

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Química



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de: Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos; en el campo de Diseño y Optimización de Reactores y Procesos.

TITULO: Producción de microalgas con fines alimenticios y energéticos.

Grupo de Innovación en Biotecnología (GiiB): Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB - UNL) e Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC - CONICET y UNL)

Autor: Josué Miguel Heinrich

Director: Prof. Horacio A. Irazoqui, PhD.

Miembros del Jurado de la Tesis: Dra. Ester CHAMORRO (Facultad Regional Resistencia - Universidad Tecnológica Nacional); Dr. Guillermo SIHUFE (Universidad Nacional del Litoral - CONICET); Mg. Liliana Santiago (Universidad Nacional del Litoral)

-2016-

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a mi director, amigos y compañeros de laboratorio *Japo*, Nacho, Fausto, Rolo, Mati, Emer, Ceci, Brenda, Manu y Franco. A mi familia, amigos y compañeros de carrera. A los Sres. Ramón Saavedra, Antonio Negro y Gerardo Rintoul. A los miembros del jurado. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB- UNL) y al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC).

A todos ustedes, muchas gracias.

INDICE.

Resumen.	vii
Abstract.	ix
Símbolos, Abreviaturas y Unidades.	xi
Introducción.	1
Objetivos.	23
Capítulo 1. Caracterización del crecimiento de la cepa <i>N. oleoabundans</i> .	27
Capítulo 2. Modelo cinético para la propagación fotoautotrófica de microalgas.	59
Capítulo 3. Escalado en Reactores PP-PTLC.	81
Conclusiones.	113
Bibliografía.	117
Anexos.	131

RESUMEN.

El término microalgas, hace referencia a un conjunto de microorganismos microscópicos fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. En general, debido a su estructura simple, son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y la utilización de energía solar para la producción de biomasa. Se encuentran presentes en todos los cuerpos de agua y en la mayoría de los ambientes terrestres, incluso en los más extremos. Debido a su gran diversidad, las aplicaciones de las microalgas van desde el empleo de la biomasa en la alimentación humana o animal y el tratamiento de efluente; hasta su uso como plataformas biotecnológicas para la elaboración de productos de interés tecnológico y alto valor comercial como ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, enzimas, proteínas, productos bio-activos utilizados por la industria farmacéutica, etc. No obstante al extenso desarrollo logrado en las últimas dos décadas, existen aún numerosos problemas que son necesario resolver a fin de lograr una tecnología de cultivo eficiente y rentable.

En este trabajo se procura evaluar la factibilidad técnica de producir materias primas derivadas de la biomasa algal. No sólo se analiza la capacidad de producción en términos de biomasa producida por año por hectárea, sino que también se consideran aspectos vinculados con la estrategia que debería adoptarse en función del compuesto final buscado. Como resultado se observó que, dependiendo del producto final deseado, la estrategia de producción a adoptar deber ser diferente. La producción de proteínas deberá realizarse en condiciones repletas de nitrógeno; para iniciar la producción de triglicéridos es ineludible la restricción de la administración de nitrógeno en el medio; y, si se desea producir almidón, entonces la cosecha de las microalgas deberá realizarse durante las últimas horas del primer o segundo día luego de iniciada la inanición por nitrógeno.

En cuanto a los rendimientos de los cultivo, se estimó la capacidad de producción de biomasa en un sistema de cultivo fotoautotrófico, el cual es una combinación de las alternativas de fotobioreactores tipo columna, tubular y *airlift*. Este sistema permite una distribución efectiva del flujo de energía radiante sobre la superficie iluminada, evitando los fenómenos de estrés oxidativo y estratificación de la luz en el cultivo. Dicha estimación se realizó teniendo en cuenta la cantidad de luz recibida por el reactor, considerando su geometría, su ubicación geográfica, y los registros del valor de radiación solar incidente para dicha ubicación. A partir de los resultados conseguidos es posible suponer que este sistema sería una opción válida para la producción de microalgas y metabolitos derivados; la productividad anual del sistema de cultivo alcanzaría el valor de 40 ton ha⁻¹ año⁻¹.

ABSTRACT.

The term microalgae, refers to a group of microscopic photosynthetic microorganisms than can grow in a heterotrophic or autotrophic way. In general, due to its simple structure, they are highly efficient in CO₂ fixation and in the use of solar energy for biomass production. Typically, microalgae are present in freshwater and marine systems, but they can be found in soil and in extreme environments. Because of its diversity, microalgae can be used for many purposes: human nutrition and animal feed; wastewater treatment; biofuel production; the production of nutraceuticals and ingredients for the pharmaceutical industry; and in the production of recombinant proteins. Despite of the developments achieved in the last two decades, there are still many problems to be resolved in order to obtain an efficient technology for the production of microalgae.

In this work the technical feasibility of producing raw materials derived from microalgae biomass is assessed. Two main factors are considered: the production capacity, in terms of biomass generated per year per hectare; and, the strategy that should be adopted according to the target compound. As a result it is observed that depending on the desired product, the production strategy to adopt must be different: protein production must be performed in nitrogen replete conditions; for the production of triglycerides it is unavoidable to perform a free nitrógeno culture stage; and, to produce starch, microalgae biomass should be harvested during the last hours of the first or second day after the initiation of a nitrogen free culture phase.

Regarding the production yields, the productivity of a novel photobioreactor (PBR) was estimated. This photobioreactor is a combination of a tubular PBR; a column-type PBR and an air-lift PBR. The proposed design allows an effective distribution of the radiant energy flux over the illuminated surface, avoiding the presence of the phenomena of oxidative stress and stratification of light in culture. The productivity estimation was made considering its geographical location; the values of the incident solar radiation at that location; and taking into account the actual amount of light received by the photobioreactor because of its geometry and configuration. Considering the predicted results, it can be assumed that the system could be a valid option for the production of microalgae and intracellular metabolitos, reaching an annual productivity of 40 tons of dry biomass per hectarea per year.

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y UNIDADES.

Capítulo 1

FBR:	fotobioreactor
AG:	Ácidos graos
TAG:	Triglicéridos
LP:	Lípidos polares
LT:	Lípidos totales
r_x :	velocidad de crecimiento [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$]
μ_x :	velocidad de crecimiento específica [h^{-1}]
r_S :	velocidad de producción de almidón [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$]
μ_S :	velocidad específica de producción de almidón [h^{-1}]
r_{TAG} :	velocidad de producción de TAG [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$]
μ_{TAG} :	velocidad específica de producción de TAG [h^{-1}]
FD:	densidad de flujo de fotones [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$]
PAR:	velocidad de absorción de fotones [$\mu\text{mol h}^{-1} \text{L}^{-1}$]
PAR_{sp} :	velocidad de absorción de fotones por unidad de biomasa [$\mu\text{mol h}^{-1} \text{gr}^{-1}$]
QY:	rendimiento cuántico

Capítulo 2

FBR	Fotobioreactor
CER	Campo de Energía Radiante
VIS	rango de longitudes de onda $400 < \lambda < 700\text{nm}$
t	tiempo [<i>día</i>]

x	concentración de biomasa [$gr L^{-1}$]
r_x	velocidad de crecimiento celular [$gr L^{-1} día^{-1}$]
\bar{r}_x	velocidad de crecimiento celular promedio en el reactor [$gr L^{-1} día^{-1}$]
λ	longitud de onda [nm]
$\alpha_\lambda(t)$	coeficiente espectral de absorción de energía radiante [cm^{-1}]
$\xi_\lambda(t)$	coeficiente espectral de dispersión de energía radiante [cm^{-1}]
$B(\underline{\Omega}' \cdot \underline{\Omega})$	función de fase asociada al fenómeno de dispersión de energía radiante
$n_\lambda(\underline{r}, t)$	distribución espectral de densidad de fotones [$\mu mol de fotones mL^{-1} nm^{-1}$]
$n_{vis}(\underline{r}, t)$	densidad de fotones-VIS, con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol de fotones mL^{-1}$]
$r_\lambda^{abs}(\underline{r}, t)$	distribución espectral de velocidades volumétricas locales de absorción de fotones [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1} nm^{-1}$]
$r_{vis}^{abs}(\underline{r}, t)$	velocidades volumétricas local de absorción de fotones-VIS, con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1}$]
$\bar{r}_{vis}^{abs}(t)$	velocidades volumétricas promedio de absorción de fotones-VIS, con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1}$]
$g(r_{vis}^{abs}, t)$	función de distribución de volúmenes de reactor en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones r_{vis}^{abs}
$g'(r_{vis}^{abs}, t)$	función de distribución de fracciones del reactor, en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones r_{vis}^{abs}
R_{vis}^{abs}	velocidad celular de absorción de fotones-VIS, con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1}$]

Capítulo 3

FBR	Fotobioreactor
CER	Campo de Energía Radiante
CIM	centro de informaciones meteorológicas.
VIS	rango de longitudes de onda $400 < \lambda < 700nm$
d	día del año
$g'(r_{vis}^{abs}, x, h, d, H)$	función de distribución de fracciones del reactor, en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones r_{vis}^{abs}
h	hora del día
$I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	Intensidad espectral de radiación [$J m^{-2} s^{-1} sr^{-1} nm^{-1}$]
$I_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	Intensidad de radiación con $400 < \lambda < 700nm$ [$J m^{-2} s^{-1} sr^{-1}$]
$n_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	Intensidad espectral en términos de número fotones [$\mu mol m^{-2} s^{-1} sr^{-1} nm^{-1}$]
$n_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$	Intensidad en términos de número de fotones con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol m^{-2} s^{-1} sr^{-1}$]
$q_{Tot}(\underline{r}, t)$	densidad de flujo de energía [$W m^{-2}$]
\underline{r}	vector posición
r_x	velocidad de crecimiento celular [$gr L^{-1} día^{-1}$]
\bar{r}_x	velocidad de crecimiento celular promedio en el reactor [$gr L^{-1} día^{-1}$]
$r_{\lambda}^{abs}(\underline{r}, t)$	distribución espectral de velocidades volumétricas locales de absorción de fotones [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1} nm^{-1}$]
$r_{vis}^{abs}(\underline{r}, t)$	velocidades volumétricas local de absorción de fotones con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1}$]
$\bar{r}_{vis}^{abs}(t)$	velocidades volumétricas promedio de absorción de fotones con $400 < \lambda < 700nm$ [$\mu mol de fotones mL^{-1} s^{-1}$]

$\underline{\hat{s}}''$	posición del sol
t	tiempo
x	concentración de biomasa [$gr L^{-1}$]

INTRODUCCIÓN

1.- MICROALGAS.

Las microalgas fueron evolutivamente los primeros organismos con capacidad de realizar fotosíntesis y los principales agentes en la creación de las condiciones de la actual atmósfera terrestre. Son clave en el equilibrio planetario ya que la dinámica del dióxido de carbono en el planeta está, en gran medida, determinada por ellas (son responsables del 50% de la fotosíntesis global). Las microalgas se encuentran principalmente en el agua (dulce o salada) pero pueden encontrarse en prácticamente cualquier ambiente del planeta, desde algunas montañas nevadas hasta en la superficie de rocas en desiertos (Spolaore, P. *et al.*, 2005; Sierra, E. *et al.*, 2007).

La ficología o algología es la disciplina que estudia las algas. El campo de la ficología es muy extenso: existe una enorme variedad de microalgas, abarcando una gran diversidad de géneros (Figura 1.1). El término microalgas incluye a especies con diferentes características metabólicas, fenotípicas y genotípicas. Más aún, con esa designación se encierra tanto a microalgas eucariotas como a cianobacterias (procariotas) (Olaiola, M., 2003). Esta diversidad en formas, tamaños y composiciones hace que las mismas tengan el potencial de ser utilizadas en una enorme cantidad de procesos que van desde la bio-remediación de aguas contaminadas hasta la producción de proteínas recombinantes por ingeniería genética (Borowitzka, M.A., 1992).

En la mayoría de los casos actúan como el eslabón primario de la cadena alimenticia, produciendo materia orgánica a partir de CO_2 , luz, agua y sales. Sin embargo las algas pueden ser autótrofas o heterótrofas. Si son autótrofas, utilizan compuestos inorgánicos como fuente de carbono; a su vez pueden ser foto-autótrofas si utilizan la luz como fuente de energía o quimio-autótrofas cuando oxidan compuestos inorgánicos para obtener la energía. Si son heterótrofas, las algas utilizan compuestos

orgánicos como fuente de carbono para el crecimiento. Algunas algas, particularmente las flageladas, son auxótrofas, requiriendo una pequeña cantidad de un compuesto orgánico para su crecimiento en el medio de cultivo; no como una fuente de energía, sino vitaminas, aminoácidos o factores de crecimiento. Algunas algas fotosintéticas son capaces de utilizar simultáneamente compuestos orgánicos suministrados en el medio de cultivo y luz como fuente de energía, en estos casos se utiliza la designación de mixotróficas (Cerón García, M.C. *et al*, 2005).

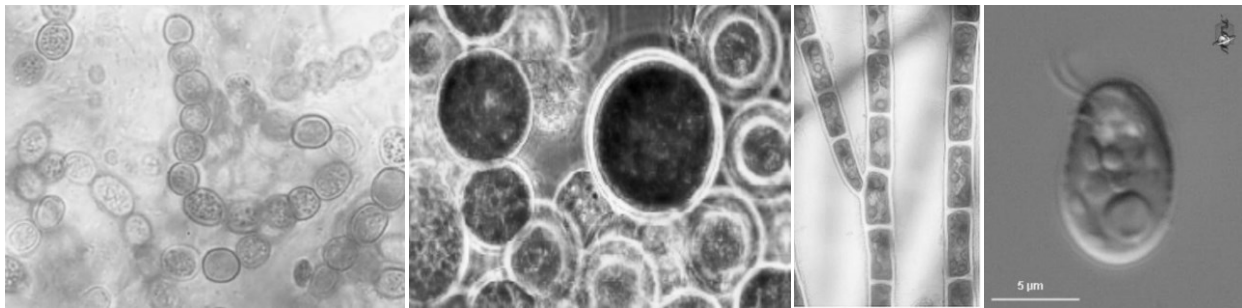


Figura 1.1: Micrografías de algunas especies de microalgas. (a) *Nostoc commune*. (b) *Chlorella pyrenoidosa*. (c) *Rhodothamniella floridula* Nägeli. (d) *Chroomona* sp..

Para la clasificación de las microalgas se utilizan distintos criterios, tales como tipos y combinaciones de los pigmentos fotosintéticos presentes; la naturaleza química de los productos de reserva y de la pared celular; los caracteres bioquímicos derivados de la citología y morfología de los organismos; etc. Las algas se agrupan en forma más general en cuatro grupos según la taxonomía propuesta por Lee Robert Edward (Lee, R.E., 2008):

- 1- Algas procariotas. Las cianobacterias son las únicas en este grupo
- 2- Algas eucariotas con cloroplastos rodeados por una doble membrana cloroplastídica.
- 3- Algas eucariotas con cloroplastos rodeados por una membrana adicional del retículo endoplasmático.
- 4- Algas eucariotas con cloroplastos rodeados por una doble membrana del retículo endoplasmático.

En base a estas y otras características pueden realizarse dentro de los mismos grupos distintas subdivisiones que escapan a los objetivos de esta tesis.

2.- FOTOSÍNTESIS EN MICROALGAS.

A la hora de caracterizar a las algas se pueden distinguir dos tipos básicos de organización celular, las procariotas y eucariotas. La diferencia más notoria entre ambos tipos celulares es que las primeras carecen de organelas limitadas por membranas (plástidos, mitocondrias, núcleos, aparato de Golgi) (Nelson D.L. *et al* 2004a; Madigan, M.T. *et al* 2003). Excepto las cianobacterias, el resto de las microalgas son eucariotas. En microalgas eucariota la fotosíntesis se realiza en los cloroplastos. Los cloroplastos son un tipo especializado de plástidos, están limitados por una envoltura formada por dos membranas concéntricas que contienen una serie de vesículas llamadas tilacoides, en donde se encuentran organizadas las clorofilas y demás estructuras celulares que convierten la energía luminosa en energía química. En el caso de cianobacterias, las vesículas tilacoidales se encuentran directamente en el citoplasma (Prasanna Mohanty *et al*, 2002).

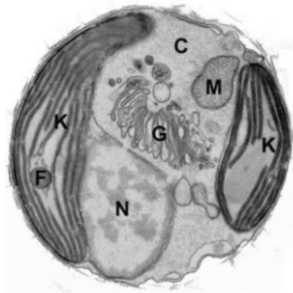


Figura 1.2: (a) microfotografía electrónica de una fina sección del alga *Chrysochromulina*. N (Núcleo), C (citoplasma), K (cloroplasto), G (aparato de Golgi), F (grasas y aceites), M (mitocondria).

Durante el crecimiento fotosintético, la mayoría de las microalgas utilizan agua como fuente de electrones, luz como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono. Antiguamente se dividió a la fotosíntesis en dos etapas: una etapa dependiente de la luz, llamada la etapa de las reacciones "lumínicas", y una etapa enzimática, independiente de la luz, llamada etapa de las reacciones "oscuras". Aunque las reacciones "oscuras" no requieren de la luz como tal y puedan ocurrir tanto en la luz como en la oscuridad, dependen de los productos químicos de las reacciones "lumínicas". Incluso, varias enzimas que controlan reacciones "oscuras" claves son reguladas indirectamente por la luz. Como resultado, estas designaciones han caído en desuso y están siendo reemplazados por vocablos que describen los procesos que ocurren durante cada etapa de la fotosíntesis: reacciones de captación de energía y reacciones de fijación del carbono (Nelson D.L. *et al*, 2004b).

En la primera etapa de la fotosíntesis, la luz es absorbida en las membranas tilacoidales de los cloroplastos por moléculas de clorofila, las cuales están compactadas de un modo especial en las membranas. La energía de la luz es usada para reducir una molécula de $NADP^+$ y fosforilar una molécula de ADP . Luego, ATP y $NADPH$ son utilizados en la segunda etapa de la fotosíntesis para reducir y fijar una molécula de CO_2 en la síntesis de hidratos de carbono (Alberts, B. *et al*, 2008).

2.1- Reacciones de captación de luz.

La generación de electrones en microalgas (al igual que en plantas superiores) comienza con la captación de fotones en estructuras especializadas llamadas *fotosistemas* (PSI y PSII) ubicadas en la membrana de las tilacoides. Los PS consisten en tres partes principales: (a) el centro de reacción, (b) la antena central y (b) la antena periférica (Figura 2.2).(Heldt H.W., 2005a)

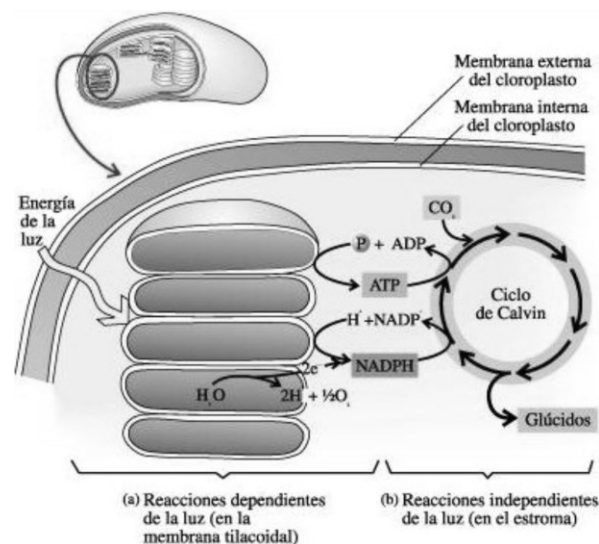


Figura 2.1: Esquema de las dos etapas implicadas en la fotosíntesis dentro de los cloroplastos. La etapa de captación de luz ocurre sobre las membranas de las vesículas tilacoidales. La fijación de dióxido de carbono se produce en el estroma de los cloroplastos.

La antena periférica está compuesta de clorofilas y otros pigmentos accesorios como carotenoides y ficobilinas. Se ubica rodeando a la antena central y es la parte más extensa del PS. La antena central rodea al centro de reacción y contiene principalmente clorofilas. En el centro de reacción se produce la separación fotoquímica de cargas. La disposición de las estructuras en los PS es de suma importancia en

la absorción y canalización de la energía de los fotones hacia el centro de reacción. Cuando un fotón es absorbido la energía del mismo es transferida, de pigmento en pigmento, desde el lugar de absorción hacia el centro de reacción en forma de *exitón* (Nelson J, 2003), perdiendo irreversiblemente en cada transferencia parte de su energía, la cual se disipa como calor. Dentro de las antenas las clorofilas se ubican de manera tal que aquellas que absorben fotones (o exitones) de mayor energía (menor longitud de onda) se ubican en la zona más periférica del complejo. Esta disposición de los pigmentos asegura que la transferencia de energía se produzca en una sola dirección: hacia el centro de reacción. Así, las antenas actúan como un embudo, permitiendo una gran superficie de captación de fotones al servicio del centro de reacción. La extensión de la antena periférica puede variar de acuerdo a la disponibilidad de luz, cuando la luz es muy tenue las células aumentan la superficie de las antenas asegurando la captación de la luz necesaria. Por otro lado, cuando la intensidad de luz es muy elevada las células desensamblan la antena periférica de manera tal que absorban energía radiante pero en forma desacoplada a las reacciones fotosintéticas. Esta estrategia es un mecanismo de protección frente a posibles daños por exposición a elevadas intensidades de luz.

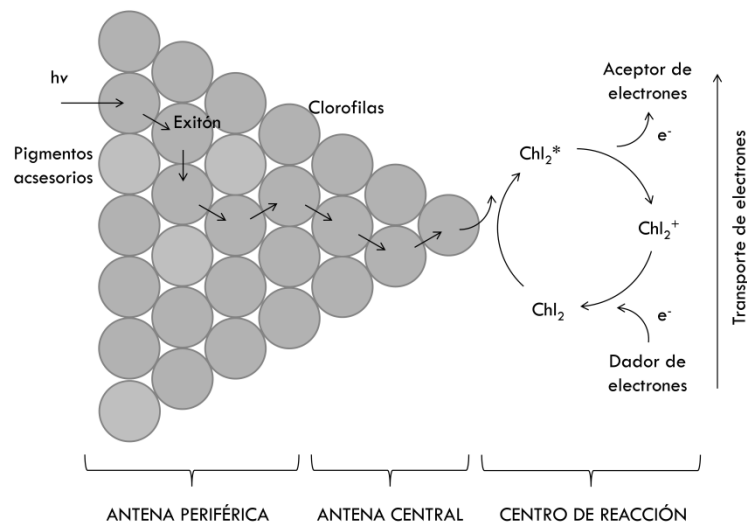


Figura 2.2: Esquema de la reacción de captación y transferencia de fotones en los fotosistemas. Los pares dador-aceptor de electrones son agua-plastoquinona en el *PSII*, y plastocianina-ferredoxina en el *PSI*.

Cuando un *exitón* llega al centro de reacción es recibido por un par de clorofilas especiales, ubicadas espacialmente muy próximas, tanto que sus orbitales moleculares se solapan. Al recibir el *exitón*, un

electrón del par de clorofilas es promovido hacia un nivel de energía superior y transferido hacia otra molécula cercana (aceptor de electrones), dejando una carga positiva en el par de clorofilas. Esta carga es neutralizada luego a través de un electrón proveniente de otra molécula (dador de electrones). Los aceptores de electrones son plastoquinona para el PSII y ferredoxina para el PSI. Los respectivos dadores de electrones son agua y plastocianina (Figura 2.3).

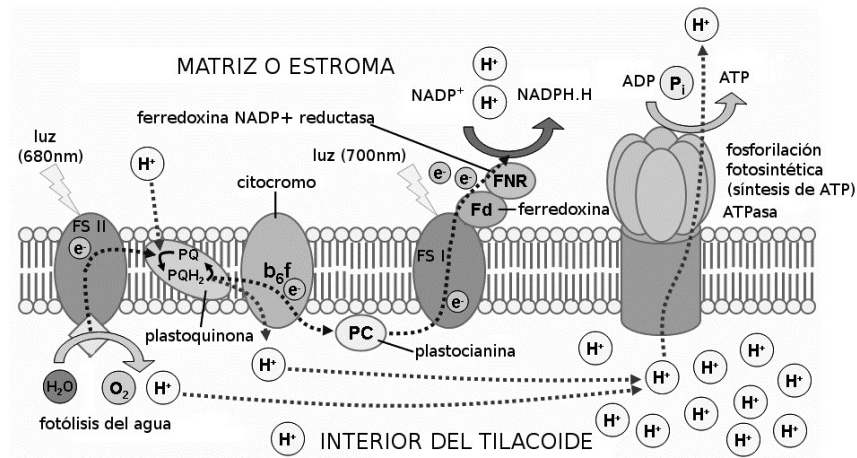


Figura 2.3: Esquema del sistema de absorción de fotones y transferencia de electrones entre los fotosistemas I y II. La cadena se inicia con la absorción de un fotón en el PSII. El fotón promueve la transferencia de un electrón desde una molécula de agua hasta una molécula de plastoquinona. La plastoquinona acepta dos electrones. La plastoquinona difunde luego a través de la membrana hasta el citocromo *b₆/f*. En el citocromo el electrón es transferido a una molécula de plastocianina, que acepta un electrón y difunde hasta el PSI. En el PSI la absorción de un fotón promueve el paso de un electrón a una ferredoxina. La ferredoxina funciona como dador de electrones en la reducción de NADP⁺ por medio de la enzima NADP-reductasa. En diferentes etapas de esta cadena se produce la acumulación de protones en el interior de las tilacoides. La transferencia de protones a favor del gradiente de concentración mediante la bomba de protones ATPasa permite la fosforilación de ADP.

El principal pigmento necesario para la etapa lumínica de la fotosíntesis es la clorofila (Figura 2.4(a)), su estructura básica es un anillo tetrapirrólico llamado porfirina, con un átomo de magnesio (Mg^{2+}) ubicado en el centro del anillo. El Mg^{2+} se encuentra covalentemente unido a dos átomos de nitrógeno del anillo y coordinado con otros dos. La porfirina posee una cola hidrofóbica (fitol) que favorece la solubilidad de la clorofila en la membrana lipídica. La diferencia entre *Chl-a* y *Chl-b* reside en el grupo sustituyente ubicado en la posición designada con la letra A en la Figura 2.4(a). Cuando un fotón alcanza las molécula de clorofila, éstas absorben la energía del fotón provocando la excitación de la molécula,

elevando un electrón hacia un orbital de mayor energía. La energía del pigmento aumenta una cantidad igual a la energía del fotón absorbido. Lo remarcable de este proceso es que ocurre en la forma "todo o nada" y que la energía que se absorbe en forma cuantos, resultando en estados de excitación discretos. La cantidad de energía absorbida depende de la estructura del pigmento (Heldt H.W., 2005b). El espectro de absorción de las clorofilas *a* y *b* puede observarse en la Figura 2.4(b).

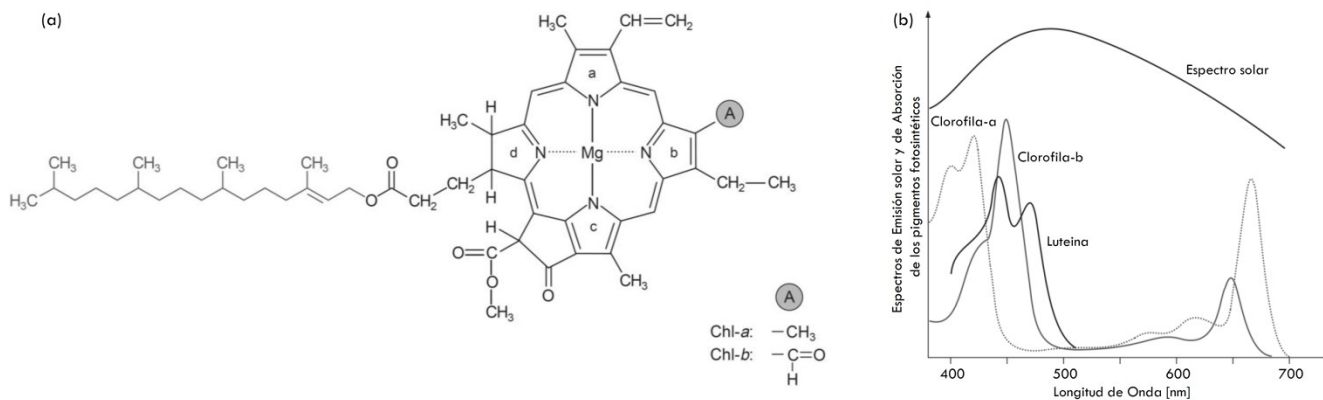


Figura 2.4: (a) Molécula del cromóforo clorofila; el cromóforo unido a la proteína forma el pigmento clorofila. (b) Espectro de absorción de las moléculas de *clorofila-a* y *clorofila-b* junto al de uno de los pigmentos accesorios (*luteina*) y el espectro de emisión solar sobre la superficie terrestre.

Las características de la interacción entre el campo de energía radiante y el complejo de moléculas encargadas de la absorción de energía radiante y síntesis de potencial reductor son muy importantes para una correcta definición del mecanismo que vincula los fenómenos ópticos con el metabolismo celular. En este sentido debemos destacar que (1) la absorción de energía radiante es dependiente de la longitud de onda: sólo se absorbe energía de determinadas longitudes de onda; y (2) la energía se absorbe en forma discreta: como "paquetes de energía". Además, la cantidad de energía de cada "paquete" depende de la longitud de onda del fotón absorbido.

2.2- Reacciones de fijación de CO₂.

En la segunda etapa de la fotosíntesis, el ATP y el NADPH formados en la primera etapa se utilizan para reducir el átomo de carbono del CO₂ por medio del ciclo de Calvin (Figura 2.3). En este conjunto de reacciones, la energía química almacenada temporalmente en las moléculas de ATP y de NADPH se

transfiere a moléculas adecuadas para el transporte y el almacenamiento de energía en las algas o en el cuerpo de las plantas. La resultante de este proceso es pues la formación de un esqueleto de carbono, a partir del cual pueden construirse luego otras moléculas orgánicas. La incorporación inicial de CO₂ en compuestos orgánicos se conoce como fijación del carbono. En algas eucariotas este proceso ocurre en el estroma del cloroplasto; mientras que en cianobacterias se produce en el citoplasma. La enzima más importante en la fijación de CO₂ es la RubisCO. Esta enzima cataliza la carboxilación de un azúcar de 5 carbonos: ribulosa-1,5-bifosfato y la formación de dos moléculas de 3-fosfoglicerato. A este paso le siguen la reducción del 3-fosfoglicerato para dar una triosa-fosfato y la regeneración del azúcar receptor de CO₂ a partir de la triosa-fosfato (Heldt H.W., 2005c). Además de la RubisCO, numerosos mecanismos intervienen en el proceso de fijación de CO₂, entre ellos un sistema de transportadores de carbono inorgánico y anhidrasas carbónicas que aumentan la concentración de CO₂ en el sitio de fijación. Estos mecanismos se denominan "*mecanismos de concentración de carbono*" (Giordano, M. *et al*, 2005; Bartlett, S.G. *et al*, 2006)

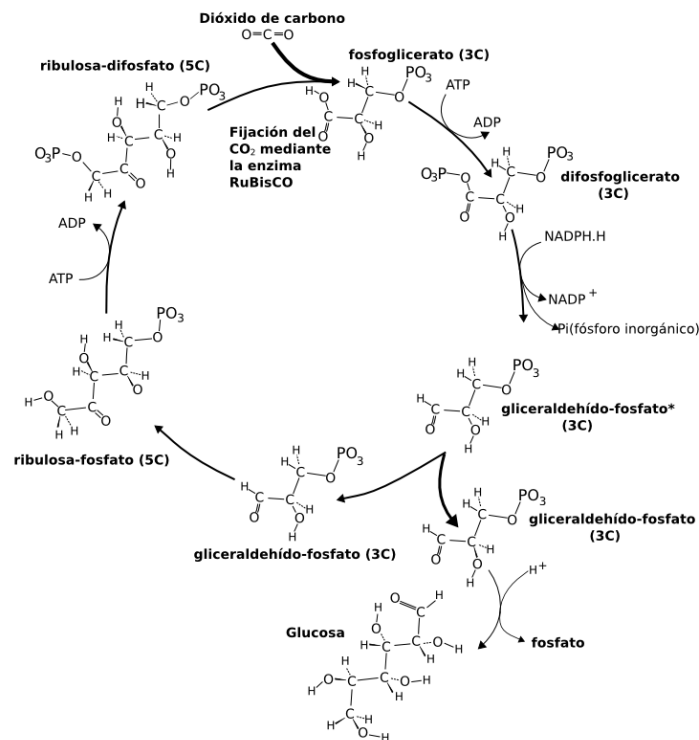


Figura 2.3: Esquema del ciclo de Calvin-Benson que se produce en el estroma de los cloroplastos para la reducción y fijación de una molécula de dióxido de carbono inorgánica.

3.- USOS Y APLICACIONES DE LAS MICROALGAS

El primer registro de uso de algas por el hombre data de 2000 años atrás en China, cuando algunos nativos utilizaron *Nostoc* como alimento en épocas de hambruna. Las microalgas han sido utilizadas desde entonces por la humanidad principalmente como alimento, aunque existen una multitud de usos y aplicaciones de las microalgas ya que en su estructura poseen una gran diversidad de compuestos de interés tecnológico y/o comercial. A lo largo del tiempo, las aplicaciones de las microalgas han ido diversificándose, desde su uso tradicional como fuente de alimento hasta posibles usos como fuente de metabolitos para tratamientos contra enfermedades. A continuación se muestra una breve revisión de sus usos.

□ **Algas para consumo humano:** Las microalgas para el consumo humano hoy en día se venden en distintas formas como tabletas, cápsulas y en forma de suspensiones. Debido a su composición y características químicas, las mismas pueden actuar como suplementos nutricionales, conservantes o colorantes naturales para alimentos. *Spirulina (Arthrospira)* es una de las principales algas utilizadas para la fabricación de productos alimenticios humanos. Debido a los altos niveles de proteínas en su composición, esta biomasa posee un alto valor nutritivo. Además, el consumo regular de microalgas tiene varios efectos saludables como por ejemplo: la atenuación de la hiperlipidemia, supresión de la hipertensión, protección contra fallas renales y la disminución del nivel de azúcar en plasma. Otro género muy utilizado con estos fines es *Chlorella*. La sustancia más importante en su composición es el β -1,3-glucano, que es un inmuno-estimulador activo, un captador de radicales libres y un reductor de lípidos de la sangre. Además se han identificado otros efectos beneficiosos para la salud, como por ejemplo la acción preventiva anti-tumorales y contra la arteriosclerosis (Muller-Feuga, A., 2000; Chae, S.R. *et al*, 2006; Harker, M. *et al*, 1996).

□ **Algas para consumo animal:** Las algas pueden ser incorporadas en la alimentación tanto de animales de granja, de peces (acuicultura) como de mascotas. El uso de microalgas en la acuicultura es muy importante, lo que no sorprende ya que son el alimento natural de muchos animales acuáticos. Los sistemas de acuicultura que incluyen la producción de microalgas y el tratamiento de agua de desechos parecen ser muy útiles para la combinación de la producción de algas con la “limpieza” biológica. Esto permite el crecimiento de las microalgas consumiendo compuestos orgánicos (nitrógeno y fosforo) presentes en las aguas residuales de ciertas industrias. Para poder ser usadas en este campo, las especies de microalgas deben satisfacer varios criterios: ser fáciles de cultivar; no ser tóxicas; tener el tamaño y

forma correctos para que puedan ser ingeridas; tener altos valores nutricionales; tener paredes celulares fácilmente digeribles para que sus nutrientes puedan ser asimilados; etc. (Wolfgang B., 2004) . Las especies más comunes para estos fines son: *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* *Thalassiosira*. Se ha demostrado a través de estudios nutricionales y toxicológicos que la biomasa de microalgas es capaz de servir como suplemento alimenticio para animales de granja (caballos, vacas, etc.) y mascotas (perros, gatos, pájaros, etc.). Para el consumo animal la especie más utilizada es también *Spirulina*. El consumo de algas favorece el buen desarrollo de los animales, proveyéndolos de vitaminas naturales, minerales, ácidos grasos esenciales y ayudándolos a mantener un peso correcto.

□ **Utilización de microalgas para el tratamiento de efluentes:** el uso de microalgas para el tratamiento de efluentes fue intensamente desarrollado por Oswald y colaboradores (Oswald W.J. *et al*, 1973). Las microalgas poseen características que las hacen muy interesante su uso en este campo, como ser: (a) tienen la capacidad de consumir nitrógeno, fósforo y amonio del agua, los cuales son unas de las principales causas de la eutrofización de los medios; (b) poseen diversos metabolismos dependientes del consumo de metales pesados, géneros tales como *Chlorella* y *Scenedesmus*, han demostrado ser excelentes captadoras de estos metales en el tratamiento de efluentes; (c) a través de su crecimiento, pueden brindar el O₂ necesario para lograr el crecimiento de bacterias heterotróficas; y, (d) una vez terminado el tratamiento, la biomasa generada puede ser utilizada en sistemas de acuicultura (Grönlund. E. *et al*, 2004; Hammouda O. *et al*, 1995).

□ **Eliminación del CO₂ de los gases de emisión de fábricas:** Los gases de emisión de las fábricas son responsables de más del 7% del total de CO₂ mundial emitido por el uso de energía. Los procesos normalmente usados para la eliminación o disminución del nivel de CO₂ en los gases de emisión consumen energía e implican la inversión de mucho dinero. En este campo las microalgas cobran una gran importancia, ya que muestran tener gran efectividad a la hora de retener el CO₂, incluso mayor a la de plantas superiores. Experimentos llevados a cabo usando la especie de microalgas *Monoruphidium minutum*, demostraron que éstas eran capaces de crecer eficientemente a través de la utilización, como fuente de alimentación, de gases que contenían altos niveles de CO₂, sulfuros y óxidos de nitrógeno, produciendo buenos rendimientos de biomasa (Zeiler, K. G. *et al*, 1995).

□ **Productos bioactivos de microalgas:** Dependiendo de las distintas especies de algas, se pueden extraer distintos compuestos de alto valor comercial, como por ejemplo: pigmentos, antioxidantes, β-

carotenos, polisacáridos, vitaminas, etc. (Borowitzka, M.A. 1999; Dallaire, V. *et al*, 2007; Chetsumon, A. *et al* 1994 y 1996). A modo de ejemplo podemos citar:

- Se ha encontrado que algunas especies, como *Spirulina* sp., tienen distintos tipos de esteroides como el clionasterol, que mostraron tener la capacidad de incrementar la producción de factores activadores de plasminógeno en células endoteliales vasculares, facilitando la prevención de enfermedades vasculares.

- Compuestos antioxidantes como β -carotenos y astaxantina aislados de microalgas, protegen a las células frente al estrés oxidativo causado por un amplio espectro de enfermedades y por el propio envejecimiento. Estudios preclínicos sugieren que el consumo de astaxantina, producida por especies como por ejemplo *Haematococcus pluvialis*, podría modular funciones anti-cancerígenas, y antiinflamatorias, dar protección contra los rayos UV y mejorar la salud cardiovascular, entre otras.

- La luteína, pigmento amarillo que se encuentra en vegetales y en el grupo de algas de las xantófitas, es usada para la prevención y tratamiento de enfermedades degenerativas.

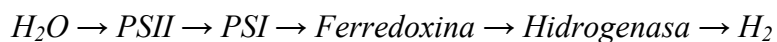
□ **Microalgas en la industria cosmética:** Extractos de microalgas pueden encontrarse en distintos productos del cuidado de la piel y cara, como cremas *anti-age*, emolientes, cremas regenerativas o refrescantes, etc. También se usan en cremas de protección solar y productos de cuidado del cabello (Lorenz, R.T. 2000; Arad, S.M. *et al* 1992). Por ejemplo, el producto llamado “Protulines” de Exsystmol S.A.M, contiene un extracto de *Arthrospira* rico en proteínas que reparan señales de envejecimiento temprano de la piel, tiene un efecto astringente y evita la formación de estrías.

□ **Microalgas como plataformas para proteínas recombinantes:** Hasta el momento las microalgas no han sido utilizadas masivamente para la producción industrial de proteínas de interés farmacéutico. Sin embargo, tienen un enorme potencial para convertirse en una plataforma muy importante para la producción de proteínas recombinantes. Son capaces de generar altos niveles de expresión de proteínas en medios de muy bajo costo (los medios de cultivo consisten básicamente en medios salinos), son fáciles de cultivar bajo distintas condiciones de crecimiento, con bajos consumos de energía. Una ventaja que presentan frente a sistemas de expresión de plantas, es que son mucho menos sensibles a la salinidad del agua que utilizan, ya que las plantas frente a altas concentraciones de sodio en el agua sufren un gran estrés, que repercute en cambios bioquímicos de los productos expresados. Además al ser células eucariotas (excepto las cianobacterias) pueden inducir modificaciones postraduccionales a las proteínas, como glicosilaciones y plegamientos necesarios para el buen funcionamiento de las mismas.

Para transformar microalgas con ADN recombinante, es posible utilizar los métodos empleados para la transformación de células vegetales, como *electroporación* o *biobalística* (Qingfang He, 2004).

□ **Producción de metano a partir de microalgas:** La producción de metano (CH₄) a través de la fermentación anaeróbica de biomasa de microalgas fue propuesta como método de conversión de energía solar hace más de 50 años. Es un método muy simple que no requiere demasiada infraestructura. Básicamente consiste en la construcción de biodigestores en los cuales la materia orgánica a fermentar es la biomasa de microalgas (Oswald, W.J. *et al*, 1960; Alzate, M.E. *et al*, 2012; Ehimen, E.A. *et al*, 2011).

□ **Producción de bio-hidrogeno:** la utilización del hidrogeno (H₂) como combustible es un tema que ha ido cobrando importancia en los últimos años. Es un combustible muy eficiente y no contaminante. Los procesos de producción de H₂ (como la electrolisis foto-voltaica y la gasificación de biomasa) han mostrado ser poco rentables y, en consecuencia no se ha avanzado mucho en estos procesos. La idea de utilizar microalgas y otros microbios para producir hidrógeno cobró impulso en la década del '70, principalmente en Japón, Estados Unidos y Europa. Hay dos vías principales para generar H₂ utilizando algas: la biofotólisis directa y la biofotólisis indirecta. La primera se basa en la transferencia directa de electrones del agua a protones, a través de la combinación de la disociación del agua y las reacciones de reducción de la ferredoxina, mediante una hidrogenasa generadora de H₂, resultando en la producción simultanea de H₂ y O₂. (Benemann J.R., 2000)



La segunda surgió del trabajo con algas verdes adaptadas a ambientes anaeróbicos en estudios con cianobacterias. Se genera una separación temporal o espacial de la generación de O₂ y las reacciones de producción de H₂, ligadas a través de la fijación de CO₂ en hidratos de carbono. El mayor inconveniente de estos procesos es que se llevan a cabo por periodos muy cortos, ya que estas reacciones se inhiben por el oxígeno generado. Ambas tecnologías siguen siendo hasta ahora caras e ineficientes y se encuentran todavía en etapas tempranas de desarrollo.

4.- MICROALGAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.

Destacaremos en forma separada esta aplicación debido al impulso que ha cobrado la misma en los últimos años a nivel mundial (Mata, T. M. *et al*, 2010; Halim, R. *et al*, 2012; Olivieri, G. *et al*, 2013,

Chisti, Y 2007, Balasubramanian, L. *et al*, 2011). Durante décadas la mayor parte de la energía empleada en el mundo ha provenido de los combustibles fósiles. Se utilizan en el transporte, la generación de electricidad, la generación de vapor, la calefacción de hogares, etc. El uso desmedido de este recurso trajo consigo dos efectos: la liberación de grandes cantidades de dióxido de carbono a la atmósfera y la disminución de las reservas de petróleo, hechos que en la actualidad se traducen en cambio climático y aumento de precios. La solución a estos problemas radica en la generación de fuentes alternativas de energía, que sean renovables y ambientalmente amigables. Entre ellas podemos citar la energía eólica, hidrocínética, solar, los biocombustibles y el hidrógeno, entre otras.

Entre los biocombustibles, los tres de mayor desarrollo a nivel mundial son el bioetanol, el biodiesel y el biogás. En el caso de la Argentina, el biodiesel es el que ha logrado un mayor crecimiento. Durante 2011, Argentina se posicionó como uno de los cuatro principales productores de biodiesel a nivel mundial, y segunda en el ranking de exportadores. La principal ventaja del biodiesel sobre los demás biocombustibles es su aplicación directa en motores diesel, principal combustible de los sectores agrícola, industrial y transportista. (Irazoqui, H.A. *et al*, 1996a y b).

El biodiesel se obtiene por transesterificación de aceites vegetales o grasas animales. En nuestro país, el principal recurso es el aceite de soja, siendo las principales zonas productoras, Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, a las que se le suman -con una producción menor- Chaco, Santiago de Estero, Salta y Tucumán. Durante 2011 la producción nacional de biodiesel alcanzó una cifra cercana a los 3 millones de toneladas, requiriéndose para ello unas 17 millones de toneladas de este cultivo. Del total producido, aproximadamente 1 millón se destinó al mercado interno para la sustitución prevista por la Ley 26.093 (Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentables de Biocombustibles) aprobada en 2006, mientras que el volumen restante, al mercado externo.

Según la visión de expertos en la materia, el mercado mundial de biocombustibles continuará creciendo de manera sostenida. La producción nacional de soja durante la campaña 2010/2011 alcanzó 50 millones de toneladas, cantidad que pondría un tope de 8.5 millones de toneladas anuales a la capacidad nacional de producción de biocombustibles. De este modo, una industria de biodiesel que utilice aceite de soja como principal materia prima trae consigo las siguientes problemáticas:

- (1) Restringe la participación nacional en el mercado mundial.
- (2) Retira el aceite de soja del mercado de alimentos, con la consecuente repercusión sobre su precio y comprometiendo la disponibilidad del mismo.

- (3) Consume grandes extensiones de suelo fértil, reduciendo la superficie disponible para otros cultivos.
- (4) Limita la oportunidad de negocios a las zonas sojeras, típicamente las zonas más ricas del país, excluyendo a las regiones menos fértiles, tradicionalmente las más pobres.

Para mantener el liderazgo internacional en el mercado de biocombustibles sin perjudicar al mercado de alimentos, el aumento en la capacidad de oferta deberá hacerse sobre la base de materias primas no alimenticias y que puedan producirse en suelos no agrícolas. Entre las diversas alternativas, una de las que ha recibido mayor impulso en los últimos años es la producción de microalgas. En 2009 Exxon Mobil anunció una inversión de 600 millones de dólares destinada al desarrollo de esta tecnología.

