

## 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un amplio y diverso grupo de microorganismos acuáticos que carecen de las estructuras celulares complejas que se encuentran en las plantas superiores. Se pueden encontrar en diversos ambientes, algunas especies viven en agua dulce y otras en agua de mar. La mayoría de las especies de microalgas son fotoautótrofas (Slade y Bauen, 2013).

A día de hoy las microalgas tienen una gran relevancia puesto que están siendo estudiadas como materia prima para la producción de biocombustibles. Los biocombustibles derivados de las microalgas se encuentran entre los biocombustibles de tercera generación y suponen un gran paso para la industria de la energía renovable.

Entre otros, las microalgas se pueden usar para la obtención de bioetanol y para la obtención de biodiesel, ya que pueden producir cantidades importantes tanto de polisacáridos como de triglicéridos. Cabe destacar que pueden acumular más de un 70 % de lípidos sobre una base de peso seco, lo que es de especial interés para la producción de biodiesel.

De momento, el alto costo de producción de las microalgas es el mayor inconveniente que tiene su uso como materia prima para producir biocombustibles. Este problema lo puede compensar el hecho de que requieren menos espacio que otros cultivos comerciales que se usan para el mismo fin, como los cultivos de palma o de jatrofa de los que se obtienen aceites para la producción de biodiesel. Las microalgas se pueden cultivar en estanques abiertos o en fotobiorreactores cerrados.

Además, las microalgas son ricas en compuestos como el ácido docosahexaenoico (DHA) y la astaxantina, que se pueden utilizar para fines médicos y que están suscitando un creciente interés en la investigación. También cabe destacar que tienen compuestos químicos que se pueden utilizar para fabricar cosméticos.

Asimismo, las microalgas se pueden usar como fuente de moléculas de valor añadido, como aceites de ácidos grasos poliinsaturados que se añaden a preparados para lactantes y a suplementos nutricionales. Otro de los múltiples usos de las microalgas es su utilización en alimentación animal.

Las microalgas también son útiles para el tratamiento de aguas residuales. Estas aguas tienen un contenido significativamente alto de aminoácidos que favorece su crecimiento. Se ha demostrado que las microalgas son capaces de reducir la demanda química de oxígeno (COD) y la demanda bioquímica de oxígeno (BOD) de las aguas residuales. Por lo tanto, su cultivo en aguas residuales no sólo ofrece una alternativa económica a la forma convencional de tratamiento de aguas residuales, sino que también reduce sustancialmente la necesidad de usar fertilizantes químicos para cultivar microalgas.

Parte del interés que están despertando las microalgas se debe a que tienen una tasa fotosintética 50 veces mayor que la de las plantas terrestres, por lo que tienen una tasa de crecimiento muy rápida. Otra de sus ventajas se basa en que el CO<sub>2</sub> que necesitan puede ser suministrado usando gases de combustión, lo que favorece la reducción de problemas ambientales como el calentamiento global (Suali y Sarbatly, 2012).

Cuando el cultivo microalgas ha alcanzado la fase estacionaria, el siguiente paso es separar las microalgas del medio. Sin embargo, el proceso de recolección de microalgas es una tarea difícil debido a su pequeño tamaño (generalmente entre 1 y 20 µm) y a la baja concentración de biomasa. Actualmente, existen varios métodos para cosechar microalgas, entre los que se encuentran la sedimentación por gravedad, la floculación, la flotación, la centrifugación y la filtración (Lam y Lee, 2012).

En estos momentos hay un gran interés en el desarrollo de nuevos enfoques más económicos y eficientes para la recolección de microalgas con el fin de reducir la inversión de capital inicial, la energía necesaria y los gastos de mantenimiento.

La separación magnética es un método rápido y sencillo para la captura eficiente y fiable de las células por nanopartículas magnéticas impulsadas por un campo magnético externo. Esta tecnología ofrece un gran potencial en cuanto a tiempo y energía asociados a la recolección de algas, mejorando el proceso sin contaminar el medio ambiente.

Se considera que la adsorción se debe principalmente a la atracción electrostática entre las nanopartículas magnéticas y las células. La composición del medio, el pH y la concentración de nanopartículas son parámetros de separación importantes que

necesitan ser optimizados para obtener altas eficiencias de separación (Xu *et al.*, 2011).

Es necesario optimizar también los métodos para separar las microalgas de las nanopartículas una vez cosechadas. Cuando el compuesto que nos interesa está dentro de las células y las nanopartículas no interfieren con la tecnología de procesamiento posterior, puede ser interesante no separar las algas de las nanopartículas y así poder separar magnéticamente los desechos celulares más tarde (Prochazkova *et al.*, 2013).

La separación magnética puede usarse para restaurar la calidad del agua de los lagos de agua dulce en los que se ha dado un crecimiento excesivo de algas debido a la eutrofización (Cerff *et al.*, 2012).

Esta técnica también puede ser útil para eliminar microalgas en piscifactorías, puesto que un crecimiento excesivo tiene como resultado un déficit en el oxígeno disponible por las noches que causa muchos problemas a la industria de la acuicultura (Toh *et al.*, 2012).

El **objetivo de este trabajo** es sintetizar nanopartículas de magnetita con grupos hidroxilo y con grupos amino, y estudiar el uso de ambas en la cosecha de dos especies distintas de microalga, *Nannochloropsis gaditana* y *Chlorella vulgaris*, creciendo con distintas fuentes de nitrógeno.

*Nannochloropsis sp.* ha demostrado ser especialmente prometedora para la producción de biodiesel debido a su alto contenido en aceite. Los procesos de separación tradicionales resultan especialmente complejos en este caso ya que su tamaño es relativamente pequeño en comparación con otras microalgas (2-4  $\mu\text{m}$ ). La superficie de esta microalga está cargada negativamente a todos los valores de pH (Hu *et al.*, 2013).

*Chlorella sp.* es un alga verde unicelular con forma elipsoidal y con una gama de diámetros que va desde 2  $\mu\text{m}$  hasta 12  $\mu\text{m}$  (Suali y Sarbatly, 2012). La pared celular de *C. vulgaris* contiene hasta un 25 % de hemicelulosa, un 15 % de lípidos, y sólo un 3 % de proteínas (Cerff *et al.*, 2012). Esta microalga tiene una carga superficial neta negativa en todos los medios (Prochazkova *et al.*, 2013).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MNPs)

#### 2.1.1. Síntesis de MNPs con grupos hidroxilo (MNP-OH)

Las nanopartículas de magnetita se sintetizan por coprecipitación de sales de hierro en medio alcalino. Los cloruros de hierro se hidrolizan y se forman los hidróxidos que en presencia de hidróxido amónico coprecipitan formando magnetita.

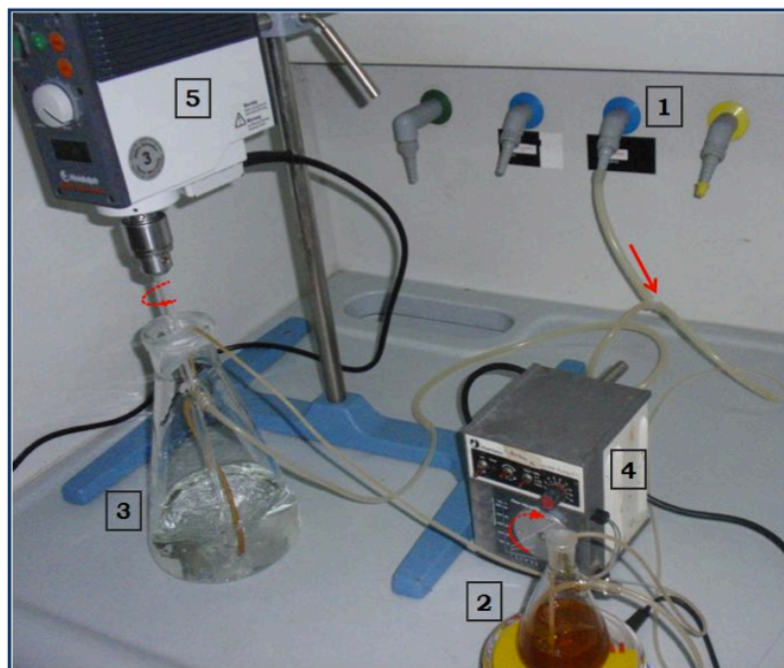
Se bombean 50 ml a 5 ml/min de una disolución con  $\text{FeCl}_2$  0,33 M y  $\text{FeCl}_3$  0,66 M sobre 450 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,42 M bajo una agitación mecánica vigorosa (400 rpm) con varilla de vidrio (Agitador RZR 2102, Heidolph), a temperatura ambiente. Una vez añadidas las sales de hierro, la agitación se mantiene durante 30 min. Se obtiene un precipitado negro que se decanta con un imán y se lava tres veces con agua desionizada y dos veces con tampón PBS (tampón fosfato salino 150 mM, pH 7,4).

Todas las disoluciones empleadas para la síntesis de nanopartículas hay que prepararlas con agua ultrapura (Milli Q) y burbujearlas continuamente con gas  $\text{N}_2$  para desplazar el  $\text{O}_2$ .

