

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



"OBSERVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PERDIDA DE VIABILIDAD CELULAR DE LA MICROALGA *CHLORELLA SOROKINIANA* EN REACTORES DE DIGESTIÓN ANAEROBIA, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPIA CONFOCAL."

Informe de práctica profesional controlada
presentada a la Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Forestales de la Universidad
de La Frontera. Como parte de los requisitos
para optar al título de Biotecnólogo.

FRANCISCO JAVIER CABRERA BARRIGA

PROFESOR GUÍA

DR. DAVID JEISON NUÑEZ

TEMUCO – CHILE

2014

"OBSERVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PERDIDA DE VIABILIDAD CELULAR DE LA MICROALGA *CHLORELLA SOROKINIANA* UTILIZADA COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN REACTORES DE DIGESTIÓN ANAEROBIA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y MICROSCOPIA CONFOCAL."

PROFESOR GUÍA

: _____

David Jeison Nuñez
Ingeniero Bioquímico.
Magister en ingeniería bioquímica.
Doctor en Ciencias Ambientales
Academico departamento de ciencias Químicas. Facultad de Ingeniería, ciencias y Administración. Universidad de la Frontera

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Alejandra Sandoval Alvarez
Doctor en Ciencias, Mención Biología Celular y Molecular Aplicada.
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular Vegetal.
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales.
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO DE PRACTICA PROFESIONAL

: _____

INDICE

Capítulo		Página
1	RESUMEN INTRODUCCION Y OBJETIVOS	3
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1	Principio de la citometría de flujo.	7
2.2	Principio de la microscopía confocal.	9
2.3	Fluorescencia natural e inducida en microorganismos y células eucariontes	10
2.4	Clasificación de las microalgas y su rol en la cadena trófica.	10
2.5	Cultivo de microalgas	13
2.6	<i>Chlorella sorokiniana</i> : una microalga versátil	15
2.7	Biogás	15
2.8	Digestión anaerobia	16
2.9	Microorganismos en la digestión anaerobia	18
2.9.1	Bacterias hidrolíticas.	18
2.9.2	Bacterias Acidogénicas	18
2.9.3	Bacterias Acetogénicas	18
2.9.4	Bacterias Metanogénicas	19
2.9.5	Bacterias Sulfuroreductoras	19
2.10	Optimización de la digestión anaerobia en reactores	19
2.10.1	Montaje del reactor.	20
2.10.2	Relación del sustrato y volumen del reactor.	20
2.11	Digestión anaerobia de microalgas	21
2.11.1	Factores que afectan la digestión anaerobia de la microalgas	21
3	MATERIALES Y METODOS	23
3.1	Cultivo de <i>Chlorella Sorokiniana</i>	23
3.2	Preparación de la microalga cultivada para la digestión anaerobia.	24
3.3	Obtención de la biomasa anaerobia	24
3.4	Diseño de los reactores de digestión anaerobia	24
3.5	Ajuste de concentraciones de biomasa anaerobia y sustrato en el reactor	25

3.6	Toma de muestras para análisis por citometría de flujo y microscopía confocal.	26
3.7	Sistema de conteo de biogas	27
3.8	Análisis de citometría de flujo	27
3.9	Preparación de muestras para microscopía confocal	28
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1	Caracterización de la población de <i>Chlorella Sorokiniana</i> .	29
4.2	Discriminación de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) en relación al estado del cultivo.	31
4.3	Observación de la microalga en contacto con el lodo anaerobio.	32
4.4	Perdida de viabilidad celular en reactores de digestión anaerobia	33
4.5	Producción de biogás	34
4.6	Error inducido por el usuario en el conteo de individuos	35
4.7	Análisis de imágenes por microscopía confocal	37
5	CONCLUSIÓN	39
6	LITERATURA CITADA	40
7	ANEXOS	44
7.1	Anexo 1	44
7.2	Anexo 2	46
7.3	Anexo 3	47

1 RESUMEN.

En el presente trabajo se ha planteado la posibilidad de observar lo que ocurre dentro de un reactor de digestión anaerobia, con microalgas como sustrato para la producción de biogás. Se utilizó herramientas tecnológicas como la citometría de flujo y la microscopía confocal con el fin de pesquisar distintas señales de fluorescencia en la microalga *chlorella sorokiniana*, tanto naturales como inducidas. A través del análisis de las señales fluorescentes de clorofila y calcofluor fue posible diferenciar la microalga y separarla de todo el resto de las bacterias anaerobias para visualizarlas en forma aislada. También se evaluó la utilización la fluorescencia natural de clorofila de la microalga, como herramienta de observación de pérdida de viabilidad celular. Los resultados mostraron una disminución gradual de la intensidad de fluorescencia de clorofila que muestra una pérdida de la viabilidad celular de *Chlorella sorokiniana* en el tiempo, pero que no necesariamente es atribuible al efecto de la degradación de estas por parte de la biomasa anaerobia.

INTRODUCCIÓN

El uso de recursos renovables para la producción de distintos productos de valor económico ha aumentado en la industria mundial ya que cada vez se han desarrollado más tecnologías capaces de obtener estos productos de manera sustentable (REN21 2013). En este contexto, el Núcleo científico BIOREN de la Universidad de la Frontera ha llevado a cabo las investigaciones relacionadas con el aprovechamiento de la biomasa microalgal como recurso renovable para la producción de varios compuestos de valor energético y económico.

Se ha optimizado las condiciones del cultivo de microalgas con el fin de obtener grandes cantidades de biomasa microalgal en poco tiempo. La biomasa que se genera a partir del cultivo de microalgas puede ser concentrada y utilizada con fines productivos. En general, la biomasa ha sido sometida a diversos procesos químicos y biológicos obteniendo productos como bioetanol, biochar, biodiesel, concentrados proteicos, biogás y bio-oil (Vanthoor-Koopmans et al 2013). Algunos de estos productos son biocombustibles, como es el caso del biodiesel y el biogás, lo cual llama el interés de la industria energética.

Se desconoce la eficiencia real de la utilización de microalgas para la producción de biodiesel y biogás, pero se sabe que se requiere mayores avances en la tecnología que permitan solventar altas demandas energéticas relacionadas con el gasto de agua, electricidad y calor en la generación de biocombustibles (Lardon 2009).

La producción de biogás mediante digestión anaerobia directamente a partir de la biomasa microalgal cosechada y concentrada, ha sido tomada por el laboratorio de biogás, de la Universidad de la Frontera como línea de investigación, por ser una propuesta interesante desde el punto de vista energético (Mussnug et al 2010, Collet et al 2011) y también en base a la observación de que productos como el biodiesel requieren mucha energía en su producción lo que no los hace rentables (Ríos et al 2013).

Durante los últimos años, en el laboratorio de biogás, se han puesto en marcha reactores de digestión anaerobia con microalgas como sustrato, ya sea con extracción y sin extracción de lípidos utilizados en la producción de biodiesel. Se ha observado que en estos reactores la producción de biogás ha sido baja a pesar de que se han ajustado condiciones de manejo óptimas al pasar a alimentación continua. La presencia de una pared celular microalgal rígida y difícil de degradar a causa de la presencia de polímeros orgánicos (celulosa), sugiere

dificultades para la degradación celular que es necesaria en el proceso de producción de biogás.

A través de esta investigación ha sido posible la observación *in-situ* del proceso degradativo de la microalga en reactores de digestión anaerobia. Mediante citometría de flujo y microscopía confocal se han establecido métodos de caracterización y cuantificación de la fluorescencia natural de la clorofila presente en la microalga *chlorella sorokiniana*, como bioindicador de viabilidad celular conforme avanza el tiempo dentro de los sistemas de digestión anaerobia. También se ha observado marcadores de pared celular como calco flúor permitiendo visualizar los niveles en que dicha pared celular pierde gradualmente su integridad tras la degradación. Este tipo de observaciones pueden servir para estudiar con mayor detalle la carencia de producción de biogas registrada con anterioridad.

El aspecto fundamental de este trabajo radica en que a través de la citometría de flujo y la microscopía confocal se ha encontrado un método de caracterización de los distintos organismos que interactúan dentro de un sistema complejo en especies microbianas, tal como un reactor de digestión anaerobia. También se plantea la utilización de estas herramientas para permitir cuantificar el número de microalgas que van perdiendo gradualmente su integridad celular por el efecto degradativo de la biomasa anaerobia y discriminar este efecto de la muerte natural de la microalga, por efectos medioambientales.

OBJETIVOS

Objetivo general

_ Observar y caracterizar la degradación de la microalga *Chlorella sorokiniana* puesta en contacto con biomasa anaerobia metanogénica utilizando la citometría de flujo y microscopía confocal como herramientas de análisis en muestras de reactor de digestión anaerobia tipo batch para la producción de biogás.