Lo atractivo de las microalgas es que:

- (1) Pueden producirse en tierras áridas, por lo que no compiten por tierras fértiles con los cultivos tradicionales.
- (2) Pueden crecer en aguas residuales o no aptas para consumo,
- (3) Se pueden producir utilizando agua de mar, en zonas costera o en terrenos inundables.
- (4) Tienen una tasa de crecimiento muy superior a la de las planta terrestres.
- (5) En su estructura presentan un porcentaje elevado de aceite, llegando a contener un 30, 50 y hasta un 80% de aceite, dependiendo de las condiciones de cultivo.
- (6) El costo de las tareas de labranza, siembra y cosecha es muy inferior debido a que pueden sembrarse y cosecharse por bombeo, desde un único punto.
- (7) El subproducto o residuo no lipídico es una fuente de proteína de alta calidad, que puede ser destinada al consumo animal o humano.

La apuesta de Exxon no es aislada, numerosas empresas e iniciativas científicas están actualmente intentando desarrollar biocombustibles a partir de algas. En nuestro país existen dos antecedentes destacados: Oil Fox (<http://www.oilfox.com.ar/>) y Biocombustibles Chubut (Goldstein, E. *et al*, 2010), ambas empresas productoras de biocombustibles a partir de aceite de soja que han incursionado en esta nueva tecnología con el objetivo de reducir su dependencia de las aceiteras tradicionales. Sin embargo, estos esfuerzos no han resultado en aplicaciones concretas debido a la falta de desarrollo en esta tecnología aún incipiente y, aunque la idea es prometedora, la viabilidad económica es aún incierta.

5.- CULTIVO DE MICROALGAS

Los medios de cultivos empleados para la propagación de microalgas son generalmente soluciones acuosas de sales. Estas sales proveen al medio con todos los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo del cultivo de las microalgas. El agregado de fuentes orgánicas de carbono no es lo más habitual, aunque hay números antecedentes de cultivos heterotróficos y mixotróficos; empleándose principalmente glicerol, glucosa u otros carbohidratos de bajo peso molecular, los cuales pueden ser obtenidos por hidrólisis de almidones, celulosas, u otros hidratos de carbonos de alto peso molecular.

En términos generales podemos decir que hasta el momento el cultivo de microalgas es más costoso que el cultivo de granos, siendo este el factor principal de la limitada aplicación de estos sistemas productivos. El crecimiento fotosintético requiere fuentes de luz (natural o artificial), CO₂, agua y sales inorgánicas. Las algas tienen temperaturas óptimas de crecimiento entre 20 y 30° C. Los medios de cultivo utilizados para su crecimiento deben incluir en su composición los elementos inorgánicos que constituyen las células y otros componentes traza, como por ejemplo, cobalto, zinc, hierro, etc., para poder ser aptos para el desarrollo de las algas. Vonshak (^{Vonshak, A., 1986}) compiló los requerimientos para la formulación de los medios de cultivo para algas, destacando los siguientes puntos a tener en cuenta: (1) el contenido total de sales en el hábitat de donde es originaria el alga; (2) la composición celular en relación a los componentes iónicos mayoritarios, como K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Ca²⁺, SO₄²⁻ y Cl⁻; (3) la fuente de nitrógeno, especialmente nitratos, amonio, urea o peptonas; (4) la fuente de carbono que se toma desde el medio acuoso, sea CO_{2(aq)}, CO₃²⁻ o HCO₃⁻; (5) el pH; (6) los requerimientos de elementos traza y algún agente quelante como el EDTA; y, (7) vitaminas.

Los medios conteniendo vitaminas, peptonas o buffers orgánicos sólo se emplean para el cultivo de algas muy exigentes, con altos requerimientos nutricionales y en condiciones de cultivo que permitan un control riguroso del proceso de manera de evitar la contaminación, especialmente por parte de bacterias cuyas velocidades de replicación son mucho mayores a las de la mayoría de las algas. Además estos compuestos incrementan el costo del medio limitando su aplicación a productos de alto valor agregado

Las características básicas del proceso que deben ser consideradas a la hora de cultivar microalgas para un fin específico son: qué cepa utilizar; de qué manera extraer el compuesto de interés; cómo proveer luz al cultivo; cómo mantener las algas en suspensión evitando la precipitación de las mismas; qué materiales usar para la construcción de reactor; cómo proveer CO₂ en forma eficiente evitando a la vez

el escape del mismo a la atmósfera; cómo remover el O₂ producido durante la fotosíntesis; y, cómo controlar el pH y la temperatura.

La luz es un parámetro de relevancia durante el cultivo de microalgas. La luz puede ser suministrada en forma continua o en ciclos de luz y oscuridad. A medida que cambia la concentración celular, también lo hacen los requerimientos de luz. El crecimiento celular se ve limitado si los niveles de luz son muy bajos; pero, demasiada intensidad puede ser perjudicial para la célula, provocando daños en los sistemas celulares por acumulación de especies reactivas del oxígeno, producidas durante la fotosíntesis. Los organismos fototróficos necesitan recibir suficiente cantidad de luz para mantener su crecimiento, un suministro insuficiente provocará una disminución en el crecimiento por pérdida respiratoria. Incrementando el suministro por sobre el punto de compensación provocará un incremento en el grado de crecimiento hasta el punto de saturación. A partir de este punto, mayores intensidades lumínicas llevarán a la fotoinhibición.

En cultivos autotróficos las microalgas utilizan CO₂ como fuente de carbono. La alimentación de CO₂ puede ser controlada a través de los cambios de pH generados en el medio. O por modificación de la concentración de CO₂ en la corriente de aireación. Siempre que se modifique la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa en contacto con el medio líquido, deberán tomarse los recaudos necesarios para evitar perturbaciones en el cultivo debido a los cambios de pH que se producen en la fase acuosa (Molina Grima, E. *et al*, 1999).

Para la producción a gran escala de biomasa se utilizan generalmente cultivos continuos. En estos procesos se alimentan periódicamente los reactores con medio fresco y se cosecha el mismo volumen de medio con algas. Casi el 25% de la biomasa producida durante las horas de luz puede perderse durante la noche debido principalmente a la respiración celular que ocurre en la ausencia de luz. La magnitud de esta pérdida también es función de los niveles de luz a los que se exponen las algas, de la temperatura de crecimiento y de la temperatura durante la noche (Ogbonna, J.C. *et al*, 2000; Richmond, A., 2004).

6.- FOTOBIOREACTORES.

Los métodos más efectivos de producción de microalgas a gran escala se realizan en “*open ponds*” y en fotobiorreactores (FBR) (Tredici M.R., 2004).

(A)- *Open ponds*. Fueron los primeros sistemas en ser utilizados para el cultivo de microalgas (desde 1950). Su construcción varía en cuanto al tamaño, dimensiones, materiales, inclinación, etc.; pero básicamente se trata siempre de piletones construidos a cielo abierto, con una profundidad no mayor a 40-50 centímetros. Estos sistemas operan de forma continua para evitar la sedimentación de las algas. Son muy sencillos de operar y el costo de construcción es muy bajo. Sin embargo tienen la gran desventaja de que es difícil controlar muchas de las variables de cultivo. Por ejemplo la temperatura, que oscila mucho entre las horas del día y la noche, y mucho más entre las distintas estaciones del año; el consumo del CO₂ administrado es muy poco eficiente, ya que gran parte del gas alimentado termina siendo liberado a la atmósfera. A su vez, los *open ponds* están muy expuestos a contaminaciones por otras especies indeseables de microalgas e incluso otros tipos de microorganismos, debido a que estas “piletas” se encuentran a cielo abierto. Por otra parte, al utilizar la luz del sol como fuente de radiación, los mismos no pueden ser muy profundos ni alcanzar densidades celulares elevadas, ya que la radiación incidente no lograría penetrar a través del medio.



Figura 6.1: Fotografía de un *open pond* utilizado para la producción masiva de *Dunaliella* en el Nature Beta Technologies Ltd (Eilat, Israel)

(B) Fotobioreactores (FBR). Estos pueden ser definidos como sistemas de cultivos fototróficos en los cuales la luz no incide directamente sobre la superficie del cultivo sino que debe lograr pasar a través de las paredes transparentes del reactor para alcanzar a las células cultivadas. Una de las principales ventajas de estos sistemas es que, al ser cerrados, permiten trabajar con cultivos libres de contaminaciones durante largos periodos. Además permiten un mayor control de las variables operativas

como temperatura (a través de intercambiadores de calor), pH, agitación (permiten utilizar bombas peristálticas o neumáticas), alimentación y consumo de CO₂, etc.

El grado de sofisticación de los FBR dependerá de su propósito, si el producto final deseado es la íntegra biomasa de microalgas, un diseño sencillo será suficiente. El vidrio y el acrílico son ampliamente utilizados. En la actualidad se han ensayado numerosos materiales de menor costo, como PVC, polietileno y policarbonatos, pensándose incluso en el diseño de reactores descartables. La superficie de los FBR debe ser diseñada para minimizar la reflexión y la refracción de la luz; aquéllos realizados con superficies curvas como tubos darán una menor disponibilidad de luz que aquellos con superficies planas. Algunos diseños han incorporado sofisticados dispositivos de iluminación, como espejos parabólicos de recolección de luz, fibras ópticas, o guías lumínicas (Behrens P.W., 2005; Scragg, A. H. *et al*, 2002).

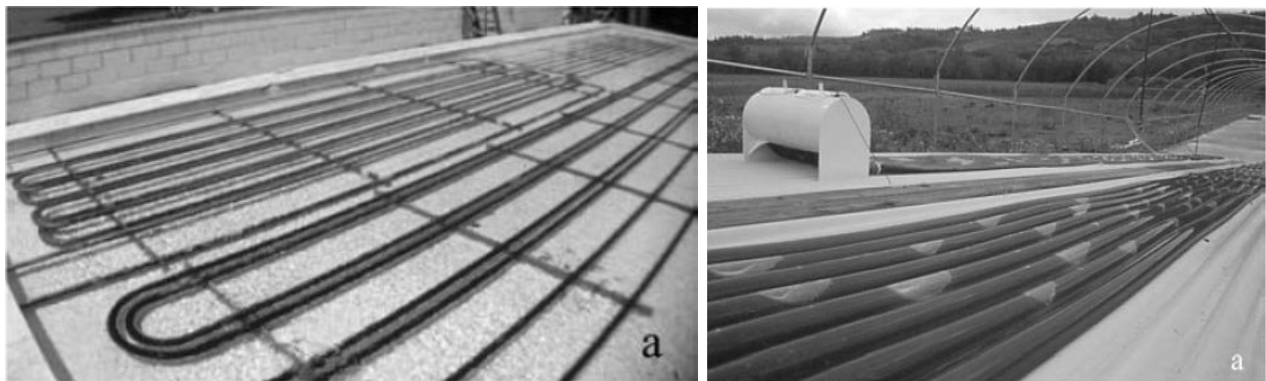


Figura 6.2 :(a) Reactor serpentina del Departamento de Ingeniería Química en la Universidad de Almería, España. (b) FBR colector inclinado en el Departamento de Agricultura y Biotecnología de la Universidad de Florencia (Italia)

Los FBR pueden ser clasificados en base a su diseño y modo de operación.

♦ FBR tubulares: existen básicamente 3 tipos de reactores tubulares: (1) Serpentina: son sistemas en los cuales varios tubos transparentes paralelos están conectados entre sí en sus extremos por codos en U, formando un arreglo plano que puede ser orientado en forma horizontal o vertical. El intercambio de gas y el agregado de nutrientes se llevan a cabo en otro receptáculo. La circulación del medio entre los tubos transparentes y el intercambiador de gases se realiza a través de sistemas de bombas o sistemas tipo *air-lift*. (2) Colectores (*manifold PBR*):consisten en una serie de tubos paralelos conectados al final por dos colectores, uno para distribución y otro para colectar las suspensiones de cultivos. Estos reactores

ahorran más energía que los anteriores, ya que los FBR serpentina consumen una considerable cantidad de energía para hacer circular el cultivo a través de los codos para poder cambiar la dirección del mismo.(3) Helicoidales (*bio-coil PBR*): consisten en tubos de pequeño diámetro, generalmente flexibles que se enrollan alrededor de una estructura vertical. Pueden colocarse varios de estos FBR en forma paralela y unirlos a través de conectores a un sistema de bombeo central, permitiendo reducir el flujo necesario y acortar la longitud de los tubos.

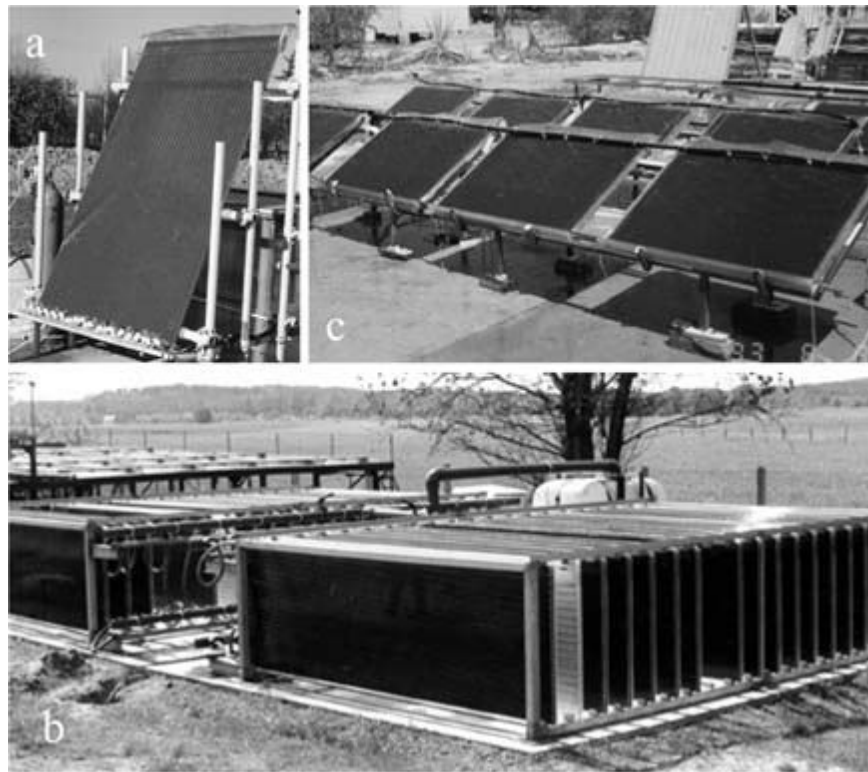


Figura 6.3: (a) Panel plano alveolar del Departamento de Agricultura y Biotecnología de la Universidad de Florencia (Italia); (b) Sistema FBR del Instituto IGV (Alemania); (c) Paneles planos de vidrio en la Universidad de Ben Gurion en Negev (Israel)

◆ FBR Planos: se construyen unas especies de cajas transparentes rectangulares, que internamente se dividen con tabiques para formar canales anchos llamados alveolos, que ayudan a la circulación ordenada del medio. Estos se deben montar con una cierta orientación e inclinación para maximizar la captación de la luz solar durante el día.

◆ FBR Cilindros verticales y “bolsas”: son posiblemente los sistemas más simples. Los cilindros verticales rígidos se construyen por lo general de vidrio, con una altura cercana a los 2 metros y diámetros de 30-50 cm. El aire para el mezclado se inyecta desde el fondo y pueden ser iluminados artificial o naturalmente. Las “bolsas” o “mangas” son reactores verticales descartables, los cuales se construyen fácilmente cortando tiras de algún plástico descartable, como polietileno, y sellándolas en los extremos por calor. Estas bolsas se cuelgan en soportes y se iluminan en forma natural o artificial. El burbujeo de aire para el mezclado es inyectado desde el fondo. Tienen una vida útil corta ya que las microalgas luego de un tiempo comienzan a pegarse a la pared interna de la bolsa. Gracias a su bajo costo, pueden ser fácilmente descartadas y reemplazadas.

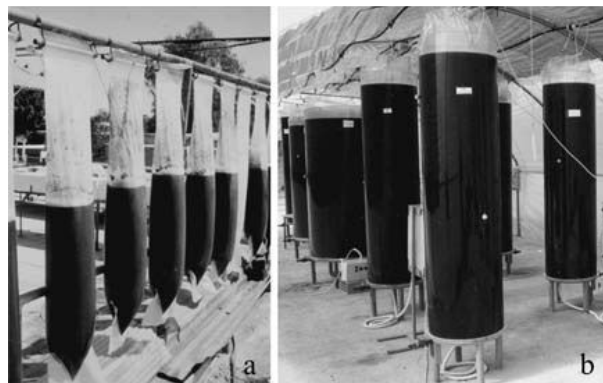


Figura 6.4 :(a) “mangas” de polietileno en el Instituto de Investigación Aplicada (Beer-Sheva, Israel); (b) columnas anulares del Departamento de Agricultura y Biotecnología de la Universidad de Florencia (Italia)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la factibilidad técnica de producir biomasa de microalgas como fuente de materias primas para la generación de bioenergías y/o compuestos para la alimentación humana y animal; evaluando la composición de la biomasa, la estrategia de cultivo y el cambio de escala.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la capacidad de crecimiento y producción de lípidos, almidón y proteínas de un cultivo de microalgas; analizando el efecto que tienen el régimen de iluminación y la falta de nitrógeno sobre dichas variables.
- 2.- Obtener una expresión cinética que permita vincular la disponibilidad de luz en el medio de cultivo con la velocidad de propagación celular de las microalgas, de manera de poder, en base a esta expresión, escalar el proceso en forma sistemática e independiente de la geometría del fotobioreactor, de su ubicación geográfica y de la época del año.
- 3.- Estimar de la capacidad de producción de biomasa de microalgas en un sistema de cultivo instalado en piletones pertenecientes a la ex-planta de tratamiento de efluentes del Parque Tecnológico Litoral Centro (Santa fe, Argentina).

CAPÍTULO 1

RESUMEN

En esta parte de la tesis se evaluó la capacidad de crecimiento y producción de lípidos, almidón y proteínas mediante el cultivo de la cepa *Neochloris oleabundans*. La microalga *N. oleabundans* fue crecida en reactores de 1.8L, bajo dos diferentes regímenes de iluminación (10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$); y, en condiciones repletas y libre de nitrógeno, de manera de evaluar la capacidad de esta cepa de producir los compuestos de interés para la industria alimenticia: proteínas, almidón y TAGs. Como resultado se observó que, dependiendo del producto final deseado, la estrategia de producción a adoptar deber ser diferente. La producción de proteínas deberá realizarse en condiciones repletas de nitrógeno; para iniciar la producción de TAGs es ineludible la restricción de la administración de nitrógeno en el medio; y, si se desea producir almidón, entonces la cosecha de las microalgas deberá realizarse durante las últimas horas del primer o segundo día luego de iniciada la inanición por nitrógeno. Por último, comparando los regímenes de iluminación, se observó que si bien las productividades más altas se corresponden con las mayores intensidades, la eficiencia en el uso y conversión de la energía solar se ve reducida.

1.- INTRODUCCIÓN: PLANTEO DE LA PROPOSICIÓN Y EXPOSICIÓN DE LO HECHOS RELACIONADOS CON LA MISMA.

Neochloris oleoabundans es una microalga eucariota edáfica (Band, C. J., 1992) considerada oleaginosa debido a que es capaz de acumular altas concentraciones de lípidos en su estructura (Gouveia, L. et al 2009, . Yang, Y. 2011). Esta acumulación de lípidos es generalmente promovida por condiciones de estrés en el cultivo. Cultivos a elevados de pH (Santos et al., 2012), alta salinidad (Arredondo-Vega, B. O. et al., 1995); y, en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Li, Y. et al, 2008; Popovich, C. A. et al , 2012; Pruvost, J. et al, 2009) han mostrado ser capaces de inducir la síntesis de lípidos en microalgas. En esta especie en particular, la deficiencia de N es capaz de inducir la síntesis de TAG. En células crecidas en condiciones de estrés, los TAG llegan a ser hasta el 80% del contenido total de lípidos. Estos TAG suelen tener un contenido mayoritario de AG de entre 14 y 20 carbonos, principalmente insaturados y monoinsaturados. Dichas características son adecuadas para la síntesis de biodiesel (Garibay-Hernández et al, 2013). *N. oleoabundans* es capaz alcanzar altas tasas de crecimiento en diferentes tipos de medios: en agua dulce (Gouveia, L. et al 2009, Arredondo-Vega, B. O. et al., 1995, Li, Y. et al, 2008; Pruvost, J. et al, 2009); en aguas de desecho (Giovanardi, M. 2013; Wang, B., 2011); y, en medios con alta salinidad (Santos et al., 2012; Arredondo-Vega, B. O. et al., 1995; Popovich, C. A. et al , 2012). Además, es capaz de sobrevivir bajo condiciones de shock osmótico (Band, C. J., 1992) y su capacidad de crecer en forma autotrófica, mixotrófica y heterotrófica ha sido reportada (Wu, N. et al, 2011; Giovanardi, M., 2013).

Debido a su robustez y versatilidad, y a su capacidad de producir tanto lípidos como almidón (Klok et al, 2013), esta microalga es señalada como uno de los candidatos más prometedores tanto para la producción de materias primas para las industrias alimenticia, farmacéutica y bioenergética, como para

el tratamiento de diversos efluentes. Los efectos del estrés por falta de nitrógeno sobre la producción de biomasa y lípidos en *N. oleoabundans* ha sido reportada bajo numerosas condiciones de cultivo (Gouveia, L. et al 2009; Santos et al., 2012; Giovanardi, M., 2013; Pruvost, J. et al, 2009; Popovich, C. A. et al , 2012; Breuer, G. et al., 2102; Levine, R. B., et al., 2011).

El estrés por falta de nitrógeno es la principal estrategia utilizada para estimular la síntesis de TAG y almidón en microalgas (Ball et al., 1990; Hu et al., 2008). La disponibilidad de nitrógeno influye directamente sobre la relación entre la energía absorbida en la fotosíntesis y la cantidad de la misma que es usada para las reacciones implicadas en la síntesis de material celular; normalmente el 55% del carbono asimilado por las microalgas está acoplado con la asimilación de nitrógeno (Huppe and Turpin, 1994). En base a esto, la hipótesis más aceptada es que en condiciones de cultivo libres de nitrógeno, el exceso de potencial reductor generado es usado en la síntesis de compuestos de reserva (Li et al., 2013); lo cual permite a la célula mantener su estado redox en condiciones normales y evitar así daños a los fotosistemas (Ledford and Niyogi, 2005) y, al mismo tiempo aumentar sus reservas de energía (Hu et al., 2008; Li et al., 2010).

Luego de agotado el nitrógeno en el medio de cultivo, es necesario que las células se adapten a las nuevas condiciones del medio; estas adaptaciones contemplan modificaciones en los niveles de expresión o actividad de las enzimas involucradas en diferentes vías. Por ejemplo, una de las respuestas que se producen en la vía de síntesis de TAG luego de iniciada la fase de estrés por nitrógeno es la sobreexpresión de la enzima diacylglicerol acyltransferasea (DGAT). Esta enzima cataliza la transferencia de un AG a una molécula de diacil glicerol (DAG), para formar TAG. Los DAG son también sustrato en la síntesis de los LP presentes en las diferentes membranas presentes en la célula. Frente al estrés por nitrógeno, sólo la expresión de la enzima DGAT es aumentada, mientras que el resto de las enzimas involucradas en la síntesis de DAG permanece casi sin modificaciones (Rismani-Yazdi et. al, 2012). Estas modificaciones en los niveles de expresión resulta en cambios en la capacidad de la célula para producir los diferentes compuestos de reserva y el destino final que se le da a la energía absorbida en la fotosíntesis. En este trabajo, se evalúa la forma en que se modifica la capacidad de *N. oleoabundans* para producir almidón y TAG luego de iniciada la etapa de estrés por nitrógeno; considerando dos condiciones de iluminación (alta y baja intensidad) con el objetivo de comprobar si la disponibilidad de luz es también un factor regulador de dicho cambio.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

(1) Generación del inóculo. 1mL de un cultivo madre de *Neochloris oleoabundans* fue utilizado para inocular de 250mL de medio BBM estériles contenidos en un erlenmeyer de manera de generar el inóculo para las FBR. El inóculo fue crecido en una cámara de cultivo marca Infors, con agitación orbital de 250rpm, a 27 °C, bajo una iluminación con $180\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, siguiendo ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. Las microalgas fueron crecidas en estas condiciones hasta alcanzar una concentración de biomasa de $2,0\text{gr L}^{-1}$ aprox.

(2) Cultivo en FBR. El FBR tipo panel (Fig. 1) conteniendo 1.55L de medio BBM a pH 7.5, 25 °C, aireado con 1.2L min^{-1} de aire conteniendo 2.0% de CO_2 , fue inoculado con los 250mL del inóculo previamente crecido. Una vez inoculado el cultivo, el mismo fue crecido bajo las condiciones de iluminación preestablecidas, 10 o $40\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$, hasta lograr la concentración de biomasa deseada. Una vez alcanzada la concentración inicial buscada, el cultivo fue llevado adelante por tres días manteniendo la concentración de biomasa constante mediante la adición de medio de cultivo fresco. El control de la concentración se hizo utilizando el sistema de control del equipo Infors, el cual utiliza la radiación saliente del reactor como parámetro de control. Cuando dicho parámetro es menor que un umbral preestablecido, se inicia la dilución del cultivo por adición de medio fresco. Este sistema sólo diluye durante las hora de luz.

Luego de los tres días de cultivo a biomasa constante, se inicia la etapa muestreo (Fig. 2). Durante el muestreo el cultivo fue realizado en forma batch para la condición de $10\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ y en fed-batch para la condición a $40\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$. Luego del primer día de iniciado el muestreo, la biomasa del reactor es cosechada por centrifugación lavada y resuspendida con medio BBM libre de nitrógeno, de manera de iniciar el cultivo en condiciones de estrés.

(3) Sólidos suspendidos totales. Las células contenidas en una alícuota de 5mL del cultivo fueron retenidas mediante un filtro de fibra de vidrio (Whatman, 55mm de diámetro, $0,45\mu\text{m}$ de diámetro poro) previamente secado en estufa (12hs a 95°C), lavadas con agua destilada para retirar los restos de medio de cultivo y secadas en estufa a 95°C durante 12 horas. La biomasa celular fue reportada en gramos de biomasa seca por litro de medio de cultivo [gr L^{-1}].

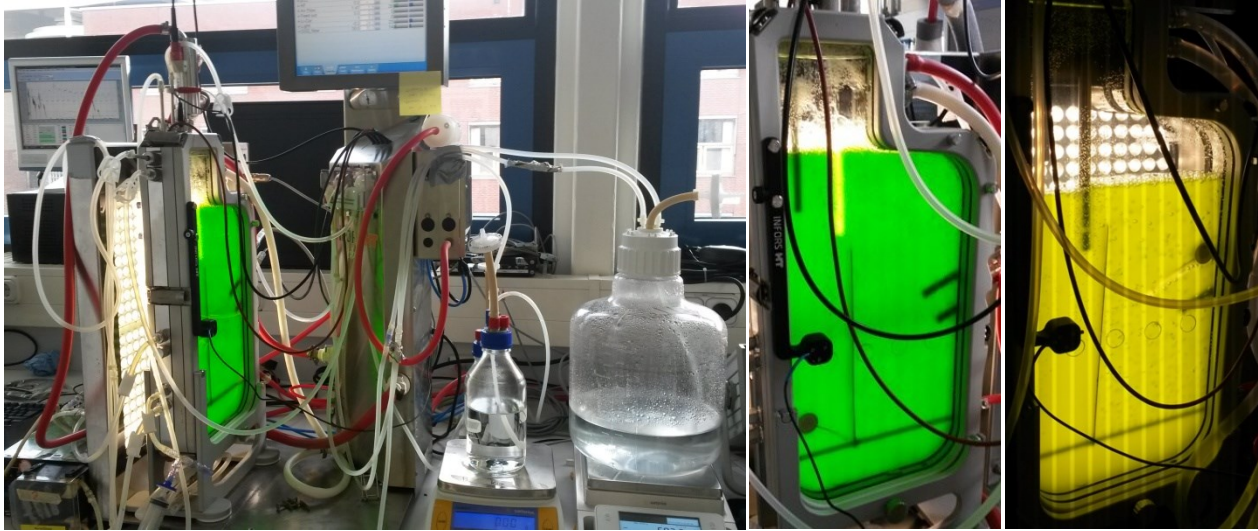


Figura 1: (A) reactor utilizado para el cultivo de la cepa *N. oleoabundans*. El mismo cuenta con un sistema de iluminación, medición y control de pH por adición de ácido o base, bombas para la adición de medio fresco y cosecha, toma de muestra, sistema de aireación con la posibilidad de agregado de CO₂ en la corriente de aire, registro y control de la temperatura. (B) Cultivo de *N. oleoabundans* en condiciones repletas de nitrógeno. (C) Cultivo de *N. oleoabundans* luego de cinco días de cultivo en condiciones de estrés por falta de nitrógeno.

(4) Recuento de células y diámetros celulares. El número de células y la distribución de tamaños celulares se determinaron utilizando el equipo Beckman Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter, Fullerton E.E.U.U, 50 μm orifice). Las muestras de cultivo fueron disueltas en buffer Isoton VR II hasta una concentración de 1×10^5 y 3×10^5 células por mL^{-1}

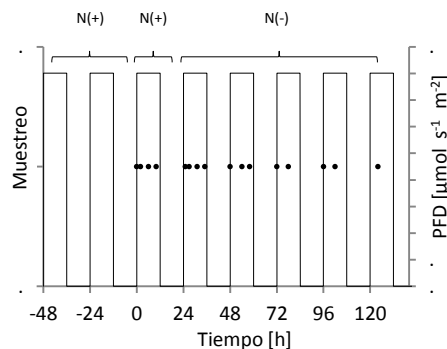


Figura 2: esquema de muestres durante las etapas repleta (día 1) y libre de nitrógeno (días 2, 3, 4, 5 y 6 de cultivo)

(5) Composición de la biomasa. Muestras de 10mL del cultivo fueron tomadas en diferentes tiempos del cultivo, según se muestra en la Fig. 1. Las muestras fueron centrifugadas a 2500rpm por 5min, resuspendidas en 10 mL de agua destilada y centrifugadas nuevamente. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en 1mL de agua destilada y transferido a tubos *beat-beater* de 2mL. Los tubos conteniendo la biomasa fueron liofilizados a -20°C por 12hs y almacenadas a la misma temperatura..

Almidón: el contenido total de almidón fue determinado a través de la metodología reportada por Fernandes et al. (2011), utilizando el kit Total Starch (AA/AMG), de la marca Megazyme International (Bray, Irlanda). Las muestras liofilizadas fueron disueltas en 1mL de etanol (80% v/v) y sometidas a disrupción celular (*Beat-Beating cell disruption*, modelo *Precellys 24*, marca *Bertin Technologies*, Francia) a 6000rpm en tres ciclos de 60s. A partir de este punto, la determinación del almidón se realizó siguiendo las instrucciones del kit. La absorbancia fue medida a 510nm en un espectrofotómetro marca Beckman, E.E.U.U, modelo DU-640.

Composición y contenido total de ácidos grasos: El contenido de ácidos grasos totales presentes en la muestra previamente liofilizada fueron extraídos con una mezcla metanol: cloroformo (5:4). Las muestras fueron sometidas a disrupción celular (*Beat-Beating*; 6000rpm; $3 \times 60\text{s}$) y transesterificadas de acuerdo al protocolo reportado por Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959) con las modificaciones sugeridas por Lamers (Lamers et al., 2010) y Santos (Sanos et al., 2012). La identificación y determinación del contenido de AG fue realizado por cromatografía gaseosa. La diferenciación entre TAG y LP fue realizada mediante la separación de los mismos a través de una columna SPE de sílica (Sep-Pak Vac Silica cartridge 6 cc/1000 mg, 125 Å, 55–105 lm, Waters). La muestra de AG extraída fue cargada en la columna y los TAG eluidos con 10mL de cloroformo. Posteriormente, los LP retenidos en la columna fueron eluidos con 10mL de una mezcla de metanol: acetona: hexano (2:2:1) (Breuer et al., 2012 y 2013).

Carbohidratos totales: La muestra liofilizada fue tratada con una solución fenol- sulfúrico concentrado, de acuerdo al protocolo publicado por Dubois et al (1956). La concentración de carbohidratos se determinó espectrofotométricamente por medición de la absorbancia a 483nm, usando glucosa pura como patrón.

Proteínas: El contenido total de proteínas fue realizado a través del kit comercial *DC- Protein Assay*, de la marca *BioRad*. La muestra liofilizada fue disuelta en 1mL de buffer de lisis, conteniendo 60mM de

Tris; 2% SDS, 10% glicerol y 10mM de DDT. La suspensión fue sometida a disrupción celular (*Beat-Beating*; 6000rpm; 3× 60s). Posteriormente, 1mL extra de buffer de lisis se adicionó a las muestras, las cuales fueron incubadas a 100°C por 30min. Luego de la incubación las muestras fueron centrifugadas y el contenido de proteínas determinado por absorbancia a 750nm mediante un espectrofotómetro (EL800, BioTek Instruments, USA). Albúmina bovina fue utilizada como patrón.

(6) Rendimiento cuántico. El rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II fue determinado por medio de la medición de la fluorescencia de la clorofila en un fluorímetro modular portable (AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments, República Checa; pico de emisión: 620 nm, pulso de luz: 2100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las muestras, diluidas de manera de lograr una DO a 750nm entre 0.2 y 0.4, fueron aclimatadas a temperatura ambiente por 10min. (Cosgrove y Borowitzka 2010; Benvenuti et al. 2015)

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN: FUNDAMENTACIÓN DE LA PROPOSICIÓN Y CRÍTICA DE LOS RESULTADOS ALCANZADOS.

Se detallan a continuación los resultados obtenidos para las condiciones de cultivo realizadas. Se comenzara por describir los resultados obtenidos para los cultivos realizados en condiciones de baja iluminación ($10\mu\text{mol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$) y, a continuación, los derivados de la condición de cultivo en alta iluminación ($40\mu\text{mol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$).

(1) Cultivo en condiciones de baja iluminación: $10\mu\text{mol s}^{-1} \text{ L}^{-1}$

(1.1) Concentración de biomasa y productividad. El cambio en la concentración de biomasa en un reactor, dx/dt , responde a la siguiente ecuación diferencial general:

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{Q_A(t)}{V_R(t)} x_A(t) - \frac{Q_S(t)}{V_R(t)} x_S(t) + r_x(t) \quad (1)$$

donde $Q_A(t)$ es el caudal con que se alimenta el reactor; $Q_S(t)$ es el caudal de cosecha; $V_R(t)$ es el volumen del reactor; $x_A(t)$ y $x_S(t)$ son, respectivamente, las concentraciones de biomasa en la corriente de alimentación y en el reactor; y, $r_x(t)$ es la productividad del reactor.

Asumiendo que $x_A = 0$ y que $Q_A = Q_S$, con lo cual el volumen V_R del reactor permanece constante:

$$\frac{dx(t)}{dt} = -\frac{Q_S}{V_R} x_S(t) + r_x(t) \quad (2)$$

asumiendo que $r_x(t) = \mu_x(t) x(t)$ la ecuación (3) puede ser escrita como:

$$\frac{1}{x(t)} \frac{dx(t)}{dt} + \frac{Q_S}{V_R} = \mu_x(t) \quad (3)$$

lo que es lo mismo que:

$$\frac{d \ln x(t)}{dt} + \frac{Q_S}{V_R} = \mu_x(t) \quad (4)$$

que numéricamente puede ser aproximado a:

$$\frac{\Delta \ln x(t)}{\Delta t} + \frac{Q_S}{V_R} = \mu_x(t) \quad (5)$$

A partir de la ecuación (5) es posible calcular el valor de $\mu_x(t)$; y, a partir de este, el de la productividad, según:

$$r_x(t) = \mu_x(t) x(t) \quad (6)$$

En las Figs. 1.1(A) a 1.1(C) es posible ver la evolución de la biomasa en el tiempo, la productividad y la velocidad de crecimiento específica en el reactor.

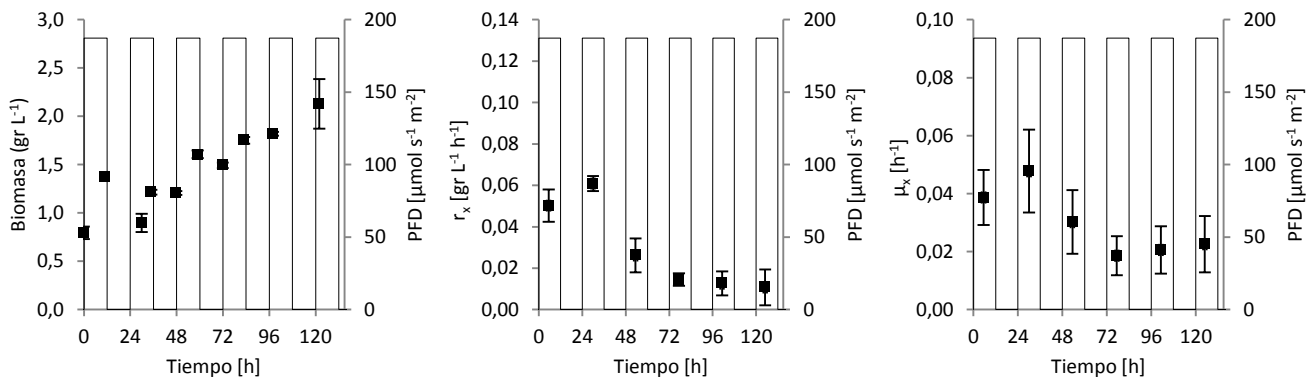


Figura 1.1. (A) Concentración de biomasa x en el tiempo [gr L⁻¹]; (B) Productividad [gr L⁻¹ h⁻¹]; (C) Velocidad de crecimiento específica [h⁻¹]

En las Figs. 1.1(A), (B) y (C), las primeras 24hs corresponden a una condición de cultivo repleta en nitrógeno; luego, a las 24hs, la biomasa en el reactor es cosechada y resuspendida en un medio libre de nitrógeno; iniciándose en ese momento el switch metabólico que termina en la acumulación de triacilglicoles. Como puede verse en las gráficas, el mayor crecimiento de la biomasa se produce durante el primer y segundo día de cultivo, correspondientes a la etapa de cultivo en condiciones repletas de nitrógeno y al primer día de estrés por ausencia de N. A partir del tercer día de cultivo (48hs) la biomasa continúa creciendo, aunque la productividad y el crecimiento específico decrecen, estabilizándose su valor en los días 4, 5 y 6. A primera vista, una explicación simple a este comportamiento podría ser que al aumentar la biomasa y mantener el régimen de iluminación constante, la cantidad de radiación suministrada al reactor por unidad de biomasa se reduce, lo cual estaría limitando el crecimiento celular. sin embargo, y como veremos más adelante, este comportamiento se presenta también en la experiencia realizada bajo una iluminación de $40\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$. En dicha experiencia la concentración de biomasa en el reactor disminuye a medida que el cultivo progresa; en el tiempo; con lo cual la cantidad de radiación suministrada al reactor por unidad de biomasa aumenta. A pesar de ello, el comportamiento de μ_x es similar, con lo cual es posible concluir que esta respuesta se debe a el estrés producido por ausencia de N.

Para garantizar que la concentración de nitrógeno comienza a ser limitante a partir de la hora 24 y no antes, se midió su concentración durante el cultivo. En la Fig. 1.2 es posible ver los valores obtenidos durante las fases de N-repleto y N-agotado.

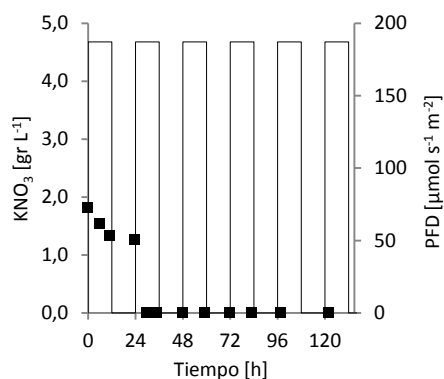


Figura 1.2. Concentración de nitrógeno, expresado en gramos de de KNO₃ por litro tiempo [gr L⁻¹].

A partir de la velocidad de consumo de KNO_3 [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$] y la velocidad de crecimiento celular [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$] es posible calcular el rendimiento en términos de gr de biomasa producido por gr de KNO_3 consumido; el cual, en condiciones repletas de nitrógeno toma un valor cercano a 1,14 [gr gr^{-1}].

(1.2) Recuento de células y tamaño celular. Cuando las microalgas son crecidas en condiciones de nitrógeno repletas y bajo un régimen de iluminación que contemple ciclos de luz y oscuridad, es posible observar que al inicio del día las células se presentan pequeñas y con un bajo contenido de almidón; durante las horas de luz, como resultado de la fotosíntesis y fijación de CO_2 , las células crecen en tamaño y almacenan compuestos de reserva de fácil disponibilidad (principalmente almidón), manteniéndose constante el número de células en el cultivo. Al llegar la noche, las microalgas comienzan a dividirse, utilizando el almidón almacenado como fuente de energía para la síntesis de los compuestos celulares necesarios para la replicación. Así, al final de la noche, el resultado es un aumento en el número de células, las cuales se presentan pequeñas y con bajo contenido de almidón.

Cuando el nitrógeno en el cultivo se agota, este comportamiento continúa por uno o dos días más, hasta que el contenido intracelular de nitrógeno es insuficiente para sostener la división celular. Durante este proceso, se produce en la célula un switch metabólico que detiene la replicación celular y activa la síntesis de triglicéridos. Como resultado de este cambio metabólico, durante los días posteriores las células aumentan progresivamente de tamaño durante el día, producto de la acumulación de lípidos, sin observarse un aumento en el número de células en la suspensión.

Este comportamiento puede ser observado en los resultados mostrados a través de las Figs. 1.3 (A), (B) y (C), en las cuales se representan las distribuciones de diámetros celulares. Las Figs. 1.3 (A) y (B) muestran la distribución de diámetros celulares al inicio, mitad y fin de la fase iluminada para un día típico durante la etapa de cultivo repleta de nitrógeno (Fig. 1.3 (A)) y para un día típico durante la etapa de cultivo libre de nitrógeno (Fig. 1.3 (B)). En la Figura 1.3 (C) es posible observar la distribución de diámetros celulares a la mitad del día, durante los 6 días de cultivo.

A partir de la función de distribución de diámetros celulares es posible calcular el radio promedio de las células. La forma en que evoluciona el tamaño celular en función de los ciclos de luz oscuridad en las etapas con y sin nitrógeno puede ser observado en la Fig. 1.4 (A). En la Fig. 1.4 (B) se muestra el número de células en suspensión [células ml^{-1}]. Como puede verse, el valor de esta variable crece durante los dos primeros días del cultivo y, a partir del día 3, permanece constante aún cuando el valor de la

concentración de biomasa continúa creciendo. A partir del número de células en suspensión y el valor de la concentración de biomasa es posible calcular la masa celular media. Como puede verse en la Fig. 1.4 (C), las células aumentan su masa durante las horas de día y disminuye durante las hora de oscuridad. Asimismo, puede verse que a medida que la etapa de cultivo libre de nitrógeno evoluciona las células aumentan su tamaño progresivamente.

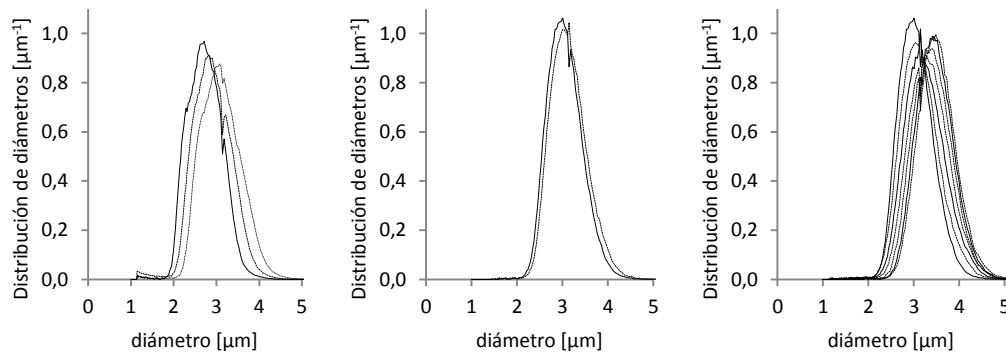


Figura 1.3. Distribución de diámetros celulares [μm^{-1}] (A) al inicio (—), mitad (- -) y fin (····) de la fase iluminada para un día típico durante la etapa del cultivo en condiciones repleta de nitrógeno; (B) al inicio(—), mitad (- -) y fin (····) de la fase iluminada para un día típico durante la fase libre de nitrógeno; y, a mitad de la fase iluminada para los 6 días de cultivos.

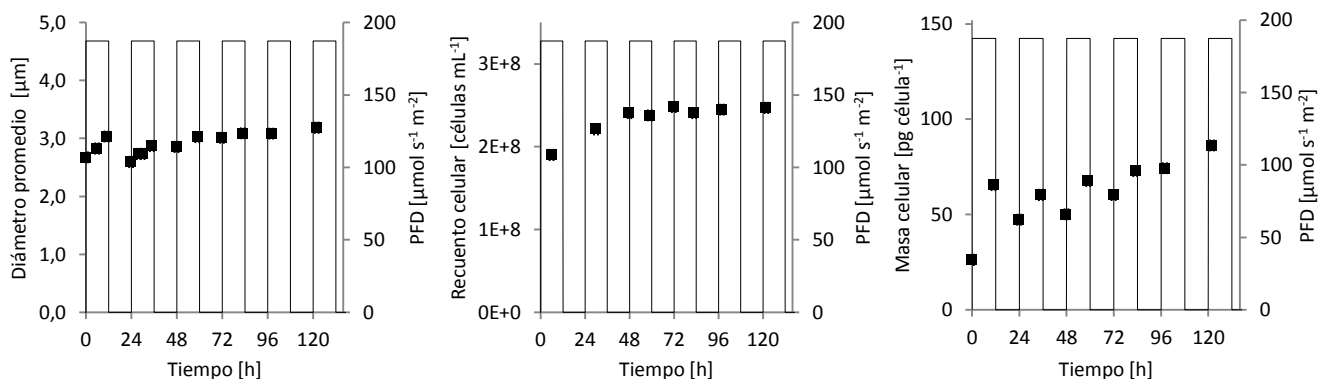


Figura 1.4. (A) recuento de células en el reactor [células mL^{-1}]; (B) masa celular [pg célula^{-1}]; y (C) diámetro celular promedio [μm].

