

PRÁCTICA 1: Determinación del coeficiente de extinción (k_a) en cultivos de microalgas

1. Introducción

La luz es el nutriente que proporciona la energía a las microalgas para que puedan llevar a cabo la generación de nueva biomasa y es por tanto el motor del crecimiento. La luz es siempre el nutriente limitante en un fotobiorreactor bien diseñado, ya que los demás nutrientes se pueden añadir en exceso. Sin embargo, la luz es limitada y además es difícil hacerla penetrar en el fotobiorreactor.

Las microalgas absorben muy intensamente la luz, provocando que en los cultivos coexistan zonas iluminadas y otras oscuras, incluso en cultivos relativamente diluidos.

Para poder diseñar fotobiorreactores es imprescindible ser capaz de describir la distribución de la luz en cultivos de microalgas. Eso es lo que se va a estudiar en esta práctica.

En concreto, para describir la distribución de luz en fotobiorreactores vamos a usar la ecuación de Lambert-Beer, una ecuación sencilla que no tiene en cuenta todos los fenómenos de atenuación de la luz, pero que, como veremos, es suficiente para los propósitos que aquí se plantean. La ecuación es:

$$I = I_0 \cdot e^{-C_b \cdot k_a \cdot x} \quad [1]$$

Donde I_0 es la irradiancia incidente ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), I es la irradiancia a una distancia x (m) bajo la superficie, C_b es la concentración de biomasa (g m^{-3}) y k_a es un número denominado coeficiente de extinción ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) que representa las propiedades ópticas de la biomasa. Es decir, k_a representa de alguna forma la capacidad de una estirpe de microalgas para absorber la luz.

Respecto a k_a , hay que tener en cuenta que:

- Puede variar dependiendo de la cepa, de su estado fisiológico y de las condiciones de operación. Por ejemplo, una microalga con menor contenido en pigmentos habitualmente absorbe menos luz (k_a menor).
- Depende de la longitud de onda de la luz. Al k_a medido a una longitud de onda determinada lo denominaremos $k_{a\lambda}$. $k_{a\lambda}$ es el que habitualmente se obtiene en espectrofotómetros midiendo a una longitud de onda dada, λ .
- Nosotros vamos a medir un k_a medio para luz blanca. Además, lo vamos a medir solo en la franja PAR (radiación fotosintéticamente activa), para lo cual usaremos un sensor de irradiancia PAR.

La práctica servirá, por tanto, para determinar k_a en un cultivo de microalgas iluminado por luz blanca y para comprobar que la Ley de Lambert-Beer se cumple en un amplio rango de concentraciones de biomasa y que resulta, por tanto, útil para describir la atenuación de la luz en cultivos de microalgas.



Figura 1. Columnas de burbujeo.

2. Objetivos

- Aprender los conceptos de irradiancia escalar e irradiancia PAR.
- Aprender a utilizar sensores de irradiancia escalar PAR 4π .
- Realizar medidas de irradiancia (I) a diferentes concentraciones de biomasa (C_b).
- Estudiar la relación entre I y C_b .
- Usar la ley de Lambert-Beer para obtener k_a .
- Comparar diferentes k_a de diferentes especies o de microalgas en diferentes condiciones fisiológicas (si se caracterizan varias estirpes, lo que podrían hacer diferentes grupos).

3. Material

Para llevar a cabo las medidas de I frente a C_b se utilizará el siguiente montaje que consta de:

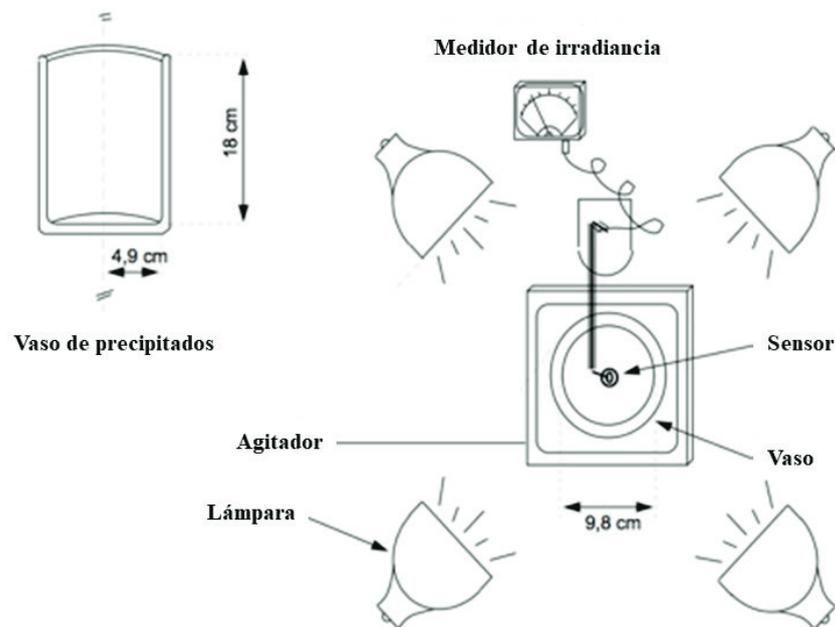


Figura 2. Material necesario.