En la **Figura 1** se muestra una fotografía del montaje utilizado para la síntesis en el laboratorio de MNPs.

La concentración de nanopartículas se calcula secando a vacío un volumen conocido en un equipo Savant (Automatic Environmental SpeedVac Apparatus).

Las nanopartículas se almacenan a 4 °C hasta el momento de su utilización.



**Figura 1. Montaje experimental usado para la síntesis de MNPs en el laboratorio.** El  $N_2$  gaseoso (1) burbujea en todo momento la disolución de los cloruros de hierro (2) y la disolución de  $NH_4OH$  (3). La bomba peristáltica (4) añade los cloruros gota a gota sobre el  $NH_4OH$  mientras se agita esta disolución mecánicamente (5).

### 2.1.2. Obtención de MNPs con grupos amino (MNP- $NH_2$ )

Para obtener MNPs con grupos amino en su superficie hay que partir de MNPs con grupos hidroxilo. Para ello, se incuban 300 mg de las nanopartículas con grupos hidroxilo durante 24 horas con 3-aminopropiltriétoxilano al 2 % (v/v), a 70 °C y a 200 rpm.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS

### 2.2.1. Caracterización morfológica y tamaño de las MNPs

La caracterización cristalográfica y la identificación de fases se llevaron a cabo en el Servicio General de Rayos X de los Servicios Generales de Investigación SGIKER de la Universidad del País Vasco.

Las muestras secas de las MNP-OH y de las MNP-NH<sub>2</sub> se miden mediante difracción de rayos X (DRX) en un difractómetro PANalytical X'Pert PRO, equipado con tubo de cobre ( $\lambda_{\text{Cu}_{K\alpha\text{media}}}=1,5418\text{\AA}$ ,  $\lambda_{\text{Cu}_{K\alpha1}}=1,54060\text{\AA}$  y  $\lambda_{\text{Cu}_{K\alpha2}}=1,54439\text{\AA}$ ), un goniómetro vertical (geometría Bragg-Brentano), una rendija programable de divergencia, un intercambiador automático de muestras, un monocromador secundario de grafito y un detector PixCel.

Para el tratamiento informático de los difractogramas obtenidos e identificación de las fases presentes se emplea el software específico PANalytical X'Pert HighScore, en combinación con la base de datos PDF2 del ICDD.

El tamaño de la nanopartícula se calcula a partir de la anchura a media altura de los máximos de difracción empleando la ecuación de Scherrer, dicha ecuación relaciona el ensanchamiento neto del pico de difracción  $\beta$  con el tamaño de cristalito ( $\tau$ , en  $\text{\AA}$ ):

$$\tau \text{ (promedio; en } \text{\AA}) = K \lambda / (\beta \cos \theta) \quad (1)$$

donde la constante  $K$  toma el valor de 0,89 al considerar las partículas esféricas;  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación  $X$  utilizada (1,5418  $\text{\AA}$ );  $\beta$  es el ensanchamiento neto del pico de difracción expresado en radianes  $2\theta$  pudiéndose determinar a partir de:

$$\beta^2 = \beta_{\text{obs}}^2 - \beta_{\text{ins}}^2 \quad (\text{según Warren}). \quad (2)$$

$$\beta = \beta_{\text{obs}} - \beta_{\text{ins}} \quad (\text{según Scherrer}). \quad (3)$$

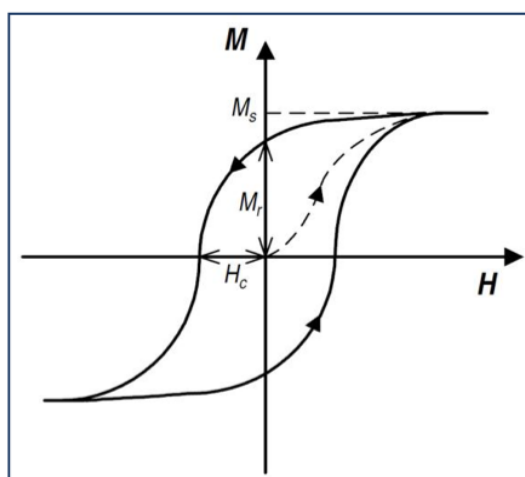
siendo  $\beta_{\text{obs}}$  la anchura observada (experimental) y  $\beta_{\text{ins}}$  la anchura instrumental.

Para medir la anchura de los picos de la magnetita se utiliza el software EVA del paquete Diffra<sup>PLUS</sup>, en el modo FPM (Full Pattern Matching).

En los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de León se observaron las MNPs con grupos hidroxilo mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

### 2.2.2. Ciclo de histéresis y tamaño del núcleo magnético

La aplicación de un campo magnético ( $H$ ) tiene como resultado la magnetización ( $M$ ) de la muestra. Se comienza aplicando un campo ( $H$ ) hasta alcanzar la saturación en la que todos los spines están orientados (saturación magnética,  $M_s$ ). Cuando se comienza a disminuir el campo se alcanza  $h = 0$ , pero se mantiene un magnetismo residual (remanencia,  $M_r$ ). El campo coercitivo es el campo magnético de sentido contrario necesario para anular el magnetismo remanente (coercitividad,  $H_c$ ). Continuando con la aplicación de un campo opuesto se vuelven a saturar, pero en esta ocasión los spines se orientan en sentido contrario. Si se continúa aumentando el campo, el ciclo vuelve a comenzar. Cuanto más ferromagnético sea el material, mayor remanencia tendrá (**Figura 2**).



**Figura 2.** Curva típica de histéresis de un material ferromagnético. La línea punteada muestra la pendiente del primer ciclo (Schmid, 2004).

A medida que va disminuyendo el tamaño de un material, el comportamiento de los átomos que lo compone muestra diferentes propiedades a las que originalmente tenía en tamaño macroscópico. Por eso las nanopartículas magnéticas presentan un comportamiento superparamagnético.

Los materiales superparamagnéticos se caracterizan por tener la capacidad de no quedarse magnetizados, lo que quiere decir que su curva de histéresis no sería una

histéresis clásica, ya que son nulas la coercitividad y la remanencia. En la práctica esto no es del todo correcto, siempre quedará un mínimo de dichas propiedades.

Se analizaron los ciclos de histéresis de las MNP-OH y de las MNP-NH<sub>2</sub> en los Servicios Generales de Investigación SGIKER de la Universidad del País Vasco.

Se calcularon las curvas de histéresis a temperatura ambiente mediante magnetometría de muestra vibrante (VSM), se empleó un electroimán hasta campos moderados (0,9 T).

A partir de las curvas de histéresis se puede hacer una aproximación al tamaño del núcleo magnético de las partículas. En nuestro caso, el resultado no será del todo exacto al tener las curvas de histéresis calculadas a temperatura ambiente en vez de a 2 K.

Empleando las ecuaciones de Langevin se realiza un ajuste a partir del modelo superparamagnético no interaccionante. La expresión aplicable a este caso es la siguiente:

$$M(H) = M_s \left( \frac{emu}{g} \right) \int_0^\infty L \left( \frac{\mu_0 M_s (Am^{-1}) V H (Am^{-1})}{k_B T} \right) f(D) dD \quad (4)$$

donde  $f(D)$  es la distribución de diámetros de la población de partículas y es una función del tipo log-normal;  $M_s$  (emu/g) imanación de saturación macroscópica;  $M_s$  (Am<sup>-1</sup>) la imanación de la partícula;  $\mu_0$  la permeabilidad magnética en el vacío; y  $k_B$  la constante de Boltzmann. El volumen crítico  $V$  se determina para cada temperatura:

$$V_C = \frac{25k_B T}{K} \quad (5)$$

donde  $K$  la constante de anisotropía efectiva.

Se supuso que las partículas eran esféricas y que el componente principal era magnetita (magnetización a 480 kA/m).



### 2.3. CULTIVO DE MICROALGAS

Las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* han sido cedidas por NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Vitoria).

*C. vulgaris* se cultiva en Erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de medio Chu 13 modificado (Largeau et al., 1980) al que variamos la fuente de nitrógeno. Se preparan medios con nitrato potásico 4 mM, otros con nitrito sódico 4 mM, y otros con sulfato amónico 2 mM (para que la concentración de ión amonio sea 4 mM).

*N. gaditana* se cultiva en Erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de medio Chu 13 modificado (Largeau et al., 1980) con agua de mar filtrada y con las mismas fuentes de nitrógeno que *C. vulgaris*.

Ambas microalgas se incuban con una fuente de luz artificial en un incubador orbital (Climo-Shaker ISF1-X, Kuhner SHAKER X) a 159 rpm y a 25 °C.

Se usa un microscopio óptico de campo claro para poder observar la morfología de ambas microalgas.

#### 2.3.1. Curvas de crecimiento

Se mide la absorbancia de 1 ml de cultivo usando un espectrofotómetro (Spectrophotometer DU800, Beckman Coulter) a 680 nm. Este procedimiento se repite a diversos tiempos con el fin de determinar el crecimiento de las microalgas y poder trazar su curva de crecimiento. Se hacen curvas de crecimiento de ambas microalgas creciendo con las tres fuentes de nitrógeno utilizadas, nitrato, nitrito y amonio.