(1.3) Producción de almidón y triglicéridos. Tanto el almidón como los triglicéridos son compuestos que las células sintetizan como reservas de energía. El almidón es un elemento de reserva de rápida disponibilidad, este compuesto se sintetiza durante las horas del día y, en situaciones de cultivo en que

las algas están saludables, sirve de fuente de energía a las reacciones enzimáticas que ocurren durante las horas oscuras, incluyendo aquellas implicadas en la división celular. Por otro lado, los triglicéridos son compuestos de reserva a largo plazo. Frente a la falta de nitrógeno la replicación celular se detiene y las algas activan la vía metabólica de síntesis de TAG de manera de canalizar la energía lumínica absorbida hacia la síntesis de compuestos de reserva, los cuales se acumulan en el interior de las células en forma de cuerpos lipídicos.

En las Fig. 1.5 puede observarse la variación del contenido de almidón en las células [gr gr^{-1}] durante los 6 días de cultivo. Como puede observarse, durante la etapa repleta de nitrógeno (día 1) la concentración de almidón intracelular es muy baja al inicio del día y se acumula durante las horas de luz. También durante los días posteriores al inicio de la fase de cultivo libre de nitrógeno el almidón se acumula durante el día y se consume durante la noche; sin embargo en los días 2 y 3, la concentración intracelular de almidón crece en forma marcada durante las horas de luz. Se ha postulado que este comportamiento nos es producto de un switch metabólico propiamente dicho, más bien es una consecuencia de la imposibilidad de sintetizar aminoácidos debido a la ausencia de N en el medio, con lo cual todos los azúcares sintetizados durante las horas de luz serían utilizados en la síntesis de almidón.

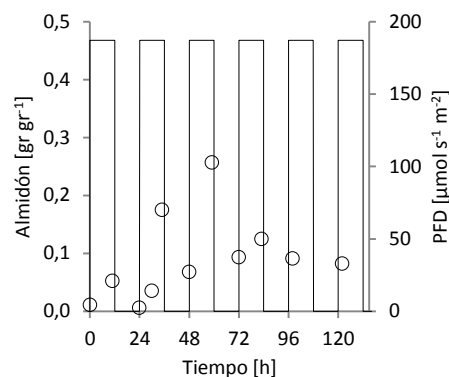


Figura 1.5. Contenido de almidón en la biomasa [gr gr^{-1}].

A partir de los datos de concentraciones de almidón y biomasa en el reactor es posible calcular la productividad [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$] y la productividad específica [h^{-1}] de almidón. En las Figs. 1.6 (A) y (B) es posible observar que la productividad aumenta en forma muy marcada al comenzar la inanición de nitrógeno, pero luego del 3er día, cuando el cambio metabólico se produjo en forma completa, la productividad de almidón en el reactor se estabiliza. Como podemos ver en la Fig. 1.1 (A), la biomasa

en el reactor varía durante el cultivo lo cual influye sobre el valor de la productividad. Si consideramos la productividad específica de almidón, variable independiente de la concentración biomasa, y que expresa la cantidad de almidón producida por cada gramo de biomasa en el reactor, vemos que su valor aumenta drásticamente el segundo día de cultivo, y luego decrece casi exponencialmente producto de la modificación del metabolismo celular; el cual se direcciona hacia la producción de TAG.

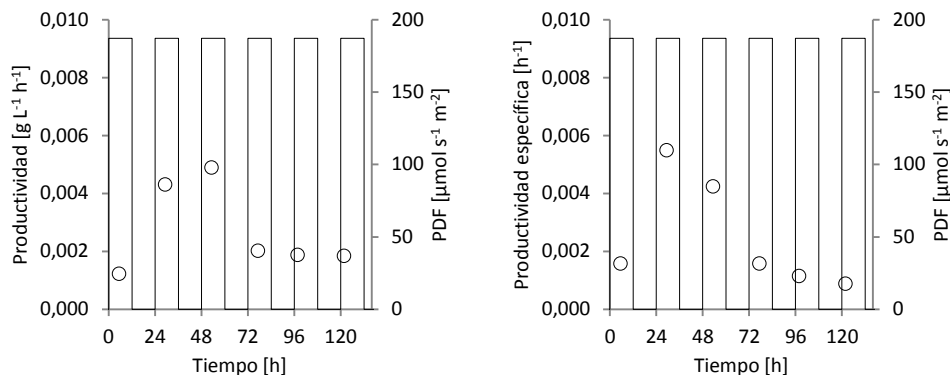


Figura 1.6. (A) Productividad de almidón en el reactor [gr L⁻¹ h⁻¹]. (B) Productividad específica de almidón [h⁻¹].

En cuanto a la acumulación de TAG, es posible observar en la Fig. 1.7 (A) que la concentración de TAG en el interior de las células es nula antes de comenzar la etapa de estrés por falta nitrógeno (día 1). A partir del inicio de la etapa de estrés, la concentración intracelular crece hasta llegar a ser el 12 % de la biomasa algal. En la Fig. 1.7 (B) es posible ver el contenido de lípidos totales en la biomasa, como puede verse el contenido de lípidos en la biomasa durante la fase de cultivo en condiciones repletas de nitrógeno es aproximadamente un 5% y, a medida que el cultivo progresa su valor se mantiene siempre por encima del valor de TAG en una magnitud semejante. La diferencia entre lípidos totales y TAG correspondería a lípidos polares, los cuales son constituyentes de las membranas celulares y organelas.

En la Fig. 1.7 (C) es posible ver cómo el valor de la productividad de TAG en el reactor crece linealmente a medida que transcurre el tiempo; este aumento se debe a dos fenómenos, al aumento de la biomasa en el reactor y el aumento en la capacidad de producción de TAG por dicha biomasa. En la Fig. 1.7 (D) es posible ver la productividad específica de TAG [h⁻¹], dicho parámetro aumenta marcadamente luego del inicio de la etapa de estrés, sin embargo, dicho aumento se reduce considerablemente a medida que progresan los días de cultivo. Como mencionamos anteriormente, la biomasa en el reactor aumenta

pero la cantidad de luz que recibe el reactor es constante, de este modo la cantidad de TAG producido por unidad de biomasa podría verse limitada por la cantidad de luz que cada unidad de biomasa recibe; pero como veremos más adelante a partir de los resultados obtenidos para los cultivos con $40\mu\text{moles s}^{-1}\text{ m}^{-2}$, este comportamiento se mantiene independientemente de la cantidad concentración de de biomasa en el reactor.

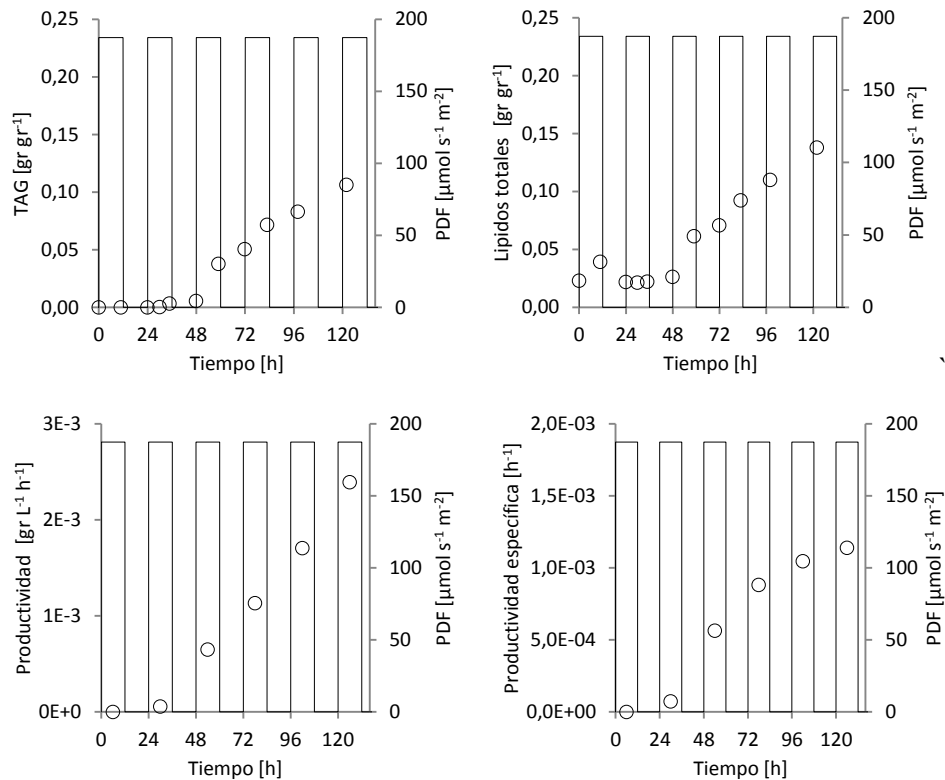


Figura 1.7. (A) Contenido de TAG en la biomasa algal [gr/gr]. **(B)** Contenido Total de lípidos en la biomasa algal [gr/gr]. **(C)** Productividad de TAG en el reactor [gr/L/h]. **(D)** Productividad específica de TAG [1/h].

En la Fig. 1.8 es posible ver la evolución de la composición de la biomasa celular durante el cultivo. Como puede verse el contenido de almidón tienen un máximo al final del segundo y tercer día de iniciado el estrés por falta de nitrógeno y alcanzando valores del 20% y 25% de la biomasa. En el caso de TAGs, su contenido aumenta a medida que progresan los días sin presentar variaciones diarias, sin embargo, su valor sólo llega a ser aproximadamente un 5% de la biomasa.

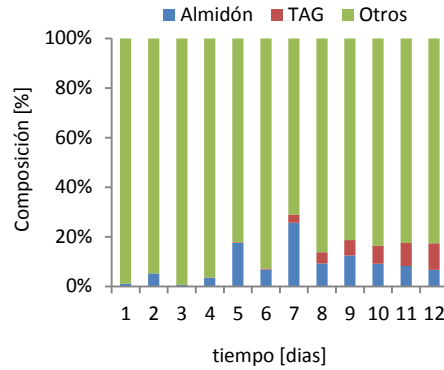


Figura 1.8. Composición de la biomasa celular.

(1.4) Análisis del la iluminación en el reactor. Durante los seis días de cultivo (uno en condiciones repletas de nitrógeno y cinco de estrés) las algas fueron iluminadas siguiendo ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. Durante las horas de luz el flujo de fotones (PDF) sobre la cara del reactor expuesta a la fuente de radiación luz fue de $190\mu\text{moles s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (dicho valor corresponde a un promedio obtenido a partir de los valores registrados sobre 40 posiciones ubicadas en la mencionada cara). Considerando el área iluminada (0.095m^2) y el volumen del reactor (1,8L); se obtuvo un régimen de iluminación de $10\mu\text{moles s}^{-1} \text{ L}^{-1}$.

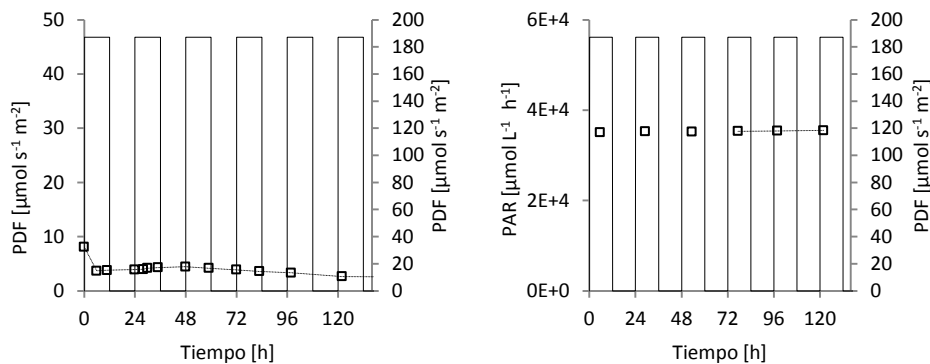


Figura 1.9. (A) Flujo de fotones en la cara posterior del reactor [$\mu\text{moles s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]. **(B)** Velocidad de absorción de fotones en el reactor [$\mu\text{moles L}^{-1} \text{ h}^{-1}$].

En la Fig. 1.9 (A) es posible ver el valor del flujo de fotones en la cara posterior del reactor. Como puede verse, dicho valor se mantiene casi constante durante el cultivo. Tal comportamiento se debe a que si bien la concentración de biomasa aumenta, la ausencia de nitrógeno en el medio produce una

disminución del contenido de pigmentos en la biomasa, con la consecuente reducción en la capacidad de absorber energía radiante. En la Fig. 1.9 (B) es posible ver que el valor de la cantidad de luz que es absorbida en el reactor permanece constante durante el cultivo, ese resultado (junto a los de la Fig. 1.9 (A)) indicaría que prácticamente toda la radiación es absorbida en el cultivo y la medición registrada en la cara posterior correspondería a la región verde del espectro, longitudes de onda de muy baja absorción.

Considerando la luz absorbida en el reactor y la concentración de biomasa es posible obtener el valor de la Velocidad de absorción de fotones en el reactor por unidad de biomasa [$\mu\text{moles g}^{-1} \text{h}^{-1}$]. Como puede verse en a Fig. 10(A) el valor de este parámetro decrece a medida que transcurre el tiempo de cultivo, confirmando que la cantidad de radiación absorbida por cada gramo de biomasa es menor. En cuanto a la cantidad de biomasa que es posible producir por μmol de fotones absorbidos, Fig. 10 (B), podemos ver que a medida progresa la etapa de estrés por nitrógeno este rendimiento decae, estabilizándose en un valor de $5,0 \times 10^{-7} \text{ gr } \mu\text{moles}^{-1}$. De la comparación de las Figs. 10 (A) y (B) es posible ver que a medida que la cantidad de fotones absorbidos por unidad de biomasa decrece el rendimiento también lo hace. Estos resultados son opuestos a los que se esperaría en un cultivo sanos, en los cuales rendimiento disminuye cuando la cantidad de fotones absorbidos aumenta (Heinrich, J.M. *et al* 2013). En este caso, la reducción en el rendimiento es debido a la condición de estrés en el cultivo. Hay que tener en cuenta que si bien la biomasa producida es menor, su contenido en lípidos aumenta y, por lo tanto, su contenido energético sería mayor y un correcto análisis debería ser llevado adelante en términos de energía producida en forma de biomasa por μmol de fotones absorbidos.

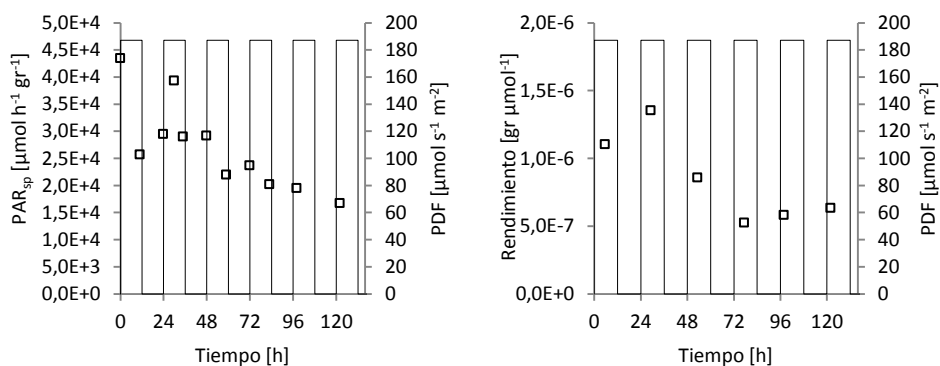


Figura 1.10. (A) Velocidad de absorción de fotones por unidad de biomasa [$\mu\text{moles gr}^{-1} \text{h}^{-1}$]. (B) Rendimiento de fotones [gr μmoles^{-1}].

(2) Cultivo en condiciones de alta iluminación: $40\mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$

(2.1) Concentración de Biomasa y productividad. Para evaluar de qué modo la cantidad de luz que recibe el cultivo acelera o retarda los cambios producido en la composición celular y la velocidad de formación de los compuestos intracelulares debido al estrés por carencia de nitrógeno en el medio, se realizó un cultivo de *N. oleoabundans* en condiciones de alta iluminación, bajo un régimen de iluminación de $40\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$.

En la Fig. 2.1 (A) es posible ver la evolución en la concentración de biomasa; el valor de dicha variables durante el cultivo es la suma de los efectos del crecimiento celular y la dilución del medio por agregado de medio fresco; ya que en este caso se eligió un modo de operar con caudales de alimentación y cosecha constantes. Esta condición de cultivo se eligió para lograr que, a diferencia del caso anterior, la biomasa en suspensión disminuya en el tiempo. Al igual que en la Figura 1.1 (A), el valor de $x(t)$ se halla entre 0.5 y $2,5 \text{ gr L}^{-1}$; aunque en este caso varía en forma inversa, el cultivo inicia en concentraciones elevadas de biomasa diluyéndose al final del cultivo.

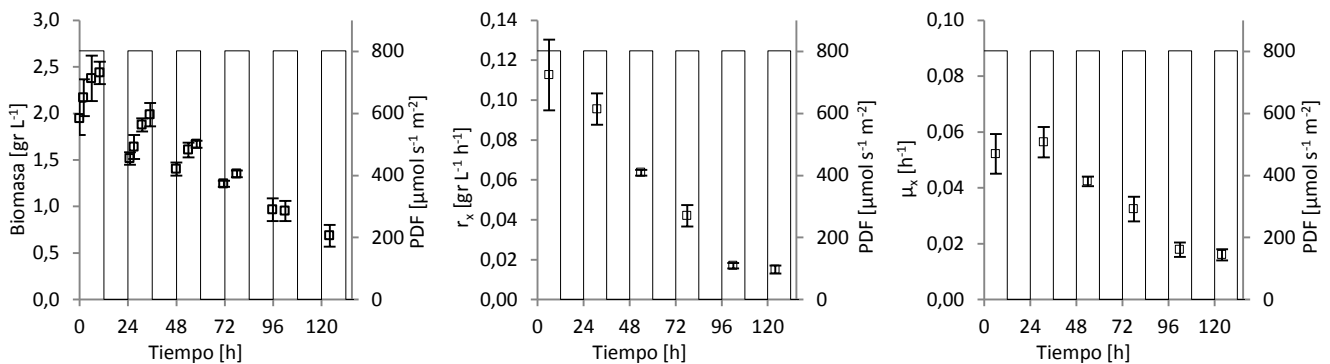


Figura 2.1. (A) Concentración de biomasa x en el tiempo [g L^{-1}]; (B) productividad [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$]; (C) Velocidad de crecimiento específica [h^{-1}].

En la Fig. 2.1(B) puede verse la evolución de la productividad, de manera inversa a lo observado en la Fig. 1.1(B), en este caso la productividad se ve reducida, debido a la reducción de la concentración de biomasa en el reactor. Sin embargo; del análisis de μ_x , es posible ver que el valor de ésta sigue el mismo comportamiento que para el caso de cultivos a baja intensidad de luz; presenta un aumento en el primer día de iniciado el estrés disminuyendo luego, hasta alcanzar un valor de casi constante.

(2.2) Recuento de células y tamaño celular. Como puede verse en la Fig. 2.2, las células de microalgas se comportan de manera similar al caso anterior ($10 \mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$). Durante la fase repleta de N inician el día con un tamaño pequeño, aumentan su diámetro promedio a medida que progresan las horas de luz y se dividen en la noche. Sin embargo, respecto al caso anterior, las células se presentan más grande, con un diámetro promedio que es casi $1 \mu\text{m}$ mayor. Al ingresar a la fase sin nitrógeno (segundo día de cultivo), al igual que en el caso anterior, se dividen sólo durante el primer día, deteniendo la replicación en la segunda noche de iniciado el estrés. En esta parte, el diámetro celular promedio es similar al caso anterior, siendo en este caso, sólo $0.2\mu\text{m}$ mayor.

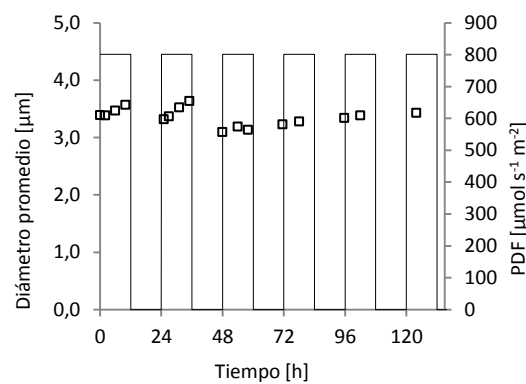


Figura 2.2. diámetro celular promedio [μm].

(2.3) Contenido celular de proteínas. Las algas crecen utilizando los compuestos presentes en el medio de cultivo para sintetizar las estructuras celulares. Durante su cultivo, se utilizan generalmente sales de nitrato como fuente de nitrógeno (aunque urea y amoníaco son también comunes su uso es menos habitual). El nitrógeno se halla presente tanto en proteínas como en pigmentos fotosintéticos y su ausencia modifica completamente la forma en que el cultivo se desarrolla. Frente al agotamiento del nitrógeno en el medio de cultivo y la imposibilidad de sintetizar proteínas, las células dejan de dividirse, activándose simultáneamente las vías de acumulación de TAG, compuestos que servirán a la célula como reservas de energía.

Como puede verse en la Fig. 2.3, el contenido intracelular de proteínas aumenta durante el primer día de cultivo (con nitrógeno); sin embargo, a partir del momento en que se elimina el N del cultivo (segundo día de cultivo) el contenido intracelular de proteínas decrece casi exponencialmente, estabilizándose en un valor que representa cerca del 20% de la biomasa. En la Fig. 2.3 pude verse que al inicio del tercer

día de cultivo se observa un incremento en el contenido intracelular de proteínas; este hecho se debe al consumo nocturno del almidón sintetizado durante el día 2 de cultivo y la consecuente disminución de la masa celular, lo cual aumenta el contenido relativo de proteínas.

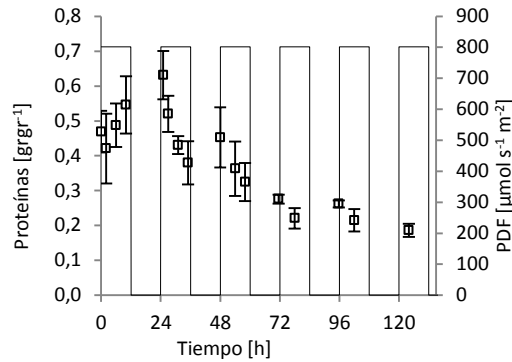


Figura 2.3. contenido intracelular de proteínas [gr gr⁻¹].

(2.4) Síntesis de almidón y otros carbohidratos. Como ya mencionamos, el almidón es sintetizado durante las horas del día y utilizado como fuente de nitrógeno en las horas oscuras para llevar adelante la síntesis de compuestos celulares y la replicación celular. Es posible ver en la Fig. 2.4(A) que, al igual que en las condiciones anteriores, en los dos primeros días de iniciada la fase de estrés por nitrógeno se produce una acumulación elevada de almidón durante las horas de luz; sin embargo, los niveles de almidón se reducen al tercer día, alcanzado valores similares a los observados durante el cultivo repleto de nitrógeno.

La concentración intracelular de otros hidratos de carbono sigue un patrón diferente al observado por el almidón: su concentración intracelular es mayor al principio de día; disminuyendo a medida que transcurren las horas de luz. Probablemente, este comportamiento se deba al incremento de la masa celular por asimilación de CO₂ y NO₃⁻ y la síntesis de almidón y proteínas, con la consecuente reducción relativa de la fracción de "otros hidratos de carbono". Los principales representantes del grupo de "otros hidratos de carbono" son los hidratos de carbono de la pared celular y glicósidos asociados a lípidos y proteínas.

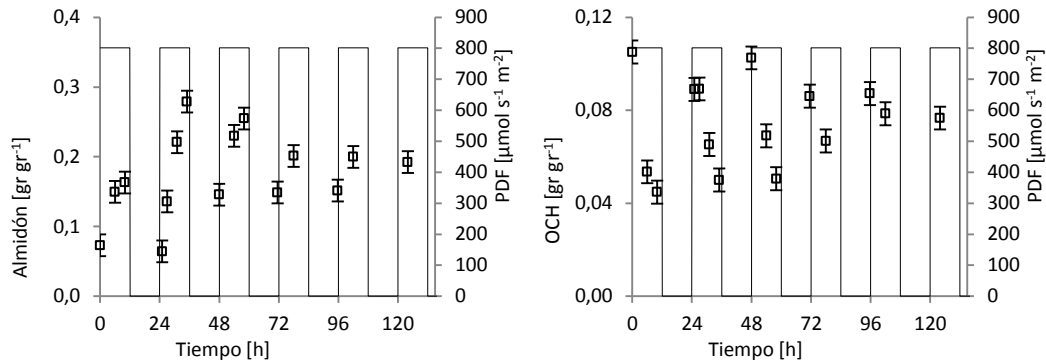


Figura 2.4. (A) Contenido intracelular de almidón [gr gr^{-1}]. **(B)** Contenido intracelular de carbohidrato diferentes al almidón [gr gr^{-1}]; calculados como la diferencia entre el contenido de total de hidratos de carbono menos el contenido de almidón.

En la Fig. 2.5 es posible ver la evolución de la producción de almidón durante el cultivo de las microalgas. Al igual que en durante el cultivo bajo un régimen de iluminación a $10 \mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$; puede observarse que luego de iniciada la eliminación de nitrógeno en el reactor se produce un incremento en la capacidad de síntesis de almidón. En la Fig. 2.5(A) observamos la productividad de almidón en el reactor, el valor de esta variable sigue un patrón diferente al observado en la Fig. 1.6(A); mientras que para el cultivo a $10 \mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ la productividad aumentó durante el día 2 y 3 de cultivo (día 1 y 2 de estrés) decreciendo a un valor basal en los días 4, 5 y 6 de cultivo (días 3, 4 y 5 de estrés); en este caso se observa un aumento en el primer día de estrés y una reducción casi exponencial de la productividad a partir del segundo día de estrés.

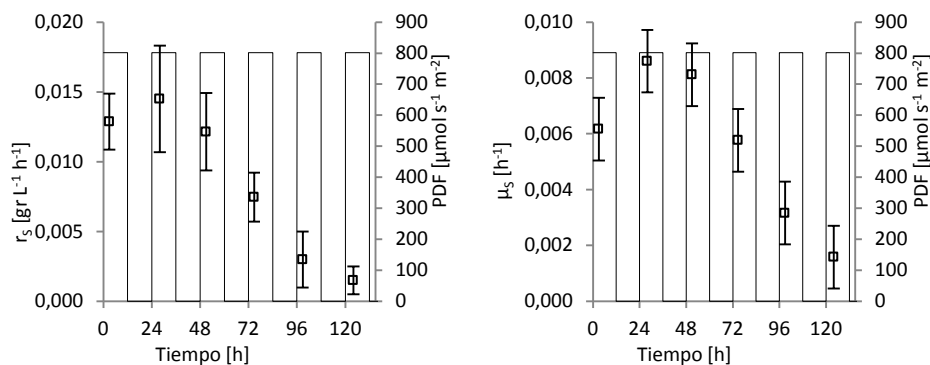


Figura 2.5. (A) Productividad de almidón en el reactor [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$]. **(B)** Productividad específica de almidón [h^{-1}].

Las diferencias en las productividades observadas a 10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ podrían deberse a que la concentración de biomasa en ambas condiciones varía en forma diferente: aumenta en el primer caso y disminuye en el segundo. Debido a la influencia que posee la concentración de biomasa en el reactor sobre la productividad se utiliza a la productividad específica de almidón [h^{-1}] como parámetro de comparación entre los cultivos a 10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$. En ambos casos esta variable muestra un valor máximo durante el primer día de estrés y una disminución casi exponencial a medida que los días de estrés continúan. Una diferencia muy importante entre ambas gráficas es la magnitud que posee dicha variable. Durante la fase de cultivo repleta de nitrógeno dicha variable toma el valor de $1.58 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $6.23 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para 10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ respectivamente. Este resultado indica que trabajando en este rango y en condiciones repletas de nitrógeno, la productividad específica de almidón varía linealmente con la cantidad de luz que recibe el cultivo. Por otro lado, al iniciarse la etapa de estrés por nitrógeno, puede verse que en ambos casos dicha productividad aumenta, sin embargo, el valor para esta variable no sigue la relación lineal observada durante la fase de cultivo repleta de N: 5.49×10^{-3} y $8.82 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para 10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ respectivamente. Otra diferencia que puede ser observada es que, a partir de el valor obtenido el primer día de estrés, esta variable desciende exponencialmente hasta llegar al valor de 8.78×10^{-4} y $1.58 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ para 10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ respectivamente; valores que tampoco mantienen la relación lineal inicial observada en condiciones repletas de N.

(2.5) Síntesis de TAG y lípidos totales. Como mencionamos anteriormente, la falta de nitrógeno dispara en las células las señales que incian la síntesis de TAG como elementos de reserva. En las Fig. 2.6 (A), (B) y (C) es posible ver la forma en que el contenido intracelular de lípidos totales; TAG y lípidos polares varías durante el cultivo. Como puede verse el contenido de lípidos totales aumentan durante el cultivo pero la acumulación de TAG sólo se inicia luego de comenzada la fase de estrés por carencia de nitrógeno. En cuanto a los lípidos polares es posible ver que el contenido intracelular varía durante el día. En la etapa repleta de N el contenido de LP aumenta durante el día; en cambio, durante los dos primeros días de iniciado el estrés por nitrógeno el contenido intracelular de LP es máximo al principio del día y se reduce durante las horas de luz; este comportamiento podría deberse a la acumulación de almidón durante las horas de luz y su consumo durante la noche, lo cual modificaría el contenido relativo de los demás compuestos. Luego del tercer día de iniciado el estrés, el contenido intracelular de LP se estabiliza.

En relación a los TAG, en ambos cultivos, 10 y 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$, la concentración intracelular de TAG aumenta en forma cuasi lineal durante la fase de estrés. Como puede verse en a Fig.1.7, para cultivos a 10 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$, dicha variable alcanza un valor cercano al 12% al quinto día de estrés; mientras que para cultivos a 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ se registra un valor del 38%.

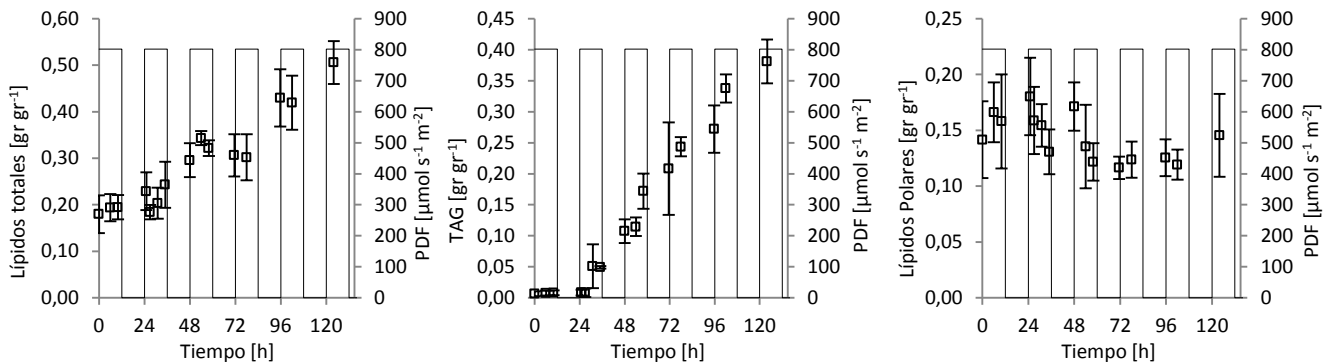


Figura 2.6. (A) Contenido intracelular de lípidos totales [gr gr^{-1}]. **(B)** Contenido intracelular de TAG [gr gr^{-1}]. **(C)** Contenido intracelular de LP [gr gr^{-1}].

En las Figs. 2.7 (A) y (B) puede verse la forma en que la capacidad de producir TAG varía luego de iniciada la fase de estrés por N bajo una condición de iluminación de 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$. En la figura se observa que existe un máximo en los valores de productividad al tercer día de iniciado el estrés; al comparar estos resultados con los obtenidos para 10 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$, es posible ver que en el primer caso los valores de r_{TAG} crecen durante los cinco días que dura la fase de estrés, hasta alcanzar el valor de $2.39 \times 10^{-3} [\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}]$ al quinto día. Sin embargo, para el cultivo a 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ los valores de r_{TAG} crecen hasta el tercer día de estrés, alcanzando el máximo de $9.14 \times 10^{-3} [\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}]$ y, a partir de ahí, r_{TAG} comienza a disminuir.

Como vimos anteriormente, debido a las diferencias en las tasas de diluciones empleadas, en los cultivos a 10 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ la concentración de biomasa aumenta, mientras que para 40 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ la biomasa disminuye luego de iniciado el estrés. Estas diferencias influyen sobre los valores de productividad del reactor. Para comparar el comportamiento del cultivo en ambas condiciones recurrimos al valor de μ_{TAG} ; que expresa la cantidad de TAG producido por unidad de biomasa. Como es posible ver en la Fig. 2.7(B) el valor de μ_{TAG} también presenta un máximo al tercer día luego de iniciado el estrés, máximo que no está presente en el caso de cultivos a 10 $\mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$.

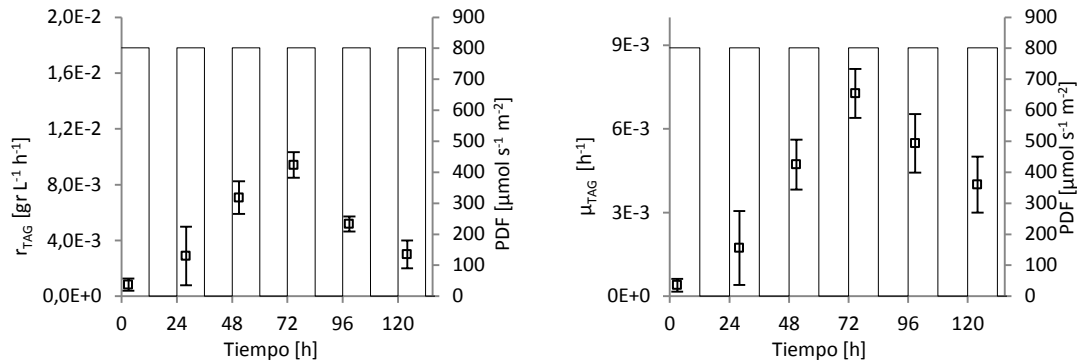


Figura 2.7. (A) Productividad de TAG en el reactor [$\text{gr L}^{-1} \text{h}^{-1}$]. **(B)** Productividad específica de TAG [h^{-1}].

Si observamos los valores μ_x para las dos condiciones de cultivo (Figs. 1.1 y 2.1), podemos ver que dichos valores no varían significativamente; sin embargo, los valores de μ_{TAG} si lo hacen; estos resultados concuerdan con los obtenidos por A. Klok y colaboradores (Klok et al., 2013) en donde se propone que en condiciones de estrés por deficiencia de N en el medio de cultivo, la síntesis de TAG actúa como sumidero de energía. De esta manera; el exceso de energía absorbida es canalizado a la síntesis de TAG y, por lo tanto, dicho resultado deberá ser tenido a la hora de diseñar los reactores.

(2.6) Composición de los TAG. Los AG son materia prima en diferentes industrias: alimentos animal y humanos, biocombustibles, cosmética, nutracéuticos, etc. Dependiendo producto a elaborar, la composición de los TAG en términos de los AG que lo componen deberá ser modificada. Un aspecto importante del cultivo de microalgas es que durante su producción la proporción relativa de cada AG presente en las células no es constante, sino que sufre modificaciones.

En la Fig. 2.8 es posible ver la evolución de las fracciones de los diferentes AG en los lípidos. Al principio del cultivo puede verse que los AG 16:3 y 18:3 constituyen una fracción importante; esto se debe a su presencia en los LP que forman las membranas celulares. A medida que el cultivo progresa a través de la fase de estrés y se comienzan a sintetizar TAG, los AG 16:3 y 18:3 pasan a ser una fracción minoritaria y las células se enriquecen principalmente en 18:1.

Las fracciones de los AG C16:0 y C18:2 permanecen constante durante el cultivo, esto no significa que su síntesis se detiene, su síntesis continua pero a la misma tasa que lo hace la síntesis de total de AG y por

ello la proporción presente en la mezcla permanece constante. Una explicación similar puede aplicarse al caso de los AG C16:3 y C18:3, su síntesis no se detiene, ocurre a una tasa menor que la síntesis total de AG y por ello su fracción se reduce.

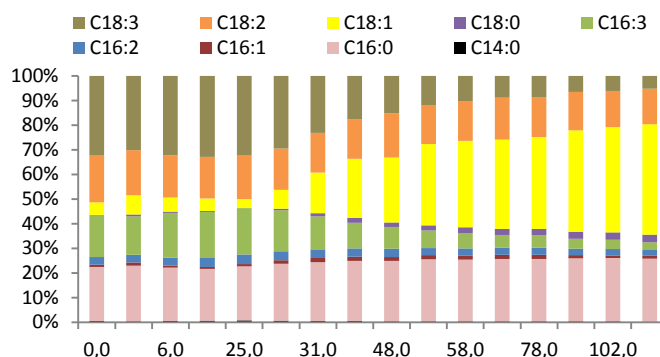


Figura 2.8. Composición de los AG presentes en los TAG

(2.7) Composición celular. A partir de los resultados obtenidos para proteínas totales, almidón, carbohidratos totales, TAG y lípidos totales es posible ver la forma en que la composición de la biomasa varía durante el cultivo (Fig. 2.9). Como es posible apreciar en la Fig. 2.9 la concentración inicial de TAG es prácticamente nula al inicio del cultivo, pero luego de cinco días de estrés constituye a fracción mayoritaria de la masa celular. El almidón por su parte no sólo varía a lo largo de los días del cultivo; sino que también presenta variaciones durante los ciclos de luz oscuridad; su concentración es mínima al principio del día y máxima al final del mismo, esto se debe a que se acumula durante las horas de luz y se consume como fuente de energía por las noches. Resulta importante destacar que la máxima concentración intracelular de almidón se logra al final del primer y segundo día de iniciado el estrés por ausencia de N, un resultado importante que deberá ser considerado durante la producción a escala si es el almidón el producto buscado.

En cuanto a proteínas, su mayor concentración corresponde a la fase de cultivo repleta de N. Durante la fase de estrés, la ausencia de N en el medio y el crecimiento celular hacen que la fracción de proteínas en la biomasa se reduzca. Al igual que las proteínas, la fracción de LP es mayor durante la etapa de cultivo repleta de N; esto se debe a que la presencia de N es necesaria para la síntesis de clorofila presente en los cloroplastos. La ausencia de N impide la síntesis de clorofila inhibiendo simultáneamente la síntesis de los LP que forman las membranas tilacoides.

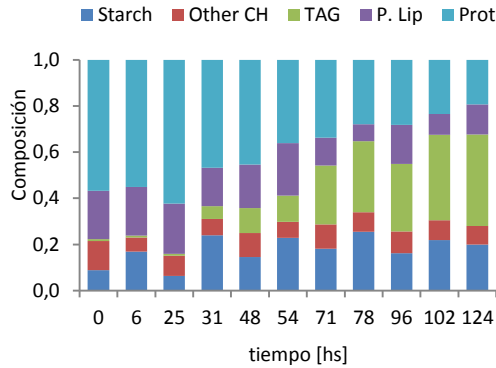


Figura 2.9. Composición de la biomasa celular.

(2.8) Análisis de la iluminación en el reactor. En esta ocasión el reactor fue iluminado con un flujo de fotones sobre la superficie de $800 \mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$; considerando la geometría del reactor, el régimen de iluminación al que está sometido el cultivo corresponde a $40 \mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$. Como puede verse en la Fig. 2.10 (A) la cantidad de luz que sale por la cara posterior del reactor crece en forma casi exponencial, producto de la suma de dos efectos, la reducción de la concentración de biomasa en el reactor y la pérdida de la capacidad de absorción de la luz por parte de la células, debido a su incapacidad de sintetizar clorofila por carencia de N.

En la Fig. 2.10 (B) es posible ver la tasa de absorción de fotones en el reactor; en comparación al cultivo bajo un régimen de $10 \mu\text{moles s}^{-1} \text{L}^{-1}$ (Fig. 1.9), en este caso dicho valor se reduce, aunque sus magnitud se mantiene siempre por encima de los valores calculados para el caso anterior.

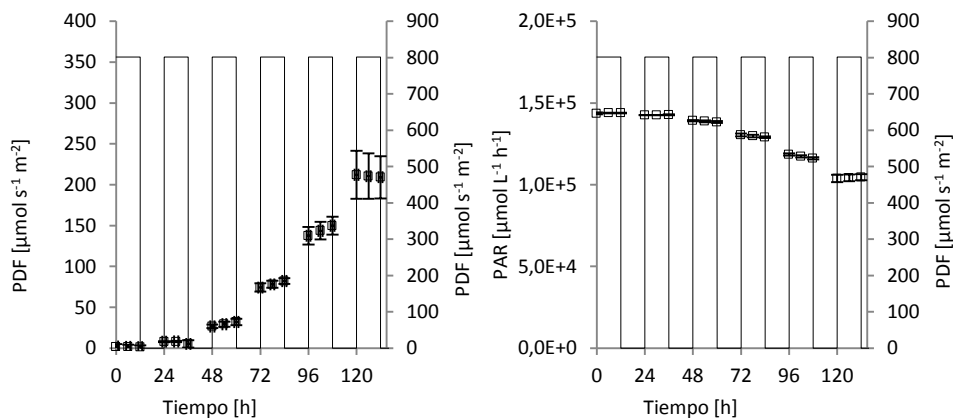


Figura 2.10. (A) Flujo de fotones en la cara posterior del reactor [$\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$]. (B) Velocidad de absorción de fotones en el reactor [$\mu\text{moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$].

Considerando la luz absorbida en el reactor y la concentración de biomasa es posible obtener el valor de la Velocidad de absorción de fotones en el reactor por unidad de biomasa [$\mu\text{moles gr}^{-1} \text{h}^{-1}$]. Como puede verse en a Fig. 2.11(A) el valor de este parámetro crece a medida que transcurre el tiempo de cultivo. En cuanto a la cantidad de biomasa que es posible producir por μmol de fotones absorbidos, Fig. 2.11(B), podemos ver que a medida progresa la etapa de estrés por nitrógeno este rendimiento decae, estabilizándose en un valor de $5,0 \times 10^{-7} \text{ gr } \mu\text{moles}^{-1}$.

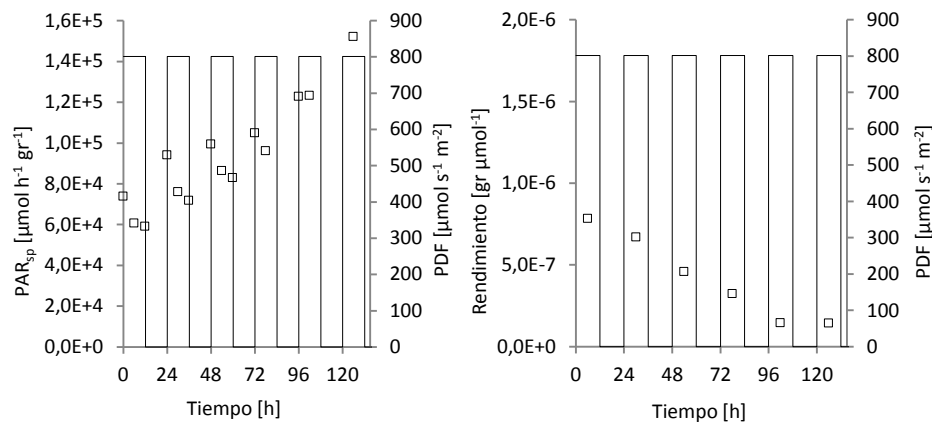


Figura 2.11. (A) Velocidad de absorción de fotones por unidad de biomasa [$\mu\text{moles/g/h}$]. (B) Rendimiento de fotones [$\text{gr } \mu\text{moles}^{-1}$].

De la comparación entre ambas condiciones de cultivo, 10 y $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$, es posible ver que durante todo los seis días el rendimiento es mayor cuando la cantidad de fotones absorbidos por unidad de biomasa es menor. Estos resultados son coherente con antecedentes bibliográficos (De Vree, J.H., 2015; Heinrich, J.M., 2013) y es un punto de suma importancia a la hora de diseñar los reactores. Cuanto mayor es la iluminación que se provee al reactor, mayor es su capacidad de producir biomasa, sin embargo el uso de los fotones absorbidos es cada vez menos eficiente.

(11) Rendimiento cuántico. La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas y algas transforman la energía de la luz en formas químicas estables. El proceso por el cual esto es llevado a cabo es complejo e involucra varios mecanismos físicos y químicos, y numerosos componentes. El proceso se inicia cuando los fotones son absorbidos por las moléculas presentes en la antenas de las membranas fotosintéticas. Los fotones absorbidos son transferida en forma de exitones hacia el centro

de reacción en donde son atrapados y utilizados en reacciones químicas o disipados, ya sea en forma de calor o emitidos como fluorescencia. Las características de la fluorescencia emitida dependerán del tipo de pigmento, de la forma en que procede la transferencia de energía y, de la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes. Otro factor de importancia es el estado redox del centro de reacción y de los dadores y aceptores de electrones que participan del proceso fotosintético. El rendimiento cuántico es una relación entre los fotones absorbidos y los emitidos mediante fluorescencia. En otras palabras QY es una forma de cuantificar la probabilidad de que el estado excitado sea desactivado por fluorescencia y no mediante otro mecanismo no radiativo. Cuanto mayor es el valor de QY; mayor es la fracción de fotones absorbidos que son eficientemente utilizados por el sistema fotosintético.

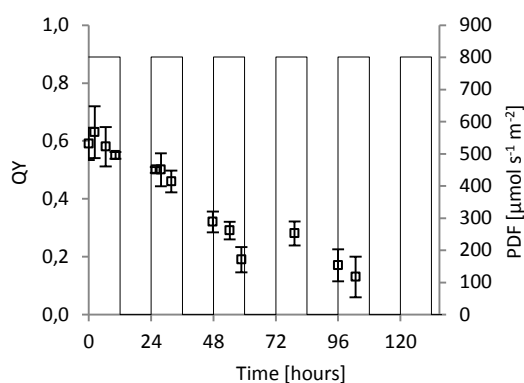


Figura 2.12: Rendimiento cuántico QY

El Valor de QY no es un valor absoluto; su utilidad radica en la posibilidad de comparar el estado de organismo, tejido o cultivo de células. Como puede verse en la Fig. 2.12, la forma en que el valor de QY evoluciona a través del cultivo es semejante a la forma en que lo hace el rendimiento en términos de biomasa producida por μmol de fotones absorbidos; aunque la relación entre ambas no es clara. Un aspecto importante que debe tenerse en cuenta es que el perfil de pigmentos presentes en la biomasa cambia; mientras que las clorofilas disminuyen por ausencia de N en el medio, la concentración de carotenoides aumenta y, por ello, los eventos de fluorescencia también lo hacen.