Objetivos específicos

_ Desarrollar métodos eficaces para la observación en el tiempo de microalgas que están en contacto con biomasa anaerobia por citometría de flujo y microscopía confocal

_ Evaluar pérdida de viabilidad celular de *Chlorella sorokiniana*, en reactores de digestión anaerobia, en base a los datos observados de intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de clorofila, destrucción de la pared celular y producción de biogás.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Principio de la citometría de flujo

Es una herramienta de análisis biofísico y fluorimétrico que permite caracterizar microorganismos presentes en una muestra por tamaño, complejidad e intensidad de señales fluorescentes que puedan estos poseer. Dentro de un citómetro de flujo pueden analizarse distintos organismos microscópicos como bacterias, hongos, microalgas y protozoos. Los parámetros generales que este equipo puede medir son tres:

A) Tamaño celular relativo: Para esto el equipo cuenta con un detector de la dispersión frontal de la luz que incide en la célula analizada denominado Forward Scatter o FSC

B) Complejidad celular relativa: Para esto el equipo cuenta con un detector de la dispersión lateral de la luz incidente en la célula analizada denominado Side Scatter o SSC

C) Intensidad de fluorescencia relativa: Consiste en la utilización de láseres para excitar moléculas que emitan fluorescencia (fluoróforos o cromóforos) que puede ser captada por algunos filtros que posee el equipo. El sistema computacional del equipo captará estas señales y les otorgará un valor de intensidad de fluorescencia determinado en comparación con el resto de la muestra.

Todas las mediciones de este equipo son relativas porque dependerán siempre de los ajustes realizados por el usuario de cada muestra y solo se comparan dentro de la muestra misma. Por lo tanto los microorganismos dependiendo de sus propiedades serán agrupados en distintas regiones dentro de un diagrama de tamaño y complejidad, lo cual permite observarlos de forma seleccionada (poblaciones). También se puede incluir tinciones específicas para lo que se desea observar/comparar y poder visualizar diferencias en el tiempo y entre poblaciones.

Dentro del equipo funcionan simultáneamente tres subsistemas que permiten la interpretación de los parámetros descritos. Estos son en primer lugar, un sistema de fluidos diseñado para transportar la muestra en un flujo laminar. Dentro de este sistema el flujo de la muestra interactúa con un flujo externo dado por un solvente, permitiendo que las células pasen alineadas. A esto se le conoce como enfoque hidrodinámico. En segundo lugar posee un sistema óptico compuesto de láseres que interceptan cada célula que pasa en flujo laminar por

un punto en específico y filtros de absorción de luz de cada laser utilizado. En tercer lugar un sistema electrónico diseñado para dar interpretación a la información óptica y diseñar diagramas de dispersión de la luz transformando los fotones en señales eléctricas.

Las compañías que fabrican estos equipos, como Becton Dickinson TM, utilizan distintas tecnologías para incorporar un numero variable de láseres al sistema. Mientras más láseres posea el sistema mayor capacidad tendrá de detectar fluoroforos en distintas zonas del espectro de luz (similar a microscopía confocal). En el cuadro 1 se da ejemplo de dos láseres y los posibles fluoroforos que se pueden utilizar con ellos.

Lasers	Optical filters	Possible dyes
488 nm (blue)	FL1: 530/0	FITC; GFP; A488
	FL2: 575/25	PE
	FL3: 613/20	PE-TxRed; PI
	FL4: 680/30	PE-Cy5PerCP; 7AAD;
	FL5: 750LP	PE-Cy7
635 nm (red)	FL8: 665/20	APC
	FL9: 750 LP	APC-Cy7

Cuadro 1: Dos láseres, Azul y Rojo, con sus respectivos filtros ópticos y tinciones comerciales disponibles para utilizar.

La versatilidad de esta técnica radica en que el usuario posee el dominio de ajustar todo tipo de parámetros, desde que filtros, láseres o detectores utilizar. También definir el número de conteos, la velocidad del flujo de la muestra y los límites de detección de los conteos, entre otros. De esta manera es posible visualizar todo tipo de tamaños celulares mientras se respete el límite de detección de cada equipo. Además el sistema óptico permite cuantificar distintas señales de fluorescencia, tanto inducidas con tinciones comerciales o naturales como la autofluorescencia de la clorofila en microalgas (Sato et al 2004).

Toda la información adquirida con los parámetros definidos por el usuario es procesada por una computadora, la cual intercala la información en un archivo final con formato .fcs (flow cytometry standard) capaz de ser visualizado en múltiples softwares. Tal archivo al ser procesado por el software muestra los datos adquiridos de los eventos registrados como células en todos los filtros ópticos utilizados y los patrones de dispersión de la luz frontal y lateral. En el software los datos pueden ser ordenados y manifestados en forma de nubes de puntos (dot-plot) o histogramas como se muestra en la Figura 1.

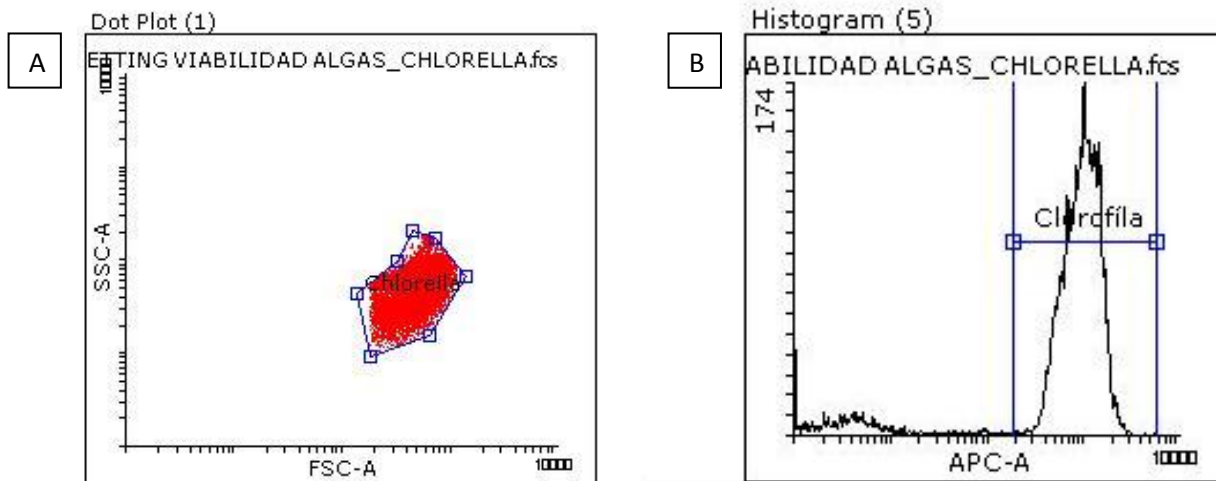


Figura 1: (A) Dot plot de una muestra en relación Tamaño v/s complejidad. (B) Histograma del filtro para clorofila.

2.2 Principio de la microscopía confocal.

La microscopía confocal es una tecnología ampliamente conocida e implementada en múltiples áreas de la investigación y análisis clínico. Mezcla la capacidad de observación de la microscopía óptica común y la detección espectral de los láseres para crear imágenes de alta resolución que son interpretadas por un detector no ocular y finalmente procesadas en un sistema computacional. El microscopio confocal supera en precisión, resolución y variedad de usos al microscopio óptico común o de campo claro. El hecho de que la muestra sea excitada por un láser da la capacidad de que los campos de detección de la muestra sean a longitud de onda definidas y en consecuencia se permita la detección de fluorescencias específicas. Dependiendo del tipo y número de láseres se pueden ver fluoróforos que proyectan fluorescencia en cualquier parte del espectro de luz inclusive en el infrarrojo y ultra violeta. Otra ventaja que posee el uso de láseres es que se puede incidir dentro de la muestra, no solo de forma superficial, simplemente cambiando el ángulo en el cual el láser incide en la muestra. Esto permite la observación tridimensional para captar formas y tamaños específicos de partículas, bacterias u otro tipo de microorganismos e inclusive realizar grabaciones.

2.3 Fluorescencia natural e inducida en microorganismos y células eucariontes.

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia, presente en sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente. Dichas sustancias son generalmente compuestos químicos denominados fluorocromos o fluoroforos. En estos compuestos, ocurre un mecanismo de transmisión de la luz en tres pasos en el cual primero se absorbe la luz, luego se disipa y finalmente se emite una señal luminiscente a una longitud de onda definida. Muchos seres vivos tienen la capacidad de emitir fluorescencias, y esto ha llamado la atención del ser humano por su utilidad en diversos ámbitos investigativos y en salud (Forbes *et al* 2007).

En general se ha logrado aislar y sintetizar fluoroforos que son capaces de adherirse a distintas biomoléculas y por lo tanto inducir fluorescencia. Existen moléculas que se unen a distintas zonas de la célula como son el citoesqueleto (proteína verde fluorescente) o la pared celular en vegetales (calcofluor). Además han sido sintetizados fluoroforos capaces de unirse a anticuerpos celulares específicos permitiendo la identificación de distintos tipos de células en seres humanos. Sin embargo también hay seres vivos que poseen fluoroforos que son parte de la composición de sus células y por lo tanto inducen auto fluorescencia. Los organismos vegetales y fotótrofos en general se caracterizan por poseer este tipo de fluorescencia natural dada por la clorofila de sus cloroplastos. Las microalgas clorofitas son también microorganismos que realizan fotosíntesis y tienen en su composición un tipo especial de clorofila con un espectro de emisión y excitación de la luz definido, a una longitud de onda alrededor de 660 nm.

