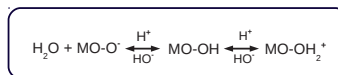


Introducción

El cultivo de microalgas presenta numerosas aplicaciones biotecnológicas como la producción de biocombustibles y la biorremediación de efluentes. Sin embargo, una de las limitaciones para la aplicación industrial de las mismas está asociada a los costos de la cosecha de las microalgas (Kim, 2013). La investigación en el área de secado y cosecha es la que mas ha crecido dentro de la biotecnología de microalgas en los últimos años según señala el primer Informe desarrollado por la Antena de Vigilancia Tecnológica Territorial del Sector Agroindustria. Los métodos de cosecha mas utilizados y desarrollados son físico químicos y consisten en centrifugación, filtración y floculación utilizando agentes químicos como el cloruro férrico. Recientemente se ha comenzado a estudiar y evaluar la alternativa de usar nanopartículas magnéticas para el proceso de cosecha (Lee, 2015). Si bien se encuentra en fase experimental en la cosecha de microalgas la separación magnética es considerado uno de los métodos mas versátiles de separación en biotecnología. El método se basa en la interacción por fuerzas electrostáticas de partículas de magnetita con las células de microalgas de modo tal de que cuando los complejos formados son expuestos a la acción de un imán decantan rápidamente. Los óxidos metálicos tales como Fe_2O_3 , al estar recubiertos por grupos oxidrilos, presentan una superficie sensible a los cambios de pH. Esto determina que las partículas se carguen positivamente por debajo de su punto isoeléctrico y negativamente por encima de este, mediante la ganancia o pérdida de protones. La ecuación 1, tomada de Ling et al (2011), muestra la reacción de protonación y desprotonación de los óxidos. Por su parte las células de microalgas presentan un potencial zeta negativo al pH al cual las partículas muestran un potencial zeta positivo. Esta diferencia de cargas permite la interacción entre las superficie de ambas lo que se entiende promueve la floculación y eventual precipitación del cultivo.

Si bien no se registran numerosos trabajos en el área, y los publicados son muy recientes, se ha podido determinar la cinética del proceso y la proporción de partículas vs biomasa adecuada para trabajar con nanopartículas (NPs) de magnetita y algunas de las especies de microalgas mas comunes. Lee y colaboradores (2014 a) han reportado buenos rendimientos en la cosecha de microalgas utilizando proporciones de masa de NPs/ biomasa que van desde 2.5 mg/mg de biomasa a 50 mg/mg de biomasa. Sin bien los resultados son promisorios todavía es necesario realizar la caracterización de los sistemas formados por las distintas especies de microalgas y distintos tipos de nanopartículas. En la actualidad hay pocos trabajos en el área y la mayoría de ellos consisten en la caracterización de la cinética de adsorción y el efecto de distintas variables sobre la eficiencia de la cosecha. Como se mencionó anteriormente se asume que las partículas y células interactúan electrostáticamente y que esta interacción promueve la floculación pero ninguno de los estudios en la literatura muestran la interacción entre las partículas y las microalgas. En este contexto *el objetivo del presente trabajo* fue evaluar la cosecha de microalgas del género *Chlorella sp* mediante la utilización de partículas de magnetita y observar la interacción por microscopía de modo tal de contribuir a la caracterización del proceso.

Ecuación (1)



Metodología y Resultados

Los experimentos fueron realizados utilizando una cepa del género *Chlorella*, A20, gentilmente donada por el Dr. Javier Velasco. La figura 1, panel A, muestra el aspecto general típico del cultivo visto al microscopio óptico, la foto a mayor aumento muestra el detalle de las células. En ambas fotos se puede apreciar que se trata de células esféricas, de tamaño homogéneo y que crecen individualmente. Las nanopartículas utilizadas se obtuvieron por el método de coprecipitación y fueron caracterizadas mediante difracción de rayos X y espectroscopia de Mössbauer. En la Figura 1 C, se muestra el patrón de difracción de rayos X de las nanopartículas (NPs). Este difractograma indica la presencia de las fases Maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) y/o Magnetita (Fe_3O_4). Debido a la similitud entre los patrones de difracción de estas dos fases de óxido de hierro, no es posible con esta técnica conseguir una identificación precisa de la especie presente en las NPs. Para alcanzar este objetivo se recurrió a la espectroscopia Mössbauer a temperatura ambiente. Utilizando la ecuación de Scherrer se determinó el tamaño medio de cristallita de las NPs: se obtuvo el ancho integrado a mitad de altura ajustando el patrón de difracción con una función Gaussiana y descontando el ancho de pico debido a factores instrumentales. El diámetro medio de cristallita así determinado fue de 133 ± 13 nm. La Figura 1 D muestra el espectro Mössbauer de las NPs obtenido a 25°C. El espectro fue ajustado con dos sextupletes cuyos parámetros hiperfinos son característicos de la magnetita. La relación de áreas de los sextupletes permite establecer la presencia de magnetita parcialmente oxidada con estequiometría de $Fe_{2.2}O_3$. Esta oxidación parcial puede atribuirse a la presencia del oxígeno del aire durante la síntesis de las NPs, el cual oxidó átomos de Fe^{2+} superficiales.

Para evaluar la cosecha de microalgas mediante NPs se desarrollaron una serie de ensayos probando distintas proporciones de masa de NPs y biomasa de microalgas. En los distintos ensayos se mantuvieron constantes la temperatura, pH y tiempos de incubación y cosecha. Los detalles y los resultados de distintos ensayos se muestran en el esquema de la figura 2 y la Tabla 1 respectivamente. La columna de la derecha de la figura 2 muestran los distintos pasos del ensayo 3 analizados al microscopio óptico. La figura 3 muestra el análisis del mismo ensayo al microscopio electrónico de barrido. En ambos análisis se puede ver como la interacción NPs-células promueve la formación de flocúlos que se ven como conglomerados de células y nanopartículas. La exposición de estos al efecto del imán hace que los mismos decanten y/o precipiten masivamente en minutos lo que queda demostrado en la eficiencia de cosecha o remoción de células del medio en los ensayos (tabla1).