4.- CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos es posible concluir que dependiendo del producto final deseado, la estrategia de producción a adoptar deber ser diferente. Si el producto final buscado ha de utilizarse como

fuelle de proteínas, entonces la producción deberá realizarse en condiciones repletas de nitrógeno. En cambio, la producción de TAGs necesariamente debe llevarse a cabo en condiciones de cultivo bajo estrés por ausencia de fuentes de nitrógeno en el medio. Para producir almidón, la cosecha de las microalgas deberá realizarse durante las últimas horas del día y, preferentemente, el cultivo deberá ser sometido a estrés por falta de nitrógeno durante 1 o 2 días, pero no más tiempo que esto.

Comparando los regímenes de iluminación, las productividades más altas de biomasa, almidón y TAG se corresponden con las mayores intensidades sin embargo, la eficiencia en el uso y conversión de la energía solar a biomasa se ve reducida. Asimismo, fue posible observar que la concentración intracelular de almidón y TAG está fuertemente influida por la cantidad de luz que alcanza al cultivo; pero, independientemente de si el régimen de iluminación es bajo o alto, el rendimiento en términos de biomasa producida por fotón absorbido [$\text{gr } \mu\text{mol}^{-1}$] se reduce a media que la fase de estrés progresa. Dicha reducción se corresponde con una disminución del QY. Es importante destacar que si bien el rendimiento en términos de biomasa producida se reduce en condiciones de estrés, el contenido energético de la biomasa producida aumenta y el análisis debería realizarse en términos de energía producida en forma de biomasa por fotón absorbidos [$\text{KJ } \mu\text{mol}^{-1}$] o, considerando el contenido energético de los fotones absorbidos, en términos energía producida como biomasa por unidad de energía absorbida [KJ KJ^{-1}]

Por otro lado también se observó que la composición de los TAG cambia durante los días que dura el estrés. Los TAG se enriquecen en la fracción de ácidos grasos C18:1; aparecen los AG C18:0 pero su fracción es siempre baja; los AG C16:3 y C18:3, que son mayoritarios en condiciones de cultivo repletas de N, se reducen considerablemente; por último, la fracción de los AG C18:2 queda casi constante. Por su parte, la concentración de LP en la biomasa decrece durante el estrés.

CAPÍTULO 2

RESUMEN

En este capítulo se obtiene una expresión cinética que permite vincular la disponibilidad de luz en el medio de cultivo con la velocidad de propagación celular de las microalgas. Esta expresión es válida en condiciones de baja iluminación y fue deducida a partir de las reacciones que forman la etapa dependiente de la luz de las fotosíntesis, asumiendo que en condiciones de baja iluminación la luz es el sustrato limitante y que la velocidad de propagación celular es proporcional a la velocidad de formación de NADPH e independiente de la disponibilidad de CO₂. La expresión cinética obtenida es función de la concentración celular de microalgas en el medio y de la velocidad volumétrica local de absorción de fotones, e incluye dos parámetros K₁ y K₂. Para determinar el valor de estos parámetros y probar la hipótesis señalada se realizaron diferentes cultivos autotróficos de la cepa de microalga *Chlorella* sp. en un medio BBM modificado y bajo tres condiciones de CO₂ en la corriente gaseosa: 0.034%, 0,34% y 3,4%. A partir del modelado del campo de energía radiante y la predicción del valor de la velocidad volumétrica local de absorción de fotones es posible, en base a esta expresión, escalar el proceso en forma sistemática e independiente de la configuración y geometría del fotobioreactor.

1.- INTRODUCCIÓN: PLANTEO DE LA PROPOSICIÓN Y EXPOSICIÓN DE LO HECHOS RELACIONADOS CON LA MISMA.

La utilización de microalgas como fuente de aceites para la fabricación de biocombustibles ha recibido mucha atención en los últimos años. Esto se debe principalmente a que poseen mínimos requerimientos nutricionales y son capaces de utilizar la energía solar en forma más eficiente que las plantas superiores (incluyendo a los cultivos tradicionales como el trigo, maíz, soja, caña de azúcar, etc.) (Olivieri, G. *et al*, 2014; Lee, E. *et al*, 2014). No sólo son capaces de multiplicarse a elevadas velocidades (aumentando el rendimiento de los cultivos en términos de toneladas de aceite producido por hectárea cada año) sino que además pueden hacerlo en aguas residuales y agua de mar, no aptas para consumo humano o uso agrícola. Asimismo es posible llevar adelante su cultivo en zonas áridas, terrenos inundables o en suelos no cultivables, por lo que no compiten por el suelo con la agricultura tradicional. Por otro lado, no sólo la industria del biodiesel presta atención en estos organismos, también han sido señaladas como materia prima en la producción de alimento humano o animal; como remediadoras ambientales en el tratamiento de efluentes; como fuente de productos de alto valor agregado para la industria alimenticia o cosmética (tales como pigmentos, antioxidantes, PUFAs); y, como plataforma biotecnológica para la expresión de proteínas recombinantes; etc. (Atlas, R. M., 2005).

En la última década se han alcanzado importantes desarrollos en cada una de las etapas involucradas en el proceso de producción, considerando tanto las operaciones up-stream como down-stream de esta tecnología. Sin embargo, a pesar de estos avances logrados, es necesario aún un mayor desarrollo para alcanzar una tecnología final sustentable y económicamente viable (Mata, T.M. *et al*, 2010; Wijffels, R.H. *et al* 2010). En lo que respecta a la etapa de cultivo, por ejemplo, es necesario resolver cuestiones como (i) de qué manera lograr una iluminación efectiva y eficiente del cultivo; (ii) cómo proveer

dióxido de carbono al cultivo, permitiendo el enriquecimiento de la corriente de aire con CO₂ adicional y a la vez minimizando las pérdidas hacia la atmósfera; (iii) cómo remover el oxígeno producido durante la fotosíntesis, el cual podría ser inhibitorio del crecimiento celular; (iv) de qué manera debe realizarse el escalado del cultivo desde los reactores de laboratorio hasta los reactores de producción a gran escala.

El objetivo del presente capítulo es obtener una expresión cinética que permita predecir la velocidad de propagación de las microalgas en función de la disponibilidad de luz en el cultivo. Para ello es necesario: (i) conocer cuál es la propiedad del campo de energía radiante (CER) vinculada a la velocidad de crecimiento; (ii) hallar un método que permita cuantificar esa propiedad dentro de la suspensión; y, por último, (iii) determinar de qué manera la velocidad de propagación celular depende del valor de esta propiedad del CER.

Las microalgas fotosintéticas utilizan agua como fuente de electrones, luz solar como fuente de energía y dióxido de carbono como fuente de carbono (Lee, E. *et al*, 2014). La luz llega al cultivo desde una fuente de radiación (natural o artificial) a través de una o más superficies iluminadas. Dentro del cultivo, la luz es parcialmente absorbida por las células reduciendo la cantidad de energía que portan a medida que la distancia a la superficie iluminada aumenta. Este fenómeno es espectralmente dependiente: la magnitud con que ocurre la absorción de energía radiante no es igual para todas las longitudes de onda sino que presenta un patrón definido por dos zonas de alta absorción (400 a 500nm y 600 a 690nm), separadas por una región de baja absorción (500 a 600nm) (Figura 1(a)). Por otro lado, la presencia de microalgas suspendidas en el medio provoca la dispersión de los haces de luz, haciendo que parte de la energía que portan sea desviada de su dirección original (Figura 1(b)). El fenómeno de dispersión no produce pérdida neta de energía en el cultivo, sólo una redistribución de los haces de luz en nuevas direcciones a medida que los mismos se propagan dentro del medio. La presencia de absorción y dispersión de radiación tiene dos consecuencias: (i) se presentan dentro del reactor zonas más y menos iluminadas; y (ii) la composición espectral de la luz en las zonas más profundas es diferente al perfil de emisión de la lámpara, y está enriquecida en longitudes de onda fotosintéticamente menos favorables.

Debido a los fenómenos de transferencia de energía radiante que se producen entre el reactor y la fuente de radiación y a los fenómenos de absorción y dispersión de energía radiante que ocurren en el cultivo, la cantidad de luz que llega a una posición específica en el medio depende de: (i) las geometrías y posiciones relativas de la lámpara y el reactor; (ii) de la cantidad de luz que emite la lámpara y su perfil de emisión; (iii) de la posición en el reactor; (iv) de la magnitud con que se presenten los fenómenos de

absorción y dispersión de energía radiante en el cultivo; (v) de los fenómenos de reflexión y refracción en las superficies del reactor; y, (v) de la dispersión de energía radiante debido a presencia de burbujas u otras partículas en el medio de cultivo, en el caso que estén presentes.

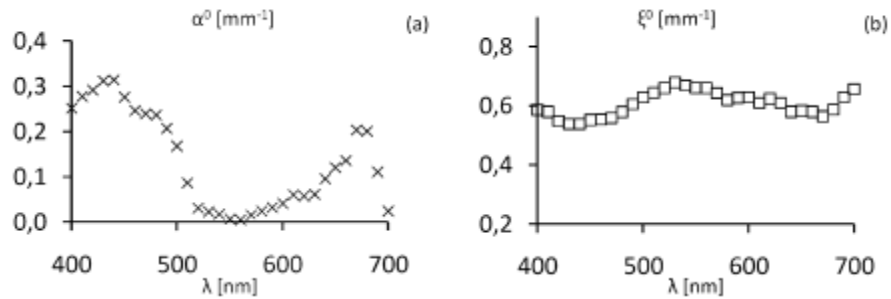


Figure 1. (a) coeficiente espectral de absorción de energía radiante en función de la longitud de onda; (b) coeficiente espectral de dispersión de energía radiante en función de la longitud de onda. Ambos coeficientes corresponden a una suspensión de *Chlorella* sp. con una concentración de $1,65 \text{ g L}^{-1}$.

Previamente a este trabajo, se desarrolló una metodología basada en el método de Monte Carlo para la simulación del CER en FBR (Heinrich, J.M. *et al*, 2012(a) y (b)). Dicho modelo trata a la suspensión de algas como un medio continuo, con centros de absorción y dispersión homogéneamente dispersos dentro del mismo, y a la luz como un conjunto de fotones moviéndose a la velocidad de la luz dentro de esta suspensión. Ese modelo fue aplicado en la determinación de las propiedades ópticas de las suspensiones de microalgas, estas propiedades son el coeficiente espectral α_λ de absorción de energía radiante, el coeficientes espectral ξ_λ de dispersión de energía radiante y la función de fase $B(\underline{\Omega}' \cdot \underline{\Omega})$ asociada al fenómeno de dispersión de energía radiante (Figuras 1(a) y 1(b)). Posteriormente, la metodología de simulación fue utilizada junto con los parámetros ópticos obtenidos para la simulación y el análisis del CER en el FBR que será utilizado en este trabajo (Figura 2) (Heinrich, J.M. *et al*, 2013). Como resultado fue posible conocer el valor de la velocidad volumétrica local r_{Vis}^{abs} de absorción de fotones con $400 < \lambda < 700 \text{ nm}$ y caracterizar la evolución de esa propiedades del CER durante la propagación de las células. Asimismo fue posible cuantificar el grado de estratificación en el reactor, a través de la función $g(r_{Vis}^{abs}, t)$ de distribución de volúmenes de reactor en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones r_{Vis}^{abs} , analizando cómo el aumento en la concentración de microalgas resulta en la

presencia de zonas oscuras o *self-shading* y, además, determinar la forma en que se modifica la distribución espectral de la radiación que portan los haces de luz a medida que los mismos avanzan hacia zonas más profundas del cultivo.

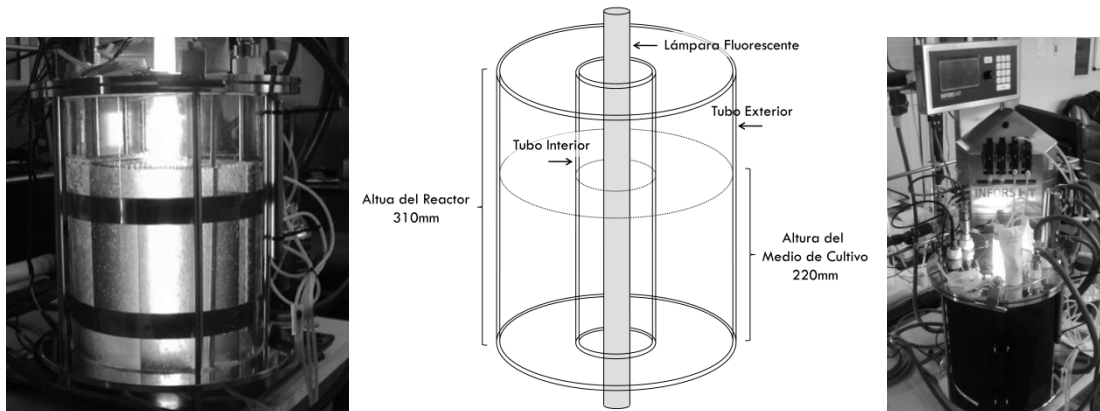


Figura 2: el FBR consiste en dos cilindros de vidrio alineados en forma concéntrica a una lámpara fluorescente. Diámetro de la lámpara: 26mm; diámetro interno del FBR: 50mm; diámetro externo del FBR: 250mm; altura del FBR: 310mm; altura del medio de cultivo: 220mm

En este trabajo se obtiene una expresión cinética para caracterizar la velocidad r_x de crecimiento de la cepa de microalga *Chlorella* sp., a partir de las reacciones presentes en la etapa dependiente de la luz de la fotosíntesis. Como resultado se obtiene una expresión cinética que depende de la velocidad volumétrica local de absorción de fotones (r_{vis}^{abs}), que es válida en condiciones de baja iluminación y que considera la presencia de zonas más y menos iluminadas dentro del reactor. Lo más importante de esta cinética es su carácter intrínseco, independiente de la geometría y configuraciones del reactor y la lámpara, lo cual permitiría su aplicación posterior durante las etapas de scaling-up.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

(a) Microalga e inóculo: en este trabajo se utilizó la cepa de microalga *Chlorella* sp., aislada de la Laguna Setúbal (Santa fe, Argentina) gentilmente cedida por la Dra. A. M. Gagneten, FHUC, UNL. Los inóculos fueron preparados de la siguiente forma: Erlenmeyers con 750 ml de medio BBM (Atlas, R. M., 2005) fueron esterilizados por 15 minutos a 121° C en autoclave e inoculados con la cepa de microalgas. Los inóculos fueron crecidos axénicamente a temperatura ambiente, iluminados con luz

fluorescente (Philips, 20 Watts, *daylight fluorescent lamp*), burbujeando aire atmosférico esterilizado mediante filtración (0.45 μm *pore size filter*) para agitar, proveer CO_2 y evitar la acumulación del O_2 producido, hasta alcanzar una concentración celular suficientemente alta (aprox. 500 mg L^{-1}).

(b) Reactor y condiciones de cultivo: El FBR consiste en dos tubos de vidrio de 50 y 250mm de diámetro externo, colocados concéntricamente a una lámpara fluorescente de 26 mm de diámetro (Figura 2 y Figura 3(a)). Para administrar CO_2 , eliminar el oxígeno producido por fotosíntesis y favorecer el mezclado, el reactor fue provisto de seis difusores de aire de vidrio sinterizado colocados simétrica y equidistantemente sobre la base del reactor. Para hacer más eficiente el mezclado y ordenar el flujo de burbujas, el reactor fue tabicado con 12 láminas verticales de acero inoxidable espejado colocadas en dirección radial al eje de la lámpara. Estas planchas dividen al reactor en 12 regiones, separándolo en zonas con y sin burbujas, una a continuación de la otra en forma alternada. Los tabiques poseen las mismas dimensiones: la altura de los mismos es de 180mm y su largo es de 96mm, extendiéndose desde la superficie externa del tubo de vidrio interno hasta la superficie interna del tubo de vidrio externo. Intercaladamente, los tabiques fueron colocados uno a la altura de la base del reactor, seguido de otro colocado 40mm por encima de la base del reactor. De esta manera la comunicación entre zonas contiguas sucede secuencialmente por encima o por debajo del tabique, produciendo en el reactor un flujo "zigzag" o "carrusel" (Figura 3.2). Para regular el caudal de aire y la temperatura, y registrar el pH y la pO_2 , el reactor fue conectado a una plataforma de cultivo Labfors 3 de Infors-HT. El caudal de aire fue mantenido en 0,3vvm y el la temperatura en 25° C. La iluminación se realizo mediante una lámpara fluorescente (Philips, daylight fluorescent lamp, de 16Watts) de 26mm de diámetro externo, durante las 24hs del día. Como fue previamente descrito, la emisión de la lámpara es isotrópica y espectralmente dependiente. Para evitar que la luz ambiental alcance la suspensión de algas, el reactor fue cubierto con una manta negra. Se llevaron adelante cultivos de microalgas en tres condiciones diferentes, variando la concentración de dióxido de carbono en la corriente gaseosa. Para ello 500 ml de inóculo fueron utilizados para iniciar el cultivo en un FBR de 10 L de volumen útil, conteniendo 9.5 L de medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo BBM modificado según la Tabla I de modo de lograr iguales pH y presión osmótica al modificar la concentración de dióxido de carbono en la fase gas. Asimismo, se reemplazó la fuente de nitrógeno original por urea, de manera de evitar las modificaciones en el pH del cultivo que produce el metabolismo del nitrato.

Tabla I: Modificaciones del medio BBM según la composición de la corriente de aire.				
Compuesto/Propiedad	BBM original	BBM modificado según el porcentaje de CO ₂ .		
		0.034%	0.34%	3.4%
NaOH [mol L ⁻¹]	0.0	1.98 10 ⁻⁴	7.05 10 ⁻⁴	5.88 10 ⁻³
NaCl [mol L ⁻¹]	4.28 10 ⁻⁴	2.69 10 ⁻³	2.12 10 ⁻³	0.0
pH	6.39	7.0	7.0	7.0
NaNO ₃ [mol L ⁻¹]	2.94 10 ⁻³	0.0	0.0	0.0
Urea [mol L ⁻¹]	0.0	1.47 10 ⁻³	1.47 10 ⁻³	1.47 10 ⁻³
Fuerza iónica [mol L ⁻¹]	8.01 10 ⁻³	8.00 10 ⁻³	7.94 10 ⁻³	1.10 10 ⁻²
Presión osmótica [mmHg]	209.6	210.2	210.2	227.4

(c) **Simulación de CER en el FBR:** Para determinar los parámetros cinéticos que relacionen la disponibilidad de luz con la velocidad de crecimiento, se diseñó y construyó un reactor anular (Figura 3). La geometría anular se eligió para facilitar el modelado matemático. La simulación por el método de MC del CER se inicia desde la fuente de emisión. La emisión de la lámpara es superficial e isotrópica; y emite homogéneamente sobre toda su superficie. De forma aleatoria se elige una posición r_L sobre la superficie de la lámpara y se asignan, al azar, una dirección $\hat{\Omega}$ y una longitud de onda λ al fotón, considerando las características de emisión de la fuente de radiación. De manera sucesiva se simula la trayectoria de un número suficientemente grande de fotones a través de cada una de las partes que componen al reactor hasta su eventual final (Figura 3(a)). Los fotones sólo pueden ser removidos del CER al ser absorbidos en la suspensión de microalgas, al impactar sobre alguna superficie negra opaca o al abandonar el reactor por el vidrio externo. Sobre la base, tapa y tabiques, todos ellos de acero espejado, la reflexión de fotones se modeló como una reflexión especular. El efecto sobre el CER de los dispositivos de medición y control (pH-metro, sonda de O₂, dedo frío, sensor de temperatura, toma de muestra, etc.) fue despreciado. En la simulación del CER dentro del reactor mediante el método Monte Carlo, los fotones son emitidos uno a uno en forma sucesiva desde la lámpara atravesando distintos eventos en su camino. Aunque los fotones son emitidos secuencialmente y su camino es simulado uno a uno, es importante recordar que todos ellos son simultáneos y que en conjunto simulan la distribución del CER en un instante dentro del reactor, el cual alcanza el estado estacionario, para cada una de las sucesivas etapas a través de las cuales evoluciona el cultivo de microalgas. Para el modelado matemático, el programa de simulación del CER dentro del reactor fue dividido en 14 subrutinas (Figura 3(b)), donde cada una modela independientemente lo que sucede en alguna frontera o espacio dentro del

de 50mL del medio de cultivo fueron retenidas mediante un filtro de fibra de vidrio (0,45µm), lavadas con agua destilada para retirar los restos de medio y secadas en estufa a 100° C durante 1 hora. La biomasa celular fue reportada en gramos de biomasa seca por litro de medio de cultivo [gDW L⁻¹].

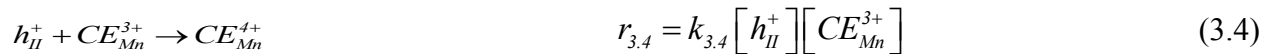
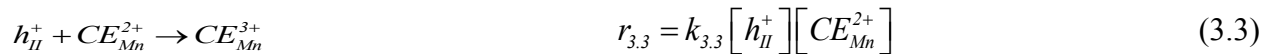
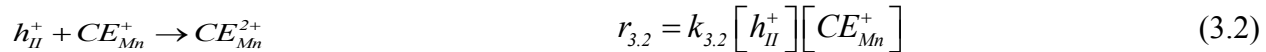
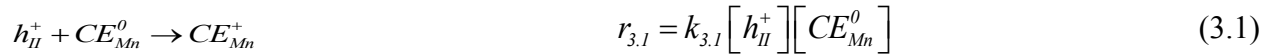
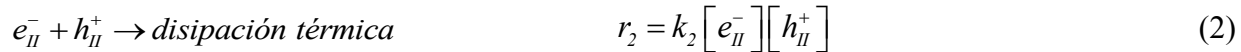
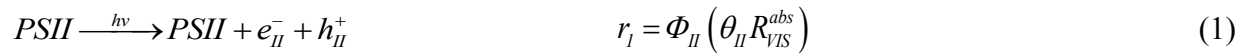
(e) Concentración de clorofila: el contenido total de clorofila fue determinado utilizando la técnica reportada por Ritchie (Ritchie, R. J., 2008). Para ello, las células de una alícuota del medio de cultivo fueron centrifugadas, resuspendidas en agua destilada y centrifugadas nuevamente para eliminar los restos de medio de cultivo. La clorofila fue extraída con alcohol etílico a temperatura ambiente por 24 hs. El contenido de clorofila fue calculado a partir de la absorbancia a 632, 649 y 665nm, utilizando los coeficientes de absorción reportados en el mismo trabajo.

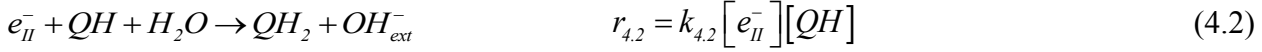
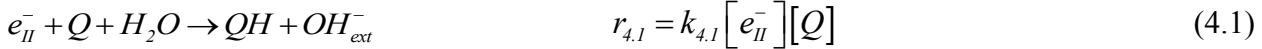
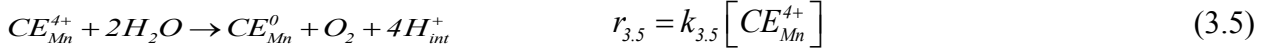
(f) Concentración de urea: La determinación de urea se realizó mediante un kit enzimático comercial Urea Color2R, de la marca Wiener Lab.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN: FUNDAMENTACIÓN DE LA PROPOSICIÓN Y CRÍTICA DE LOS RESULTADOS ALCANZADOS.

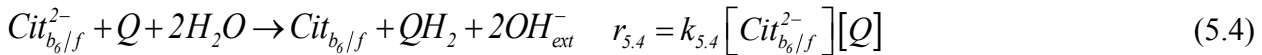
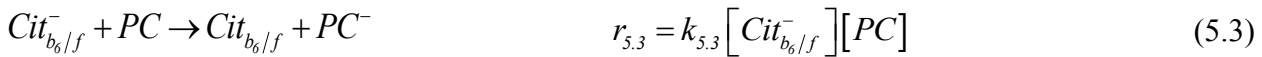
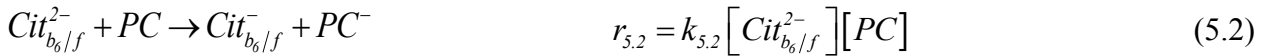
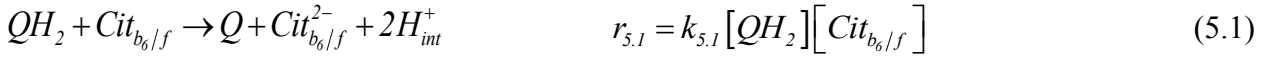
Modelo cinético de crecimiento celular. En este trabajo, para modelar el crecimiento celular de microalgas en cultivos autótrofos y en condiciones de baja iluminación, nos basamos en el esquema de reacciones de la etapa dependiente de la luz de la fotosíntesis (Heldt H.W., 2004 a y b):

Fotosistema II

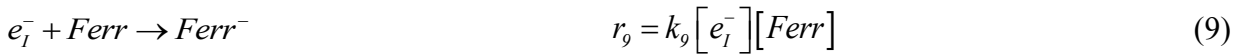
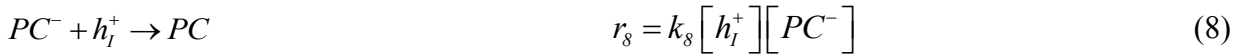
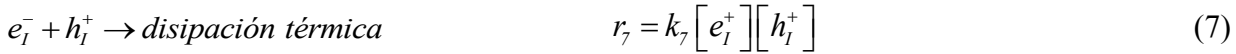
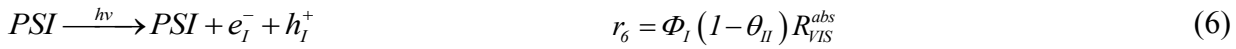




Citocromo y Ciclo-Q



Fotosistema I



La etapa dependiente de la luz comienza con la absorción de energía radiante en el fotosistema II (PSII). En el PSII, un complejo de antenas capta la energía radiante gracias a la presencia de pigmentos de clorofila. La velocidad con que ocurre este fenómeno es igual a la velocidad de absorción de fotones en el PSII, multiplicada por un rendimiento Φ_{II} . Debido a que la absorción de fotones en las células se produce casi exclusivamente en PSII y PSI, la velocidad de absorción de fotones en el PSII puede escribirse como una fracción θ_{II} de la velocidad celular R_{VTS}^{abs} de absorción de fotones.

Producida la absorción de energía radiante, ésta es direccionada hacia el centro de reacción. En el centro de reacción un par específico de clorofilas produce la separación de cargas, con la consecuente generación de un hueco h_{II}^+ y un electrón e_{II}^- (Ecuación 1). Esta separación de cargas puede sufrir un proceso de recombinación y disipación térmica (Ecuación 2). Para evitar esto, el hueco positivo h_{II}^+ es

combinado con un electrón que es provisto por un complejo enzimático CE_{Mn}^{4+} asociado al *PSII*, el cual posee en su estructura un clúster de átomos de manganeso. Este complejo provee sucesivamente al *PSII* con cuatro electrones (Ecuaciones 3.1 a 3.4), catalizando posteriormente la oxidación de dos moléculas de agua para producir oxígeno y protones (Ecuación 3.5).

Por su parte, el electrón e_{II}^- es utilizado para reducir una quinona Q , transitoriamente unida al *PSII*. Esta quinona es capaz de aceptar dos electrones produciendo hidroquinona QH_2 (Ecuaciones 4.1 y 4.2).

Posteriormente, la hidroquinona es oxidada en el Citocromo *b₆f* (Ecuación 5.1). En el Citocromo *b₆f* se produce secuencialmente la reducción de dos moléculas de plastocianina *PC* (Ecuaciones 5.2 y 5.3). Además, en el *Citocromo b₆f*, se produce una reacción adicional conocida con el nombre de *ciclo-Q*. Esta reacción cataliza la transferencia de protones hacia el lumen del tilacoide (Ecuación 5.4). Cuando la reacción evoluciona por esta vía, la quinona Q producida a partir de la reacción 5.1 es nuevamente reducida recuperándose la hidroquinona QH_2 ; el balance neto es el transporte de dos protones.

Luego, en el *PSI* se produce la absorción de energía de otro fotón. El proceso de absorción y separación de cargas se produce en forma análoga a lo ocurrido en el *PSII*, sólo que en este caso, una molécula de plastocianina PC^- es utilizada como dadora de electrones para neutralizar el hueco h_i^+ ; y una ferredoxina *Ferr* es la aceptora final del electrón e_i^- .

A partir de este punto, se produce una serie de las reacciones enzimáticas que no involucran la utilización de energía radiante; pero tiene como sustrato los productos del mecanismo de absorción de energía radiante en los *PSII* y *PSI*. Uno de ellos utiliza dos moléculas de ferredoxina para producir *NADPH* a partir de $NADP^+$ (Ecuación 10); y el otro implica la utilización de la energía potencial acumulada como un gradiente de protones para catalizar la formación de *ATP*, a partir de *ADP* y P_i (Ecuación 11).



Tanto *ATP* como *NADPH* son sustratos de numerosas reacciones enzimáticas, entre las cuales está la fijación de CO_2 por parte de la enzima *RubisCO*, durante la fase de la fotosíntesis independiente de la luz (Heldt, H. W., 2004b).

Continuando con la hipótesis de que las condiciones de operación corresponden a un ambiente de baja iluminación y, por ello, la absorción de energía radiante es la etapa limitante del crecimiento celular, haremos las siguientes hipótesis:

- Todos los compuestos involucrados en las reacciones de transporte de electrones se encuentran en estado estacionario y no hay acumulación de los mismos dentro de las células, por lo que la velocidades celulares con que se forman y consumen son iguales.
- La velocidad de crecimiento celular es proporcional a la velocidad celulares de formación de $Ferr^-$ (Ecuación 9) y la captación de energía es la etapa limitante del crecimiento.
- Las concentraciones intracelulares totales de los compuestos, enzimas y estructuras celulares involucradas en el transporte de electrones son constantes durante el crecimiento.
- La relación entre las concentraciones de las versiones oxidadas y reducidas de cada compuesto se mantiene constante.

Considerando el primer punto:

$$r_{h_i^+} = 0 = r_6 - r_7 - r_8 \quad (12)$$

$$r_{h_i^+} = 0 = \Phi_I (1 - \theta_{II}) R_{VIS}^{abs} - k_7 [e_i^-] [h_i^+] - k_8 [h_i^+] [PC^-] \quad (13)$$

$$r_{e_i^-} = 0 = r_6 - r_7 - r_9 \quad (14)$$

$$r_{e_i^-} = 0 = \Phi_I (1 - \theta_{II}) R_{VIS}^{abs} - k_7 [e_i^-] [h_i^+] - k_9 [e_i^-] [Ferr] \quad (15)$$

A partir de las Ecuaciones 13 y 14 tenemos que:

$$[e_i^-] = \frac{k_9 [Ferr]}{2k_7} \left(\sqrt{1 + \frac{4\Phi_I (1 - \theta_{II}) R_{VIS}^{abs} k_7}{k_8 k_9 [PC^-] [Ferr]}} - 1 \right) \quad (15)$$

$$[h_i^+] = \frac{k_8 [PC^-]}{2k_7} \left(\sqrt{1 + \frac{4\Phi_I (1 - \theta_{II}) R_{VIS}^{abs} k_7}{k_8 k_9 [PC^-] [Ferr]}} - 1 \right) \quad (17)$$

Considerando el segundo punto podemos hacer la siguiente propuesta:

$$r_x = K_I r_9 = K_I k_9 [e_i^-] [Ferr] = K_I' [e_i^-] [Ferr] \quad (18)$$

donde K'_1 es una constante de proporcionalidad. Combinando las Ecuaciones 15 y 18:

$$r_x = K'_1 \frac{k_9 [Ferr]^2}{2k_7} \left(\sqrt{I + \frac{4\Phi_I (1 - \theta_{II}) R_{VIS}^{abs} k_7}{k_8 k_9 [PC^-] [Ferr]}} - I \right) \quad (19)$$

Por último, a partir de la tercera, cuarta y quinta hipótesis, llegamos a la siguiente expresión para la velocidad de crecimiento celular en condiciones en que la luz es el factor limitante:

$$r_x = K_3 \left(\sqrt{I + K_2 \frac{r_{VIS}^{abs}}{x}} - I \right) \quad (20)$$

en donde:

$$K_3 = K'_1 \frac{k_9 [Ferr]^2}{2k_7} \quad (21)$$

$$K_2 = \frac{4\Phi_I (1 - \theta_{II}) k_7}{k_8 k_9 [PC^-] [Ferr]} \quad (22)$$

En la Ecuación 20, la velocidad volumétrica celular R_{VIS}^{abs} de absorción de fotones fue relacionada con la velocidad volumétrica local r_{VIS}^{abs} de absorción de fotones en el volumen de reactor a través de:

$$r_{VIS}^{abs} \left[\frac{\text{nro de fotones}}{\text{tiempo} \times \text{Vol medio}} \right] = R_{VIS}^{abs} \left[\frac{\text{nro de fotones}}{\text{tiempo} \times \text{Vol biomasa}} \right] \frac{x \left[\frac{\text{gr biomasa}}{\text{Vol medio}} \right]}{\rho_{cel} \left[\frac{\text{gr biomasa}}{\text{Vol biomasa}} \right]} \quad (23)$$

Modelado y análisis del campo de Energía Radiante. La velocidad volumétrica local r_{λ}^{abs} de absorción de fotones representa la tasa, por unidad de volumen de cultivo, con que los fotones son localmente absorbidos por las algas en suspensión. La absorción de luz es dependiente de la longitud de onda λ de la radiación, por lo cual, para un instante t , en cualquier posición \underline{r} en el FBR, existe una distribución espectral $r_{\lambda}^{abs}(\underline{r}, t)$ de velocidades locales de absorción de fotones. Esta distribución puede relacionarse con la distribución espectral de densidades de fotones $n_{\lambda}(\underline{r}, t)$ a través de la velocidad de la luz, c , y del coeficiente espectral de absorción de energía radiante, $\alpha_{\lambda}(t)$, de acuerdo a:

$$r_{\lambda}^{abs}(\underline{r}, t) = c \alpha_{\lambda}(t) n_{\lambda}(\underline{r}, t) \quad (24)$$

Luego, la velocidad volumétrica local $r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)$ de absorción de fotones, considerando todos los fotones en el rango 400 a 700nm es :

$$r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t) = \int_{400}^{700} r_{\lambda}^{abs}(\underline{r}, t) d\lambda = c \int_{400}^{700} \alpha_{\lambda}(t) n_{\lambda}(\underline{r}, t) d\lambda \quad (25)$$

En la Ecuación (25) $\alpha_{\lambda}(t)$ es el coeficiente espectral de absorción de energía radiante, dependiente del tiempo en forma indirecta, a través de la variación en el tiempo de la concentración de biomasa y del contenido de clorofilas; y, $n_{\lambda}(\underline{r}, t)$ es la distribución espectral de densidades de fotones en la posición \underline{r} en el reactor, la cual puede relacionarse con la distribución espectral de densidades de energía radiante, $e_{\lambda}(\underline{r}, t)$, a través de

$$e_{\lambda}(\underline{r}, t) = \frac{hc}{\lambda} n_{\lambda}(\underline{r}, t) \quad (26)$$

En donde h es la constante de Planck y λ es la longitud de onda del fotón. Por otro lado, la densidad local $n_{VIS}(\underline{r}, t)$ de fotones-VIS, considerando todos los fotones en el rango 400 a 700nm es

$$n_{VIS}(\underline{r}, t) = \int_{400}^{700} n_{\lambda}(\underline{r}, t) d\lambda \quad (27)$$

En la Ecuación (25) $\alpha_{\lambda}(t)$ puede determinarse experimentalmente; y $n_{\lambda}(\underline{r}, t)$ puede ser obtenida por simulación numérica, a través de la metodología basada en el método de Monte Carlo propuesta por Heinrich J.M. (Heinrich J.M. *et al*, 2013). Debido a los fenómenos de transferencia de energía radiante presentes en el reactor, tanto la velocidad volumétrica local $r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)$ de absorción de fotones-VIS, como la densidad volumétrica local $n_{VIS}(\underline{r}, t)$ de fotones-VIS dependen de la posición \underline{r} en el reactor y, por ello, es posible distinguir dentro del reactor zonas más y menos iluminadas.

La estratificación de la luz en el reactor es de importancia a la hora de diseñar, escalar u optimizar un fotobioreactor. Para cuantificar el grado de estratificación de la luz en el fotobioreactor es posible caracterizarlo a través de una función $g'(r_{VIS}^{abs}, t)$ de distribución de volúmenes de reactor en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones (Heinrich, J.M. *et al*, 2013; Niizawa, I. *et al*, 2014).

Esta distribución depende del tiempo, pero en forma indirecta, a través de la variación en el tiempo de la concentración de biomasa y/o del contenido de pigmentos. A partir de $g'(r_{VIS}^{abs}, t)$ es posible calcular la fracción $\delta_{(r_{VIS,1}^{abs}-r_{VIS,2}^{abs})}$ del reactor que opera con velocidades de absorción incluidas en el rango

$r_{VIS,1}^{abs} < r_{VIS}^{abs} < r_{VIS,2}^{abs}$ a partir de la Ecuación (28)

$$\delta_{(r_{VIS,1}^{abs}-r_{VIS,2}^{abs})} = \int_{r_{VIS,2}^{abs}}^{r_{VIS,1}^{abs}} g'(r_{VIS}^{abs}, t) dr_{VIS}^{abs} \quad (28)$$

La función $g'(r_{VIS}^{abs}, t)$ cumple con la siguiente condición de normalización

$$\int_0^{\infty} g'(r_{VIS}^{abs}, t) dr_{VIS}^{abs} = 1 \quad (29)$$

En la Figura 4 es posible ver de qué manera se produce el fenómeno de estratificación en el reactor a medida que la biomasa en suspensión aumenta. Cuando la concentración de biomasa es baja, el reactor opera con bajas velocidades de absorción debido a que el coeficiente de absorción en a suspensión es baja y a pesar de que la concentración de fotones es alta. A medida que la biomasa en suspensión aumenta, las zonas más próximas a la lámpara operan con velocidad es de absorción más altas, sin embargo, esta elevada absorción de fotones reduce la concentración de fotones en las zonas más profundas, que operan con bajas velocidades de absorción. Estos resultados fueron previamente publicados (Heinrich, J.M. *et al*, 2013)

Crecimiento en el FBR y ajuste de parámetros cinéticos. En las Figura 5(a), (b) y (c) es posible ver la evolución de la biomasa en las experiencias llevadas adelante. La diferencia entre estas tres experiencias es la concentración de dióxido de carbono utilizada en la corriente gaseosa con que se alimenta el cultivo: (a) = 0.034% (atmosférico), (b) = 0.34% y (c) = 3.4%. El aumento en la concentración de dióxido de carbono en la fase gaseosa aumenta la concentración de CO₂ en la fase acuosa, lo cual desplaza los equilibrios ácido base del grupo carbonato disminuyendo el pH del medio de cultivo. Si se adiciona una base para contrarrestar este efecto se modifican la fuerza iónica y la presión osmótica del cultivo. Considerando que el crecimiento de las microalgas es dependiente de estos parámetros, la composición inicial del medio BBM fue modificada (Tabla I) de manera que el pH, la fuerza iónica y la

presión osmótica iniciales del medio de cultivo sea la misma para todos los casos ensayados. Una modificación adicional realizada sobre el medio BBM fue el reemplazo de NaNO_3 por urea como fuente de nitrógeno. La razón de esto es evitar las modificaciones sobre el pH del medio que produce el metabolismo del NO_3^- , logrando así mantenerlo en el rango de 7,0 a 7,2 durante todo el cultivo en las tres experiencias (datos no mostrados).

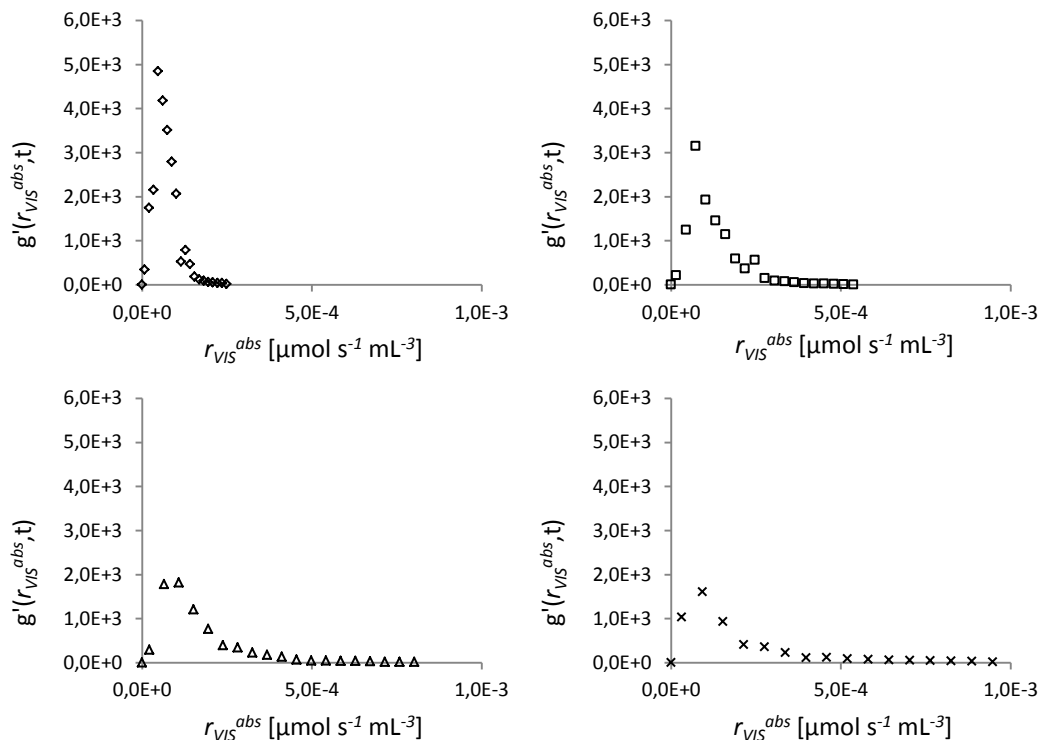


Figura 4: función $g'(r_{VIS}^{abs}, t)$ de distribución de volúmenes de reactor en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones para diferentes concentraciones celulares de biomasa (a) día 6: $57,3 \text{ mg L}^{-1}$; (b) día 9: $135,0 \text{ mg L}^{-1}$; (c) día 12: $219,2 \text{ mg L}^{-1}$; (d) día 15: $311,7 \text{ mg L}^{-1}$. Correspondiente a un cultivo realizado bajo una concentración de CO_2 de 0.34%

Durante todos cultivos la concentración celular de clorofila fue medida experimentalmente. Los resultados experimentales mostraron que el contenido intracelular de clorofilas totales permaneció invariables, durante el cultivo (15 días) con una concentración de 2.4 mg Chl cada 100 mg de biomasa (datos no mostrados). La concentración de urea en el medio de cultivo fue cuantificada durante el crecimiento de las microalgas. Se observó que la concentración de la misma durante los 15 días de cultivo sigue un patrón similar en todos los casos y que, en el intervalo de crecimiento considerado, la

concentración de urea no es restrictiva del crecimiento celular (datos no mostrados). Como puede verse, en los tres casos el crecimiento celular progresa en forma similar a pesar que existe entre ellos una gran diferencia respecto a la concentración de CO₂ en la corriente gaseosa. A partir de estos resultados es posible asumir que bajo estas condiciones de iluminación, el crecimiento es independiente de la concentración de CO₂ y la luz es el sustrato limitante del crecimiento.

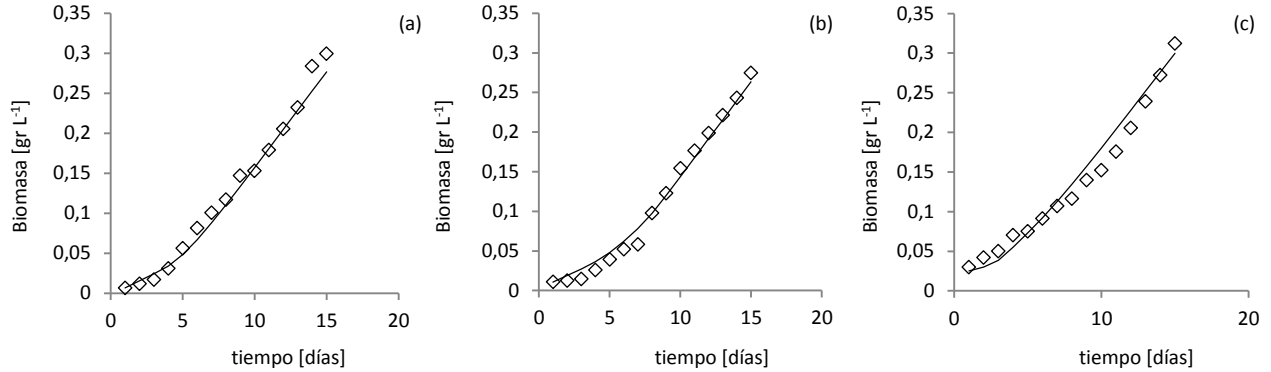


Figura 5: valores experimentales (\diamond) y teóricos (—) de la concentración de biomasa [$gr L^{-1}$] en función de tiempo [$días$] para las tres condiciones de CO₂ ensayadas . (a) 0,034%. (b) 0,34%. (c) 3,4%.

