

Protocolos de Microalgas de la Red RENUWAL (I)



* ISBN: 978-84-15413-46-2

* Editorial: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el D

* Título: PROTOCOLOS DE MICROALGAS DE LA RED RENUWAL

* Editor general: GOUVEIA, LUISA ; NAVARRO LLORENS, JUANA MARIA

* Formato del producto: Digital: descarga y online
Detalle Formato: PDF ; Formato fijo

* Idioma de publicación: Español / Castellano

* Número de edición: 1

* Fecha de edición: 26/04/2022

País de edición: España

Materia destacada Thema: RNU : Sostenibilidad

* Materia destacada IBIC: RNU : Sostenibilidad

* Estado en la editorial: Activo

* Disponibilidad: Disponible. Sin detalles

* Precio: España
01 (Gratis)

Las microalgas pueden ser utilizadas para la recuperación de nutrientes contenidos en diversos efluentes, contribuyendo de esta forma a la mejora de la sostenibilidad de multitud de procesos. Sin embargo, para poder conseguir procesos eficientes es necesario evaluar con detalle cada aplicación en función de los efluentes que se van a procesar. Dependiendo del proceso, la biomasa algal obtenida puede tener interés para su aplicación en distintos sectores y productos finales con diferente valor añadido, i.e., farmacéutico, cosmético, agroalimentario-ganadero-acuícola, ambiental, químico o incluso energético.

En el año 2019, varios grupos de investigación pertenecientes a diferentes países iberoamericanos junto con 6 empresas que trabajan con microalgas se unieron para solicitar al programa de Redes de la CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; <https://www.cytmed.org/es/cytmed>) la creación de una red temática para el tratamiento de efluentes con microalgas. Las Redes Temáticas que subvenciona este organismo, son asociaciones de grupos de investigación y desarrollo (I+D) de entidades públicas o privadas y empresas de los países miembros del Programa CYTED, cuyas actividades científicas o tecnológicas están relacionadas dentro de un ámbito común de interés y enmarcadas en una de las Áreas del Programa. En nuestro caso, la red se solicitó por el área industrial. La red RENUWAL 320RT0005 fue concedida en esta convocatoria del 2019 para iniciarse en el año 2020 durante un periodo de 4 años que, con motivo de la Pandemia, se ha extendido hasta el 2024 (<https://www.cytmed.org/es/renuwal>).

Las redes CYTED tienen como objetivo general el intercambio de conocimientos entre grupos de I+D y la potenciación de la cooperación como método de trabajo. El objetivo principal de la Red RENUWAL, es disponer de una Red multi- e interdisciplinar que permita la sinergia necesaria para impulsar las aplicaciones potenciales de las microalgas como agentes de reciclaje para la industria y el medioambiente en el marco de la Economía Circular. Para ello se analizan e implementan los procedimientos disponibles basados en microalgas que permitan el desarrollo de nuevas estrategias sostenibles de valorización de la biomasa algal. Como objetivos específicos de la propuesta, la Red trabaja en tres ejes distintos: a) Gestión del conocimiento; b) Gestión de la comunicación y c) Gestión educacional.

Dentro de la gestión de comunicación, queremos ofrecer parte de nuestro *know-how* mediante la publicación de procedimientos que puedan ser de interés para todos aquellos relacionados con el mundo de las microalgas. Es por eso, que en esta primera publicación se recopilan algunos de los protocolos utilizados para el trabajo con microalgas en diferentes disciplinas. Es nuestra intención seguir recopilando más protocolos de los centros que componen la red RENUWAL y ponerlos al servicio de aquellos interesados.

Agradecemos la ayuda que la Cyted nos ha brindado para que este proyecto pueda hacerse realidad, tanto por la concesión de la red como por ayudarnos durante todo el proceso de publicación. Para cualquier sugerencia, pregunta o aclaración pueden ustedes dirigirse por mail a las editoras. Esperemos que les guste esta iniciativa y la encuentren de utilidad.

Editoras:

JUANA MARÍA NAVARRO LLORENS (UCM) jmnavarr@ucm.es

LUISA GOUVEIA (LNEG) luisa.gouveia@lneg.pt

Contenido

Protocolo de cultivo de la microalga *Botryococcus braunii*5

Andrés Alonso Arbeláez Pérez, Néstor David Giraldo Calderón, Lucía Atehortúa Garcés

Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación12

Patricia Laura Marconi, Myriam Zawoznik, María Daniela Groppa, Laura I. de Cabo

Flow cytometry-assisted method for cell disruption of microalgae.....18

Daniel Figueiredo, Teresa Lopes da Silva, Alice Ferreira, Alberto Reis, Luisa Gouveia^{1,2}

Conjugación triparental en cianobacterias.....29

Sara Baldanta Callejo, Govinda Guevara, Juana María Navarro Llorens

Determinación de fosfato disuelto e intracelular en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis* orientados a la producción de lípidos neutros para biodiesel.....37

Ana M. Martínez, Lucas A. Martín, Cecilia A. Damiani, Paolo M. Díaz Godoy, Patricia I. Leonardi, Cecilia A. Popovich

Identificación y cuantificación de clorofila *a* y fucoxantina en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca (Pcia. de Buenos Aires, Argentina).....47

M. Alejandra Sequeira, M. Belén Faraoni, Ana M. Martínez, M. Cecilia Damiani, Patricia Leonardi, Cecilia A. Popovich

Analysis of microalgae lipids from adapted Bligh Dyer followed by derivatization and GC-MS analysis.....56

Gisele Alves, Maiara Priscilla de Souza, Liange Reck, Carlucio Roberto Alves, Rosana de Cassia de Souza Schneider

Determinación de carbohidratos totales por fenol-sulfúrico (DuBois-Gilles-Hamilton)62

Enrique Romero Frasca, Germán Buitrón

Protocolo de Preparación y Evaluación de Pilas de Combustible de Óxido Sólido69

Araceli Fuerte, Rita X. Valenzuela, Paloma Ferreira-Aparicio, Beata Bochentyn

Método de cálculo del potencial bioquímico de metano (BMP), mediante el equipo AMPTS II, para la investigación en digestión anaeróbica.84

Juan Luis Ramos, Nely Carreras

Protocolo de cultivo de la microalga *Botryococcus braunii*

Andrés Alonso Arbeláez Pérez¹, Néstor David Giraldo Calderón¹, Lucía Atehortúa Garcés¹

¹Universidad de Antioquia, Grupo de Biotecnología, Calle 70 No 52-21, AA 1226, Medellín, Colombia.

Correspondencia: latehor@gmail.com

RESUMEN

Este protocolo describe una guía para el cultivo de *Botryococcus braunii* a escala de matraz, lo que es una herramienta útil para mantener cultivos de iniciación (inóculos) en óptimas condiciones antes de su escalado. Es una etapa clave del proceso de producción a gran escala en todo sistema biotecnológico.

La especie de microalga descrita en este documento es ampliamente estudiada a nivel mundial como una potencial fuente de energía renovable, gracias a su gran particularidad de producir hidrocarburos y excretarlos al medio [1]. Debido a esto es de gran importancia conocer y establecer los protocolos adecuados para los inicios de cultivo, teniendo en cuenta la demanda nutricional de la especie, así como sus tiempos de crecimiento, lo que resulta en el diseño de un flujograma de proceso que incluya las fases críticas y los pasos a seguir para lograr el objetivo de cultivar esta especie a nivel de laboratorio. Los resultados obtenidos han demostrado que el protocolo establecido es apto para el cultivo axénico de *Botryococcus braunii*, mostrando buena velocidad de crecimiento y un periodo constante de mantenimiento que permita obtener células en perfectas condiciones para iniciar cultivos de producción para su posterior escalado.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de tecnologías para la obtención de múltiples productos de valor agregado a partir de diferentes fuentes renovables, es una etapa clave en la transición de procesos hacia modelo más diversos y ambientalmente responsables [2]. Las microalgas han ganado interés en los últimos años debido a su potencial de crear biorrefinerías que acoplen procesos que produzcan diferentes tipos de productos, dentro de los cuales están los derivados del petróleo [3]. La evaluación de diversos medios de cultivos aptos para el cultivo de *Botryococcus braunii* ha sido motivo de estudio por largo tiempo [4] donde los nutrientes que presentan principales variaciones son el nitrógeno y el fósforo.

Las concentraciones adecuadas de los nutrientes que componen mayoritariamente el medio, así como las concentraciones celulares iniciales, son vitales para las producciones a gran escala de las microalgas [5]. Debido a esto, la evaluación de una concentración inicial adecuada fue evaluada y el periodo de tiempo de los mantenimientos fue establecido para el cultivo de *Botryococcus braunii* en escala de matraz.

PROTOCOLO

1. Preparación del medio de cultivo

Para el cultivo de *Botryococcus braunii*, se utilizó el siguiente medio de cultivo. La composición se basa en macronutrientes que son utilizados durante el crecimiento celular, trazas de elementos que son coadyuvantes en el metabolismo y una solución de hierro.

Tabla 1. Medio de cultivo

	Elementos	g/L	***
Macronutrientes	NaNO ₃	1	1,5
	K ₂ HPO ₄	0,093	0,042
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036	
Trazas	H ₃ BO ₃	0,00286	
	MnSO ₄ .H ₂ O	0,00188	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00022	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00039	
	CuSO ₄ .7H ₂ O	0,00008	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,00004	
Fe	Citrato Férrico de NH ₄	0,006	
	Ácido Cítrico	0,006	
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,001	

***Medio de cultivo solido: agar - agar (13 g/L)

2. Material Inicio

- 2.1 Para cada cepa de agua dulce se requieren 5 matraces de 500 ml con 200 ml de medio BG11 con entrada y salida de gases. En total 1L de medio por cada cepa de agua dulce para cada lote
- 2.2 10 erlenmeyers de 100 ml estériles
- 2.3 10 tubos falcon de 50 ml estériles
- 2.4 1 Gradilla estéril para poner los falcon
- 2.5 N Acrodiscos medianos (50mm) – Siendo N = (# cepas * 5 + 5)
- 2.6 K Erlenmeyer de 1.0L estériles – Siendo K = (# cepas + 1)
- 2.7 Mechero
- 2.8 Fósforos
- 2.9 Aspersor con etanol al 70%
- 2.10 Plástico para envolver la boca de los envases luego de inoculados
- 2.11 Toallas o papel absorbente para secar y limpiar

3. Material mantenimiento

- 3.1 P litros de medio BG11 – siendo $P = (\# \text{ cepas agua dulce} * 5 * 0,1L + 0,5L)$ (se agregan 100 ml en cada envase)
- 3.2 P litros de medio salino – siendo $P = (\# \text{ cepas salinas} * 5 * 0,1L + 0,5L)$ (se agregan 100ml en cada envase)
- 3.3 10 erlenmeyers de 100ml estériles
- 3.4 10 tubos falcon de 50ml estériles
- 3.5 Gradilla para poner los falcon
- 3.6 K Erlenmeyer de 1.0L estériles – Siendo $K = (\# \text{ cepas} + 1)$ para depositar sobrantes de cada cepa
- 3.7 Mechero
- 3.8 Fósforos
- 3.9 Aspersor con etanol al 70%
- 3.10 Plástico para envolver la boca de los envases luego de inoculados
- 3.11 Toallas o papel absorbente para secar y limpiar

4. Descripción mantenimiento

4.1 Inicio lote

- 4.1.1 Luego de esterilizados y enfriados todos los materiales hasta temperatura ambiente, llevar los envases a la cabina de flujo de laminar junto con el cultivo que será usado como inóculo y los demás materiales.
- 4.1.2 Dejar en exposición a la luz UV durante 20 minutos.
- 4.1.3 Luego de pasado el tiempo de exposición a la luz UV, poner los acrodiscos en la salida de gases a los envases.
- 4.1.4 Encender el mechero y flamear la boca de todos los envases sin células y el envase que tiene el inóculo.
- 4.1.5 Pasar 20ml de suspensión celular de cultivo de origen a cada uno de los matraces de cultivo de forma aséptica.
- 4.1.6 Flamear nuevamente la boca de todos los envases buscando eliminar cualquier residuo de humedad que puede favorecer la proliferación de contaminantes.
- 4.1.7 Forrar la boca de los envases con plástico para sellado.
- 4.1.8 Retirar todo el material y limpiar la cabina con etanol al 70%.
- 4.1.9 Llevar todos los envases a un agitador orbital iluminado con luz blanca a $25 \mu E/m^2/s$.
- 4.1.10 Instalar las redes de suministro de gases a cada uno de los envases.
- 4.1.11 Incubar a 110 rpm.
- 4.1.12 Agregar dióxido de carbono a todos los envases cada 48h a través del sistema de distribución de gases durante 10 segundos hasta el siguiente mantenimiento.

4.2 Consideraciones adicionales

- 4.2.1 Se recomienda iniciar el trabajo en la cabina de flujo laminar en orden ascendente en rapidez de crecimiento para no favorecer las contaminaciones cruzadas

- 4.2.2 Los cultivos establecidos deben ser renovados mensualmente.
- 4.2.3 Todos los envases deben ser marcados con su respectivo número y fecha de establecimiento y renovación.
- 4.2.4 Los cultivos tomados de estos lotes para ser usados como inóculo para otros experimentos se deben reponer en cada renovación de medio para evitar futuras limitaciones de células activas.
- 4.2.5 Luego de la inoculación, y pasados varios días de incubación se debe realizar un chequeo permanente para identificar envases que muestren colores o características físicas diferentes del resto. En caso de tratarse de una contaminación, se recomienda retirar el envase inmediatamente de agitador y reponerlo con uno nuevo en el siguiente evento de renovación.

4.3 Renovación de un lote

- 4.3.1 Luego de esterilizados y enfriados todos los materiales hasta temperatura ambiente, llevar todos los materiales esterilizados junto con los cultivos a renovar a la cabina de flujo laminar
- 4.3.2 Dejar en exposición a la luz UV durante 20 minutos.
- 4.3.3 Luego de la exposición a la luz UV, quitar el plástico protector de la boca de todos los envases y flamear con el mechero.
- 4.3.4 Retirar 100 ml de suspensión celular de cada envase con el matraz de este mismo volumen y depositarla en los envases de 1,0L.
- 4.3.5 Agregar 100 ml de medio de cultivo fresco a cada uno de los envases a los que se retiró la suspensión con un matraz de 100 ml estéril.
- 4.3.6 Flamear el cuello de todos los envases y luego de enfriar, sellar con plástico.
- 4.3.7 Llevar nuevamente todos los envases al agitador orbital, instalar las redes de distribución de gases y renovar la agitación.
- 4.3.8 Suministrar dióxido de carbono gaseoso a todos los envases durante 10 segundos para proporcionar la carga inicial de fuente de carbono.
- 4.3.9 Cada lote debe renovarse cada 4 semanas y se debe suministrar CO₂ gaseosos cada dos días.

4.4 Consideraciones adicionales

- 4.4.1 El protocolo aquí descrito está diseñado para hacer la renovación de un lote completo de *Botryococcus braunii*. En el caso de que alguno de los lotes se haya descompletado, bien sea por contaminación o por requerimientos de inóculo, dentro de la preparación de los materiales se debe incluir la cantidad de medio de cultivo y matraces acondicionados suficientes para reponer los envases faltantes. El inóculo para estos envases a reponer será la suspensión sobrante del cambio del mismo lote de mantenimiento.
- 4.4.2 Se recomienda toma muestras al azar de algunos de los cultivos de las cepas para posteriormente revisarla en el microscopio y así poder identificar a integridad de las células y posibles contaminaciones.

4.5 Notas importantes

- 4.5.1 Debido a que es posible que se use alguno de esos envases como inóculo para determinados ensayos, es importante hacer un inventario semanal para saber cuántos envases se deben reponer y así evitar escases de envases de mantenimiento.
- 4.5.2 Se recomienda tener por lo menos dos lotes de cultivos de mantenimiento para cada cepa separados por un tiempo de dos semanas uno del otro. Al tener dos lotes, en caso de haber algún problema que provoque la pérdida de un lote entero, se cuenta con uno adicional como respaldo. Esto evitaría tener que iniciar cultivos nuevamente partiendo de cultivos sólidos ante cualquier problema que pudiera presentarse.

4.6 Condiciones de cultivo

- 4.6.1 *Botryococcus braunii* es cultivado en periodos de 25 días (ajuste de nutrientes) para cada lote de mantenimiento.
- 4.6.2 El volumen de trabajo es de 400 ml en matraces de 1L mantenidos en agitación constante de 100 rpm con una iluminación de 0.258 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.
- 4.6.3 La temperatura del cuarto es de 22°C.
- 4.6.4 Los cultivos son gasificados 1 vez al día con un pulso de CO₂ durante 20 segundos.
- 4.6.5 El ajuste de los nutrientes se realiza con un reemplazo del 60% del volumen del cultivo con medio fresco.
- 4.6.6 Los cultivos se mantienen aproximadamente a una concentración de 3 g/L al final de su ciclo de mantenimiento

RESULTADOS

Siguiendo el protocolo, se evaluó el consumo de nutrientes por lote de recambio lo que indicaría el tiempo de mantenimiento adecuado para que la microalga no sufra un déficit nutricional que comprometa su viabilidad. Durante la cinética (Figura 1), se pudo observar que el consumo total de fosfato (PO₄) ocurría en unos pocos días después de iniciar la cinética, lo cual puede ser debido a que la abundancia de este nutriente estimula su propia acumulación, y la célula puede usarlo gradualmente a medida que lo vaya necesitando [6]. El fósforo tiene un papel estructural fundamental en muchas estructuras moleculares y celulares, como en el caso de los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos y fosfolípidos, los cuales son indispensables en las estructuras membranosas [7]. En los ensayos presentados con el fosfato, se identificó que sin importar la concentración de fosfato en el medio (< 60 mg L⁻¹), la concentración de este llegaba a cero a más tardar el día 5, por lo que se optó por descartar el uso de un modelo para este, además de variar su concentración en el medio dependiendo del nitrógeno, estableciendo una relación molar N:P de 10:1 la cual es establecida en la basándose en la composición molecular de *B. braunii* [8]. Caso distante ocurre con el nitrato, cuyo uso y acumulación parece no tener relación con la disponibilidad de fosfato [6].

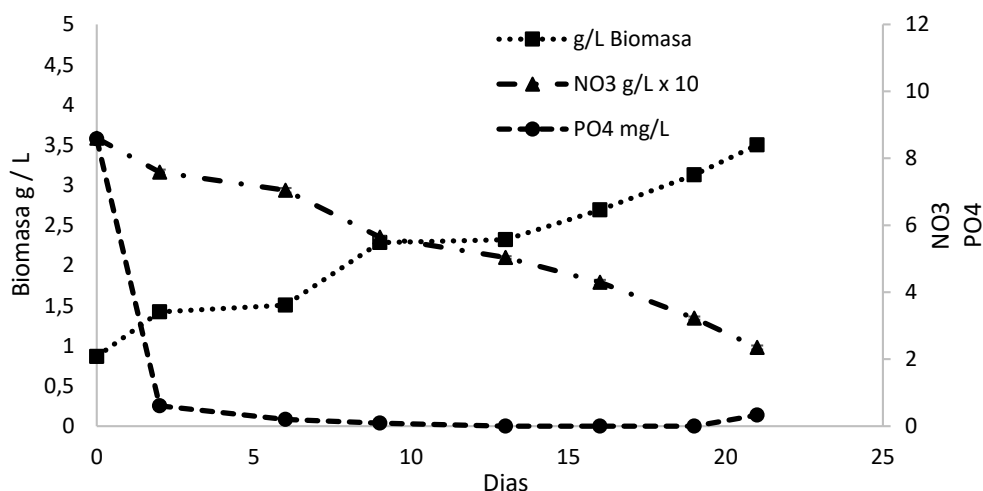


Figura 1. Cinética de crecimiento y consumo de la microalga *Botryococcus braunii*.

El nitrógeno está implicado en múltiples funciones celulares, es un componente necesario para la síntesis de pigmentos como la clorofila y por lo tanto posee un papel fundamental en el proceso de obtención de energía a través de la fotosíntesis. Además, es el principal componente de los aminoácidos, en donde su limitación influye en la traducción de mRNA y a su vez en la síntesis de proteínas; hace parte de la estructura de vitaminas y forma parte de coenzimas y enzimas [9].

El principal uso de nitrato por la célula es la síntesis de proteínas asociadas a la replicación del ADN, por lo que es un nutriente que favorece la multiplicación celular y por lo tanto afecta directamente las tasas de crecimiento de las algas [9–11]. Por esta razón su consumo es gradual y proporcional al crecimiento logrado, como puede evidenciarse en la Figura 1. Es sabido que el nitrógeno junto con el fósforo son los nutrientes responsables de los conocidos “Bloom” de microalgas en cuerpos de agua provenientes de actividades antropogénicas [12].

DISCUSIÓN

El actual protocolo establece un proceso adecuado para el crecimiento celular de *Botryococcus braunii* en escala de laboratorio seguido de un protocolo de mantenimiento que permite su replicación indefinida en el tiempo. Las etapas críticas que permiten llevar a cabo el procedimiento son aquellas donde se compromete la inocuidad del cultivo, debido a que una temprana contaminación con otro microorganismo afectaría su replicación en las siguientes etapas. Por consiguiente, el método está limitado en el volumen de trabajo evaluado y la especie estudiada. Por lo cual, el método establecido tiene un gran potencial para ser implementado en sistemas microalgales a escala de matraz.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a la agencia nacional de hidrocarburos por la financiación presentada para la realización de este estudio. Así mismo, al grupo de biotecnología de la Universidad de Antioquia por las instalaciones utilizadas.

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] Furuhashi K, Kiyotaka S, Shigeru O, Kenji I (2013). Seawater-Cultured *Botryococcus braunii* for Efficient Hydrocarbon Extraction. *PLoS One*. 8(6), e66483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066483>.
- [2] Liu GC, Liao YF, Wu YT, Ma XQ, Chen LM (2017). Characteristics of microalgae gasification through chemical looping in the presence of steam. *Int. J. Hydrogen Energy*. 42 (36), 22730–22742. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.173>.
- [3] Barbosa MJ, Wijffels RH (2013). Biofuels from Microalgae, In: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch29>.
- [4] Dayananda C, Sarada R, Vinod Kumar, Ravishankar GA (2007). Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies, *Electron. J. Biotechnol.* 10(1), 79-91. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue5-fulltext-11>.
- [5] Arbelaez AA (2019). Analysis, modeling and improvement of production process of the microalga *Botryococcus braunii* for energy purposes. M.Sc. Thesis. Faculty of Engineer, Universidad of Antioquia-Colombia.
- [6] Beuckels A, Erik S, Koenraad M (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98-106 <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>.
- [7] Azcón-Bieto J, Talón M (2008). Fundamentos de fisiología vegetal (No. 581.1). McGraw-Hill Interamericana, New York.
- [8] Grobbelaar JU (2012). Microalgae mass culture: The constraints of scaling-up. *J. Appl. Phycol.* 24, 315–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9728-6>.
- [9] Barsanti L, Gualtieri P (2006). Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology. Second edition. eBook. Published March 5, 2014 by CRC Press.
- [10] Peccia J, Haznedaroglu B, Gutierrez J, Zimmerman JB (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends Biotechnol.* 31,134–138. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.010>.
- [11] Turpin DH, Elrifi IR, Birch DG, Weger HG, Holmes JJ (1988). Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. *Can. J. Bot.* 66, 2083–2097. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.05.002>.
- [12] Andersen R (2005). Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, New York, 578 pp.

Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación

Patricia Laura Marconi¹, Myriam Zawoznik², María Daniela Groppa³, Laura I. de Cabo⁴

¹CONICET, CEBBAD-Univ. Maimónides, Hidalgo 775, Buenos Aires, Argentina;

²FFyB, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina

³IQUIFIB-CONICET, FFyB, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina

⁴Museo Argentino de Ciencias Naturales “B. Rivadavia”-CONICET, Buenos Aires, Argentina

Correspondencia: marconi.patricialaura@maimonides.edu

RESUMEN

Se detalla el protocolo para obtener microalgas inmovilizadas en alginato de sodio. El cultivo de microalgas inmovilizadas en alginato de sodio ha mostrado ser eficiente para obtener mayores rendimientos en los procesos de biorremediación. El presente protocolo describe la obtención de perlas de alginato con concentraciones conocidas de *Chlorella vulgaris* inmovilizada.

INTRODUCCIÓN

La inmovilización de la biomasa microalgal en diversos soportes tales como el alginato, agar-agar, celulosa y sílica-gel, entre los más utilizados [1-5] protege las microalgas de los efectos tóxicos de los contaminantes presentes en el agua, manteniendo el pH y evitando temperaturas extremas, permitiendo una mayor eficiencia en la producción de biomasa y sobrevivida [6]. En particular, el alginato es una matriz de polisacáridos especialmente útil para la elaboración de cápsulas esféricas, comúnmente denominadas “perlas”. Además, las células atrapadas en la matriz ocupan un volumen pequeño y definido -las perlas tienen un tamaño de 1 a 1,5 cm de diámetro- y son fáciles de manipular confiriendo una estabilidad operacional al sistema (Figura 1A). Otra ventaja, es mantener una comunicación célula-célula generalmente obtenida por moléculas señal disueltas en la matriz que las contiene. En nuestro caso, la principal ventaja de la inmovilización de las microalgas en alginato fue obtener mayor biomasa y facilitar su recuperación (Figura 1B). Las perlas no sólo contribuyen a la resolución de aspectos estrictamente técnicos relacionados con la ingeniería del proceso (“scaling-up”), sino que evitan la liberación de células al medio y, por ende, los potenciales peligros de eutrofización del sistema e introducción de especies exóticas. Además, el uso de las perlas contribuye con la cosecha de la biomasa, haciendo este proceso menos costoso.

A



B

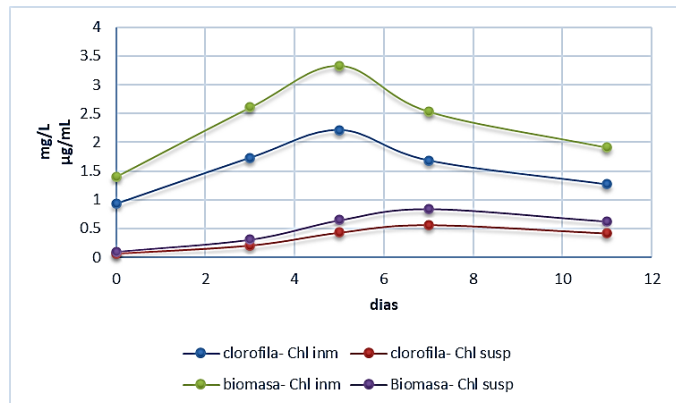


Figura 1. Cultivos de microalgas de *C. vulgaris* alimentados con agua del Lago Lugano. A) perlas de alginato conteniendo células al 2% (P:V); B) comparación del crecimiento obtenido por cultivos en suspensión (Chlsusp) o inmovilizados (Chlinm) en perlas de alginato. Biomasa, estimación por peso seco (mg/L); concentración de clorofila (µg/mL). Obtenido de Groppa et al. (2019) [7].

El presente protocolo describe la obtención de perlas de alginato conteniendo una concentración conocida de microalgas. Además, se describe el protocolo para liberar las algas del alginato.

Protocolo de inmovilización de *Chlorella vulgaris*

1. Disolver alginato de sodio en agua estéril al 10%. Utilizar un mixer o procesadora hogareña para tal fin. La solución debe quedar translúcida. Autoclavar la solución a 0,10 MPa por 15 min.
2. Preparar una suspensión de algas creciendo en fase exponencial. La concentración puede variar entre 1 a 6 x 10⁶ células/ml en medio de cultivo sintético. Se puede obtener esta suspensión filtrando con papel de filtro estéril o centrifugar en condiciones de esterilidad (menor a 5000 g por 10 min) y resuspender en medio hasta obtener la densidad deseada.

Nota: Cultivo suspensión de *C. vulgaris*: medio MS, con el agregado de sacarosa (3 %) y suplementado con el regulador de crecimiento AIA (ácido indol acético, 1 mg/L) [8]. Los medios de cultivo se dispensan en Erlenmeyers de 250 mL (50 mL en cada uno) y se mantienen en agitación constante (100 rpm) para su oxigenación. Las incubaciones se realizan a 24±2 °C, con fotoperíodo de 16:8 luz:oscuridad con una intensidad PAR de 400 µmol.m⁻²s⁻¹. El crecimiento se evalúa mediante peso fresco de biomasa, densidad óptica a 600 nm de longitud de onda y recuento en cámara de Neubauer.

3. Mezclar la solución de *C. vulgaris* obtenida en el ítem 2 con alginato de sodio 2% estéril en relación 20:80 (V:V).

Nota: se almacena el alginato al 10 % estéril. La dilución correspondiente se realiza según la siguiente fórmula.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

4. Mezclar durante 15 minutos sobre un agitador electromagnético (“magnetic stirrer”).

5. Gotear la mezcla con una aguja de 2.0 mm de diámetro de salida sobre una solución 2% de CaCl₂ estéril en agitación suave (medio de gelificación) sobre un agitador electromagnético. Alternativa para grandes volúmenes a preparar: utilizar una bomba peristáltica con una vía estéril.
6. Incubar las bolillas formadas en CaCl₂ 2% estéril en agitación rotatoria (60-100 rpm) durante 1 h a 22 °C.
7. Descartar el medio y lavar las bolillas tres veces con 10 vol. de solución salina estéril (0.85% NaCl) en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 20 minutos cada uno cambiando el medio durante cada lavado.

Recuperación de la biomasa inmovilizada: una vez finalizado el proceso de biorremediación, se cosechan las perlas con la microalga inmovilizada y se recupera la biomasa por dos mecanismos posibles.

1. Por redisolución de la matriz:
 - a. Triturar en forma mecánica y suavemente las bolillas en un pequeño volumen de buffer fosfato KH₂PO₄/Na₂HPO₄, 1 M y pH 6,5 (relación aproximada de 1 bolilla:1ml). Se puede utilizar Eppendorf y un pilón o *pestle* (Bel-Art®) para una muestra de 10 bolillas
 - b. Centrifugar las suspensiones a 2500 rpm durante 10 minutos.
2. Por disgregación mecánica de la matriz
 - a. Triturar mecánicamente las bolillas en un pequeño volumen de medio
 - b. Diluir la suspensión en medio de trabajo.
 - c. Centrifugar la suspensión a 2500 rpm durante 10 minutos.

RESULTADOS

Entre los contaminantes que más impactan en el medio ambiente se describe el exceso de las especies químicas nitrogenadas y fosforadas responsables de causar la eutrofización de las aguas trayendo aparejado un desbalance en el ecosistema. Para probar la eficiencia del cultivo de las microalgas inmovilizadas se llevaron a cabo cultivos utilizando biorreactores tipo tanque agitado (Minifors, Infors HT®, Switzerland) con un vaso de 2 L y agitación por paleta marina (100 rpm), con sistema de control de pH y aireación por burbujeo ("sparger") con una bomba a 0,5 vvm. El biorreactor fue alimentado con agua del lago Lugano (sector correspondiente a las coordenadas 34°40'50.80"S y 58°26'44.10"O) o medio sintético (MS suplementado con AIA 1 mg/L, sacarosa 3 %) [9].

La cinética de crecimiento se basó en muestreos diarios de 10 perlas de alginato a lo largo de 14 días, donde se cuantificó el número de células inmovilizadas en cada bioproceso (Tabla 1).

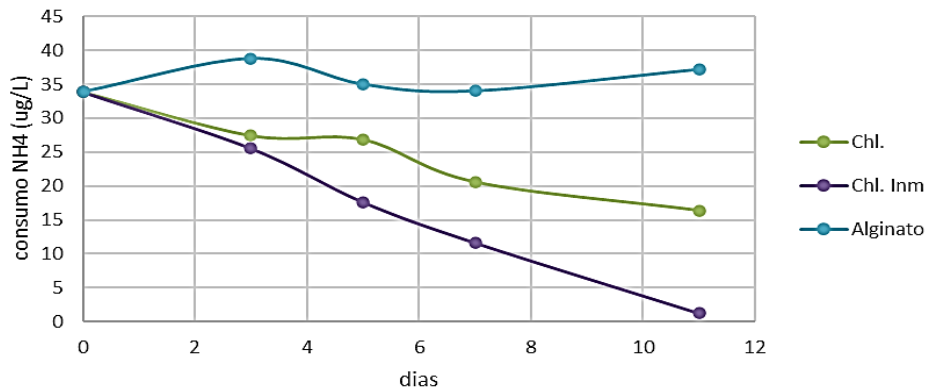
El medio de cultivo MS con 3% de sacarosa fue el más adecuado para generar biomasa con un tiempo de duplicación de 3 días.

Además, se observa una disminución significativa del contenido de amonio y fósforo en los mismos ensayos respecto al control (perlas de alginato sin microalgas) (Figura 2). Cabe destacar que se obtuvieron mejores resultados en los sistemas con algas inmovilizadas respecto a los cultivos de las mismas algas en suspensión [9]. A los 11 días de cultivo, se consume casi el total del amonio y más del 80% del fósforo total en los tratamientos con microalgas inmovilizadas.

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de *Chlorella vulgaris* inmovilizada en perlas de alginato, en biorreactores alimentados con agua del lago Lugano. Los asteriscos señalan diferencias significativas ($p \leq 0,05$). RGR: Tasa específica de crecimiento (peso final-peso inicial/peso inicial), μ : velocidad de crecimiento (peso final-peso inicial/días en cultivo), dt: tiempo de duplicación. MS, medio sintético MS; ALL: agua del Lago Lugano. Los cálculos cinéticos se realizaron con “FermenterTool software 2018” (www.fermentertool.com/en/).

	MS	ALL
RGR	73,3*	9,7*
μ (d^{-1})	0,214*	0,090*
dt (d)	3	8

A



B

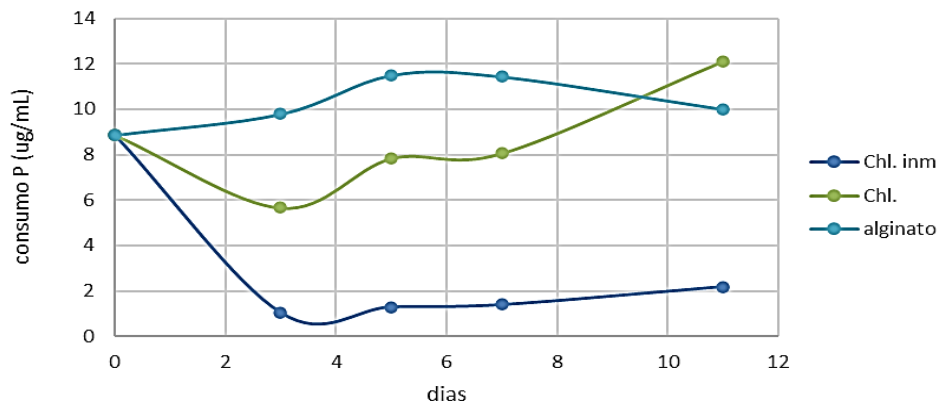


Figura 2. Consumo de nitrógeno amoniacal (A) y fósforo total, (B) en agua del Lago Lugano luego de cultivar *C. vulgaris* en suspensión (Chl.) o inmovilizadas en perlas de alginato (Chl. Inm) respecto al control de perlas de alginato sin células (Alginato). Obtenido de Trentini et al. (2017), [9].