#### 2.3.2. Concentración de clorofilas

Se centrifuga durante 10 minutos una muestra de 1 ml en un Eppendorf de 2 ml a 15000 g en una microcentrífuga (Microfuge 18 Centrifuge, Beckman Coulter). A continuación, se retiran 850 µl de sobrenadante y se añaden 1,35 ml de agua destilada. Después se centrifugan las muestras a 15000 g durante 10 minutos, y se retiran de nuevo 850 µl de sobrenadante para añadir 1,35 ml de metanol. Hay que agitar para extraer las clorofilas, es importante que el tiempo de agitación sea

siempre el mismo para extraer la misma cantidad de clorofila. Se pone la muestra a incubar a 80 °C durante 15 minutos en un calentador para Eppendorfs (Digital Heatblock, VWR). Luego se centrifuga de nuevo a 15000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se mide en el espectrofotómetro a 450 nm para detectar los carotenoides, a 650 nm para detectar la clorofila-b (Chl b), y a 665 nm para detectar la clorofila-a (Chl a).

$$Chl a \left( \frac{\mu g}{ml} \right) = (16,5 A_{665} - 8,3 A_{650})V \quad (6)$$

$$Chl b \left( \frac{\mu g}{ml} \right) = (33,8 A_{650} - 12,5 A_{665})V \quad (7)$$

$$Carotenoides \left( \frac{\mu g}{ml} \right) = \frac{(A_{450} V)}{250} \quad (8)$$

Para seguir el crecimiento de las microalgas usamos la concentración de clorofila-a, que es el tipo de clorofila universal que se encuentra en plantas, algas y cianobacterias. Se hacen curvas con las concentraciones de clorofila-a de ambas microalgas creciendo con las tres fuentes de nitrógeno utilizadas, nitrato, nitrito y amonio.

### 2.3.3. Conductancia de los medios de cultivo

Se llama electrolito a la sustancia que en disolución acuosa produce iones. Como los iones son partículas cargadas, cuando se mueven en la disolución conducen la corriente eléctrica. Una corriente eléctrica implica siempre un movimiento de carga.

La conductividad es una medida de la facilidad con la que una corriente eléctrica pasa a través de un conductor, en este caso una disolución iónica. La conductancia de una solución está directamente vinculada a la cantidad de sólidos totales disueltos y se mide en siemens por metro (S/m).

Para medir la conductancia de los distintos medios de ambas microalgas, se toman 20 ml del medio de cultivo y se centrifugan en un tubo Falcon a 6000 rpm durante 20 minutos a 15 °C (Allegra X-22R Centrifuge, Beckman Coulter).

Luego, se analiza el sobrenadante sin células en un conductímetro (Orion Star A212 Conductivity Meter, Thermo Scientific) previamente lavado con agua Milli Q.

## 2.4. ADSORCIÓN DE MICROALGAS

Para la inmovilización de microalgas se emplea 1 mg de MNPs, tanto con grupos hidroxilo como con grupos amino. Las MNPs con grupos hidroxilo crean interacciones polares con las microalgas, mientras que las MNPs con grupos amino crean tanto interacciones polares como iónicas debido a la interacción de las cargas positivas de estas MNPs con las cargas negativas de las microalgas.

Tras lavar las MNPs con agua Milli Q en un Eppendorf, se retira el agua con ayuda de un imán para añadir las microalgas. El volumen de cultivo añadido es el correspondiente a la cantidad de clorofila que deseamos añadir en cada caso, luego se añade el agua Milli Q necesaria para llegar a 1 ml.

Se inmovilizaron muestras de tres cultivos diferentes de *N. gaditana* en fase exponencial, cada uno creciendo con una de las tres fuentes de nitrógeno utilizadas, y de dos cultivos de *C. vulgaris* en fase exponencial, uno creciendo con nitrato y el otro con nitrito. De cada cultivo se adsorbieron en 1 mg de nanopartículas cuatro muestras distintas, con cantidades de microalgas equivalentes a 2, 5, 7 y 10 µg de clorofila-a. Estos experimentos se realizaron para ambos tipos de nanopartículas (MNP-OH y MNP-NH<sub>2</sub>).

Una vez añadidas las microalgas a las MNPs, se deja la mezcla en un brazo agitador (RM-2L Intelli-Mixer, ELMI) a 30 rpm durante 5 minutos. A continuación, se retira el sobrenadante con ayuda de un imán para medir la concentración de clorofila-a, la clorofila del sobrenadante corresponde a lo no inmovilizado.

Se utiliza siempre un control de microalgas sin inmovilizar para saber la cantidad de clorofila-a total.

Para calcular el porcentaje de inmovilización se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inmovilizado} = \frac{[\text{Chl a control}] - [\text{Chl a no inmovilizada}]}{[\text{Chl a control}]} \times 100 \quad (9)$$

## 2.5. DESINMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS

Este experimento se realizó con *C. vulgaris* crecida con nitrito e inmovilizada en MNP-NH<sub>2</sub>, y con *N. gaditana* crecida con nitrato e inmovilizada en MNP-OH. Para *C. vulgaris* se empleó una cantidad de cultivo equivalente a 2 µg de clorofila-a, y para *N. gaditana* se usó una cantidad de cultivo equivalente a 5 µg de clorofila-a.

Primero se inmoviliza en 1 mg de nanopartículas la cantidad deseada de microalgas en cada caso, usando el método ya explicado, y se retira el sobrenadante con ayuda de un imán para medir la concentración de clorofila-a correspondiente a lo no inmovilizado.

A continuación, se añade 1 ml de ácido sulfúrico al 10 % (v/v) en las MNPs con las microalgas adsorbidas.

Se probaron tres métodos distintos de desinmovilización con ácido sulfúrico durante 1 hora: brazo agitador a 45 rpm a temperatura ambiente, baño (Unitronic 320 OR, P. Selecta) a 40 °C con agitación manual en un vórtex cada 15 minutos, sonorreactor (UTR 200, Hielscher Ultrasound Technology) a 32 kHz y a 40 °C.

Después se recoge el sobrenadante con ayuda de un imán para medir la concentración de clorofila-a, corresponde a lo que se ha logrado desinmovilizar.

Al igual que en la inmovilización, se usa como control una muestra de microalgas sin MNPs para medir su concentración de clorofila-a.

También se usan como controles MNP-OH y MNP-NH<sub>2</sub> sin microalgas, se les añade ácido sulfúrico y se prueban los tres tipos distintos de desinmovilización testados para ver el efecto que tiene el ácido sulfúrico en las MNPs.

Para calcular el porcentaje de desinmovilización se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Desinmovilizado} = \frac{[\text{Chl a desinmovilizada}]}{[\text{Chl a control}] - [\text{Chl a no inmovilizada}]} \times 100 \quad (10)$$

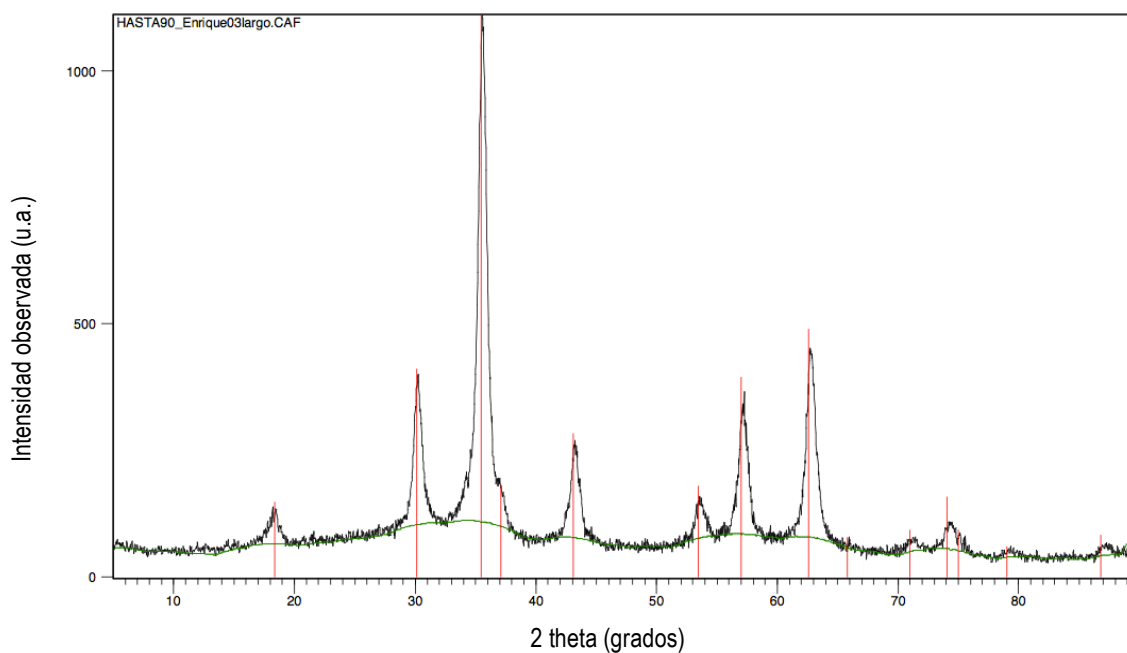
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. SÍNTESIS DE LAS MNPs