Para considerar la presencia de zonas con diferentes grado de iluminación, en este trabajo se calculó la velocidad promedio \bar{r}_x de crecimiento celular según la Ecuación (30), evitando el uso de una expresión cinética en función de la velocidad volumétrica promedio de absorción de fotones \bar{r}_{VIS}^{abs} , la cual no consideraría la presencia de zonas más y menos iluminadas en el reactor.

$$\bar{r}_x = \int_0^{\infty} K_3 \left(\sqrt{I + K_2 \frac{r_{VIS}^{abs}}{x}} - I \right) g'(r_{VIS}^{abs}, t) dr_{VIS}^{abs} \quad (30)$$

El ajuste de parámetros se realizó mediante la herramienta Algoritmo Genético, realizando un ajuste individual para cada cultivo en las condiciones de %CO₂ en la corriente gaseosa, obteniéndose los siguientes resultados: $K_3 = 4.982 \times 10^4 [gr L^{-1} día^{-1}]$ y $K_2 = 2.541 \times 10^{-6} [gr s \mu mol^{-1}]$

En las Figura 5(a), 3(b) y 3(c) la línea continua representa el valor de la concentración de biomasa teórica calculada mediante el modelo y los parámetros cinéticos K_3 y K_2 , considerando la concentración inicial de la biomasa en cada cultivo. El modelo planteado y los parámetros obtenidos reproducen aceptablemente los datos hallados experimentalmente.

4.- CONCLUSIONES.

En este trabajo se obtuvo una expresión cinética y los parámetros incluidas en la misma, de manera de lograr predecir la velocidad de crecimiento de las microalgas en función de la disponibilidad de energía radiante en el cultivo. Una herramienta como tal es indispensable para llevar adelante en forma sistemática el diseño, escalado y optimización de los fotobioreactores destinados a la propagación de microalgas en forma autotrófica. Para lograr dicho objetivo se realizó el tratamiento de dos aspectos: por un lado se derivó una expresión matemática que vincule la velocidad de crecimiento celular con la disponibilidad de energía radiante en el cultivo a partir del esquema de reacciones de la etapa dependiente de la luz de la fotosíntesis, obteniéndose una expresión que depende de la velocidad volumétrica local, $r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)$, de absorción de fotones con longitud de onda $400 < \lambda < 700 \text{ nm}$ y de la concentración de microalgas en suspensión. En segundo lugar, para conocer el valor de $r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)$ se aplicó una metodología de simulación del CER que permite no solo cuantificar la cantidad de energía radiante en cada posición del cultivo, sino que permite además conocer la composición espectral de la misma y calcular la tasa con la cual es localmente absorbida.

CAPÍTULO 3

RESUMEN

En este trabajo se realizó una estimación de la capacidad de producción de microalgas y lípidos en un sistema de piletones pertenecientes a la ex-planta de tratamiento de efluentes del Parque Tecnológico Litoral Centro (Santa fe, Argentina). Para ello se comenzó por la caracterización de la fuente de iluminación natural, el sol, considerando su posición y su intensidad espectral de emisión en función del día y la hora. Posteriormente, se diseñó un sistema fotobioreactores para el cultivo de microalgas que reúne las ventajas de los reactores tipo columna, *airlift* y tubular. Luego, aplicándose la metodología de simulación basada en el método Monte Carlo para la resolución del campo de energía radiante en el interior del fotobioreactor y a partir de una expresión cinética obtenida previamente, se logró estimar la producción de este sistema de cultivo, radicado en las instalaciones del Parque Tecnológico Litoral Centro.

1.- INTRODUCCIÓN: PLANTEO DE LA PROPOSICIÓN Y EXPOSICIÓN DE LO HECHOS RELACIONADOS CON LA MISMA.

Las microalgas son organismos microscópicos capaces de utilizar la luz solar como fuente de energía. Con esta denominación se incluyen diversos grupos taxonómicos, incluso microorganismos eucariotas y procariotas (Olaizola, M., 2003). La gran variedad de especies de microalgas hace que puedan ser usadas en un enorme número de procesos biotecnológicos, incluyendo la producción de metabolitos de interés farmacológico, cosmético, energético y nutricional, el tratamiento de efluentes y la remediación ambiental (Wijffels, R.H. *et al*, 2013). Dependiendo del producto o proceso del cual se trate y de los volúmenes de cultivo implicados, las microalgas pueden ser producidas en reactores cerrados o abiertos. Los primeros permiten un control riguroso de las variables de cultivo y eliminan casi completamente los riesgos de contaminación; los abiertos, en cambio, están expuestos a la intemperie y su uso se restringe a procesos que involucran grandes extensiones y que pueden ser llevados a cabo con mínimas medidas de control o utilizando cepas de rápido crecimiento (Tredici, M.R., 2004).

La producción de aceites de microalgas como materia prima para la fabricación de biocombustibles es un proceso masivo que implica grandes extensiones de suelo y un producto final de relativamente bajo valor. Por este motivo se recomienda comúnmente realizar su producción en sistemas de bajo costo de operación y con mínima inversión inicial. Asimismo, considerando que su finalidad es la producción de combustibles, es importante considerar que el proceso deberá tener un balance energético positivo, por lo cual es recomendable la utilización de luz solar, evitando el uso de fuentes artificiales de radiación, y la adopción de tecnologías de cosecha y extracción de aceites que posean mínimo consumo energético (Mata, T. M. *et al*, 2010; Halim, R. *et al*, 2012; Olivieri, G. *et al*, 2013; Chisti, Y., 2007; Balasubramanian, L. *et al*, 2011).

Desde esta óptica, la opción de preferencia para el cultivo son los sistemas "open ponds" o "race-ways". Estos sistemas abiertos están expuestos a la radiación solar natural, utilizan estanques poco profundos (normalmente entre 30 y 50cm de profundidad), están provistos con ruedas de paletas u otros dispositivos para hacer circular el agua y mantener las algas suspensión, y abarcan superficie que varían entre algunas decenas hasta cientos de metros cuadrados. La principal ventaja de estos sistemas son sus bajos costos de construcción y operación; sin embargo, el control de estos sistemas resulta dificultoso debido a que son susceptibles a contaminaciones con hongos, bacterias, protozoos u otras especies de microalgas; además de estar expuestos a condiciones ambientales.

En las instalaciones del Parque Tecnológico Litoral Centro (PTLC) existe un conjunto de piletones, estanques abiertos y decantadores pertenecientes a una planta de tratamientos de efluentes que actualmente se encuentra fuera de uso (Figura 1). Estas instalaciones se hallan en buen estado general y gran parte del equipamiento (bombas, sopladores, agitadores, mezcladores, etc.) está en condiciones de funcionar. En este capítulo, se proyecta escalar el cultivo de microalgas en el sistema compuesto por seis piletones, dispuestos en forma contigua, que pueden ser operados individualmente o en forma interconectada.

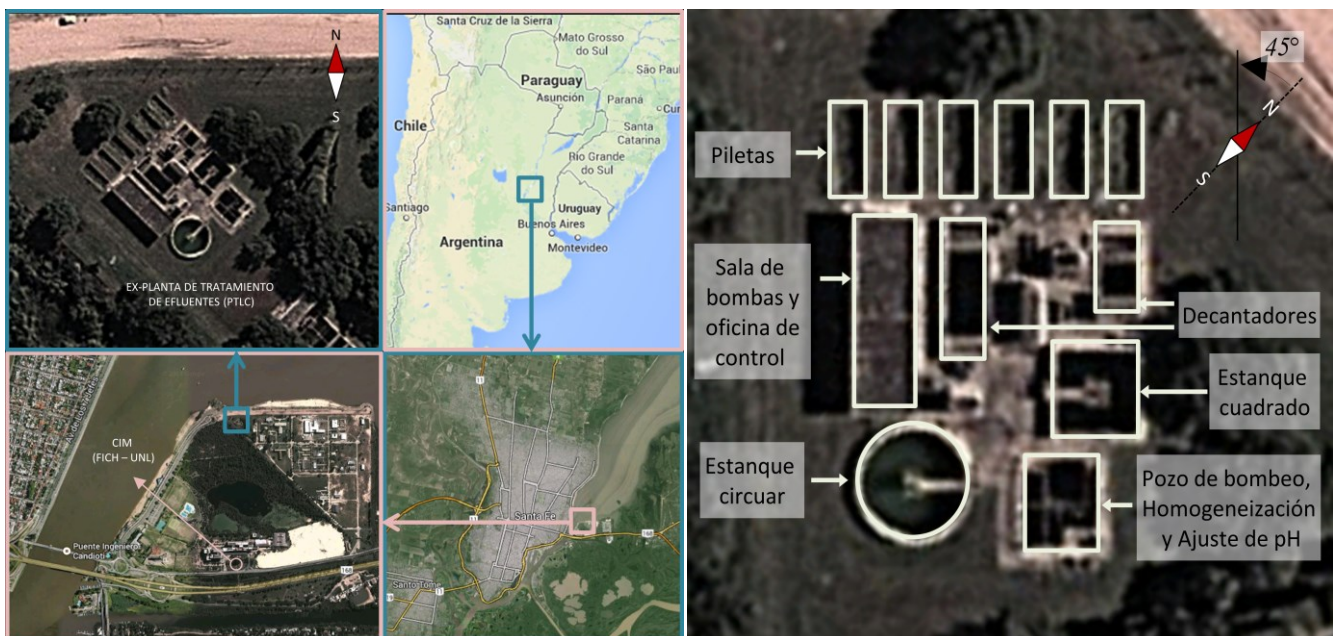


Figura 1: Vista aérea de la ex-panta de tratamiento de efluentes del Parque Tecnológico Litoral Centro. Santa fe, Argentina.

La luz es la fuente de energía durante el cultivo foto-autotrófico de microalgas y, en muchos casos, el sustrato limitante del crecimiento celular. Asimismo, debe tenerse en cuenta que una iluminación excesiva podría ser perjudicial para el cultivo y que la distribución espectral de la radiación que alcanza a las celular podría influir en el direccionamiento del metabolismo celular (Niizawa. I. *et al*, 2014); por ello, una correcta iluminación del cultivo es clave para lograr una máxima producción de los FBR. Por otro lado, un adecuado tratamiento matemático de la condición de iluminación del cultivo es necesario para lograr una correcta interpretación de los resultados obtenidos a escala laboratorio y lograr, posteriormente, un escalado sistemático del proceso de cultivo desde el laboratorio hasta escalas de cultivo mayores, como planta piloto o producción masivas. Adicionalmente, para predecir la velocidad de crecimiento de las microalgas es necesario contar con una expresión cinética que vincule la disponibilidad de energía radiante con la tase de crecimiento celular (Heinrich J.M. *et al* 2013 y 2015).

Para considerar estos aspectos en la predicción de la capacidad de producción del sistema, realizando sistemáticamente el escalado del cultivo, se utilizará en el presente trabajo una metodología basa en la simulación del CER a través del método de Monte Carlo (Heinrich J.M. *et al*, 2012(a) y 2012(b)) y el análisis del CER a partir del cálculo de la función $g(r_{VIS}^{abs}, t)$ de distribución del volúmenes de reactor en términos de velocidades volumétricas locales de absorción de energía radiante r_{VIS}^{abs} (Heinrich, J.M. *et al*, 2013). El aspecto más atractivo de esta metodología es que permite conocer, para cada instante t , cuál es el régimen de iluminación al que está sometida la suspensión de algas y analizar el grado de estratificación de la luz en la suspensión, independientemente de sus geometrías, de la concentración de biomasa y de las características de emisión de la fuente de iluminación; constituyéndose así, en una herramienta de análisis, diseño, optimización y comparación de FBR. En cuanto a la expresión cinética, se utilizará la expresión cinética obtenida en el Capítulo anterior para la especie *Chlorella* sp. y los parámetros que fueron ajustados en el mismo capítulo.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Cultivo: la estimación de la productividad de los reactores se realizará para la cepa *Chlorella* sp., gentilmente cedida por la Dr. A. M. Gagneten, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral. Esta cepa se escogió debido a que presenta altas velocidades de crecimiento y son capaces de competir con otras cepas que pudieran contaminar el cultivo, su contenido lipídico es

relativamente alto (15% aprox.) y, además, fue aislada localmente evitando los riesgos que podrían presentarse por la introducción de cepas no nativas. En cuanto a la expresión cinética y sus parámetros, se utilizará la reportada por (Heinrich, J.M. *et al*, 2015).

Medición de la radiación solar: Para la cuantificación de la cantidad de radiación que recibe una superficie expuesta a la luz solar en las cercanías del predio en el cual se realiza el escalado del cultivo se recurrió a los datos registrados por el Centro de Informaciones Meteorológicas "Lic. Enrique Rodríguez" de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas de la Universidad Nacional del Litoral (CIM-FICH-UNL), situado a una distancia de 700m aproximadamente del sistema de piletones (Figura 1). Este centro dispone de un Adquisidor de Datos Meteorológicos Pegasus EP2000, equipado con un sensor de radiación modelo TS-301.

Ubicación del sistema de producción: se propone realizar el escalado del cultivo de microalgas en un conjunto de seis piletones rectangulares a cielo abierto que forman parte de instalaciones de la ex-planta de tratamiento de efluentes del Parque Tecnológico Litoral Centro (PTLC) (Latitud 31.634636 S, Longitud 60.672562 O) (Figura 1).

Simulación del CER: Para la simulación del campo de energía radiante en los piletones y predecir el crecimiento en los mismos se recurrió a la metodología propuesta por Heinrich *et al*. (Heinrich, J.M. *et al*, 2012(a), 2012(b) y 2013) basada en el método de Monte Carlo. La simulación computacional se realizó utilizando los coeficientes espectrales de absorción y dispersión de energía radiante y la función de fase reportados por el mismo autor (Heinrich, J.M. *et al*, 2012(a)).

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN: FUNDAMENTACIÓN DE LA PROPOSICIÓN Y CRÍTICA DE LOS RESULTADOS ALCANZADOS.

(a) Medición de la Radiación solar incidente $q_{vis}^G(\underline{r}, t)$.

Los datos provistos por el CIM consisten en una colección de más de 250.000 datos (tomados cada 15 minutos, desde octubre de 2008 y hasta diciembre de 2013) correspondientes a la cantidad total de energía radiante solar $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ por unidad de tiempo y unidad de área que incide en un instante t , sobre la superficie del detector ubicado en una posición \underline{r} , incluyendo la energía radiante con $300 < \lambda < 3000nm$ que llega en todas las direcciones contenidas en la semiesfera superior al plano del

detector. Esta cantidad de radiación $q_{Tot}^G(r,t)$ contempla tanto la radiación directa $q_{Tot}^D(r,t)$ proveniente en la dirección del sol, como la radiación difusa $q_{Tot}^d(r,t)$.

Al comparar las diferentes mediciones de radiación registradas en intervalos de 15 minutos durante una misma hora de un mismo día es posible ver una gran dispersión entre las medidas realizadas, esta dispersión es aún mayor si se comparan los registros pertenecientes a una misma hora de un mismo día pero de años diferentes. Para poder considerar esa dispersión en las mediciones registradas, los datos fueron tratados estadísticamente de la siguiente forma:

- Se compuso un año típico de 365 días incluyendo las medidas de los 6 años. En el intervalo $1 \leq d \leq 365$, $d = 1$ corresponde al primer día de enero.
- El día fue dividido en 24 horas, desde las 00hs hasta las 23hs. A cada hora h le corresponden todas las mediciones realizadas 30 minutos antes o 30 minutos de cada hora exacta.
- En cada hora h de un día d , fueron consideradas las medias realizadas a las misma hora h en los 3 días previos y los 3 días posteriores a ese día d .
- En caso de años bisiestos, el 29 de febrero es considerado como una repetición del 28 de febrero.

En la Figura 2 se muestran en forma de gráfico de caja la distribución de los datos registrados por el CIM durante los seis años de mediciones, durante las 24 horas, para los días 21 marzo, 21 de junio, 22 de septiembre y 21 de diciembre. Como puede verse los valores máximos de radiación corresponden a los días de verano, cuando los rayos del sol inciden perpendicularmente al trópico de Capricornio, disminuyendo a media que la fecha se aproxima al 21 de junio, cuando los rayos del sol inciden perpendicularmente al trópico de Cáncer. A partir de esa fecha, los registros comienzan a aumentar paulatinamente hasta llegar al 21 de diciembre. Asimismo, es posible ver la evolución de los valores de radiación durante el día, alcanzando el valor máximo entre las 12 y las 13hs.

En la Figura 2, para una hora h de un día d cualquiera del año, la dispersión observada en los datos registrados se debe a variaciones en las condiciones climáticas, principalmente a la presencia de nubes. Los registros de alta radiación corresponden a condiciones de baja o nula nubosidad, mientras que los registros menores pertenecen a días nublados o de lluvia. La presencia de nubes no solo disminuye la cantidad neta de energía radiante que alcanza la superficie del detector, sino que además reducen la relación entre la cantidad de energía radiante $q_{Tot}^D(r,t)$ que incide directamente desde el sol y la

cantidad $q_{Tot}^d(\underline{r}, t)$ que llega en forma difusa a la superficie del detector. En días sin nubosidad casi la totalidad de la radiación que llega a una superficie corresponde a radiación directa $q_{Tot}^D(\underline{r}, t)$; a medida que la nubosidad aumenta el valor de $q_{Tot}^D(\underline{r}, t)$ se reduce significativamente, llegando a ser despreciable frente al valor de $q_{Tot}^d(\underline{r}, t)$ cuando la nubosidad es muy alta.

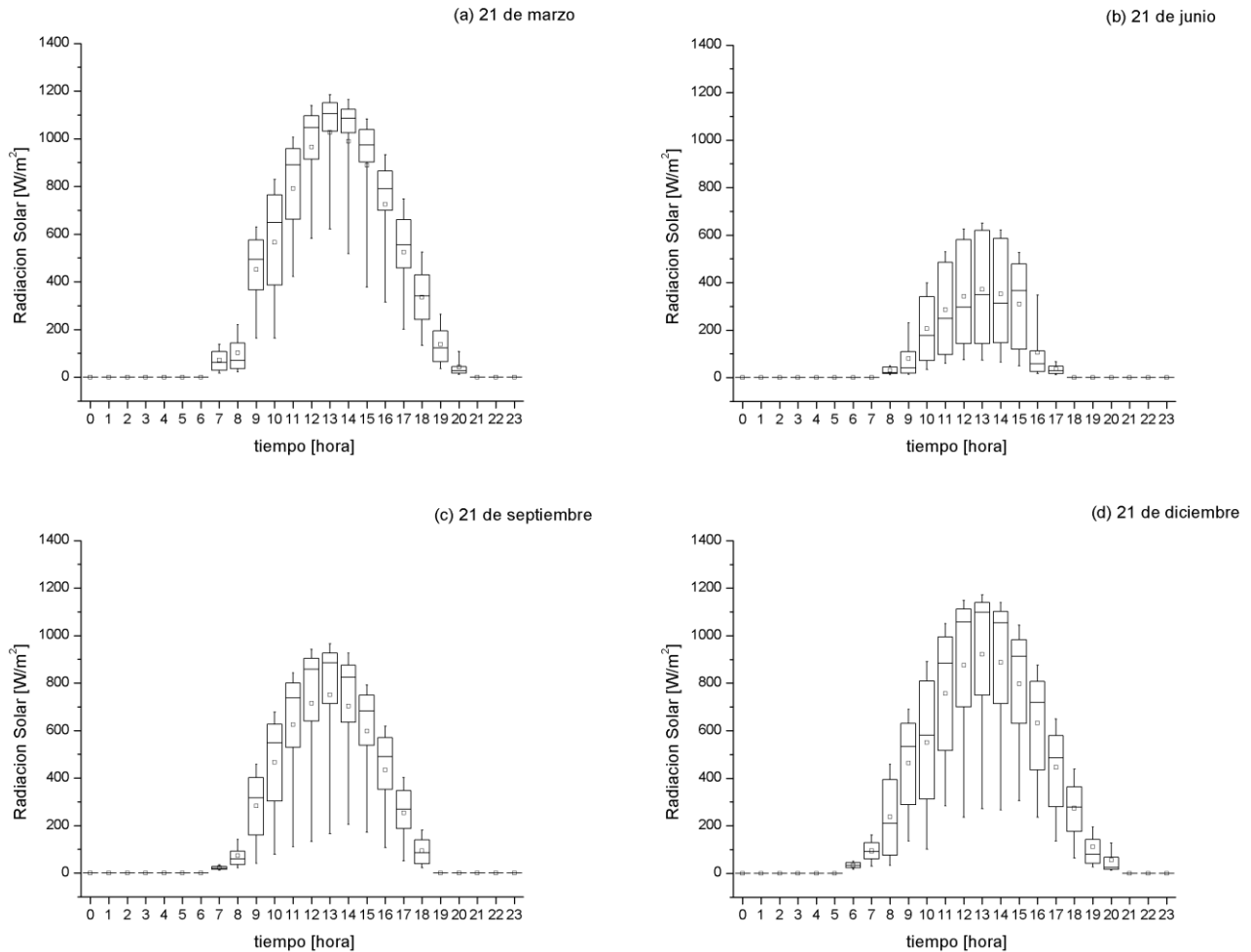


Figura 2: Distribución de los datos registrados por el CIM entre octubre de 2008 y diciembre de 2013, durante las 24 horas, para los días (a) 21 marzo, (b) 21 de junio, (c) 22 de septiembre y (d) 21 de diciembre. Los valores corresponden a la cantidad total de energía radiante solar $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ por unidad de tiempo y unidad de área que incide en un instante t , sobre la superficie del detector ubicado en una posición \underline{r} , incluyendo la energía radiante con $300 < \lambda < 3000nm$ que llega en todas las direcciones contenidas en la semiesfera superior al plano del detector. En el gráfico la caja representa los cuartiles Q_1 , Q_2 y Q_3 . Las líneas continuas se extienden desde el percentil P_{10} al percentil P_{90} . El promedio se representa con el símbolo \square .

Debido a la forma en que se producen la atenuación en el valor de $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ y su redistribución entre $q_{Tot}^D(\underline{r}, t)$ y $q_{Tot}^d(\underline{r}, t)$, la iluminación de un FBR a una hora h en un día d cualquiera debería ser representada a través del conjunto de condiciones de radiación, caracterizado mediante una función de distribución, calculada a partir de los datos de radiación medidos. Dicho de otra manera, para una hora h en un día d existe un conjunto de condiciones de radiaciones q_{Tot}^G posibles, en donde la probabilidad $P(q_{Tot}^G)$ de ocurrencia de cualquiera de ellas puede ser determinada a través de una función de distribución $E(q_{Tot}^G)$, obtenida a partir de los datos medidos.

De este modo, para una hora h de un día d la probabilidad $P(q_{Tot,(1)}^G, q_{Tot,(2)}^G)$ de que la Radiación incidente se encuentre en el rango $q_{Tot,(1)}^G < q_{Tot}^G < q_{Tot,(2)}^G$ es

$$P(q_{Tot,(1)}^G, q_{Tot,(2)}^G) = \int_{q_{Tot,(1)}^G}^{q_{Tot,(2)}^G} E(q_{Tot}^G) dq_{Tot}^G \quad (1)$$

En la Figura 3 se muestra la función de distribución $E(q_{Tot}^G)$ para el 21 de diciembre a las 13:00hs. Como puede verse en la figura existe una alta probabilidad (calculada a partir de la Ecuación (1)) de que en ese día el valor de radiación $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ esté en el rango $1000 < q_{Tot}^G < 1200 [Wm^{-2}]$. A su vez, según se expuso con anterioridad, debido a la presencia de nubes, a ese valor de radiación $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ le corresponde una relación (o tal vez un conjunto de relaciones posibles) entre la energía $q_{Tot}^D(\underline{r}, t)$ que llega al detector en forma directa y la energía $q_{Tot}^d(\underline{r}, t)$ que incide en forma difusa.

Los datos provistos por el CIM no contemplan la diferenciación entre las fracciones $q_{Tot}^D(\underline{r}, t)$ y $q_{Tot}^d(\underline{r}, t)$ de los valores de $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$, un parámetro necesario para la simulación precisa del CER en FBR iluminado solarmente. La inexistencia de estos registros obliga a realizar un promedio en los valores medidos de $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ para cada hora de cada día y tratar la relación entre las fracciones directa y difusa asumiendo que ese valor $\bar{q}_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ corresponde a un día despejado y utilizando los datos reportados por Albizzati E.D. *et al* (Albizzati, E.D. *et al* 1997). Esta estrategia permite una predicción razonable de las condiciones de iluminación a la cual estaría sometido un FBR ubicado en la planta de

tratamientos de efluentes del PTLC, permitiendo una adecuada predicción de la capacidad de producción del sistema.

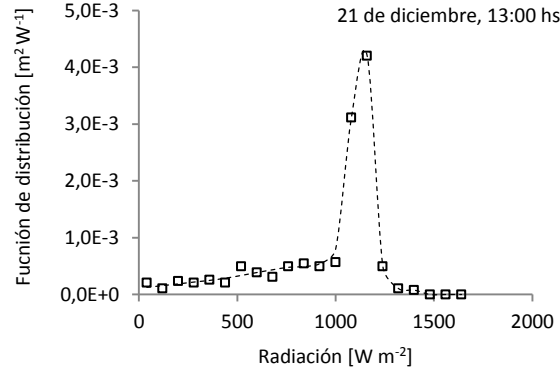


Figura 3: Función de distribución $E(q_{Tot}^G)$ para los datos de radiación solar para el 21 de diciembre a las 13:00hs en los diferentes años. Los valores corresponden a la cantidad total de energía radiante solar $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ por unidad de tiempo y unidad de área que incide en un instante t , sobre la superficie del detector ubicado en una posición \underline{r} , incluyendo la energía radiante con $300 < \lambda < 3000nm$ que llega en todas las direcciones contenidas en la semiesfera superior al plano del detector.

En la Figura 4 se presentan en forma de líneas de contorno el valor de $\bar{q}_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ para las 24hs de los 365 días del año. En el Anexo I al final del trabajo se presentan en forma de tabla los valores de $\bar{q}_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ para las 24 horas del día, de los 365 días del año.

(c) Las intensidades solar y distribución espectral de la radiación solar.

Siendo $q_{Tot}^G(\underline{r}, t)$ la cantidad total de energía radiante por unidad de tiempo y unidad de área, con $300 < \lambda < 3000nm$, proveniente del sol que incide sobre una superficie horizontal ubicada en una posición \underline{r} , en un instante t ; entonces, la cantidad de esa energía radiante incluida en la región visible del espectro electromagnético, con $400 < \lambda < 700nm$, puede calcularse según:

$$q_{VIS}^G = \frac{q_{Tot}^G \int_{400}^{700} I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t) d\lambda}{\int_{300}^{3000} I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t) d\lambda} = 0.416 q_{Tot}^G \tag{2}$$

Donde $I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{Q}}, t)$ es la distribución espectral de intensidad solar, según se muestra en la Figura 5.

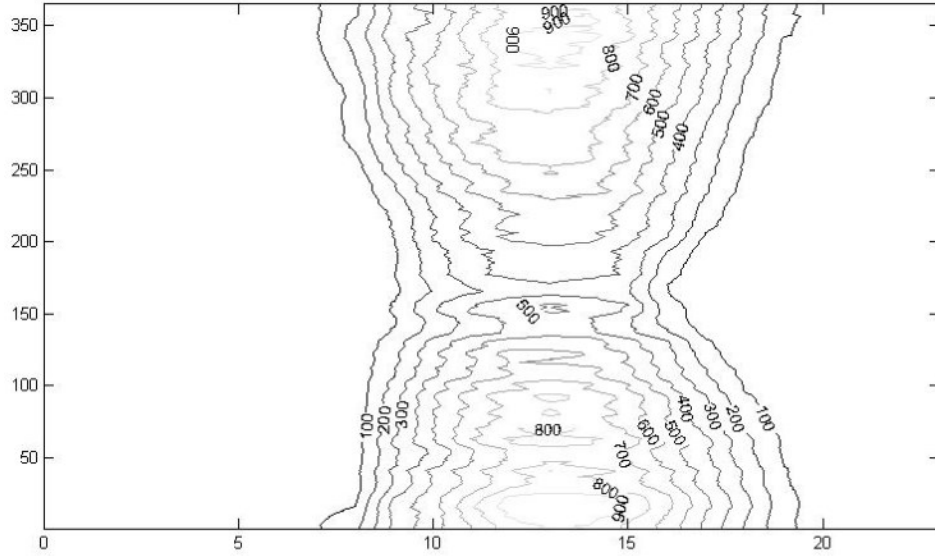


Figura 4: valor de $\bar{q}_{Tot}^G(\underline{r},t)$ para las 24hs de los 365 días del año representados en forma de líneas de contorno. Los valores corresponden a la cantidad total de energía radiante solar $q_{Tot}^G(\underline{r},t)$ considerando el rango $300 < \lambda < 3000nm$.

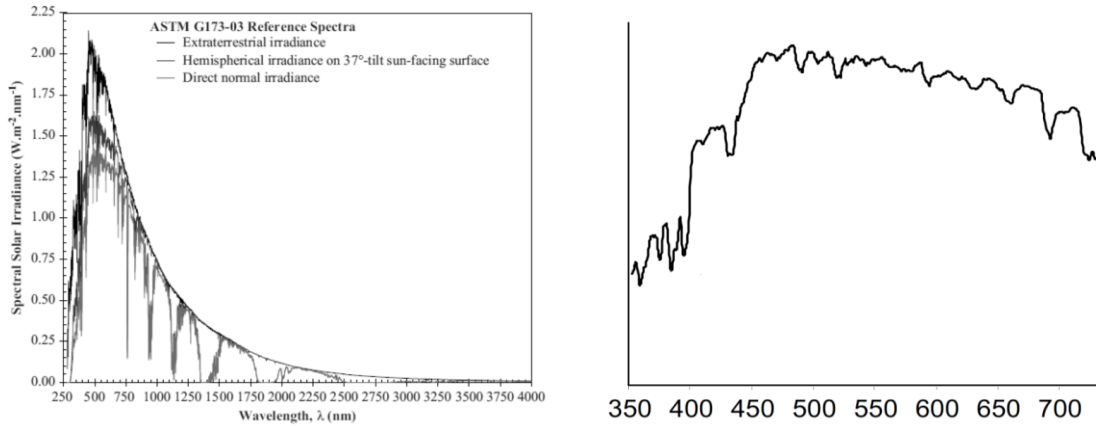


Figura 5: distribución espectral de la radiación para los rangos (a) $250 < \lambda < 4000nm$ y (b) $350 < \lambda < 700nm$. Los valores se muestran en unidades arbitrarias. (Adaptado de Pilon, L. *et al*, 2011).

Por otro lado, la densidad de flujo global de radiación visible $q_{VIS}^G(\underline{r},t)$ sobre esa posición puede expresarse según:

$$q_{VIS}^G(\underline{r},t) = q_{VIS}^D(\underline{r},t) + q_{VIS}^d(\underline{r},t) \quad (3)$$

Donde $q_{VIS}^D(\underline{r}, t)$ es la densidad de flujo de radiación visible directa y $q_{VIS}^d(\underline{r}, t)$ es la densidad de flujo de radiación visible difusa. En la Ecuación (3), las densidades de flujo de radiación directa y difusa pueden relacionarse con las respectivas intensidades espectrales de radiación directa y difusa a través de:

$$q_{VIS}^G(\underline{r}, t) = \int \int_{\hat{\underline{\Omega}} \lambda} I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\lambda d\hat{\underline{\Omega}} + \int \int_{\hat{\underline{\Omega}} \lambda} I_{\lambda}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\lambda d\hat{\underline{\Omega}} \quad (4)$$

La densidad de flujo de energía radiante directa puede calcularse según:

$$q_{VIS}^D(\underline{r}, t) = \int \int_{\hat{\underline{\Omega}} \lambda} I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\lambda d\hat{\underline{\Omega}} \quad (5)$$

Considerando que $I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = 0$ cuando $\hat{\underline{\Omega}} \neq \hat{\underline{\Omega}}_{Sol}$; y $I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \neq 0$ para $\hat{\underline{\Omega}} = \hat{\underline{\Omega}}_{Sol}$; la Ecuación (5) puede reescribirse como:

$$q_{VIS}^D(\underline{r}, t) = \int \int_{\hat{\underline{\Omega}} \lambda} \delta(\hat{\underline{\Omega}}) I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\lambda d\hat{\underline{\Omega}} \quad (6)$$

Donde $\delta(\hat{\underline{\Omega}})$ es una delta de Dirac. En la Ecuación (6), la intensidad espectral $I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ puede vincularse con la intensidad-VIS $I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$, a través de:

$$I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \int_{\lambda} I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\lambda \quad (7)$$

Con lo cual:

$$q_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} \delta(\hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (8)$$

Análogamente, a partir de las Ecuaciones (5) y (7), es posible calcular la densidad de flujo de energía radiante difusa según:

$$q_{VIS}^d(\underline{r}, t) = \int \int_{\hat{\underline{\Omega}} \lambda} I_{\lambda}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\lambda d\hat{\underline{\Omega}} \quad (9)$$

Si asumimos que la energía radiante sobre la superficie en \underline{r} sigue una distribución isotrópica y, por lo tanto, $I_{\lambda}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ es independiente de $\hat{\underline{\Omega}}$;

$$q_{VIS}^d(\underline{r}, t) = I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} \quad (10)$$

En donde:

$$I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \int_{\lambda} I_{\lambda}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) d\lambda \quad (11)$$

Por último, integrando en $\hat{\underline{\Omega}}$ las Ecuaciones (8) y (10), y reemplazando las expresiones para $q_{VIS}^D(\underline{r}, t)$ y $q_{VIS}^d(\underline{r}, t)$ en la Ecuación (4), obtenemos:

$$q_{VIS}^G(\underline{r}, t) = I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + \pi I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \quad (12)$$

Si denominamos α a la relación I_{VIS}^D / I_{VIS}^d , la Ecuación (12) puede reescribirse como:

$$q_{VIS}^G(\underline{r}, t) = I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) [\alpha (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + \pi] \quad (13)$$

Reordenando las Ecuaciones (12) y (13); los valores de $I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ y $I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ pueden calcularse a partir de $q_{VIS}^G(\underline{r}, t)$ mediante:

$$I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \frac{q_{VIS}^G(\underline{r}, t)}{[\alpha (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) + \pi]} \quad (14)$$

$$I_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \frac{q_{VIS}^G(\underline{r}, t) - \pi I_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)}{(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}})} \quad (15)$$

En las Ecuaciones (14) y (15) los diferentes valores de α para cada mes del año para la ciudad de Santa fe pueden obtenerse en el trabajo publicado por Albizzati E.D. (Albizzati, E.D. *et al*, 1997). La Ecuación (15) sólo es válida para $(\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) \neq 0$.

Para transformar la cantidad de energía radiante que alcanza al detector [$W m^{-2}$] en cantidad de fotones [μmol de fotones m^{-2}] teniendo en cuenta la distribución espectral de la energía radiante, se asumió que tanto $I_{\lambda}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ como $I_{\lambda}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ siguen la misma distribución en λ que la radiación espectral solar $I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ de la Figura 5(b). Considerando la Ecuación (7), la distribución $I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ puede expresarse de acuerdo a:

$$I_{\lambda}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = I_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) E_J(\lambda) \quad (16)$$

donde $E_J(\lambda)$ es la función de distribución espectral en términos de energía, la cual cumple con la siguiente condición de normalización

$$\int_{400}^{700} E_J(\lambda) d\lambda = 1 \quad (17)$$

Por otro lado, la intensidad espectral $I_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ en términos de energía radiante puede vincularse con la intensidad espectral $n_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ en términos de número de fotones, mediante la relación:

$$I_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = \frac{hc}{\lambda} n_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \quad (18)$$

Al igual que en la Ecuación (16), $n_\lambda(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ puede expresarse en relación la función de distribución espectral $E_N(\lambda)$ en término de número de fotones, con lo cual la Ecuación (18) puede describirse como:

$$I_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) E_J(\lambda) = \frac{hc}{\lambda} n_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) E_N(\lambda) \quad (19)$$

Integrando ambos lados de la Ecuación (19) en λ luego de obvias modificaciones; la relación entre $I_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ y $n_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)$ es:

$$\frac{I_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t)}{hc} \int_{VIS} \lambda E_J(\lambda) d\lambda = n_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int_{VIS} E_N(\lambda) d\lambda \quad (20)$$

con lo cual:

$$n_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) = 4,603 \left[\frac{\mu mol}{Joule} \right] I_{VIS}(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \quad (21)$$

En la Figura 6 se muestran las funciones de distribución $E_J(\lambda)$ y $E_N(\lambda)$ en términos de energía y número de fotones respectivamente para la radiación solar.

Por último, las densidades superficiales de flujo fotones en forma directa y difusa, pueden obtenerse mediante las siguientes expresiones:

$$q_{VIS}^D(\underline{r}, t) = n_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} \delta(\hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} = n_{VIS}^D(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) \quad (22)$$

$$q_{VIS}^d(\underline{r}, t) = n_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \int_{\hat{\underline{\Omega}}} (\hat{\underline{n}} \cdot \hat{\underline{\Omega}}) d\hat{\underline{\Omega}} = 2\pi n_{VIS}^d(\underline{r}, \hat{\underline{\Omega}}, t) \quad (23)$$

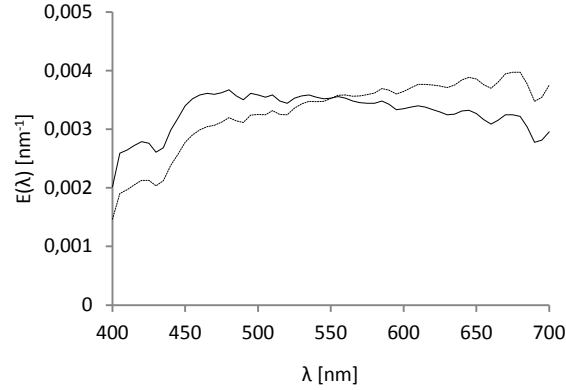


Figura 6: Función de distribución espectral $E(\lambda)$ de la radiación solar en términos de número de fotones (---) y en términos de Energía (—). Ambas distribuciones cumplen la condición $\int_{400}^{700} E(\lambda) d\lambda = I$.

(c) La posición del sol respecto al centro de la tierra un día d del año.

Para simular el campo de energía en fotobioreactores iluminados con luz solar es necesario considerar tanto la energía $q_{VIS}^D(\underline{r}, t)$ que llega al reactor en forma directa, como la energía $q_{VIS}^d(\underline{r}, t)$ que llega a la superficie del cultivo en forma difusa. En general, se asume que la energía difusa se distribuye en forma isotrópica alrededor de la semiesfera sobre el plano tangente a la posición \underline{r} . Por otro lado, $q_{VIS}^D(\underline{r}, t)$ proviene desde una única posición: la posición del sol.

Para predecir la posición del sol en una hora específica del día, en un día del año y para una posición geográfica sobre la superficie de la tierra, se estableció un sistema de coordenadas $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$ ubicado en el centro de la tierra. Estos ejes de coordenadas están fijos y la tierra gira sobre el eje \hat{z} , en sentido $\hat{x} \rightarrow \hat{y}$. Respecto al eje de coordenadas $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$, el sol estará siempre sobre una elipse centrada en el sistema $\{\hat{e}_1; \hat{e}_2; \hat{e}_3\}$, con su eje menor coincidente con el eje x y que forma un ángulo de $23,5^\circ$ con el

plano XY (Figura 7). La función para esa elipse, en el sistema de coordenadas $\{\underline{\hat{e}}_1; \underline{\hat{e}}_2; \underline{\hat{e}}_3\}$, es

$$\left(\frac{E_1}{a}\right)^2 + \left(\frac{E_2}{b}\right)^2 = 1. \text{ Respecto al sistema } \{\underline{\hat{x}}; \underline{\hat{y}}; \underline{\hat{z}}\} \text{ los ejes } \underline{\hat{e}}_1, \underline{\hat{e}}_2, \text{ y } \underline{\hat{e}}_3 \text{ son:}$$

$$\underline{\hat{e}}_1 = 1\underline{\hat{x}} + 0\underline{\hat{y}} + 0\underline{\hat{z}} \quad (24)$$

$$\underline{\hat{e}}_2 = 0\underline{\hat{x}} + \cos \beta \underline{\hat{y}} + \sin \beta \underline{\hat{z}} \quad (25)$$

$$\underline{\hat{e}}_3 = 0\underline{\hat{x}} - \sin \beta \underline{\hat{y}} + \cos \beta \underline{\hat{z}} \quad (26)$$

Donde $\beta = 23,5^\circ$ es el ángulo de inclinación del eje rotación de la tierra, respecto al plano que incluye a

la elipse. Por otro lado, para el caso de la elipse que describe la tierra durante su traslación $\frac{a}{b} \approx 1$

(Khavrus, V. *et al*, 2010 y 2012); de modo que es posible asumir que la posición del sol respecto al sistema $\{\underline{\hat{e}}_1; \underline{\hat{e}}_2; \underline{\hat{e}}_3\}$ puede caracterizarse mediante la ecuación de un círculo. Dependiendo de la estación

del año; la posición del sol sobre ese círculo en el plano que contiene a $\underline{\hat{e}}_1$ y a $\underline{\hat{e}}_2$, puede conocerse a

través del ángulo α'_1 . De acuerdo al sistema de coordenadas establecido (Figura 7), este ángulo toma los

siguientes valores: $\alpha'_1 = 0$ el 21 de marzo (día 80 del año); $\alpha'_1 = \frac{1}{2}\pi$ el día 22 de junio (día 173 del

año); $\alpha'_1 = \pi$ el 23 de septiembre (día 266 del año); y, $\alpha'_1 = \frac{3}{2}\pi$ el 22 de diciembre (día 356 del año).

En forma más general, para un día d cualquiera tal que $d = 1$ corresponda al 1º de enero de un año

$$\text{típico de 365 días, } \alpha'_1 = \frac{2\pi}{365}(d - 80)$$

Luego, para ese día d , es posible calcular el vector unidad $\underline{\hat{s}}'$ que señala la posición del sol en el sistema

$\{\underline{\hat{e}}_1; \underline{\hat{e}}_2; \underline{\hat{e}}_3\}$, según:

$$\underline{\hat{s}}' = \cos \left[\frac{2\pi}{365}(d - 80) \right] \underline{\hat{e}}_1 + \sin \left[\frac{2\pi}{365}(d - 80) \right] \underline{\hat{e}}_2 + 0\underline{\hat{e}}_3 \quad (27)$$

Luego, en el sistema $\{\underline{\hat{x}}; \underline{\hat{y}}; \underline{\hat{z}}\}$ la posición del sol es:

$$\underline{\hat{s}} = \cos \left[\frac{2\pi}{365}(d - 80) \right] \underline{\hat{x}} + \sin \left[\frac{2\pi}{365}(d - 80) \right] \cos \beta \underline{\hat{y}} + \sin \left[\frac{2\pi}{365}(d - 80) \right] \sin \beta \underline{\hat{z}} \quad (28)$$

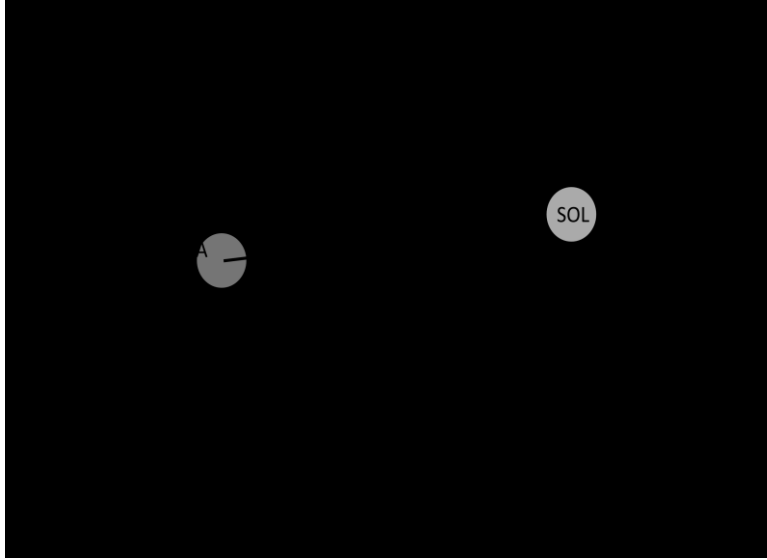


Figura 7: Posición relativa del sol respecto al eje terrestre en los diferentes días del año. El centro de la tierra está ubicada en el centro del sistema $\{x; y; z\}$. La tierra gira sobre sí misma en el eje z . En este esquema, la posición del sol estará siempre sobre una elipse en el plano que incluye los versores \hat{e}_1 y \hat{e}_2 .

Asimismo, en coordenadas polares y sobre el sistema $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$, la posición del sol puede caracterizarse a través de los ángulos ϕ_s y θ_s .

$$\hat{s} = \sin \theta_s \left[\cos \phi_s \hat{x} + \sin \phi_s \hat{y} \right] + \cos \theta_s \hat{z} \quad (29)$$

con lo cual los ángulos ϕ_s y θ_s que caracterizan la posición del sol un día d cualquiera del año, en coordenadas polares y sobre el sistema $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$ son:

$$\cos \theta_s = \sin \left[\frac{2\pi}{365} (d - 80) \right] \sin \beta \quad (30)$$

$$\cos \phi_s = \frac{\cos \left[\frac{2\pi}{365} (d - 80) \right]}{1 - \left\{ \sin \left[\frac{2\pi}{365} (d - 80) \right] \sin \beta \right\}^2} \quad (31)$$

(d) La posición del sol a una hora h del día, un día d del año para una posición sobre la superficie de la tierra.

Sobre el meridiano de Greenwich, considerando el sistema de coordenadas $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$, el día comienza a las 00:00hs cuando $\phi_G = \phi_s - \pi$ (Figura 8). Luego, a cualquier hora h_G en Greenwich

$$\phi_G = \phi_s - \pi + h_G \frac{\pi}{12}. \quad (32)$$

Donde ϕ_G y ϕ_s son los ángulos acimutales en el sistema $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$ que indican, respectivamente las posiciones del meridiano de Greenwich y del sol. A partir de esto, a cualquier hora $h_p = h_G + \Delta h$ en una posición cualquier sobre la superficie de la tierra (que para fines prácticos asumiremos que es esférica), con una diferencia horaria Δh respecto al meridiano de Greenwich, el vector unidad \hat{p} , en el sistema $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$, que señala una posición, puede conocerse a través de:

$$\hat{p} = \sin \theta_p \cos \phi_p \hat{x} + \sin \theta_p \sin \phi_p \hat{y} + \cos \theta_p \hat{z} \quad (33)$$

En la Ecuación (33), $\phi_p = \phi_s + \pi \left(\frac{h_p - \Delta h}{12} - 1 \right) + long$ y $\theta_p = \frac{\pi}{2} + lat$. En este caso, la *latitud* y *longitud* correspondientes a ese punto geográfico a partir de se determinan según la siguiente convención: (1) sobre la línea de ecuador $lat = 0^\circ$, y es positiva en dirección Sur y negativa en dirección Norte; (2) sobre la línea del meridiano de Greenwich $long = 0^\circ$, y es positiva hacia el Este y negativa hacia el Oeste.