El pH inicial en las muestras de agua del lago Lugano fue de 9, lo cual puede traer como consecuencia la formación de amoníaco y el desacople de la cadena de electrones en el fotosistema II ([10], Tabla 2). El valor de pH disminuye al finalizar el bioproceso, lo

cual reduce los riesgos de toxicidad por presencia de amoniaco.

Finalmente, también se pudo observar que en presencia de *C. vulgaris* inmovilizada hubo una reducción de la concentración de plomo (90%); cadmio (65%); cobalto (más de 50%) y cromo (50%) en el agua. De esta manera, el contenido de metales en el agua queda dentro de los valores admisibles propuestos por la "American Public Health Association" (APHA, 2005) (Tabla 2). Algunas microalgas tienen la capacidad de acumular en su interior metales pesados y de degradar algunos compuestos orgánicos. Está descrito que los metales pueden adsorberse a la pared celular de la microalga *C. vulgaris*. Los grupos químicos funcionales como amino, hidroxilo, ácidos, entre otros, de la pared celular atraen por diferencia de cargas a los metales inmovilizándolos en la superficie celular [12-15]. El proceso de inmovilización en alginato no impidió la remoción de metales de las muestras de agua.

Tabla 2. Evaluación del efecto biorremediador de *Chlorella vulgaris* sobre el agua del lago Lugano en biorreactores. Valores de referencia de APHA (2005) [11].

	Valores iniciales	bioproceso	Valores de referencia
pH	9	8,4	6,5/9
Hierro (ppm)	0,30	0,3	0,3
Cobalto (ppm)	0,08	ND	ND
Plomo (ppm)	165,00	6,0	50,0
Cadmio (ppm)	4,00	<2	10,0

CONCLUSIONES

- Nuestro modelo de contaminación ambiental fue el agua proveniente del lago Lugano, CABA. El conjunto de trabajos publicados permitió demostrar que microalgas inmovilizadas en perlas de alginato permite biorremediar estas aguas en el término de 5 días en sistemas confinados como son los Erlenmeyers y los biorreactores.
- Las ventajas de trabajar con perlas de alginato fueron facilitar la manipulación y aislamiento de las células, permitiendo su crecimiento en forma simultánea con la remoción de los elementos contaminantes medidos, en especial nutrientes inorgánicos y metales pesados.
- La tecnología se presenta como una alternativa potencialmente aplicable a espacios abiertos para su biorremediación y posterior remoción, evitando la eutrofización del sistema.

AGRADECIMIENTOS: a los estudiantes Lic. Andrea Trentini, Lic. Daniel Orozco, Ing. Juan Sanchez Novoa

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, Lebsky V, Bustillos JJ (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when coimmobilized in alginate beads with the microalgae-growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J Microbiol* 48, 514–521.
- [2] Bashan LE, Bashan Y (2008). Joint Immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant–bacterium interactions. *Appl Environ Microbiol* 74, 6797–6802.
- [3] Bashan LE, Bashan Y (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technol* 101, 1611–1627-
- [4] Perullini M, Ferro Y, Durrieu C, Jobbagy M, Bilmes SA (2014). Sol–gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors. *Journal of Biotechnology* 179, 65-70.
- [5] Durrieu C, Ferro Y, Perullini M, Gosset A, Jobbágy M, Bilmes SA (2016). Feasibility of using a translucent inorganic hydrogel to build a biosensor using immobilized algal cells. *Environmental Science and Pollution Research* 23(1), 9-13.
- [6] El-Sheekh MM, Metwally MA, Allam NG, Hendam HE (2017). Effect of Algal Cell Immobilization Technique on Sequencing Batch Reactors for Sewage Wastewater Treatment. *Int J Environ Res* 11, 603. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0053-z>
- [7] Groppa MD, Trentini A, Zawoznik M, Bigi R, Nadra C, Marconi PL (2019). Optimization of a bioremediation strategy for an urban stream of Matanza-Riachuelo basin. *Int J Environ Ecol Eng* 13, 418-424.
- [8] Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- [9] Trentini A, Groppa MD, Zawoznik M, Bigi R, Perelman PE, Marconi PM (2017). Biorremediación del lago Lugano de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires por algas unicelulares – estudios preliminares para su posterior utilización. *Terra Mundus* 4. <http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/handle/123456789/4302>.
- [10] Collos Y, Harrison PJ (2014). Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Marine pollution bulletin*, 80, 8-23.
- [11] APHA. American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Ed., Washington DC: American Public Health Association. Accessed 2005.
- [12] Monteiro CM, Castro PM, Malcata FX (2012). Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol Progress* 28, 299-311.
- [13] Kaplan, D (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In: Richmond A, Hu Q (Ed) Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology John Wiley & Sons, New York.
- [14] Ferraro G, Toranzo RM, Castiglioni DM, Lima Jr E, Mansilla MV, Fellenz NA, Bagnato C (2018). Zinc removal by *Chlorella* sp. biomass and harvesting with low-cost magnetic particles. *Algal Research* 33, 266-276.
- [15] Sayadi MH, Rashki O, Shahri E (2019). Application of modified *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* powder on the adsorption of heavy metals from aqueous solutions. *J Environ Chem Eng* 7, 103169.

Flow cytometry-assisted method for cell disruption of microalgae

Daniel Figueiredo¹, Teresa Lopes da Silva², Alice Ferreira², Alberto Reis², Luisa Gouveia^{1,2}

¹GreenCoLab - Green Ocean Technologies and Products Collaborative Laboratory, CCMAR, University of Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

²LNEG_UBB - Laboratório Nacional de Energia e Geologia IP. - Unidade de Bioenergia e Biorrefinarias, Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038, Lisboa, Portugal
Correspondence: luisa.gouveia@lneg.pt

SUMMARY

The effect of cell disruption by high-pressure homogenization can be accessed in a fast and comprehensive way by using flow cytometry, which distinguishes and quantifies disrupted, permeabilized and intact cell populations.

ABSTRACT

Cell disruption is a mandatory process to extract intracellular components of microalgae, which are useful for food, feed, agriculture, biomedical or pharmaceutical applications. A wide variety of cell disruption technologies is available, but optimization of operation parameters is required. Flow cytometry (FC) combined with viability staining dyes is a valuable tool to quickly analyze cell disruption. In this protocol, samples of *Tetrademus obliquus* that are subjected to multiple disruption conditions (e.g., high-pressure homogenization pressures and cycles) are analyzed using a flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser. Samples are stained with the viability dye SYTOX-Green, which stains DNA of membrane-compromised cells. Staining optimization is the most critical step in this protocol, since it depends heavily on species, cultivation media and cell concentration. Fluorescence data collected with Forward and Side Scatter detectors as well as the FITC (green) fluorescence detector allows the distinction of intact, membrane-permeabilized and disrupted cell populations. The distinction of cells with compromised membranes can be useful when mild-disruption applications are necessary. In conclusion, by having a faster and more reliable evaluation of cell disruption, rupturing technologies can be optimized quicker, resulting in a more efficient and cost-reduced downstream process.

INTRODUCTION

Microalgae are a sustainable alternative to produce foods, feeds, fertilizers, pharmaceuticals, or fuels, due to their potential in sequestering CO₂ and uptake of wastewater pollutants [1]. The rich biochemical composition of microalgae can be used in a biorefinery concept, where lipids, proteins, pigments, or other molecules can be separated for different applications [2]. These intracellular components are only accessible after breaking the cell wall, which in some species or growth conditions is a challenging step, often associated to high operation costs [3]. Analyzing cell disruption is then crucial to compare and optimize the available disruption technologies.

Flow cytometry (FC), a technology invented in the 1950s, is currently used to count and analyze cell functions and compartments, therefore exploring their characteristics, such as morphology, composition, metabolic activity or viability [4,5]. In a flow cytometer, samples are acquired and drained into the flow cell, where a narrow stream transports the sample into a physiological buffer called sheath fluid [6]. Cells are then directed to pass individually in the interrogation point, where each cell intercepts the lasers and emits light that is captured by the detectors (Figure 1). FC detectors measure the light scattered by the cells, such as the forward scatter (FSC), often indicated as a measure of the relative cell size and the side scatter (SSC), associated to the inner cell complexity. The flow cytometer is also equipped with fluorescence detectors, which collect the emission of a fluorescence at a specific wavelength range, by filtering unwanted wavelengths with a bandpass filter [7]. The scattered and fluorescence light is then converted to an electric signal with a specific voltage, and the data allows the multiparametric analyses of all cells. These signals, which represent events (e.g. cell, debris particle, or salts) can be gated based on two-dimensional plots, allowing the selection of subpopulations that share the same properties under the same multidimensional parameter space [6].

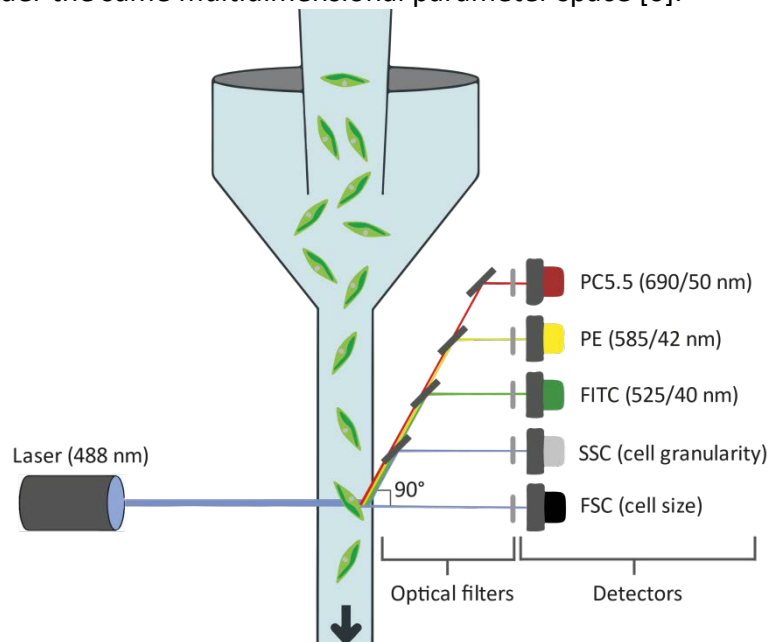


Figure 1. Schematic representation of flow cytometry with *Tetradesmus obliquus*. Cells in the flow cell are suspended in a liquid sheath fluid (represented in blue) which is constrained in a narrow tube. Light from the optical filters is directed to the forward scatter (FSC), side scatter (SSC), and the green (FITC), yellow (PE) and red (PC5.5) fluorescence detectors.

Flow cytometry is commonly used with staining of fluorescent dyes, which can detect and unravel cellular components or enzymatic activities [8]. Furthermore, without the addition of dyes, it is possible to detect microalgae cell features, such as chlorophyll, which is a fluorescent compound mainly responsible for the cell-based fluorescence, commonly designated autofluorescence [5,9]. Microalgae are easily distinguished using FC due to their large size and wide diversity, especially when compared to unicellular prokaryotes, which are smaller and less complex, therefore having lower

FSC and SSC signals. However, analyzing microalgae with FC is more challenging than the analysis of animal tissues due to their wide variety of pigments and secondary metabolites that can interfere with fluorescent staining [10]. Flow cytometry scattered light is also influenced by cell orientation, organelles, cell refractive indices, DNA content, or cultivation media⁶. Sample preparation also differs widely, as the extraction of organelles, chemical fixation or the buffer solution is often species dependent [10].

A broad list of methods including different dyes exist for microalgae applications, such as the determination of lipid content, reactive oxygen species or cell viability [7,10–13]. The detection of fluorescence-stained nuclei, where membrane-impermeable fluorochromes (e.g., SYTOX-Green, PICO Green) determine cell viability in terms of membrane integrity are the most common [10]. SYTOX-Green is an impermeable dye that only enters in cells with damaged plasma membranes, staining cell nucleic acids [14]. Cells stained with SYTOX-Green and excited with a blue laser (488 nm) emit green fluorescence colour, whereas intact cell membranes (not stained with SYTOX-Green) can be visualized as red-coloured cells, as a result of chlorophyll autofluorescence [13]. In this protocol, flow cytometry coupled with SYTOX-Green was used to analyze *Tetradismus obliquus* membrane integrity, after the microalgal culture has been subjected to disruption with a high-pressure homogenizer.

PROTOCOL

A. MICROALGAE CULTIVATION AND CELULAR DISRUPTION

Tetradismus obliquus, formerly known as *Scenedesmus obliquus* (ACOI 204/07, ACOI Culture Collection, Coimbra University, Portugal), was cultivated in piggery wastewater diluted 1:20 in a 5L bubble-column photobioreactor with a working volume of 4L for 16 days. The culture was kept at room temperature (23-25°C), under continuous artificial light conditions using fluorescent lamps (Philips TL-D). A constant light intensity of 67.6 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ was provided to the culture, which was agitated with an air flowrate of 0.7 vvm.

B. FLOW CYTOMETRY PREPARATION AND ANALYSES

1. Collect a sample from a viable microalgae culture, preferably at exponential phase to 1-5 mL tubes/Eppendorf's.
2. Incubate 1 tube of the microalga culture in a water-bath at 100 °C, for 30 min. This heat-treatment will permeabilize the microalga cell cytoplasmic membrane and is the positive control of the experiment. The negative control is the culture without any treatment.
3. Run the non-stained negative control in the flow cytometer to adjust the number of events/s, by diluting the microalgal culture with phosphate buffer saline (PBS). Flow cytometry readings of 100-150 events/s should be used.
4. Define the layout in the flow cytometer software by creating a FSC/SSC and a FITC/FSC 2-dimension dot plots.
5. Adjust the flow cytometer detector gains to both microalga culture and staining dye so that cell events appear visible within the tested fluorescence range (detector gains are not transversal to other flow cytometers). The microalga cells autofluorescence should be adjusted to the first logarithmic decade in FITC/FSC plot, so that the stained cells fluorescence can be visualised within the fluorescence range detectors.

6. If necessary, create a detection threshold below the microalga FSC or SSC plots, to disregard smaller events (e.g., bacteria or debris).
7. Prepare a 30 μM working stock solution of SYTOX-Green by dissolving it in pure dimethyl sulfoxide (DMSO).
8. Optimize the staining procedure, by testing different incubation times and stain concentrations using the positive control (heat-treated cells).
 - a. Start by studying increasing stain concentrations (e.g., 0.1-3.0 μM) at a fixed incubation time (e.g., 30 min). The optimal stain concentration should be the one that produces the highest stain FITC fluorescence.
 - b. Optimize the incubation time by incubating cells at increasing times (e.g., 1-30 min). The optimal incubation time should be the one that produces the highest stain FITC fluorescence.
9. Run both positive (heat-treated cells) and negative controls (exponential growing cells) after incubating with SYTOX-Green, using the optimized staining procedure. Run also unstained both positive and negative control samples.
10. Create the gates comprising the different *T. obliquus* sub-populations:
 - a. Select *T. obliquus* cell events from the negative control unstained, using the FSC/SSC plot to create gate 0 (G0; Figure 2a). These are the untreated cell events which typically appear as an elliptic broad spot.
 - b. Select *T. obliquus* cell events from the positive control (heat-treated cells) unstained using the FSC/SSC plot to create gate 1 (G1; Figure 2b). This gate should be at the same position as G0 and is related to cells that kept their size and internal content after sample heat-treatment. Debris from cells that lost their size and internal content due to disruption treatments will appear below this gate.
 - c. In FITC/FSC plot using the positive control stained, select the subpopulation (with all G1 backgated) that exhibits higher Sytox Green fluorescence, creating the gate 2 (G2; Figure 2c). These cells have their membrane compromised due to heat-treatment.
 - d. Compare the FITC/FSC fluorescence for both stained positive and negative controls and create gate 3 (G3), by selecting events with lower FITC fluorescence (Figure 2d). These are events that appear below G2, which relate to cells not stained with SYTOX-Green, therefore with intact cell membranes.
 - e. These controls were then used for further comparison with data obtained from HPH disruption treatment on *T. obliquus*.

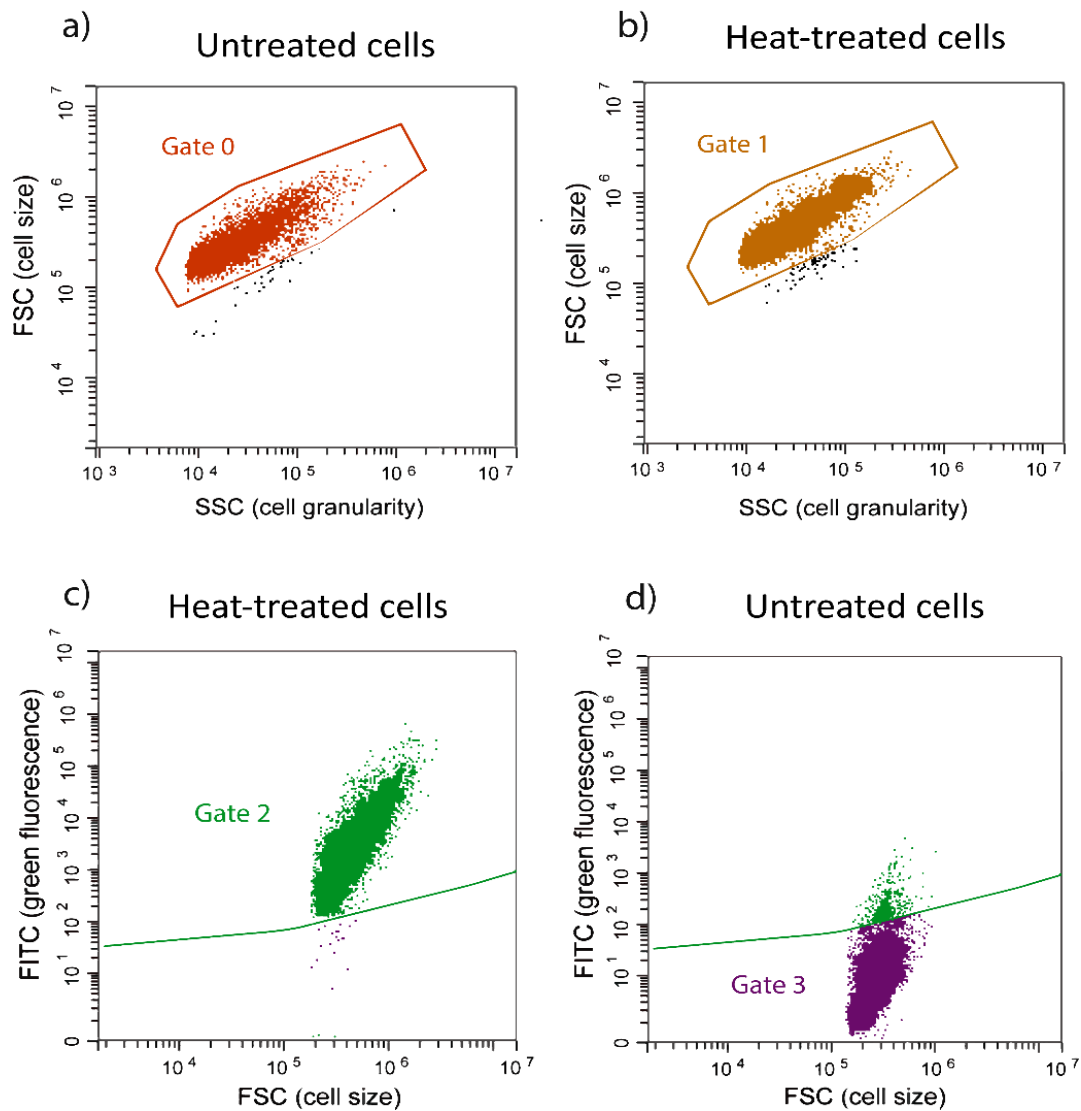


Figure 2. Flow cytometry gates for *Tetradismus obliquus* using the detectors FSC/SSC and FITC/FSC dot plots. Untreated (exponential grown) cells are used as a negative control (**a, d**) and heat-treated (dead) cells are used as a positive control (**b, c**).

11. Proceed to the cell disruption treatment. Collect samples immediately before the FC analysis, to prevent sample degradation.
12. Apply non-destructive ultrasonication to the sample tubes for 10 s to disperse microalgae aggregates, before FC analyses.
13. Dilute samples with PBS and use the already optimized staining procedure.
14. Run both stained and unstained samples to determine all cell populations.

C. DATA ANALYSES

1. Export FC data in .FSC files and run it with a compatible software.
2. Create the same population gates as in Figure 2 (G0-G3 gates). These gates are used to quantify the following microalgae cell subpopulations:
 - a. Disrupted cells, which have changed their structure, size, and internal content due to harsh HPH treatment (obtained by subtraction of G1 from G0).
 - b. Permeabilized cells, which have a compromised cytoplasmic membrane, but maintain their structure, size, and internal complexity after the HPH treatment (G2).

- c. Intact cells, which have an intact cytoplasmic membrane (G3).
3. Calculate the percentage of disrupted cells by subtracting the number of events in G1 (cells that kept their size and internal content after treatment) by the G0 events (untreated cells) and dividing it by the G0 events (Equation 1).

$$\text{Disrupted cells (\%)} = \frac{G0 \text{ events} - G1 \text{ events}}{G0 \text{ events}} * 100 \quad (\text{Equation 1})$$

4. Calculate the percentage of permeabilized cells by dividing the number of events in G2 (permeabilized cells), by the number of events in G0 (Equation 2).

$$\text{Permeabilized cells (\%)} = \frac{G2 \text{ events}}{G0 \text{ events}} * 100 \quad (\text{Equation 2})$$

5. Calculate the percentage of intact cells by dividing the number of events in G3 (intact cells), by the number of events in G0 (Equation 3).

$$\text{Intact cells (\%)} = \frac{G3 \text{ events}}{G0 \text{ events}} * 100 \quad (\text{Equation 3})$$

TABLE OF MATERIALS

Table 1. Table of materials and equipment used for the protocol, which include the company name, catalog number and description/comments.

Name of Material/ Equipment	Company	Catalog Number	Comments/Description
Cytoflex	Beckman Coulter	-	Flow cytometer
PandaPLUS 2000	GEA	-	High-Pressure Homogenizer
SYTOX-Green	Thermo Fisher Scientific	S7020	Fluorescent dye
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Honeywell	D5879-1L	For preparation of SYTOX- Green solution
Phosphate- buffered saline (PBS) tablets	Oxoid	BR0014	Dulbecco 'A' Tablets
Falcon tubes	VWR	734-0451	To collect disruption samples
Microtubes	Fisher scientific	11926955	1.5 mL Eppendorf tubes

RESULTS

By subjecting *T. obliquus* to high-pressure homogenization at different pressures (100, 350 and 600 bar) and cycles (1, 2 and 3), there is a clear impact on cell size, internal content, and membrane integrity (Table 2). The increase in pressure and cycle number decreases the number of intact cells (83.4% without HPH to 55.3-8.4% with HPH treatments), while increasing the disrupted cells (0% without HPH to 3.4-74.8% with HPH treatments). As for permeabilized cells, there is strong increase with 1 cycle (16.6% without HPH to 44.7-55.0%), followed by a decrease with 2 or 3 cycles (44.7-55.0% to 16.8-46.2%, respectively). This suggests permeabilized cells with 1 cycle are

more prone to suffer cell lysis due to the already compromised membrane. Indeed, this population decrease was accompanied with an increase in the disrupted population, especially at 350 and 600 bar (1 cycle= 3.4-28.9%; 2 and 3 cycles= 36.5-74.8%). Permeabilized cells in the untreated sample (16.6%) are a result of already membrane compromised cells, which is also evident in Figure 2c. These results confirm that the present FC protocol to evaluate cell disruption and membrane integrity of *T. obliquus* was successfully implemented.

Table 2. Cell disruption results of *Tetrademus obliquus* subject to different pressure and cycles of high-pressure homogenization. Intact, permeabilized and disrupted populations were determined using FSC, SSC, and FITC fluorescence channels. Data are shown as mean \pm standard deviation ($n=2$).

Sample	Intact cells (%)	Permeabilized cells (%)	Disrupted cells (%)	Total (%)
Untreated	83.4 \pm 0.5	16.6 \pm 0.7	0.0 \pm 0.0	100
100 bar 1 cycle	55.3 \pm 1.2	44.7 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0	100
100 bar 2 cycle	53.8 \pm 0.4	46.2 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	100
100 bar 3 cycle	34.7 \pm 0.3	36.1 \pm 0.4	29.3 \pm 18.9	100
350 bar 1 cycle	41.7 \pm 0.9	55.0 \pm 1.3	3.4 \pm 9.4	100
350 bar 2 cycle	23.9 \pm 0.1	39.5 \pm 0.1	36.5 \pm 5.4	100
350 bar 3 cycle	16.5 \pm 0.6	30.8 \pm 0.9	52.7 \pm 5.1	100
600 bar 1 cycle	25.8 \pm 0.7	45.3 \pm 1.0	28.9 \pm 3.4	100
600 bar 2 cycle	12.8 \pm 0.6	25.7 \pm 0.8	61.6 \pm 1.6	100
600 bar 3 cycle	8.4 \pm 0.1	16.8 \pm 0.1	74.8 \pm 0.8	100

There are constrains that may compromise the accuracy of the method, such as not using optimal staining conditions (Figure 3). The inability to stain compromised membranes makes the intact and permeabilized gates undistinguishable. This often leads to underestimation on the proportion of permeabilized cells which compromises the method. To overcome this, staining optimization can be performed with a heat-treated microalga sample, by increasing dye concentrations to the point no increase in FITC fluorescence is observed. This concentration should be compatible with all samples, including all cell concentrations and media types. If using different media composition and cell concentrations, it might be relevant to check interferences on staining by boiling samples and using them as positive controls. If equal FITC fluorescence among samples is observed, then the staining is not impaired.

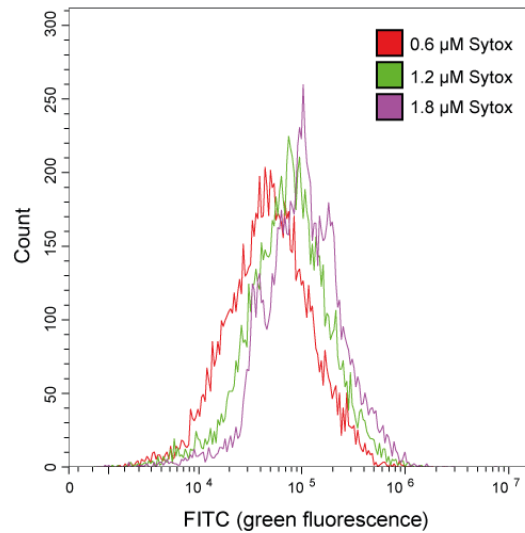


Figure 3. Flow cytometry histogram for staining optimization showing different concentrations of SYTOX tested on *Tetrademus obliquus* dead cultures (positive control), using the FITC channel.

Another concern is the cultivation media and cell suspension (broths) affecting FC analyses due to organic contamination (e.g., bacteria or debris) or salt precipitates overlapping with the microalga populations. Wastewater such as piggery wastewater (PWW) contains events with similar FSC fluorescence to *T. obliquus* untreated cells. This media contamination still overlaps with the untreated *T. obliquus* gate (G0 contains 1.4% PWW media) and is highly visible below this gate in both media (Figure 4a), and *T. obliquus* untreated and treated samples (Figure 4b and Figure 4c, respectively).

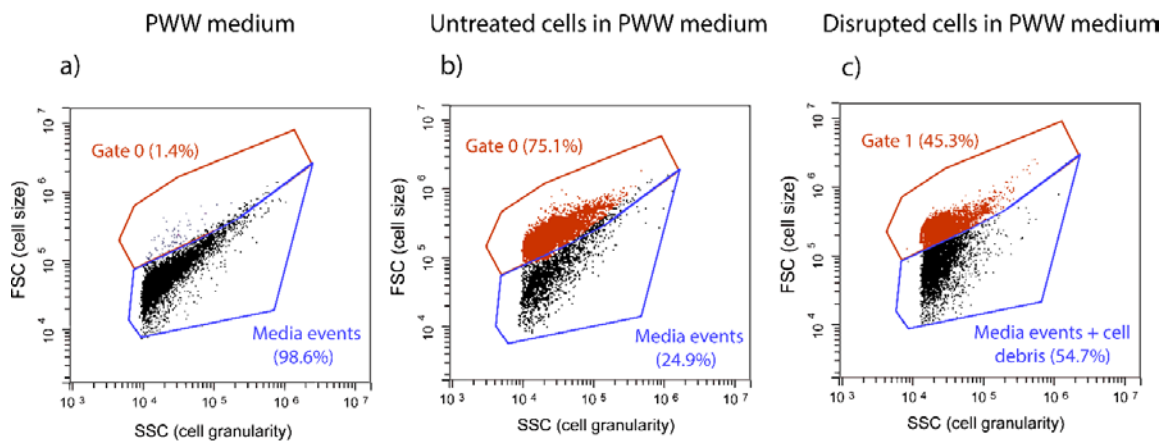


Figure 4. Flow cytometry populations gates present in (a) piggery wastewater (PWW) media, (b) untreated cells in PWW media, and (c) disrupted cells in PWW media using FSC/SSC dot plots.

Running only media without cells previously to the cell analysis is a recommendable practise to check if particles contamination overlaps with any of the microalga population gates. If so, the overlapping media events can be subtracted using cell concentration events ([events]), as exemplified for a disrupted population (Equation 4). The same subtraction logic applies for intact and permeabilized cell populations.

$$\text{Disrupted cells (\%)} = \frac{G0 [\text{events}] - G1 [\text{events}] - G0 \text{ media} [\text{events}]}{G0 [\text{events}]} * 100 \quad (\text{Equation 4})$$

Other concerns can occur, such as cell toxicity caused by high concentrations of the staining dye solvent (e.g., acetone or DMSO). Nevertheless, unexpected changes in FSC/SSC or FITC fluorescence can be detected when optimizing dye concentration. Also changes in the microalga autofluorescence can occur while keeping samples waiting for analyses. Immediate FC analyses after sample treatment can prevent this.

DISCUSSION

Evaluating cellular disruption is usually performed using microscopic manual count, gravimetric analyses or flow cytometry [15]. While manual count and gravimetric analyses are time-consuming and often lead to underestimations, flow cytometry is recognized as a powerful tool to analyze the cell disruption yield in a quick and accurate manner [16]. Different FC protocols have been conducted, either using non-staining options [15] or combining the use of viability dyes, such as SYTOX-Green or propidium iodide [17,18]. While the first are an easy and safe procedure to evaluate cell disruption, a closer view at the membrane permeability is only achieved using viability dyes.

Optimizing the dye staining parameters and its working stock solution are the most critical steps of this procedure, as fluorescence deviations can compromise results. The dye staining time, concentration and solvent for the working stock solution require careful validation and should be adjusted to the microalga, cell concentration and cultivation media. A common concern in this protocol are the overlapping events caused by media composition or contamination. While these could be avoided with appropriate subtraction in the data analysis, biological contamination already in the culture with equal microalgae FSS and FSC signal, require other selecting procedures. For example, if this contamination is from non-autotrophs (e.g., fungi or bacteria), the red fluorescence detector can be used to select only microalga cells, as chlorophyll fluorescence set events to higher red fluorescence levels.

SYTOX-Green gives information about cell membrane integrity, by differentiating between intact and permeabilized cells but adds no more information about cell viability (e.g., metabolic activity). Nevertheless, SYTOX-Green analyses can be complemented with the use of carboxyfluorescein diacetate (CFDA) which gives a gradient on cellular metabolic activity, or with 3,3-dihexylocarbocyanine iodide (DiOC6(3)), which gives information on the cell membrane electric potential [19]. Another limitation of this method could be FC associated costs, which are high for equipment and consumables [20]. Nevertheless, simpler and cheaper cytometers can be found in the market with cell viability evaluation capabilities [21].

In summary, this method represents a robust platform to rapidly analyze microalgae membrane integrity and disruption. This information is useful to optimize the disruption efficiency of different rupture mechanisms towards the desired disruption outcome. Ultimately, optimizing disruption parameters and understanding cell lysis is important to achieve a more efficient and less costly bioprocess, while being particularly important to food, feed, or agricultural applications.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was financially supported by: (i) project ALGAVALOR - Lisboa-01-0247-FEDER-035234, funded by national funds (supported by COMPETE2020, Lisboa 2020, and Algarve 2020), through the European Regional Development Fund (ERDF); (ii) Biomass and Bioenergy Research Infrastructure (BBRI)- LISBOA-01-0145-FEDER-022059, funded by national funds (PORTUGAL2020, Lisboa 2020, and Norte 2020) through ERDF; (iii) PERFORMALGAE - ALG-01-0247-FEDER-069961 supported by national funds (COMPETE2020, CRESCE Algarve 2020) through ERDF; (iv) and Red CYTED P319RT0025 - RENUWAL - Red Iberoamericana para el Tratamiento de Efluentes con Microalgas. Alice Ferreira is pleased to acknowledge her PhD grant no. SFRH/BD/144122/2019 awarded by Fundação para a Ciência e Tecnologia. The authors express their gratitude to Graça Gomes and Natércia Sousa (LNEG) for laboratorial assistance.