2.4 Clasificación de las microalgas y su rol en la cadena trófica.

El término "microalga" no posee un orden taxonómico definido, sin embargo en la actualidad se utiliza ampliamente cuando nos referimos a microorganismos eucariontes fotosintéticos que habitan en medios acuáticos y terrestres. Se estima que el número de especies que poseen estas características va desde 1 a 10 millones (Barsanti y Gualtieri 2006) por lo cual existe una enorme diversidad dentro del grupo de seres vivos que denominamos microalgas. También existen organismos que poseen las mismas características pero pertenecen al dominio bacteria ya que son procariontes, se les conoce como cianobacterias u algas verde-

azules y también han sido catalogadas dentro de las microalgas aunque se tiende a diferenciarlas puesto que en algunos cultivos o medios acuáticos son consideradas contaminación debido a que algunas generan toxinas (Liu *et al* 2011). En el cuadro 2 se representan las distintas especies de microalgas y su hábitat.

Cuadro 2 Clasificación de algunas microalgas y cianobacterias

Dominio	División	Nombre Común	Hábitat			
			Marinas	Agua dulce	Terrestre	Simbiótico
Procariontes	Cyanophyta	Algas Verde-Azules	Si	Si	Si	Si
	Prochlorophyta	s.n.	Si	n.d.	n.d.	Si
	Glaucophyta	s.n.	n.d.	Si	Si	Si
	Rhodophyta	Algas Rojas	Si	Si	Si	Si
	Heterokontophyta	Algas Doradas Algas Verde-Amarillas Diatomeas Algas Cafés	Si	Si	Si	Si
Eucariontes	Haptophyta	Coccolitoporidas	Si	Si	Si	Si
	Cryptophyta	Cryptomonas	Si	Si	n.d.	Si
	Chlorara	Chniofita	Si	n.d.	n.d.	Si
	Dinophyta	Dinoflagelados	Si	Si	n.d.	Si
	Euglenophyta	Euglenoides	Si	Si	Si	Si
	Chlorophyta	Algas verdes	Si	Si	Si	Si

Adaptación de Barsanti y Gualtieri 2006.

Dentro de las microalgas existen grandes diferencias en términos morfológicos y anatómicos. Existen especies como *Nannchloropsis* que viven de forma unicelular y no poseen flagelos por lo que no presentan movilidad. En contraste, *Chlamidomonas Sp* vive de forma unicelular y posee movilidad por dos flagelos (Figura 2). En el cuadro 3 se muestran algunas especies y sus características morfológicas.

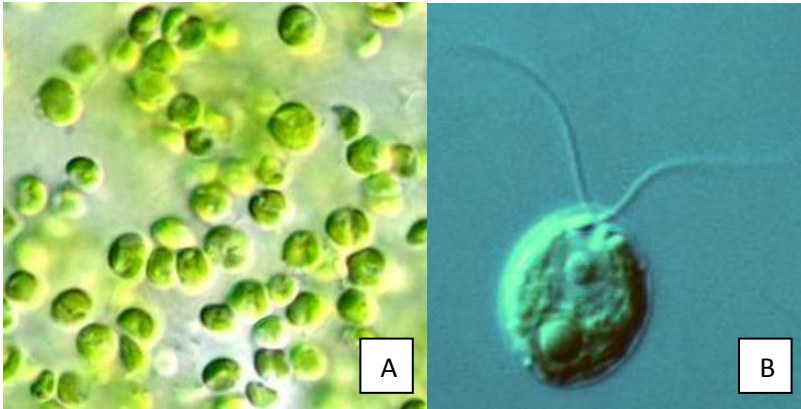


Figura 2: (A) Imagen de *Nannochloropsis Oculata*.(B) Imagen de *Chlamydomona Reinhardtii*

Hay también una variedad de especies que conviven en agregados, estos grupos son indefinidos pues algunos se componen de pocas células (racimos) como *Botryococcus Sp.* Hasta de miles de ellas (*Hydrurus Foetida*). En estas agrupaciones celulares no hay distribución de roles, solo conviven y sobreviven por si mismas (Figura 3).

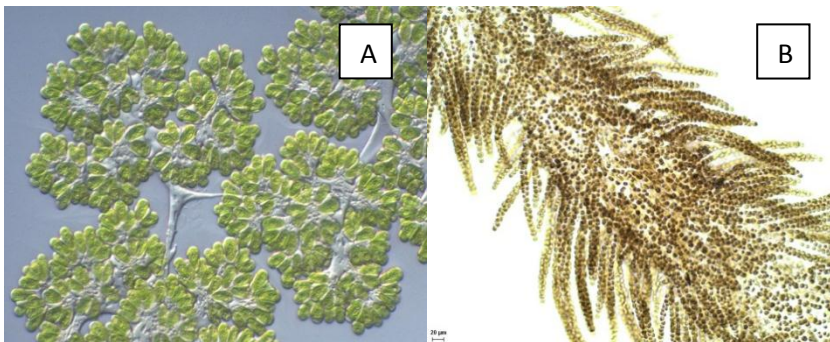


Figura 3: (A) Imagen de *Botryococcus Braunii*. (B) Imagen de *Hydrurus Foetida*.

Los métodos reproductivos de las microalgas, son diversos y varían según la especie. Las microalgas eucariontes se reproducen mayoritariamente por bipartición o clusters, sin embargo pueden reproducirse de manera asexual de diversas maneras como son formación de autosporas, formación de autocolonia y fragmentación (Barsanti y Gualtieri 2006). También pueden reproducirse de forma sexual.

Cuadro 3: Características de las microalgas.

	Unicelular y No móvil	Unicelular móvil	y	Colonial y no móvil	Colonial móvil	y	Filamentosa	Parenquimatosa
Cyanophyta	Synechococcus	n.d.		Anacystis	n.d.		Calothrix	Pleurocapsa
Prochlorophyta	Prochloron	n.d.		n.d.	n.d.		Prochlorothrix	n.d.
Glaucophyta	Glaucocystis	Gloeochaete		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Rhodophyta	Porphyridium	n.d.		Cyanoderma	n.d.		Goniotricum	Palmaria
Heterokontophyta	Navicula	Ochromonas		Chlorobotrys	Synura		Ectocarpus	Fucus
Haptophyta	n.d.	Chrysochromulina		n.d.	Corymbellus		n.d.	n.d.
Cryptophyta	n.d.	Cryptomonas		n.d.	n.d.		Bjornbergiella	n.d.
Dinophyta	Dinococcus	Gonyaulax		Gloeodinium	n.d.		Dinoclonium	n.d.
Euglenophyta	Ascoglena	Euglena		Colacium	n.d.		n.d.	n.d.
Chlorarachniophyta	n.d.	Chlorarachnion		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Chlorophyta	Chlorella	Dunaliella		Pseudosphaerocystis	Volvox		Ulothrix	Ulva

Adaptado de Barsanti y Gualtieri 2006.

Las microalgas son un eslabón fundamental en la cadena trófica puesto que son el alimento de la mayoría de los organismos acuáticos por lo que se les denomina fitoplancton (Barsanti y Gualtieri 2006). Participan activamente en la captura del CO₂ en los mares y regulan la presencia de Nitrógeno y Fosforo en las aguas por lo que son utilizadas como bioindicadores de contaminación (Amengual-Morro *et al* 2012).

Estos microorganismos se han adaptado a una gran cantidad de hábitats, es por esto que algunas algas verdes como chlorella son capaces de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas (Kim *et al* 2013) lo cual será detallado en los siguientes apartados.

2.5 Cultivo de microalgas

Las microalgas son consideradas microorganismos con un valorable potencial de cultivo ya que funcionan como verdaderas " industrias celulares fotosintéticas" que convierten dióxido de carbono en biomasa o una serie de compuestos bioactivos (Wang *et al* 2008). Desde una perspectiva industrial poseen ventajas como su facilidad de cultivo (dependiendo del tipo), mayor eficiencia fotosintética que plantas terrestres, mayores productividades de biomasa, mayores tasas de crecimiento que plantas y mayores tasas de fijación de CO₂ y producción de O₂ (Xu *et al* 2009).

Las microalgas actualmente son cultivadas a nivel industrial en diversas formas, existen cultivos abiertos de microalgas conocidos como Raceways (Figura 4 A). En ellos la biomasa crece dentro de una piscina que se encuentra en contacto con la luz solar directa. Para mantener homogenizado el sistema se genera un flujo de agua con una paleta giratoria.