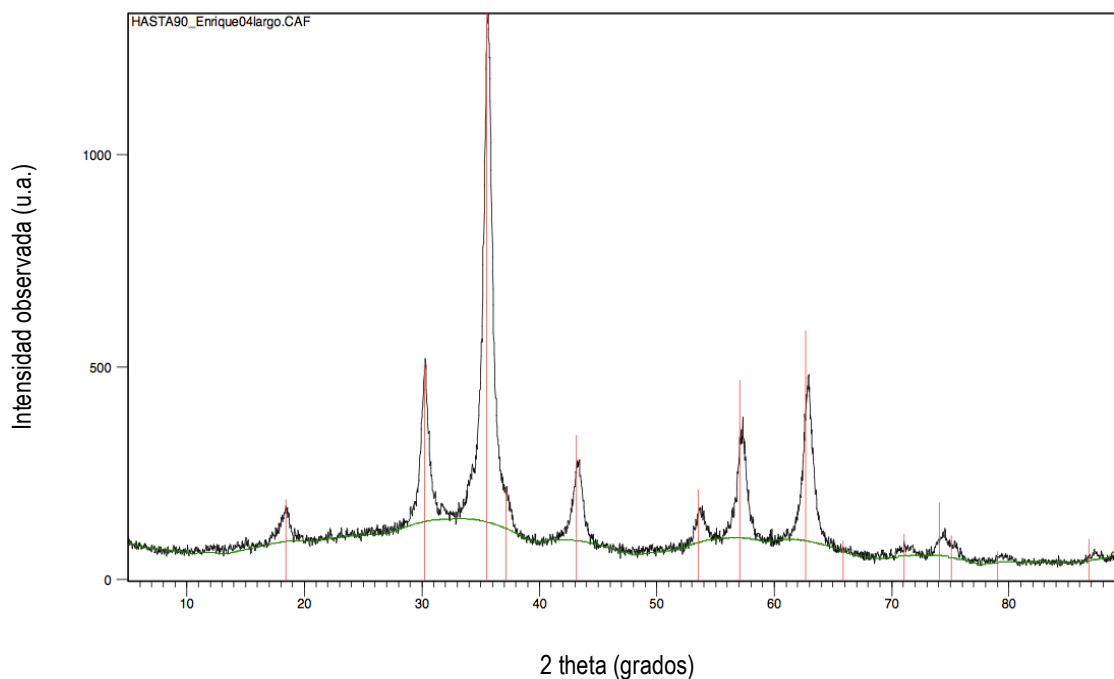
##### 3.1.1. Caracterización morfológica y tamaño de las MNPs

La única fase identificada para ambos tipos de nanopartícula es la magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_2$  (óxido doble ferroso-férrico  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}\text{O}_4$ ), que cristaliza en el sistema cúbico.

Las siguientes figuras (**Figura 3** y **Figura 4**) corresponden a los difractogramas experimentales medidos, con los máximos de difracción correspondientes a la magnetita.



**Figura 3.** Difractograma de la muestra de MNPs con grupos hidroxilo. Los máximos de difracción correspondientes a la magnetita se pueden ver en color rojo.



**Figura 4. Difractograma de la muestra de MNPs con grupos amino.** Los máximos de difracción correspondientes a la magnetita se pueden ver en color rojo.

El tamaño de los cristalitos se obtuvo aplicando la ecuación de Scherrer, Ecuación (1). El ensanchamiento neto del pico se determinó según Warren, Ecuación (2), y según Scherrer, Ecuación (3). De la **Tabla 1** se puede deducir que el tamaño medio de cristalito es del orden de 10 nm en ambos casos.

**Tabla 1. Tamaño medio de las distintas MNPs sintetizadas calculado a partir de la anchura a media altura de los máximos de difracción.**

	Tamaño medio de cristalito (Ecuación de Scherrer, ensanchamiento de Scherrer)	Tamaño medio de cristalito (Ecuación de Scherrer, ensanchamiento de Warren)
MNP-OH	96 Å	87 Å
MNP-NH <sub>2</sub>	89 Å	82 Å

El tamaño y forma de las nanopartículas magnéticas con grupos hidroxilo se comprobó mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 5**). La forma de las nanopartículas es esférica, y el tamaño parece cercano a unos 10 nm.

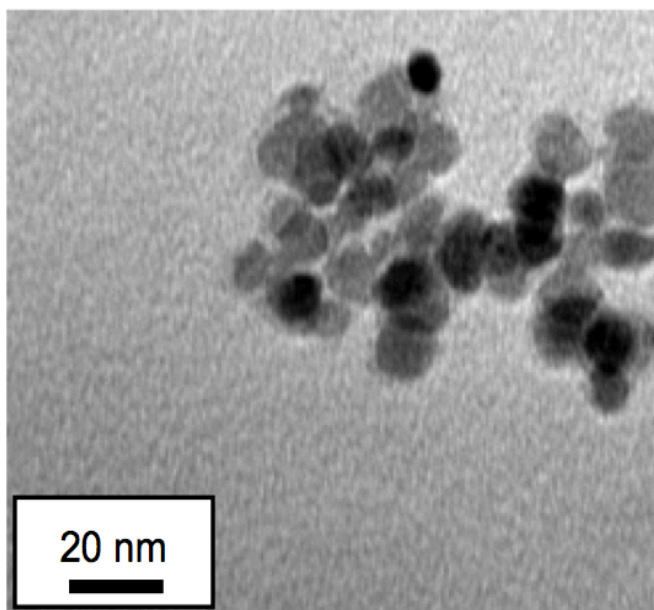
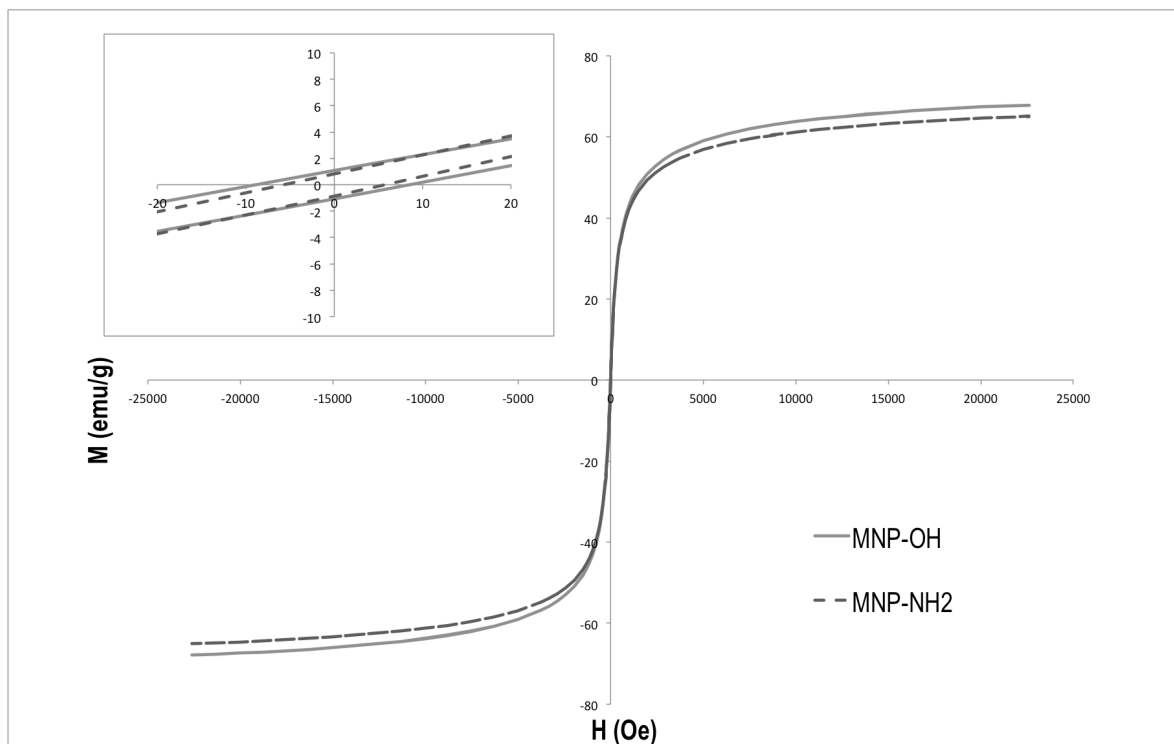


Figura 5. Imagen de las MNPs con grupos hidroxilo obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

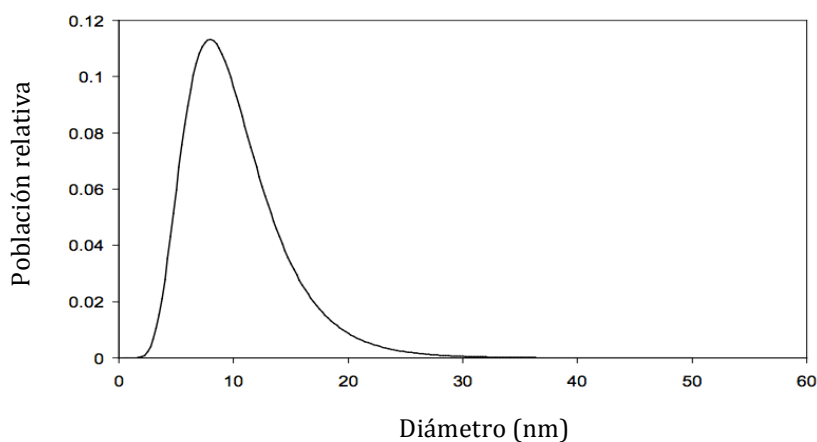
### 3.1.2. Ciclo de histéresis y tamaño del núcleo magnético

Las curvas de histéresis a temperatura ambiente para los dos tipos de nanopartículas sintetizados indican un claro comportamiento superparamagnético, la remanencia y la coercitividad son mínimas (**Figura 6**). La saturación magnética más baja se observó en las MNP-NH<sub>2</sub> ( $M_s = 65,086$  emu/g), esto se debe a que tienen mayor cantidad de material orgánico alrededor del núcleo magnético que las MNP-OH ( $M_s = 67,865$  emu/g).