DISCLOSURES:

The authors declare they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] Bhalamurugan GL, Valerie O, Mark L (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. *Environmental Engineering Research* 23, 229-241.
- [2] Ferreira A, Ribeiro B, Ferreira AF, et al. (2019). Scenedesmus obliquus microalga-based biorefinery – from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers – aiming at a circular bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 13(5), 1169-1186.
- [3] Günerken E, D’Hondt E, Eppink MHM, Garcia-Gonzalez L, Elst K, Wijffels RH (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances* 33, 243-260.
- [4] Andersen, R. A. (Ed.). (2006). Algal culturing techniques. Elsevier.
- [5] Hyka P, Lickova S, Přibyl P, Melzoch K, Kovar K (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances* 31, 2-16.
- [6] Pereira H, Schulze PSC, Schüler LM, Santos T, Barreira L, Varela J (2018). Fluorescence activated cell-sorting principles and applications in microalgal biotechnology. *Algal Research* 30, 113-120.
- [7] Silva TL, Roseiro JC, Reis A (2012). Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology* 30, 225-232.
- [8] McKinnon KM (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* 120, 5-11.
- [9] Marie D, Rigaut-Jalabert F, Vaultot D (2014). An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry Part A*. 85, 962-968.
- [10] Čertnerová D, Galbraith DW (2021). Best practices in the flow cytometry of microalgae. *Cytometry Part A*. 99, 359-364.
- [11] Rumin J, Bonnefond H, Saint-Jean B, et al. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels* 8, 1-16.

- [12] Dias C, Gouveia L, Santos JAL, Reis A, Silva TL (2020). Using flow cytometry to monitor the stress response of yeast and microalgae populations in mixed cultures developed in brewery effluents. *Journal of Applied Phycology* 32, 3687-3701.
- [13] Bernaerts TMM, Gheysen L, Foubert I, Hendrickx ME, Van Loey AM (2019). Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. *Algal Research* 42, 101616.
- [14] Thakur S, Cattoni DI, Nöllmann M (2015). The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent. *European Biophysics Journal* 44, 337-348.
- [15] Günerken E, D'Hondt E, Eppink M, Elst K, Wijffels R (2017). Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella* sp. during bead milling. *Algal Research* 25, 25-31.
- [16] Medwid RD, Krebs L, Welch S (2018). Evaluation of *Escherichia coli* cell disruption and inclusion body release using nucleic acid binding fluorochromes and flow cytometry. *43*, 777-782.
- [17] Sato M, Murata Y, Mizusawa M, Iwahashi H, Oka S (2004). A simple and rapid dual-fluorescence viability assay for microalgae. *Microbiol Cult Coll* 20, 53-59.
- [18] Franklin NM, Adams MS, Stauber JL, Lim RP (2001). Development of an Improved Rapid Enzyme Inhibition Bioassay with Marine and Freshwater Microalgae Using Flow Cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40, 469-480.
- [19] Freitas C, Nobre B, Gouveia L, Roseiro J, Reis A, Silva TL (2004). New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry* 49, 554-562.
- [20] Lee H, Oh J-H, Choe S (2020). Development of a Compact Optical Measurement System to Quantify the Optical Properties of Fluorescently Labeled Cervical Cancer Cells. *Engineering Proceedings* 2, 15.
- [21] Lulijwa R, Alfaro AC, Merien F, et al. (2019). Characterisation of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) blood and validation of flow cytometry cell count and viability assay kit. *Fish & Shellfish Immunology* 88, 179-188.

Conjugación triparental en cianobacterias

Sara Baldanta Callejo¹, Govinda Guevara¹, Juana María Navarro Llorens¹

¹Grupo de Ingeniería metabólica Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España
Correspondencia: joana@bio.ucm.es

RESUMEN

En este capítulo se presenta un protocolo de conjugación en gotas o “spots” basado en el desarrollado por Elhai, J., & Wolk, C. P. (1988) [1] con modificaciones.

En la conjugación triparental, un plásmido al que llamamos cargo, se moviliza de una primera bacteria a una tercera a través de una cepa auxiliar que porta un plásmido conjugativo y que ayuda a la transferencia. Este protocolo de conjugación triparental, se ha probado con éxito en *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 y *Chroococcidiopsis* sp.

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias son organismos procariotas que comparten características con las bacterias gram-negativas (como la pared celular) y con algas eucariotas como la capacidad de realizar la fotosíntesis. La aplicación biotecnológica de las cianobacterias es un campo de reciente interés, pero es necesario contar con herramientas de manipulación genética [2-4]. El siguiente protocolo de conjugación triparental es uno de los métodos de transferencia de material genético, junto a la electroporación y la transformación natural, que más se utilizan en las cianobacterias [5].

En este proceso, se distingue a la cepa donante (“donor”) que es la *E. coli* que porta el plásmido de amplio rango de huésped (cargo) que se desea transferir a la cianobacteria y a la cepa auxiliar (“helper”) que es la cepa de *E. coli* que porta el plásmido conjugativo (pRL443 / pRK2013 / pRK600) que va a promover la transferencia del cargo a otras bacterias. Este plásmido conjugativo no debe ser capaz de replicarse en la cianobacteria. La cepa receptora (“Recipient”) es la cianobacteria a la que se quiere transferir el cargo.

La selección, tanto en *E. coli* como en la cianobacteria receptora, requiere del uso de diferentes antibióticos o marcadores. El cargo debe contener un gen de resistencia que permita seleccionar las cepas de *E. coli* y, tras la conjugación, de las cianobacterias que lo portan; por otra parte, aunque se use el mismo antibiótico para ambas, la *E. coli* no crece en BG11 (el medio de cultivo de la cianobacteria) porque es un medio pobre y no tiene una fuente de carbono

MATERIALES

Los materiales se muestran en la Figura 1, y son:

- Placas de BG11 con agar al 1,5-2% (p/v) y el antibiótico de interés para la cianobacteria.
- Placas de BG11 con agar al 1,5-2% (p/v) con LB al 5% (v/v).
- Filtros para transferencia de Immobilon-NC HATF de 85 mm, poro de 0,45 µm

autoclavados.

- *E. coli* HB101 (preferentemente, también sirve DH10B) con el plásmido conjugativo (pRL443 / pRK2013 / pRK600).
- *E. coli* HB101 (preferentemente, también sirve DH10B) con el plásmido cargo de interés. Opcional: además del cargo, puede contener el plásmido helper pRL623, que contiene tres metilasas de *Anabaena* sp. PCC 7120 y los genes *mob*. El helper pRL623 es estrictamente necesario cuando se conjuga *Anabaena*.
- Los plásmidos cargo deben llevar un oriT o bien los genes *mob* en el caso de no usar el plásmido pRL623.
- Pinzas y tijeras de acero inoxidable estériles.
- Incubadora a 30°C con 100 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz blanca continua.
- Centrífuga de mesa.
- Micropipeta p20, p200 y p100.
- Puntas estériles de micropipeta.

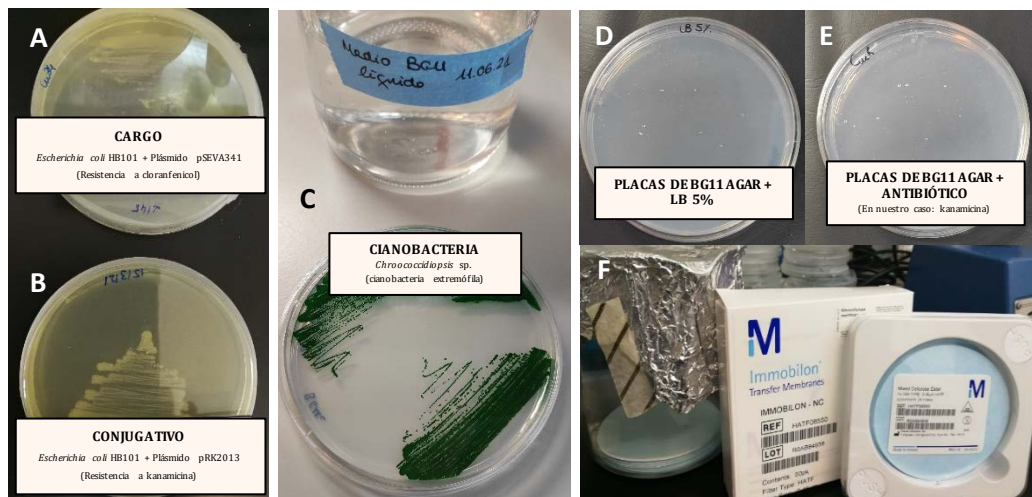


Figura 1. Materiales empleados en la conjugación triparental. Cepas de *E. coli* cargo (A) y conjugativa (B); cianobacteria a conjugar y medio BG11 (C); placas de agar en BG11 con LB al 5% y placas de agar en BG11 con el antibiótico de selección del cargo (D); Membranas para la conjugación (E).

PROCEDIMIENTO

NOTAS

Teniendo en cuenta el número de conjugaciones que se vayan a realizar, se debe calcular la cantidad necesaria de *E. coli* que se va a necesitar: 1 mL de cargo y 0.75 mL de conjugativo permiten realizar 6 gotas o spots de 10 μL de la mezcla.

La preparación de las *E. coli* debe realizarse en esterilidad al mechero o en campana, extremando la precaución para evitar contaminaciones. Todo el trabajo con cianobacterias, tanto la preparación como la conjugación, debe realizarse en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

En cuanto a la fase de crecimiento de la cianobacteria, es preferible emplear cultivos en fase exponencial temprana. Por otro lado, para las cianobacterias filamentosas se recomienda sonicar el cultivo antes de realizar la conjugación.

1. Preparación de *E. coli* (Figura 2)

- 1.1. Poner a crecer los cultivos de la *E. coli* cargo y la *E. coli* conjugativa con LB más el respectivo antibiótico en un matraz y dejar crecer O/N. El volumen dependerá del número de conjugaciones que se desee hacer.
- 1.2. Al día siguiente, pasar a un eppendorf y centrifugar a 15000 rpm durante 1 min. Para mantener las proporciones óptimas entre la cepa cargo y la conjugativa, se centrifugan 2 mL para las *E. coli* con el cargo y 1.5 mL para las *E. coli* que llevan el plásmido conjugativo.
- 1.3. Resuspender con una pipeta cada pellet en LB sin antibióticos con cuidado y sin usar vórtex.
- 1.4. Lavar cada pellet dos veces con LB sin antibiótico, centrifugando en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.
- 1.5. Resuspender cada pellet en 500 μ L de LB.
- 1.6. Mezclar en un eppendorf estéril 250 μ L de la cepa cargo más 250 μ L de la cepa conjugativa.
- 1.7. Centrifugar la mezcla 15000 rpm durante 1 min.
- 1.8. Quitar el sobrenadante con pipeta con cuidado y resuspender el pellet despacio con pipeta en LB, sin usar vórtex.
- 1.9. Hacer un último lavado con 500 μ L de LB sin antibiótico.
- 1.10. Resuspender el pellet en 60 μ L de LB sin antibiótico.
- 1.11. Mantener a 37°C al menos 1 hora, mientras se preparan las cianobacterias.

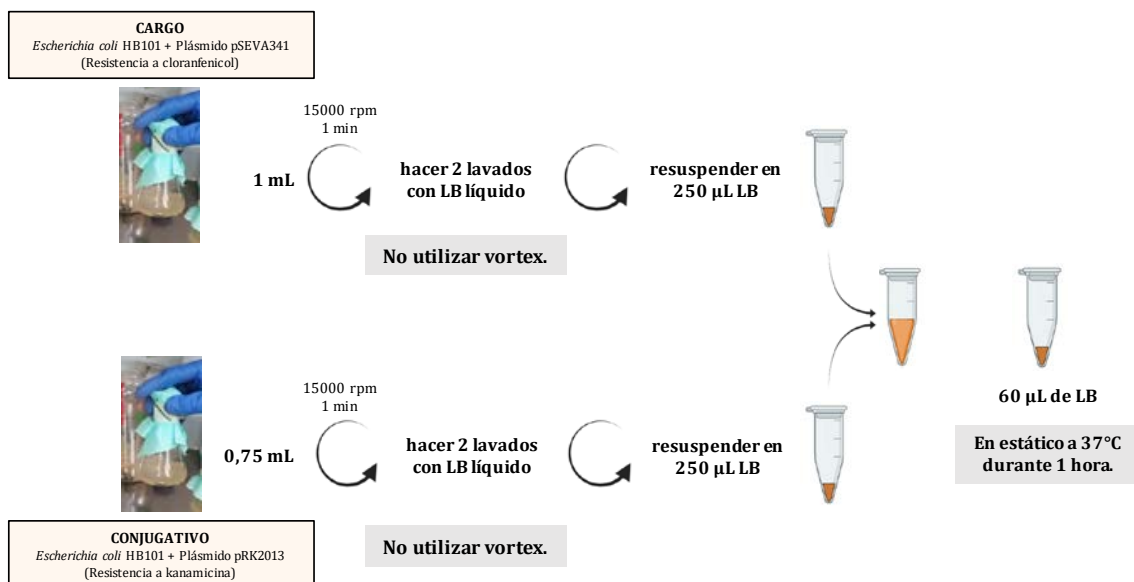


Figura 2. Preparación de los cultivos de *E. coli* para el proceso de conjugación.

2. Preparación de las cianobacterias

Protocolo empleado con *Synechocystis* sp. y *Synechococcus elongatus*.

- 2.1. Tras crecer la cianobacteria en el medio BG11, medir la OD_{750nm} del cultivo.

- 2.2. Centrifugar a 5000 rpm durante 15 min a 15°C.
- 2.3. Resuspender el cultivo en un volumen mínimo de BG11 (unas 10 veces menos que el volumen inicial).
- 2.4. Medir la DO_{750nm} del pellet (es necesario diluir antes de medir). Si no se alcanza al menos una DO de 16, volver a centrifugar más cultivo de cianobacteria para incrementar biomasa.
- 2.5. Preparar las diluciones necesarias para la conjugación. Cada dilución se prepara en un Eppendorf estéril diferente. Preparar DO₇₅₀ 16, 8, 0'8, 0'08, 0'008 preparadas en medio BG11. Si no se quieren hacer tantas pruebas, con tener diluciones a partir de 0'8 podría ser suficiente.

Protocolo empleado con *Anabaena* sp.

- 2.1. Medir la DO_{750nm} del cultivo (opcional, no es necesario que esté a una DO concreta).
- 2.2. Revisar al microscopio la longitud de los filamentos
- 2.3. Sonicar en ciclos de 30 segundos en el baño (30 segundos en hielo y reduciendo la luz sobre el matraz).
- 2.4. Tras considerar filamentos cortos adecuados para la conjugación, dejar 4 horas en estático con luz reducida.
- 2.5. Centrifugar a 5000 rpm durante 15 min a 15°C.
- 2.6. Resuspender en el mismo volumen de BG11.
- 2.7. Centrifugar a 5000 rpm durante 15 min a 15°C.
- 2.8. Resuspender el cultivo en un volumen mínimo (10 veces menos).
- 2.9. Medir la DO_{750nm} del pellet (es necesario diluir antes de medir). Si no se alcanza al menos una DO de 16, volver a centrifugar más cultivo de cianobacteria para incrementar la biomasa.
- 2.10. Preparar las diluciones necesarias para la conjugación. Cada dilución se prepara en un Eppendorf estéril diferente. Preparar DO_{750nm} 16, 8, 0'8, 0'08, 0'008 preparadas en medio BG11. Si no se quieren hacer tantas pruebas, con tener diluciones a partir de 0'8 podría ser suficiente.

3. Conjugación triparental (Figura 3)

Todo este proceso se debe hacer en una campana de esterilidad.

- 3.1. Poner la membrana, previamente esterilizada p.e en un vaso, sobre el medio BG11 agar con 5% LB (v/v) en placa. Dejar que la membrana esté totalmente empapada y pegada al medio. Revisar que no queden burbujas de aire entre el medio y la membrana.
- 3.2. En una placa estéril vacía depositar 10 µL de la mezcla de *E. coli* (preparadas en la parte uno del protocolo) y 10 µL de la cianobacteria por cada dilución (preparadas en la parte dos del protocolo).
- 3.3. Mezclar despacio con pipeteo suave.
- 3.4. Coger 10 µL y depositarlos en forma de gotas (spots) en la membrana.

- 3.5. Colocar la placa en la incubadora a 30°C con 100 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz blanca continua.
- 3.6. A las 24/48 horas se cambia el filtro por medio del uso de pinzas estériles a una placa de BG11 con antibióticos.
- 3.7. Para *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Chroococcidiopsis* sp. y *Anabaena* sp. PCC 7120 se debe esperar 48 horas antes de pasarlas a la placa de BG11 con antibióticos, mientras que para *Synechococcus elongatus* PCC 7942 bastan 24 horas.
- 3.8. Usar pinzas estériles. Si se desean mezclar plásmidos con distintas resistencias, cortar la membrana con tijeras estériles.
- 3.9. Dependiendo del éxito de la conjugación, se tarda más de 1 semana en ver transformantes.
- 3.10. Cambiar cada 7-10 días el filtro a una nueva placa con antibióticos.

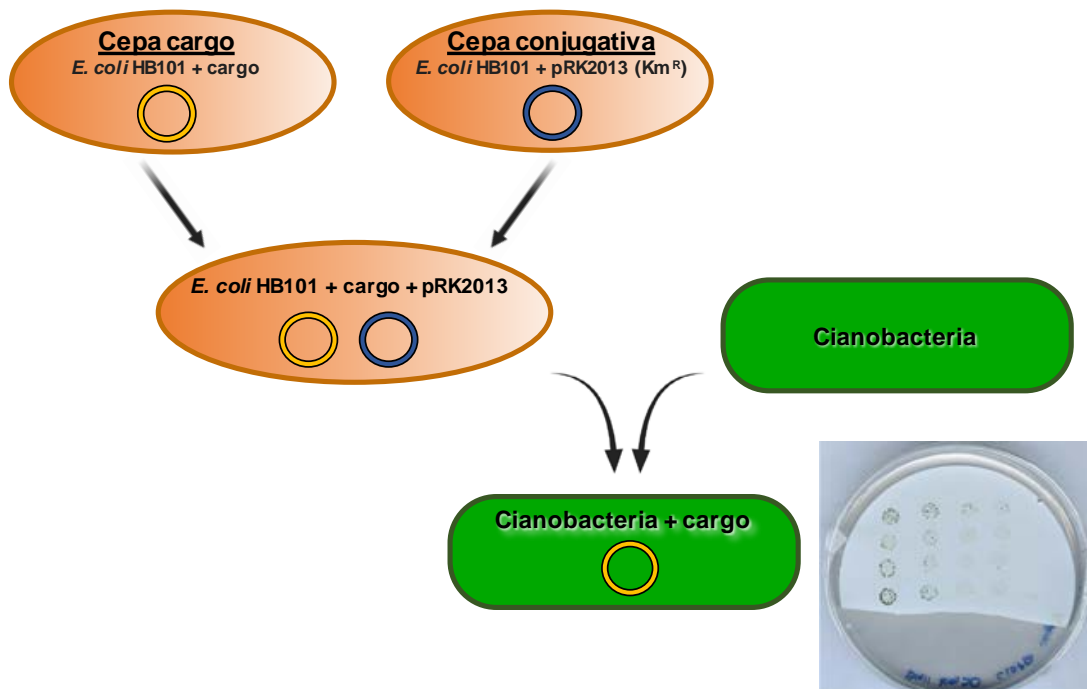


Figura 3. Esquema del proceso de conjugación.

RESULTADOS

pSL2773 (Figura 4) es un plásmido que permite la edición genética de cianobacterias [6]. Como ejemplo representativo de la conjugación triple, se va a proceder a la conjugación de la cepa modelo de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (donado por el Dr. Luis López-Maury del IBVF-CSIC, Sevilla, España) con el plásmido pSL2773 (obtenido en el laboratorio a partir del vector pSL2680 procedente de Himadri Pakrasi (Addgene plasmid # 85581; <http://n2t.net/addgene:85581>; RRID:Addgene_85581). *Synechocystis* 6803 se cultivó en medio BG11 a pH 7.5 y 10 mM de Hepes a 30°C y a 100 $\mu\text{mol foton} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de luz blanca.



Figura 4. Esquema del plásmido pSL2773.

El proceso de conjugación se llevó a cabo como ya se ha detallado anteriormente. La cepa de *E. coli* HB101 que porta al plásmido conjugativo pRK2013 se utilizó como cepa conjugativa; por otra parte, la cepa HB101 que porta al plásmido pSL2773 se utilizó como cepa cargo. Se dejaron crecer O/N y se mezclaron la cepa cargo y la conjugativa en una proporción 2:1.5 respectivamente. Después de los lavados de la mezcla, se resuspendió el pellet en un volumen pequeño (unas 16 veces más reducido que el volumen inicial de cultivo, de 2 mL a 120 μ L de LB sin antibióticos) y se dejó reposar una hora a 37°C.

Por otra parte, cuando la cianobacteria ha alcanzado una densidad de crecimiento visible (en torno a una DO_{750nm} de 1-3), se preparó una serie de diluciones para la conjugación, desde 14 (DO tras centrifugar y concentrar el cultivo) hasta 0'008 en medio BG11 estéril. Seguidamente, se mezclaron 10 μ L de la mezcla de *E. coli* y otros 10 μ L de la cianobacteria, y 10 μ L de la mezcla se depositaron en la membrana de conjugación previamente colocada en el medio de las placas de BG11 con 5% LB y sin antibióticos. Las membranas con los spots se dejaron 48 horas incubando a 30°C bajo una luz continua de 100 μ mol fotones \cdot m⁻² \cdot s⁻¹. Seguidamente, se transfirió la membrana a una placa de BG11 agar suplementada con 50 μ g/mL de kanamicina. Las colonias aparecieron tras unos 8 días de incubación (Figura 5 A).

La comprobación del proceso de conjugación se realiza mediante una PCR (Figura 5 B) para lo cual se usaron los oligos AL034 (5'-GGTAGCGTTGCCAATGATGT) y AL035 (GGCAAGATCCTGGTATCGGT).

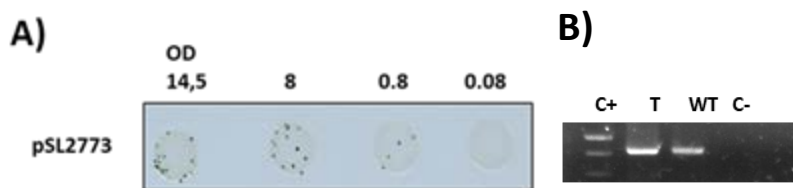


Figura 5. Resultados de la conjugación triparental de *Synechocystis* con el plásmido pSL2773. A. Colonias obtenidas tras la conjugación triparental. Se testaron diferentes densidades ópticas a 750nm en BG11 agar con Kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B. Confirmación por PCR de transformantes con el plásmido pSL2773. La detección del vector se realizó con los Oligos AL034 y AL035 que amplifican la resistencia a kanamicina. Muestras C+: control positivo (plásmido); T: DNA de un clon positivo; WT: cianobacteria sin transformar; C-: control negativo de PCR (sin DNA).

Tabla 1. Plásmidos y *E. coli* de interés para la conjugación.

Antibiótico	Cepa	Plásmido	Interés
Km ^R	<i>E. coli</i> HB101	pRK2013	Contiene los genes <i>tra</i> permitiendo la transferencia de plásmidos mediante conjugación. <i>supE44</i> , $\Delta(\text{mcrC-mrr})$, <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>
Km ^R	<i>E. coli</i> HB101	pSL2773	Cepa HB101 de <i>E. coli</i> con el plásmido pSL2773.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a la red iberoamericana Cytel Renuwal, al Proyecto ALGATEC-CM (P2018/BAA-4532) cofinanciado por los Fondos Sociales europeos y al Proyecto SETH (RTI2018-RTI2018-094399-A-I00). S.B. ha participado con una beca predoctoral de la UCM, "Universidad Complutense de Madrid".

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] Elhai J, Wolk CP (1988). Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 747-54. doi: 10.1016/0076-6879(88)67086-8. PMID: 3148842.
- [2] Khalifa SAM, Shedid ES, Saied EM, Jassbi AR, Jamebozorgi FH, Rateb ME, Du M, Abdel-Daim MM, Kai GY, Al-Hammady MAM, Xiao J, Guo Z, El-Seedi HR (2021). Cyanobacteria-From the Oceans to the Potential Biotechnological and Biomedical Applications. *Mar Drugs.* 19(5), 241. doi: 10.3390/md19050241. PMID: 33923369.
- [3] Ng IS, Keskin BB, Tan SI (2020). A Critical Review of Genome Editing and Synthetic Biology Applications in Metabolic Engineering of Microalgae and Cyanobacteria. *Biotechnol J.* 15(8):e1900228. doi: 10.1002/biot.201900228. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32080963.
- [4] Wang F, Gao Y, Yang G (2020). Recent advances in synthetic biology of cyanobacteria for improved chemicals production. *Bioengineered.* 11, 1208-1220. doi: 10.1080/21655979.2020.1837458. PMID: 33124500.
- [5] Vioque A (2007). Transformation of cyanobacteria. *Adv Exp Med Biol.* 616, 12-22. doi:

10.1007/978-0-387-75532-8_2. PMID: 18161487.

- [6] Ungerer J, Pakrasi HB (2016). Cpf1 Is A Versatile Tool for CRISPR Genome Editing Across Diverse Species of Cyanobacteria. *Sci Rep.* 21, 39681. doi: 10.1038/srep39681. PMID: 28000776; PMCID: PMC5175191.

Determinación de fosfato disuelto e intracelular en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis* orientados a la producción de lípidos neutros para biodiesel

Ana M. Martínez¹, Lucas A. Martín^{2,3}, Cecilia A. Damiani^{2,3}, Paolo M. Díaz Godoy², Patricia I. Leonardí^{2,3}, Cecilia A. Popovich^{2,3,4*}

¹Departamento de Química - Instituto de Química del Sur (UNS-CONICET). Universidad Nacional del Sur. Alem 1253. B 8000, Bahía Blanca, Argentina.

²Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA). Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) CONICET-UNS, Camino La Carrindanga, Km

³Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. UNS, San Juan 670, B 8000, Bahía Blanca, Argentina.

⁴Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs. As (CIC-UPSO) Ciudad de Cali 320, B8000, Bahía Blanca, Argentina.

Correspondencia: bmpopovi@criba.edu.ar (Cecilia A. Popovich)

RESUMEN

Este protocolo describe el procedimiento para determinar el contenido intracelular de fosfato en una diatomea marina y fosfato disuelto en el medio de cultivo.

El tratamiento de aguas residuales es una necesidad emergente ante el aumento de la población humana y la actividad industrial. Un problema para resolver en los actuales sistemas de tratamiento es la captación de nitrógeno y fósforo. Algunas especies de diatomeas acumulan altas concentraciones de nutrientes intracelularmente. La rápida incorporación de fosfato y su almacenamiento en vacuolas resulta en una potencial aplicación del cultivo en medios de aguas residuales, como biotratamiento terciario. En este trabajo, el cultivo de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis* está orientado a promover la acumulación de lípidos neutros para la obtención de biodiesel, sin embargo, el procedimiento analítico descrito para el seguimiento de la concentración de fosfato es aplicable a otros fines del cultivo. Determinar la concentración intracelular presenta varios puntos críticos. Se propone la estimación experimental de la concentración de fósforo, de la concentración microalgal y del biovolumen. Se obtuvieron resultados satisfactorios y adecuados para la comparación entre las distintas fases del cultivo.

INTRODUCCION

El aumento de la población humana y de la actividad industrial genera cada vez más cantidad de efluentes residuales que necesitan ser tratados. Por otro lado, la escasez de los recursos hídricos incentiva la necesidad de recuperar las aguas residuales para distintos usos. La eliminación de la materia orgánica es uno de los aspectos más controlados en el proceso de depuración. No ocurre lo mismo con la eliminación del nitrógeno (N), fósforo (P) y otras sales disueltas que involucra metodologías más complejas. Las aguas residuales con altas concentraciones de N y P son una causa

importante de eutrofización en los cuerpos de agua naturales donde son vertidas, y representan un recurso inadecuado para su reutilización. En general, los tratamientos terciarios convencionales eliminan estos nutrientes, pero a expensas de un alto consumo de energía y baja eficiencia, a lo que debe sumarse la pérdida de estos elementos para el sistema productivo comercial. En contraposición, la utilización de microalgas se presenta como un bio-tratamiento terciario alternativo de gran interés a nivel mundial [1,2] debido a su alta eficiencia de remoción de nitrógeno y fósforo (entre un 80% y 100%). Además, estos microorganismos tienen la capacidad de transformar estos nutrientes en biomasa con potenciales aplicaciones industriales. En particular, algunas especies de diatomeas sometidas a altas concentraciones de nutrientes tienen la capacidad de acumular nitrato, fosfato y silicatos en vacuolas como una forma de reserva [3]. Muchas especies también pueden sintetizar lípidos, péptidos, aminoácidos, pigmentos antioxidantes y fitoesteroles [4]. Así, la biomasa producida a partir de efluentes residuales y bajo un concepto de biorrefinería puede representar una fuente de materia prima de interés para industrias de biofertilizantes, biocombustibles y alimento para animales, entre otros. Además, la depuración de los efluentes representa una ventaja ambiental y económica al permitir la reutilización del agua para otros fines comerciales de una manera sustentable.

En particular, en el presente trabajo se describe el protocolo de determinación de fosfatos disuelto e intracelular de la diatomea *Halamphora coffeaeformis* cultivada en agua de mar con fines bioenergéticos. Esta metodología puede ser de utilidad en cultivos de diatomeas en aguas residuales con altas concentraciones de fosfatos, para evaluar tanto la remoción del fosfato disuelto como también para analizar el almacenamiento del fosfato intracelular.

PROTOCOLO

DETERMINACION DE FOSFATO

La estimación de la concentración de fosfato se realiza según Murphy y Riley [5], sobre alícuotas previamente filtradas por filtros de fibra de vidrio de 0,7 μm de poro (GF/F). El método empleado se basa en reacciones específicas para el ión ortofosfato, que reacciona en medio ácido con el molibdato de amonio y el tartrato de antimonio potasio para formar ácido fosfomolibdico. Este heteropoliácido es reducido por ácido ascórbico a azul de molibdeno, detectado a $\lambda=885$ nm en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60 empleando celdas de 1 cm. El segmento de calibración empleado es de 0,3 – 10 μM .

1. Preparación del material

1.1 Preparar una disolución de ácido clorhídrico (HCl) al 10% agregando 100 mL de HCl al 32-36% a 900 mL de agua ultrapura para lograr un volumen final de 1 L. Guarde en recipiente de polietileno de alta densidad (HDPE). **PRECAUCIÓN:** disponga de los elementos de seguridad personal para manipulación de corrosivos. Evite que los vapores se liberen en el área de trabajo. Adicione lentamente el ácido al agua para evitar salpicaduras y aumento de la temperatura.

1.2 Lave todo el material a emplear en el laboratorio y en el muestreo con detergente libre de fosfato, enjuague con abundante agua y deje en remojo en HCl 10% durante 2 horas. Enjuague con agua ultrapura y mantenga el material reservado. Asegúrese que no queden restos ácidos en el material. **PRECAUCIÓN:**

disponga de los elementos de seguridad personal para corrosivos. Use guantes y evite las salpicaduras en la piel, use protección de ojos y rostro.

1.3 Coloque los filtros de fibra de vidrio en sobres de papel aluminio individuales y coloque en la mufla los sobres abiertos. Combustione a 450°C durante 4 horas. Cierre los sobres para almacenar en lugar seco hasta su uso.

1.4 Emplee pinzas y guantes libres de polvo para manipular los filtros y el material.

1.5 Disponga de agua de mar artificial. Ajuste la salinidad a la salinidad del cultivo en caso de ser necesario.

2. Toma de muestras y filtrado

2.1. Defina si empleará muestra única, duplicados o más y tome muestras independientes y representativas en los frascos de muestreo.

2.2. Traslade los frascos con las muestras cerrados, al abrigo de la luz y en lugar fresco hasta el laboratorio.

2.3. Coloque un filtro de fibra de vidrio de 0,7 μm de tamaño de poro previamente acondicionado en el portafiltro y enjuague con agua de mar artificial.

2.4. Coloque un tubo para colectar el filtrado o cambie el kitasato por uno limpio.

2.5. Filtre, a presión reducida (1/8 atm), un volumen exactamente medido de la alícuota de muestra. En general 10,00 mL puede ser suficiente, dependiendo de la densidad del cultivo. Descarte como lavado los primeros mL del filtrado colectados en el tubo.

2.6. Retire el tubo con el filtrado y reserve para la cuantificación de fosfato en el medio de cultivo. Guarde a -20 °C hasta su análisis.

2.7. Enjuague el filtro con el material retenido antes de retirarlo del portafiltro, haciendo pasar 3 fracciones de 3 a 5 mL de agua de mar artificial para eliminar restos de medio de cultivo.

2.8. Retire el filtro y colóquelo en el tubo para la extracción de fosfato intracelular.

2.9. En este punto, puede almacenar a -20 °C hasta continuar el procedimiento de extracción.

3. Extracción de fosfato intracelular

3.1. Adicione 5 mL de agua ultrapura al tubo de extracción conteniendo el filtro con el material microalgal. Incorpore un "blanco" a partir de este punto, colocando un filtro limpio del lote que está empleando en un tubo e incorpore al procedimiento.

3.2. Realice el procedimiento de disrupción celular con una sonda ultrasónica en el tubo de extracción. **PRECAUCIÓN:** emplee la protección auditiva en este procedimiento.

3.3. Someta a 70°C durante 3 minutos como tratamiento adicional de disrupción y liberación del contenido intracelular.

3.4. Filtre a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,7 μm (previamente acondicionado según el punto 1.3) recolectando el filtrado en tubos limpios. Enjuague el filtro haciendo pasar 2 porciones de 2 mL de agua de mar artificial colectando el lavado en el mismo tubo. Deje enfriar.

3.5. En este punto se puede interrumpir el procedimiento y conservar a -20 °C hasta su cuantificación.

3.6. Lleve a volumen de 10,00 mL con agua de mar artificial empleando material volumétrico.

4. Cuantificación de ortofosfato

4.1. Reactivos (grado reactivo analítico)

PRECAUCIÓN: Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

4.1.1. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 5N: en una botella de vidrio agregue 50 mL de agua ultrapura, luego mientras agita continuamente agregue lentamente 7 mL de H_2SO_4 concentrado ($\delta=1.84 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Se puede almacenar indefinidamente.

PRECAUCIÓN: evite el contacto con piel y ojos, produce lesiones muy graves. Evite liberar vapores al lugar de trabajo.

4.1.2. Tartrato de Antimonio y Potasio $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$: disolver 0,136 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ($M=334 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) en agua ultrapura y llevar a 50 mL. Puede almacenarse refrigerado en botella de vidrio o plástica hasta 2 meses.

PRECAUCIÓN: Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol. Evite dispersar en el ambiente de trabajo.