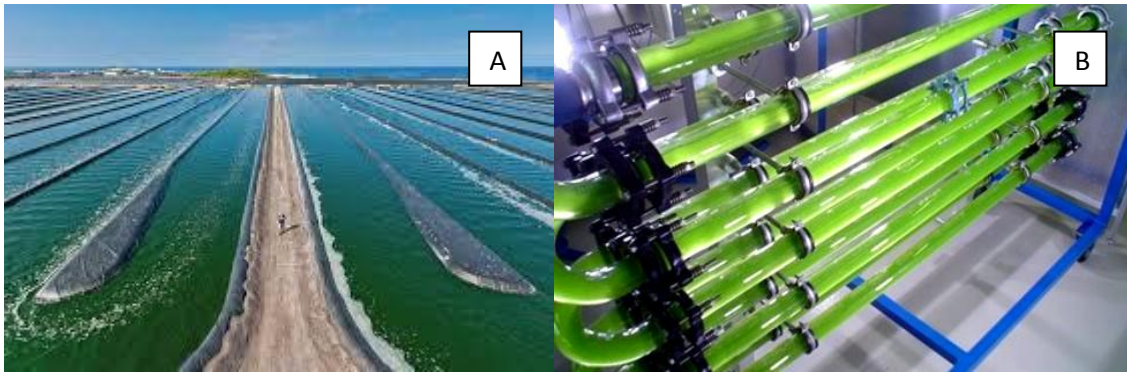


Figura 4: (A) Cultivos de microalgas abiertos (raceways). (B) Cultivos de microalgas cerrados (Fotobiorreactor tubular)

También existen diversos sistemas cerrados para el cultivo de microalgas. Estos son denominados Fotobiorreactores (Figura 4B) los cuales consisten en cámaras cerradas de superficies transparentes, aireadas y ubicadas junto a fuentes de luz artificial o natural (solar). Existe una gran cantidad de tipos de fotobiorreactores como los reactores tubulares o de tipo serpentin y los de tipo inclinado, entre otros (Chisti, 2007). Los sistemas de biorreactores empleados a nivel laboratorio son iluminados externamente por luz artificial con lámparas fluorescentes y diodos emisores de luz (light emitting diodes, LED) entre otros (Figura 5).

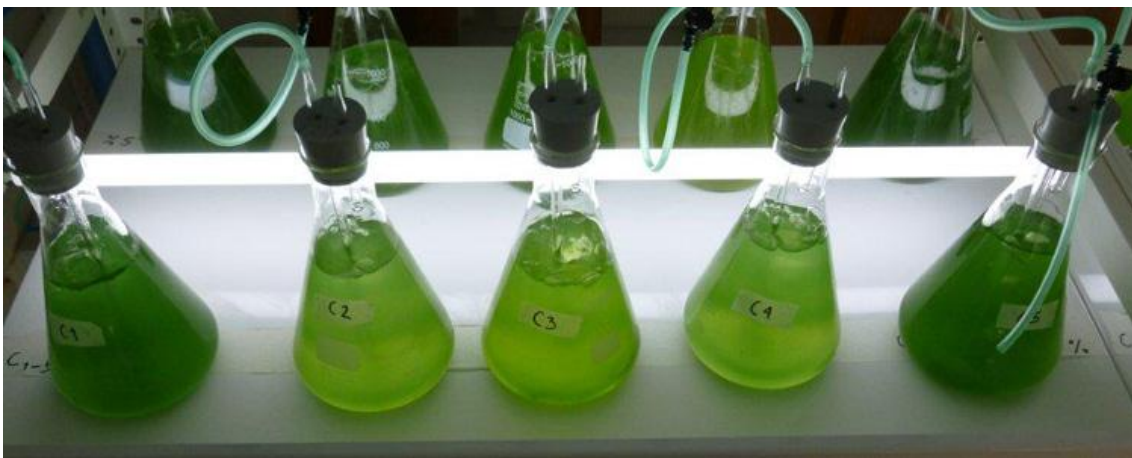


Figura 5: Cultivo común de microalgas a escala de laboratorio

2.6 *Chlorella sorokiniana*: una microalga versátil

Chlorella sorokiniana es una microalga eucarionte chlorofita que vive de forma unicelular en fuentes de agua dulce. No posee movilidad por flagelo y su tamaño celular va desde los 2 a 10 μm . Posee clorofila a como agente captador de luz solar. Es una microalga de crecimiento versátil al poder usar fuente de carbono orgánica e inorgánica. Así se puede realizar cultivos de *Chlorella* autótrofos, con luz exclusiva y mixotrófico, con nutrientes y luz (Subashchandrabose et al 2013). También se ha dado reportes de que crece sin problemas en condiciones heterotróficas por lo cual tiene un especial interés en su uso para el tratamiento de aguas residuales (Hongyang et al 2011).

También *Chlorella sorokiniana* juega un importante rol como alimento de animales ya que han sido consideradas como una fuente rica de carbohidratos, proteínas y vitaminas. Su alto contenido proteico las hace adecuadas como materia prima para la producción de concentrados proteicos (Mahasneh, 1997), mientras que sus altos contenidos vitamínicos las hacen adecuadas para alimentación de sistemas de acuicultura (Gapasin et al., 1998). También ha sido utilizada para la producción de compuestos de valor agregado como antioxidantes (luteína, α/β caroteno, α/β tocoferol, zeaxantina) (Matsukawa et al., 2000).

Finalmente sumado a su gran potencial alimenticio se encuentra toda la gama de usos que se le están dando en el ámbito de la bioenergía (Mussnug et al 2010). Se ha expandido su utilización como biomasa en producción de biodiesel, biogas y otros biocombustibles. Hoy existen en Europa varias plantas industriales que se dedican al cultivo en masa de microalga con estos fines. Además bajo ciertas condiciones *C. sorokiniana* es conocida por producir biohidrógeno, una fuente de energía (Chader et al., 2009).

2.7 Biogas

El compuesto denominado biogas corresponde a una mezcla gaseosa común en la naturaleza compuesta por metano, dióxido de carbono y algunas trazas de otros gases. Su formación ocurre naturalmente cuando la materia orgánica (biomasa) se descompone en una atmósfera húmeda en ausencia de oxígeno, en presencia de un grupo de microorganismos naturales que son metabólicamente activos a estas condiciones (biomasa anaerobia o lodo anaerobio) (MINENERGIA 2011). En la naturaleza el metano se forma como gas de pantano,

en el tracto digestivo de rumiantes, en plantas por compostaje húmedo y en campos de arroz inundado, etc. El biogás posee propiedades y composición que dependen del origen del sustrato y están representadas en el cuadro 1. Este compuesto es inflamable cuando posee una composición de metano superior al 45% (Deublein y Steinhauser 2008).

Cuadro 1 Composición y propiedades del biogas.

Composición	55-70% metano 30-45% dióxido de carbono 0.01-25% nitrógeno Trazas: H²S, NH³, mercaptanos
Contenido energético	6-6.5 kWh m ⁻³
Equivalente de combustible	0.6-0.65L de combustible/m ³ biogas.
Temperatura de ignición	650- 750°C
Olor	Huevo podrido (sulfuros)
Presión crítica	75 - 89 Bar

Adaptado de Deublein y Steinhauser 2008.

El biogás es de interés industrial, porque puede producirse con desechos orgánicos y ser utilizado como fuente de energía calórica o para producir energía eléctrica (Mambeli 2014). También puede ser usado en reemplazo del gas natural como combustible doméstico previa purificación del metano (Tabatabaei *et al* 2010).

2.8 Digestión anaerobia

Se le llama digestión anaerobia al proceso a través del cual se produce el biogás. Este proceso puede ocurrir naturalmente, o puede realizarse artificialmente dentro de un reactor de digestión anaerobia. Se lleva a cabo por bacterias y archeas que crecen en condiciones anóxicas y van degradando sucesivamente la materia orgánica hasta transformarla en biogás (Deublein y Steinhauser 2008).

El proceso comienza con la hidrólisis bacteriana de los sustratos. Los polímeros orgánicos insolubles, tales como hidratos de carbono, lípidos y proteínas se descomponen a los derivados solubles que se vuelven disponibles para otras bacterias. A continuación, las bacterias acidogénicas convierten los azúcares y aminoácidos en dióxido de carbono, hidrógeno, amoníaco, y ácidos grasos orgánicos (AGV). Las bacterias acetogénicas

convierten estos ácidos orgánicos resultantes en ácido acético, junto con amoniaco adicional, hidrógeno, y dióxido de carbono. Estos subproductos son utilizados por un último grupo de microorganismos denominados metanogénicos. Los microorganismos metanogénicos son encargados de producir el metano y CO₂ a través de dos rutas diferentes (Demirel y scherer 2008). Un grupo de metanogénicas transforma directamente moléculas de H₂ en metano mientras que el otro grupo utiliza el ácido acético como sustrato para la producción de metano (Figura 6).