**Figura 6.** Curva de histéresis a temperatura ambiente de las MNP-OH (línea gris claro continua) y de las MNP-NH<sub>2</sub> (línea gris oscuro discontinua). El comportamiento de las nanopartículas es superparamagnético, en la ampliación de la zona central de la gráfica se puede apreciar que la remanencia y la coercitividad son mínimas.

A partir de un ajuste a una función de Langevin, Ecuación (4) y Ecuación (5), se ha calculado un diámetro promedio de 9,5 nm para las MNPs con grupos hidroxilo (**Figura 7**). El tamaño promedio de las MNPs sintetizadas se corresponde aproximadamente con los resultados previos obtenidos por DRX y TEM.

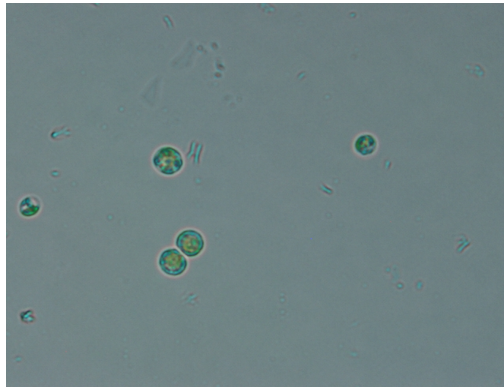


**Figura 7.** Distribución de tamaños de las de las MNP-OH. Obtenida usando las ecuaciones de Langevin.

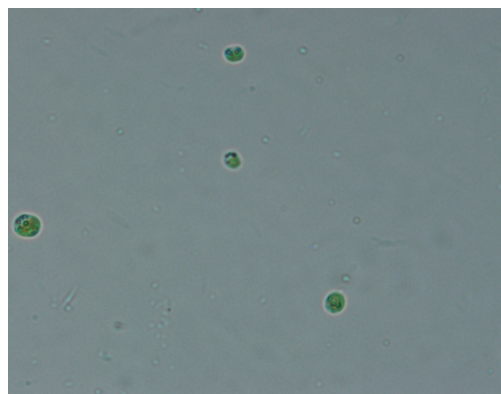


### 3.2. CULTIVO DE MICROALGAS

Gracias a las imágenes del microscopio óptico de campo claro se puede observar tanto la forma redondeada de las microalgas, como el característico color verde que proviene de sus pigmentos fotosintéticos (**Figura 8** y **Figura 9**).

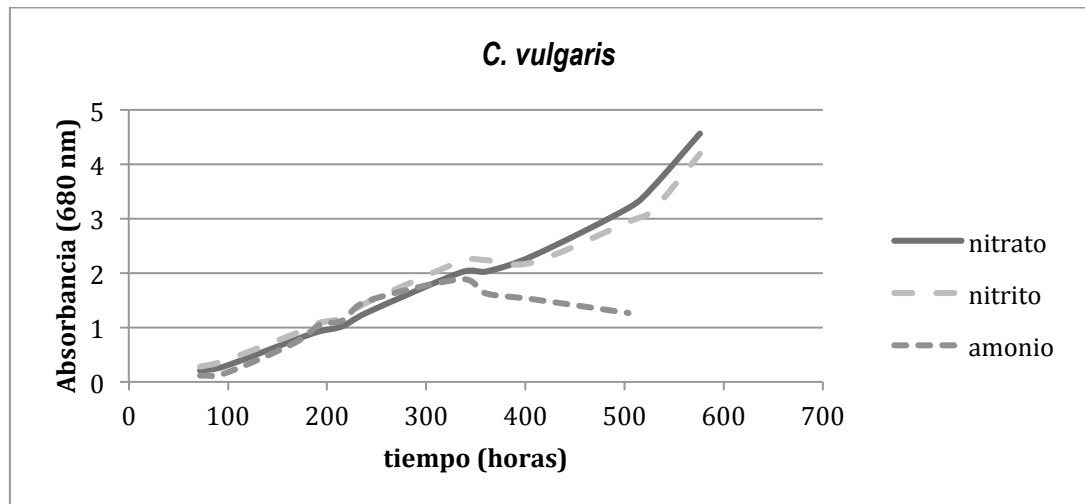


**Figura 8.** *C. vulgaris* vista al microscopio óptico de campo claro (100x).



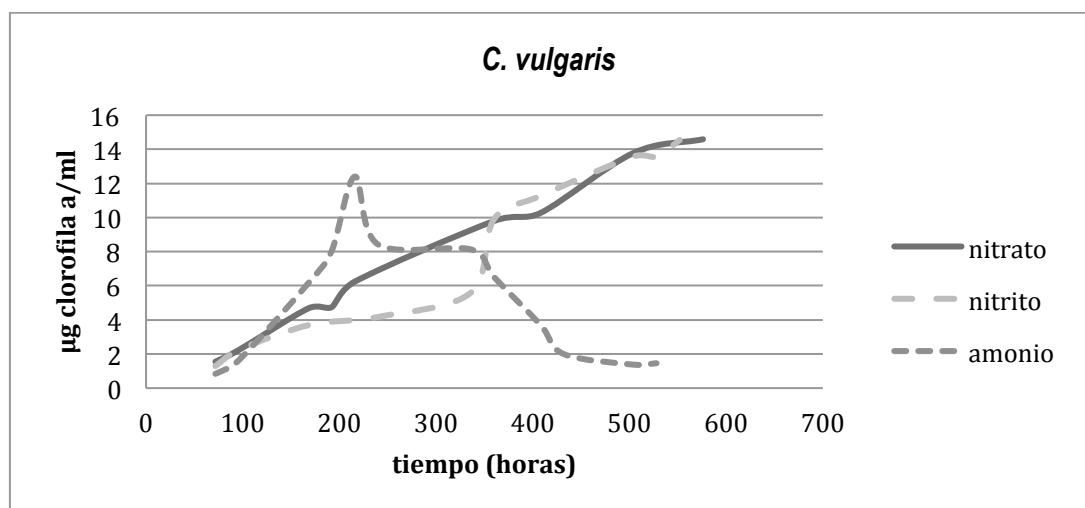
**Figura 9.** *N. gaditana* vista al microscopio óptico de campo claro (100x).

En las curvas de crecimiento de *C. vulgaris* se puede apreciar que la mejor fuente de nitrógeno es el nitrato, es un resultado lógico puesto que el nitrito y el amonio a altas concentraciones pueden llegar a ser tóxicos para las microalgas. En este caso, las microalgas con nitrito crecen casi tan bien como con nitrato. También se puede observar que creciendo con amonio pasan de fase exponencial a fase de muerte cerca de las 300 horas, un tiempo relativamente corto (**Figura 10**).



**Figura 10. Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en medios con diferentes fuentes de nitrógeno.** Medio con nitrato (línea gris), medio con nitrito (línea discontinua guión largo), medio con amonio (línea discontinua guión corto).

Mirando las curvas de concentración de clorofila-a de *C. vulgaris* calculadas con la Ecuación (6), se observa que las microalgas crecidas con amonio experimentan un rápido crecimiento seguido de una muerte rápida sin pasar por fase estacionaria. Esto puede deberse a un veloz consumo de la fuente de nitrógeno, o a la toxicidad del amonio y de los productos derivados de su metabolismo (**Figura 11**).



**Figura 11. Curvas de concentración de Chl a de *C. vulgaris* en medios con diferentes fuentes de nitrógeno.** Medio con nitrato (línea gris), medio con nitrito (línea discontinua guión largo), medio con amonio (línea discontinua guión corto).

Por otro lado, en las curvas de crecimiento de *N. gaditana* se puede observar que con nitrito hay menor crecimiento que con nitrato o amonio. De nuevo, la mejor fuente de nitrógeno ha resultado ser el nitrato, es lo esperado por ser la única fuente de nitrógeno empleada que no es tóxica para las microalgas (**Figura 12**).