4.1.3. Molibdato de Amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: en una botella de polietileno de alta densidad (HDPE) disolver 1,5 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($M = 1236 \text{ g mol}^{-1}$) en agua ultrapura y llevar a 50 mL. Se puede almacenar varias semanas a temperatura ambiente en oscuridad; se debe reemplazar si aparece precipitado.

4.1.4. Ácido Ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$): disolver 1,35 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ($M = 176 \text{ g mol}^{-1}$) en 25 mL de agua ultrapura. Preparar diariamente o mantener a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en recipiente plástico.

4.1.5. Disponga de solución estándar de fosfato: 1000 mg en 1000 mL ($\pm 0,4 \%$)

4.1.6. Solución de trabajo: diluya el estándar (1:200) tomando 150 μL y llevando a 25,00 mL en un matraz aforado clase A.

4.1.7. **Reactivo Color:** a 5 mL de H_2SO_4 5N agregue 1 mL de tartrato de antimonio y potasio, 2 mL de molibdato de amonio y 2 mL de ácido ascórbico. Es suficiente para 20 muestras. Descarte después de usar, no se conserva.

4.2 Calibración y registro de señales

4.2.1. Encienda el espectrofotómetro para estabilizar y seleccione 885 nm como longitud de onda.

4.2.2. Prepare la curva de calibrado con testigos entre 0,3 μM y 8 μM de PO_4^{3-} llevando por ejemplo 60 μL , 200 μL , 400 μL , 600 μL , 800 μL y 1000 μL de la solución de trabajo a un volumen final de 10,00 mL con agua de mar artificial.

4.2.3. Coloque 5,00 mL de cada muestra y blanco de procedimiento en tubos limpios y etiquetados.

4.2.4. Adicione a los testigos, muestras y blancos 500 μL de Reactivo Color, tape y agite.

4.2.5. Espere el desarrollo de color a temperatura ambiente ($<30^\circ\text{C}$) [6].

4.2.6. Realice la lectura de la Absorbancia entre los 15 min. y las 2 h.

4.2.7. Ajuste mediante regresión lineal y evalúe la calibración.

PRECAUCIÓN: disponga los residuos adecuadamente. El tartrato de antimonio y potasio es tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

5. Concentración celular y biovolumen

- 5.1. Agite suavemente la muestra para extraer 1 mL de cultivo y colocar en la cámara de Sedgwick-Rafter.
- 5.2. Cuente N campos y estime el número de células por mL.
- 5.3. Agite suavemente la muestra para extraer 2 mL de cultivo.
- 5.4. *Halamphora coffeaeformis* presenta frústulos elíptico-lanceolados con ápices truncados. A partir de esta forma y de acuerdo con [7] estime el biovolumen en μm^3

6. Estimación del contenido intracelular

- 6.1. Calcular el contenido de PO_4^{3-} intracelular ($C_1 \pm S_1$) en mM como sigue:

$$C_1 \pm S_1 = P_1 \pm DE_{P1} * (1/ N_1 \pm DE_{N1}) * (1/ B_1 \pm DE_{B1})$$

$$C_1 = P_1 * (1/ N_1) * (1/ B_1)$$

$$S_1 = C_1 \sqrt{\left(\frac{DE_{P1}}{P_1}\right)^2 + \left(\frac{DE_{N1}}{N_1}\right)^2 + \left(\frac{DE_{B1}}{B_1}\right)^2}$$

C_1 : VALOR MEDIO DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR

S_1 : INCERTIDUMBRE DEL VALOR DE CONCENTRACIÓN INTRACELULAR

$P_1 \pm DE_{P1}$: concentración de fosfato ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) \pm desviación estandar

$N_1 \pm DE_{N1}$: concentración celular (Numero de células. mL^{-1}) \pm desviación estandar

$B_1 \pm DE_{B1}$: biovolumen (mL) \pm desviación estandar

Si se tomaran dos o más muestras independientes en el punto 1, se expresaría como $C \pm ES$ donde C es el valor promedio de las concentraciones de las réplicas C_1, C_2, \dots, C_n y la incertidumbre sería el error estándar de del valor medio expresado como $ES = S/\sqrt{n}$ con n: número de muestras independientes.

7. INCERTIDUMBRE Y ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EN EL MEDIO DE CULTIVO

De la curva de calibrado se obtiene la concentración por duplicado C_{D1} y C_{D2} expresándose el resultado como la media \pm el desvío estándar.

RESULTADOS

La Figura 1 presenta el proceso completo, incluyendo el muestreo y se indican las principales fuentes de incertidumbre en el procedimiento. Los componentes son agrupados en tres: a) estimación de la concentración de fósforo (P), b) estimación de la concentración microalgal (N) y c) estimación del biovolumen (B), las cuales son valoradas experimentalmente como la dispersión de medidas repetidas, expresándose como una desviación estándar según Ramsey et al. [8].

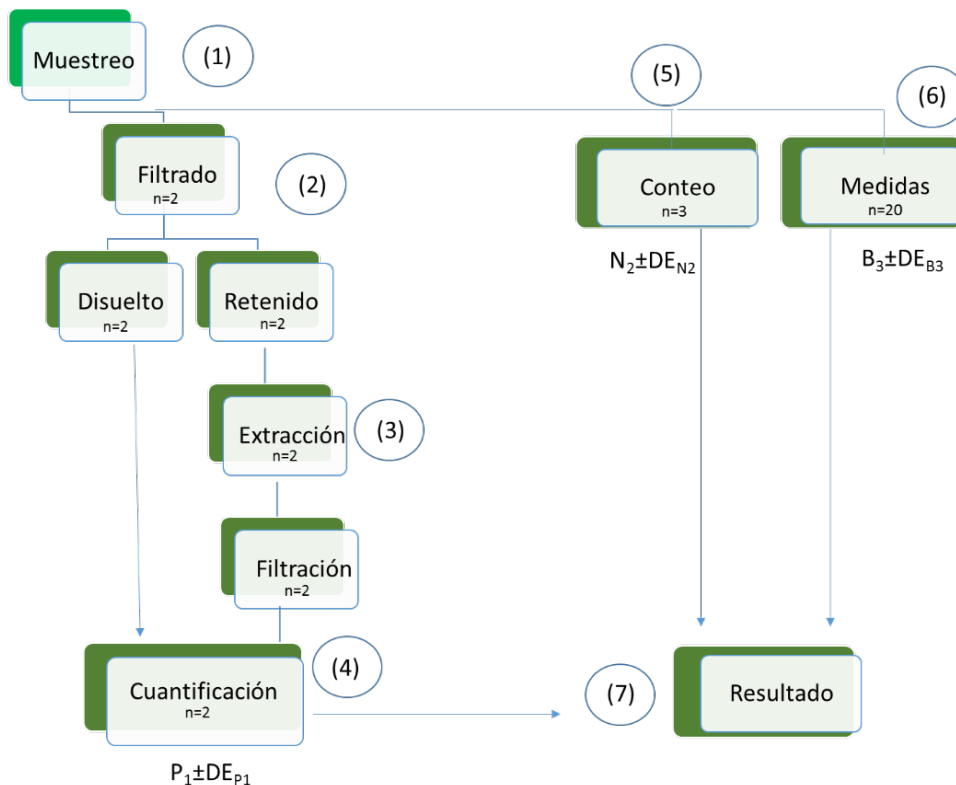


Figura 1. Representación esquemática general del protocolo, marcando las principales fuentes de incertidumbre. (1) Incertidumbre debida a la heterogeneidad del cultivo. (2) Incertidumbre sobre la retención de las células sin perder contenido intracelular. (3) Incertidumbre en la eficiencia en la disrupción celular. (4) Incertidumbre en el proceso de calibración. (5) Incertidumbre en la distribución al azar de las células en la cámara de recuento. (6) Incertidumbre en la medición micrométrica de las dimensiones celulares.

La Figura 2 muestra la variación de la densidad celular (células.mL^{-1}) y la biomasa (peso seco libre de cenizas, PSLC, g.L^{-1}) de *H. coffeaeformis* creciendo en pileta tipo *raceway*. Las células presentaron una fase *lag* corta, seguida de una fase de crecimiento exponencial de seis días, durante la cual los valores de PSLC aumentaron casi tres veces. La fase de crecimiento estacionaria ocurrió entre los días 10 y 22 y se caracterizó por valores relativamente estables de PSLC y densidad celular. Desde el día 22 en adelante, los valores de biomasa mostraron una tendencia decreciente, lo que indica una fase de declinación del crecimiento.

La Figura 3 muestra la variación del fosfato disuelto e intracelular en el cultivo de *H. coffeaeformis*, a partir del cual se puede evaluar el efecto del estado nutricional celular sobre la acumulación de lípidos. Se indica el fosfato disuelto limitante para el crecimiento de diatomeas, de acuerdo con Sarthou et al. [9]. El P disuelto disminuyó exponencialmente y alcanzó sus valores límite en los primeros días de cultivo ($P < 8,9 \mu\text{M}$ en el día 7), con una tasa de remoción de $3,62 \mu\text{M.día}^{-1}$. En cultivos discontinuos de diatomeas, la acumulación de lípidos neutros (triacilglicéridos: TAG) en respuesta a la limitación de P es variable [10].

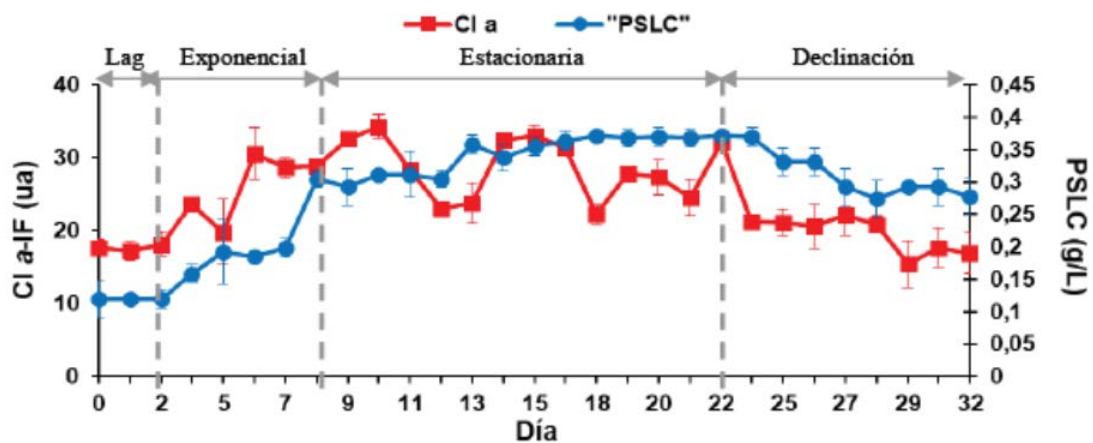


Figura 2. Variación de la densidad celular y la biomasa de un cultivo de *H. coffeaeformis* en pileta tipo *raceway*. DC: densidad celular; PSLC: peso seco libre de cenizas.

Esto puede deberse a que las diatomeas tienen la capacidad de absorber fosfato cuando sus concentraciones en el medio son elevadas y almacenarlo en grandes depósitos intracelulares que generan una reserva adicional [10, 11]. En el presente estudio, cabe destacar que, aunque el P disuelto alcanzó valores límite rápidamente (Figura 3), la concentración de lípidos neutros alcanzó su punto máximo en el día 32 (Figura 4). Además, la reserva de fosfato al comienzo del cultivo fue 8,71 mM P, más de 200 veces mayor que el fosfato disuelto (Figura. 2). Esta reserva de P se utilizó a lo largo de todo el cultivo y alcanzó valores mínimos durante la fase de declinación del crecimiento, cuando la acumulación de TAG fue máxima. Por lo tanto, en esta especie ambas fuentes de P (disuelto más interno) tuvieron que agotarse para inducir la máxima acumulación de lípidos neutros. Por lo tanto, la acumulación de fosfato en *H. coffeaeformis* puede explicar el retraso observado en la acumulación de TAG, que alcanzó un valor máximo el día 32. Además, esta reserva interna de P podría ayudar a comprender el efecto variable del P disuelto sobre la acumulación de TAG en las diatomeas.

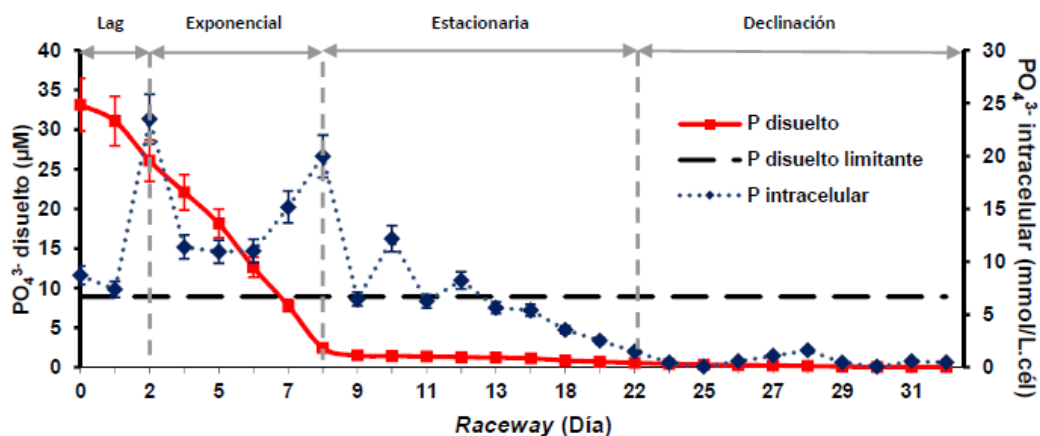


Figura 3. Cinética del fosfato disuelto e intracelular en un cultivo de *H. coffeaeformis* en pileta tipo *raceway* (modificado de [3]).

La Figura 4 muestra la cinética de acumulación de lípidos en el cultivo de *H. coffeaeformis*. En la fase de crecimiento estacionario (días 10 a 22), el contenido de lípidos totales osciló entre el 10 y el 17% (PSLC), con un valor máximo de lípidos neutros de 9,89% (PSLC). El contenido de lípidos totales aumentó en la fase de declinación de crecimiento hasta 33,41% (PSLC) debido a un aumento de los lípidos neutros, los cuales alcanzaron un 29,15% (PSLC) o un 87% con respecto a los lípidos totales. En las fotomicrografías se puede apreciar el aumento en el tamaño de las gotas lipídicas, las cuales en el día 32 de cultivo ocupan una gran parte del citoplasma de la célula (Figura 4).

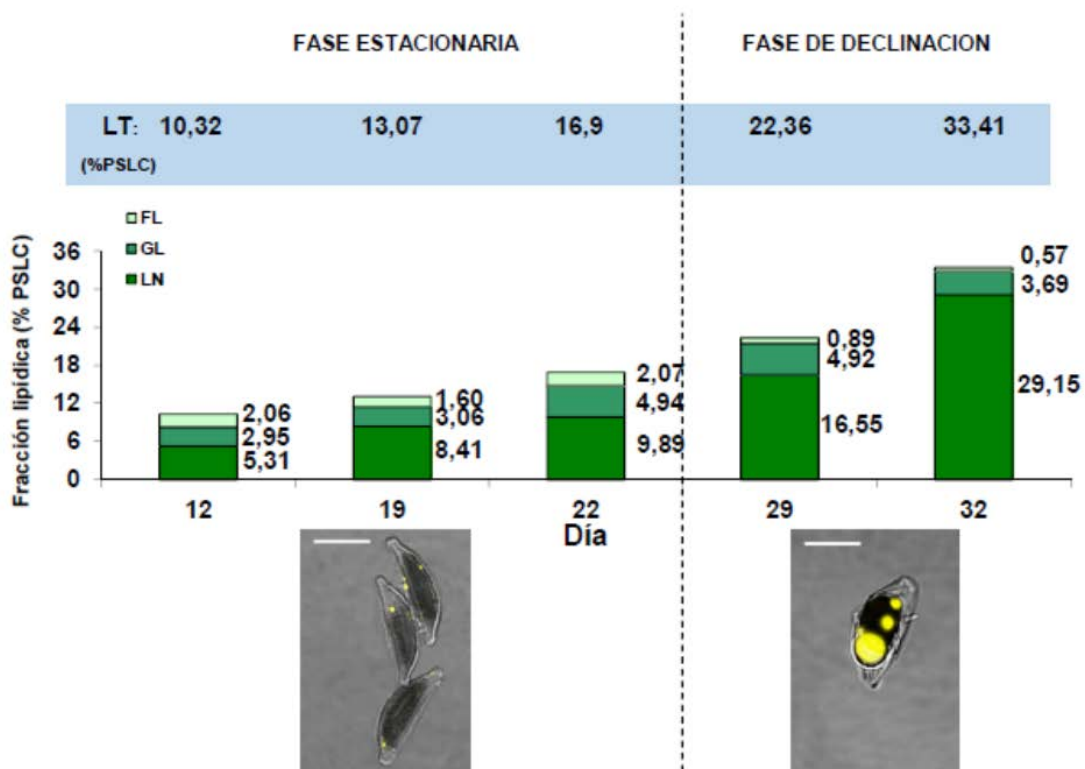


Figura 4. Variación de la cantidad y composición de lípidos en *Halamphora coffeaeformis* (modificado de [3]).

DISCUSION

**El protocolo descrito representa una herramienta confiable para medir la cinética del fosfato disuelto e intracelular en diatomeas.

**Cuando la especie microalgal es cultivada en aguas residuales, la cinética del P disuelto es clave para evaluar la capacidad de la especie de biorremediar las aguas residuales, dado que la metodología permite determinar rangos de P desde 0,3 μ M. Por su parte, la cinética de P intracelular es una herramienta muy útil para evaluar la capacidad de la especie de almacenar P. Esta última información es relevante para evaluar el uso de la biomasa como biofertilizante fosfatado.

**En biorrefinerías microalgales destinadas a bioenergía, como es el caso de los

resultados mostrados en este trabajo, el protocolo descripto es adecuado para poder definir el estado nutricional de la especie estudiada y por ende para estimar el tiempo de acumulación de los lípidos neutros aptos para biodiesel. Dicha información permite tomar decisiones en relación con el tiempo de cosecha de la biomasa. El uso de la deprivación de los nutrientes disueltos como un indicador de estrés en diatomeas no es una herramienta confiable, debido a la capacidad que tienen algunas especies de acumular altas concentraciones de nutrientes intracelulares.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) (Resolución N° 801/18), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-00348), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET, PIP 11220200100696CO) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) (PGI 24/B246 y 24/Q105) por la financiación otorgada para la realización de este estudio. CAP es investigadora de la CIC. LAM y PIL son investigadores CONICET.

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] Acien FGF, Fernandez Sevilla JM, Molina Grima E (2017). Microalgae: The Basis of Mankind Sustainability. In: Llamas B, Mazadiego FL, De Gracia MFS (eds.). Case Study of Innovative Projects - Successful Real Cases, IntechOpen, 123-140 pp.
- [2] Pott R, Johnstone-Robertson M, Verster B, Rumjeet S, Nkadimeng L, Raper T, Rademeyer S, Harrison S (2018). Wastewater Biorefineries: Integrating Water Treatment and Value Recovery. In: Leal Filho W, Surroop D (eds.). The Nexus: Energy, Environment and Climate Change. Green Energy and Technology. Springer, Cham. 289-302 pp.
- [3] Martín LA, Popovich CA, Martínez AM, Scodelaro Bilbao P, Damiani MC, Leonardi PI (2018). Hybrid two-stage culture of *Halamphora coffeaeformis* for biodiesel production: Growth phases, nutritional stages and biorefinery approach. *Renewable Energy* 118, 984–992.
- [4] Popovich CA, Faraoni MB, Sequeira MA, Daglio Y, Martín LA, Martínez AM, Damiani MC, Matulewicz MC, Leonardi PI (2020). Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond. *Algal Research* 51, 102030.
- [5] Murphy J, Riley J (1962). A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27, 31-36.
- [6] Pai SC, Wang TY, Fang TH, Jiann KT (2015). Effect of heating on the color formation reaction in the Murphy and Riley method for the determination of phosphate in natural waters. *Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2, 139.
- [7] Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae, *Journal of Phycology* 35, 403-424.
- [8] Ramsey MH, Ellison SLR, Rostron P (eds.) (2019). Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide

to methods and approaches. Second Edition, Eurachem. ISBN (978-0-948926-35-8). Available from <http://www.eurachem.org>

- [9] Sarthou G, Timmermans RKR, Blain S, Treguer P (2005). Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review, *Journal of Sea Research* 53, 25-42.
- [10] Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG (2014). Diatoms: a fossil fuel of the future, *Trends in Biotechnology* 32, 117-124.
- [11] Griffiths MJ, Harrison ST (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21, 493-507.

MATERIALES

Material o Equipo	Casa comercial	Referencia	Descripción
Agua MilliQ	Millipore, Billerica, MA		Resistividad de ~ 18,5 MΩ y ausencia de impurezas con actividad superficial
HCl	ACS	CAS: 7647-01-0	32-36%
detergente libre de fosfatos	Biopak	NC 3402.20.90	diluido según indicaciones del fabricante
Balanza	OHAUS Corp. USA	PA 214	Legibilidad 0,0001 g
Espectrofotómetro UV-Vis	Agilent Cary 60		
celdas de lectura	de cuarzo o vidrio		de 1cm de paso optico
Mufla			hasta 800°C
Disruptor celular ultrasónico	OMNI		con tipo OR-T-156 (250 ul-10 mL), potencia límite: 50%
bomba de vacío	Milipore		con regulador para filtrado a baja presión
portafiltro de virio de 25mm	milipore		adaptado para agregar tubo de recolección de filtrado
kitasato	Gassco		de vidrio
termoreactor	HACH		temperatura regulada a 70°C
filtros de fibra de vidrio	Munktell		0.7 μm de tamaño de poro
Vortex	VELP Scientifica		
Papel aluminio			
Matraces volumétricos de 5,	Gassco		Clase A
Pipeta automática de 100-	Eppendorf		
Pipeta automática de 40 - 200	Eppendorf		
puntas para micropipetas			
Microscopio campo claro	Leica		
Cámara de recuento			
tubos de vidrio calidad óptica	HACH		
Acido Sulfúrico	Biopack	CAS: 7664-93-9	
Heptamolibdato de amonio	Merck	CAS: 12054-85-2	
Tartrato de antimonio y	Sigma-Aldrich	CAS:28300-74-5	
L-Acido Ascórbico	Sigma-Aldrich	CAS: 50-81-7	
Freezer -20°C			
Standard de fosfato	Merck	119898	trazable a SRM de NIST KH ₂ PO ₄ en H ₂ O 1000 mg/l PO ₄ Certipur®
agua de mar artificial			
conservadora de frío portátil			

Identificación y cuantificación de clorofila *a* y fucoxantina en cultivos de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca (Pcia. de Buenos Aires, Argentina).

M. Alejandra Sequeira¹, M. Belén Faraoni^{1*}, Ana M. Martínez¹, M. Cecilia Damiani², Patricia Leonardi², Cecilia A. Popovich^{2,3*}

¹Instituto de Química del Sur (INQUISUR). Universidad Nacional del Sur (UNS). B 8000, Bahía Blanca, Argentina.

²Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA). Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) CONICET-UNS, Camino La Carrindanga, Km 7. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS), San Juan 670, B 8000, Bahía Blanca, Argentina.

³Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs. As (CIC-UPSO) Ciudad de Cali 320, B8000, Bahía Blanca, Argentina.

Correspondencia: bmpopovi@criba.edu.ar (Cecilia A. Popovich);
bfaraoni@criba.edu.ar (María Belén Faraoni)

RESUMEN

El presente protocolo describe la técnica de extracción optimizada de pigmentos provenientes de la biomasa de la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca (Argentina) y cultivada en piletas tipo *raceways*. En particular, se describe la identificación y cuantificación de fucoxantina y clorofila *a* utilizando Cromatografía Líquida de Alta Performance en fase reversa y Espectroscopía UV-Vis.

Las diatomeas (Clase Bacillariophyceae), son microalgas unicelulares que contribuyen a un 25% de la productividad primaria anual terrestre y a un 40% de la productividad primaria total de los océanos, convirtiéndose así en un grupo de organismos fotosintéticos relevantes en la captación de CO₂ de la atmósfera y en la generación de biomasa en los ambientes naturales. Además, la capacidad de estas microalgas de producir varios metabolitos de interés industrial las ha transformado en materias primas ideales para el desarrollo de distintos tipos de biorrefinerías. En particular, estudios realizados en la diatomea marina *Halamphora coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca (Argentina) y cultivada en piletas *raceways*, han demostrado que esta especie presenta la capacidad de producir cantidades significativas de fucoxantina (Fx). La Fx es considerada un metabolito de alto valor agregado, con potencial aplicación en las industrias de nutracéuticos, cosmética, alimentación humana y animal; así como en la salud. Sin embargo, su disponibilidad se limita actualmente a fuentes no sustentables como el aceite de pescado y ciertas especies de algas pardas. Bajo este contexto, en este trabajo se describe el protocolo usado para la extracción, identificación y cuantificación de clorofila *a* (Cl *a*) y Fx de *H. coffeaeformis*, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) y Espectroscopía UV-Vis (UV-VIS). Los tiempos de retención y máximos de absorción, utilizando estándares de referencia, se emplearon como criterios de identificación de estos pigmentos.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos microalgales de alcance comercial, en general, están orientados a la producción de biomasa rica en proteínas con fines nutraceuticos o alimenticios. Sin embargo, la diversidad de microalgas que existe en nuestro planeta representa un gran abanico de metabolitos como son los pigmentos (carotenoides y clorofilas), además de lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, entre otros, con un gran potencial de mercado [1-3]. En particular, la Fx es una xantofila que presenta una amplia gama de propiedades bioactivas como antioxidante, anti-cancerígeno, hipoglucemiante, anti-obesidad, anti-envejecimiento, anti-angiogénico y anti-metastásico en animales; así también por sus propiedades beneficiosas en el hígado, vasos sanguíneos del cerebro, huesos, piel y ojos [4]. Por lo cual, representa un metabolito que podría competir en las industrias nutraceuticas, alimenticias y de la salud. Si bien la síntesis química de este pigmento es posible, es un proceso muy costoso y por lo tanto su extracción a nivel industrial se realiza a partir de macroalgas pardas, como por ejemplo, *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis* y *Undaria pinnatifida* [5]. Sin embargo, esta producción no es sustentable debido al bajo contenido de Fx que presentan estas algas y a la cosecha indiscriminada de las poblaciones naturales. Por otro lado, la Fx es mucho más abundante en algunas especies de diatomeas. En particular, estudios realizados con cultivos de la diatomea marina *Halimnobia coffeaeformis*, aislada del estuario de Bahía Blanca (Argentina), en piletas *raceways* han demostrado una producción significativa de Fx [6].

Los carotenos y xantofilas han sido estudiados a partir de la utilización de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), la cual permite realizar análisis cuali/cuantitativos con resultados de gran exactitud y sensibilidad [7]. El detector de UV con arreglo de diodos acoplado al HPLC posibilita la identificación selectiva de cada pigmento presente en la muestra algal, por medio del barrido del pico, haciendo uso de las propiedades espectrales de este tipo de compuestos. Asimismo, para determinar la concentración de los pigmentos de forma rápida, sencilla y confiable, resulta de gran utilidad la Espectroscopía UV-VIS (UV-Vis) [8], método basado en la aplicación de las leyes fotométricas, que correlaciona la absorción de luz de un compuesto a una determinada longitud de onda con la concentración del mismo en una muestra. Haciendo uso de este método es posible trazar una curva de calibrado estándar que permita relacionar en forma directamente proporcional la medición de absorbancia con la concentración del pigmento de interés, para cuantificar su rendimiento en la biomasa algal por simple medición de su absorción UV-Vis.

Bajo este contexto, en el presente trabajo se detalla la optimización del protocolo de extracción, así como las metodologías de identificación y cuantificación usadas para la determinación de Fx y Cl α en diferentes etapas de un cultivo de *H. coffeaeformis* en piletas de tipo *raceways* [6]. Se espera que esta metodología represente una herramienta útil para evaluar la identificación y cuantificación de Fx y Cl α en cultivos de diatomeas con potenciales aplicaciones industriales.

PROTOCOLO

1. Optimización de la extracción de pigmentos a partir de biomasa seca de *H. coffeaeformis*

Consideraciones generales

Inicialmente se llevó a cabo la optimización de la técnica de extracción con disolventes a partir de la biomasa seca de un cultivo de *H. coffeaeformis*. Las muestras fueron lavadas con H₂O bidestilada, posteriormente liofilizadas y conservadas en freezer a -80°C.

- 1.1. Pesar 50mg de biomasa seca.
- 1.2. Pulverizar en mortero.
- 1.3. Adicionar 1 mL del medio de cultivo f/2 (20:1 volumen/peso) usado para el crecimiento de la especie y colocar en tubo de centrifuga de vidrio envuelto en aluminio.
- 1.4. Agitar en vortex por 10min, repitiendo 3 veces.
- 1.5. Determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a 750nm (rango de barrido: 400 a 800nm).
- 1.6. Utilizar como blanco medio de cultivo f/2.
- 1.7. Centrifugar a 1000 x g durante 30 min y retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur.
- 1.8. Agregar 1 mL de etanol absoluto al pellet (20:1 volumen/peso) y homogenizar en vortex por 3min.
- 1.9. Colocar en cristizador en un baño de glicerina controlado a 40 °C durante 2 h. con agitación magnética y manteniendo en oscuridad.
- 1.10. Centrifugar a 1000 x g durante 30 min.
- 1.11. Retirar el extracto obtenido con pipeta Pasteur
- 1.12. Colocar en frasco caramelo y mantener a -20 °C hasta su análisis espectroscópico y cromatográfico.

Notas importantes

El presente protocolo nos permitió predecir una cuantificación comparable por bibliografía [8], de la concentración de fucoxantina en la muestra algal utilizando Espectroscopía UV-Vis (18,99 mg.L⁻¹) y HPLC (21,4 mg.L⁻¹).

2. Extracción, identificación y cuantificación de pigmentos a partir de células en diferentes etapas de cultivo

Consideraciones generales

Para la determinación de Fx y Cl α en las diferentes fases de crecimiento, se seleccionaron muestras conteniendo 20 mL de cultivo de *H. coffeaeformis* en diferentes etapas de cultivo: 0, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 21 y 22 días. Cada muestra se filtró utilizando filtros Whatman GF/C (1.2 μ m) y se almacenó a -80 °C. Se adaptó el protocolo optimizado de extracción anteriormente descrito.

- 2.1. Colocar cada filtro conteniendo las células de *H. coffeaeformis* en un frasco caramelo conteniendo un imán.
- 2.2. Agregar 2 mL de etanol absoluto a cada frasco.
- 2.3. Agitar en vortex 1 min, repitiendo 3 veces.

- 2.4. Colocar los frascos en cristizador en un baño de glicerina controlado a 40 °C durante 2 h. con agitación magnética y manteniendo en oscuridad.
- 2.5. Centrifugar a 1000 x g durante 30 min.
- 2.6. Retirar cada extracto obtenido con pipeta Pasteur.
- 2.7. Filtrar utilizando jeringa de 2 mL y un filtro de jeringa de PTFE de 0,2 µm directamente sobre viales caramelo de inyección automática de HPLC.
- 2.8. Mantener a -8 °C hasta su análisis cromatográfico.
- 2.9. Utilice las condiciones de la tabla 1 para el análisis cromatográfico por HPLC.

Tabla 1 Condiciones para el análisis cromatográfico por HPLC.

Columna	Acclaim TM fase inversa 120 - C18 (2,1 mm × 150 mm; 3 µm, Dionex Bonded Silica Products)
Fase Móvil	ACN: H ₂ O (83:17)
Tiempo de inyección:	15 min.
Flujo:	0,5 mL.min ⁻¹
Temperatura:	25 °C
Detector UV-Vis	445 nm

- 2.10. Inyectar una disolución madre etanólica del estándar de Fx para determinar el tiempo de retención (t_R) del compuesto.
- 2.11. Inyectar concentraciones decrecientes obtenidas por dilución de la disolución madre etanólica del estándar de Fx, para elaborar una curva de calibrado externa.
- 2.12. Determinar las absorbancias de cada estándar en el espectrofotómetro UV-Vis a 449 nm y calcular su concentración usando un valor de coeficiente de extinción molar (0,1%, 1 cm) de 160 L/g/cm a 449 nm.
- 2.13. Inyectar los extractos e identificar la Fx del resto de los componentes al comparar los t_R obtenidos con el t_R del estándar.
- 2.14. Obtener la concentración volumétrica de Fx (mg.L⁻¹) en cada extracto a partir de la curva de calibrado.
- 2.15. Determinar las absorbancias de cada extracto en el espectrofotómetro UV-Vis a 663 nm (absorción de Cl α + Fx) sustrayendo el "scatter" al valor obtenido.
- 2.16. Determinar las absorbancias a 663 nm de distintas diluciones de la disolución madre del estándar de Cl α en acetona, y calcular su concentración usando un valor de coeficiente de extinción molar de Cl α de 82 L/g/cm.
- 2.17. Elaborar con los datos obtenidos una curva de calibrado externa Abs₆₆₃ vs concentración de Cl α .
- 2.18. Obtener la concentración de Cl α + Fx en cada extracto a partir de entrar en la curva de calibrado con los valores de absorbancia a 663 nm, previa resta del "scatter".

- 2.19. Obtener la concentración volumétrica de clorofila *a* (mg.L⁻¹) en cada extracto por sustracción de los valores de concentración de Fx previamente calculados para cada extracto.

RESULTADOS

La Fx junto con la Cl *a*, la clorofila *c* y una apoproteína constituyen el principal complejo captador de luz de algas feófitas, haptófitas y diatomeas. Este complejo transfiere la energía absorbida al centro de reacción que es la Cl *a*, la cual participa directamente en la fotosíntesis [9]. La Fx constituye el carotenoide más importante producido por las diatomeas y ha sido informado como un metabolito con importante actividad antioxidante [9]. A partir del presente protocolo, se aisló la fracción de pigmentos enriquecida en carotenoides y clorofilas; se identificó la Fx y Cl *a*; y se cuantificó la concentración volumétrica de ambos metabolitos (mg.L⁻¹) en *H. coffeaeformis* utilizando HPLC y UV-Vis.

Los picos de Fx en los extractos algales obtenidos por HPLC se asignaron comparando su tiempo de retención con el del estándar puro. En la Figura 1a se observa el cromatograma HPLC del estándar de Fx, mostrando un t_R de 4,566 min; en la Figura 1b se observa el cromatograma HPLC de un extracto etanólico mostrando el pico de Fx con un t_R de 4,566 min. La curva de calibrado elaborada a partir de los estándares de Fx por HPLC es mostrada en la Figura 1c. La determinación de las concentraciones volumétricas o producción de cada estándar en el rango de 4–100 mg.mL⁻¹ fue realizada por espectroscopía UV-Vis (Figura 1d).