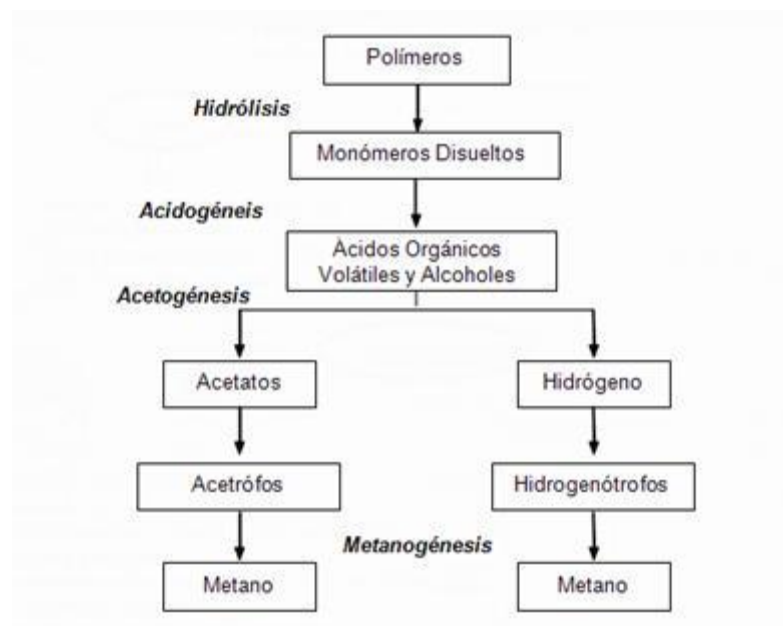


Figura 6: Esquema del proceso de metanogénesis en las dos rutas, acetotrófica y hidrogenotrófica.

La eficiencia de la digestión anaerobia dependerá en primera instancia de la composición del sustrato. Si este posee un alto porcentaje de proteínas y carbohidratos complejos, como es el caso de las microalgas, la metanogénesis se verá dificultada por la hidrólisis de estos compuestos, por lo cual deberá aumentar el número de bacterias hidrolíticas previamente a que las siguientes etapas del proceso puedan ser efectivas (Jeihanipour *et al* 2011). En el caso de que el sustrato posea una gran cantidad de ácidos orgánicos, la metanogénesis se llevará a cabo con mayor facilidad (Henze 2008).

2.9 Microorganismos en la digestión anaerobia

Se ha reconocido la participación de al menos cuatro consorcios de microorganismos en el proceso de DA. Cada uno sucede al otro descomponiendo gradualmente la materia orgánica a través de distintos procesos metabólicos (Narihiro y Sekiguchi 2007). En este apartado se dará detalle de los procesos involucrados por cada consorcio.

2.9.1 Bacterias hidrolíticas

Son bacterias anaeróbicas facultativas que solubilizan extracelularmente las moléculas de los polímeros orgánicos (proteínas, carbohidratos y lípidos) formando azúcares, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos. Especies de este grupo son *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Bacteroides*. Estas bacterias utilizan enzimas hidrolíticas extracelulares como celulasas, proteasas y lipasas para la degradación. La hidrólisis de los carbohidratos está mediada por la glucólisis de ebden-meyerov mientras que la hidrólisis de proteínas ocurre por enzimas proteolíticas que forman péptidos y aminoácidos. La fermentación de estos compuestos produce dióxido de carbono y amoniaco, junto con ácidos orgánicos que dependerán de los aminoácidos fermentados (Chen *et al* 2008).

2.9.2 Bacterias Acidogénicas

Son bacterias anaerobias facultativas y estrictas que producen el proceso fermentativo intracelular de los productos de la actividad hidrolítica, transformándolos en ácidos grasos de cadena corta, conocidos como ácidos grasos volátiles (AGV), siendo los más comunes el ácido acético, ácido propionico y ácido butírico. También hay producción de hidrogeno y dióxido de carbono y la misma actividad bacteriana produce sulfuros y compuestos aromáticos (Mejía 1996).

2.9.3 Bacterias Acetogénicas

Estas bacterias anaerobias (*Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*) utilizan la ruta de la Acetil CoA para producir acetato a partir de hidrogeno y dióxido de carbono (Mejía 1996). También transforman los AGVs en acetato necesario para el metabolismo de las bacterias metanogénicas. De hecho hay una estrecha relación simbiótica entre estas bacterias porque las últimas ayudan a disminuir la presión parcial de hidrogeno requerido por las bacterias acetogénicas.

2.9.4 Bacterias Metanogénicas

Se componen de especies de bacterias y arqueas muy sensibles a la presencia de O₂ y a las variaciones de PH. No pueden utilizar sustratos complejos y su producto final es siempre metano (Mejía 1996). Crecen lentamente con tiempos de generación sobre 3 días a 35°C. También son inhibidas por AGVs no ionizados y se han dividido en dos subgrupos en base a su metabolismo los cuales son:

A) bacterias metanogénicas hidrogenotróficas: Utilizan como sustrato hidrogeno molecular para la producción de metano (Methanobacterium, Methanospirillum).

B) Bacterias metanogénicas acetotróficas o acetoclasticas: Utilizan acetato como sustrato para la producción de metano (Methanosarcina, Methanosaeta).

2.9.5 Bacterias Sulfurorreductoras

Son bacterias anaerobias obligadas (*Desulfovibrio*) metabólicamente versátiles, provenientes de varias familias y diferentes géneros. Utilizan sulfato u otros compuestos oxidados de azufre como aceptor final de electrones. Compiten con las metanogenicas por sus sustratos lo que causa menor rendimiento en CH₄ y producción de H₂S.

2.10 Optimización de la digestión anaerobia en reactores

Si bien el proceso de digestión anaerobia ocurre en la naturaleza, para llevarlo a cabo en sistemas artificiales (reactores) se requiere diseñar condiciones de manejo adecuadas en la preparación de estos y durante su tiempo de funcionamiento, para permitir que la biomasa anaerobia mantenga su habilidad de producir biogás y no sufra daños por acumulación de ciertos compuestos inhibitorios. También se debe ajustar las concentraciones adecuadas de sustrato y lodo en relación al volumen y tipo de reactor con el que se desea trabajar, pues de esta manera se tiene seguridad de que el reactor tiene todo lo necesario para realizar la DA.

Para que la biomasa anaerobia tenga actividad es necesario eliminar todo el oxígeno disuelto de la atmosfera por lo que se reemplaza todo el aire por una mezcla compuesta de Nitrógeno y CO₂ al comienzo de la operación.

2.10.1 Montaje del reactor.

En términos generales llamamos lodo anaerobio a toda la biomasa anaerobia que será capaz de producir biogás. Comúnmente el lodo anaerobio puede ser rescatado de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales, o de reactores anaerobios industriales ya construidos (Cheremisinoff 2002).

Para el diseño de un reactor anaerobio es necesario conocer el contenido de materia orgánica total del sustrato y la biomasa anaerobia.

La materia orgánica disponible en un sistema se puede medir como gramos de O₂ necesarios para oxidar compuestos orgánicos y se conoce como Demanda Química de oxígeno (DQO) (APHA 1998). Su principio se basa en que casi todos los compuestos orgánicos pueden ser completamente oxidados a CO₂ bajo el efecto de un fuerte agente oxidante en condiciones acidas. La cantidad de oxígeno que se requiere para esta oxidación es la demanda química de oxígeno y puede cuantificarse por colorimetría con dicromato de potasio.

Por otro lado se puede conocer la cantidad de materia orgánica de una muestra al incinerarla, ya que todo compuesto orgánico se puede transformar en CO₂ al ser combustionado, quedando solo un residuo de materia inorgánica tras la combustión. Por lo tanto del total del peso seco de una muestra (sólidos totales) se puede extraer el peso combustionable a 550°C (sólidos volátiles) al sustraer el peso de la materia no combustionable (Sólidos fijos). Los sólidos volátiles representarán la materia orgánica disponible.

2.10.2 Relación del sustrato y volumen del reactor.

Otro factor de importancia para favorecer la metanogénesis es elegir la cantidad adecuada de sustrato con que se desea alimentar. Para esto se necesita conocer además de la DQO de la muestra, el volumen que va a tener el reactor. Con estos datos se puede saber qué régimen de alimentación tendrá un reactor de forma continua o con solo una inyección (batch).

Los regímenes de alimentación se conocen como velocidad de carga orgánica (VCO) y se representan como gramos de DQO que se inyectan por litro de lodo en un día (VCO = gDQO/L/d). Esto representa el régimen estándar con que se definirá la administración del sustrato al reactor y variará dependiendo de cuán óptima esté la producción de metano en el sistema.

2.11 Digestión anaerobia de microalgas

La digestión anaerobia de microalgas ha sido un proceso que gradualmente ha ido ganando mayor popularidad. Los trabajos que se realizaon antiguamente con microalgas como sustrato de digestión anaerobia, mostraron producciones bajas de biogas (Nair et al 1983). Sin embargo en la actualidad se ha planteado como un paso necesario para que la producción de otros biocombustibles como el biodiesel sea rentable (Sialve et al 2009), lo cual atrae el interés científico.

Existen factores que afectan la digestión anaerobia de las microalgas y que pueden considerarse limitantes del proceso, ya que pueden provocar inhibición de la actividad metanogenica de la biomasa anaerobia. En términos generales la composición celular de la microalga y los medios en los que sobrevive pueden estar afectando la actividad de la biomasa anaerobia.