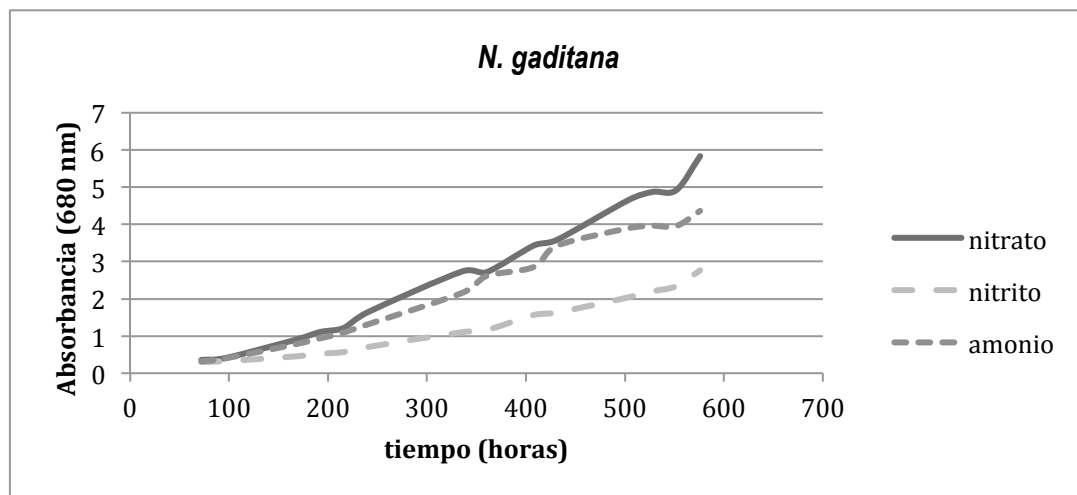


Figura 12. Curvas de crecimiento de *N. gaditana* en medios con diferentes fuentes de nitrógeno. Medio con nitrato (línea gris), medio con nitrito (línea discontinua guión largo), medio con amonio (línea discontinua guión corto).

De las curvas de concentración de clorofila-a de *N. gaditana* calculadas con la Ecuación (6), se puede deducir que con nitrito y con amonio mueren antes que con nitrato, esto probablemente se deba a la toxicidad del nitrito y del amonio (**Figura 13**).

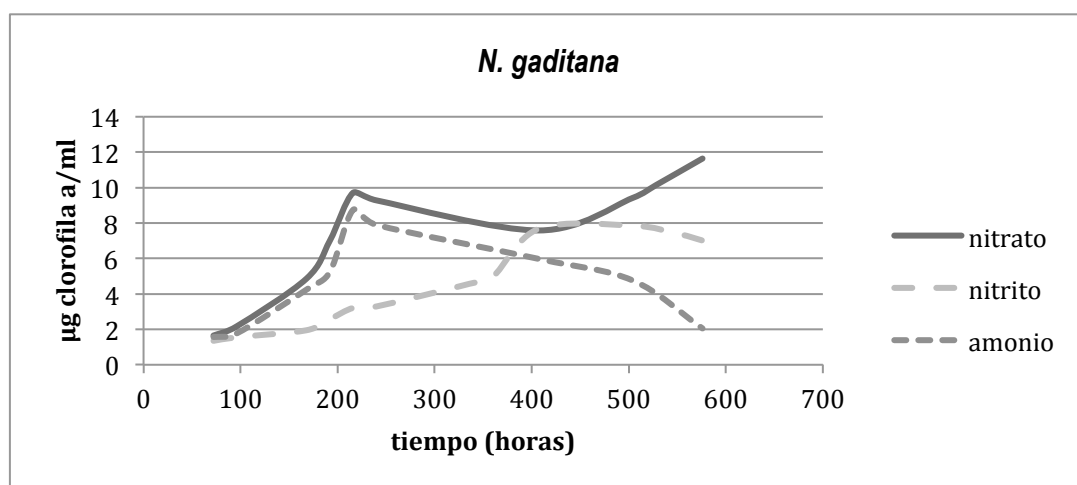


Figura 13. Curvas de concentración de Chl a de *N. gaditana* en medios con diferentes fuentes de nitrógeno. Medio con nitrato (línea gris), medio con nitrito (línea discontinua guión largo), medio con amonio (línea discontinua guión corto).

### 3.2.1. Conductancia de los medios de cultivo

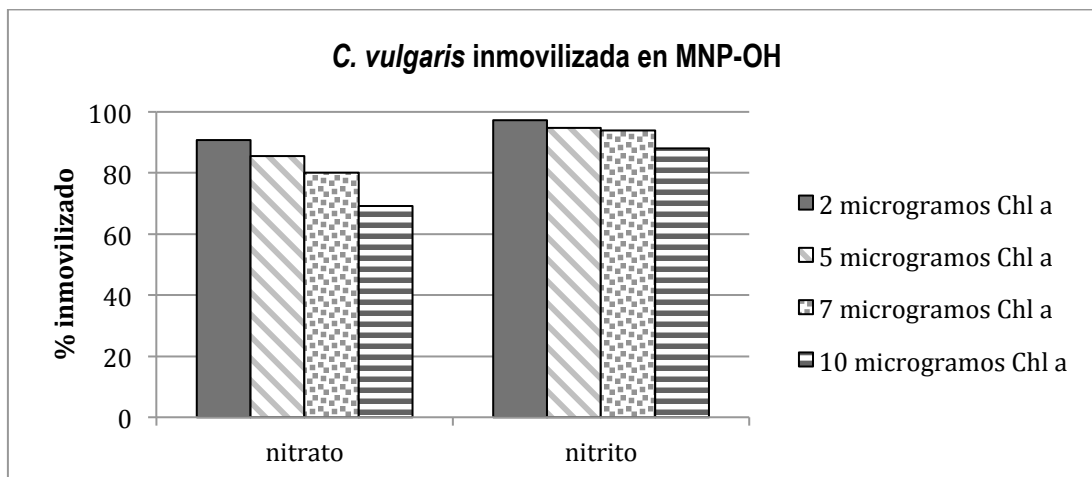
Las medidas de conductancia más altas con diferencia son las de los medios de *N. gaditana*, esto se debe a que contienen agua de mar en vez de agua destilada y, por lo tanto, tienen más cantidad de electrolitos (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Medidas de conductancia en  $\mu\text{S/cm}$  de los distintos medios de *C. vulgaris* y *N. gaditana* tras 26 días de cultivo.**

Fuente de nitrógeno	<i>C. vulgaris</i>	<i>N. gaditana</i>
Nitrato	1772 $\mu\text{S/cm}$	57960 $\mu\text{S/cm}$
Nitrito	1726 $\mu\text{S/cm}$	58490 $\mu\text{S/cm}$
Amonio	2527 $\mu\text{S/cm}$	57980 $\mu\text{S/cm}$

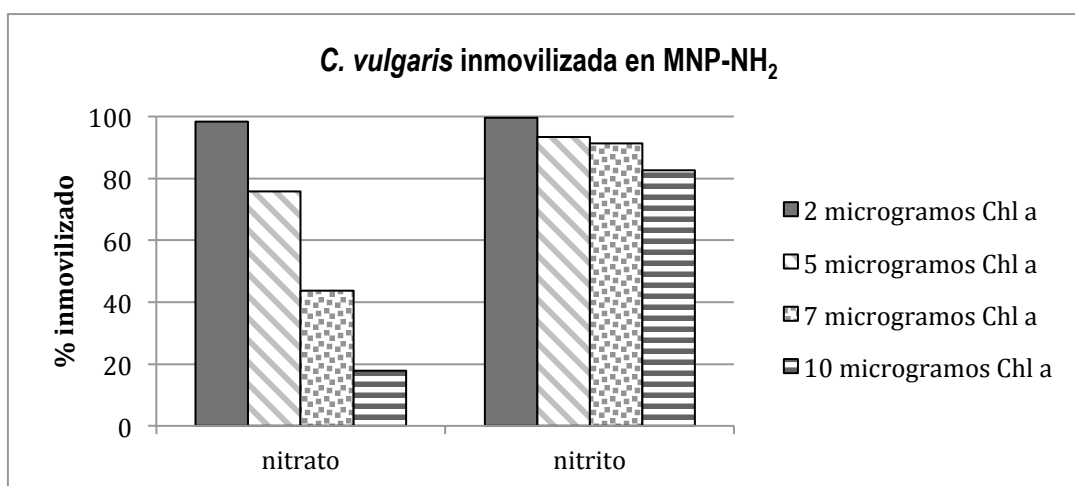
### 3.3. ADSORCIÓN DE MICROALGAS

Se inmovilizaron en 1 mg de MNP-OH cuatro muestras distintas, con cantidades de microalgas equivalentes a 2, 5, 7 y 10  $\mu\text{g}$  de clorofila-a, de dos cultivos de *C. vulgaris*, uno creciendo con nitrato y otro con nitrito, el cultivo con amonio se descartó debido a su rápida muerte (**Figura 14**). El porcentaje inmovilizado, que se calcula con la Ecuación (9), como es lógico descende al aumentar la cantidad de microalgas de la muestra. En general, los resultados son mejores con el cultivo que crece con nitrito, el porcentaje de inmovilización descende en menor medida al aumentar la cantidad de microalgas. El porcentaje de inmovilización supera el 60 % en todos los casos, siendo el más alto el de la muestra con 2  $\mu\text{g}$  de clorofila-a del medio con nitrito.