Siguiendo el protocolo, la concentración volumétrica o producción de Cl *a* (mg.L⁻¹) en los mismos extractos crudos de *H. coffeaeformis* fue cuantificada mediante espectroscopía UV-Vis. A partir de los datos de producción (mg.L⁻¹) obtenidos por HPLC y UV-Vis de ambos metabolitos, se calculó la cinética del rendimiento (mg.g⁻¹ PS) de Fx y Cl *a* en los cultivos de *H. coffeaeformis*, que sigue el perfil mostrado en la Figura 2.

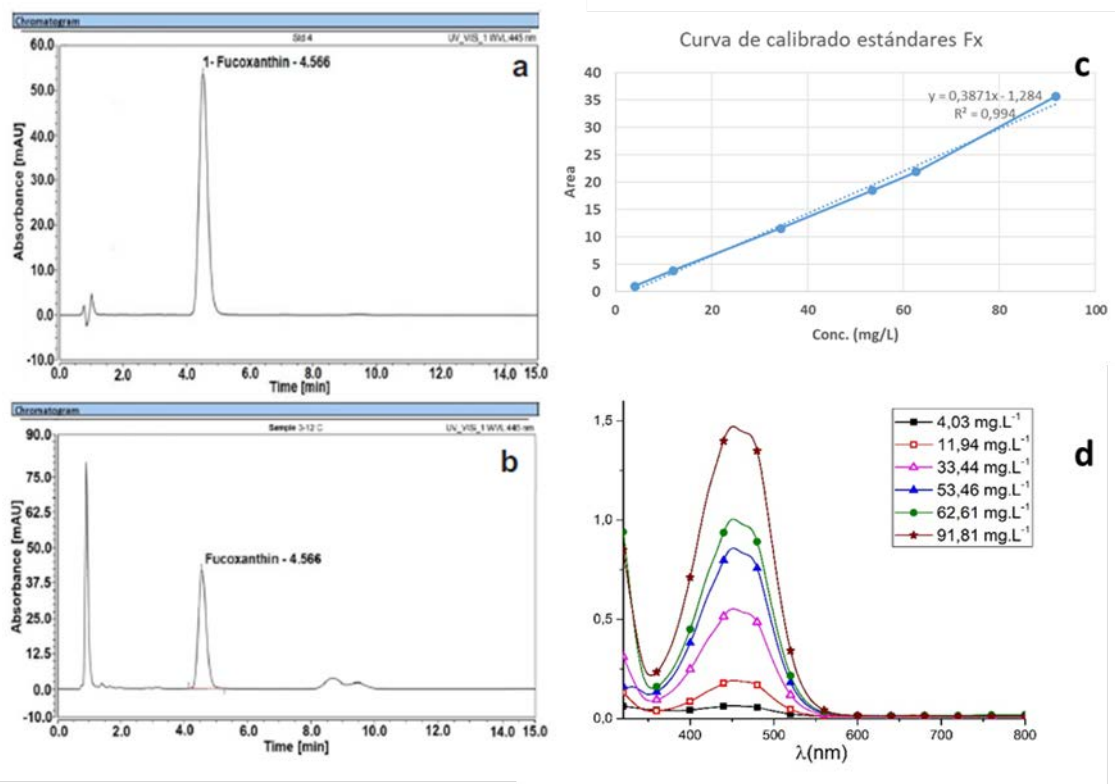


Figura 1. Cuantificación de fucoxantina (Fx). (a) Cromatograma HPLC del estándar de Fx; (b) Cromatograma HPLC del extracto obtenido en el día 7 de cultivo [6]. (c) Curva de calibrado obtenida por HPLC. (d) Espectro UV-Vis de los estándares de Fx en el rango de concentración 4–100 mg.mL⁻¹.

Durante la cinética, se pudo observar que la producción de Cl *a* y Fx aumentó a lo largo de la experiencia hasta 15,4 mg.L⁻¹ y 15,6 mg.L⁻¹ en el día 22, respectivamente; mientras que las concentraciones (expresadas en peso seco -PS-) más altas de Cl *a* (~ 26-38 mg.g⁻¹ PS) y Fx (~ 30-38 mg.g⁻¹ PS) se encontraron desde el día 13 al día 22, respectivamente. La producción y el rendimiento de Cl *a* y Fx mostraron un aumento significativo entre el día 0 y el día 22 ($p < 0,05$). El aumento simultáneo de Cl *a* y Fx en diferentes etapas de cultivo podría estar relacionado con su respuesta fisiológica similar frente a las condiciones de luz y nutrientes.

El rendimiento de Fx de *H. coffeaeformis* fue mayor que el reportado para el género relacionado *Amphora sp.* ($1,21 \pm 0,18$ mg.g⁻¹ PS) [10], coincidió favorablemente con el rendimiento de Fx de *Odontella aurita*, una diatomea de alto rendimiento (> 20 mg.g⁻¹ de PS) [9], y fue al menos treinta veces más alto que en las macroalgas pardas (0,87 mg.g⁻¹ PS), la principal fuente comercial de este pigmento [11].

El contenido de Fx varía según las especies y cepas de la misma especie, y se ve afectado por múltiples factores relacionados con las condiciones de cultivo [10]. Su valor de rendimiento máximo, junto al de la Cl *a*, se correlacionan en sincronía con la producción máxima de biomasa, resultando muy valiosa la determinación de estas biomoléculas como índices de la productividad de biomasa en los cultivos de *H. coffeaeformis*.

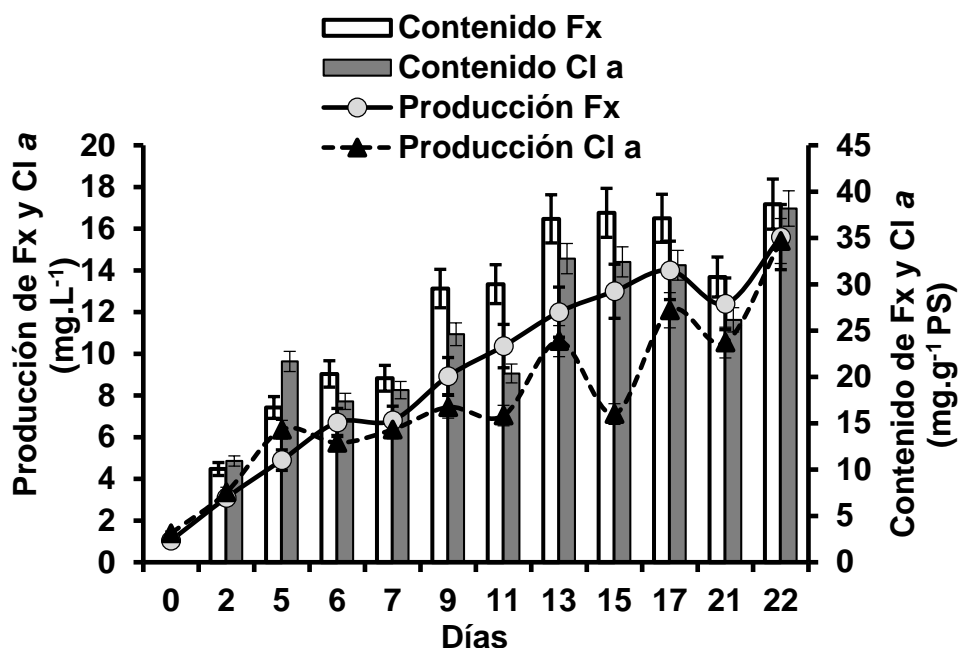


Figura 2. Producción (mg.L^{-1}) y cinética de la producción (mg.g^{-1} PS) de Fx y Chl *a*. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar relativa (RSD), $n = 3$. RSD fue 2,1% según el análisis de HPLC [6].

DISCUSIÓN

El estudio de metabolitos de alto valor agregado como la Fx, ha desarrollado un gran interés debido a sus posibles aplicaciones industriales [12]; sin embargo, su disponibilidad se limita actualmente a fuentes no sustentables. Aunque algunas especies de diatomeas también son una fuente natural de estos metabolitos, es necesario avanzar en la reducción de las barreras de costos involucrados en su producción a gran escala. A tal fin, en el presente trabajo se desarrolló un protocolo con alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de trabajo para la identificación y cuantificación de Fx y Cl *a* en distintas etapas de cultivo, que posibilita la evaluación del rendimiento potencial de metabolitos de interés biológico presentes en la diatomea marina *H. coffeaeformis*.

El protocolo de extracción fue optimizado en una primera etapa a partir de la disposición de biomasa liofilizada que permitió obtener la máxima concentración de pigmentos. Asimismo, el protocolo de identificación y cuantificación de la Fx y la Cl *a* se implementó a partir de un exhaustivo análisis de las condiciones de corrida cromatográficas de HPLC.

La etapa crítica en el protocolo es la realización de todos los procesos de extracción, identificación y cuantificación en ausencia de luz para evitar la descomposición de los pigmentos.

El método está limitado respecto al tipo de columna cromatográfica especificada para realizar la cuantificación por HPLC.

Los resultados obtenidos contribuyen a la promoción del aprovechamiento rentable y seguro de *H. coffeaeformis* con fines biotecnológicos innovadores en las áreas de: nutracéutica, cosmética y acuicultura; considerando además la escasez mundial de

agua dulce y materias primas convencionales de alto valor, que justifica la búsqueda de fuentes alternativas, en particular las de origen marino.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) (Resolución N° 801/18), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-00348), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET, PIP 11220200100696CO) y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) (PGI 24/B246) por la financiación otorgada para la realización de este estudio. CAP y MBF son investigadoras de la CIC. PIL es investigadora del CONICET.

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] Hayes M et al. (2018). Microalgal bioactive compounds including protein, peptides, and pigments: applications, opportunities, and challenges during biorefinery processes. *Nov. proteins food, Pharm. Agric.* 239–255. <https://doi.org/10.1002/9781119385332.ch12>.
- [2] Martín LA, Popovich CA, Martínez AM, Scodelaro PG, Damiani MC, Leonardi PI (2018). Hybrid two-stage culture of *Halamphora coffeaeformis* for biodiesel production: growth phases, nutritional stages and biorefinery approach. *Renew. Energy* 118, 984–992. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.086>.
- [3] Wang JK, Seibert M (2017). Prospects for commercial production of diatoms. *Biotechnol. Biofuels.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0699-y>.
- [4] Kim SK, Pangestuti R (2011). Biological activities and potential health benefits of fucoxanthin derived from marine brown algae. *Adv Food Nutr Res.* 64, 111-28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00009-0>. PMID: 22054942.
- [5] Lourenço-Lopes C. et al. (2020). Scientific Approaches on Extraction, Purification and Stability for the Commercialization of Fucoxanthin Recovered from Brown Algae. *Foods.* 9, 1113 <https://doi.org/10.3390/foods9081113>
- [6] Popovich CA et al. (2020). Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond. *Algal Research* 51, 102030. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102030>
- [7] Foo SC. et al. (2017). HPLC fucoxanthin profiles of a microalga, a macroalga and a pure fucoxanthin standard, *Data in Brief* 10, 583-586. ISSN 2352-3409. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.12.047>.
- [8] Wang L-J, Fan Y, Parsons RL, Hu G-R, Zhang P-Y, Li F-L (2018). A Rapid Method for the Determination of Fucoxanthin in Diatom. *Mar. Drugs* 16. <https://doi.org/10.3390/md16010033>.
- [9] Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q, Zhang C (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 11, 2667–2681. <https://doi.org/10.3390/md11072667>
- [10] Ishika, T. et al. (2017). Haloadapted microalgae for fucoxanthin production: effect of incremental increase in salinity. *Algal Res.* 28, 66–73.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.002>.

- [11] Kim SM et al. (2012). A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1843–1855 <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9602-2>.
- [12] Wang C, Chen X, Nakamura Y, Yu C, Qi H. (2020). Fucoxanthin activities motivate its nano/micro-encapsulation for food or nutraceutical application: a review. *Food Funct.* 11, 9338-9358. <https://doi.org/10.1039/D0FO02176H>

MATERIALES

Material o Equipo	Casa Comercial	Referencia	Descripción
Acetona	Supelco		Grado HPLC
Acetonitrilo	Supelco		Grado HPLC
Agua MilliQ	Millipore, Billerica, MA		Resistividad de ~ 18,5 MΩ y ausencia de impurezas con actividad superficial
Balanza	OHAUS Corp. USA	PA 214	Legibilidad 0,0001 g
Centrífuga	GELEC GL 40	N° 4205 CA 0,9 A	3500 rpm
Cristalizador	PYREX		
Cromatógrafo HPLC LS-MS	Thermo Scientific UltiMate 3000 –MSQ PLUS		Con detector UV- Vis de longitud de onda fija: 445nm.
Espectrofotómetro UV–Vis	Agilent Cary 60		
Estándar de clorofila <i>a</i>	SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA		La clorofila <i>a</i> fue purificada y disuelto en acetona grado HPLC
Estándar analítico de fucoxantina	Supelco		USA
Etanol absoluto 100%	Supelco		Grado HPLC
Filtro de PTFE			2,0 μm
Frasco caramelo			
Glicerina			
Imán			
Jeringa	RYMCO		2,0 mL
Medio de cultivo f/2			Usado para el crecimiento de la especie
Mortero			
Pipetas Pasteur	Normax		230 mm
Papel aluminio			
Placa de calefacción y agitación m	IKA	IKA RET Basic	Control de temperatura y agitación
Termómetro	Luft		Germany
Tubos de centrifuga	I.V.A.		
Vortex	VELP Scientifica		

Analysis of microalgae lipids from adapted Bligh Dyer followed by derivatization and GC-MS analysis

Gisele Alves¹, Maiara Priscilla de Souza¹, Liange Reck², Carlucio Roberto Alves², Rosana de Cassia de Souza Schneider^{1*}

¹Environmental Technology Postgraduate Program and Center of Excellence in Oilchemistry and Biotechnology University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência 2293, Bloco 53, CEP 96815-900 Rio Grande do Sul, Brazil.

²Northeast Biotechnology Network Postgraduate Program and Natural Sciences Postgraduate Program (from State University of Ceara), Av. Dr, Silas Munguba, 1.700, CEP 60.714-903 Fortaleza, Brazil.

Correspondence: Rosana de Cassia de Souza Schneider at rosana@unisc.br

SUMMARY

This protocol allows to determine the content and lipid profile of microalgae biomass using modified Bligh Dyer method, derivatization, and analysis by GC / MS.

The increasing demand for lipids production in human and animal food, biofuels, drugs, and cosmetics has intensified the search for alternatives to produce renewable resources to obtain high lipid yields. Microalgae can be extremely relevant in these sectors due to the possibility to produce compounds with high added value. However, the lipid extraction from these microorganisms still requires high costs considering the high energy demand as well as the environmental impacts from the use of harmful solvents. Considering these aspects, the aim of this study was to develop a protocol to disrupt microalgae cell wall using an adapted Bligh and Dyer method followed by derivatization and GC-MS analysis. In this protocol, the Bligh and Dyer method, which uses methanol and chloroform as solvents and ultrasound for cell disruption was adapted. The new method present favorable conditions in terms of time reduction and solvents. Derivatization and GC-MS analysis present great results for fatty acid profile determination and could be applied for different types of microalgae.

INTRODUCTION

Microalgae are a promising source of high added lipids, especially for the functional food ingredients industry due to the amounts of omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFAs), such as docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentanoic acid (EPA) and other compounds. One of the main advantages is the broad range applicability considering the possibility to acting as human health metabolites and producing disease suppressive compounds [1]. The costs associated with oil extraction, biodiesel processing and the variability of algal biomass production should focus on methods of the oil-rich algae itself [2].

The lipid extraction from microalgal cell differs from traditional food cultures since

microalgae cell wall must be disrupted to release lipids before the extraction. However, the robust cell wall structure of microalgae can be affected using conventional mechanical methods, since the lipids dissolution is inhibited [3]. Thus, the rupture of microalgae cell wall becomes the key step in the extraction and recovery of lipids. The selection of the appropriate solvents becomes fundamental for the extraction process, since it compromises the structure of this cell wall ensuring its rupture and, therefore, the extraction of lipids [4]. Ultrasound treatment alters microbial cell structures by two main mechanisms: cavitation, followed by the propagation of shock waves. The latter phenomenon forms jet streams in the surrounding environment, thus causing cell disruption by high-strength shear forces [5,6]. In this context, the use of the Bligh and Dyer (1959) method [7] appears as a suitable alternative, however, some conditions were optimized in order to reduce environmental impacts and costs.

PROTOCOL

1. Lipids extraction

- 1.1. To weight 300 mg of microalgae biomass in glass centrifuge tubes and 6 mL of chloroform (CHCl₃) and 3 mL of methanol (MeOH) were added.
- 1.2. The tubes passed to a cell disruption process by ultrasound, with an ice bath, for 45 min, remaining subsequently at rest for 4 h on freezer.
- 1.3. Subsequently, the sonication process for 30 min was repeated, followed by a centrifugation step at 3600 rpm for 10 minutes.
- 1.4. The lipid phase was separated into another in glass centrifuge tubes, with residual biomass and 1 mL of CHCl₃ and 2 mL of MeOH.
- 1.5. The tube containing the residual biomass passed through sonication and centrifugation processes, respectively, both for 15 min.
- 1.6. The lipid phase was separated and the previously removed organic phase was incorporated. To this tube containing the sum of the lipid phases, 4 mL of ultrapure H₂O and 2 mL of CHCl₃ were added followed by a centrifugation step of 10 min.
- 1.7. After the centrifugation process, the lipid phase was transferred another flask, which was subsequently dried in an oven at 70 °C until constant weight.
- 1.8. Afterwards, the lipid fraction was weighed, and the amount of total lipids was determined in lipid yield % (LY) of dry biomass (oil content) and in milligrams of lipid per liter of microalgal culture (LC) according to the equations:

$$TL = \frac{(F2 - F1) \times 100}{m}$$

$$TLC = \frac{(TL \times FDB)}{100}$$

TL = total lipids (in% of freeze-dried biomass);

TLC = total lipids (in mg L⁻¹ of microalgal culture);
F1 = mass of the empty glass flask (mg);
F2 = mass of the glass flask + total lipids (mg);
m = mass of the lyophilized biomass sample (mg);
FDB = amount of dry (freeze-dried) biomass per liter of microalgal culture (mg L⁻¹).

2. Derivatization

- 2.1. To determine fatty acids, 6 mL of methanolic solution with NaOH was added to a volumetric flask and refluxed for 20 min (saponification).
- 2.2. Then, 7 mL of a 14% (w/v) boron trifluoride solution in methanol (derivatizing) was added through the reflux condenser by dripping, then refluxed for 4 min.
- 2.3. Likewise, 5 mL of heptane was added to the reaction medium, remaining at reflux for 2 min.
- 2.4. After reaching room temperature, 2 mL of saturated aqueous NaCl solution was added.
- 2.5. Finally, the upper heptane phase was separated and dried with anhydrous sodium sulfate (before injection).

3. GC-MS analysis

- 3.1. Chromatographic analyses were performed using the MS system equipped with GC 2010 gas chromatography and MS-QP 2010 Plus detector.
- 3.2. The GC-MS system was operated with a 30 m capillary column ZB-WAX (polyethylene glycol, Phenomenex, USA with an internal diameter of 0.25 mm and 0.25 μ m of thickness).
- 3.3. The column oven temperature program was 70 °C (4 °C min⁻¹) to 240 °C for 5 min and elevated to 250 °C (35 min). The injector temperature was 250 °C with an injection volume of 1 μ L, and injection mode was split (1:10).
- 3.4. Transfer line temperature was set at 260 °C; ion source was electron ionization (EI) at 70 eV and the temperature was set at 270 °C. Helium was used as a carrier gas with a flow of 1 mL min⁻¹.
- 3.5. The methyl ester of fatty acids was identified and quantified by comparison with spectra library and with the reference standard of the Fatty Acid Methyl Esters (Unsaturated Kit and Saturated Straight Chains Kit; Sigma-Aldrich, USA).

RESULTS

The total lipid content in microalgae can range between 15-77%, and the composition of this bioproduct can differ considerably with different species. The adapted Bligh and Dyer method can be a suitable alternative considering the low solvent content and short extraction time if compared to the traditional method. The derivatization method can convert the extracts into methyl esters for further GC-MS chromatographic analysis. Considering the routine analysis of several types of

microalgae, the fatty acid profile of microalgae biomass is commonly the palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1), linoleic (C18:2), linolenic (C18:3) and eicosapentaenoic (C20:5) acids, as shown in Figure 1 and Table 1 from periphytic sample, rich in microalgae. The results are obtained in Fatty acids methyl ester (FAME) after derivatization with BF_3 /methanol.

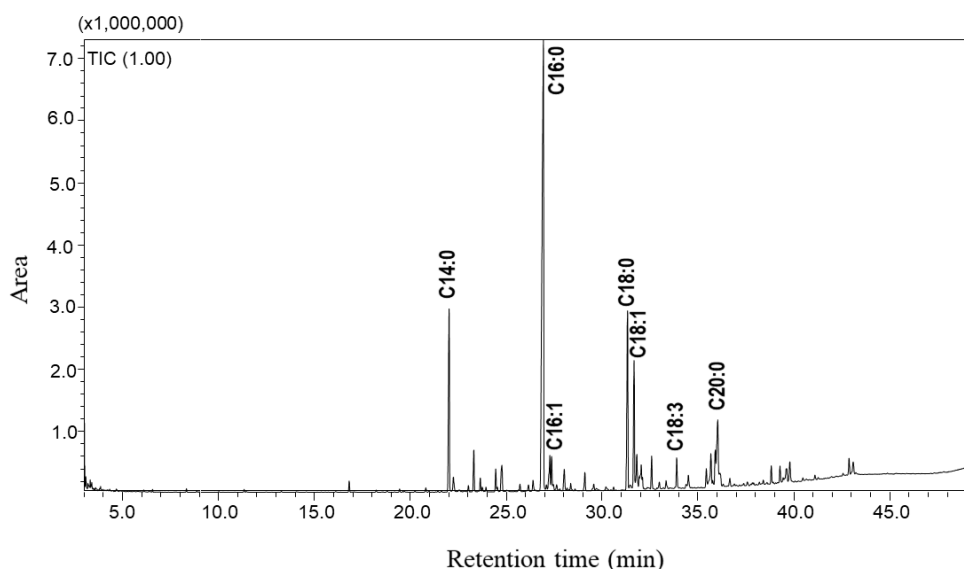


Figure 1. Chromatogram of the main fatty acids found in microalgae biomass obtained by adapted Bligh and Dyer method, derivatized and followed by GC-MS analysis.

Table 1. FAMES found in microalgae biomass derivatized by GC-MS with the retention time (min), equation with r^2 .

Retention time (min)	Fatty acids determined by FAME	Equation	r^2
21.77	C14:0	$y = 1\text{E}+07x + 1\text{E}+06$	0.9908
26.62	C16:0	$y = 1\text{E}+07x + 2\text{E}+06$	0.9916
27.09	C16:1	$y = 7\text{E}+06x + 666418$	0.9876
31.06	C18:0	$y = 1\text{E}+07x + 2\text{E}+06$	0.9839
31.38	C18:1	$y = 1\text{E}+07x + 2\text{E}+06$	0.9861
32.29	C18:2	$y = 8\text{E}+06x + 795091$	0.9870
33.58	C18:3	$y = 7\text{E}+06x + 739008$	0.9800

As shown in Table 1, palmitic acid (C16:0) was the predominant fatty acid in the periphytic samples. It is important to highlight that other compounds can be separated by gas chromatography that have not been identified since the lipid fraction extracted by the Bligh-Dyer method can contain pigments that are in the lipid phase. As an alternative, if there are too many pigments in microalgae biomass can be purified with ethanol washing. After fatty acid analysis, it was found that C16:0 represented a predominance (> 80%) of the detected fatty acids.

If we have biomass with low yields of lipids, some alternatives must be observed, such

as the high levels of ash and the ratio between carbon and nitrogen (C/N) since higher C/N ratios can increase the lipid content [8]. In unfavorable environmental conditions or stress, many microalgae alter their biosynthetic pathways to form and accumulate lipids. It is possible to increase lipid productivity by stress conditions such as by nitrogen inhibition, higher temperatures, changes in pH and high salt concentrations [9].

DISCUSSION

The protocol for microalgae cell disruption with adapted Bligh and Dyer using ultrasonic disruption reduced extraction time and solvent volume. The fatty acid profile was successfully performed for different microalgae.

The use of different ultrasonication equipment should be optimized. As for derivatization, there are several concentrations of BF₃ in methanol on the market, here we used it with 14%. Likewise, the glassware used can be selected to avoid solvent evaporation.

In the chromatographic analysis, the lipid profile (%) can be performed in relation to the total area or the corrected total area. The total corrected area considers the response factor for each FAME separated in the chromatogram.

ACKNOWLEDGMENTS:

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors would also like to thank the University of Santa Cruz do Sul (UNISC), TecnoUNISC, through the Center for Research in Oleochemical and Biotechnological Processes and Products for MCTIC (01.0144.00/2010), CNPq (310228/2019-0), Red Iberoamericana para el Tratamiento de Efluentes con Microalgas (RENUWAL) and Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

DISCLOSURES:

Authors have nothing to disclose.

REFERENCES

- [1] Katiyar R, Arora A (2020). Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Research* 46, 101800.
- [2] Rocca S, Agostini S, Giuntoli J, Marelli L (2015). Biofuels from algae: technology options, energy balance and GHG emissions. In. Sci. Tech. Res. Rep., Off. Eur. Union, Luxembourg. E. 27582. Luxembourg, Publications Office of the European Union.
- [3] Ma Y-A, Cheng Y-M, Huang J-W, Jen J-F, Huang Y-S, Yu C.-C (2014). Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37 (8), 1543-1549.
- [4] Araujo GS, Matos LJBL, Fernandes JO, Cartaxo SJM, Gonçalves LRB, Fernandes FaN. Farias WRL (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics Sonochemistry* 20 (1), 95-98.

- [5] Gerde JA, Montalbo-Lombay M, Yao L, Grewell D, Wang T (2012). Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*. 125, 175-181.
- [6] Günerken E, D'hondt E, Eppink MHM, Garcia-Gonzalez L, Elst K, Wijffels RH (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*. 33 (2), 243-260.
- [7] Bligh EG, Dyer WJ (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (1), 911-917.
- [8] De Souza MP, Rizzetti TM, Hoeltz M, Dahmer M, Júnior JA, Alves G, Benitez LB, Schneider RCS (2020). Bioproducts characterization of residual periphytic biomass produced in an algal turf scrubber (ATS) bioremediation system. *Water Science and Technology*. 82 (6), 1247-1259 (2020).
- [9] De Souza MP, Hoeltz M, Gressler PD, Benitez LB, Schneider RCS (2019). Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges. *Waste and Biomass Valorization*. 10 (8), 2139-2156.

Determinación de carbohidratos totales por fenol-sulfúrico (DuBois-Gilles-Hamilton)

Enrique Romero Frasca¹, Germán Buitrón^{1*}

¹Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México

*Correspondencia: gbuitronm@iingen.unam.mx

RESUMEN

Este protocolo describe la cuantificación de azúcares totales en muestras homogéneas por medio de la formación de complejos fenólicos, de coloración estable, procedentes de la hidrólisis ácida de polisacáridos y oligosacáridos en monosacáridos y posterior deshidratación en compuestos furfúricos.

El ensayo de colorimetría para la determinación de azúcares totales en muestras homogéneas por fenol-sulfúrico se basa en una conversión catalítica de todos los sacáridos de cadena media (oligosacáridos) y de cadena larga (polisacáridos), así como sus derivados, en subunidades monoméricas por acción de un ácido fuerte concentrado (por ejemplo, ácido sulfúrico, H₂SO₄). La exposición prolongada a este tipo de ácido promueve la pérdida moléculas de agua en los monómeros, en un proceso conocido como deshidratación, y hace que se produzcan compuestos furfúricos y hexosas a 5-hidroxifurfural. La interacción

del fenol con el 5-hidroxifurfural facilita la formación de complejos químicos de una coloración amarillo-naranja que absorben la luz en el espectro visible, obteniendo una máxima absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (para hexosas) y 480 nm (para pentosas y ácidos urónicos). La gran ventaja de este método se basa en los bajos costos, estabilidad colorimétrica y pronta disponibilidad de los reactivos, así como su facilidad de procesamiento.

INTRODUCCIÓN

El uso de microalgas como materia prima para el desarrollo de biorrefinerías se ha estudiado en los últimos años por su alto y variado contenido de macromoléculas (carbohidratos, lípidos y proteínas) capaces de convertirse en biocombustibles y bioproductos [1]. A pesar de ello, aún se tienen diversos cuellos de botella en diferentes escalas que deben ser superados. Uno de estos, es emplear métodos de cuantificación rápidos, económicos y simples que permitan una caracterización de las macromoléculas sin comprometer el funcionamiento de los reactores de cultivo.

Los carbohidratos son biomoléculas con una gran importancia en el campo de investigación relacionado con las ciencias de la vida e industrias derivadas de ello [2,3]. En la literatura se han reportado diferentes métodos analíticos para la determinación de carbohidratos, basados tanto en espectrofotometría, como en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), refractometría, entre otras [4] (Parc et al., 2014).

Existe una amplia variedad de métodos colorimétricos basados en espectrofotometría que emplean reactivos como antrona, fenol, orcinol o resorcinol [2]. El método colorimétrico para la determinación de la concentración de carbohidratos más ampliamente utilizado es el desarrollado por DuBois et al. (1956) [5] y conocido como método de DuBois debido a la facilidad del procedimiento, sensibilidad, rapidez de los resultados y por ser apropiado para cuantificar diferentes azúcares como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En síntesis, los carbohidratos presentes en las muestras, tanto oligosacáridos como polisacáridos, pueden ser determinados bajo una reacción de degradación (hidrólisis ácida) donde se generan monosacáridos. La adición de ácidos minerales, como ácido sulfúrico, provoca la deshidratación de los carbohidratos con la eliminación de tres moles de agua [6,7]. Con esta reacción se forman derivados del furfural [8], y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) [2]. En el caso de pentosas, se produce una deshidratación a furfural y en las hexosas a HMF. La presencia del fenol y su interacción con el HMF facilita la formación de complejos químicos de una coloración amarillo-naranja que absorben la luz en el espectro visible, obteniendo una máxima absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (hexosas) y 480 nm (pentosas y ácidos urónicos) y en consecuencia facilitan la cuantificación de los carbohidratos a través de la espectrofotometría [5,9]. En este sentido, el método de DuBois ha demostrado ser estable y reproducible, logrando acortar el tiempo necesario para la determinación de carbohidratos comparado con otros métodos colorimétricos [10].

PROTOCOLO

1. Elaboración de disolución estándar de Glucosa para obtener la curva padrón

1.1. Preparar un estándar de Glucosa a una concentración de $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ agregando 250.0 mg de D-(+) Glucosa grado analítico estándar a un matraz volumétrico de vidrio (Clase A) de 250 mL y aforando con agua destilada hasta la marca.

1.1.1. Agitar el matraz hasta observarse una completa solubilización de la glucosa.

ATENCIÓN: Opcionalmente, la disolución puede someterse a un ligero aumento de temperatura (30 - 50 °C) en una placa de calentamiento para acelerar la solubilización

1.2. A partir de la disolución $1,000 \text{ mg Glucosa L}^{-1}$ se preparan, al menos, cuatro diluciones patrones transfiriendo un volumen conocido a matraces volumétricos de vidrio (Clase A) de 50 mL y aforando con agua destilada hasta la marca.

ATENCIÓN: se sugiere emplear patrones de glucosa con una concentración de 20 a 100 mg L^{-1} y repetir, por lo menos, tres veces la preparación de diluciones con la finalidad de confirmar la confiabilidad del método

Hecho esto, las diluciones patrones son sometidas al procesamiento fenol-sulfúrico descrito en el siguiente paso

2. Procesamiento de muestras líquidas y determinación de absorbancia por espectrofotometría

2.1. En primer lugar, preparar una solución Fenol 5.0% (m/V) añadiendo 50.0 g de Fenol $\geq 99\%$ grado A.C.S. a un matraz volumétrico de 1,000 mL y aforar con agua destilada hasta la marca.

ATENCIÓN: Almacenar la solución de Fenol 5.0% (m/V) a una temperatura de ± 2.0 °C.

2.2. A continuación, añadir 1.0 mL de muestra líquida o dilución patrón dentro de un tubo de ensayo con tapón de rosca, fondo redondo de 10 mL; si no se dispone de suficiente volumen de muestras líquidas, se sugiere realizar una dilución (no más de 1:2) con agua destilada hasta alcanzar el volumen de trabajo

ATENCIÓN: El blanco experimental se prepara sustituyendo la muestra líquida con agua destilada.

2.3. Luego, añadir 1.0 mL de la solución de Fenol 5.0% (m/V) recién preparada a cada uno de los tubos de ensayo y 5.0 mL de H_2SO_4 36N (concentrado) grado A.C.S.

ATENCIÓN: Se sugiere añadir el ácido sulfúrico por las paredes del tubo de ensayo (de manera inclinada) para evitar una fuerte reacción exotérmica y/o generación de vapores. Trabajar en campana de seguridad y utilizando careta protectora.

2.4. Homogeneizar vigorosamente de 5 a 10 s empleando un mezclador de vórtice e incubar a temperatura ambiente por 10 min.

ATENCIÓN: El tubo de ensayo se calienta rápidamente durante la agitación

2.5. Con cuidado, resuspender el contenido de los tubos de ensayo y transferirlos a un baño de agua a temperatura ambiente (25 a 30 °C) por 15 min.

2.6. Transcurrido este tiempo, retirar del baño de agua.

2.7. Transferir una pequeña alícuota de la muestra líquida a una celda espectrofotométrica limpia. Hacer lo mismo con el blanco experimental.

2.8. Introducir el blanco experimental en el espectrofotómetro y establecer como referencia en el espectrofotómetro a una longitud de onda visible de 490nm.

2.9. Leer y registrar la absorbancia de las muestras líquidas bajo la misma longitud de onda visible (490nm)

RESULTADOS

En la Figura 1 se observa la curva de calibración generada a partir de D-(+) Glucosa grado analítico. Resulta importante destacar el alto grado de correlación entre las concentraciones propuestas y una regresión lineal.