2.11.1 Factores que afectan la digestión anaerobia de la microalgas:

A) Degradabilidad de la pared celular:

La pared celular microalgal posee polímeros de difícil degradación por parte de la biomasa anaerobia, se han observado residuos indigeribles en pruebas de digestión anaerobia con bajo rendimiento en la producción de metano (Jeihanipour et al 2011). Sin embargo, como se explicaba anteriormente, la pared celular no es igual en todas las microalgas eucariontes, algunas microalgas poseen matrices extracelulares sin pared celular mientras que otras especies poseen inclusive matrices poliméricas fuera de la pared celular las cuales las agrupan en racimos (Blumreisinger et al 1983).

B) Inhibición por presencia de amoniaco:

La degradación de las proteínas genera amoniaco libre que puede acumularse y generar residuos. Esta acumulación podrá causar distintas variaciones en el sistema que están asociadas a inhibición de la actividad metanogenica (Fernandes et al 2012). Pueden ocurrir cambios en el pH intracelular, aumento de los requerimientos de energía de mantenimiento e inhibición de reacciones específicas enzimáticas.

C) Inhibición por salinidad

Si se utilizan microalgas que provienen de aguas saladas o del mar es probable que se enfrente esta situación. Los niveles elevados de salinidad causan deshidratación en las bacterias debido al aumento en la presión osmótica (Yerkes et al 1997). La deshidratación se da por cationes libres que usualmente están presentes en el proceso de digestión anaerobia como sodio, potasio, calcio y magnesio.

Para llevar a cabo la digestión anaerobia de microalgas es necesario ajustar algunas condiciones que impidan la inhibición de la biomasa anaerobia, sin embargo aunque esto se cumpla, como se explicó anteriormente, el paso limitante de este proceso es la hidrólisis de los compuestos poliméricos presentes en las microalgas (Pared celular) por esto se considera necesario llevar a cabo procesos de pretratamiento de la microalga con el fin de lograr una elevada producción de metano. Algunos pretratamientos son uso de enzimas, destrucción mecánica o tratamientos térmicos (Hyouun Kim et al 2013) etc.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo, se realizó un cultivo de *Chlorella sorokiniana* el cual fue deshidratado y posteriormente puesto en contacto con biomasa anaerobia metanogénica dentro de botellas de vidrio que funcionaron como reactores de digestión anaerobia. Se tomó periódicamente muestras de aquellos reactores las cuales fueron medidas por citometría de flujo y microscopía confocal y se analizó las diferencias en relación a patrones de intensidad de fluorescencia de clorofila y fluorescencia de calcofluor.

3.1 Cultivo de *Chlorella Sorokiniana*

Para el cultivo de la microalga se utilizaron foto-biorreactores pequeños diseñados en matraces Erlenmeyer de 1L (Figura 7A), se les suministró oxigenación a través de una bomba de aire que sirve además como fuente de turbulencia al medio para la homogenización. Los cultivos fueron dispuestos en un cuarto especial a temperatura constante de 22°C y se suministró luz artificial constante con tubos LED (Figura 7B).

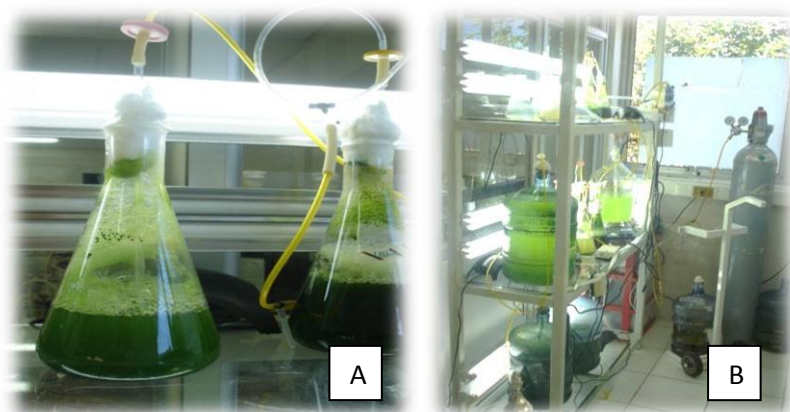


Figura 7: (A) Un ejemplar de cultivo de microalgas en matraz Erlenmeyer de 1lt. (B) Imagen del cuarto de cultivo de microalgas.

Para optimizar el crecimiento de microalgas se utilizó régimen de cultivo mixotrófico. Los matraces fueron llenados con medio de cultivo M8A para crecimiento de microalgas (Anexo 1), fueron sellados con tapones de algodón y luego dispuestos para esterilización por autoclave a 121°C. Los inóculos de microalga se obtuvieron de las sepa guardadas del laboratorio de biogás provenientes de la Universidad de Huelva - España.

Una vez estériles, los matraces fueron inoculados con sepa microalgal, conectados y dejados en reposo por un tiempo superior a 14 días.

3.2 Preparación de la microalga cultivada para la digestión anaerobia.

Tras alcanzar una alta concentración de microalgas en el medio de cultivo, los matraces fueron retirados del régimen de cultivo y fueron deshidratados mediante la técnica de centrifugación. Los cultivos fueron abiertos de forma estéril y luego dispuestos en tubos falcon estériles para centrifugación durante 5 min. a 7000 RPM sucesivamente. Se descartó el sobrenadante quedando una pasta concentrada de microalgas al fondo del tubo falcon.

El concentrado de microalgas fue resuspendido en 40 ml de agua destilada estéril para homogeneización y se tomaron alícuotas para posteriormente medir contenido de materia orgánica (DQO). Con los valores de DQO conocidos se inocularon los reactores el mismo día de la concentración para evitar la degradación del cultivo.

3.3 Obtención de la biomasa anaerobia

Como biomasa anaerobia metanogénica para el trabajo se utilizó un lodo anaerobio granular de alta actividad metanogénica obtenido de un reactor anaerobio industrial tipo UASB que se encuentra dentro de la planta de RILES de la industria Compañía de Cervecerías Unidas S.A. (CCU), Camino a Lautaro, Chile. Debido a que la microalga es un sustrato complejo de hidrolizar, fue necesario realizar un proceso de aclimatación al sustrato, por parte del lodo anaerobio. La biomasa anaerobia fue alimentada durante un extenso periodo con una mezcla de Almidón (40%), Peptona (40%) y Vino (20%). Aportando de esta manera una gran cantidad de carbohidratos y proteínas que son gran parte de la composición microalgal. Esta biomasa fue mantenida en tales condiciones durante gran parte del año 2013 y fue puesta en contacto con la microalga tras medir cantidad de sólidos volátiles (SV, Anexo 2) y ajustarlos a 3 g/L dentro de los reactores .

3.4 Diseño de los reactores de digestión anaerobia

Para los ensayos de digestión anaerobia, el diseño experimental se trató de botellas de vidrio inoculadas algunas solo con microalga y otras con microalga y biomasa anaerobia (lodo). Las botellas con inóculo fueron puestas en un baño térmico constante a 35°C y luego conectadas a un equipo de medición de biogás. Para favorecer el proceso de digestión anaerobia se reemplazó completamente el aire dentro de las botellas por una atmósfera de Nitrógeno y CO₂.

En la figura 8 se representa un ensayo con tres botellas (reactores) que contenían lodo anaerobio y microalgas (repeticiones) y una de ellas solo tenía microalgas (control).

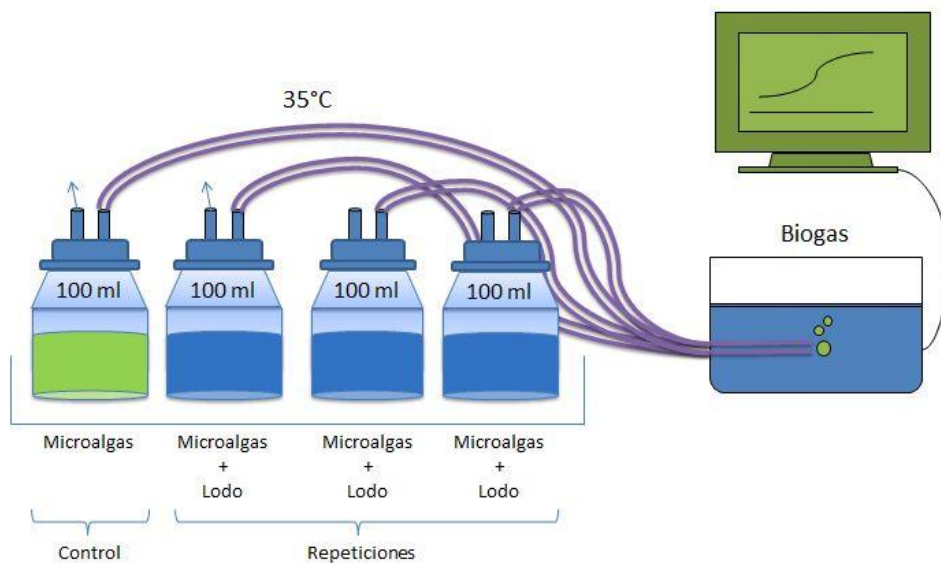


Figura 8: Esquema del experimento: Los pequeños reactores guían la producción de gas hasta una batea que cuenta el aire dentro del agua por burbujeo y se registra en el computador. Sistema Bioprocess Control™. Las flechas indican lugar de toma de muestras para citometría.