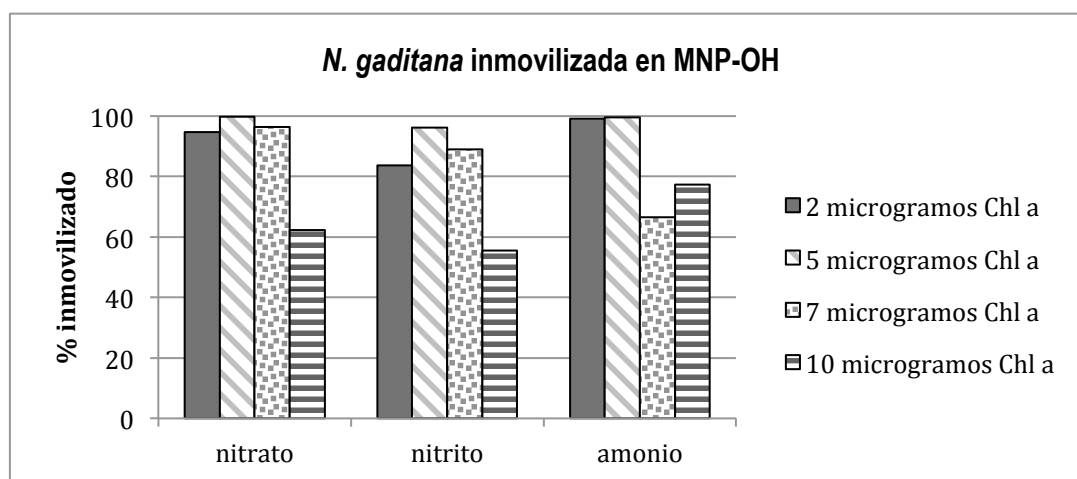
**Figura 14.** Inmovilización en 1 mg de MNP-OH de distintas cantidades de *C. vulgaris* creciendo con nitrato y con nitrito. Cantidades equivalentes a 2  $\mu\text{g}$  de Chl a (gris), 5  $\mu\text{g}$  de Chl a (rayas inclinadas), 7  $\mu\text{g}$  de Chl a (puntos) y 10  $\mu\text{g}$  de Chl a (rayas horizontales).

Se inmovilizaron en 1 mg de MNP-NH<sub>2</sub> cuatro muestras de los dos mismos cultivos de *C. vulgaris* con las mismas cantidades de microalgas que en el caso anterior (**Figura 15**). En este caso también se obtienen mejores resultados con el medio con nitrito, ya que con el otro cultivo al aumentar la cantidad de microalgas desciende mucho el porcentaje de inmovilización. El mejor porcentaje de inmovilización es el de la muestra con 2  $\mu\text{g}$  de clorofila-a del medio con nitrito.



**Figura 15.** Inmovilización en 1 mg de MNP-NH<sub>2</sub> de distintas cantidades de *C. vulgaris* creciendo con nitrato y con nitrito. Cantidades equivalentes a 2  $\mu\text{g}$  de Chl a (gris), 5  $\mu\text{g}$  de Chl a (rayas inclinadas), 7  $\mu\text{g}$  de Chl a (puntos) y 10  $\mu\text{g}$  de Chl a (rayas horizontales).

Se inmovilizaron en 1 mg de MNP-OH cuatro muestras distintas, con cantidades de microalgas equivalentes a 2, 5, 7 y 10  $\mu\text{g}$  de clorofila-a, de cada uno de los tres cultivos de *N. gaditana* (**Figura 16**). En los medios con nitrato y con nitrito el porcentaje de inmovilización supera el 80 % excepto para la cantidad de microalgas mayor, siendo mejores los resultados del medio con nitrato. En el medio con amonio el porcentaje de inmovilización supera el 90 % hasta que la cantidad de microalgas aumenta a 7  $\mu\text{g}$  de clorofila-a. En todos los casos el porcentaje de inmovilización supera el 50 %. La mejor inmovilización es la del medio con nitrato correspondiente a la muestra con 5  $\mu\text{g}$  de clorofila-a.



**Figura 16.** Inmovilización en 1 mg de MNP-OH de distintas cantidades de *N. gaditana* creciendo con nitrato, con nitrito y con amonio. Cantidades equivalentes a 2  $\mu\text{g}$  de Chl a (gris), 5  $\mu\text{g}$  de Chl a (rayas inclinadas), 7  $\mu\text{g}$  de Chl a (puntos) y 10  $\mu\text{g}$  de Chl a (rayas horizontales).

Se inmovilizaron en 1 mg de MNP-NH<sub>2</sub> cuatro muestras de los tres mismos cultivos de *N. gaditana* con las mismas cantidades de microalgas que en el caso anterior (**Figura 17**). La mejor inmovilización es la del medio con nitrato correspondiente a la muestra con 2  $\mu\text{g}$  de clorofila-a. En la muestra del cultivo con amonio con una cantidad de microalgas equivalente a 5  $\mu\text{g}$  de clorofila-a se inmoviliza muy poca cantidad de microalgas, puede deberse a un error en algún momento del manejo de esa muestra.

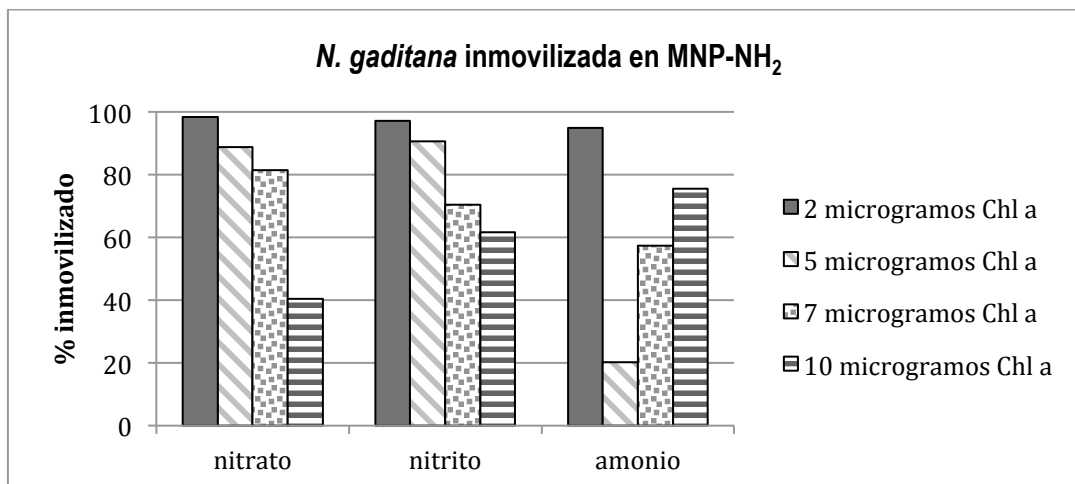


Figura 17. Inmovilización en 1 mg de MNP-NH<sub>2</sub> de distintas cantidades de *N. gaditana* creciendo con nitrato y con nitrito. Cantidades equivalentes a 2 µg de Chl a (gris), 5 µg de Chl a (rayas inclinadas), 7 µg de Chl a (puntos) y 10 µg de Chl a (rayas horizontales).

Los medios que tienen menor conductancia se corresponden con los medios con mejores resultados de inmovilización para cada microalga, en el caso de *N. gaditana* es el medio con nitrato y en el *C. vulgaris* es el medio con nitrito.

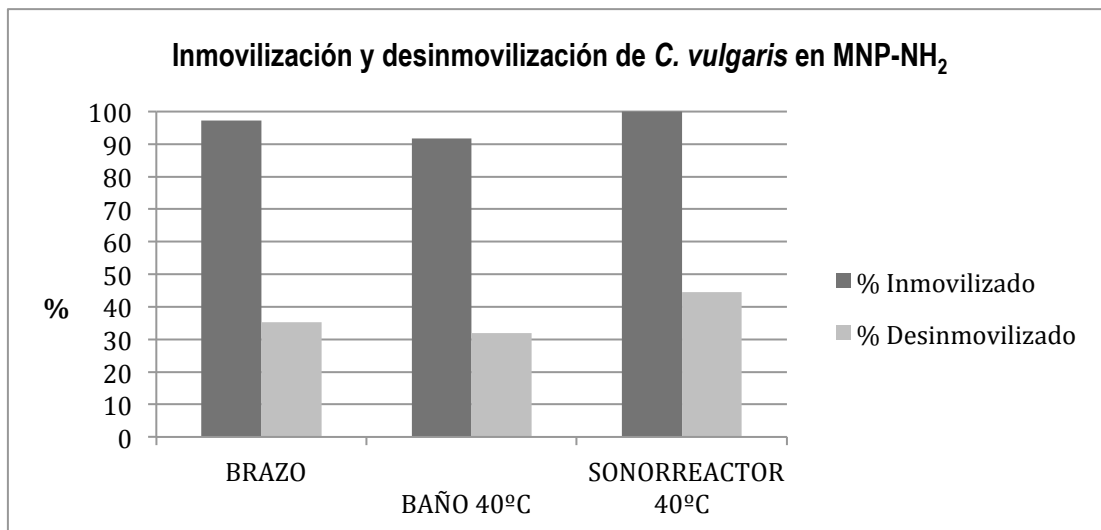
### 3.4. DESINMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS

Para la desinmovilización de las microalgas se seleccionaron aquellas condiciones que produjeron un mayor porcentaje de inmovilización. Se usaron los cultivos de *C. vulgaris* crecida con nitrito y de *N. gaditana* crecida con nitrato. Para *C. vulgaris* la cantidad de cultivo utilizado fue equivalente a 2 µg de clorofila-a y se adsorbió en 1 mg de MNP-NH<sub>2</sub>, y para *N. gaditana* la cantidad de cultivo utilizado fue equivalente a 5 µg de clorofila-a y se adsorbió en 1 mg de MNP-OH.

