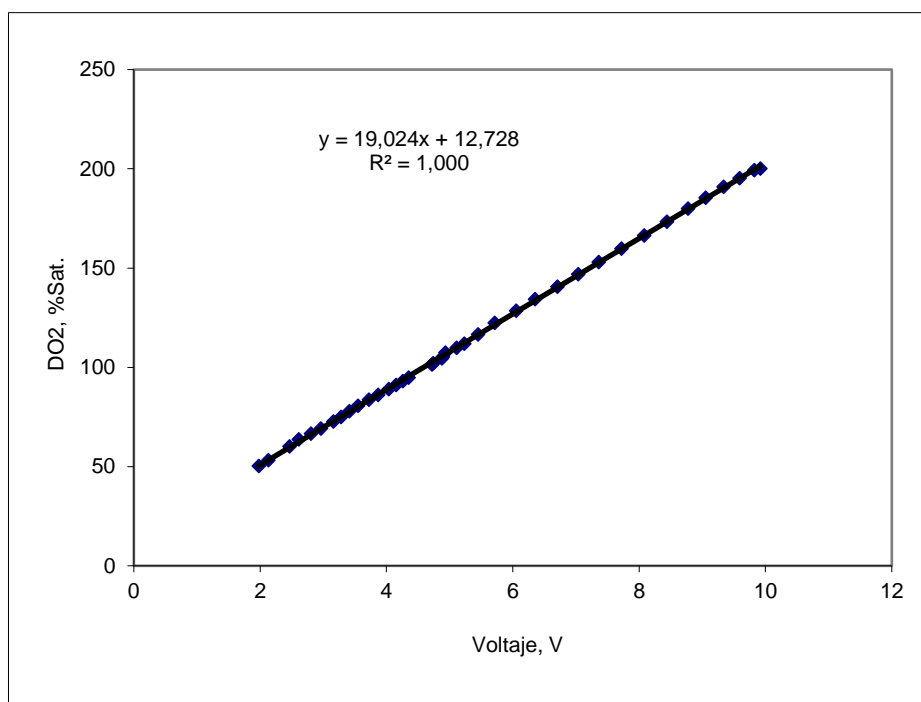


Figura 29. Calibración de la relación entre el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto y el voltaje medido.

Voltaje-Saturación de oxígeno disuelto (%): se emplea para convertir los datos registrados mediante el sistema de adquisición de datos, cuya lectura se hace en voltios. En estos casos el ajuste siempre es muy bueno y de una elevada reproducibilidad si se emplea el mismo tipo de sensor amperométrico, obteniéndose la siguiente curva de calibrado:

$$DO_2, \%Sat. = 19.024 \cdot Voltaje + 12.728$$

Ecuación 26. Curva de calibrado Voltaje – Saturación de OD (%).

Voltaje-Irradiancia: se emplea para convertir a intensidad de luz ($\mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$) el voltaje que proporciona a los diodos la fuente de luz. Se han establecido los siguientes polinomios (Tablas 14 y 15), en los que y es la irradiancia, en $\mu\text{mol fotones} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$, y x es el voltaje procedente de la fuente de luz, en mV. Ambas calibraciones fueron llevadas a cabo con antelación a la realización de los experimentos.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO RÉGIMENES DE LUZ CONTINUA.

Ensayos con <i>Nannochloropsis gaditana</i> a T = 20 °C y 25 °C.	
De 0 mV a 299 mV	$y = -2.621 \cdot 10^{-6}x^3 + 1.501 \cdot 10^{-3}x^2 + 4.768 \cdot 10^{-2}x + 13.21$
De 300 mV a 750 mV	$y = 0.3293x - 6.7229$
De 751 mV a 10000 mV	$y = -4.106 \cdot 10^{-10}x^3 - 5.796 \cdot 10^{-6}x^2 + 0.277x + 9.141$

Ensayos con <i>Nannochloropsis gaditana</i> , a T = 15 °C y 28 °C.	
De 0 mV a 500 mV	$y = -1.097 \cdot 10^{-6}x^3 + 9.281 \cdot 10^{-4}x^2 + 0.3065x + 1.112$
De 501 mV a 5000 mV	$y = 1.395 \cdot 10^{-9}x^3 - 3.270 \cdot 10^{-5}x^2 + 0.5632x - 22.75$

Tablas 14 y 15. Calibración V-I. Los experimentos a T = 15 °C y 28 °C tienen un calibrado diferente debido a la sustitución de varios LEDs de los paneles.

Anexo 3. Datos de μ -I estimados a las cuatro temperaturas a partir de P.

T, °C	I, $\mu\text{mol fotones (m}^2\cdot\text{s)}^{-1}$	μ neta, h ⁻¹
15	509.15	0.0301
	249.26	0.0307
	118.60	0.0114
	1796.13	0.0248
	64.27	0.0033
	984.01	0.0253
	381.84	0.0248
	1410.22	0.0238
	753.18	0.0241
	3104.29	0.0238
20	279.93	0.1041
	157.93	0.0975
	77.99	0.0421
	998.13	0.1198
	45.29	-0.0106
	536.67	0.1196
	240.25	0.1085
	776.89	0.1066
	410.21	0.0977
	1643.97	0.1041
25	279.93	0.0758
	157.93	0.0684
	77.99	0.0429
	998.13	0.0952
	536.67	0.0931
	240.25	0.0720
	776.89	0.0885
	45.29	0.0146
	410.21	0.0819
	1643.97	0.0706
28	509.15	0.0360
	249.26	0.0244
	118.60	0.0028
	1796.13	0.0199

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE CULTIVOS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* BAJO RÉGIMENES DE LUZ CONTINUA.

	64.27	-0.0083
	984.01	0.0372
	381.84	0.0441
	1410.22	0.0402
	753.18	0.0409
	3104.29	0.0253

Tabla 16. Datos de μ -I estimados a las cuatro temperaturas a partir de P.