En esa posición \hat{p} sobre la tierra puede generarse un sistema de coordenadas $\{\hat{u}_1; \hat{u}_2; \hat{u}_3\}$ talque $\hat{u}_3 = \hat{p}$ indica la dirección radial, \hat{u}_2 señala al Norte y \hat{u}_1 apunta al Este. En el sistema de coordenadas $\{\hat{x}; \hat{y}; \hat{z}\}$ lo vectores \hat{u}_1 , \hat{u}_2 y \hat{u}_3 son:

$$\hat{u}_3 = \sin \theta_p \cos \phi_p \hat{x} + \sin \theta_p \sin \phi_p \hat{y} + \cos \theta_p \hat{z} \quad (34)$$

$$\hat{u}_2 = \sin \left(\theta_p - \frac{\pi}{2} \right) \cos \phi_p \hat{x} + \sin \left(\theta_p - \frac{\pi}{2} \right) \sin \phi_p \hat{y} + \cos \left(\theta_p - \frac{\pi}{2} \right) \hat{z} \quad (35)$$

$$\hat{u}_1 = \hat{u}_2 \times \hat{u}_3 \quad (36)$$

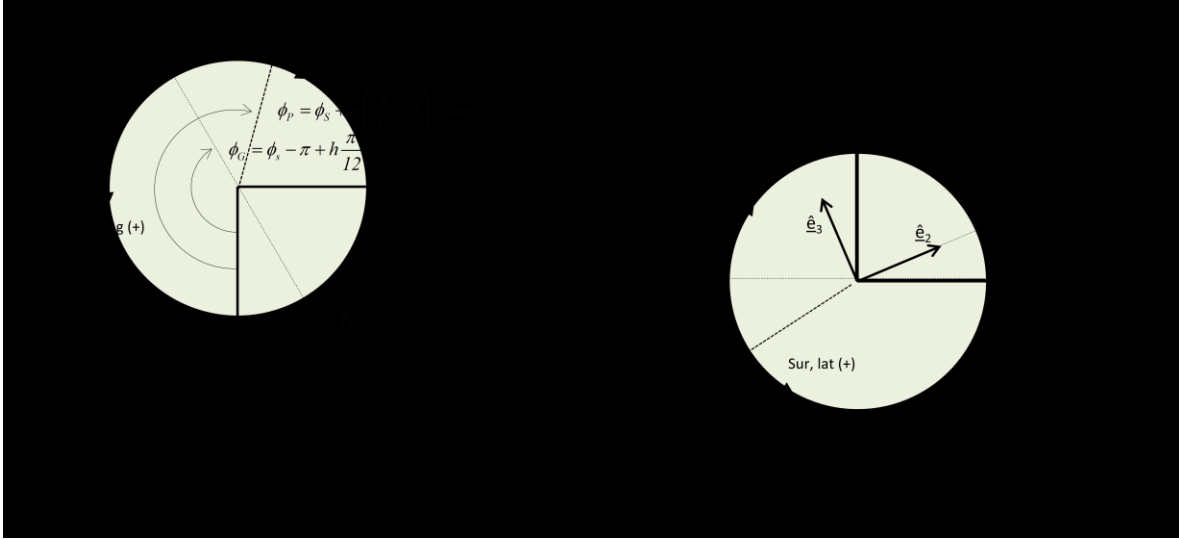


Figura 8: posición del sol respecto a una posición específica sobre la superficie de la tierra considerando la hora y las coordenadas terrestres.

Por último el vector unitario $\underline{\hat{s}}''$, que señala la posición del sol en el sistema $\{\underline{\hat{u}}_1, \underline{\hat{u}}_2, \underline{\hat{u}}_3\}$, puede calcularse según:

$$\underline{\hat{s}}'' = (\underline{\hat{s}} \cdot \underline{\hat{u}}_1) \underline{\hat{u}}_1 + (\underline{\hat{s}} \cdot \underline{\hat{u}}_2) \underline{\hat{u}}_2 + (\underline{\hat{s}} \cdot \underline{\hat{u}}_3) \underline{\hat{u}}_3 \quad (37)$$

que en relación a los puntos cardinales es:

$$\underline{\hat{s}}'' = (\underline{\hat{s}} \cdot \underline{\hat{u}}_1) Este + (\underline{\hat{s}} \cdot \underline{\hat{u}}_2) Norte + (\underline{\hat{s}} \cdot \underline{\hat{u}}_3) Vertical \quad (38)$$

En la Figura 9 puede verse al posición del sol en diferentes horas del día para cuatro días del año.

(e) Diseño de los reactores.

En el Capítulo 2 se obtuvo una expresión cinética y se determinaron los parámetros incluidos en ella. Mediante la misma es posible predecir el valor de la velocidad local de crecimiento celular $r_x(r_{VIS}^{abs}, x)$ para la cepa de microalga *Chlorella* sp. Esta expresión depende de la concentración de biomasa $x(t)$ y de la velocidad volumétrica local de absorción de fotones $r_{VIS}^{abs}(r, t)$. A su vez, la velocidad de absorción de fotones $r_{VIS}^{abs}(r, t)$ depende de la posición r en el reactor y del tiempo t ; esta última

dependencia no es directa, sino a través de la variación en el tiempo de la concentración de biomasa o de la condición de iluminación a la cual está expuesta el reactor.

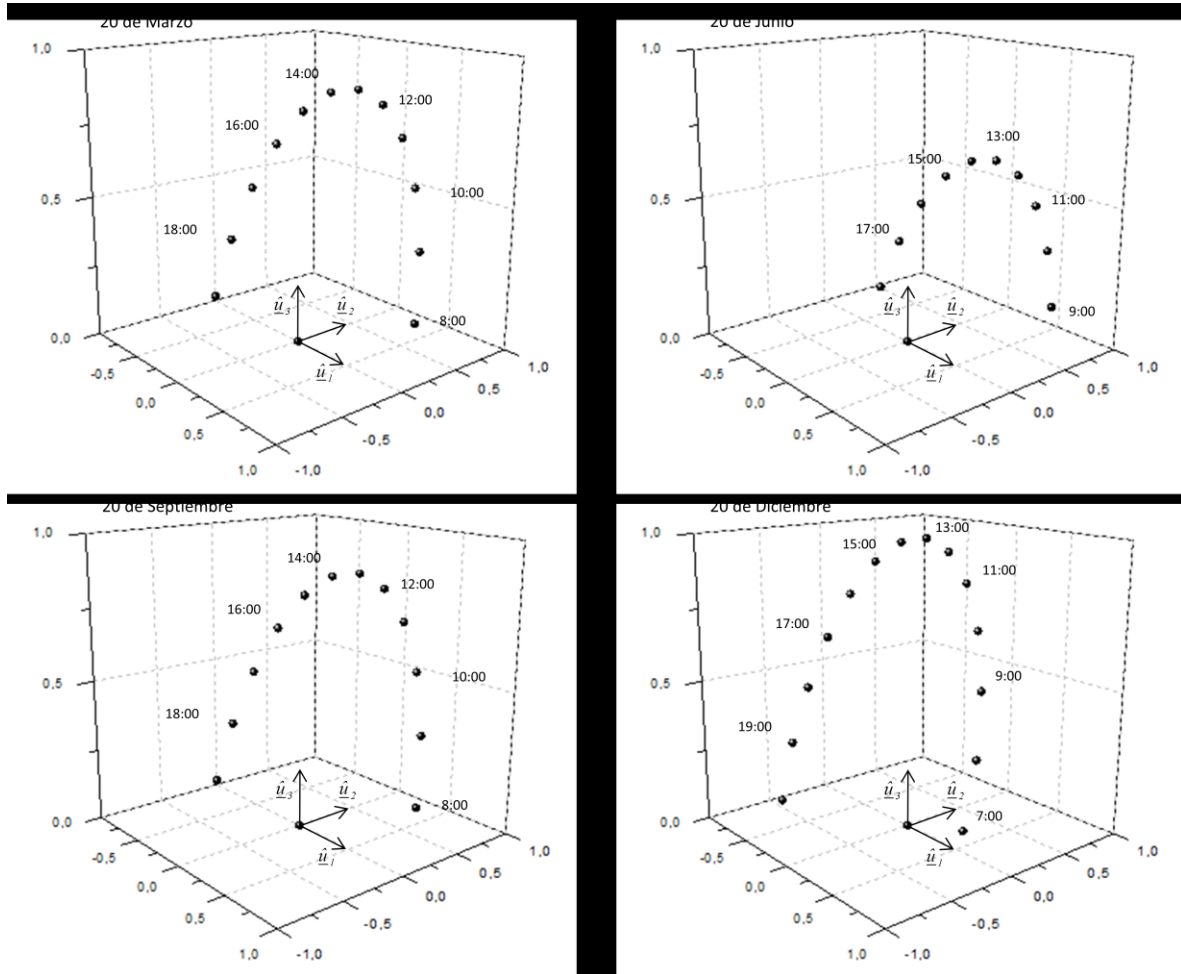


Figura 9: Posición del sol para diferentes horas de los días (a) 20 de marzo, (b) 20 de junio, (c) 20 de septiembre y (d) 20 de diciembre en la ciudad de Santa fe. Los vectores \hat{u}_1 ; \hat{u}_2 ; y \hat{u}_3 indican, respectivamente las direcciones Este, Norte y Vertical.

Durante la determinación de dicha expresión se trabajó en condiciones de baja iluminación con el objetivo de asegurar que sea la luz el sustrato determinante de la velocidad de propagación. La iluminación en el reactor, de geometría anular, se realizó a través de una lámpara fluorescente de 16Watt ubicada en el centro del reactor. En estas condiciones, la máxima densidad de flujo de fotones q_{VIS} sobre la superficie del vidrio interno del rector corresponde a un valor de $126 \mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Considerando la radiación total que incide sobre el cultivo a través de toda la superficie iluminada s y el volumen V_R del reactor, el flujo de fotones por unidad de volumen de cultivo $\tilde{\Sigma}_{VIS}$ corresponde a:

$$\tilde{\Sigma}_{VIS} = \frac{1}{V_R} \int q_{VIS}(r,t) ds = 0,49 \mu mol s^{-1} L^{-1} \quad (39)$$

Sobre la superficie del reactor abierto tipo *open ponds*, la densidad de flujo de fotones varía en función de la fecha y la hora. Los valores pueden llegar a ser muy altos, por encima de los $1000 \mu moles s^{-1} m^{-2}$. En esta situación las zonas más cercanas a la superficie del piletón podrían estar sometidas a estados de foto-inhibición o estrés oxidativo por exceso de radiación, mientras que en las zonas más profundas, debido al efecto *self shading*, la luz podría no ser suficiente para mantener un crecimiento celular sostenido.

Para lograr una iluminación homogénea y semejante a las utilizadas en escala de laboratorio (Capítulo 2), se propone realiza el cultivo en un sistema de FBR tipo columnas interconectadas, dispuestas verticalmente en el interior del piletón, el cual permanecerá lleno de agua (Figura 10). Este sistema integra las ventajas de los sistemas tipo tubulares, columna y *airlift* permitiendo un mezclado eficiente, una alta relación área iluminada por unidad de volumen y un buen intercambio líquido-gas. En este sistema, la radiación solar que originalmente incidiría sobre la superficie del cultivo, es distribuida sobre la superficie lateral del FBR cilíndrico, logrando así un aumento en el área iluminada y reduciendo la magnitud del flujo local de radiación solar $q_{VIS}(r,t)$. El efecto neto es una iluminación moderada y más uniforme del cultivo.

Para un mayor aprovechamiento de la luz solar, el fondo y las paredes del piletón estarán pintadas blancas, reflejando la luz en forma difusa. El piletón permanecerá lleno de agua de manera de lograr un mejor control de la temperatura y evitar las diferencias de presión entre el interior y el exterior del reactor. Las columnas estarán interconectadas mediante tubos horizontales, situados en la base de cada columna, de manera de permitir la recirculación y el mezclado del cultivo. Para mejorar el mezclado en el interior de las columnas, los reactores estarán tabicados con un tabique plano, que se extiende desde el fondo de la columna y hasta algunos centímetros por debajo de la superficie del medio de cultivo en el interior del reactor. El tabique divide la columna en dos, de manera de lograr que las conexiones de ingreso y egreso de fluido a la columna queden en extremos opuestos.

Este sistema prevé, además, la inyección de aire desde la base de la columna, en la posición en la cual el líquido se mueva en dirección ascendente, asemejando el reactor a un sistema *airlift*. De este modo se evita la acumulación de oxígeno a la vez que se administra CO_2 al cultivo. En caso de suministrar aire en la columna, la misma deberá poseer un sistema para evacuar el mismo. Adicionalmente, al ser un sistema cerrado, reduce el riesgo de contaminación y permite un control más preciso de las variables de cultivo. Por último, este sistema de cultivo podría ser fabricado en material descartable (PET o polietileno), reduciendo su costo y minimizando los riesgos de contaminación.

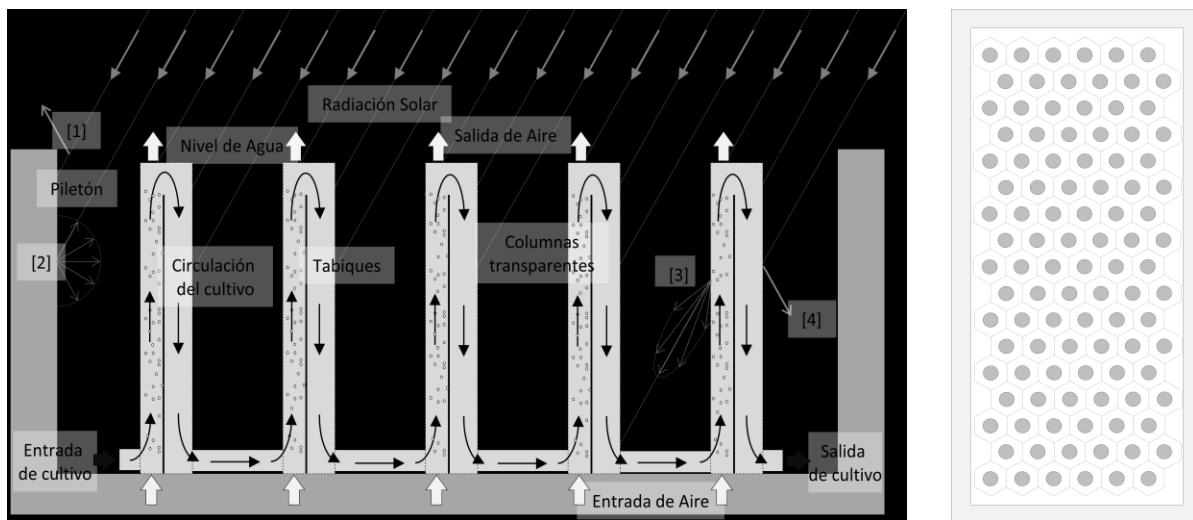


Figura 10: (a) Esquema del sistema de FBR tipo columna-tubular, sumergidos en los piletones del PTLC. El sistema de FBR consiste en columnas verticales interconectadas por tubos horizontales. Antes de alcanzar la suspensión, parte de la radiación solar es reflejada [1] sobre la interfase líquido-gas y en las paredes del FBR [4]. Las paredes y el fondo son de color blanco por lo que los haces de luz que inciden sobre los mismos son reflejados en forma difusa [2]. Un tabique divide las columnas en dos para favorecer el mezclamiento, permitiendo además la inyección de aire. No toda la radiación solar es absorbida en la suspensión y parte de la misma emana desde la cara posterior del FBR [3]. (b) Vista superior y disposición en tresbolillo de las columnas en el interior del piletón.

Es este trabajo nos enfocaremos en los aspectos relativos a la *transferencia de energía radiante* en el FBR, de manera de lograr una estimación razonable de la capacidad de producción de este sistema de cultivo montado en los piletones disponibles en el PTLC. Es importante remarcar que todos los demás fenómenos de diseño deberán ser analizados para lograr un sistema de cultivo eficiente. Estos fenómenos son: transferencia de cantidad de movimiento y régimen de mezclamiento; transferencia de masa e intercambio líquido-gas; y, transferencia de energía y control de temperatura. Estos aspectos dependen

de las características del sistema de circulación de medio de cultivo; de la geometría del reactor; de las propiedades de fluido; del régimen de aireación y las características del sistema difusor de aire; etc. El desarrollo de esta tecnología requerirá que cada uno de estos fenómenos sea analizado primeramente en forma aislada, para luego analizar la forma en que se relacionan entre ellos de manera de llevar adelante una optimización del sistema su conjunto.

(f) Simulación y análisis de CER en el sistema de cultivo.

Una vez conocidos los valores para $n_{\lambda}^D(\underline{r}, \underline{\hat{Q}}, t)$ y $n_{\lambda}^d(\underline{r}, \underline{\hat{Q}}, t)$ y habiendo determinado la posición \hat{s}'' del sol para una ubicación geográfica \underline{r} , en un instante t , la simulación del CER en un FBR (de geometría definida) por el método basado en el método de Monte Carlo consiste en:

- Establecer las características de la fuente de radiación
 - Fijar las coordenadas terrestres de Santa Fe
 - Establecer una día y una hora
 - Estimar el valor de $q^G(\underline{r}, t)$ a partir de los datos provistos por el CIM y calcular $q_{VIS}^G(\underline{r}, t)$
 - Determinar la posición del sol
 - Calcular el coseno del ángulo que forma con la normal
 - Adoptar un valor para la relación I_D/I_d
 - Calcular los valores de I_{VIS}^D e I_{VIS}^d
 - Calcular los valores para n_{VIS}^D y n_{VIS}^d
 - Calcular los valores para q_{VIS}^D y q_{VIS}^d
- Simular el CER en el FBR para ese día y hora
 - Establecer una concentración de biomasa y de clorofila en el medio
 - Simular el camino de un número suficientemente grande de fotones de la siguiente forma:
 - Elegir una longitud de onda para el fotón
 - Elegir si el fotón es **D** o **d**; si es **d**: dirección al azar; si es **D**: dirección inversa a la del sol
 - Elegir una posición sobre la superficie del piletón.
 - Determinar si el fotón es reflejado sobre la superficie del agua.
 - Calcular la posición de impacto sobre la superficie del FBR tipo columna
 - Determinar si el fotón es reflejado sobre la superficie del FBR.
 - Simular su camino hipotético hasta ser absorbido o encontrarse con un límite del FBR.
 - Avanzar un paso en la suspensión
 - Chequear si alcanzó algún límite del reactor
 - Generar un número aleatorio
 - Elegir entre las alternativa se absorbido, dispersa o ninguna de las anteriores.
 - Si se absorbe generar un nuevo fotón
 - Si se dispersa generar una nueva dirección considerando la función de fase
 - Si ni es absorbido ni dispersado avanzar un nuevo paso.
- Calcular los valores de $r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)$, la función de distribución normalizada $g'(r_{VIS}^{abs}, t)$ y el valor de r_x .

Para este FBR, la densidad de flujo de fotones $q_{VIS}(\underline{r}, t)$ sobre su superficie no es homogéneas (hay zonas más y zonas menos iluminadas) con lo cual el valor de la densidad de flujo de fotones depende no sólo de la fecha, la hora y la geometría del reactor; sino que también depende de la posición \underline{r} sobre la superficie del reactor. Para caracterizar la forma en que la radiación solar se distribuye sobre la superficie del reactor, es posible definir una función de distribución de superficies $s(q_{VIS}, t)$ en términos de densidades locales de flujo de fotones $q_{VIS}(\underline{r}, t)$. A partir de $s(q_{VIS}, t)$, el producto $s(q_{VIS}, t)dq_{VIS}$ es la fracción de la superficie del reactor tubular sobre la cual la densidad de flujo de fotones se halla entre q_{VIS} y $q_{VIS} + dq_{VIS}$. La fracción acumulada de superficie con densidades de flujo en el intervalo $(0, q_{VIS})$ es:

$$\frac{S(q_{VIS}, t)}{S_T} = \int_0^{q_{VIS}} s(\hat{q}_{VIS}, t) d\hat{q}_{VIS} \quad (40)$$

donde S_T es la superficie total del FBR, $S(q_{VIS}, t)$ es la superficie acumulada del FBR con densidades de flujo de fotones en el intervalo $(0, q_{VIS})$ y $d\hat{q}_{VIS}$ es la variable de integración para el intervalo $0 < d\hat{q}_{VIS} < dq_{VIS}$. Considerando la condición límite $\lim_{q_{VIS} \rightarrow \infty} S(q_{VIS}, t) = S_T$, es posible concluir que $s(q_{VIS}, t)$ está normalizada en 1.

$$\lim_{q_{VIS} \rightarrow \infty} \frac{S(q_{VIS}, t)}{S_T} = \lim_{q_{VIS} \rightarrow \infty} \int_0^{q_{VIS}} s(\hat{q}_{VIS}, t) d\hat{q}_{VIS} = 1 \quad (41)$$

Con la cual, la relación entre $s(\hat{q}_{VIS}, t)$ y $\frac{S(q_{VIS}, t)}{S_T}$ es:

$$\frac{1}{S_T} \frac{dS(q_{VIS}, t)}{dq_{VIS}} = s(q_{VIS}, t) \quad (42)$$

relación que puede ser numéricamente aproximada de acuerdo a:

$$\frac{1}{S_T} \left[\frac{S(q_{VIS} + \Delta q_{VIS}, t) - S(q_{VIS}, t)}{\Delta q_{VIS}} \right] \approx s(q_{VIS}, t) \quad (43)$$

para valores de q_{VIS} suficientemente pequeños.

Luego, a partir de $s(q_{VIS}, t)$ la densidad de flujo promedio \bar{q}_{VIS} sobre la superficie del reactor, dependiente del día, la hora y la geometría del reactor, puede ser calculada según la Ecuación (44)

$$\bar{q}_{VIS} = \int_0^{\infty} q_{VIS} s(q_{VIS}, t) dq_{VIS} \quad (44)$$

En la Figura 11(a) se muestran los resultados de la función de distribución $s(q_{VIS}, t)$ en términos de densidades de flujo de fotones q_{VIS} sobre la superficie de un FBR tipo columna con un radio (R_T) de 100mm, una altura (H_R) de 1200mm y un distancia (d_C) entre centros de 447mm (parámetros de diseño elegidos en forma arbitraria); para el 21 de diciembre a las 13hs. En la Figura 11(b) se muestran los resultados obtenidos según la Ecuación (40) para las fracciones $\frac{S(0, q_{VIS})}{S_T}$ en el FBR tipo columna y

para un reactor *open pond* tradicional de 30cm de profundidad. Para un reactor tipo *open pond*, la densidad de flujo sobre la superficie es homogénea y, en esa fecha y hora, toma el valor de $1650 \mu\text{moles } m^{-2} s^{-1}$; por ello $\frac{S(0, q_{VIS})}{S_T}$ es igual a cero en el intervalo $0 \leq q_{VIS} < 1650 \mu\text{mol } s^{-1} m^{-2}$ e igual a 1 en el

intervalo $0 \leq q_{VIS} \leq 1650 \mu\text{mol } s^{-1} m^{-2}$. Para el caso del FBR tipo columna solo una fracción menor a 0,05 de la superficie del reactor (la parte superior) es irradiada con una densidad de flujo q_{VIS} semejante a la hallada en el caso del sistema *open pond*; por el contrario, una gran fracción de la superficie del reactor ($\approx 0,80$) recibe un flujo de fotones relativamente bajo, en el rango $50 < q_{VIS}(r, t) < 200 \mu\text{moles } s^{-1} m^{-2}$.

En cuanto a la densidad de flujo promedio $\bar{q}_{VIS}(t)$ y al flujo de fotones por unidad de volumen de cultivo $\tilde{\varrho}_{VIS}(r, t)$, para el 21 de diciembre a las 13hs, estas variables son, respectivamente, $\bar{q}_{VIS} = 233 \mu\text{mol } s^{-1} m^{-2}$ y $\tilde{\varrho}_{VIS} = 4,9 \mu\text{mol } s^{-1} L^{-1}$ para el caso del FBR tipo columna; y, $\bar{q}_{VIS} = 1650 \mu\text{mol } s^{-1} m^{-2}$ y $\tilde{\varrho}_{VIS} = 5,5 \mu\text{mol } s^{-1} L^{-1}$ para el reactor tipo *open pond* con 30cm de profundidad. A partir de estos valores es posible comprender y cuantificar la forma en que el diseño de FBR tipo columna permite una iluminación más homogénea del cultivo evitando zonas de alta irradiación y la presencia del fenómeno de estatificación en el medio.

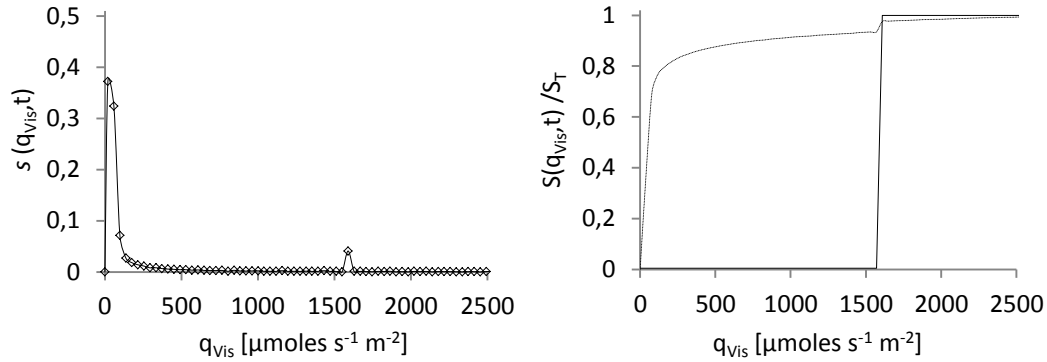


Figura 11: (a) Función de distribución de superficies $s(q_{VIS}, t)$ en términos de densidades locales de flujo de fotones $q_{VIS}(\underline{r}, t)$ para el 21 de diciembre a las 13hs. (b) La fracción acumulada de superficie con densidades de flujo en el intervalo $(0, q_{VIS})$ para el mismo día y hora.

Es importante remarcar que la función de distribución $s(q_{VIS}, t)$ en términos de q_{VIS} varía con el día y la fecha y, además, con la geometría del reactor. En la Figura 12 se muestra en forma de gráfico de cajas, la distribución de densidades de flujos de fotones $q_{VIS}(\underline{r}, t)$ sobre la superficie del FBR tipo columna con $R_T = 100\text{mm}$, $H_R = 1200\text{mm}$ y $d_C = 447\text{mm}$, para diferentes fechas y horas. Como puede verse, la fecha como la hora tienen una gran influencia sobre la distribución del flujo de radiación $q_{VIS}(\underline{r}, t)$ en las paredes del FBR. No hay que olvidar que la geometría de los reactores (elegidas arbitrariamente en este caso) es una variable susceptible de ser optimizada.

En la Figura 13 se muestra la densidad de flujo de fotones sobre una superficie horizontal $q_{VIS}(t)$ junto al flujo promedio de fotones $\bar{q}_{VIS}(t)$ en el FBR tipo columna del ejemplo. Se incluyen además los valores para el flujo de fotones por unidad de volumen de cultivo $\tilde{\Sigma}_{VIS}(\cdot, \cdot)$, para las alternativas de reactores: piletones abiertos y FBR tipo columnas/tubular. Como puede verse, el diseño del reactor tipo columna logra una efectiva atenuación del flujo de radiación sobre la superficie del cultivo y una distribución más homogénea de la luz en el medio, evitando las condiciones extremas, pero manteniendo constante el valor del flujo de fotones por unidad de volumen de cultivo, $\tilde{\Sigma}_{VIS}(\cdot, \cdot)$, en el reactor.

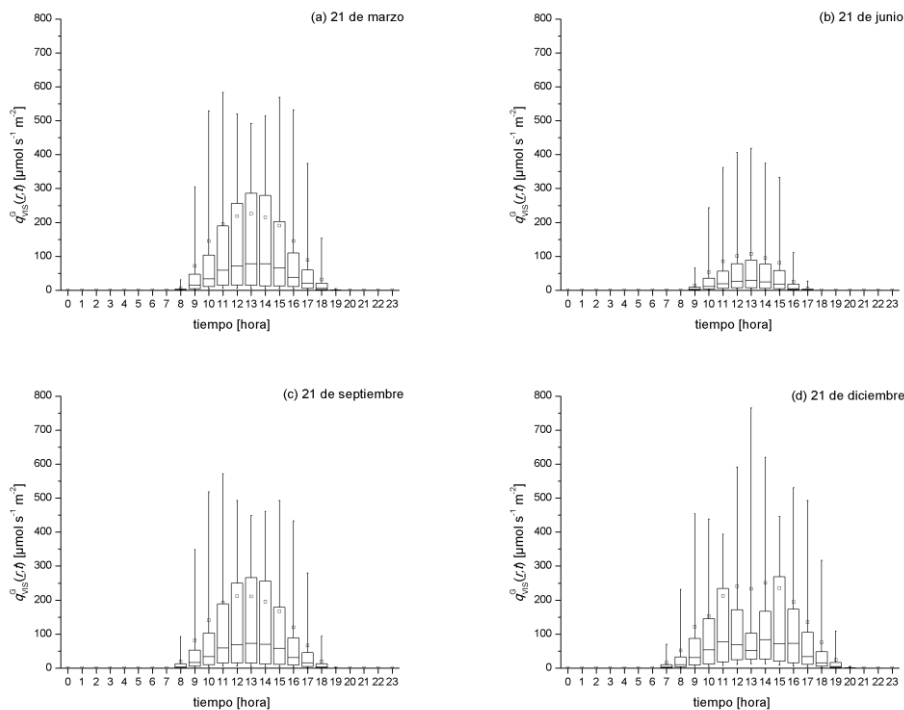


Figura 12: distribución de densidades de flujos de fotones $q_{VIS}^0(\underline{r}, t)$ sobre la superficie del FBR tipo columna para los días **(a)** 21 de marzo, **(b)** 21 de junio, **(c)** 21 de septiembre y **(d)** 21 de diciembre. En el gráfico la caja representa los cuartiles Q_1 , Q_2 y Q_3 . Las líneas continuas se extienden desde el percentil P_{10} al percentil P_{90} . El promedio se representa con el símbolo \square .

(h) Estimación de la velocidad de crecimiento celular en el sistema de cultivo diseñado.

En este apartado se realiza una estimación de la capacidad de producción de biomasa microalgas en el sistema de cultivo en FBR tipo tubular-columna, ubicado en las instalaciones del PTLC y con iluminación solar. La estimación se lleva adelante seleccionando un geometría arbitraria para el diseño del FBR con la finalidad de obtener una aproximación razonable que pueda ser mejorada mediante una estrategia de optimización. Durante dicha optimización se deberá considerar que es posible modificar tanto la geometría del reactor (diámetro, altura y distancia entre columnas) como las condiciones operativas (concentración de biomasa, caudales de líquido y aire, etc.). Asimismo, la optimización del reactor no puede hacerse solo en términos del CER, también es necesario considerar el efecto de las variables de diseño y operación sobre el mezclado y la transferencia líquido gas en el sistema y su influencia tanto en la productividad del sistema, como en parámetros económicos como costos operativos e inversión inicial. Por último, se deberá considerar que las condiciones de operación y

configuración más eficiente del sistema de cultivo podrían ser diferente para cada época del año, con lo cual estas deberán ser halladas particularmente a través de un proceso de optimización.

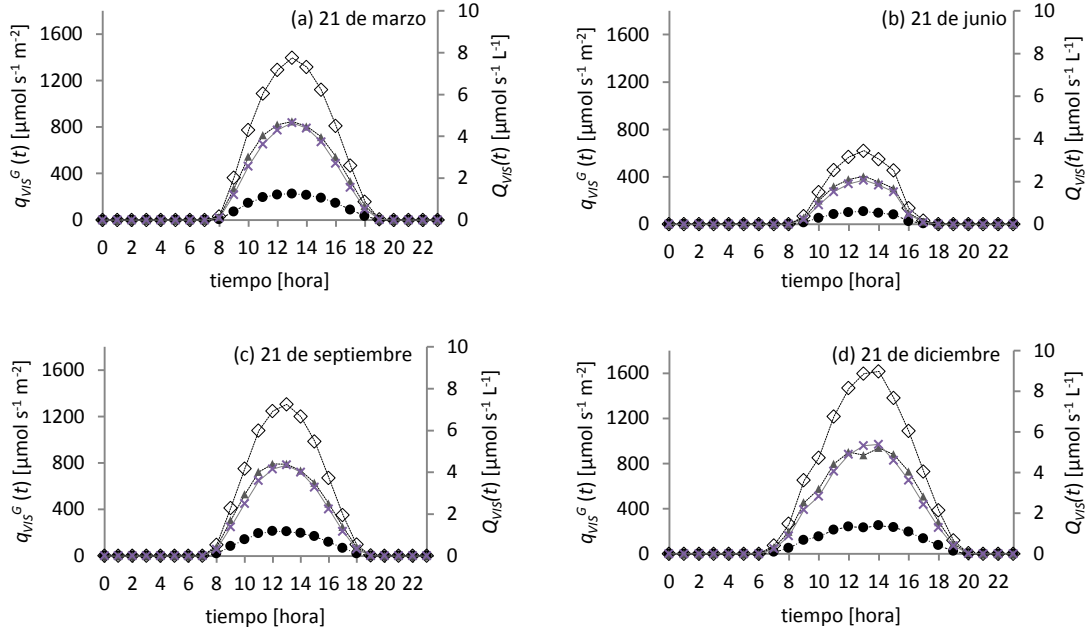


Figura 13: Densidad de flujo de fotones $q_{VIS}(t)$ sobre una superficie horizontal (\diamond); flujo promedio de fotones $\bar{q}_{VIS}(t)$ sobre la superficie del FBR tipo columna del ejemplo (\bullet) y flujo de fotones por unidad de volumen de cultivo $\tilde{\Sigma}_{VIS}(t)$, para las alternativas de reactores: piletones abiertos de 30cm de profundidad (\blacktriangle) y FBR tipo columnas/tubular (\times); para los días **(a)** 21 de marzo, **(b)** 21 de junio, **(c)** 21 de septiembre y **(d)** 21 de diciembre.

En función de la concentración de biomasa y la iluminación del reactor, para un instante t y una posición \underline{r} cualquiera en el FBR, en donde la velocidad de absorción de fotones es $r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)$ y la concentración de biomasa es $x(t)$, la velocidad de crecimiento es:

$$r_x(r_{VIS}^{abs}, x) = K_3 \left(\sqrt{I + K_2 \frac{r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)}{x(t)}} - I \right) \quad (45)$$

Luego, la velocidad de crecimiento promedio en el reactor para ese instante t es:

$$\bar{r}_x(x, t) = \int_0^{\infty} K_3 \left(\sqrt{I + K_2 \frac{r_{VIS}^{abs}(\underline{r}, t)}{x(t)}} - I \right) g'(r_{VIS}^{abs}) dr_{VIS}^{abs} \quad (46)$$

donde $g'(r_{VIS}^{abs})$ es la función normalizada de distribución de volúmenes de reactor en términos de velocidades volumétricas de absorción de fotones r_{VIS}^{abs} (ver Capítulo 2). Esta función $g'(r_{VIS}^{abs})$ depende además de las propiedades ópticas del medio de cultivo, de la geometría del FBR, y del tiempo t , en función la variación de la iluminación del FBR, la cual depende de la hora y el día del año.

Para un día d , la velocidad de crecimiento media diaria $\bar{r}_{x,diaria}$ es:

$$\bar{r}_x(x, d) = \frac{\int_0^{24} \int_0^{\infty} K_3 \left(\sqrt{I + K_2 \frac{r_{VIS}^{abs}(t, \underline{r})}{x(t)}} - I \right) g'(r_{VIS}^{abs}) dr_{VIS}^{abs} dt}{\int_0^{24} \int_0^{\infty} g'(r_{VIS}^{abs}) dr_{VIS}^{abs} dt} = \frac{I}{24} \int_0^{24} \int_0^{\infty} K_3 \left(\sqrt{I + K_2 \frac{r_{VIS}^{abs}(t, \underline{r})}{x(t)}} - I \right) g'(r_{VIS}^{abs}) dr_{VIS}^{abs} dt \quad (47)$$

Para estimar la capacidad diaria de producción se considera que el reactor es operado en forma continua, manteniendo la concentración de Biomasa constante, con un valor igual 1 gr L^{-1} . Al igual que la geometría del reactor, y por las mismas razones, esta variable fue elegida arbitrariamente. En la Figura 13(a) puede verse la velocidad de crecimiento media $\bar{r}_x(x, t)$ en el reactor, para las diferentes horas en diferentes días del año. Como puede verse, en horas próximas al medio día las velocidades estimadas son mayores, debido a la mayor disponibilidad de luz solar, esta diferencia se ve acentuada en días de verano. En la Figura 13(b) se puede ver el valor de la productividad [$\text{ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$] para los diferentes días del año de estos sistemas de cultivo junto con la producción total estimada en cada uno de los piletones disponibles en las instalaciones del PTLC. Como puede verse, en verano las producciones estimadas son mayores, debido a la mayor disponibilidad de luz solar y a existencia de jornadas más largas. Asimismo, puede verse que aún en invierno los valores estimados para la productividad ($\approx 20 \text{ ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$), calculados a través del escalado sistemático a partir de valores obtenidos a escala laboratorio son muy superiores a los reportados para cultivos tradicionales de mayor presencia como soja, colza o palma.

Por último, y a partir de los resultados estimados, la productividad anual del sistema de cultivo en FBRs tipo columna-tubular alcanzaría el valor medio de $40 \text{ ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, con lo cual, considerando el

contenido celular de lípidos ($\approx 15\%$) alcanzado en experiencias llevadas a cabo en propio laboratorio y utilizando cepas de microalgas nativas, aisladas localmente, la productividad anual de aceite conseguida sería superior a las $6,0 \text{ ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, un valor 10 veces superior al producido a partir de cultivos de soja, la principal materia prima actual de la industria del biodiesel.

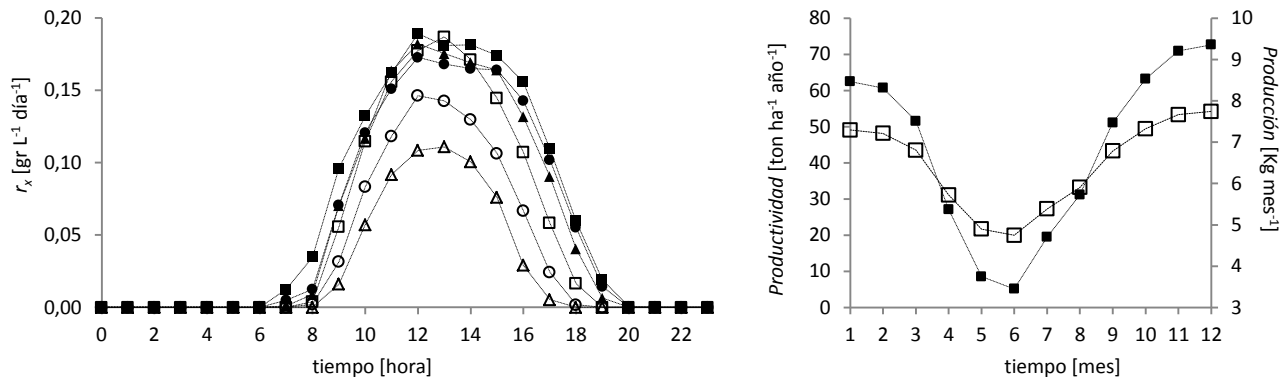


Figura 13: (a) velocidad de crecimiento promedio estimada $\bar{r}_x(x,t)$ en el reactor en función de la hora, para los días 21 de enero (■); 21 de febrero (●); 21 de marzo (▲); 21 de abril (□); 21 de mayo (○); 21 de junio (△). (b) Productividad anual estimada (□) y producción estimada en cada piletón (■) en función de la fecha.

4.- CONCLUSIONES.

En este trabajo se caracterizó la fuente de radiación solar considerando (i) la posición del sol en función del día, la hora y la posición geográfica sobre la tierra; (ii) el flujo de energía incidente; (iii) su distribución espectral; y, (iv) la distinción entre las fracciones radiación directa y radiación difusas. Se diseñó un sistema de cultivo fotoautotrófico de microalgas que es una combinación de las alternativas de FBR cerrados tipo columna y tubular que permite una distribución efectiva del flujo de energía radiante sobre la superficie iluminada evitando los fenómenos de estrés oxidativo y estratificación de la luz en el cultivo. Se estimaron la velocidad de crecimiento promedio en el reactor, en función de la hora y la fecha; y la velocidad de crecimiento media diaria, en función de la fecha; permitiendo así estimar la productividad del sistema y la producción teórica lograda. A partir de los resultados conseguidos es posible considerar que este sistema sería una opción válida para la producción de microalgas, aunque es necesario aún incluir en el modelo de crecimiento el efecto de fotoperíodos y realizar una optimización global del sistema incluyendo los fenómenos de mezclado y transferencia de materia líquido-gas.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados alcanzados en el presente trabajo es posible llegar a las siguientes conclusiones.

- Dependiendo del producto final deseado, la estrategia de producción a adoptar deberá ser diferente. Si el producto buscado ha de utilizarse como fuente de proteínas, entonces la producción deberá realizarse en condiciones repletas de nitrógeno. Si se está produciendo biomasa rica en TAG, el cultivo deberá atravesar una fase de estrés por ausencia de nitrógeno en el medio. Si se busca producir almidón, la cosecha de las microalgas deberá realizarse durante las últimas horas del día.
- Las productividades más altas de biomasa, almidón y TAG se logran a través de cultivos expuestos a altas intensidades de radiación; sin embargo, la eficiencia en el uso y conversión de la energía solar a biomasa se ve reducida.
- La composición de los TAG cambia durante los días que dura el estrés. Los TAG se enriquecen en la fracción de ácidos grasos C18:1. Aparecen los AG C18:0 pero su fracción es siempre baja. Los AG C16:3 y C18:3, que son mayoritarios en condiciones de cultivo repletas de N, se reducen considerablemente. La fracción de los AG C18:2 queda casi constante. La concentración de LP en la biomasa decrece durante el estrés por falta de N.
- Se obtuvieron una expresión cinética y los parámetros incluidas en la misma. Esta herramienta es necesaria para llevar adelante en forma sistemática el diseño, escalado y optimización de los fotobiorreactores destinados a la propagación de microalgas en forma autotrófica.
- Se caracterizó la radiación solar considerando (i) la posición del sol en función del día, la hora y la posición geográfica sobre la tierra; (ii) el flujo de energía incidente; (iii) su distribución espectral; y, (iv) la distinción entre las fracciones radiación directa y radiación difusas.

- Se diseñó un sistema de cultivo fotoautotrófico de microalgas que es una combinación de las alternativas de FBR cerrados tipo columna y tubular, que permite una distribución efectiva del flujo de energía radiante sobre la superficie iluminada, evitando los fenómenos de estrés oxidativo y estratificación de la luz en el cultivo.
- Se estimaron la velocidad de crecimiento promedio en el fotobioreactor, en función de la hora y la fecha; y la velocidad de crecimiento media diaria en función de la fecha; permitiendo así estimar la productividad del sistema y la producción teórica lograda.
- A partir de los resultados conseguidos es posible suponer que este sistema sería una opción válida para la producción de microalgas y metabolitos derivados; lográndose una productividad anual que alcanzaría el valor de $40 \text{ ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

- Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P. (2008) Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplast. En: Molecular Biology of the cell. (Eds.: Marjorie Anderson y Sherry Granum). Taylor & Francis Group. New York, USA. p: 813-878.
- Alzate, M.E.; Muñoz, R.; Rogalla, F.; Fdz-Polanco, F.; Pérez-Elvira, S.I. (2012) Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresource Technology*. 123: 488-494
- Arad, S. M.; Yaron, A.. (1992) Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology*. 3: 92-97
- Balasubramanian, L.; Subramanian, G.; Nazeer, T.T.; Simpson, H.S.; Rahuman, S.T.; Raju, P. (2011). Cyanobacteria cultivation in industrial wastewaters and biodiesel production from their biomass: A review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 58(4): 220-225
- Bartlett, S.G.; Mitra, M.; Moroney, J. V. (2006) CO₂ Concentrating Mechanisms. En: Advances in Photosynthesis and Respiration. Vol. 23 The Structure and Function of Plastids. (Eds.: Wise, R.R.y Hooper, J. K.). Springer. Illinois, U.S.A. p: 253–271.
- Behrens P.W. (2005) Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae En *Algal Culturing Techniques*. (Ed.: Andersen R. A). Elsevier Academic Press. San Diego, USA. p: 189-204.
- Benemann J.R. (2000). Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology* 12: 291–300.

- Borowitzka M. A.. (1992) Algal biotechnology products and processes—matching science and economics, *J. Appl. Phycol.* 4: 267–279
- Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* 70, 313–321.
- Cerón García M. C., Sánchez Mirón A., Fernández Sevilla J. M., Molina Grima E., García Camacho F.. (2005) Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*: Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry.* 40(1): 297-305.
- Chae, S.R., Hwang, E.J., Shin, H.S. (2006). Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photobioreactor. *Bioresource Technol.* 97: 322–329.
- Chetsumon, A., Maeda, I., Umeda, F., Yagi, K., Miura, Y., Mizoguchi, T. (1994). Antibiotic production by the immobilized cyanobacterium, *Scytonema* sp. TISTR 8208, in a seaweed-type photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 6: 539–543.
- Chetsumon, A., Umeda, F., Maeda, I., Yagi, K., Mizoguchi, T., Miura, Y. (1998). Broad spectrum and mode of action of an antibiotic produced by *Scytonema* sp. TISTR 8208 in a seaweed-type bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–72: 249–256.
- Chisti, Y. (2007) Research review paper Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294–306
- Dallaire, V., Lessard, P., Vandenberg, G., de la Noüe, J. (2007). Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technol.* 98: 1433–1439.
- Ehimen, E.A. ; Sun, Z.F. ; Carrington, C.G.; Birch, E.J.; Eaton-Rye, J.J. (2011) Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy.* 88(10): 3454-3463
- Giordano, M.; Beardall, J.; Raven, J.A. (2005) CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:99–131

- Goldstein, Evelin; Gutman, Graciela E. (2010). Biocombustibles y Biotecnología. Contexto internacional, situación en la Argentina. Documento de Trabajo. CEUR - CONICET. Septiembre/2010
- Grönlund, E.; Klang, A.; Falk, S.; Hanæus, J. (2004) Sustainability of wastewater treatment with microalgae in cold climate, evaluated with energy and socio-ecological principles. *Ecological Engineering* 22:155–174
- Halim, R.; Danquah, M. K.; Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30: 709–732
- Hammouda O., Gaber A. and Abdelraouf N. (1995) Microalgae and Wastewater Treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 31(3):205-210
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. (1996). Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter airlift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 113–118.
- Heldt H.W. (2005a) Photosynthesis is an electron transport process. En: *Plant Biochemistry*. (Eds.: Hans-Walter Heldt in cooperation with Fiona Heldt) Elsevier. San Diego, USA. p: 67-114
- Heldt H.W. (2005b) The use of energy from sunlight by photosynthesis is the basis of life on earth. En: *Plant Biochemistry*. (Eds.: Hans-Walter Heldt in cooperation with Fiona Heldt) Elsevier. San Diego, USA. p: 45-66
- Heldt H.W. (2005c) The Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO₂ assimilation. En: *Plant Biochemistry*. (Eds.: Hans-Walter Heldt in cooperation with Fiona Heldt) Elsevier. San Diego, USA. p: 165-194
- Irazoqui, H.; Isla, M. (1996a) ¿Por qué una oleoquímica de base agrícola?. *Aceites y Grasas*. 23:156-166.
- Irazoqui, H.; Isla, M. (1996b) La oleoquímica. Usos alternativos de los aceites vegetales. Productos y aplicaciones de mayor valor comercial a partir de los ésteres y de la glicerina. *Aceites y Grasas*. 23: 171-188
- Lam, M.K. , Lee, K.T. (2013) . Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO₂ bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 14: 169-176.