- Vaso de precipitados de vidrio transparente de aproximadamente 1 L de capacidad de dimensiones conocidas (se requiere de un calibre).
- Agitador con imán para mantener las microalgas en suspensión durante la medida.
- Bomba peristáltica para vaciar el vaso.
- Sensor de irradiancia escalar PAR tipo 4π .
- Soporte para colocar el sensor en el centro del vaso.
- Lámparas dispuestas alrededor del vaso, dirigidas hacia el centro del mismo. Las lámparas se situarán a una distancia tal que el sensor no se sature cuando $C_b=0$.

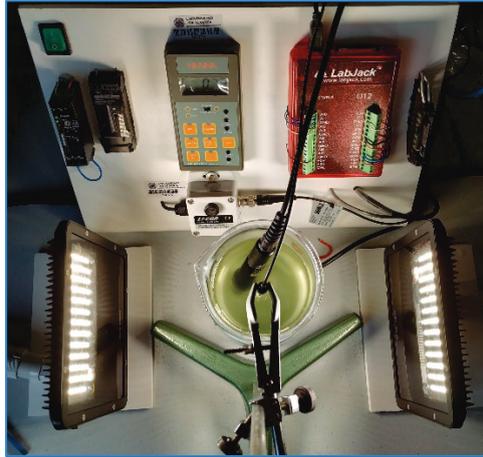


Figura 3. Montaje experimental.

Además, se necesitarán los siguientes elementos:

- 1 L de cultivo de microalgas de concentración conocida (estará en torno a 1 g L^{-1} , es decir, 1000 g m^{-3}).
- 2.5 L de disolución isotónica para diluir (medio de cultivo claro con el que se han cultivado las microalgas).
- Probetas, pipetas y propipetas para realizar las diluciones (1 probeta de 500 mL y 1 vaso de precipitados de 1 L).
- Gradilla con 10 tubos para toma de muestras.
- Cubeta desechable y frasco lavador.
- Espectrofotómetro UV-visible.

4. Procedimiento

La práctica consiste en obtener medidas de irradiancia (I) en el centro del vaso a varias concentraciones de biomasa (C_b) que deberían ir al menos entre 50 g m^{-3} (el experimento a concentración más baja) y 1000 g m^{-3} (concentración más alta). Deberían obtenerse al menos 8-10 puntos experimentales. El procedimiento es el siguiente:

1. Llene el vaso con 1 L de agua (V_{total}). Posicione el sensor en el centro y mida la irradiancia, que estará en torno a $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ o $0.6 \cdot 10^{17} \text{ q cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (para ello hay que abrir el programa DAQFactory, hacer click en ajuste automático, fijar en SP un valor de 1000 y hacer click en el botón ajuste de irradiancia, esperando unos segundos hasta que alcance dicho valor y se quede estable). En estas condiciones está midiendo I_0 (irradiancia de la fuente sin atenuar por la biomasa).
2. Vacíe el vaso. Llénelo con 1 L de cultivo de microalgas sin diluir. La concentración es conocida y la llamaremos C_{b1} . Cuide de que el sensor esté bien posicionado en el centro. Anote la irradiancia que registra el sensor que llamaremos I_1 .
3. Diluya el cultivo retirando 300 mL del vaso y reponiendo 300 mL de disolución para diluir (medio de cultivo). La primera dilución baja la concentración del cultivo de 1000 a 700 g m^{-3} . Mida la irradiancia que da el sensor y tendrá la nueva pareja de datos (I_2 , C_{b2}) que puede anotar en su tabla de resultados.
4. Vuelva a diluir de la misma manera. Después de la segunda dilución la concentración de biomasa C_{b3} es 490 g m^{-3} . Mida la nueva irradiancia I_3 .

5. Si repite el procedimiento de dilución 9 veces obtendrá al final $C_{b10}=40 \text{ g m}^{-3}$ y su correspondiente I_{10} .

Si realiza las diluciones con cuidado puede obtener C_b después de cada dilución realizando un sencillo balance de materia. Otra opción sería realizar una medida de la concentración de biomasa por peso seco de la muestra, pero en este caso no lo haremos por falta de tiempo.

Nota: Otra opción para comprobar la concentración de biomasa es tomar una muestra del cultivo que ha retirado después de cada dilución para medir su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm o a la que le indique el profesor/a. Podrá relacionar estos valores con la concentración del cultivo haciendo una recta de calibrado mediante la representación de los valores de C_b (g m^{-3}) *versus* absorbancia, donde la pendiente se denomina coeficiente de absortividad de la microalga. Tenga presente que la recta pierde linealidad usualmente para valores de absorbancia superiores a 0.7; descarte los puntos de la zona que deje de ser lineal. Una vez obtenida la recta de calibrado puede determinar la concentración de biomasa multiplicando por el coeficiente de absortividad de la microalga la absorbancia que de la muestra (recuerde diluir la muestra si obtiene una absorbancia superior a 0.7 y multiplicar la absorbancia obtenida en la muestra diluida por el factor de dilución aplicado a esa muestra, es decir, por volumen total/volumen de cultivo).