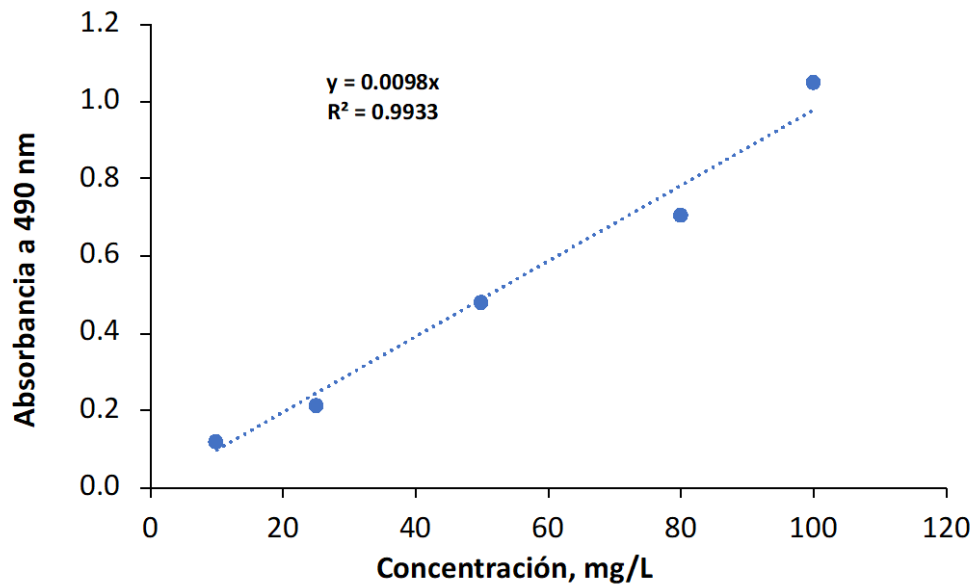


Figura 1. Curva de calibración para determinar la concentración de glucosa a una absorbancia de 490nm empleando el método fenol-sulfúrico.

Considerando entonces la ecuación de la correlación lineal en un rango de 10 a 100 mg L⁻¹ de Glucosa con una regresión ajustada de 0.99, se presenta entonces el cálculo de la concentración de carbohidratos en microalgas empleando la siguiente ecuación:

$$y = 0.0098 x \quad (1)$$

Donde y representa el valor de absorbancia obtenido en un rango de luz visible de 490 nm y x representa la concentración de glucosa en mg L⁻¹ bajo dicho rango de luz visible. Los valores de absorbancia a 490 nm obtenidos para las muestras de consorcio nativo de microalgas corresponden a **0.673**, lo cual sustituyendo en la Ec. 1 se obtiene:

$$0.673 = 0.0098 x \quad (2)$$

Despejando la variable incógnita x, para encontrar la concentración de carbohidratos degradados en glucosa en mg L⁻¹, se obtiene lo siguiente:

$$x = \frac{0.673}{0.0098} = 68.7 \text{ mg L}^{-1} \quad (3)$$

Finalmente, se obtiene que la concentración promedio de carbohidratos en el consorcio nativo de microalgas empleado es de **68.7 mg L⁻¹**. En caso de obtenerse una concentración de carbohidratos fuera del rango de concentración empleado para realizar la curva de calibración, se sugiere ampliar el rango hasta abarcar la concentración obtenida preliminarmente.

DISCUSIÓN

El método desarrollado por DuBois ha demostrado ser simple, estable y reproducible. En comparación con otros métodos colorimétricos, p. ej. el método con antrona, donde la reacción se ha reportado como limitada e inestable dado a la rápida degradación y consecuente oscurecimiento de la antrona, y en consecuencia, del analito. Lo anterior altera su lectura colorimétrica, además de poseer una menor capacidad en el análisis de polisacáridos conformados por mezclas de azúcares [2, 11]. Por otra parte, el método Monsigny emplea resorcinol, el que propone procedimientos de mucha mayor complejidad y duración, si bien presenta menores sensibilidades durante la lectura de las absorbancias de soluciones acuosas de carbohidratos [12].

AGRADECIMIENTOS:

Se agradece el apoyo de CYTED a través del proyecto de Red RENUWAL P319RT002. E. Romero Frasca agradece el financiamiento otorgado por el Programa de Becas CONACYT-OEA-AMEXCID (no. 855766). Se agradece a la Dra. Virginia Montiel Corona por el apoyo técnico proporcionado.

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS:

- [1] Ardila-Álvarez AM, López-Matos Y, Vásquez-Cáceres ME, González-Delgado AD, Barajas-Solano AF (2017). Obtención de lípidos y carbohidratos a partir de microalgas mediante el diseño de medios de cultivo selectivos. *Tecnológicas* 20, 83–94. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-77992017000100007
- [2] López-Legarda X, Taramuel-Gallardo A, Arboleda C, Segura-Sánchez F, Restrepo-Betancur LF (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química* 29, 180–198.
- [3] Zhu B, Liu F, Li X, Wang Y, Gu X, Dai J, Wang G, Cheng Y, Yan C (2015). Fast quantification of endogenous carbohydrates in plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 38, 34–41. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400899>
- [4] Parc AL, Lee H, Chen K, Barile D (2014). Rapid Quantification of Functional Carbohydrates in Food Products. *Food and Nutrition Sciences* 05, 71–78. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.51010>
- [5] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- [6] Bicker M, Hirth J, Vogel H (2003). Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub- and supercritical acetone. *Green Chemistry* 5, 280–284. <https://doi.org/10.1039/b211468b>
- [7] Salak F, Yoshida H (2006). Acid-Catalyzed Production of 5-Hydroxymethyl Furfural from D-Fructose in Subcritical Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45, 2163–2173. <https://doi.org/10.1021/ie051088y>

- [8] Caratzoulas S, Vlachos, DG (2011). Converting fructose to 5-hydroxymethylfurfural: a quantum mechanics/molecular mechanics study of the mechanism and energetics. *Carbohydrate Research* 346, 664–672.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.029>
- [9] Albalasmeh AA, Berhe AA, Ghezzehei TA (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97, 253–261.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- [10] Hall MB (2013). Efficacy of reducing sugar and phenol–sulfuric acid assays for analysis of soluble carbohydrates in feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 185, 94–100.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.06.008>
- [11] Loewus FA (1952). Improvement in Anthrone Method for Determination of Carbohydrates. *Analytical Chemistry* 24, 219–219.
<https://doi.org/10.1021/ac60061a050>
- [12] Monsigny M, Petit C, Roche AC (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry* 175, 525–530.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90578-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90578-7)

MATERIALES Y REACTIVOS:

Nombre del Material/Equipo	Compañía	Número de catálogo	Comentarios/Descripción
Ácido Sulfúrico, A.C.S., ≥95.0%	Herschi Trading	A1590	
Balanza analítica Ohaus Explorer	Cole-Parmer	EW-11011-43	
Celdas de absorción de cubeta macro Hellma™	Fisher Scientific	10518691	
Charola de plástico	PROLAB	PRO1002675	Medidas 57 x 14 mm
D-(+)-Glucosa, estándar analítico	Supelco	47829	
Espátula Bochem™ con cuchara estándar de acero inoxidable	Fisher Scientific	10045070	
Espectrofotómetro UV/VIS Lambda™ 25	PerkinElmer Inc.	-	
Fenol, ACS, ≥99.0%	Sigma-Aldrich	242322	
Gradilla para tubo de ensayo			
Matraz volumétrico, Clase A, 250 mL			
Matraz volumétrico, Clase A, 50 mL			
Micropipeta 1,000 µL			
Pipeta volumétrica, Clase A, 1 mL			
Pipeta volumétrica, Clase A, 10 mL			
Pipeta volumétrica, Clase A, 2 mL			
Pipeta volumétrica, Clase A, 5 mL			
Propipeta o pipeteador			
Puntas para micropipeta			Para 1,000 µL
Vaso de precipitado, 50 mL	PYREX®	CLS100050	
Viales con tapón de rosca, 10 mL	HACH	2415925	

Protocolo de Preparación y Evaluación de Pilas de Combustible de Óxido Sólido

Araceli Fuerte^{1*}, Rita X. Valenzuela¹, Paloma Ferreira-Aparicio¹, Beata Bochentyn²

¹Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).
Departamento de Energía, Madrid, Spain

²Universidad Tecnológica de Gdańsk. Facultad de Física Aplicada y Matemáticas.
Poland

*Correspondencia: araceli.fuerte@ciemat.es

RESUMEN

Este protocolo describe la metodología para la preparación de celdas de óxido sólido y su evaluación como pila de combustible (SOFC). Es fruto del estudio realizado en el marco de los proyectos FCTESTNET [1] y SOFCNET [2] del V Programa Marco, en el Comité IEC/TC105 [3] e investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio.

Las pilas de combustible son dispositivos capaces de transformar la energía química de un combustible en energía eléctrica, con alta eficiencia y baja o nula emisión de contaminantes a la atmósfera. En el marco energético y medioambiental actual resulta imprescindible el desarrollo de sistemas de conversión de energía más eficientes, viables económicamente y no contaminantes. La definición de protocolos estandarizados de preparación y evaluación de este tipo de dispositivos ayudará al rápido desarrollo y comercialización de los mismos y con ello a la necesaria transición energética.

De entre las posibles configuraciones, en el presente trabajo se define el protocolo para la preparación de celdas de óxido sólido soportadas sobre el electrolito. Además, se detalla el protocolo para la evaluación de pilas de combustible SOFC alimentadas con diferentes combustibles y bajo diferentes condiciones de operación, así como para el análisis post-operacional a fin de evaluar las posibles causas de degradación de estos dispositivos.

Los resultados obtenidos con la aplicación de estos protocolos han demostrado que son aptos para la preparación y evaluación de las prestaciones de las pilas de combustible de óxido sólido SOFC, permitiendo la evaluación de prestaciones de nuevos materiales y de diferentes celdas, así como identificar mecanismos de degradación en función de los materiales utilizados o de las condiciones de operación. De este modo, se pueden buscar soluciones que subsanen estas limitaciones y con ello ayudar al posterior escalado y comercialización de estos dispositivos.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un creciente interés en el desarrollo de nuevas tecnologías para la generación de energía sostenible basada en el uso de las denominadas energías renovables, debido principalmente a los graves problemas asociados al cambio

climático, al incremento de la demanda energética en la sociedad actual, al aumento de emisiones contaminantes que afectan a los ecosistemas y a la vida humana, así como a la necesidad de reducir la dependencia de la importación de combustibles fósiles [4,5,6]. Resulta evidente que el desarrollo de sistemas de conversión de energía más eficientes, viables económicamente y no contaminantes es una necesidad y un reto tecnológico al que se enfrenta actualmente la sociedad [7]. En este contexto es donde las pilas de combustible, especialmente las de óxido sólido (SOFCs) juegan un papel importante debido a su alta eficiencia en la conversión de energía y alta flexibilidad en la selección de combustibles, en comparación con otros tipos de pilas de combustible [8].

Una pila de combustible es un dispositivo electroquímico que convierte directamente la energía química de un combustible (generalmente hidrógeno) y un oxidante (generalmente oxígeno) en electricidad y calor, sin la necesidad de una combustión, con alta eficiencia y baja emisión de sustancias contaminantes. En caso de utilizar hidrógeno como combustible los únicos productos de la reacción son electricidad y agua. Los elementos básicos de una pila de combustible son el ánodo, en el que se produce el proceso de oxidación del combustible y se liberan electrones a un circuito externo, el cátodo, donde tiene lugar la reducción del oxidante, y el electrolito, que se encuentra separando físicamente al ánodo del cátodo y que es el responsable del transporte de las especies iónicas necesarias para que la reacción global tenga lugar. En el caso de las pilas de combustible de óxido sólido, debido a las altas temperaturas de operación, se puede alimentar directamente una gran variedad de combustibles, como los hidrocarbonados o biogénicos, biogás, gas natural, bioetanol, etc., los cuales son transformados internamente en hidrógeno [9]. Cabe destacar que aunque la utilización de combustibles de origen biogénico conlleva la inevitable formación de CO₂ en el ánodo de la SOFC, con su utilización se minimiza la huella de carbono del proceso y el impacto medioambiental [10]. Por otra parte, estos combustibles pueden contener una gran variedad de impurezas, tales como H₂S, VOCs, siloxanos, cloruros, etc. Su acumulación gradual y/o interacción en la interfase ánodo/electrolito pueden causar la desactivación del ánodo por bloqueo de los sitios catalíticamente activos y provocar la degradación de la celda y consecuente pérdida de prestaciones [11]. Por ello, desde un punto de vista científico y pensando en la futura comercialización de estos dispositivos, la búsqueda de nuevos materiales más tolerantes a las impurezas y eficientes para la conversión electroquímica resulta estratégica para la conversión directa de biocombustibles en electricidad con alta eficiencia y versatilidad.

En cuanto a los materiales que conforman las pilas de combustible de óxido sólido sus diferentes componentes, electrodos y electrolito, han de cumplir una serie de requisitos. En cuanto a sus propiedades eléctricas ambos electrodos, ánodo y cátodo, han de presentar elevada conductividad electrónica con el fin de minimizar las pérdidas óhmicas. Además, es recomendable que pueda conducir tanto electrones como iones de modo que se aumente la superficie activa, la denominada fase de triple frontera donde gas, electrodo y electrolito entran en contacto y se produce la reacción electroquímica. Por su parte, el electrolito debe presentar una elevada conductividad iónica para permitir el paso del ion óxido y una conductividad electrónica mínima o despreciable para evitar las pérdidas de voltaje.

Los electrodos han de ser porosos para permitir el transporte de las moléculas de

combustible y de oxidante a los sitios de reacción. El límite inferior de porosidad vendría dado por consideraciones de transporte de masa mientras que el superior por la resistencia mecánica de los componentes y la existencia de suficientes caminos de conducción. El diseño de la microestructura puede llegar a ser tan importante como unas buenas propiedades intrínsecas del material. El electrolito ha de ser denso ya que actúa como separador físico de los electrodos evitando el contacto entre los gases y ha de ser estable en ambas atmósferas.

Existen una serie de características comunes a todos los componentes, como que su microestructura no puede variar con el tiempo ya que se produciría una variación en la respuesta del sistema. Los componentes no deben reaccionar entre ellos para evitar la formación de fases secundarias en la interfase, que pueden producir la caída del rendimiento. Deben presentar coeficientes de expansión térmica bajos y similares para minimizar roturas durante los procesos de arranque y parada. Y es deseable que sean baratos para que su procesado sea sencillo de cara a una producción a gran escala.

La temperatura de operación de estos sistemas viene determinada fundamentalmente por las propiedades conductoras de los materiales.

Los materiales comúnmente utilizados en SOFC son de tipo cerámico. Como electrolito se utiliza el óxido de zirconio estabilizado con ytrio (YSZ), con alta conductividad iónica a elevada temperatura ($> 800\text{ }^{\circ}\text{C}$), denso, aislante electrónico y estable en un amplio rango de presiones parciales de oxígeno. El cermet Ni-YSZ constituye frecuentemente el ánodo, siendo un material cerámico que presenta compatibilidad química y coeficiente de expansión térmica adecuado al electrolito, además de aportar conductividad iónica al sistema y un alto contenido en metal (30 %) que cataliza la oxidación del combustible le confiere mayor conductividad electrónica favoreciendo la extracción de corriente hacia el colector. Y, por último, como cátodo se emplea manganita de lantano dopada con estroncio por presentar alta conductividad eléctrica en condiciones oxidantes, adecuada compatibilidad química con la YSZ y semejanza en los coeficientes de expansión térmica. Sin embargo, aunque estos componentes comerciales han resultado los más óptimos para operar este tipo de pilas con hidrógeno, el ánodo de Ni/YSZ no es apto para trabajar con hidrocarburos: el níquel cataliza la descomposición de los hidrocarburos en carbón e hidrógeno, forma depósitos de carbono sobre el catalizador que deterioran su microestructura y alteran sus propiedades electrocatalíticas, y además presenta baja tolerancia al azufre presente en los combustibles hidrocarbonados e inestabilidad en ciclos de oxidación reducción. Como solución se están investigando diferentes materiales anódicos, basados en óxidos mixtos de cerio, cerámicas conductoras electrónicas, titanatos, entre otros. En cuanto al electrolito, también se han estudiado otros materiales, como los óxidos de cerio dopados con gadolinio o samario, que presentan mayor conductividad iónica que la 8YSZ a menor temperatura, lo que permite disminuir la temperatura de operación de la celda. Y en lo referente a los cátodos se están estudiando una gran variedad de perovskitas, estructura K_2NiF_4 , etc. con mayor actividad catalítica en la reducción de oxígeno a temperaturas moderadas ($500\text{-}600\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Una vez descritas las características principales de una pila de combustible, en este caso de óxido sólido (SOFC), y de sus componentes fundamentales, cabe destacar que el establecimiento de protocolos tanto para su preparación, como de evaluación de

sus prestaciones y su normalización y estandarización aplicada al desarrollo e implantación de las pilas de combustible, resulta necesario e interesante debido a principalmente a dos factores. En primer lugar, es una tecnología multidisciplinar, con diferentes materiales, procesos de fabricación, diversidad de condiciones de operación y una gran variedad de aplicaciones y requerimientos de potencia. Y en segundo lugar, la normalización de los procesos de preparación y evaluación puede facilitar economías de escala y curvas de aprendizaje que reduzcan costes de desarrollo e implantación de estos dispositivos como una buena opción tecnológica para la conversión y aprovechamiento de la energía de modo limpio, eficiente y económicamente viable, frente a otras opciones de almacenamiento y gestión de energía.

La normativa referente a la tecnología de las pilas de combustible es desarrollada a nivel internacional por el comité IEC/TC105 de la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) y a nivel nacional por el subcomité técnico: CTN 206/SC105. Hasta el momento, el protocolo para la evaluación de las pilas de combustible de óxido sólido se define en la Especificación Técnica IEC TS 62282-7-2: *Fuel cell technologies – Part 7-2: Test methods – Single cell and stack performance* [12], que actualmente está siendo adaptada para su transformación en norma internacional (IS).

PROTOCOLO

1. Preparación de celda de óxido sólido soportada en el electrolito

A continuación, se muestra un esquema de los pasos a seguir y los materiales requeridos (Figura 1 y Tabla 1):



Figura 1. Diagrama del método de preparación de celdas SOFC soportadas en el electrolito.

Tabla 1. Listado de Materiales

Nombre del Material/ Equipo	Marca	Comentarios/Descripción
Acetona	Panreac	disolvente
Ceramabond 552	Aremco	cemento refractario
Decoflux WB40	Zschimmer-Schwarz	ligante
Hilos de oro y platino	Platecxis	colector de corriente
Manganita o ferrita de lantano (LSM o LSCF)	Praxair	cátodo
Óxido de cerio dopado (Ni, Cu, etc.)	Precusores Panreac	ánodo
Óxido de cerio dopado con gadolinio (GDC)	Praxair	electrolito
Óxido de cerio dopado con samario (SDC)	Praxair	electrolito
Óxido de circonio dopado con itrio (8YSZ)	Pi-Kem	electrolito
Pasta de oro	Heraeus	colector de corriente
Pasta de platino	Engelhard	colector de corriente
Polímero poliéster/poliamida (KD-1)	Croda	dispersante
Polimetilmetacrilato (PMMA)	Sigma-Aldrich	formador de poro
Polivinilbutiral (Butvar B98)	Sigma-Aldrich	ligante
α -terpineol	Fluka	dispersante

1.1. Preparación de electrolito denso y poroso

1.1.1. Preparación de electrolito denso mediante prensado uniaxial (0,5 Kg/15 s) de los polvos del material cerámico seleccionado como electrolito (0,6 g): Sinterización a alta temperatura (1300-1500 °C, dependiendo del material utilizado) durante 10 h a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y posterior pulido de la lámina a fin de reducir el espesor por debajo de 200 μ m.

1.1.2. Preparación de electrolito poroso por deposición mediante la técnica de *tape casting* sobre la lámina delgada de electrolito denso: Para ello se prepara una tinta mezclando los polvos del material cerámico seleccionado como electrolito, con un formador de poro y un ligante, en relación 1:1:1 en peso. Tras depositar la tinta sobre el electrolito denso se lleva a cabo un tratamiento térmico a alta temperatura, en el que se elimina el formador de poro, calentando a una velocidad de 0,5 °C/min y manteniéndose durante 1 h a 400 °C y 2 h a 1400 °C; la velocidad de enfriamiento en todos los casos es de 5 °C/min.

1.2. Preparación de tintas de electrodo y su deposición sobre el electrolito

1.2.1. Preparación de tintas de electrodo: Para la deposición de los electrodos sobre ambos lados del electrolito se preparan tintas con los materiales seleccionados como ánodo y cátodo, mezclando los polvos del material para electrodo con un dispersante (2 % peso) y acetona y se introducen en un molino de rodillos durante 24 h. Tras la molienda, la suspensión resultante se mezcla en un vaso de precipitados con la denominada "ink vehicle" (30 % peso), compuesta por un ligante y un dispersante (Butvar B98 y α -terpineol, relación 5:95 en peso). Se mantiene en agitación a temperatura ambiente

durante 6 días para la correcta eliminación de los disolventes.

1.2.2. Deposición de electrodo sobre electrolito: La tinta resultante de los respectivos electrodos, ánodo y cátodo, son depositadas mediante la técnica de *screen-printing* sobre el electrolito. En primer lugar, se deposita la tinta de cátodo, sobre la lámina densa de electrolito, y se somete a tratamiento térmico, calentando a 1 °C/min y manteniendo a 850 °C/min durante 2h, en el caso de usar las perovskitas listadas en la tabla 1 como cátodo. Posteriormente se deposita la tinta del ánodo sobre la lámina porosa de electrolito y se somete de nuevo a tratamiento térmico a 750 °C, calentando a 1 °C/min y manteniendo dicha temperatura durante 2h, para el caso de ánodos basados en óxido de cerio.

1.3. Pegado de colectores de corriente

Una vez ensamblados electrodos y electrolito se pintan las superficies de los electrodos con platino (cátodo) y oro (ánodo), usando para ello pastas comerciales, y se adhiere un hilo del mismo material que actuará como colector de corriente (ver Tabla 1). Se someten al tratamiento térmico especificado por el fabricante.

2. Evaluación en celda

A continuación, se muestra un esquema de los pasos a seguir (Figura 2):



Figura 2. Diagrama del método de evaluación de celdas SOFC.

2.1. Ensamblaje de la celda de óxido sólido a la celda de medida e instalación en la estación de ensayo

2.1.1. Ensamblaje de la celda: La celda SOFC se sella al tubo cerámico de la celda de evaluación electroquímica, conformada por dos tubos de alúmina, uno exterior al que se sella la celda y uno interior por el que se alimenta el combustible (Figura 3). El cátodo queda expuesto al exterior (lo que se denomina cátodo abierto) y se utiliza el oxígeno del aire para llevar a cabo la reacción. Para el sellado se utiliza un cemento cerámico (Tabla 1) y se aplica el tratamiento térmico especificado por el fabricante.

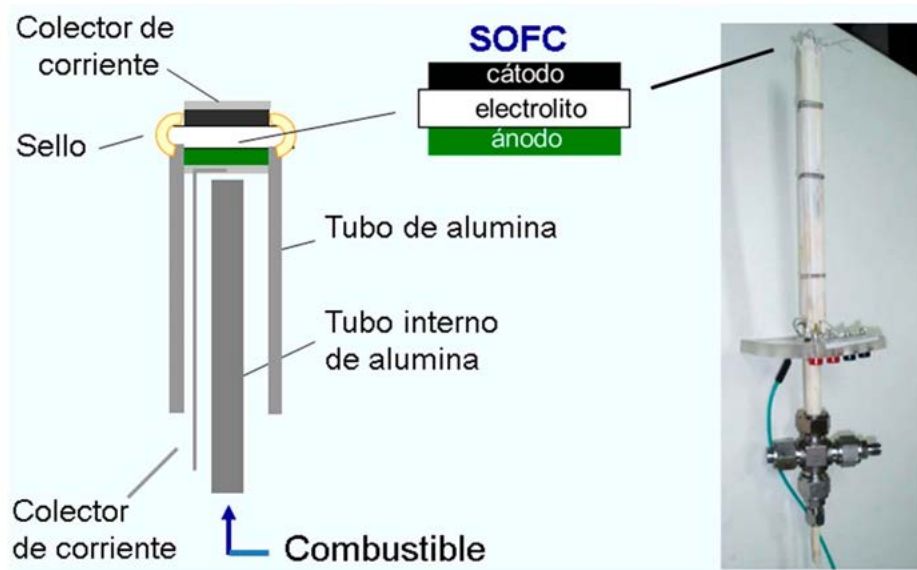


Figura 3. Celda para la caracterización electroquímica de una SOFC.

2.1.2. Instalación de la SOFC en la estación de ensayo: La estación de ensayos para pilas de combustible SOFC incluye un horno tubular, sistemas de alimentación de gases e impurezas mediante controladores del flujo másico, humidificadores de gases previos a la entrada de la celda, una carga electrónica (proporcionada por un potencióstato-galvanostato), las correspondientes unidades de control de los distintos sistemas periféricos y un cromatógrafo de gases conectado a la pila (Figura 4).

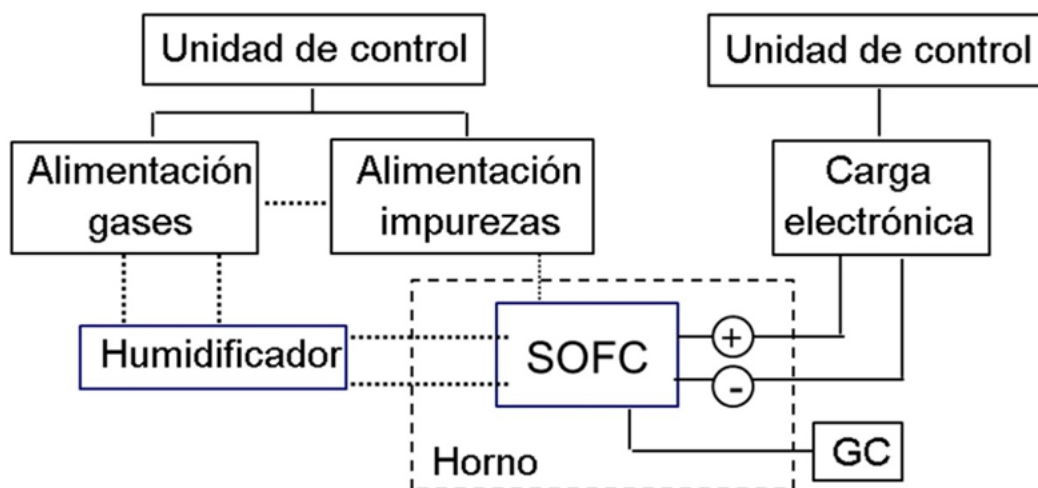


Figura 4. Esquema de la estación de ensayos SOFC.

La celda electroquímica se coloca en la estación de ensayos SOFC, en el horno tubular y para confirmar el correcto sellado de la celda se alimenta hidrógeno y

se comprueba el caudal de gas tanto a la entrada como a la salida de la celda y se descartan posibles fugas (por mal sellado o fractura de la celda) mediante la utilización de un detector de hidrógeno. Se conectan los colectores de corriente a la celda de evaluación, asegurando un contacto eléctrico óptimo y se conecta el potencióstato-galvanostático que se utilizará para realizar la caracterización electroquímica de la celda.

2.2. Puesta en marcha de la estación SOFC y activación de electrodos

Tanto para el arranque, como para la activación de los electrodos y el análisis inicial de la celda el combustible utilizado es el hidrógeno. Como oxidante se utiliza el oxígeno del aire, como ya hemos comentado anteriormente. El rango de temperatura habitualmente estudiado es de 400 a los 950 °C. El voltaje de la celda (OCV) es registrado desde el inicio del calentamiento.

2.2.1. Alimentación del combustible: Se alimenta hidrógeno, con un caudal total de 50 mL/min (calculado para para una celda de aproximadamente 0,3 cm²), controlado mediante controladores de flujo másico. Por lo general, el combustible se hace pasar por un humidificador antes de su entrada a la cámara anódica, a temperatura ambiente para alcanzar una humedad del 3 %.

2.2.2. Calentamiento de la celda: La velocidad de calentamiento es de 1 °C/min, controlada por un termopar situado en el interior del horno junto a la celda. La celda se mantiene indefinidamente a la temperatura seleccionada para su evaluación. Una vez alcanzada la temperatura de operación se mide de nuevo el caudal de entrada y de salida de gases de la celda a fin de descartar posibles fugas.

2.2.3. Activación de electrodos: Una vez estabilizada la temperatura de operación, la celda se mantiene durante 12 horas con alimentación de hidrógeno en el ánodo para asegurar la completa reducción del mismo. Transcurrido este tiempo, se realiza la caracterización electroquímica de la celda, mediante voltametría lineal, determinando la máxima densidad de potencia (MDP) alcanzada en estas condiciones. Se calcula la densidad de corriente que se debe aplicar para que la celda opere al 95 % de su máxima potencia y se mantiene dicha demanda de carga durante 24 h como mínimo, para lograr así la activación del electrodo, lo que se corrobora mediante una nueva voltametría lineal.

2.3. Evaluación de las prestaciones de la SOFC

Las prestaciones de la celda se evalúan de modo continuo tanto a circuito abierto como en modo galvanostático, bajo demanda de carga, ajustándose ésta al valor que permite la operación continua de la celda al 95 % de su máxima potencia. La evaluación de la celda SOFC puede llevarse a cabo utilizando una gran variedad de combustibles, H₂, biogás, etc. pudiendo evaluarse el efecto de las diferentes impurezas presentes en los mismos, diferentes temperaturas, así como diferentes demandas de carga. Para realizar

cualquier cambio en los parámetros bajo estudio, la celda se mantiene a circuito abierto (OCV). Las condiciones utilizadas para los ensayos son las siguientes:

2.3.1. Efecto de la temperatura de operación: se evalúa la celda en intervalos de 50 °C. Los cambios en la temperatura se realizan a una velocidad de 1 °C/min y se espera 1 h para su estabilización.

2.3.2. Efecto de la demanda de corriente: se va variando la misma a una velocidad de 10 mV/s y registrando el voltaje resultante, intentando en lo posible que el voltaje de la celda no sea inferior a 0,5 V a fin de minimizar su degradación.

2.3.3. Efecto del combustible alimentado: se modifica la alimentación anódica sustituyendo el hidrógeno por otro combustible, como metano, biogás, etc. y se espera 1 h para la homogeneización de la composición de los gases alimentados.

2.3.4. Ensayos de durabilidad: durante periodos de tiempo superiores a las 1000 h bajo demanda de corriente operando al 95 % de la máxima densidad de potencia.

2.3.5. Ensayos de enfriamiento y posterior reinicio de la operación: a una velocidad de enfriamiento y calentamiento de 1 °C/min, a circuito abierto y alimentación de hidrógeno en el ánodo.

2.4. Caracterización electroquímica

Una vez estabilizadas las condiciones del ensayo a realizar, se mantiene la celda operando 1 h a OCV y 1 h bajo demanda de corriente, al 95 % de la máxima densidad de potencia. Antes y después de cada ensayo se realiza la caracterización electroquímica mediante voltametría lineal y espectroscopía de impedancia, utilizando para ello los siguientes parámetros:

2.4.1. Voltametría lineal: se selecciona como voltaje inicial para la medida el valor del OCV + 0,2 V y la velocidad de barrido es de 10 mV/s.

2.4.2. Espectroscopía de impedancia: se lleva a cabo a circuito abierto, en modo galvanostático, en un rango de frecuencias de 60KHz a 10 mHz y mediante la aplicación de una intensidad eléctrica de 5 mA.

2.5. Caracterización post-operacional de la celda

A fin de poder evaluar la degradación de la celda tras su operación, se llevará a cabo su desmontaje utilizando para ello una herramienta rotativa o miniamoladora para trabajos delicados con accesorios de corte para cerámicos

(tipo Dremel). La celda es caracterizada mediante diferentes técnicas.

2.5.1. Microscopía electrónica de barrido y análisis EDX: permite identificar la posible migración de cationes entre los electrodos y el electrolito, así como la formación de capas intermedias en la interfase que pudieran ser aislantes y mermar las prestaciones de la pila de combustible. Mediante la espectrometría por dispersión de energías de rayos X (EDX) en diferentes puntos del ánodo podemos identificar y estimar cuantitativamente la acumulación de diferentes impurezas presentes en el combustible, que pueden bloquear los sitios catalíticamente activos para la reacción electroquímica y envenenar el ánodo, provocando en ocasiones un deterioro irreversible de la pila de combustible.

2.5.2. Termogravimetría: para evaluar la posible formación de depósitos de carbono sobre el ánodo, cuando se utilizan combustibles hidrocarbonados. Se realizan ensayos de oxidación a temperatura programada (TPO), utilizando una corriente gaseosa de 10 % O₂ en inerte (Ar), con un caudal de 25 mL/min y variando la temperatura de 30 a 750 °C a una velocidad de 5 °C/min.

RESULTADOS

Siguiendo los protocolos descritos se prepararon diferentes celdas de óxido sólido soportadas en el electrolito y se evaluaron bajo las diferentes condiciones descritas en el protocolo. El registro continuo del voltaje, la caracterización propuesta, así como la aplicación de los diferentes pasos definidos en el protocolo permiten, de modo efectivo, la preparación y evaluación de las prestaciones de celdas de óxido sólido operando como pilas de combustible, pudiendo valorar comparativamente diferentes materiales, así como diferentes condiciones de operación. A continuación, se muestran los resultados obtenidos con una celda de óxido sólido basada en óxidos de cerio dopados (electrolito y ánodo) y utilizando como cátodo la perovskita ferrita de cobalto, estroncio y lantano (LSCF). En la Figura 5 se muestra el registro continuo del voltaje durante toda la operación de la celda con diferentes combustibles y bajo diferentes demandas de carga [13]. En la Figura 6 se muestra comparativamente la potencia desarrollada por la celda alimentada con diferentes combustibles.