- Lee R. E.. (2008) Basic characteristics of the algae. En: *Phycology*. (Ed.: Lee R. E.) Cambridge University Press. New York, USA. p: 1-27
- Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TIBTECH* 18: 160–167.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (2003). *Microorganismos y Microbiología*. En: Brock, *Bilología de los microorganismos*. (Eds.: Michael T. Madigan, John N. Martinko, Jack Parker) Pearson, Prentice Hall. Madrid, Spain. p: 1-20.
- Mata, T. M.; Martins, A.A.; Caetano, N. S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232.
- Molina Grima E., Acién Fernández F. G., García Camacho F., Chisti Yusuf. (1999) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, Volume 70(1-3):231-247
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12: 527–534.
- Nelson D. L. y Cox M. M. (2004a) *The Foundations of Biochemistry*. En: *Lehninger Principles of Biochemistry*. (Eds.: Katherine Ahir) W.H. Freeman and Company. New York. USA. p: 1-44.
- Nelson D. L. y Cox M. M. (2004b) *Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation*. En: *Lehninger Principles of Biochemistry*. (Eds.: Katherine Ahir) W.H. Freeman and Company. New York. USA. p: 690-750.
- Nelson J. (2003). *Electrons and Holes in Semiconductors*. En: *The physics of solar cells*. (Eds.: Nelson J.) Imperial College Press. London, UK. p: 41-78.
- Ogbonna J.C., Tanaka H. (2000) Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*. 12: 207-218
- Olaizola M.. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. 20: 459-466
- Olivieri, G.; Gargano, I.; Andreozzi, R.; Marotta, R.; Marzocchella, A.; Pinto, G.; Pollio, A.. (2013) Effects of photobioreactors design and operating conditions on *Stichococcus bacillaris* biomass and biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*. 74: 8-14

- Oswald, W.J. (1973). Productivity of algae in sewage disposal. *Solar Energy*. 15(1):107–117
- Oswald, W.J., Golueke, C.G. (1960). Biological transformation of solar energy. *Adv. Appl. Microbiol.* 2: 223–262.
- Prasanna Mohanty, Madhulika Srivastava y Kolli Bala Krishna. (2002). The Photosynthetic Apparatus of *Spirulina*: Electron Transport and Energy Transfer. En: *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. (Ed: Avigad Vonshak). Taylor & Francis. London, UK. p: 17-42.
- Qingfang He, (2004) Microalgae as Platforms for Recombinant Proteins. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (Ed.: Richmond, A.) Blackwell Publishing company. Oxfors, UK. p: 471-484.
- Richmond, A. (2004) Biological Principles of Mass Cultivation. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (Ed.: Richmond, A.) Blackwell Publishing company. Oxfors, UK. p: 125-177.
- Scragg, A. H.; Illman, A. M. ; Carden, A.; Shales, S. W. (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23(1): 67-73
- Sierra E., Ación F.G., Fernández J.M., García J.L., González C. and Molina E. (2007) Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*. 138(1-3): 136-147.
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. (2005) Commercial applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101(2): 87-96.
- Tredici M.R. (2004) Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (Ed.: Richmond, A.) Blackwell Publishing company. Oxfors, UK. p: 178-214.
- Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, En: *Handbook of microalgal mass cultura* (Ed.: A. Richmond). CRC Press, Florida, USA. p: 117–145.
- Wolfgang B. (2004) Microalgae in Human and Animal Nutrition En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (Ed.: Richmond, A.) Blackwell Publishing company. Oxfors, UK. p: 312-351.

Zeiler, K. G.; Heacox, D. A.; Toon, S. T.; Kadam, K. L.; Brown, L.M. (1995) The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. *Energy Conversion and Management*. 36(6-9): 707-712

CAPÍTULO 1

Arredondo-Vega, B. O., Band, C. J., & Vazquez-Duhalt, R. (1995). *Cytobios*, 83, 201–205

Band, C. J., Arredondo-Vega, B. O., Vazquez-Duhalt, R., & Greppin, H. (1992). *Plant, Cell & Environment*, 15, 129–133.

Benvenuti Giulia & Rouke Bosma & María Cuaresma & Marcel Janssen & Maria J. Barbosa & René H. Wijffels. Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation *J Appl Phycol* (2015) 27:1425–1431 DOI 10.1007/s10811-014-0470-8

Bligh E.G., W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.

Breuer, G. et al 2012, Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., & Legrand, J. (2009). *Bioresource Technology*, 100, 5988–5995.

Breuer, G., Evers, W.A.C., de Vree, J.H., Kleinegris, D.M.M., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Lamer, P.P. (2013), Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *J.Vis. Exp.*, e50628, doi:10.3791/50628

Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H. (2012), The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology* , ISSN 0960-8524 – p. 217 – 226

Cosgrove J, Borowitzka MA (2010) Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In: Suggett DJ, Prásil O, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Springer, Dordrecht, pp 1–17

De Vree, J.H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H. 2015. Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for Biofuels* 8 (1): 215

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28(3):350–356
- Garibay-Hernández Adriana & Rafael Vazquez-Duhalt & Leobardo Serrano-Carreón & Alfredo Martínez Nitrogen Limitation in *Neochloris oleoabundans*: A Reassessment of Its Effect on Cell Growth and Biochemical Composition *Appl Biochem Biotechnol* (2013) 171:1775–1791
- Giovanardi, M., Ferroni, L., Baldisserotto, C., Tedeschi, P., Maietti, A., Pantaleoni, L. and Pancaldi, S. (2013) *Protoplasma*, 161–174.
- Gouveia, L., Marques, A., da Silva, T., & Reis, A. (2009). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 821–826.
- Herbert D, Phipps PJ, Strange RE (1971) Chemical analysis of microbial cells. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) *Methods in Microbiology*. Academic, London, pp 209–344
- Kliphuis A.M.J., L. deWinter, C. Vejrazka, D.E. Martens, M. Janssen, R.H. Wijffels, Photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* in a turbulently mixed short light-path photobioreactor, *Biotechnol. Prog.* 26 (2010) 687–696.
- Klok Anne J., Johannes A. Verbaander a, Packo P. Lamers a, Dirk E. Martens a, Arjen Rinzema a, René H. Wijffels A model for customising biomass composition in continuous microalgae production. *Bioresource Technology* 146 (2013) 89–100
- Lamers P.P., C.C.W. van de Laak, P.S. Kaasenbrood, J. Lorier, M. Janssen, R.C.H. De Vos, et al., Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*, *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 638–648.
- Levine, R. B., Costanza-Robinson, M. S., & Spatafora, G. A. (2011). *Biomass and Bioenergy*, 35, 40–49.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. (2008). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 629–636.
- Popovich, C. A., Damiani, C., Constenla, D., Martínez, A. M., Freije, H., Giovanardi, M., et al. (2012). *Bioresource Technology*, 114, 287–293.

- Santos A.M., M. Janssen, P.P. Lamers, W.A.C. Evers, R.H. Wijffels, Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline–saline conditions, *Bioresour. Technol.* 104 (2012) 593–599.
- Wang, B., & Lan, C. Q. (2011). *Bioresource Technology*, 102, 5639–5644.
- Wu, N., Li, Y., & Lan, C. (2011). *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 935–942.
- Yang, Y., Xu, J., Vail, D., & Weathers, P. (2011). *Bioresource Technology*, 102, 5076–5082.
- Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.-C., Matagne, R., 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66, 1–9.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639.
- Huppe, H.C., Turpin, D.H., 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 577–607
- Li, Y., Han, D., Yoon, K., Zhu, S., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. Molecular and cellular mechanisms for lipid synthesis and accumulation in microalgae: biotechnological implications. In: Richmond, A., Hu, Q. (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, second ed. Wiley- Blackwell, Chichester, pp. 545–565.
- Rismani-Yazdi Hamid, Berat Z Haznedaroglu, Carol Hsin and Jordan Peccia . Transcriptomic analysis of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* reveals metabolic insights into triacylglyceride accumulation. *Biotechnology for Biofuels* 2012, 5:74

CAPÍTULO 2

- Lee, E.; Pruvost, J.; He, X.; Munipalli, R.; Pilon, L. (2014) Design tool and guidelines for outdoor photobioreactors. *Chemical Engineering Science* 106: 18–29
- Olivieri, G.; Salatino, P.; Marzocchella, A. (2014). Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: Configurations, operating strategies and applications *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 89:2: 178-195

- Lee, E.; Pruvost, J.; He, X.; Munipalli, R.; Pilon, L.(2014). Design tool and guidelines for outdoor photobioreactors. *Chemical Engineering Science* 106: 18–29
- Atlas, R. M. (2005). *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. Second Ed. Taylor & Francis. Boca Ratón, USA.
- 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
- Wijffels, R.H.; Barbosa, M.J.(2010) . An outlook on microalgal biofuels. *Science*. 329(5993): 796–799.
- Eaton, A. D.; Clesceri, L. S. ; Rice, E. W.; Greenberg, A. E. (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Part 10000: Biological Examination (Eds.: Eaton, A. D., L. S. Clesceri, E. W. Rice and A. E. Greenberg.). American Public Health Association, Washington, USA. p:10–26 - 10–27
- Ritchie, R. J. (2008) Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115–126.
- Heldt, H. W. (2004a) The use of energy from sunlight by photosynthesis is the basis of life on earth. In *Plant Biochemistry* (Ed.: H. W. Heldt). Elsevier, San Diego, USA. p: 45-66.
- Heldt, H. W. (2004b) Photosynthesis is an electron transport process. In *Plant Biochemistry* (Ed.: H. W. Heldt). Elsevier, San Diego, USA. p: 67-114.
- Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2012 a). Analysis and design of photobioreactors for microalgae production I: Method and parameters for radiation field simulation. *Photochemistry and Photobiology* 88 (4) : 938-951
- Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2012 b) Analysis and design of photobioreactors for microalgae production II: Experimental Validation of a radiation field simulator based on a Monte Carlo algorithm. *Photochemistry and Photobiology* 88 (4): 952-960
- Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2013) Stratification of the Radiation Field Inside a Photobioreactor During Microalgae Growth. *Photochemistry and Photobiology*. 89(5): 1127-1134

Niizawa, I.; Heinrich, J.M.; Irazoqui, H.A.. (2014) Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs. *Biochemical Engineering Journal* 90: 214-223

CAPÍTULO 3.

Albizzati, E.D.; Rossetti, G.H.; Alfano O.M. (1997). Measurements and predictions of solar radiation incident on horizontal surfaces at Santa Fe, Argentina (31 ° 39'S, 60 ° 43'W). *Renewable Energy*. 11(4): 469-478.

Balasubramanian, L.; Subramanian, G.; Nazeer, T.T.; Simpson, H.S.; Rahuman, S.T.; Raju, P. (2011). Cyanobacteria cultivation in industrial wastewaters and biodiesel production from their biomass: A review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 58(4): 220-225

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294–306

Halim, R.; Danquah, M. K.; Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30: 709–732

Heinrich, J.M., Irazoqui, H.A. (2015) Kinetic Model of Photoautotrophic Growth of *Chlorella* sp. Microalga, Isolated from the Setúbal Lagoon. *Photochemistry and Photobiology*. 91(5): 1095-1102

Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2012 a). Analysis and design of photobioreactors for microalgae production I: Method and parameters for radiation field simulation. *Photochemistry and Photobiology* 88 (4) : 938-951

Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2012 b) Analysis and design of photobioreactors for microalgae production II: Experimental Validation of a radiation field simulator based on a Monte Carlo algorithm. *Photochemistry and Photobiology* 88 (4): 952-960

Heinrich, J.M.; Niizawa, I.; Botta, F.A.; Trombert, A.R.; Irazoqui, H.A. (2013) Stratification of the Radiation Field Inside a Photobioreactor During Microalgae Growth. *Photochemistry and Photobiology*. 89(5): 1127-1134

Mata, T. M.; Martins, A.A.; Caetano, N. S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232.

- Niizawa, I.; Heinrich, J.M.; Irazoqui, H.A.. (2014) Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs. *Biochemical Engineering Journal* 90: 214-223
- Olaizola M.. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. 20: 459-466
- Olivieri, G.; Gargano, I.; Andreozzi, R.; Marotta, R.; Marzocchella, A.; Pinto, G.; Pollio, A.. (2013) Effects of photobioreactors design and operating conditions on *Stichococcus bacillaris* biomass and biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*. 74: 8-14
- Pilon L.; Berberoglu H.; Kandilian R. (2011) Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 112(17):2639-2660.
- Wijffels R. H; Kruse O.; Hellingwerf, K. J. (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*. 24:405–413
- Tredici M.R. (2004) Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. (Ed.: Richmond, A.) Blackwell Publishing company. Oxfors, UK. p: 178-214.
- Khavrus, V.; Shelevytsky, I. (2012). Geometry and the physics of seasons. *Physics Education*.47(6): 680- 687
- Khavrus, V.; Shelevytsky, I. (2010). Introduction to solar motion geometry on the basis of a simple model. 45(6): 10- 19

ANEXOS

CAPÍTULO 2: Esquema de las subrutinas empleadas en la simulación del CER en el FBR.

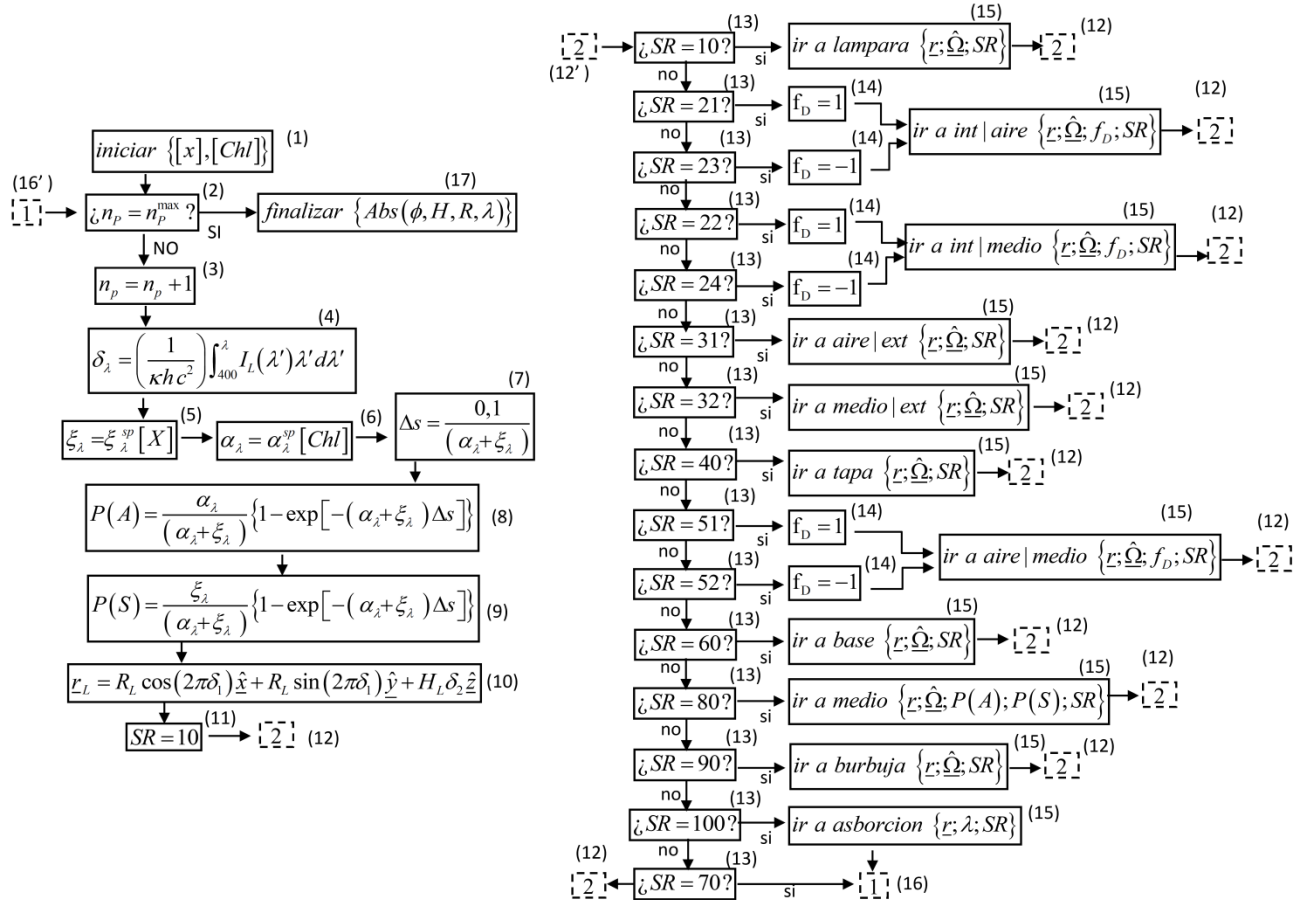


Figura 1: Programa principal de simulación del camino de los fotones dentro del reactor para el cultivo de microalgas (1) El programa se inicia fijando los valores de la concentración de biomasa $[x]$ y clorofila $[Chl]$. (2) Se cheque si ya fueron emitidos un número n_p de fotones igual al número n_p^{max} de fotones a emitir. (3) Si no se alcanzó el valor de n_p^{max} se suma una unidad al contador n_p . (4) Se escoge una longitud de onda para el fotón a través de la función de distribución de emisión de energía radiante $I(\lambda)$ en el espectro electromagnético. (5) Se calcula el coeficiente de dispersión, de acuerdo al coeficiente específico de dispersión ξ_λ^{sp} y la concentración de biomasa $[x]$. (6) Se calcula el coeficiente de absorción α_λ^{sp} , de acuerdo al coeficiente específico de absorción y la concentración de clorofila $[Chl]$. (7) Se calcula la longitud Δs de cada paso un decimo del camino libre medio. (8) Se calcula la probabilidad $P(A)$ de absorción. (9) Se calcula la probabilidad $P(S)$ de dispersión. (10) Se determina una posición inicial r_L al azar sobre la superficie de la lámpara para comenzar la simulación del camino del fotón a través de la generación de dos números aleatorios δ_1 y δ_2 . (11) Se determina la posición SR del fotón para continuar la simulación desde la subrutina correspondiente. (12) El algoritmo de cálculo continua desde la posición 12'. (13) Se chequea la posición SR sobre la cual se encuentra el fotón para continuar la simulación desde la subrutina correspondiente. (14) Se fija el valor de f_D , este factor solo puede tomar los valores 1 y -1 y se utiliza para establecer el sentido en que se produce el encuentro del fotón con alguna de las superficies. (15) El programa principal utiliza la subrutina correspondiente, las cuales se describirán a continuación, para continuar con la simulación del camino recorrido por el fotón en su paso por el reactor (16) Al alcanzar esta posición significa que el fotón fue absorbido, alcanzó una superficie negra opaca o salió del reactor hacia el exterior y el algoritmo continua desde la posición 16'. (17) El programa finaliza arrojando como resultado la velocidad volumétrica local de absorción de fotones, dependiente de la longitud de onda, en coordenadas cilíndricas de acuerdo el ángulo acimutal ϕ , la altura H respecto a la base del reactor y la distancia radial R al eje de la lámpara.

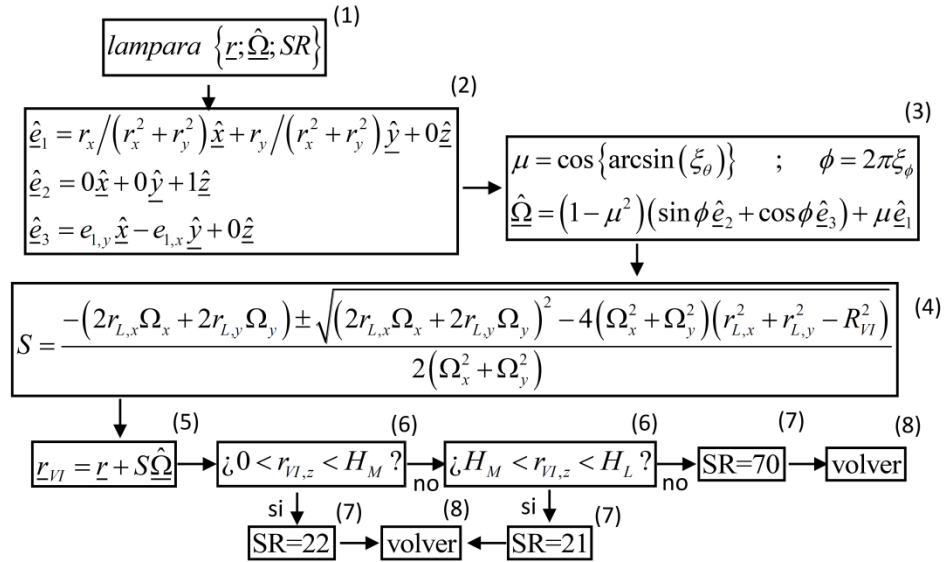


Figura 2: Subrutina para la simulaci3n de los posibles destinos de los fotones desde la l3mpara fluorescente. (1) Se inicia la subrutina *l3mpara*, desde el programa principal el fot3n llega con una posici3n r_L sobre la superficie de la l3mpara y una longitud de onda direcci3n de propagaci3n λ . (2) Se establece un sistema de coordenadas a trav3s de los vectores \hat{e}_1 , \hat{e}_2 y \hat{e}_3 seg3n la posici3n r_L del fot3n para asignarle a este una direcci3n aleatoria $\underline{\hat{\Omega}}$. (3) Mediante la utilizaci3n de n3meros aleatorios δ_μ y δ_ϕ se asigna al fot3n una direcci3n aleatoria $\underline{\hat{\Omega}}$. (4) Se calcula la distancia S que recorre el fot3n desde la posici3n actual r_L hasta la pr3xima posici3n r_{VI} , sobre la superficie del vidrio interno, cuyo radio es R_{VI} . Existen dos soluciones posibles para la ecuaci3n dentro del recuadro 4, el valor correcto es la soluci3n positiva, la soluci3n negativa corresponde al la distancia que recorrer3a en la direcci3n $-\underline{\hat{\Omega}}$. (5) Se contin3a la simulaci3n del camino del fot3n a trav3s del reactor avanzado la distancia S en la direcci3n $\underline{\hat{\Omega}}$ hasta la nueva posici3n sobre el vidrio interno. (6) Se cheque si la altura sobre el eje z en que el fot3n alcanza la posici3n sobre el vidrio interno se encuentra por encima de la tapa del reactor ($r_z > H_L$) o por debajo de la base del mismo ($r_z < 0$) o si se encuentra por encima ($H_M < r_z < H_L$) a por debajo de la altura del medio de cultivo ($0 < r_z < H_M$). (7) Se establece la nueva ubicaci3n SR del fot3n para continuar con la simulaci3n de su camino. (8) La subrutina *l3mpara* retorna al programa principal.

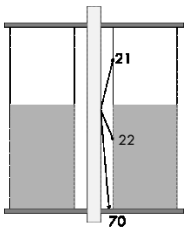


Figura 2': Desde la l3mpara hay tres posibles destinos del fot3n emitido: (21) vidrio interno sobre el nivel de medio de cultivo. (22) Vidrio interno por debajo del nivel de medio de cultivo. (70) los soportes negros opacos superior o inferior para la l3mpara fluorescente.

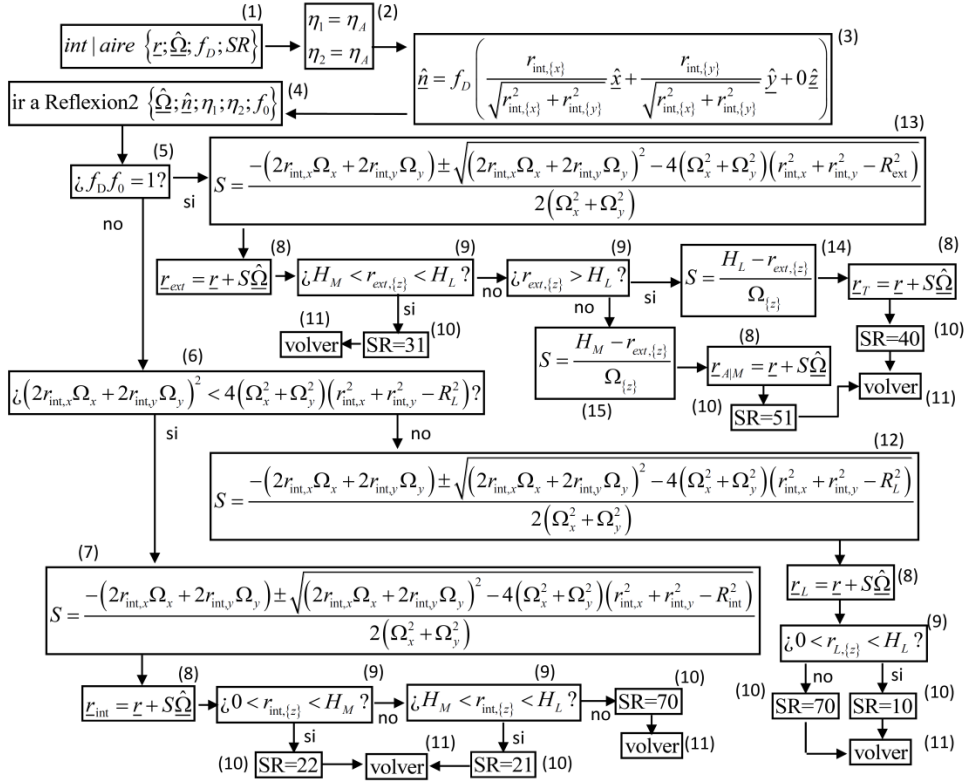


Figura 3: Subrutina para la simulación de los posible destinos de los fotones luego de alcanzar el vidrio interno, a una altura ubicada sobre el nivel de medio de cultivo. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se fijan los valores de los índices de refracción η_i de los medios ubicado en ambos lados del vidrio, en este es caso $\eta_1 = \eta_1 = \eta_{aire}$. (3) Se determina el determina el vector \underline{n} normal a la superficie del vidrio en el lugar de impacto del fotón considerando el factor f_D que fija el sentido del vector \underline{n} (hacia el interior o exterior del vidrio interno). (4) Se llama a la subrutina *Reflexion2* para determinar si el fotón será reflejado o no sobre la superficie del vidrio. (5) A partir del producto $f_0 f_D$, se determinar si en qué sentido continua el fotón (hacia el interior o exterior del vidrio interno). (6) Si el producto $f_0 f_D$ es negativo, la dirección del fotón ubicado sobre la superficie del vidrio interno es hacia el interior del mismo y, por ello, se chequea si en su recorrido el fotón impactará sobre la superficie de la lámpara. (7) En caso de pasar a través de la lámpara, se calcula la distancia S que el fotón avanza hasta impactar sobre la superficie de la lámpara. La ecuación en el recuadro 7 tiene dos soluciones, la menor es la correcta. (8) Se mueve el fotón una distancia S en la dirección $\underline{\Omega}$ desde la posición actual hasta la nueva posición. (9) Se compara la altura sobre el eje z en que el fotón alcanza la nueva posición con la altura de la tapa del reactor ($z = H_L$), la altura de la superficie del medio de cultivo ($z = H_M$) o la base del reactor ($z = 0$) según corresponda. (10) Se determina cuál es la nueva ubicación SR del fotón para continuar con la simulación de su camino a través del reactor. (11) La subrutina retorna al programa principal para continuar con la simulación del recorrido del fotón. (12) En este caso, el fotón tienen una dirección con sentido hacia el interior del vidrio interno que en su recorrido no pasa a través de la lámpara y se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie del vidrio interno. En el recuadro 12 hay dos posibles soluciones para S , la solución diferente de cero es la correcta. (13) Si el producto $f_0 f_D$ es positivo, el fotón tienen una dirección con sentido hacia el exterior del vidrio interno y se calcula la distancia S que el fotón avanza hasta impactar sobre la superficie del vidrio externo. Hay dos soluciones para S , la correcta es la que posee valor positivo. (14) En este caso el fotón impactara sobre la superficie de la tapa del reactor antes de alcanzar al vidrio externo y por ello se calcula la distancia S que el fotón avanza hasta impactar sobre la tapa del reactor. (15) En este caso el fotón impactará sobre la interfase aire-medio de cultivo antes de alcanzar al vidrio externo y por ello se calcula la distancia S que el fotón recorre hasta impactar sobre la superficie del medio de cultivo.

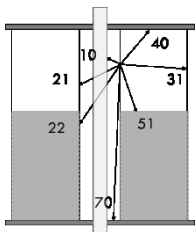


Figura 8: Posibles destinos del fotón luego de llegar al vidrio interno. En caso de que el producto $f_D f_0$ sea negativo, los posibles destinos son: (21) sobre vidrio interno por encima del nivel de medio de cultivo; (22) sobre el vidrio interno por debajo del nivel de medio de cultivo; (10) sobre la superficie de la lámpara fluorescente o (70) sobre una de los soportes negros opacos superior o inferior de la lámpara. Si el producto $f_D f_0$ es positivo, los posibles destinos son (40) la tapa del reactor, (51) la interface aire-medio de cultivo o (31) el vidrio externo del reactor.

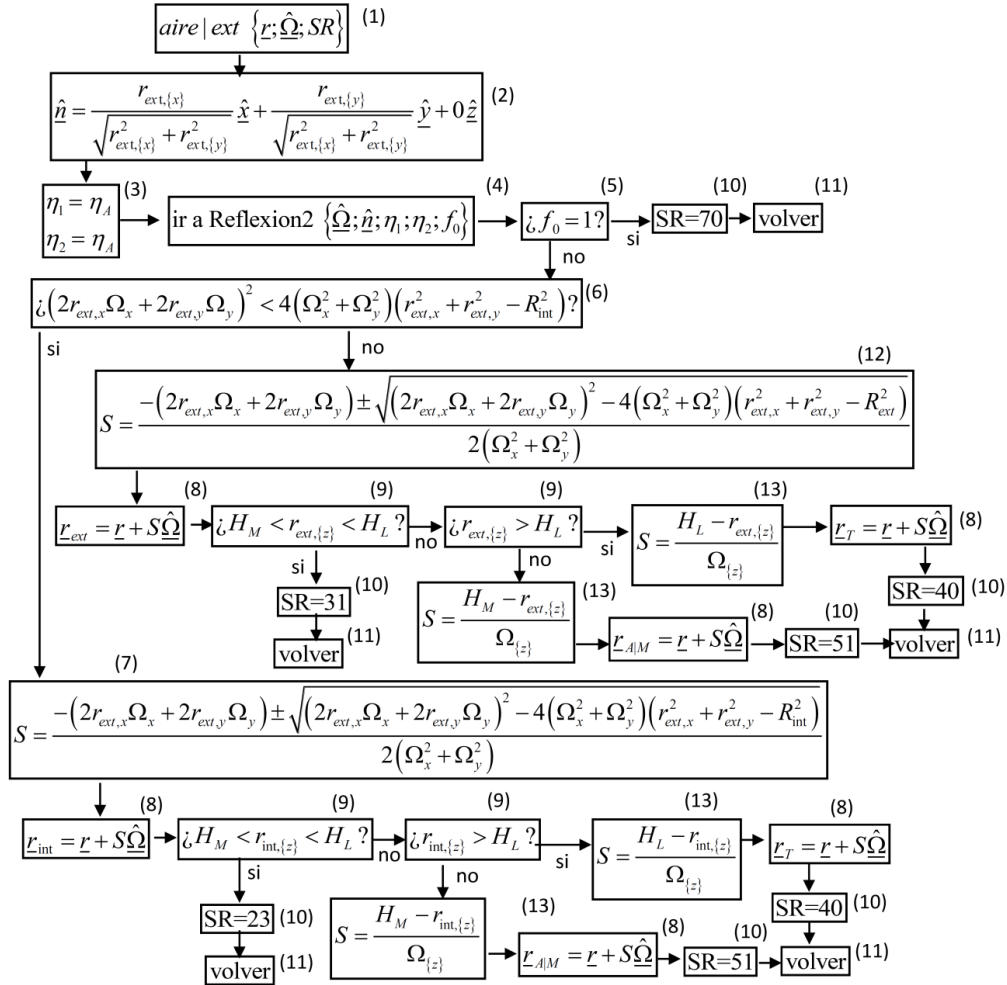


Figura 10: Subrutina para la simulación de los posibles destinos de los fotones luego de alcanzar la superficie del vidrio externo a una altura ubicada por encima del nivel de medio de cultivo. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se calcula en vector \hat{n} normal a la superficie del vidrio externo con el mismo sentido que posee el fotón. (3) Se fijan los valores de los índices de refracción η_i de los medios ubicado en ambos lados del vidrio, en este es caso $\eta_i = \eta_i = \eta_{aire}$. (4) Se llama a la subrutina *Reflexión2* para determinar si el fotón será reflejado sobre la superficie del vidrio o no. (5) Se verifica el valor de f_0 para determinar si el fotón fue reflejado o no sobre el vidrio externo. (6) Si el factor f_0 es negativo, la dirección del fotón es hacia el interior del vidrio externo y se verifica si en su camino el fotón pasa por la superficie del vidrio interno. (7) Si en su recorrido el fotón pasa por el vidrio interno, se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie del vidrio interno. En el recuadro 7, hay dos posibles soluciones para S , la solución correcta es la menor. (8) Se calcula la nueva posición \underline{r} del fotón avanzando una distancia S en la dirección $\underline{\Omega}$ hacia la nueva posición del fotón. (9) Se verifica la altura en el eje z de la nueva posición \underline{r} y se compara con la altura de a base del reactor ($z = 0$), la altura del medio de cultivo ($z = H_M$) y la altura de la tapa del reactor ($z = H_L$). (10) Se determina la nueva ubicación SR del fotón para seleccionar la subrutina correspondiente. (11) La subrutina retorna al programa principal. (12) Si en su recorrido el fotón no pasa por el vidrio interno, se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie del vidrio externo. En el recuadro 12, hay dos posibles soluciones para S , la solución correcta es aquella diferente de cero. (13) En este caso el fotón impactará sobre la interfase aire-medio de cultivo o sobre la tapa del reactor antes de alcanzar al vidrio externo o interno y por ello se calcula la distancia S que el fotón recorre hasta impactar sobre la superficie del medio de cultivo.

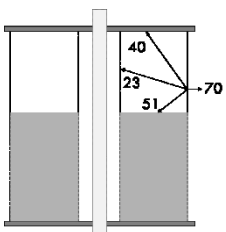


Figura 10': Posibles destinos del fotón luego de llegar al vidrio externo en una posición por encima de la altura del medio de cultivo. Para valores negativos del factor f_0 los posibles destinos son: (23) el vidrio interno sobre el nivel de medio de cultivo, (40) la tapa del reactor o (51) la interface Aire-medio de cultivo. Si f_0 es positivo, el fotón (70) sale al exterior del reactor y se pierde.

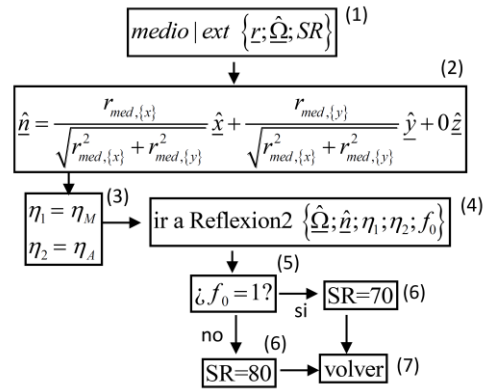


Figura 11: Subrutina para la simulación de los posible destinos de los fotones luego de alcanzar la superficie del vidrio interno desde el medio de cultivo. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se calcula en vector \underline{n} normal a la superficie del vidrio externo con el mismo sentido que posee el fotón.. (3) Se fijan los valores de los índices de refracción η_i de los medios ubicado en ambos lados del vidrio, en este es caso $\eta_1 = \eta_{agua}$ y $\eta_2 = \eta_{aire}$. (4) Se llama a la subrutina *Reflexión2* para determinar si el fotón será reflejado sobre la superficie del vidrio o no. (5) Se verifica el valor de f_0 para determinar si el fotón fue reflejado o no sobre el vidrio externo. (6) Se determina la nueva ubicación SR del fotón de acuerdo al valor de factor f_0 para seleccionar la subrutina correspondiente. (7) La subrutina retorna al programa principal.

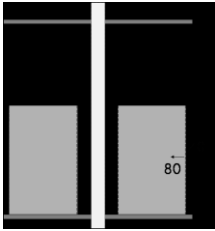


Figura 11': Posibles destinos del fotón luego de llegar al vidrio externo desde el medio de cultivo. Si valor del factor f_0 es negativo el fotón vuelve a (80) el medio de cultivo; si f_0 es positivo el fotón se pierde en (70) el exterior del reactor.

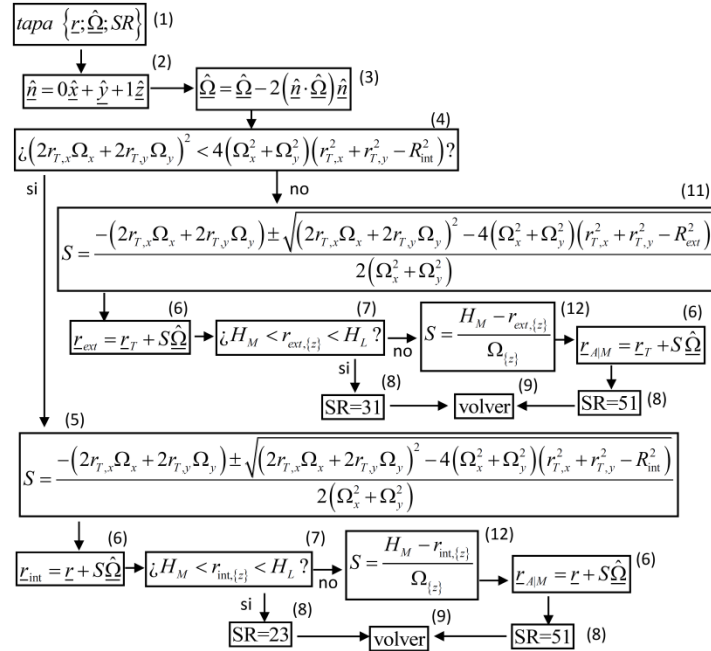


Figura 12: Subrutina para la simulación de los posibles destinos de los fotones luego de alcanzar la tapa del reactor. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se calcula en vector \underline{n} normal a la superficie de la tapa del reactor, con el mismo sentido que el fotón. (3) Se calcula la dirección $\underline{\Omega}$ que tendrá el fotón luego de la reflexión. (4) Se determina si el fotón reflejado en su camino pasa por el vidrio interno. (5) Si la dirección del fotón pasa a través del vidrio interno se calcula la distancia S que el fotón recorre hasta llegar a la superficie del vidrio interno. En el recuadro 5 hay dos soluciones para S , la solución correcta es la menor. (6) Se avanza hasta la nueva posición. (7) Se verifica la altura en el eje z de la nueva posición \underline{r} y se compara con la altura de a base del reactor ($z = 0$), la altura del medio de cultivo ($z = H_M$) y la altura de la tapa del reactor ($z = H_L$). (8) Se determina la nueva ubicación SR del fotón para seleccionar la subrutina correspondiente. (9) La subrutina retorna al programa principal. (10) Si en su recorrido el fotón no pasa por el vidrio interno, se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie del vidrio externo. En el recuadro 13, hay dos posibles soluciones para S , la solución correcta es aquella diferente de cero. (11) (5) Si la dirección del fotón no pasa a través del vidrio interno se calcula la distancia S que el fotón recorre hasta llegar a la superficie del vidrio externo. En el recuadro 11 hay dos soluciones para S , la solución correcta es la diferente de cero. (12) En este caso el fotón impactará sobre la interfase aire-medio de cultivo antes de alcanzar al vidrio externo o interno y por ello se calcula la distancia S que el fotón recorre hasta impactar sobre la superficie del medio de cultivo.

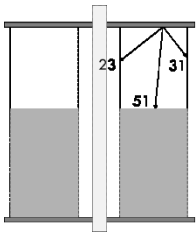


Figura 12': Posibles destinos del fotón luego de llegar a la tapa del reactor. La tapa es de acero espejado y por la tanto se considera que todos los fotones son reflejados. Los destinos posibles son: (23) el vidrio interno sobre el nivel de medio de cultivo, (31) el vidrio interno por encima del nivel de medio de cultivo o (51) la interface aire-medio de cultivo.

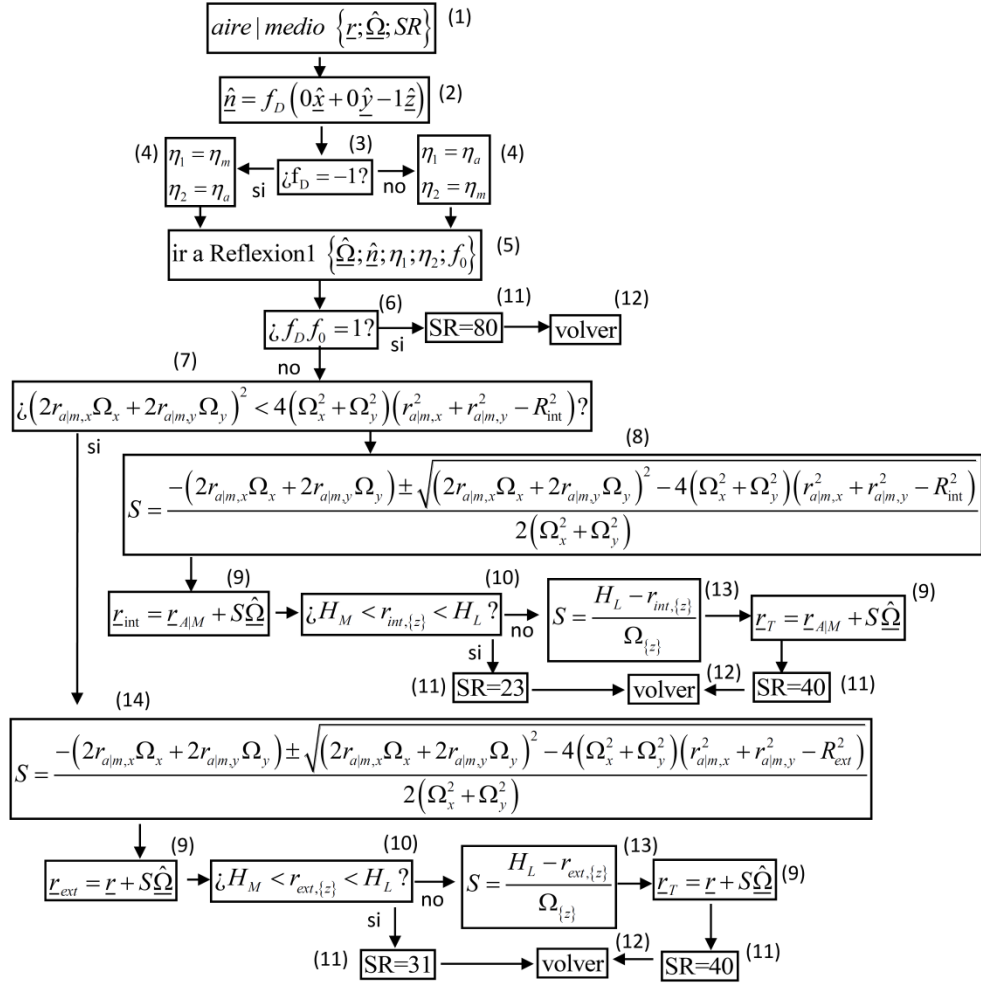


Figura 13: Subrutina para la simulación de los posibles destinos de los fotones luego de alcanzar la interfase aire-medio de cultivo. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se calcula en vector \underline{n} normal a la superficie de la interfase, con el mismo sentido que la dirección del fotón. (3) Se cheque al valor de f_D , para determinar si el fotón llega a la interfase desde arriba o desde debajo de la superficie del medio de cultivo. (4) Se fijan los valores η_i de los índices de refracción correspondientes. (5) Se llama a la subrutina *Reflexion1* para seleccionar si el fotón será reflejado sobre la superficie del vidrio o no. (6) Se verifica el valor de producto $f_0 f_D$, para determinar cuáles son los posibles destinos del fotón. (7) Si el producto $f_0 f_D$ es negativo, la dirección del fotón es hacia arriba de la interfase aire-medio de cultivo y se verifica si en su camino el fotón pasa a través del vidrio interno. (8) Si en su recorrido el fotón pasa por el vidrio interno, se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie del vidrio. En el recuadro 8, hay dos posibles soluciones para S , la solución correcta es la menor. (9) Se calcula la nueva posición \underline{r} del fotón avanzando una distancia S en la dirección $\underline{\Omega}$ hacia la nueva posición del fotón. (10) Se verifica la altura en el eje z de la nueva posición \underline{r} y se compara con la altura de a base del reactor ($z = 0$), la altura del medio de cultivo ($z = H_M$) y la altura de la tapa del reactor ($z = H_L$). (11) Se determina la nueva ubicación SR del fotón para seleccionar la subrutina correspondiente. (12) La subrutina retorna al programa principal. (13) En este caso el fotón impactará sobre la tapa de reactor antes de alcanzar al vidrio externo o interno y por ello se calcula la distancia S que el fotón recorre hasta impactar sobre la superficie del medio de cultivo. (14) Si en su recorrido el fotón no pasa por el vidrio interno, se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie del vidrio interno. En el recuadro 13, hay dos posibles soluciones para S , la solución correcta es la mayor que cero.