5. Medidas experimentales

Si no lo ha hecho ya, anote todos los datos experimentales que va a necesitar:

- Concentración del cultivo inicial: C_{bi} , g m^{-3} =
- Irradiancia inicial (vaso con agua limpia): I_0 , $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (o $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) =
- Paso óptico del vaso (radio); L , m =
- Volumen de trabajo: V_{total} , m^3 =

Y complete la siguiente tabla con sus medidas experimentales:

$V_{\text{reemplazado}}$ (m^{-3})	C_b (g m^{-3})	I ($\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Absorbancia espectrofotómetro
0	C_{bi} =		
0.0003			
0.0003			
0.0003			
0.0003			
0.0003			
0.0003			
0.0003			
0.0003			
0.0003			

Con estos datos ya puede determinar el k_a tal como se explica a continuación.

6. Discusión de los resultados

Calcule el k_a a partir de los datos obtenidos. La forma clásica de hacerlo es despejar la ley de Lambert-Beer de la siguiente forma:

$$I = I_o \cdot e^{-C_b \cdot k_a \cdot L}$$

$$\ln\left(\frac{I}{I_o}\right) = -C_b \cdot k_a \cdot L$$

$$\ln\left(\frac{I_o}{I}\right) = k_a \cdot L \cdot C_b = m \cdot C_b$$

Es decir, que si se cumple la ley de Lambert- Beer la representación de $\ln(I_o/I)$ vs. C_b debería dar una línea recta de pendiente $m = k_a \cdot L$ de la que se puede obtener el coeficiente de extinción k_a como:

$$k_a = \frac{m}{L}$$

Podría hacerse una tabla como esta:

C_b (g m ⁻³)	I ($\mu E m^{-2} s^{-1}$)	$\frac{I_o}{I}$	$\ln\left(\frac{I_o}{I}\right)$
C_{bi}			
0	I_o	1	0

A partir de esta tabla, represente los datos de $\ln(I_o/I)$ versus C_b . Haga una regresión lineal y obtenga el valor de k_a a partir de la pendiente. Debería obtenerse algo similar a esto (el valor de la pendiente podrá cambiar considerablemente según la microalga empleada):

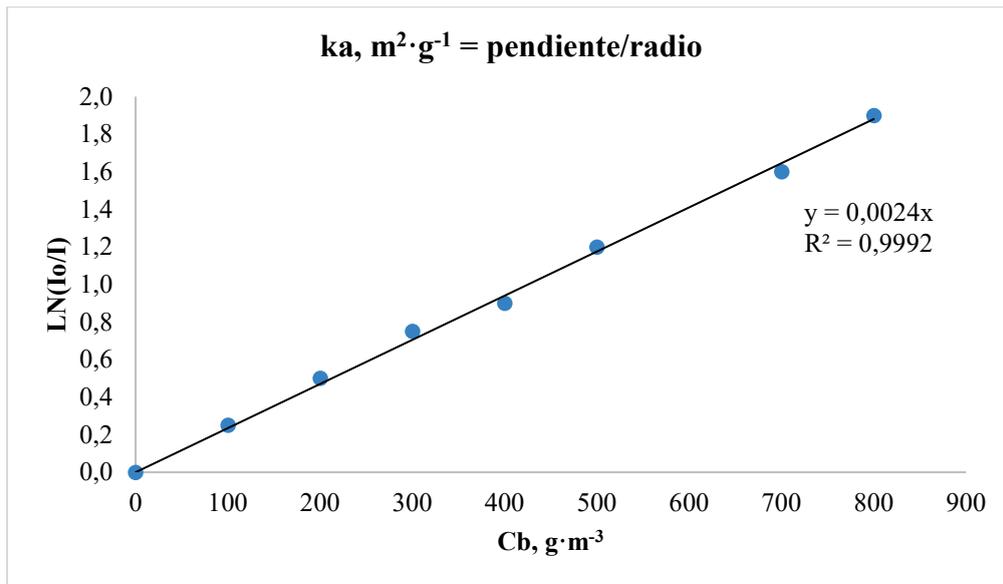


Figura 4. Logaritmo neperiano de I_0/I frente a concentración de biomasa.

Comente los resultados obtenidos a la vista de su gráfica.

Prepare un informe de sus resultados y conteste las siguientes cuestiones.

7. Cuestiones

- 1 - ¿Cómo influyen las unidades en las que se expresa I al medir el k_a ? ¿Es lo mismo utilizar $\mu E m^{-2} s^{-1}$ que $quanta cm^{-2} s^{-1}$?
- 2 - ¿Importa en qué unidades se ponga el camino óptico L para calcular k_a ?
- 3 - ¿Qué consecuencias tendría que en el esquema experimental el sensor no estuviese en el centro?
- 4 - En el experimento de medida del k_a , ¿importa el tamaño del sensor?