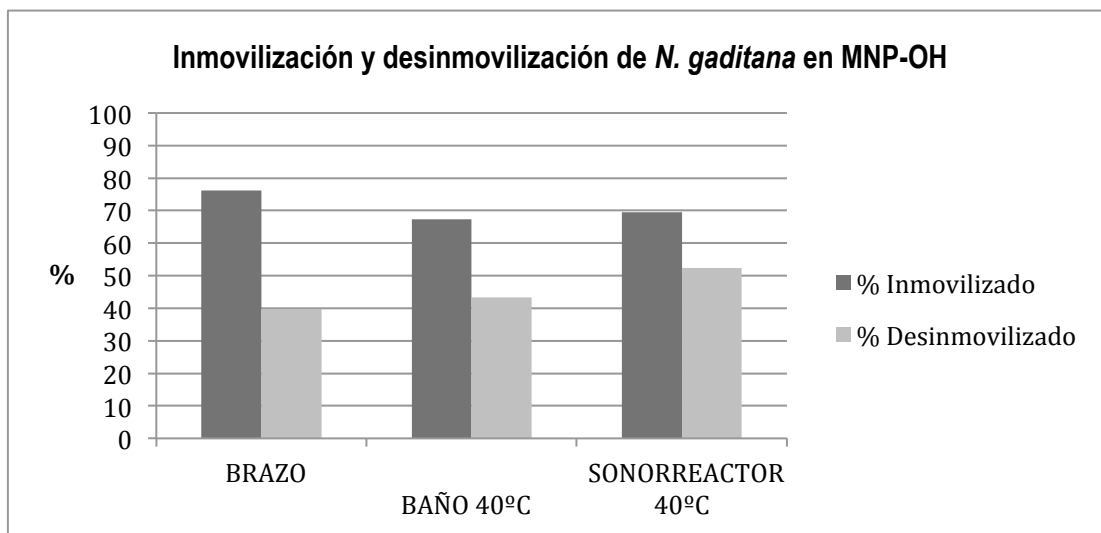
El porcentaje de inmovilización se calcula con la Ecuación (9) y el porcentaje de desinmovilización se calcula con la Ecuación (10).

Para ambas microalgas la técnica de desinmovilización que mejor resultado dio fue el sonorreactor, aunque ni siquiera con ese método se logra una completa desinmovilización. El baño a 40 °C no parece que mejore la desinmovilización, con *C. vulgaris* dio incluso peor resultado que la desinmovilización a temperatura ambiente, y la mejora que supuso su uso con *N. gaditana* apenas es apreciable. En

ningún caso se obtuvo una desinmovilización superior al 50 % (Figura 18 y Figura 19).



**Figura 18. Inmovilización en MNP-NH<sub>2</sub> y tres desinmovilizaciones de *C. vulgaris* creciendo con nitrito.** La cantidad de microalgas inicial era equivalente a 2 µg de Chl a. El porcentaje de inmovilización se puede ver en gris oscuro, y el de desinmovilización en gris claro.



**Figura 19. Inmovilización en MNP-OH y tres desinmovilizaciones de *N. gaditana* creciendo con nitrito.** La cantidad de microalgas inicial era equivalente a 5 µg de Chl a. El porcentaje de inmovilización se puede ver en gris oscuro, y el de desinmovilización en gris claro.



El efecto del ácido sulfúrico en las MNP-OH y las MNP-NH<sub>2</sub> sin microalgas que se usaron como control fue muy fuerte puesto que se disolvieron en los tres casos, en el brazo agitador, en el baño a 40 °C y en el sonorreactor.

El hecho de que no se obtenga una completa desinmovilización puede deberse a que el ácido sulfúrico destruye tanto las MNPs como las microalgas, por lo que solo detectamos las células que han sobrevivido a este tratamiento tan agresivo.

#### 4. CONCLUSIONES

La mejor fuente de nitrógeno para el crecimiento de las microalgas es el nitrato, puesto que no es tóxico como el nitrito o el amonio.

El efecto del amonio en el crecimiento de *C. vulgaris* supone un rápido crecimiento seguido de una muerte rápida sin pasar por una fase estacionaria.

Una menor conductancia del medio de cultivo favorece la adsorción, los medios con menor conductancia se corresponden con las mejores inmobilizaciones para cada microalga.

Las MNPs con grupos hidroxilo crean interacciones polares con las microalgas. En cambio, las MNPs con grupos amino crean tanto interacciones polares como iónicas debido a la interacción de las cargas positivas de estas MNPs con las cargas negativas de la superficie de las microalgas.

Se ha observado que en general, al aumentar la cantidad de microalgas descende el porcentaje de inmobilización.

El mayor porcentaje de inmobilización obtenido para *C. vulgaris* es el de la muestra con 2 µg de clorofila-a del medio con nitrito absorbida en MNPs con grupos amino. En cambio, la mejor inmobilización de *N. gaditana* fue la de la muestra con 5 µg de clorofila-a del medio con nitrato absorbida en MNPs con grupos hidroxilo.

El proceso de desinmovilización con ácido sulfúrico utilizado es demasiado agresivo, provoca la disolución de las nanopartículas y la destrucción de parte de las células.

Las microalgas tienen una gran relevancia en estos momentos debido a sus múltiples usos, pero es imprescindible mejorar los procesos de producción y recolección de

estos microorganismos puesto que los altos costes que conllevan son la traba que frena el desarrollo de muchas de sus aplicaciones potenciales.

Está claro que la separación magnética es un buen candidato para mejorar la cosecha de microalgas y evitar los métodos tradicionales más caros e ineficientes, pero es una técnica que aún está en desarrollo y necesita ser optimizada.

Es importante descubrir todos los parámetros que influyen en la inmovilización y en la posterior desinmovilización para poder optimizarlos, y obtener así la mayor cantidad de células posible.

Los resultados de esta técnica, de momento, parecen muy prometedores, está claro que tiene un gran potencial y que podría usarse para cosechar muchos otros tipos de microorganismos de interés en un futuro.

## **5. AGRADECIMIENTOS**

Tengo que agradecer la amable cesión de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis gaditana* a NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Vitoria.

Al Grupo de Tecnología Enzimática y Celular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco le agradezco que me haya permitido usar sus instalaciones, equipos y demás instrumental para la realización de este Trabajo de Fin de Grado.

Finalmente, quiero agradecer su colaboración a los Servicios Generales de Investigación SGIKER de la Universidad del País Vasco y a los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de León.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

Cerff, M., Morweiser, M., Dillschneider, R., Michel, A., Menzel, K., Posten, C., 2012. Harvesting fresh water and marine algae by magnetic separation: Screening of separation parameters and high gradient magnetic filtration. *Bioresource Technology* 118: 289-295.

- Hu, Y.R., Wang, F., Wang, S.K., Liu, C.Z., Guo, C., 2013. Efficient harvesting of marine microalgae *Nannochloropsis maritima* using magnetic nanoparticles. *Bioresource Technology* 138: 387-390.
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances* 30: 673-690.
- Largeau, C., Casadevall, E., BerkaloV, C., Dhamliencourt, P., 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 19: 1043-1051.
- Prochazkova, G., Safarik, I., Branyik, T., 2013. Harvesting microalgae with microwave synthesized magnetic microparticles. *Bioresource Technology* 130: 472-477.
- Slade, R., Bauen, A., 2013. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy* 53: 29-38.
- Schmid, G., 2004. Nanoparticles: from theory to application. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany). ISBN: 3-527-30507-6.
- Suali, E., Sarbatly, R., 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16: 4316-4342.
- Toh, P.Y., Yeap, S.P., Kong, L.P., Ng, B.W., Chan, D.J.C., Ahmad, A.L., Lim, J.K., 2012. Magnetophoretic removal of microalgae from fishpond water: Feasibility of high gradient and low gradient magnetic separation. *Chemical Engineering Journal* 211–212: 22–30.
- Xu, L., Guo, C., Wang, F., Zheng, S., Liu, C.Z., 2011. A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation. *Bioresource Technology* 102: 10047–10051.