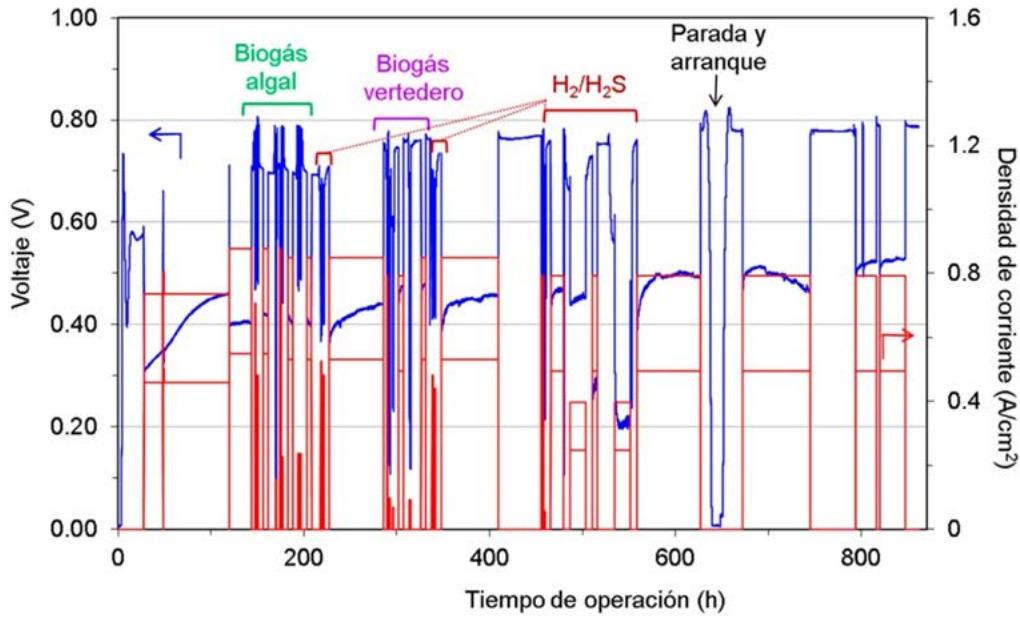


Figura 5. Prestaciones de una SOFC bajo diferentes combustibles y demandas de corriente.

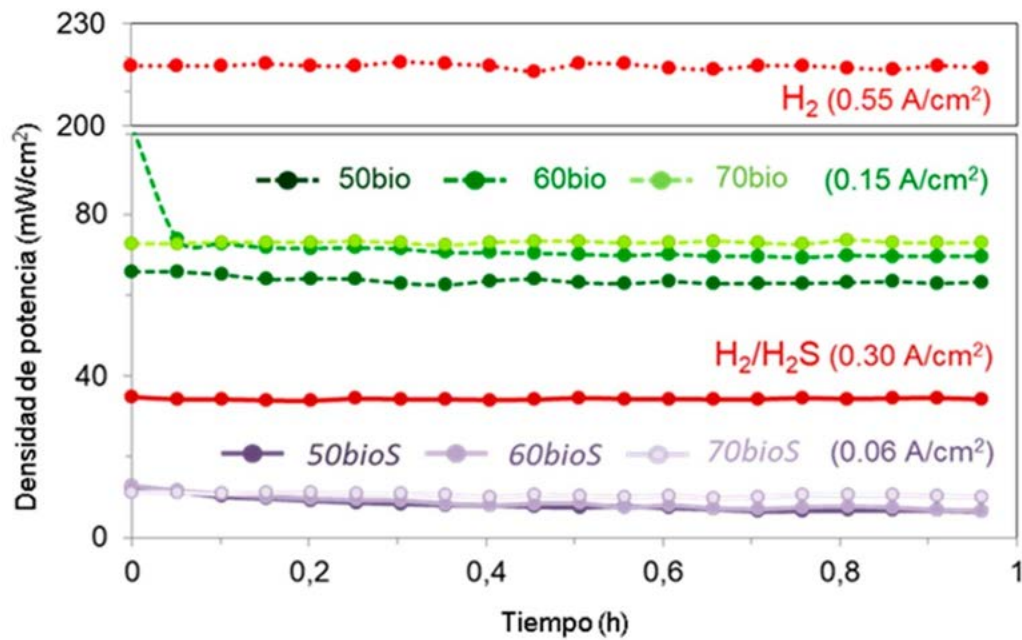


Figura 6. Representación comparativa de las prestaciones de la SOFC alimentada con diferentes combustibles.

La caracterización electroquímica propuesta permite identificar pequeñas variaciones de las prestaciones de la pila en función de las diferentes variables estudiadas, como por ejemplo el efecto de las impurezas (Figura 7) o la recuperación de las prestaciones tras eliminar las impurezas del combustible (Figura 8) [14].

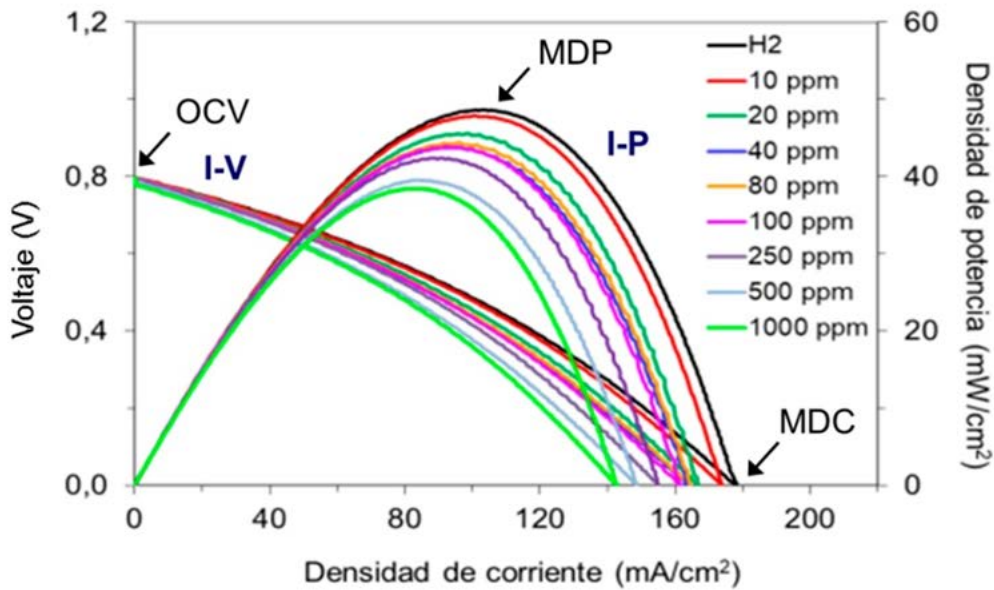


Figura 7. Representación gráfica de las voltametrías lineales (curvas I-V e I-P).

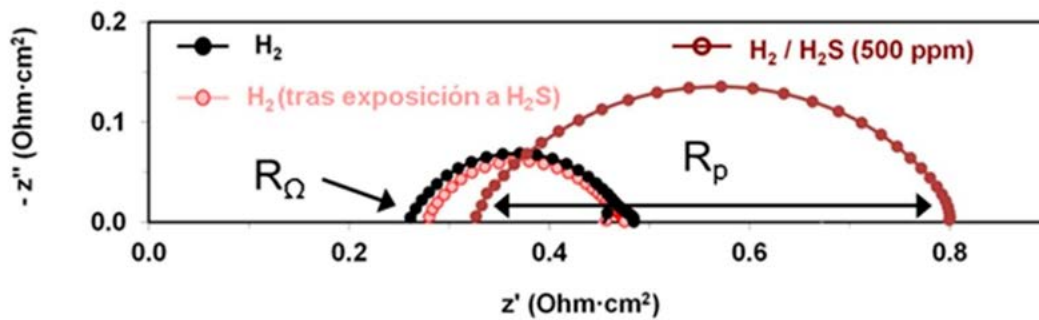


Figura 8. Representación gráfica de los espectros de impedancia (Diagrama de Nyquist).

Finalmente, la caracterización de la celda tras la operación permite evaluar su degradación debido a la posible migración de cationes en la interfase formando capas aislantes [15], por envenenamiento del electrodo debido a las impurezas del combustible, o por la formación de depósitos de carbono que taponan los centros catalíticos activos del ánodo y merman las prestaciones finales de la pila de combustible (Figuras 9-11) [14].

Mediante los ensayos de oxidación a temperatura programada (TPO) podemos cuantificar comparativamente los depósitos de carbono que se forman con los diferentes materiales anódicos, al operar la pila con un combustible hidrocarbonado (gas natural, biogás, etc.) Además, según la temperatura a la que se produce su oxidación y volatilización en forma de CO₂, se obtiene información del tipo de depósito de carbono formado y su labilidad.

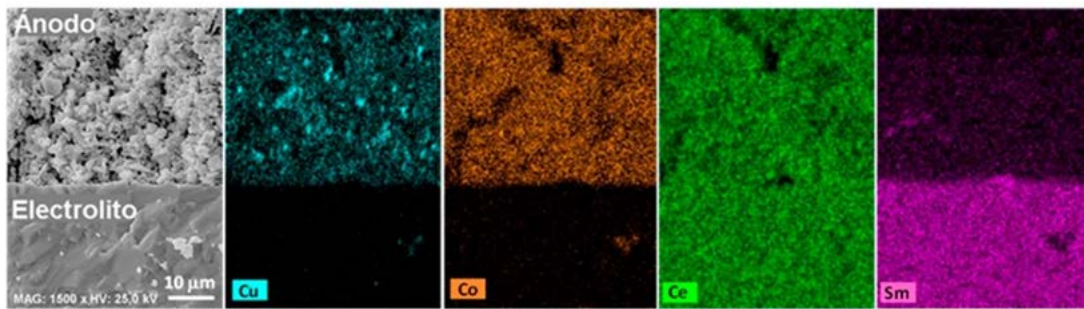


Figura 9. Evaluación de la posible segregación de cationes por espectroscopía electrónica de barrido y “mapping”.

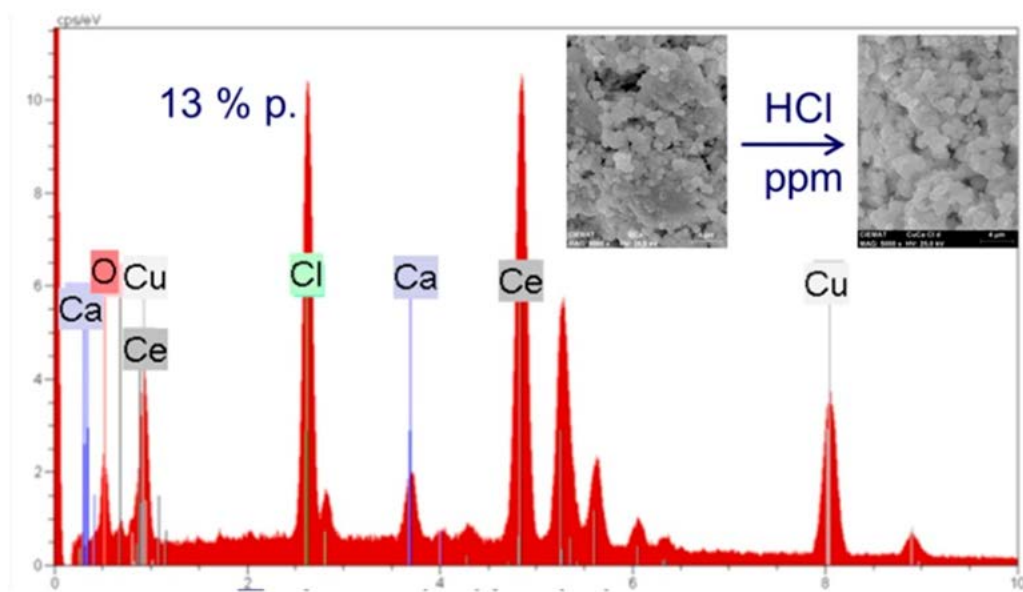


Figura 10. Acumulación de impurezas en la superficie del ánodo, análisis mediante SEM-EDX.

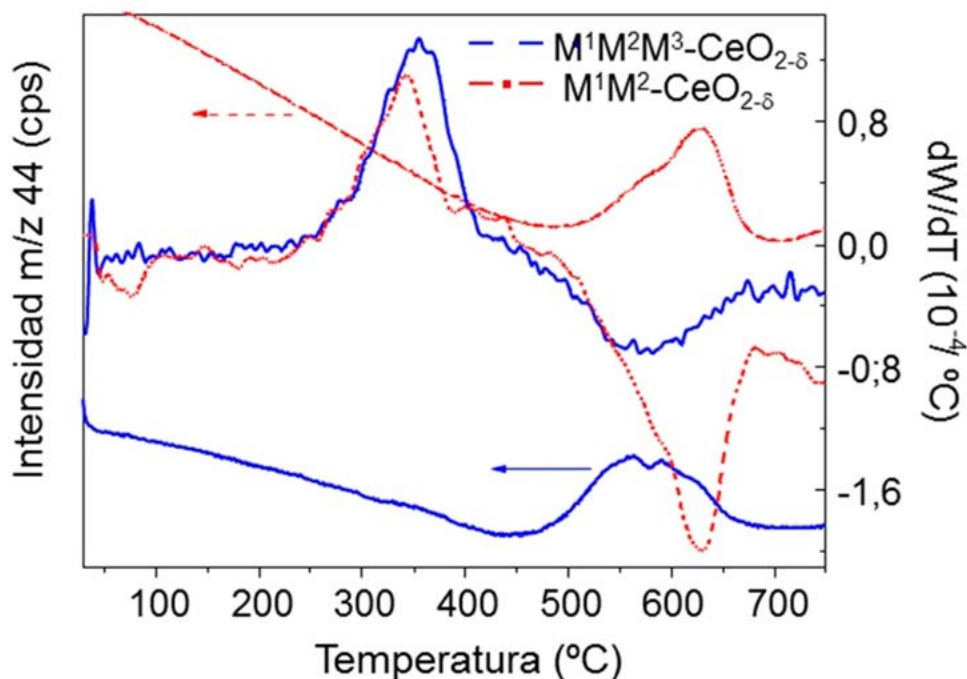


Figura 11. Evaluación de la formación de depósitos de carbono mediante termogravimetría (ensayos TPO) y espectroscopía de masas.

DISCUSIÓN

El presente protocolo describe una metodología adecuada para la preparación de pilas de combustible de óxido sólido soportadas en el electrolito, así como para la evaluación de sus prestaciones. Permite la comparación de diferentes materiales propuestos como electrodos o electrolito de este tipo de pilas de combustible y el estudio de diferentes variables de operación a fin de optimizar el desarrollo de este tipo de dispositivos y facilitar su comercialización e implantación como sistemas de conversión de energía limpios, eficientes y fiables.

A fin de poder evaluar la posible degradación de estos dispositivos, debido a las condiciones de operación requeridas según su aplicación, se ha implementado el protocolo con una caracterización exhaustiva post-operacional de la celda. Los resultados de esta caracterización permiten proponer nuevas alternativas que subsanen las posibles causas de degradación.

Aunque en él se describe exclusivamente el método de preparación de pilas de combustible de óxido sólido (SOFC) depositadas sobre el electrolito, de entre las configuraciones posibles, el protocolo de evaluación de celdas definido es aplicable a cualquier tipo de configuración de celdas SOFC.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen el apoyo de la Red RENUWAL- P320RT0025 CYTED, así como a la Unidad de Pilas de Combustible del CIEMAT por las instalaciones utilizadas. El presente trabajo no ha recibido ninguna financiación específica del sector público o privado.

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- [1] FCTESTNET: The fuel cell testing and standardization network. ENG2-CT-2002-20657. <https://cordis.europa.eu/project/id/ENG2-CT-2002-20657/es>.
- [2] SOFCNET: Thematic network on solid oxide fuel cell technology. ENG2-CT-2002-20652. <https://cordis.europa.eu/project/id/ENG2-CT-2002-20652/es>.
- [3] IEC/TC105: Fuel cell technologies. https://www.iec.ch/ords/f?p=103:7:4616648204935:FSP_ORG_ID:1309.
- [4] Sims REH (2004). Renewable energy: a response to climate change. *Solar Energy*. 76, 9-17.
- [5] Erdinc O, Uzunoglu M (2012). Optimum design of hybrid renewable energy systems: Overview of different approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 1412-1425.
- [6] Kober T, Schiffer HW, Densing M Panos E (2019). Global energy perspectives to 2060 – WEC's World Energy Scenarios 2019. *Energy Strategy Reviews* 31, 100523.
- [7] European Environment Agency, EEA Rep. 1-8.
- [8] Fuel Cell Handbook (2004). 7th ed., EG&G Technical Services, Inc. U.S. Department of Energy.
- [9] Ormerod RM (2003). Fuels and Fuel Processing in: High Temperature Solid Oxide Fuel Cells: Fundamentals, Design and Applications. Singhal S.C. and Kendall K. (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam 333-361.
- [10] Craggs L, Gilbert P (2018). Sustainable Greenhouse Gas Reductions from Bioenergy Systems-Climate Change: A Bioenergy Driver and Constraint in: Greenhouse Gas Balances of Bioenergy Systems, Thornley P. and Adams P. (Eds.), Academic Press 1-10.
- [11] Haga K, Adachi S, Shiratori Y, Itoh K, Sasaki K (2008). Poisoning of SOFC anodes by various fuel impurities. *Solid State Ionics* 179, 1427-1431.
- [12] Technical Specification: IEC TS 62282-7-2: Fuel cell technologies – Part 7-2: Test methods – Single cell and stack performance tests for solid oxide fuel cells (SOFC). International Electrotechnical Commission. ISBN 978-2-8322-1539-5 (2014).
- [13] Fuerte A, Valenzuela RX, Ferreira-Aparicio P, Bochentyn B (2021). Fuel cells and microalgae for sustainable energy production. *J. of Energy Chemistry*. Submitted 2022.
- [14] Fuerte A, Valenzuela RX, Escudero MJ (2017). Role of dopants on ceria-based anodes for IT-SOFCs powered by hydrocarbon fuels. *Universal Journal of Electrical and Electronic Engineering* 5, 45-55.
- [15] Fuerte A, Valenzuela RX, Escudero MJ, Daza L (2014). Study of a SOFC with a bimetallic Cu-Co-ceria anode directly fuelled with simulated biogás mixtures. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 4060-4066.

Método de cálculo del potencial bioquímico de metano (BMP), mediante el equipo AMPTS II, para la investigación en digestión anaeróbica.

Juan Luis Ramos¹, Nely Carreras^{2*}

¹Departamento de Ingeniería Agraria y del Medio Natural, Universidad de La Laguna (ULL), Camino San Miguel de Geneto, 2, 38296, San Cristóbal de La Laguna, España.

²CIEMAT. Avda. Complutense 40. 28040 Madrid.

Correspondencia: nely.carreras@ciemat.es

RESUMEN

El potencial bioquímico de metano (BMP) proporciona una medida de la digestibilidad anaeróbica de un sustrato dado. La información proporcionada por esta prueba es por tanto valiosa para determinar la cantidad de carbono orgánico de un sustrato que se puede convertir anaeróbicamente en metano, es decir para evaluar potenciales sustratos anaeróbicos y optimizar el diseño y el funcionamiento de un digestor anaeróbico. Asimismo, esta prueba proporciona un método repetible para hacer comparaciones relativas de la digestibilidad anaeróbica y la producción potencial de biogás entre varios sustratos de forma individual y/o en codigestión. El conocimiento de esta prueba es por tanto importante para la investigación y gestión de las plantas de biogás. Este documento describe el procedimiento de la prueba BMP utilizado en el Laboratorio de Digestión Anaerobia del CIEMAT para cuantificar la producción de biogás. Se siguen las indicaciones de la norma alemana VDI 4630 de la Verein Deutscher Ingenieur (Asociación Alemana de Ingenieros), norma de amplia aceptación en el sector de la investigación en digestión anaerobia, con el fin de establecer una metodología clara que permita que pruebas realizadas en diferentes centros de investigación, llevadas a cabo por diferentes técnicos y realizadas con diferentes sustratos sean comparables entre sí en cuanto a los resultados obtenidos. Para ello, se utiliza el Analizador Automático de Medición de Metano (AMPTS II). Este equipo ha ido ganando popularidad en los estudios de biodegradabilidad anaeróbica por su capacidad para proporcionar mediciones, registros e informes automáticos y en tiempo real de la producción de biogás.

INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico mediante el cual una serie de bacterias en condiciones anaerobias son capaces de degradar la materia orgánica generando una serie de productos gaseosos conocidos como biogás, con un alto valor energético por su contenido en metano (50-70%), y un subproducto rico en nutrientes conocido como digerido o digestato. Este proceso se produce a través de una serie de complejos procesos microbiológicos, en los cuales diversos tipos de bacterias trabajan en sinergia [1]. A medida que crece la protección ambiental y la demanda de energía

renovable, hay una creciente atención de la comunidad científica por la DA [2] debido al beneficio tanto energético como medioambiental que aporta en el tratamiento de residuos orgánicos [3-6].

La idea de la prueba BMP, que fue descrita por primera vez por Owen et al, en 1979, se ha ido desarrollando y perfeccionando a lo largo de los años [3,7-11]. Los distintos protocolos propuestos aportan información más o menos detallada de cómo diseñar y realizar las pruebas de BMP. Las pruebas de biodegradabilidad tienen como objetivo principal determinar la idoneidad de un sustrato o mezcla de sustratos para su empleo en DA. Su idoneidad se determina analizando la biodegradabilidad máxima, así como la máxima producción de biogás y metano. El BMP es un parámetro que indica la máxima cantidad de metano que se puede recuperar de un sustrato. Se suele expresar bien por unidad de masa de sólidos volátiles (VS) o demanda química de oxígeno (DQO). De igual manera, las pruebas de BMP son una opción para medir el impacto de un pretratamiento en la degradabilidad del sustrato. Por ello, se vienen realizando numerosos estudios e investigaciones que tratan de determinar el BMP de diversos tipos de sustratos orgánicos [3], tales como residuos orgánicos y lodos de depuradora, y también de cultivos energéticos [12]. La medida del BMP de sustratos orgánicos es una herramienta poderosa y útil para la investigación [11,13-16] y, a efectos prácticos de la DA, para el diseño y gestión de las plantas de biogás [11,17-19].

Proporcionar condiciones óptimas para el proceso de DA es clave para lograr el mayor grado posible de degradación. Por lo tanto, las condiciones aplicadas en una prueba de BMP han de ser las del mejor ambiente posible para el crecimiento microbiano. Para ello, la materia prima a estudiar se sitúa en las condiciones óptimas en los reactores anaerobios durante un periodo de tiempo a lo largo del cual no se realiza ningún tipo de acción sobre ellos salvo la agitación y el mantenimiento de una temperatura constante.

En la práctica, las pruebas BMP son ensayos en discontinuo en los que una cantidad conocida de material objeto de estudio se mezcla con una cantidad suficientemente alta de inóculo procedente de un digestor en operación [20], que contiene una población microbiana mixta capaz de llevar a cabo el proceso de DA [21]. La elección de la relación inóculo-sustrato ha de ser adecuada para evitar tanto el exceso como la insuficiencia de carga del proceso [22]. El espacio de cabeza del reactor se purga antes del inicio de la prueba para eliminar el oxígeno por el paso de un gas inerte. Después, el reactor se mantiene a una temperatura adecuada, que puede ser mesófila o termófila, dependiendo de la procedencia del inóculo y/o del proceso considerado, y se mezcla de forma suave. Se controla la cantidad producida de biogás y el propio biogás se libera de forma continua o intermitente. De esta manera, se puede determinar una curva cinética para la producción de biogás a lo largo del tiempo. La composición del biogás generalmente se analiza mediante cromatografía de gases (GC) o analizador de infrarrojos para determinar los porcentajes de metano y dióxido de carbono. Como alternativa, la fracción de CO_2 puede eliminarse haciendo reaccionar, por ejemplo, el biogás con hidróxido de sodio para retener el CO_2 y medir solo metano; en este caso el contenido de CO_2 se puede determinar mediante valoración por retroceso o titulación. El ensayo ha de continuar hasta que la tasa de producción de metano sea muy baja para dar tiempo a la degradación de los sustratos más lentos [9]. La prueba BMP generalmente termina cuando cesa la producción de biogás es decir,

cuando la curva de producción acumulativa de biogás se aplana o cuando la producción de biogás de la muestra de ensayo sea la misma que la del inóculo. Este tiempo puede ser de 30 a 45 días o puede llegar a 50 días para sustancias como la celulosa [3], o incluso a 100 días o más para algunos materiales con contenido lignocelulósico [23]. Con el fin de estandarizar las pruebas de BMP, es recomendable que la prueba finalice cuando la producción neta diaria de metano sea inferior al 1% del metano acumulado durante tres días consecutivos [9,24]. El inóculo debe ser digerido por separado (en las mismas condiciones) para obtener un valor de control (cantidad de metano producida por el inóculo únicamente); este valor de control debe deducirse de los resultados de los reactores para obtener el rendimiento atribuido al sustrato real de la prueba. Dividiendo el rendimiento de metano atribuido al sustrato del ensayo por la cantidad de sustrato añadido, se obtiene el rendimiento de metano específico; éste puede expresarse en unidades de $\text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{SV}$ añadido o $\text{m}^3 \text{kg}^{-1} \text{ST}$ añadido, u otra unidad, según corresponda.

La biodegradabilidad anaeróbica de un sustrato está relacionada con el BMP ²⁵, se obtiene dividiendo el valor del BMP experimental por el valor teórico correspondiente [2,20]. Este valor teórico se suele calcular en base a la estequiometría del proceso de DA según la composición elemental del sustrato [26]. Ésta puede medirse directamente o a partir del análisis macromolecular (p. ej., carbohidratos, proteínas, lípidos) o incluso mediante un análisis detallado [27], ya que permite distinguir mejor entre los componentes del sustrato que se degradan con facilidad, con dificultad y los que no se degradan [7]. Para muestras de líquidos y lodos, el valor teórico se puede calcular en base a la DQO y el rendimiento teórico de metano de DQO, es decir $0,35 \text{ L CH}_4 / \text{g DQO}$ [28]. Determinar la DQO de materia orgánica particulada también es posible, pero entraña mayor dificultad [29].

Existe una falta de estandarización en unidades y técnicas en la determinación del BMP, lo que limita la confianza en la información que se genera al obtener resultados no comparables ya que todos los métodos se utilizan de manera diferente y, a menudo, los investigadores los modifican para definir la biodegradabilidad anaeróbica de los compuestos orgánicos [22]. Actualmente, el problema central con las pruebas de BMP es la falta de procedimientos estandarizados y la falta de información que se aporta en los informes [11,30].

No obstante, para la realización de las pruebas de biodegradabilidad se emplea ampliamente la norma VDI 4630 de la Verein Deutscher Ingenieur (Asociación Alemana de Ingenieros) [10]. Esta norma, de amplia aceptación en el sector de la investigación en DA, pretende unificar metodologías. Como se ha comentado, uno de los principales inconvenientes de la investigación en este campo es la dificultad de comparar resultados de experimentaciones realizadas por diferentes grupos de trabajo debido a la diversidad de metodologías empleadas. Esta norma pretende establecer una metodología clara que permita que pruebas realizadas en diferentes centros de investigación, llevadas a cabo por diferentes técnicos y realizadas con diferentes sustratos sean comparables entre sí en cuanto a resultados obtenidos. La norma incluye pautas sobre cómo debe realizarse la toma de muestras, su conservación y transporte, así como otras consideraciones.

El procedimiento de la prueba BMP utilizado en el Laboratorio de Digestión Anaerobia del CIEMAT para cuantificar la producción de biogás ha seguido las indicaciones de la

norma alemana VDI 4630, con el fin de que los resultados obtenidos sean ampliamente compatibles y comparables a los obtenidos por otros investigadores. En este protocolo se especificarán las indicaciones que tienen un efecto directo en los resultados obtenidos. Para llevar a cabo la prueba BMP se utiliza el Analizador Automático de Medición de Metano (AMPTS II, Bioprocess Control, Suecia). Este equipo ha ido ganando popularidad en los estudios de biodegradabilidad anaeróbica por su capacidad para proporcionar mediciones, registros e informes automáticos y en tiempo real de la producción de biogás.

PROTOCOLO

1. Condiciones de la prueba

- 1.1. Realización de las pruebas de biodegradabilidad como mínimo por duplicado, aunque preferentemente se realizarán por triplicado.
- 1.2. Reducción del tamaño de partícula del sustrato o mezcla de sustratos a emplear antes del comienzo de la prueba de biodegradabilidad.
- 1.3. Utilización de un inóculo apropiado: se recomienda la utilización de un inóculo procedente del tratamiento de sustratos con el mismo origen que el sustrato en estudio. Si esto no es posible, es preferible utilizar un inóculo procedente del tratamiento de lodos de EDAR ya que, debido a su naturaleza, este inóculo entra en contacto con todo tipo de materia orgánica y por tanto cuenta con una rica diversidad microbiana.
- 1.4. Uno de los indicadores de calidad que debe cumplir dicho inóculo es que el contenido en materia volátil o sólidos volátiles (SV) sea igual o superior al 50% del contenido de materia seca o sólidos totales (ST). La materia volátil se corresponde con microorganismos en un inóculo bien digerido y, por tanto, este porcentaje indica que existe una gran proporción de microorganismos en el medio.
- 1.5. El inóculo debe mantenerse durante un mínimo de 3-4 días en condiciones anaerobias a la temperatura a la que operará el ensayo de biodegradabilidad con el objetivo de disminuir al mínimo su producción endógena de biogás. Esto puede realizarse dejando el inóculo en los propios reactores del equipo AMPTS II.
- 1.6. La prueba de biodegradabilidad debe contener entre un 1,5 y un 2% en peso de materia orgánica procedente del inóculo con el objetivo de asegurar una concentración de biomasa microbiana suficiente.
- 1.7. La cantidad de materia orgánica del sustrato o mezcla de sustratos a introducir en los ensayos se calcula en base a:
 - $SV_{\text{sustrato}}/SV_{\text{inóculo}} \leq 0.5$
 - La producción de biogás a partir del sustrato debe ser mayor del 80% de la producción de biogás total.
 - La concentración de sólidos totales en la prueba debe ser menor del 10% para asegurar un buen contacto entre biomasa microbiana y biomasa del sustrato a degradar.

- 1.8. Se debe realizar una purga con gas nitrógeno (N_2) del gas de cabecera de los reactores antes de su sellado para asegurar condiciones anaerobias desde el principio de la experimentación, lo que permitirá reducir o eliminar completamente las fases de degradación aerobias que conducirían a una disminución de la producción de biogás.
- 1.9. Se debe incluir reactores de referencia o blancos en el ensayo mediante los que se determinará la producción endógena de biogás del inóculo para después ser restada de la producción total de biogás de los reactores con sustrato.
- 1.10. La agitación de los reactores anaerobios debe ser constante o al menos una agitación intensa una vez al día.

2. Descripción del Analizador automático de medición de metano (AMPTS II)

Este equipo ha sido desarrollado por la empresa Bioprocess Control1 (Lund, Suecia) con el objetivo de simplificar la realización de los ensayos de biodegradabilidad. Consta de los siguientes elementos:

1. Baño termostático
2. 15 reactores anaerobios de 500 mL de capacidad con motor de agitación individual.
3. 15 botellas de fijación de CO_2 de 80 mL de capacidad.
4. Unidad de celdas de medida por desplazamiento de volumen con 15 canales.
5. Conexión online a ordenador por medio del software propio.

Los reactores anaerobios constan con una salida de gas en la parte superior, que se conecta a las botellas de fijación de CO_2 mediante tubos flexibles de 1/8". En estas botellas de fijación de CO_2 una solución básica absorberá el CO_2 contenido en el biogás, permitiendo que continúe fluyendo el metano desde estas botellas a las celdas de medida de volumen por desplazamiento.

Se recomienda la lectura completa del manual de operación y mantenimiento del AMPTS II antes de comenzar a utilizarlo.

3. Procedimiento experimental

En esta sección se detallará el procedimiento experimental empleado en el ensayo de biodegradabilidad. Durante el procedimiento experimental se seguirán las indicaciones de la norma VDI 4630.

- 3.1. Selección y caracterización del inóculo
 - 3.1.1. Obtener un inóculo apropiado
 - 3.1.2. Antes de cada ensayo el inóculo se mantiene en predigestión durante 3-4 días para reducir la producción endógena de biogás.
 - 3.1.3. Cuando ésta finaliza, se realiza el análisis de ST y SV sobre el inóculo para, de acuerdo a las indicaciones de la norma VDI 4630, calcular la proporción de inóculo y sustrato/s a emplear en cada ensayo.
 - 3.1.4. Sobre el inóculo también se realizan análisis de NTK, NTA, DQOt, DQOs, alcalinidad parcial y total (AP y AT), ácidos volátiles (AV) y pH.5.

3.2. Caracterización del sustrato o sustratos a emplear.

- 3.2.1. En el caso de que se realicen ensayos de codigestión de varios sustratos conviene conocer la composición elemental de cada cosustrato para determinar la proporción (en base a SV) de cada uno de ellos en las mezclas a estudiar, obteniendo mezclas con una relación C/N determinada. Por lo tanto, además de realizar dicho análisis elemental es necesario caracterizar los sustratos en base a su contenido en sólidos volátiles (SV). A su vez, se realiza la caracterización en sólidos totales (ST), nitrógeno total Kjeldahl (NTK), demanda química de oxígeno total y soluble (DQOt y DQOs) y nitrógeno total amoniacal (NTA).
- 3.2.2. Posteriormente, se procede a la homogeneización de los sustratos por separado. En el caso de sustratos sólidos se realiza una molienda de éstos, en el caso de sustratos semisólidos se recomienda una trituración y para los sustratos líquidos una correcta homogeneización mediante agitación.
- 3.2.3. Una vez se determina las cantidades de inóculo y sustrato a emplear en cada ensayo, éstas se introducen en el reactor anaerobio.
- 3.2.4.