Figura 1: Cultivo de *Chlorella* y experimentos de caracterización de las nanopartículas de magnetita utilizadas en los ensayos.

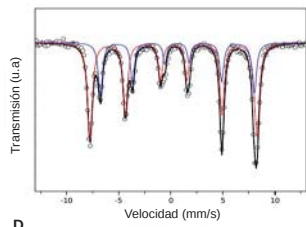
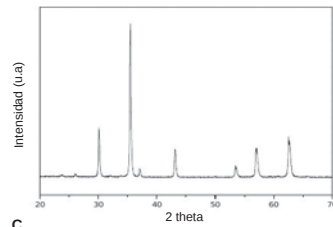


Figura 2. Ensayo de cosecha de cultivos de *chlorella* utilizando nanopartículas de magnetita

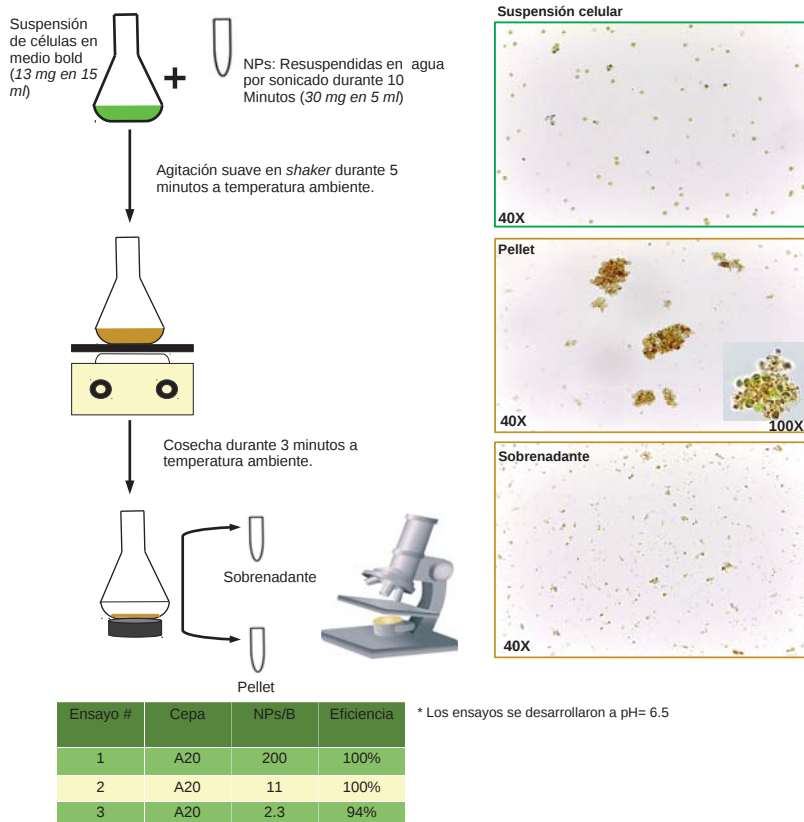
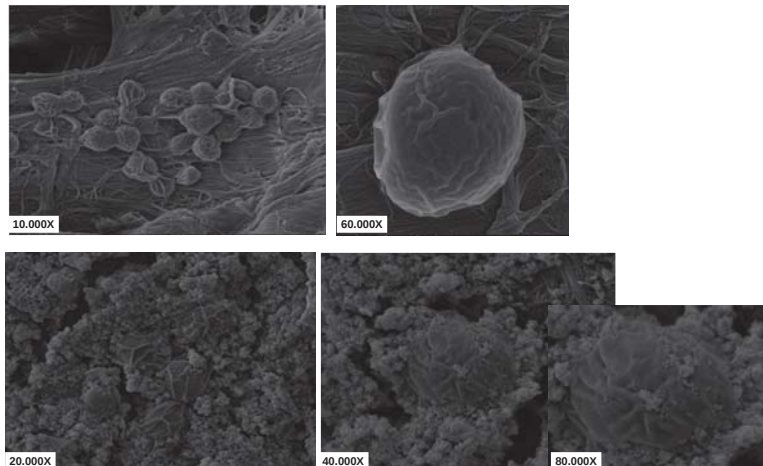


Figura 3: Interacción partícula-célula: análisis por microscopía electrónica de barrido



Conclusiones

- Distintas proporciones de NPs y biomasa, inclusive tan bajas como 2.3, mostraron muy buenos rendimientos de cosecha con tiempos de incubación y cosecha en el rango de minutos.
- Los ensayos de cosecha mostraron muy buen rendimiento trabajando a un pH de 6.5 compatible con el de cultivo de microalgas.
- El análisis al microscopio del ensayo mostró que las NPs actúan como floculante promoviendo la formación de agregados celulares que decantan rápido y fácilmente bajo el efecto del imán.

Referencias

- Kim, J. (2013a) Biotechnol. Adv. Vol. 31 pp. 862.
- Lee Young-Chul. (2015) Bioresource Technology. Vol. 184 pp. 63.
- Lee, K. (2014a) Bioresource Technology, 167 pp. 284.
- Ling X. (2011) Bioresource Technology. Vol. 102 pp. 10047.
- Primer Informe Territorial Desarrollado por la Antena de Vigilancia Tecnológica. Ministerio de Agricultura, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva y Red de Microalgas.