Para la elaboración de los reactores de digestión anaerobia se utilizó botellas schott con tapones de goma modificados de dos orificios, uno con salida para flujo de biogás y otro para extracción de muestras para citometría. El biogás de salida fue guiado con mangueras Tygon™ hacia el sistema de medición de biogás Bioprocess Control™ (Figura 8). Para la toma de muestras para citometría de flujo y microscopía confocal se utilizó mangueras flexibles que se conectaban a jeringas esteriles tomando 1 ml de la mezcla homogenizada.

3.5 Ajuste de concentraciones de biomasa anaerobia y sustrato en el reactor

Las concentraciones puestas de la biomasa anaerobia (lodo) y la biomasa microalgal dentro de los reactores fueron de 3 gramos por litro de solidos volátiles de biomasa anaerobia por 3 gramos por litro de DQO de microalga concentrada. Para definir la concentración de lodo anaerobio se utilizó el protocolo estándar de análisis de solidos volátiles (Anexo 2).

Para definir la concentración de DQO de la biomasa microalgal se utilizó el protocolo estándar (Anexo 3) en equipo de espectrofotometría HACH™.

En base a los análisis realizados, se estableció las concentraciones correspondientes de biomasa anaerobia y sustrato para cada reactor. Las botellas, mangueras y puntas de micropipeta fueron autoclavadas y llevadas a campana de flujo laminar para la preparación de los reactores. Se introdujeron 3 g/L SV de biomasa anaerobia en agitación, luego 3 g/L DQO de microalga concentrada y se completó al volumen necesario para cada ensayo con agua destilada estéril. En el caso de la muestra "control" solo se incluyó microalga. Se taparon las botellas y se administró Gas Nitrogeno - Dioxido de carbono por dos minutos a cada botella. Posteriormente se instalaron las mangueras en los frascos y en el equipo Bioprocess Control y se dió inicio al ensayo.

3.6 Toma de muestras para análisis por citometría de flujo y microscopía confocal.

El equipo de citometría de flujo, FACS CANTO II de Beckton Dickinson™ fue utilizado para este trabajo. Este equipo es capaz de procesar tamaños de partícula inferiores a 50 μm , por lo cual, la muestra fue filtrada.

Se tomó por medio de jeringas un volumen de 1 ml de la mezcla dentro del reactor homogenizada. Este volumen se dispuso en un tubo eppendorff el cual fue llevado a centrifugación a 3000 RPM por 30 segundos. Se realizó filtración de la muestra con filtro Merck Millipore de 41 μm instalado entre una aguja y la punta de la jeringa (Figura 9). La muestra filtrada fue puesta dentro de un tubo especial para citometría de flujo. De esta manera, se impidió que cualquier partícula superior a 41 μm estuviera presente dentro de aquella muestra.



Figura 9: Imagen que muestra cómo se disponen los filtros en la jeringa de 1 ml.

3.7 Sistema de conteo de biogas

El biogas producido por los reactores fue medido por el sistema automatizado Bioprocess Control™ (Figura 10) el cual consiste en una batea con agua conectada a un sistema computacional. Con mangueras para gases (Tygon™) el biogas debe difundir desde los reactores hasta el mecanismo interno de la batea con agua donde se ubican asas que acumulan el biogas y lo liberan en cierto volumen dando un registro de producción que puede verse en la pantalla del computador



Figura 10: Sistema de medición de biogas Bioprocess control.

3.8 Análisis de citometría de flujo

Para visualizar el estado de la microalga en las muestras analizadas, previamente se reconoció la presencia de *chloerlla sorokiniana* en la nube de puntos de un diagrama de tamaño celular v/s complejidad celular. Tras haber conocido la población correcta de microalgas se utilizó como método de observación definir 10000 eventos de conteo dentro de la población seleccionada de microalgas, sin importar cuantos eventos se contaran fuera de esta selección. Se cuantificó clorofila utilizando el filtro APC de Becton Dickinson que mide emisiones de longitud de onda entre 650 y 660 nm y se realizaron histogramas de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de este parámetro en las distintas muestras analizadas.

3.9 Preparación de muestras para microscopía confocal.

Para la visualización de la microalga dentro de los reactores se tomó alícuotas de la mezcla homogeneizada y se dispusieron en portaobjetos de vidrio. Se utilizó tinción de calcofluor para marcación de pared celular y se dejó incubar por 20 minutos. Las muestras se observaron en oscuridad con microscopio confocal OLYMPUS en dos canales de longitud de onda específica: 488 nm para calcofluor y 633 nm para clorofila presente.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la población de *Chlorella Sorokiniana*

La cepa de *Chlorella sorokiniana* creció sin problemas en las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. El cultivo al final del proceso poseía coloración verde pasto intenso con manchas en las paredes del matraz producto del biofilm formado por la microalga. En los distintos ensayos realizados la concentración de microalgas en base seca fue de entre 6,2 g/L y 6,6 g/L. Al visualizarlas por el microscopio óptico común se veía una población de células en buenas condiciones sin contaminación por bacterias.

La microscopía confocal del cultivo de microalgas arrojó células integra con vasta fluorescencia de clorofila en los cloroplastos, como puede observarse en la figura 11. La alta fluorescencia de clorofila nos indica que las células de *c. Sorokiniana* poseen buena actividad fotosintética. Sin embargo también se puede observar que dentro del cultivo aparecen pequeñas bacterias las que en primera instancia sugieren contaminación del cultivo.

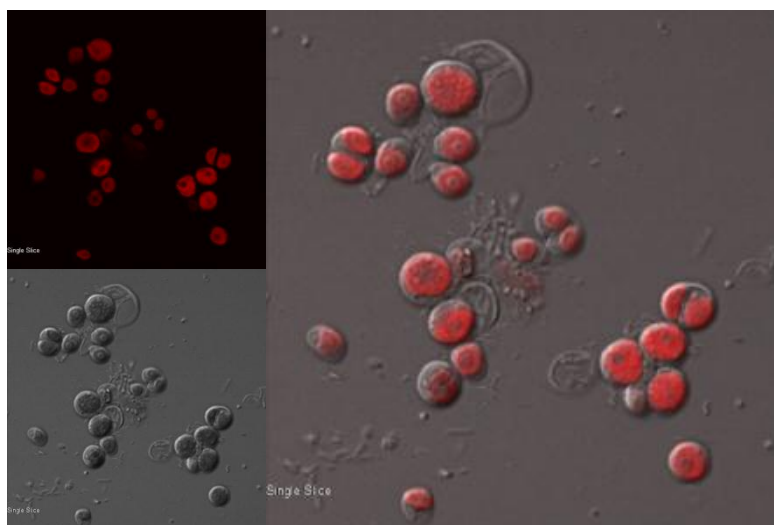


Figura 11: Imagen de cultivo de *Chlorella sorokiniana* usando filtro de clorofila Alexa fluor 633nm.

Cuando sometemos la muestra del cultivo diluida diez veces a un citometro de flujo, se puede captar inmediatamente la ubicación de la microalga en un diagrama de tamaño/complejidad (FSC/SSC). Se aprecia que poseen un tamaño y complejidad alto dentro de la nube de puntos que para estos sistemas se interpreta como células eucariontes (Figura 12). Además queda nuevamente de manifiesto una población bacteriana ubicada en la parte inferior debido a que su tamaño y complejidad relativas son mucho menores. Según la literatura (Watanabe et al 2005) el hecho de que esta contaminación bacteriana esté presente no representa ningún problema y es del todo natural. *Chlorella Sorokiniana* crece simbióticamente en medios mixotróficos con un consorcio bacteriano que aporta metabolitos secundarios (vitaminas) que estimulan su crecimiento.

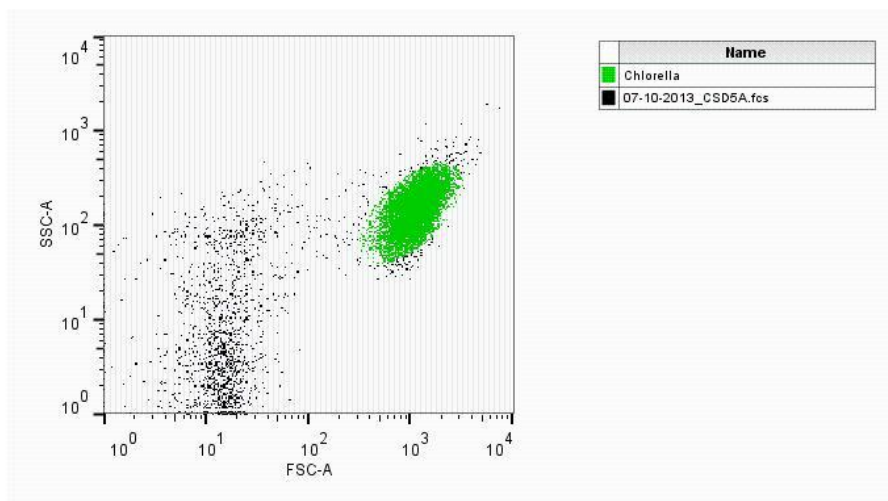


Figura 12: Diagrama de dispersión de cultivo de chlorella sorokiniana. En verde población seleccionada de microalga. En negro biomasa bacteriana que acompaña a la microalga.