3.3. Caracterización de la mezcla inóculo +sustrato

Además de los análisis que se realizan sobre el/los sustrato/s individuales y sobre el inóculo, hay que realizar análisis del contenido de cada uno de los reactores, es decir, sobre la mezcla inóculo+sustrato/s. Para ello existen diferentes opciones, de las cuales se elegirá una u otra en función de la experiencia de la persona que vaya a llevar a cabo la experimentación y en función de las características de los sustratos a emplear. Las técnicas que se han utilizado hasta ahora son las siguientes:

- 3.3.1. Análisis iniciales sobre mezcla réplica: Además de las mezclas (sustrato/s más inóculo) de cada reactor, se realiza aparte una réplica extra para cada tipo de mezcla a analizar en el ensayo de biodegradabilidad. Esta mezcla extra será la que se utilice para realizar los análisis iniciales, por lo tanto, conoceremos las condiciones iniciales de cada mezcla, sin embargo, no conoceremos si existen desviaciones entre reactores réplicas que contienen la misma mezcla. Este método se recomienda cuando se analicen sustratos de difícil homogeneización con el inóculo. Antes de hacer el análisis de la muestra réplica deberemos asegurarnos de que exista una correcta homogeneización.
- 3.3.2. Análisis iniciales sobre muestra del reactor: En este caso, se realiza más mezcla de la necesaria para el ensayo de biodegradabilidad, retirando una parte de ésta del interior de cada reactor una vez esté correctamente homogeneizado para realizar los análisis sobre ella. De esta forma, conoceremos las condiciones iniciales de cada reactor por separado. Debido a que los resultados en cuanto a la producción de biogás se expresan en función de la cantidad inicial de sustrato inicial introducida al digestor, esta técnica requiere que a la cantidad inicial de sustrato e inóculo introducida al digestor se le reste la cantidad proporcional de sustrato e inóculo que se extrae del digestor para

realizar los análisis. Así, por ejemplo, si realizamos 500 mL de mezcla que contiene 450 mL de inóculo más 50 gramos de sustrato (imaginemos que su densidad sea de 1 g mL^{-1}) y sustraemos para la realización de los análisis iniciales 100 mL de mezcla (inóculo más sustrato) los resultados finales habrán de calcularse en base a 40 gramos de sustrato y 360 mL de inóculo, ya que si está correctamente homogeneizado en esos 100 mL extraeremos 10 gramos de sustrato y 90 mL de inóculo. Este método se recomienda cuando se analicen sustratos sólidos o semisólidos y líquidos que se homogeneicen muy fácilmente con el inóculo en poco tiempo.

3.4. Preparación de la prueba.

- 3.4.1. Las cámaras de fijación de CO_2 deben rellenarse con NaOH 3 M, a ser posible con indicador de pH. Si no se dispone de un indicador de pH que indique el agotamiento de la solución, se recomienda cambiar la solución de fijación de CO_2 después de cada experimento para asegurar la capacidad fijadora de ésta.
- 3.4.2. Para la purga del aire atmosférico del espacio de cabecera de los reactores anaerobios cada uno de ellos cuenta con una entrada regulada por medio de pinzas que se cierran mediante una rueda fija en un canal de anchura decreciente.
- 3.4.3. La purga del aire atmosférico se realizará introduciendo nitrógeno gaseoso (N_2) por medio de dicha entrada con la pinza abierta, hasta que por la celda de medida correspondiente se observe como sale el gas de purga. Se recomienda un caudal de 2,5 litros por minuto durante al menos 30 segundos para cada uno de los reactores, con el fin de garantizar un intercambio estadístico de más de 5 veces el espacio de cabeza completo, tras lo cual la pinza debe cerrarse completamente. El sistema AMPTS II aporta información sobre el volumen de metano estándar (0°C , 1 atm, seco) producido en cada botella, que se puede usar para calcular tanto la curva de producción específica de metano (SMP) como la del BMP final.
- 3.4.4. Programar el incubador a la temperatura deseada.
- 3.4.5. Conectar y rellenar la base de datos del software AMPTS II.

3.5. Inicio de la prueba

- 3.5.1. Pesar con precisión la masa de inóculo bien mezclada e introducirla en los digestores.
- 3.5.2. Pesar con precisión el sustrato y añadirlo en los reactores.
- 3.5.3. Comprobar el pH de la mezcla si es inferior a 7.3, ajustarlo (cuando se saca la sonda tener cuidado de no extraer material).
- 3.5.4. Introducir sustrato/s e inóculo en el interior del digestor (y tomar la muestra de su interior en su caso, asegurando una correcta homogeneidad y representatividad de ésta).
- 3.5.5. Se cierra el reactor, se introduce en el baño termostático.

- 3.5.6. Se conecta a la cámara de fijación de CO₂ correspondiente.
- 3.5.7. Se procede a la purga de su espacio de cabecera con gas N₂.
- 3.5.8. Se enciende el ordenador y el software del AMPTS II y se introducen los datos necesarios que se verán en la siguiente sección.
- 3.5.9. Se arranca la medida del metano producido.
- 3.5.10.
- 3.6. Fin de la prueba
 - 3.6.1. Cuando la producción de metano diaria sea menor del 1% del metano total acumulado durante el ensayo, éste puede darse por terminado (aproximadamente 30-40 días dependiendo de la velocidad de degradación).
 - 3.6.2. Se conservan las muestras de cada reactor en frío para su posterior análisis
 - 3.6.3. Se procede al análisis de las muestras (se realizan los mismos análisis descritos en los apartados 3.1 y 3.2).

4. Manejo del Software del AMPTS II

El software para manejar el equipo AMPTS II es muy intuitivo. Además de este manual, existe un manual propio de la casa Bioprocess Control que es necesario leer antes de comenzar a manejar el equipo.

- 4.1. Para ejecutar el software es necesario que el ordenador disponga de un buscador de internet (Internet Explorer, Mozilla Firefox o Google Chrome), aunque no es necesario que el equipo se encuentre conectado a internet.
- 4.2. Una vez el buscador esté abierto es necesario localizar el IP del equipo AMPTS II. Una vez ejecutada la búsqueda aparecerá la pantalla de entrada al software (ver Figura 2). Se recomienda que el software y el ordenador se encuentren continuamente encendidos y conectados al equipo AMPTS II durante la realización de un experimento para que se produzca la descarga automática y continua de datos desde el equipo y así evitar llegar a la saturación de la memoria del AMPTS II con la consiguiente pérdida de datos.
- 4.3. Tras seleccionar con el ratón la opción de 'Log in to the AMPTS II instrument' nos pedirá un nombre de usuario y una contraseña (ver Figura 3).
- 4.4. Tras seleccionar 'Aceptar' podremos utilizar el software del equipo AMPTS II, cuya primera entrada es la que se puede ver en la Figura 4.
- 4.5. Mediante la selección de las diferentes opciones que se encuentran en la barra superior nos podremos mover por las diferentes pantallas del software.
- 4.6. La primera pantalla que encontramos es 'Experiment', correspondiente a los parámetros que queremos fijar en el experimento. Aquí podremos introducir valores como el nombre de cada reactor, su contenido, la concentración del inóculo, la relación inóculo/sustrato, formas de medida (SV o DQOt), etc. Algunos de estos datos serán utilizados por el propio software para el cálculo de los resultados. Se recomienda ser muy riguroso en la introducción de estos

- datos ya que evitará posibles confusiones a la hora de trabajar con los resultados que proporciona el software al final del experimento.
- 4.7. La siguiente pantalla es la de 'Control', que nos permite controlar de forma continua el experimento (ver Figura 7). Activando, pausando o parando la medida de cada una de las células de biogás (1-15), encendido o apagado de los motores de agitación, ajuste de la velocidad de agitación de los motores (0-100%), así como el tiempo de funcionamiento y el tiempo de reposo de éstos.
 - 4.8. La opción de "Graphs" se corresponde con las gráficas que el software nos proporciona de forma online, para el control continuo del experimento en tiempo real (ver Figura 8). De esta forma no es necesario terminar el experimento o descargar el reporte de resultados para tener información del transcurso del experimento. Se podrán seleccionar o deseleccionar las diferentes celdas de medición de metano que se deseen para que se muestren en la gráfica correspondiente. Además de la producción acumulada de metano podremos observar las tasas de producción de metano a lo largo del tiempo.
 - 4.9. La siguiente pantalla disponible es la de 'Download report' que nos permite generar los informes de resultados de los diferentes experimentos (ver Figura 9). Estos informes se pueden presentar con los resultados expuestos en diferentes unidades de tiempo (en horas, en días, etc.). Cuando se seleccione el botón 'Generate report' nos aparecerán las opciones de descargar el informe en formato Excel o en formato CSV (.csv).
 - 4.10. Por último, encontramos la pantalla de 'System', correspondiente a los ajustes del sistema. No se aconseja modificar ninguno de los parámetros que aquí aparecen a no ser que se sea un usuario experto. En esta pantalla podremos modificar la dirección IP del equipo AMPTS II, el huso horario, la contraseña de acceso al sistema, así como la calibración de fábrica de las diferentes celdas de medida del volumen de metano producido. Los ajustes que aparecen en el "pantallazo", que puede ver en la Figura 10, son los correspondientes a los ajustes de fábrica.

RESULTADOS

Tanto académicos como técnicos utilizan la prueba BMP para determinar el rendimiento máximo de metano (CH_4) alcanzable a partir de un sustrato orgánico determinado^{9,20}. El producto principal de una prueba BMP es la curva de producción acumulada de metano a lo largo del tiempo, a partir de la cual se puede obtener el rendimiento máximo de metano (el potencial) y la cinética de degradación del sustrato. Generalmente se presenta como curva de producción específica de metano (SMP). Las pruebas de BMP se realizan comúnmente por métodos volumétricos o manométricos (basados en presión). Aunque hay diversos ejemplos que proporcionan información detallada sobre cómo realizar las pruebas de BMP, aún falta una validación de los resultados más allá de verificar el rendimiento de un control positivo, o que no se exceda una cierta desviación estándar dentro de las réplicas. Dado que la forma de la curva SMP es muy similar para la mayoría de los sustratos, éste puede ser

otro criterio para validar cualitativamente los resultados de la prueba BMP [22].

Una desviación significativa de esta típica curva suele asociarse con una falta de confianza en los resultados obtenidos de las pruebas BMP. La norma alemana VDI 4630 [10] es hasta ahora la única guía de BMP que analiza la forma típica de las curvas SMP, aunque de forma breve [22]. La representación gráfica de una curva SMP, generalmente, debe ser similar a la línea continua de la Figura 11. Sin embargo, puede darse el caso de que puedan aparecer curvas con diferentes formas, lo que puede indicar la presencia de problemas en el diseño del ensayo o en la ejecución experimental del mismo, que deben afrontarse para poder hacer estimaciones de BMP precisas y repetibles. Con el fin de saber cómo determinadas acciones o errores, que se pueden producir en la determinación de la prueba BMP, afectan al diseño de las curvas SMP, Koch et al [2] llevaron a cabo el estudio de la influencia de tres posibles defectos que se pueden cometer en la realización de la prueba, tales como: el almacenamiento del inóculo (dos semanas y a diferentes temperaturas), la dilución del inóculo con agua (sin dilución y a una dilución 1: 2) y la relación inóculo-sustrato (ISR) (de 2,00 a 0,05) [22]. Se utilizaron modelos cinéticos comunes para evaluar mejor las curvas SMP. Todos los defectos evaluados mostraron una influencia en las curvas SMP. Sin embargo, tanto la dilución excesiva como la relación inóculo-sustrato extremadamente baja fueron los que mostraron los mayores efectos, tanto en el diseño de las curvas SMP como en los BMP [22]. En el caso más extremo (relación inóculo/sustrato de 0.05), se produce una fase de retraso de varios días, y la BMP resultante es un 15% menor que en el caso de referencia.

La Figura 11 muestra una compilación de las respuestas más extremas de los tres defectos que se han analizado, las formas son comparables a las mostradas en la norma VDI 4630 [10] como "formas típicas de las curvas de formación de gas". La línea continua, como ya se ha comentado anteriormente, sería la curva normal, la línea de trazo largo muestra la curva que representa la influencia del almacenamiento del inóculo, la línea de trazo corto la curva que representa la influencia de la dilución del inóculo y la línea de puntos la curva que representa el uso de una relación inóculo/sustrato incorrecta.

Por lo tanto, estos ejemplos muestran que, con la información del diseño de las curvas SMP se pueden identificar y abordar problemas en su procedimiento experimental, lo que en última instancia contribuye a mediciones de BMP más precisas.

El enfoque general es simple y útil, y siempre debe ser parte de un control de calidad para las pruebas de BMP [22].

Para poder evaluar la calidad de las curvas SMP y, por tanto, de los resultados obtenidos, es conveniente que se incluyan las curvas SMP en todos los estudios futuros de BMP, al menos como material complementario, como ya otros autores recomendaron con anterioridad [9]. Sin embargo, si bien analizar el diseño de la curva SMP puede ser útil para detectar fallos comunes que se pueden producir en las pruebas BMP, no puede utilizarse para detectar todos los errores posibles, como errores en el cálculo de los SV del sustrato, sesgos en la medición de metano o fugas de biogás [31], que pueden no influir en la forma de la curva SMP. La aplicación del método propuesto no se limita a las pruebas de BMP con alta resolución temporal,

pero cuanto mayor sea la resolución temporal, se pueden identificar mejor las pequeñas discrepancias con la curva típica [22].



Figura 1. Componentes del AMPTS II: 1. Baño termostático. 2. Reactores anaerobios y unidad de agitación. 3. Botellas de fijación de CO₂. 4. Unidad de medida de volumen del metano generado. 5. Parte trasera de unidad de medida de volumen con las diferentes conexiones.

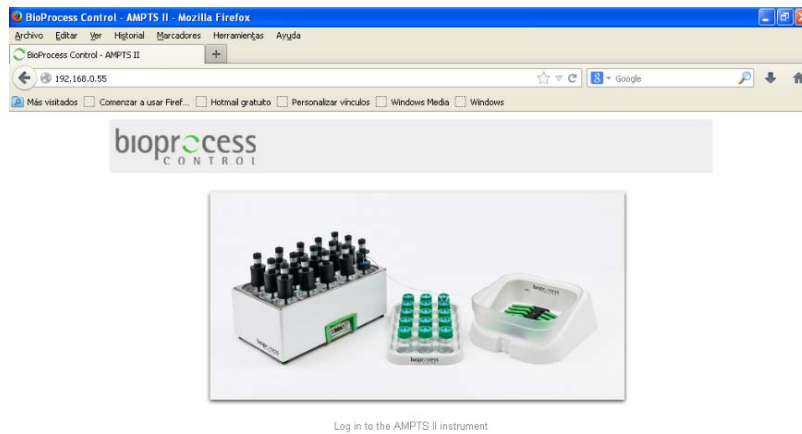


Figura 2. Página de entrada al software del AMPTS II.

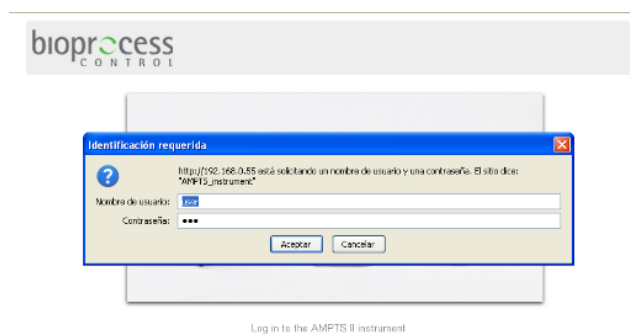


Figura 3. Nombre de usuario y contraseña.

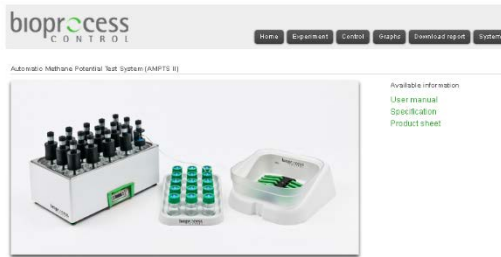


Figura 4. Página inicial del software AMPTS II.

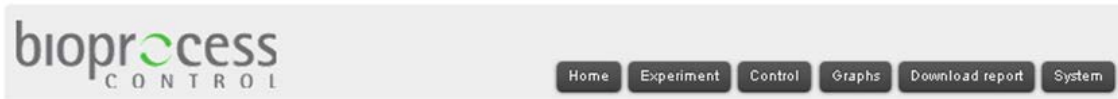


Figura 5. Barra para desplazarse por las diferentes pantallas del software AMPTS II.

bioprocess CONTROL

Home Experiment Control Graphs Download report System

Experiment settings

Choose experiment bottle to edit

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Bottle #1

Name: blanco

Total sample amount [g]: 400

Inoculum concentration [% w/w]: 4

Substrate concentration [% w/w]:

VS ratio:

Total volume of reactor [ml]: 600

Assumed CH4 content [%]: 60

Type of unit [VS/COD]: VS

Experiment guidelines

Calculated value for setting up the experiment bottle

Inoculum amount [g]: 400

Substrate amount [g]: 0

Inoculum VS or COD amount [g]: 16

Substrate VS or COD amount [g]: 0

Headspace volume [ml]: 200

Guideline matrix [Show]

Store settings Restore settings

Experiment common settings

Eliminate overestimation

Activated Deactivated

CO2 in flush gas [%]: 0

Process temperature

Assumed temperature [Celsius]: 37

Store settings

Figura 6. Pantalla correspondiente a los parámetros de ajuste del experimento.

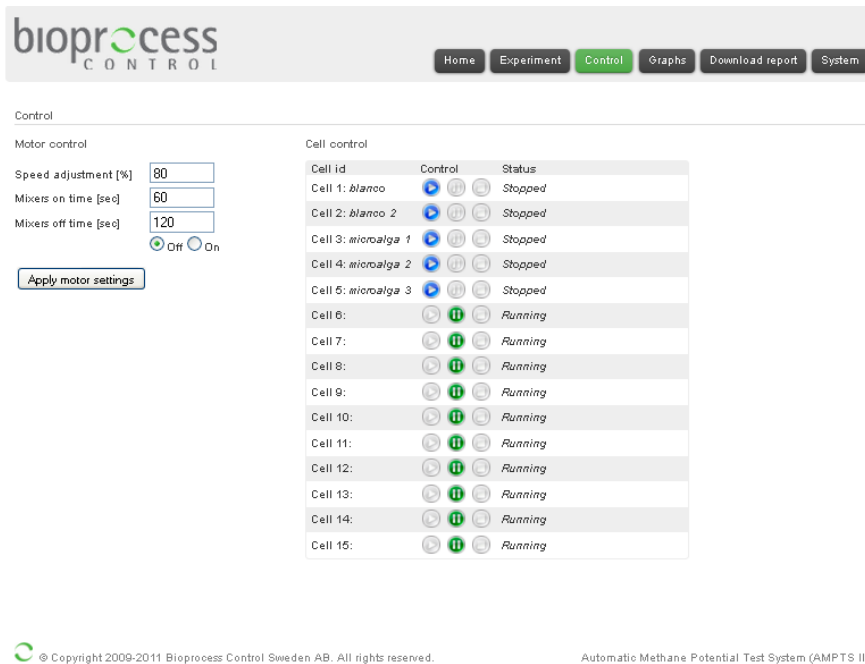


Figura 7. Pantalla correspondiente al control del experimento.



Figura 8. Gráfica de producción acumulada de metano de un experimento.

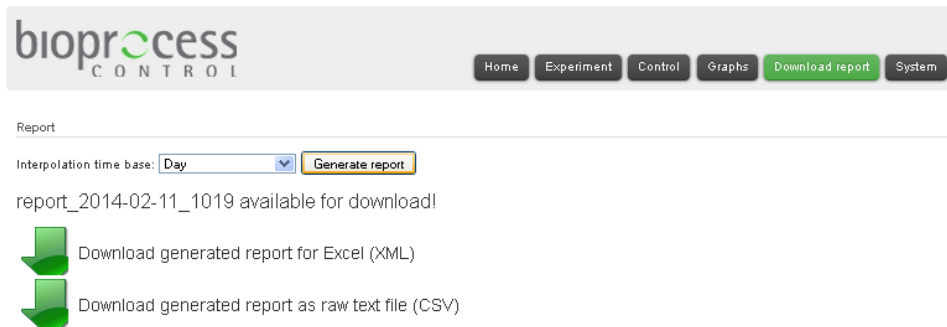


Figura 9. Pantalla para la descarga de informes de resultados.

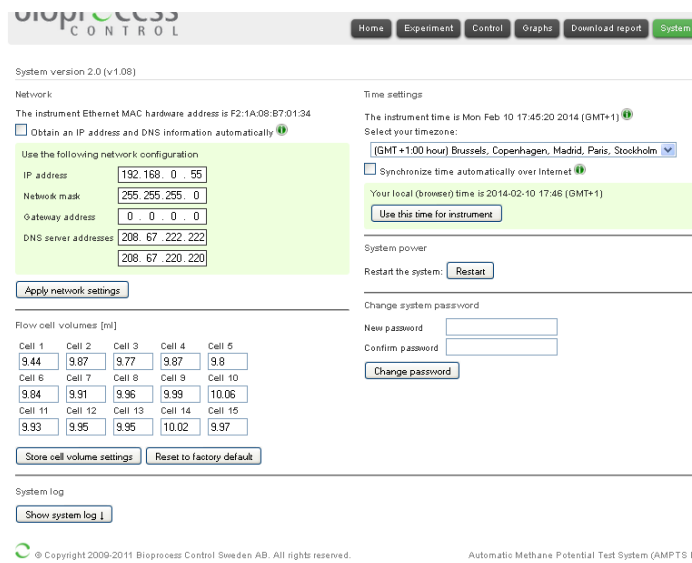


Figura 10. Pantalla para la modificación de los ajustes del sistema.

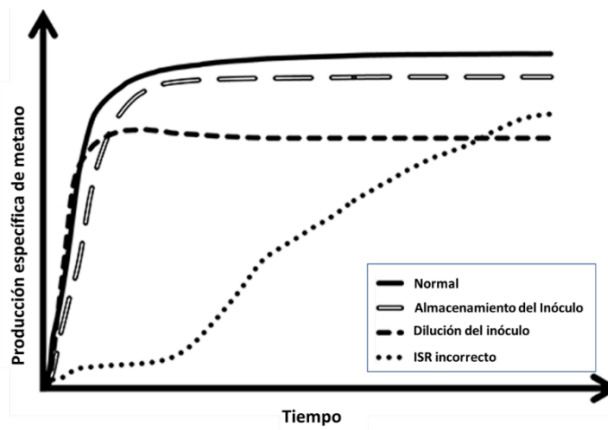


Figura 11. Una curva de producción de metano específica normal y el impacto de tres fallas típicas en el diseño o ejecución experimental. Fuente: Adaptada de Koch, 2019 [22].

DISCUSIÓN

A diferencia de las experiencias con reactores en continuo, las pruebas de BMP se realizan en discontinuo y se pueden llevar a cabo sin una gran inversión en equipos, mano de obra y tiempo. Sin embargo, ésta y otras diferencias limitan la aplicabilidad de los resultados de una prueba BMP en la operación de una planta a gran escala. No obstante, a medida que han ido mejorando los modelos informáticos y la complejidad de las expresiones matemáticas para describir el proceso de digestión anaeróbica, se ha descubierto que la información de los experimentos en discontinuo produce predicciones razonables del comportamiento a gran escala. Las pruebas BMP de los sustratos a digerir y sus cargas orgánicas específicas podrían usarse para diseñar diferentes componentes de plantas de digestión anaeróbica a gran escala, como el tamaño de los digestores y las posibilidades de explotación del biogás producido [11].

Actualmente, el problema central de las pruebas BMP es la falta de un procedimiento estándar y la falta de información más detallada en las publicaciones. Incluso en artículos de revistas de referencia, los resultados de las pruebas de BMP no siempre se utilizan de manera adecuada [2]. La literatura muestra importantes discrepancias entre los mismos sustratos [32]. Resultados obtenidos en diferentes grupos de investigación participantes en un estudio interlaboratorio relacionado con el BMP, donde se investigaron todas las condiciones experimentales que influyen en la prueba, como el inóculo, las características del sustrato y las condiciones experimentales, a partir de cuatro sustratos, concluyó que la influencia de los inóculos y los factores experimentales fue casi insignificante con respecto a la extensión de la biodegradación anaeróbica, mientras que las tasas difirieron significativamente según los enfoques experimentales [20].

Entre las grandes ventajas del uso de las pruebas BMP destaca la posibilidad de determinar no solo la máxima cantidad de metano que se puede recuperar de un sustrato, sino también de una mezcla de sustratos en codigestión. Asimismo, las pruebas de BMP son una opción para medir el impacto de un pretratamiento en la degradabilidad del sustrato, aunque se cuestiona la transferibilidad a sistemas operados en continuo [33]. Por otra parte, las pruebas BMP permiten proporcionar las condiciones óptimas para el proceso de DA (selección adecuada del inóculo [8,9,20], de la relación inóculo/sustrato [22], temperatura y agitación [34]) que es clave para lograr la mayor degradación posible. Por ello, las condiciones aplicadas en una prueba de BMP pueden lograr las mejores condiciones posibles para el crecimiento microbiano. lo que está implícito en el término *potencial* del nombre de la prueba. Por tanto, el rendimiento de metano logrado en experimentos continuos o en plantas a gran escala generalmente debería ser menor en comparación con el valor obtenido en una prueba de BMP [35].

La prueba BMP permite conocer la biodegradabilidad anaeróbica de un sustrato al dividir los BMP obtenidos por los valores teóricos correspondientes. El valor teórico se suele calcular en base a la estequiometría del proceso de DA en función de la composición elemental del sustrato [26] que puede medirse directamente o deducirse del análisis macromolecular (carbohidratos, proteínas, lípidos) o incluso mediante un análisis más detallado [27], ya que permite distinguir aún más entre los componentes del sustrato, según sean fácilmente, difícilmente y no digeribles [7]. En una aproximación realista de la biodegradabilidad anaeróbica, incluso si la materia

orgánica es 100% biodegradable anaeróbicamente, solo alrededor del 90% se transformará en metano, ya que alrededor del 10% se utilizará para la producción de biomasa microbiana [10,36].

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las pruebas BMP permiten una evaluación cualitativa de la cinética del proceso. Si bien la toxicidad aguda de un inhibidor presente en el sustrato o mezcla de sustratos puede detectarse en las pruebas de BMP, esto no es posible para la toxicidad crónica. A diferencia de los sistemas de operación en continuo, el sustrato en una prueba de BMP solo se añade una vez, y debido a la proporción típicamente alta de inóculo presente en el ensayo, las pruebas sinérgicas o antagonistas que ocurren en las pruebas de BMP en codigestión pueden ser diferentes de las que ocurren en procesos en continuo. Las pruebas de BMP no se pueden utilizar para evaluar los efectos a largo plazo de la disponibilidad de nutrientes o oligoelementos debido a la alimentación monótona. De igual modo, el rendimiento de metano, la estabilidad del proceso y la tasa de carga orgánica alcanzable en un sistema de funcionamiento continuo no pueden dilucidarse mediante pruebas de BMP [2].

La prueba BMP es una herramienta muy importante para la investigación y de gran importancia por su aportación al proceso de digestión anaeróbica pero tiene limitaciones respecto a las experiencias en continuo y viceversa. Ambos procesos son complementarios y de gran interés para los procesos de digestión anaeróbica.

REFERENCIAS

- [1] Gonzalez-Fernandez C, Sialve B, Molinuevo-Salces B (2015). Anaerobic Digestion of Microalgal Biomass: Challenges, Opportunities and Research Needs. *Bioresour. Technol.* 198, 896–906.
- [2] Koch K, Hafne SD, Weinrich S, Astals S, Holliger C (2020). Power and limitations of biochemical methane potential (BMP) tests. *Front. Energy Res.* 8, 63.
- [3] Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, Borzacconi L, Campos JL, Guwy AJ, Kalyuzhnyi S, Jenicek P, van Lier JB (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Sci. Technol.* 59, 927–934.
- [4] Feodorov V (2016). Modern Technologies of Treatment and Stabilization for Sewage Sludge from Water Treatment Plant. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 10, 417–430.
- [5] Jain S, Jain S, Wolf IT, Lee J, Tong YW (2015). A Comprehensive Review on Operating Parameters and Different Pretreatment Methodologies for Anaerobic Digestion of Municipal Solid Waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 142–154.
- [6] Tchobanoglous G, Burton F, Stensel D (1991). *Wastewater Engineering Treatment Reuse*, 4th ed.; McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, NY, USA. pp. 1505–1533.
- [7] Angelidaki I, Sanders W (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 117–129. doi: 10.1007/s11157-004-2502-3.
- [8] VDLUFA (2011). *Measurement of Biogas and Methane Yields in Fermentation Tests*. Darmstadt: Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungsund Forschungsanstalten (VDLUFA).
- [9] Holliger C, Alves M, Andrade D, Angelidaki I, Astals S, Baier U, Bougrier C, Buffière P, Carballa M, De Wilde V, et al. (2016). Towards a standardization of biomethane

potential tests. *Water Sci. Technol.* 74, 2515–2522

- [10] VDI 4630 (2016). Fermentation of Organic Materials - Characterisation of the Substrate, Sampling, Collection of Material Data, Fermentation Tests. Düsseldorf: Verein Deutscher Ingenieure (VDI).
- [11] Filer J, Ding HH, Chang S (2019). Biochemical Methane Potential (BMP) assay method for anaerobic digestion research. *Water* 11, 921. doi: 10.3390/w11050921.
- [12] Pearse LF, Hettiaratchi JP, Kumar S (2018). Towards developing a representative biochemical methane potential (BMP) assay for landfilled municipal solid waste – a review. *Bioresour. Technol.* 254, 312–324. doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.069.
- [13] Ariunbaatar J, Esposito G, Yeh DH, Lens PNL (2016). Enhanced anaerobic digestion of food waste by supplementing trace elements: role of selenium (VI) and iron (II). *Front. Environ. Sci.* 4, 8. doi: 10.3389/fenvs.2016.00008.
- [14] Yeshanew MM, Frunzo L, Lens PNL, Pirozzi F, Esposito G (2016). Mass loss controlled thermal pretreatment system to assess the effects of pretreatment temperature on organic matter solubilization and methane yield from food waste. *Front. Environ. Sci.* 4, 62. doi: 10.3389/fenvs.2016.00062.
- [15] Benn N, Zitomer D (2018). Pretreatment and anaerobic codigestion of selected PHB and PLA bioplastics. *Front. Environ. Sci.* 5, 93. doi: 10.3389/fenvs.2017.00093.
- [16] Hafner SD, Koch K, Carrere H, Astals S, Weinrich S, Rennuit C (2018). Software for biogas research: Tools for measurement and prediction of methane production. *SoftwareX* 7, 205–210. doi: 10.1016/j.softx.2018.06.005.
- [17] Koch K, Plabst M, Schmidt A, Helmreich B, Drewes JE (2016). Co-digestion of food waste in a municipal wastewater treatment plant: comparison of batch tests and full-scale experiences. *Waste Manag.* 47, 28–33. doi: 10.1016/j.wasman.2015.04.022
- [18] Gandiglio M, Lanzini A, Soto A, Leone P, Santarelli M (2017). Enhancing the energy efficiency of wastewater treatment plants through co-digestion and fuel cell systems. *Front. Environ. Sci.* 5, 70. doi: 10.3389/fenvs.2017.00070.
- [19] Lippert T, Bandelin J, Musch A, Drewes JE, Koch K (2018). Energy-positive sewage sludge pre-treatment with a novel ultrasonic flatbed reactor at low energy input. *Bioresour. Technol.* 264, 298–305. doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.073.
- [20] Raposo F, Fernández-Cegrí V, De la Rubia MA, Borja R, Béline F, Cavinato C, et al. (2011). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1088–1098. doi: 10.1002/jctb.2622.
- [21] Weinrich S, Schäfer F, Bochmann G, Liebetrau (2018). Value of Batch Tests for Biogas Potential Analysis. In *Method Comparison and Challenges of Substrate and Efficiency Evaluation of Biogas Plants*; IEA Bioenergy Task 37; University College Cork: Cork, Ireland. ISBN 978-1-910154-49-6.
- [22] Koch K, Hafner SD, Weinrich S, Astals S (2019). Identification of Critical Problems in Biochemical Methane Potential (BMP) Tests From Methane Production Curves. *Front. Environ. Sci.* 7:178. doi: 10.3389/fenvs.2019.00178.
- [23] Gunaseelan VN (2004). Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass Bioenergy* 26, 389–399.
- [24] Holliger C, Astals S, Fruteau de Laclos H, Hafner SD, Koch K, Weinrich S (2021). Towards a standardization of biomethane potential tests: A commentary. *Water Sci. Technol.* 83, 247–250.

- [25] Jensen PD, Ge H, Batstone DJ (2011). Assessing the role of biochemical methane potential tests in determining anaerobic degradability rate and extent. *Water Sci. Technol.* 64, 880–886. doi: 10.2166/wst.2011.66216.
- [26] Buswell AM, Mueller HF (1952). Mechanism of methane fermentation. *Ind. Eng. Chem.* 44, 550–552. doi: 10.1021/ie50507a033.
- [27] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- [28] Buffiere P, Loisel D, Bernet N, Delgenes J-P (2006). Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Sci. Technol.* 53, 233–241. doi: 10.2166/wst.2006.254.
- [29] Noguerol-Arias J, Rodríguez-Abalde A, Romero-Merino E, Flotats X (2012). Determination of chemical oxygen demand in heterogeneous solid or semisolid samples using a novel method combining solid dilutions as a preparation step followed by optimized closed reflux and colorimetric measurement. *Anal. Chem.* 84, 5548–5555. doi: 10.1021/ac3003566.
- [30] Raposo F, Borja R, Ibelli-Bianco C (2020). Predictive regression models for biochemical methane potential tests of biomass samples: Pitfalls and challenges of laboratory measurements. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 127, 109890.
- [31] Hafner SD, Astals S (2019). Systematic error in manometric measurement of biochemical methane potential: sources and solutions. *Waste Manag.* 91, 147–155. doi: 10.1016/j.wasman.2019.05.001.
- [32] Ribeiro T, Cresson R, Pommier S, Preys S, André L, Béline F, Bouchez T, Bougrie C, Buffière P, Cacho J, Camacho P, Mazéas L, Pauss A, Pouech P, Rouez M, Torrijos M (2020). Measurement of Biochemical Methane Potential of Heterogeneous Solid Substrates: Results of a Two-Phase French Inter-Laboratory Study. *Water* 12, 2814. <https://doi.org/10.3390/w12102814>.
- [33] Janke L, Weinrich S, Leite AF, Sträuber H, Nikolausz M, Nelles M, et al. (2019). Pre-treatment of filter cake for anaerobic digestion in sugarcane biorefineries: assessment of batch versus semi-continuous experiments. *Renew. Energy* 143, 1416–1426. doi: 10.1016/j.renene.2019.05.029.
- [34] Koch K, Bajón Fernández Y, Drewes JE (2015). Influence of headspace flushing on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Bioresour. Technol.* 186, 173–178. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.071.
- [35] Holliger C, Fruteau de Laclos H, Hack G (2017). Methane production of full-scale anaerobic digestion plants calculated from substrate's biomethane potentials compares well with the one measured on-site. *Front. Energy Res.* 5:12. doi: 10.3389/fenrg.2017.00012.
- [36] Rittmann BE, McCarty PL (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. New York, NY: McGraw-Hill Education.