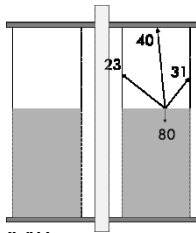


Figura 13': Posibles destinos del fotón luego de llegar a la interface aire-medio. (23) vidrio interno sobre el nivel de medio de cultivo. (31) vidrio interno por debajo del nivel de medio de cultivo. (40) Tapa del reactor. (80) Medio de cultivo.

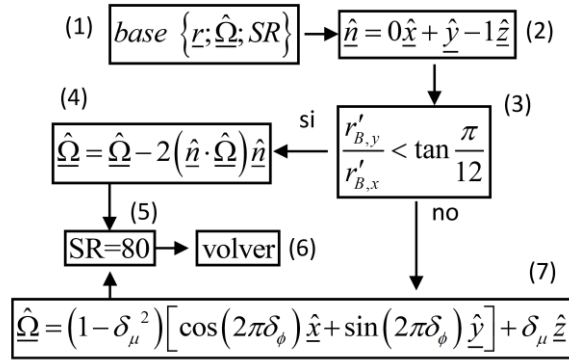


Figura 14: Subrutina para la simulación de los posible destinos de los fotones luego de alcanzar la base del reactor. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se calcula en vector \underline{n} normal a la superficie de la base del reactor, con el mismo sentido que la dirección del fotón. (3) Se verifica si la posición de impacto corresponde a una posición sobre la base espejada o sobre los difusores de aire de vidrio sinterizado. (4) Si la posición de impacto es sobre la base espejada se calcula la dirección \underline{Q} de reflexión. (5) Se determina la nueva ubicación SR del fotón para seleccionar la subrutina correspondiente. (6) La subrutina retorna al programa principal. (7) Si la posición corresponde a una posición sobre los difusores de aire de vidrio sinterizado se escoge una dirección de reflexión \underline{Q} al azar mediante la utilización de números aleatorios δ_μ y δ_ϕ .

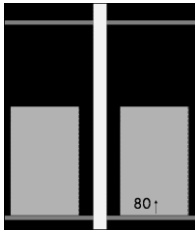


Figura 14': El único destino posible al llegar a la base del reactor es retornar (80) al medio por reflexión especular sobre el base de acero inoxidable espejado o difusa sobre el difusor de aire construido en vidrio sinterizado.

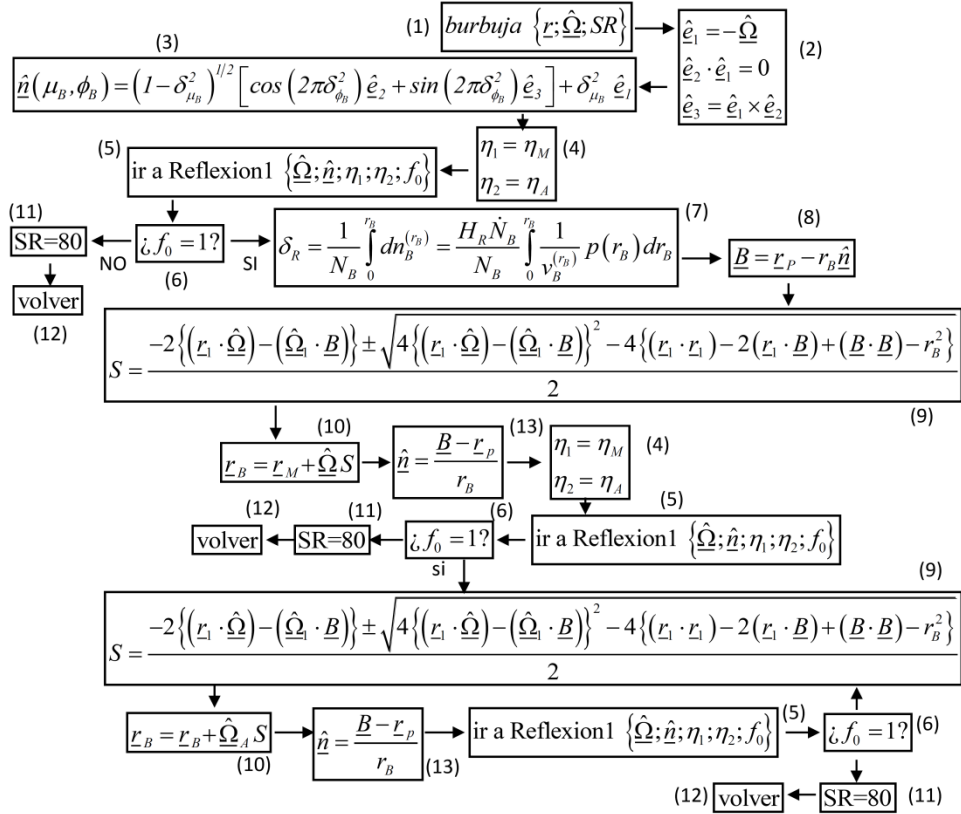


Figura 15: Subrutina para la simulación de los posible destinos de los fotones luego de alcanzar la base del reactor. (1) Se inicia la subrutina. (3) Se establece un sistema de coordenadas a través de los vectores \hat{e}_1 , \hat{e}_2 y \hat{e}_3 . (3) Se calcula en vector \underline{n} normal a la superficie de la burbuja en la posición de encuentro fotón-burbuja, a través de dos números aleatorios δ_μ y δ_ϕ . (4) Se fijan los valores η_i de los índices de refracción correspondientes. (5) Se llama a la subrutina *Reflexion1* para seleccionar si el fotón será reflejado sobre la superficie del vidrio o no. (6) Se verifica el valor del factor f_0 , para determinar si el fotón fue reflejado o no. (7) Se escoge al azar una radio r_B para la burbuja a partir de la un número aleatorio δ_B y de la función de distribución de burbujas residentes en el medio de cultivo con radio r_B . (8) Se calcula la posición \underline{B} del centro de la burbuja a partir de la posición de encuentro fotón-burbuja, el radio r_B de la burbuja y el vector \underline{n} normal a la superficie de la burbuja en el lugar de impacto. (9) Si el fotón pasa al interior de la burbuja, se calcula la distancia S que el fotón debe avanzar hasta impactar sobre la superficie de la burbuja desde el interior de la misma. En el recuadro 9, hay dos posibles soluciones para S , la solución correcta es la diferente de cero. (10) Se avanza el fotón una distancia S en la dirección $\underline{\Omega}$ desde la posición r inicial hasta la posición r final. (13) Se calcula el vector normal a la superficie de impacto considerando la posición de sobre la superficie de la burbuja r_p , la posición de la burbuja \underline{B} y el radio de la burbuja r_B . (11) Se determina la nueva ubicación SR del fotón para seleccionar la subrutina correspondiente. (12) La subrutina retorna al programa principal.

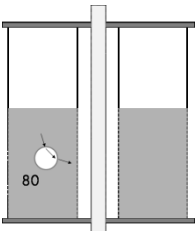


Figura 15': El único destino final posible al llegar a una burbuja (80) es retornar a medio, ya sea por simple o múltiple reflexión.

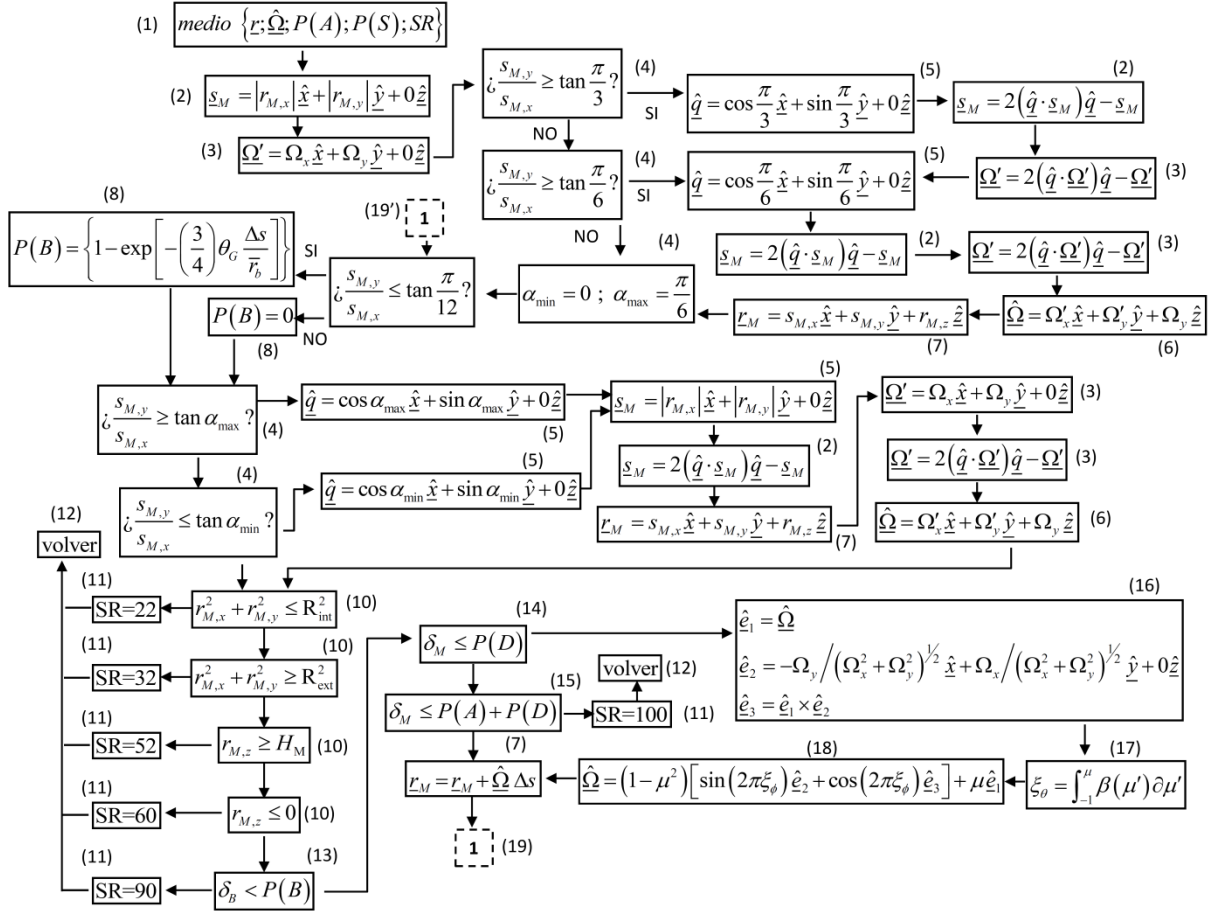


Figura 16: Subrutina para la simulación de los posibles caminos a través del medio de cultivo. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se calcula el vector \underline{s}_M para incorporar la condición de simetría. \underline{s}_M es la proyección del vector posición \underline{r}_P sobre el plano $\{XY\}$. (3) Se calcula el vector $\underline{\Omega}'$ para incorporar la condición de simetría. $\underline{\Omega}'$ es la proyección del vector dirección $\underline{\Omega}$ sobre el plano $\{XY\}$. (4) se compara la posición del fotón respecto a los ángulos que determinan los límites de cada región y las condiciones de simetría. (5) Se establece el vector \underline{q} correspondiente al plano de simetría (6) Se re-calcula el vector dirección $\underline{\Omega}$ considerando la condición de simetría. (7) Se calcula la nueva posición \underline{r}_P del fotón. (8) Se fija la probabilidad $P(B)$ dependiente de la fracción de volumen θ_G de que en su camino ΔS el fotón encuentre una burbuja. (9) Se fijan los valores α_{\min} y α_{\max} para determinar los límites de la región en la cual se encuentra el fotón. (10) Se verifica si el fotón en su recorrido alcanzó alguno de los límites de la región: un tabique, el vidrio externo, el vidrio interno, la interfase líquido-gas o la base del reactor. (11) Se determina la nueva ubicación SR del fotón para seleccionar la subrutina correspondiente. (12) La subrutina retorna al programa principal. (13) Comparando la probabilidad $P(B)$ de que ocurra el evento de que un fotón encuentre en su camino una burbuja un número δ_b generado al azar se decide si en la posición \underline{r}_P actual del fotón, se producirá el encuentro de un fotón con una burbuja. (14) Comparando la probabilidad $P(S)$ de que ocurra el evento de dispersión con un número δ_M generado al azar se decide si en la posición \underline{r}_P actual del fotón, se producirá la dispersión del fotón. (15) Comparando la probabilidad $P(A)$ de que ocurra el evento de absorción del fotón en el medio de cultivo con un número δ_M generado al azar se decide si en la posición \underline{r}_P actual del fotón, se producirá la absorción del fotón. (16) Producido el evento de dispersión se establece un sistema de coordenadas a través de los vectores \hat{e}_1 ; \hat{e}_2 y \hat{e}_3 para generar una nueva dirección para el fotón. (17) Se escoge la desviación respecto a a dirección original a través de un número aleatorio δ_μ y la función de fase $B(\underline{\Omega}, \underline{\Omega}')$. (18) Se establece la nueva dirección $\underline{\Omega}$ del fotón considerando el sistema de coordenadas \hat{e}_1 ; \hat{e}_2 y \hat{e}_3 y un nuevo número δ_θ generado al azar.

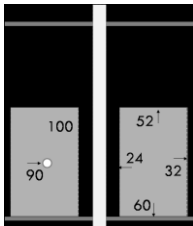


Figura 16': Posibles destinos del fotón durante su camino a través del medio de cultivo: (24) el vidrio interno por debajo del nivel del medio de cultivo, (60) la base del reactor, (32) el vidrio externo por debajo del nivel del medio de cultivo, (52) la interface medio de cultivo- aire, (90) encontrarse con una burbuja o (100) ser absorbido por las microalgas en suspensión.

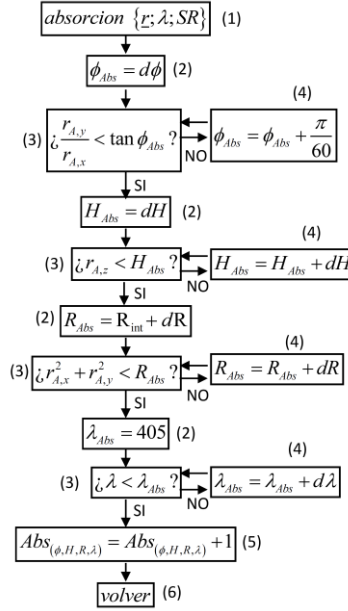


Figura 17: Subrutina para registrar la posición en la cual se absorben los fotones. (1) Se inicia la subrutina. (2) Se establece el valor inicial de una de la variable a través de la cuales depende $Abs(\phi, H, R, \lambda)$. (3) Se compara el valor de la variable ϕ_P , H_P , R_P o λ_P en la cual se produjo la absorción del fotón en el rector con la variable ϕ_A , H_A , R_A o λ_A utilizada para la construcción de $Abs(\phi, H, R, \lambda)$. (4) Si el valor de la variable ϕ_P , H_P , R_P o λ_P que caracteriza el lugar en el cual se produjo la absorción del fotón en el rector es mayor al valor de la variable de registro ϕ_P , H_P , R_P o λ_P se adiciona a la variable de registro correspondiente la cantidad $d\phi$, dH , dR o $d\lambda$. (5) Se adiciona un fotón a la cuenta $Abs(\phi, H, R, \lambda)$ de fotones absorbidos en la posición caracterizada a través de las variables ϕ_A , H_A , R_A y λ_A . (6) La subrutina retorna al programa principal.

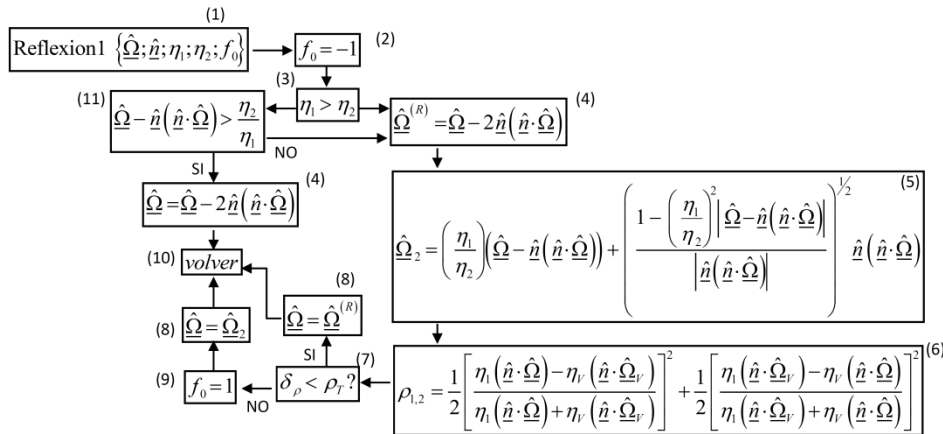


Figura 18: Módulo de simulación de reflexión/refracción sobre la interfase de los medios 1 y 2. (1)- inicio de la subrutina. (2)- Se asigna a f_0 el valor inicial -1 ; f_0 conservará este valor en caso de ser reflejado (3)- Se cheque si el índice de refracción del medio inicial 1 es mayor a del medio 2 . (4)- Se computa la dirección de reflexión. (5) Se calcula la dirección de refracción en el medio 2 . (6)- Se calcula la reflectividad $\rho_{1,2}$ sobre la interfase. (7)- Se compara el valor de $\rho_{1,2}$ con un número δ_ρ generado aleatoriamente. (8)- Se reemplaza la dirección $\hat{\Omega}$ por la correspondiente dirección $\hat{\Omega}^{(R)}$ o $\hat{\Omega}_2$ final. (9)- Se asigna a f_0 el valor 1 correspondiente al evento de refracción. (10)- Se retorna a la subrutina con el valor de f_0 y la nueva dirección $\hat{\Omega}$. (11)- Se cheque que el ángulo de incidencia sea menor que el ángulo máximo, a partir del cual la reflectividad es total.

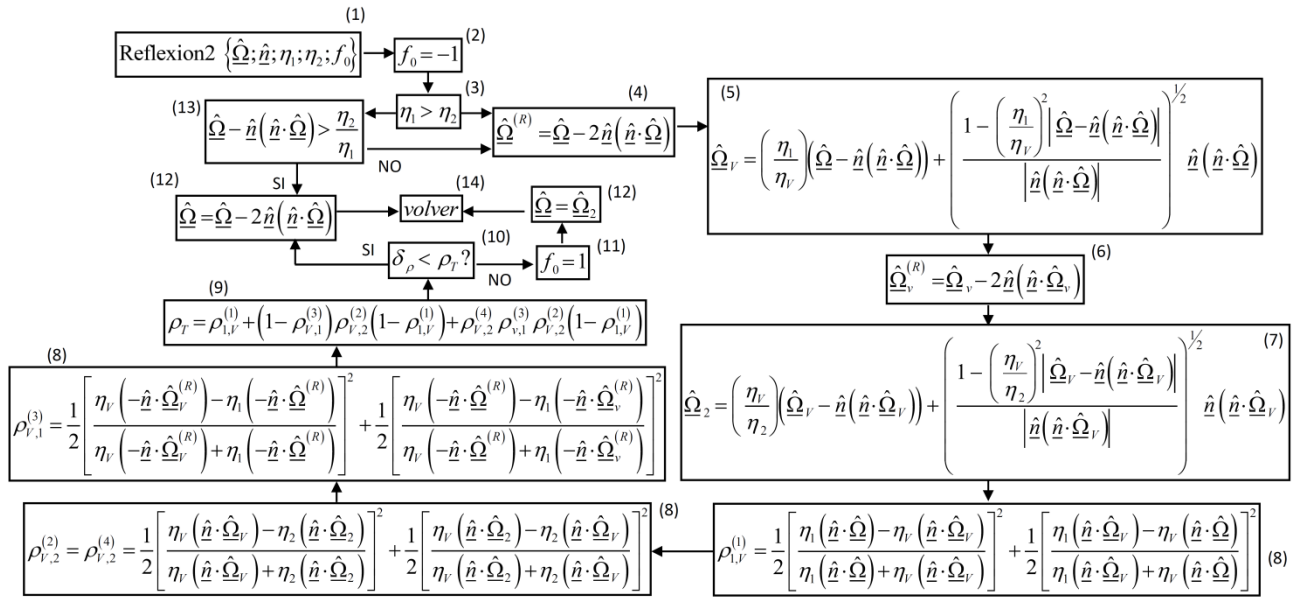


Figura 19: módulo de simulación de la reflexión/refracción sobre una pared transparente de espesor reducido que separa los medios 1 y 2. (1)- Inicio de la subrutina. (2)- Se asigna a f_0 el valor inicial -1 ; f_0 conservará este valor en caso de ser reflejado (3)- Se cheque si el índice de refracción del medio inicial 1 es mayor a del medio 2. (4)- Se computa la dirección de reflexión en el medio 1. (5)- Se calcula la dirección de refracción en el material transparente. (6)- Se computa la dirección de reflexión en el material transparente. (7)- Se calcula la dirección de refracción en el en el medio 2. (8)- Se calcula la reflectividad $\rho_{i,j}$ en la interfase que separa los medios i y j . (9)- Se calcula la reflectividad total ρ_T a través de la pared de material transparente. (10)- Se compara el valor de ρ_T con un número generado aleatoriamente δ_ρ . (11)- Se asigna a f_0 el valor 1 correspondiente al evento de refracción en el medio 2. (12)- Se reemplaza la dirección $\hat{\Omega}$ inicial por la correspondiente dirección $\hat{\Omega}^{(R)}$ o $\hat{\Omega}_2$ final. (13)- Se retorna a la subrutina con el valor de f_0 y la nueva dirección $\hat{\Omega}$. (14)- Se cheque que el ángulo de incidencia sea menor que el ángulo máximo, a partir del cual la reflectividad es total.

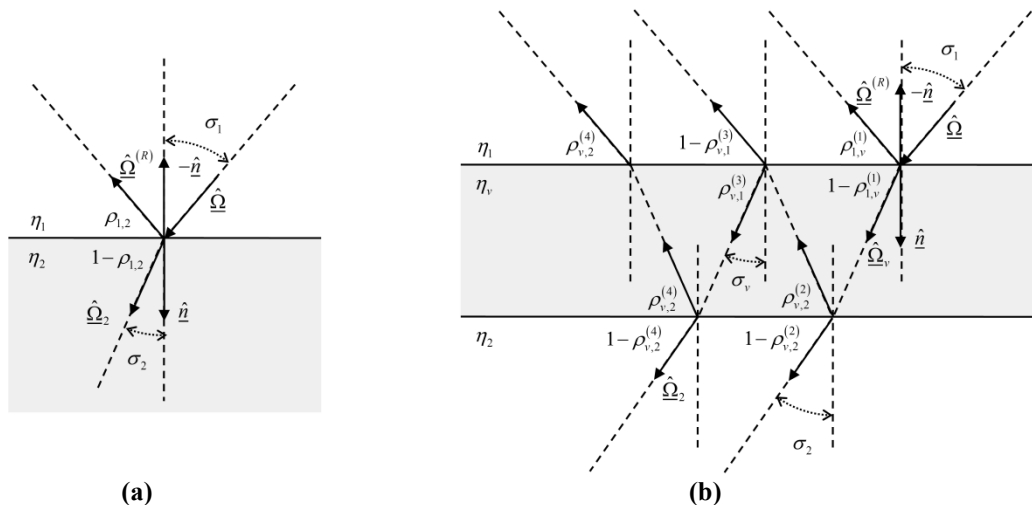


Figura 20: Representación del evento de reflexión o refracción sobre (a) una interfase entre los medios 1 y 2 y (b) sobre una lamina o pared de material transparente de espesor reducido que separa los medios 1 y 2

CAPÍTULO 3: Valores promedio de la radiación solar incidente [W m⁻²].

Tabla I. Valores de la radiación promedio en función del día y la hora. El promedio fue calculado incluyendo los valores de los 6 años, considerando los registros tomados entre los 30 minutos previos y los 30 minutos posteriores a cada hora, y considerando los valores de los 3 días anteriores y 3 días posteriores de cada día. Los registros con valores inferiores a 10 [W m⁻²] fueron desestimados por ser comparables con la señal de base del instrumento.

día	hora																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0	0	0	0	0	0	36	92	174	428	568	702	865	915	898	782	678	483	296	129	45	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	37	91	170	428	569	701	863	908	895	780	671	476	295	128	44	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	38	92	169	418	558	705	861	909	895	779	665	476	296	125	45	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	37	91	162	423	565	720	874	924	905	789	668	480	298	128	46	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	38	90	156	418	557	722	886	934	911	805	679	476	298	125	45	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	37	88	152	420	557	731	892	939	917	807	676	483	301	125	45	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	37	85	147	419	550	738	892	944	925	812	680	489	306	125	43	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	36	83	143	420	548	745	895	954	923	820	693	494	311	126	42	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	37	82	137	428	557	763	926	983	954	837	685	493	313	128	43	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	39	79	130	422	547	758	928	980	964	857	693	499	317	131	43	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	43	76	125	429	540	749	918	985	967	865	705	497	317	130	43	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	44	73	123	428	533	753	913	985	969	874	705	497	322	131	42	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	70	115	432	541	769	932	1001	980	894	713	502	326	132	42	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	70	114	437	546	769	925	998	971	888	707	504	325	132	42	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	72	107	448	559	787	950	1023	993	904	724	519	330	134	43	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	71	102	451	566	791	965	1026	989	888	726	525	336	137	43	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	71	97	439	560	784	955	1026	992	888	729	528	334	136	43	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	67	94	439	564	775	950	1019	996	879	733	524	333	138	44	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	64	90	428	555	761	940	1008	979	874	730	524	329	137	43	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	63	86	425	563	760	941	1006	980	876	726	523	327	135	43	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	63	82	420	561	750	940	1002	977	869	727	517	324	134	41	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	62	79	412	565	746	939	1001	973	859	723	517	324	132	43	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	60	76	401	567	737	930	984	965	858	724	516	323	132	43	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	57	75	377	545	707	881	933	921	834	712	504	319	130	43	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	56	73	369	541	701	866	911	895	809	694	490	310	126	43	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	54	69	348	527	696	844	894	886	796	678	482	305	124	42	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	52	64	346	532	686	835	895	885	798	677	481	303	123	42	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	52	64	342	533	675	823	885	875	780	666	467	295	119	41	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	49	63	333	526	664	809	867	861	771	663	465	295	118	42	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	48	64	326	522	649	792	851	844	752	648	462	290	116	43	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	45	66	316	513	644	783	843	832	749	634	454	286	112	44	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	44	70	310	505	631	771	829	807	736	625	452	284	112	45	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	43	66	309	511	635	778	838	811	748	628	458	283	110	44	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	43	68	310	510	631	772	839	805	737	611	443	283	109	44	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	40	68	310	510	636	777	843	809	739	621	450	286	110	47	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	39	68	312	510	638	769	844	811	748	623	453	287	108	51	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	37	68	313	508	638	756	829	788	743	617	451	284	106	53	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	38	67	313	509	643	758	846	799	748	618	456	285	106	53	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	39	69	329	524	668	787	875	834	769	625	464	284	106	52	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	39	67	327	522	667	792	894	851	775	636	466	286	107	53	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	39	67	336	540	673	798	904	848	775	633	470	285	106	53	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	39	68	319	518	657	786	880	828	751	612	459	282	105	54	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	39	67	310	501	644	766	857	805	738	599	452	277	105	53	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	39	66	299	482	621	752	837	790	724	583	436	262	101	50	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	37	67	286	466	615	735	823	777	715	574	427	260	98	49	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	38	63	288	462	611	728	808	776	713	576	430	258	98	50	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	37	61	292	461	608	742	813	788	719	580	428	256	97	49	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	36	61	288	450	594	712	787	752	695	562	419	252	96	49	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	34	59	292	453	610	724	787	770	698	567	424	251	95	49	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	34	61	290	442	603	711	783	768	695	556	420	247	93	48	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	32	60	291	438	604	711	773	752	686	550	419	243	91	45	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	31	61	286	431	597	715	780	768	692	551	417	241	92	44	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	29	59	285	419	598	715	769	756	687	543	409	233	89	41	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	0	26	56	284	420	596	721	767	742	677	548	409	230	88	43	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	25	57	282	422	595	713	758	736	683	542	413	230	88	45	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	25	57	284	423	599	723	757	738	689	549	411	228	87	45	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0	0	24	56	295	440	621	744	776	754	710	565	420	228	84	43	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	23	56	303	448	636	762	797	770	721	578	432	231	84	43	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	22	57	310	469	665	783	830	799	734	585	437	235	85	44	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	21	53	318	482	677	802	840	807	740	592	438	233	87	44	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	21	51	319	490	682	805	852	807	746	593	433	233	88	42	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	20	50	311	490	690	795	848	804	744	589	431	231	86	42	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	20	47	312	502	708	824	870	824	755	590	422	225	84	36	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	0	20	46	302	495	692	799	845	792	741	582	418	223	83	36	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0	0	19	44	293	491	677	787	815	769	712	565	404	216	81	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	0	19	43	284	488	669	781	811	768	704	556	394	210	79	0	0			

162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	90	234	330	386	410	389	324	108	33	0	0	0	0	0	0	0
163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	85	228	317	373	397	377	323	108	34	0	0	0	0	0	0	0
164	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	83	220	307	360	387	365	315	105	34	0	0	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	79	211	291	347	376	358	310	103	34	0	0	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	79	206	285	343	371	353	309	105	35	0	0	0	0	0	0	0
167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	79	207	290	347	373	348	309	102	33	0	0	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	80	214	306	368	391	361	319	102	33	0	0	0	0	0	0	0
169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	82	216	310	362	388	355	312	102	34	0	0	0	0	0	0	0
170	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	219	317	371	394	356	314	100	34	0	0	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	86	222	324	376	399	359	317	105	34	0	0	0	0	0	0	0
172	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87	226	326	378	405	364	319	109	35	0	0	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	87	228	330	384	413	371	325	109	33	0	0	0	0	0	0	0
174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91	234	338	393	425	389	338	115	32	0	0	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	94	240	350	403	436	405	352	120	33	0	0	0	0	0	0	0
176	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	97	247	358	417	451	416	365	127	35	23	0	0	0	0	0	0
177	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	97	258	377	448	484	443	388	135	34	23	0	0	0	0	0	0
178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	96	254	371	437	476	440	385	136	33	23	0	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	95	251	371	438	476	442	385	137	34	23	0	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37	93	248	370	435	476	439	378	135	34	23	0	0	0	0	0	0
181	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35	90	250	367	435	478	442	377	137	34	23	0	0	0	0	0	0
182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	92	255	374	445	488	449	384	144	35	22	0	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	90	255	369	435	479	439	375	146	35	23	0	0	0	0	0	0
184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	89	256	371	440	485	445	379	151	35	23	0	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	85	248	362	431	480	441	379	158	37	22	0	0	0	0	0	0
186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	84	249	361	431	476	441	378	162	38	22	0	0	0	0	0	0
187	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	86	257	371	442	485	450	385	165	37	23	0	0	0	0	0	0
188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	86	257	370	446	491	457	388	172	38	22	0	0	0	0	0	0
189	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	86	254	366	436	482	448	378	175	38	22	0	0	0	0	0	0
190	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	86	262	374	446	492	456	382	183	39	23	0	0	0	0	0	0
191	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	87	266	385	452	499	462	384	192	40	20	0	0	0	0	0	0
192	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	87	259	368	431	479	447	374	195	42	20	0	0	0	0	0	0
193	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	89	260	368	431	473	442	368	199	44	18	0	0	0	0	0	0
194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	87	259	366	427	471	445	371	208	45	18	0	0	0	0	0	0
195	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	87	269	381	450	492	464	387	223	47	18	0	0	0	0	0	0
196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	89	274	392	457	499	470	383	231	50	18	0	0	0	0	0	0
197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	90	276	390	456	496	470	386	243	56	19	0	0	0	0	0	0
198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	94	276	393	465	506	483	400	254	58	17	0	0	0	0	0	0
199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	95	282	402	476	517	494	410	265	61	17	0	0	0	0	0	0
200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	98	296	418	495	530	506	415	271	65	17	0	0	0	0	0	0
201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	99	304	431	507	543	519	423	282	69	17	0	0	0	0	0	0
202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	99	300	430	513	552	525	428	292	76	19	0	0	0	0	0	0
203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	100	304	438	521	557	533	438	303	83	20	0	0	0	0	0	0
204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	103	304	441	534	562	539	444	309	88	21	0	0	0	0	0	0
205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	101	297	428	516	542	524	433	304	93	21	0	0	0	0	0	0
206	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	103	288	407	495	524	515	430	305	95	21	0	0	0	0	0	0
207	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	101	286	412	509	537	530	445	315	103	22	0	0	0	0	0	0
208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	103	298	425	525	555	549	458	322	109	24	0	0	0	0	0	0
209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	106	312	441	540	567	557	466	325	116	24	0	0	0	0	0	0
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	109	311	439	536	561	553	466	328	122	24	0	0	0	0	0	0
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	110	311	440	542	566	558	479	334	127	25	0	0	0	0	0	0
212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	106	306	438	538	567	558	478	332	131	25	0	0	0	0	0	0
213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	107	306	430	530	561	547	469	326	130	26	0	0	0	0	0	0
214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	106	301	422	520	551	541	468	326	135	26	0	0	0	0	0	0
215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	111	302	425	522	554	550	479	336	144	26	0	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	111	295	414	514	545	544	472	331	145	25	0	0	0	0	0	0
217	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	111	290	409	508	546	548	470	331	151	25	0	0	0	0	0	0
218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	114	292	406	500	545	546	471	326	155	25	0	0	0	0	0	0
219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	116	303	406	490	538	537	465	319	155	25	0	0	0	0	0	0
220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	118	300	403	492	547	544	468	326	157	25	0	0	0	0	0	0
221	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	116	305	416	508	567	555	473	328	161	25	0	0	0	0	0	0
222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	125	326	440	526	588	571	481	334	166	26	0	0	0	0	0	0
223	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	127	317	437	531	591	570	477	330	166	27	0	0	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	131	311	425	523	587	563	484	330	167	28	0	0	0	0	0	0
225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	138	318	434	521	589	570	490	334	170	31	0	0	0	0	0	0
226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	141	321	439	525	593	573	492	336	172	34	0	0	0	0	0	0
227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	147	323	437	521	581	565	484	330	173	35	0	0	0			

247	0	0	0	0	0	0	0	0	18	47	245	435	564	657	706	677	561	399	240	85	0	0	0	0	0
248	0	0	0	0	0	0	0	0	18	51	251	440	574	667	707	674	558	397	237	86	0	0	0	0	0
249	0	0	0	0	0	0	0	0	19	52	252	435	568	658	695	659	543	391	235	86	0	0	0	0	0
250	0	0	0	0	0	0	0	0	19	57	259	438	570	660	698	663	548	393	236	87	0	0	0	0	0
251	0	0	0	0	0	0	0	0	20	60	262	444	579	669	700	667	551	397	239	87	0	0	0	0	0
252	0	0	0	0	0	0	0	0	20	62	264	443	576	666	700	664	553	398	236	86	0	0	0	0	0
253	0	0	0	0	0	0	0	0	19	63	256	430	576	666	704	668	554	400	239	88	0	0	0	0	0
254	0	0	0	0	0	0	0	0	20	65	261	440	587	681	719	680	565	414	244	89	0	0	0	0	0
255	0	0	0	0	0	0	0	0	21	68	278	458	612	705	734	690	579	427	250	92	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	0	0	22	73	282	467	624	716	750	702	597	435	254	93	0	0	0	0	0
257	0	0	0	0	0	0	0	0	23	77	287	474	633	726	762	709	604	437	255	93	0	0	0	0	0
258	0	0	0	0	0	0	0	0	24	81	288	466	634	734	771	715	610	436	253	93	0	0	0	0	0
259	0	0	0	0	0	0	0	0	24	84	286	463	629	727	768	713	600	427	251	93	0	0	0	0	0
260	0	0	0	0	0	0	0	0	25	89	293	469	632	729	771	707	597	429	251	93	18	0	0	0	0
261	0	0	0	0	0	0	0	0	27	95	300	479	641	737	772	704	599	433	250	95	19	0	0	0	0
262	0	0	0	0	0	0	0	0	28	99	302	483	647	743	778	709	598	434	251	97	20	0	0	0	0
263	0	0	0	0	0	0	0	0	30	102	301	480	637	719	757	699	587	423	251	96	19	0	0	0	0
264	0	0	0	0	0	0	0	0	31	105	308	483	649	729	756	701	590	427	255	99	19	0	0	0	0
265	0	0	0	0	0	0	0	0	31	107	310	483	653	729	761	709	591	428	260	100	21	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0	0	32	111	319	494	660	728	754	699	584	424	258	101	21	0	0	0	0
267	0	0	0	0	0	0	0	0	32	112	315	492	669	739	764	710	591	429	265	103	22	0	0	0	0
268	0	0	0	0	0	0	0	0	33	115	326	515	686	762	779	728	609	438	273	105	23	0	0	0	0
269	0	0	0	0	0	0	0	0	33	120	340	531	704	773	789	740	622	450	280	109	24	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	35	121	336	521	688	757	781	728	608	442	276	108	24	0	0	0	0
271	0	0	0	0	0	0	0	0	35	124	337	524	688	759	776	725	601	443	277	111	25	0	0	0	0
272	0	0	0	0	0	0	0	0	36	125	336	518	675	748	758	716	596	438	276	112	25	0	0	0	0
273	0	0	0	0	0	0	0	0	36	127	342	534	685	759	760	719	599	452	286	117	27	0	0	0	0
274	0	0	0	0	0	0	0	0	36	130	343	535	686	758	753	715	604	458	288	120	27	0	0	0	0
275	0	0	0	0	0	0	0	0	37	127	340	529	677	748	739	714	595	449	286	121	28	0	0	0	0
276	0	0	0	0	0	0	0	0	37	124	330	508	658	733	732	707	592	446	286	120	29	0	0	0	0
277	0	0	0	0	0	0	0	0	37	125	330	508	657	727	726	703	589	443	290	123	29	0	0	0	0
278	0	0	0	0	0	0	0	0	35	125	338	516	668	746	743	715	592	448	295	127	30	0	0	0	0
279	0	0	0	0	0	0	0	0	33	125	337	515	656	742	744	717	594	451	296	125	31	0	0	0	0
280	0	0	0	0	0	0	0	0	34	127	333	514	648	736	735	707	595	452	298	127	31	0	0	0	0
281	0	0	0	0	0	0	0	0	34	127	331	509	650	742	740	724	604	456	297	128	31	0	0	0	0
282	0	0	0	0	0	0	0	0	34	130	345	524	659	743	746	735	615	466	300	128	31	0	0	0	0
283	0	0	0	0	0	0	0	0	34	132	350	531	676	755	752	743	620	473	304	130	31	0	0	0	0
284	0	0	0	0	0	0	0	0	33	132	354	534	685	768	766	749	624	475	309	130	31	0	0	0	0
285	0	0	0	0	0	0	0	0	32	136	363	545	702	781	780	766	640	484	316	135	32	0	0	0	0
286	0	0	0	0	0	0	0	0	32	136	367	545	704	765	763	752	627	478	314	133	32	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	0	0	0	31	137	377	554	721	786	776	759	636	483	320	139	37	0	0	0	0
288	0	0	0	0	0	0	0	0	33	135	374	550	715	783	781	771	645	484	323	141	40	0	0	0	0
289	0	0	0	0	0	0	0	0	33	134	380	559	727	796	799	769	642	485	325	142	42	0	0	0	0
290	0	0	0	0	0	0	0	0	33	134	377	552	727	797	802	769	653	496	332	144	44	0	0	0	0
291	0	0	0	0	0	0	0	0	32	137	384	562	734	798	801	765	647	496	333	145	44	0	0	0	0
292	0	0	0	0	0	0	0	0	33	135	383	560	727	797	805	769	655	500	336	148	46	0	0	0	0
293	0	0	0	0	0	0	0	0	33	135	393	569	741	816	824	781	679	514	339	149	48	0	0	0	0
294	0	0	0	0	0	0	0	0	35	137	403	584	763	825	847	799	697	525	346	155	49	0	0	0	0
295	0	0	0	0	0	0	0	0	35	133	404	569	758	825	843	791	691	525	348	158	54	0	0	0	0
296	0	0	0	0	0	0	0	0	35	134	414	577	768	838	861	800	709	541	361	165	56	0	0	0	0
297	0	0	0	0	0	0	0	0	36	131	417	585	772	851	872	802	709	544	369	170	58	0	0	0	0
298	0	0	0	0	0	0	0	0	37	127	423	587	761	843	866	794	706	541	369	170	60	0	0	0	0
299	0	0	0	0	0	0	0	0	38	123	423	588	752	839	860	795	706	542	372	173	62	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	38	121	429	593	757	848	860	798	709	545	372	176	63	0	0	0	0
301	0	0	0	0	0	0	0	0	39	122	425	584	740	852	872	804	715	546	370	176	64	0	0	0	0
302	0	0	0	0	0	0	0	15	40	121	426	588	744	858	886	816	723	554	375	177	62	0	0	0	0
303	0	0	0	0	0	0	0	16	39	124	436	596	756	872	897	818	725	560	376	179	63	0	0	0	0
304	0	0	0	0	0	0	0	16	40	125	439	599	755	879	901	831	740	567	383	183	63	0	0	0	0
305	0	0	0	0	0	0	0	19	42	128	438	597	745	868	898	815	729	565	382	184	62	0	0	0	0
306	0	0	0	0	0	0	0	18	42	128	441	597	744	874	903	822	737	566	382	187	62	0	0	0	0
307	0	0	0	0	0	0	0	19	42	127	442	591	737	870	894	811	725	557	371	184	61	0	0	0	0
308	0	0	0	0	0	0	0	19	45	129	426	580	716	841	864	791	706	553	374	186	61	0	0	0	0
309	0	0	0	0	0	0	0	19	44	132	429	589	715	860	869	801	716	557	379	189	63	0	0	0	0
310	0	0	0	0	0	0	0	18	44	139	442	617	726	878	889	827	731	568	382	190	61	0	0	0	0
311	0	0	0	0	0	0	0	18	45	143	435	615	715	871	889	833	728	564	383	192	62	26	0	0	0
312	0	0	0	0	0	0	0	19	45	148	425	617	709	875	881	835	733	567	381	193	61	0	0	0	0
313	0	0	0	0	0																				

332	0	0	0	0	0	0	29	80	209	418	598	711	886	935	886	761	574	403	241	84	51	0	0	0
333	0	0	0	0	0	0	30	81	214	426	594	718	898	950	889	759	574	398	236	82	60	0	0	0
334	0	0	0	0	0	0	29	83	212	420	581	720	907	956	881	761	576	404	242	85	58	0	0	0
335	0	0	0	0	0	0	30	83	215	428	591	730	915	960	891	770	578	406	244	84	50	0	0	0
336	0	0	0	0	0	0	31	83	220	433	578	728	906	942	866	761	573	407	246	86	47	0	0	0
337	0	0	0	0	0	0	31	85	221	441	575	733	895	932	863	760	573	407	246	86	44	0	0	0
338	0	0	0	0	0	0	32	87	224	444	571	727	895	931	875	770	585	412	252	87	44	0	0	0
339	0	0	0	0	0	0	33	89	227	449	567	736	909	945	894	787	603	425	257	87	42	0	0	0
340	0	0	0	0	0	0	34	91	232	461	580	759	923	962	911	802	618	433	260	89	41	0	0	0
341	0	0	0	0	0	0	34	92	234	455	575	762	926	966	914	817	631	446	267	92	41	0	0	0
342	0	0	0	0	0	0	34	94	239	464	575	765	926	973	921	819	636	449	271	95	40	0	0	0
343	0	0	0	0	0	0	35	93	239	468	572	762	913	962	929	832	652	464	280	111	55	0	0	0
344	0	0	0	0	0	0	33	94	237	470	583	776	913	961	928	826	656	466	282	111	54	0	0	0
345	0	0	0	0	0	0	34	94	235	463	565	765	897	948	912	815	653	460	280	112	53	0	0	0
346	0	0	0	0	0	0	34	94	237	464	551	756	876	921	887	797	631	446	274	112	56	0	0	0
347	0	0	0	0	0	0	34	93	234	450	538	750	871	920	900	811	640	453	276	113	55	0	0	0
348	0	0	0	0	0	0	34	92	230	447	536	756	875	920	907	817	645	458	282	116	51	0	0	0
349	0	0	0	0	0	0	35	92	233	456	538	757	869	919	909	809	642	454	281	115	50	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	35	92	229	444	520	737	849	895	897	797	635	452	279	118	51	0	0	0
351	0	0	0	0	0	0	35	90	220	433	512	726	839	899	917	797	637	449	274	118	51	0	0	0
352	0	0	0	0	0	0	34	89	216	427	506	720	844	905	925	806	650	459	281	122	52	0	0	0
353	0	0	0	0	0	0	34	89	214	429	512	726	856	919	935	814	658	465	282	123	52	0	0	0
354	0	0	0	0	0	0	32	89	212	431	516	717	852	916	930	816	663	464	284	125	52	0	0	0
355	0	0	0	0	0	0	31	89	205	423	511	703	831	900	916	794	649	465	287	129	52	0	0	0
356	0	0	0	0	0	0	31	89	198	423	514	695	829	891	911	787	645	460	286	133	52	0	0	0
357	0	0	0	0	0	0	30	87	192	424	519	698	829	883	902	787	644	459	283	135	54	0	0	0
358	0	0	0	0	0	0	30	88	186	422	519	697	846	886	904	780	631	444	271	118	44	0	0	0
359	0	0	0	0	0	0	31	88	183	417	504	671	817	868	878	768	635	440	270	119	43	0	0	0
360	0	0	0	0	0	0	29	89	182	423	521	683	828	873	876	767	637	448	272	120	43	0	0	0
361	0	0	0	0	0	0	30	91	180	425	536	695	856	897	902	777	659	473	287	125	42	0	0	0
362	0	0	0	0	0	0	29	93	183	440	557	707	873	913	897	765	660	472	285	124	43	0	0	0
363	0	0	0	0	0	0	37	95	185	438	559	690	853	897	891	758	659	477	290	126	45	0	0	0
364	0	0	0	0	0	0	36	93	177	430	557	688	856	895	894	767	666	480	292	127	46	0	0	0
365	0	0	0	0	0	0	35	90	174	425	556	690	857	904	893	772	672	481	296	129	46	0	0	0