Por otro lado, cuando utilizamos el filtro para clorofila, denominado por Beckton Dickinson APC (660 nm) en un diagrama de dispersión v/s complejidad celular (SSC), podemos detectar como se agrupa la población en relación su intensidad de fluorescencia media (Figura 13). Si por otro lado observamos la distribución de esta fluorescencia en un histograma podemos ver que todos los eventos seleccionados como "chlorella +", Es decir en buenas condiciones y que corresponden al 80% de la población de chlorella, poseen valores cercanos a 4000 en escala relativa logarítmica indicando una alta fluorescencia relativa.

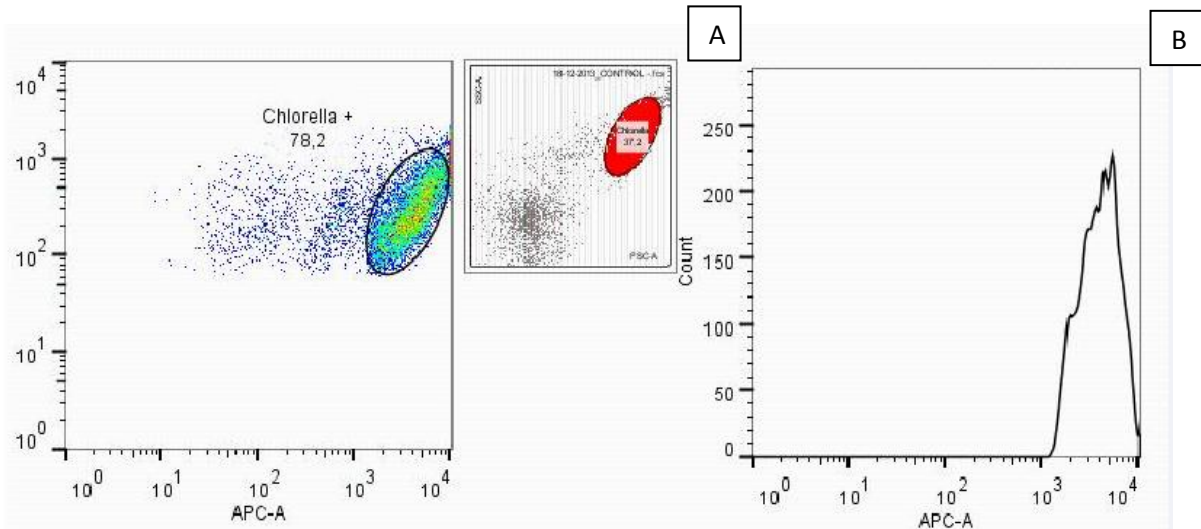


Figura 13: (A) Distribución del filtro APC dentro de la población seleccionada de *chlorella sorokiniana* en muestra de cultivo fresco (indicadas en el diagrama original en rojo). (B) Histograma del filtro APC.

4.2 Discriminación de la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) en relación al estado del cultivo.

Para dar fe de que la metodología usada es certera para la caracterización de viabilidad celular, se realizó una prueba de superposición de dos poblaciones medidas el mismo día pero que presentaban distintas condiciones. Una de ellas es una muestra sometida a un ambiente anoxico a 35°C durante diez días (Rojo) y la otra es una muestra del cultivo que permaneció refrigerada esteril durante el mismo tiempo (Verde) tras la concentración del cultivo (Figura 14).

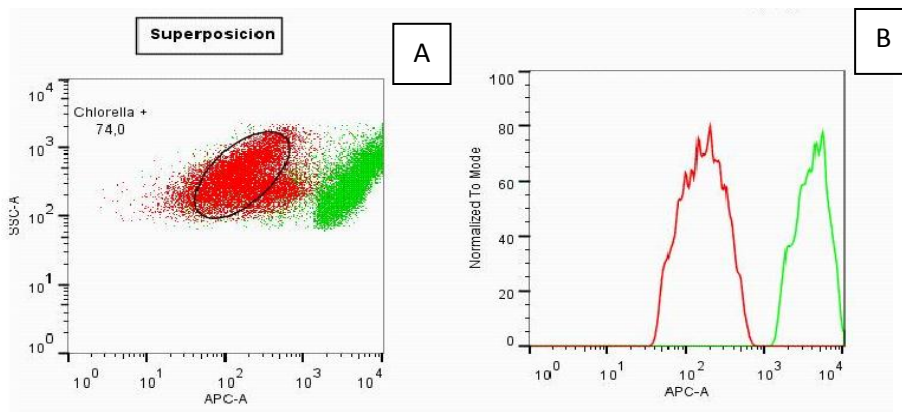


Figura 14: (A) Diagramas de dispersión de complejidad celular v/s Fluorescencia de clorofila (SSC/APC) superpuestos, de dos muestras que se encuentran en distintas condiciones. Rojo: Microalga en régimen anaerobio. Verde: Microalga conservada en refrigeración. (B) histogramas superpuestos de dichas muestras.

Se da evidencia de que hay una pérdida de IFR inducida por las condiciones ambientales en la muestra en rojo. Esta muestra estuvo a 35°C en oscuridad sin oxígeno durante diez días.

4.3 Observación de la microalga en contacto con el lodo anaerobio.

Como se explicó anteriormente, se diseñó un método para visualizar microalgas en contacto con la biomasa anaerobia sin obstruir el capilar del citometro vía centrifugación y posterior filtración. Los diagramas captados tras utilizar este método muestran que es efectivo en su objetivo ya que no se tapó el capilar y se pudo visualizar chlorella sorokiniana sin problemas en una muestra altamente concentrada al tener la presencia de microalgas y microorganismos anaerobios (Figura 15), tambien se muestra que la población seleccionada de microalgas puede ser diferenciada de las bacterias principalmente a través del filtro APC.

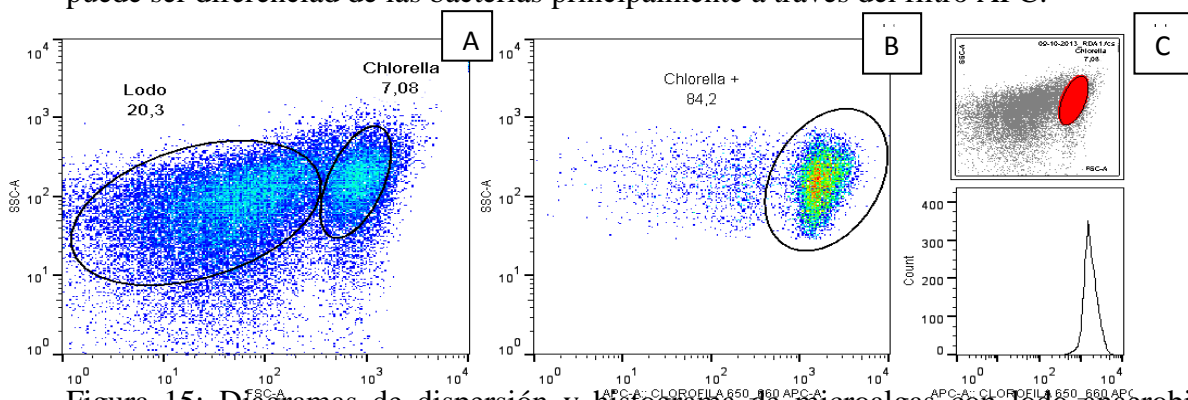


Figura 15: Diagramas de dispersión y histograma de microalgas con lodo anaerobio. (A) Diagrama FSC/SSC de la muestra total. (B) Diagrama de dispersión de la población seleccionada de Chlorella sorokiniana (en rojo) con SSC/APC. (C) histograma del filtro APC.

4.4 Pérdida de viabilidad celular de *Chlorella sorokiniana* en reactores de digestión anaerobia

Se realizó un ensayo de observación de la pérdida de intensidad de fluorescencia relativa de clorofila en el tiempo, como índice de pérdida de viabilidad celular. Aquí se comparó el efecto de la biomasa anaerobia en la pérdida de IFR con el efecto del stress medioambiental en condiciones anaerobias. Una botella solo poseía un inculo de microalga concentrada y se le denominó "control". Otras tres botellas tenían un inculo de microalga y biomasa anaerobia y se les denominó "reactor 1, 2 y 3" respectivamente. Se tomaron muestras sucesivas del control y los reactores con lo que se pudo elaborar una curva de pérdida de IFR de clorofila. En la figura 16 se superpusieron varios histogramas de IFR de clorofila de muestras tomadas consecutivamente. Se muestra datos representativos del control y de los reactores.

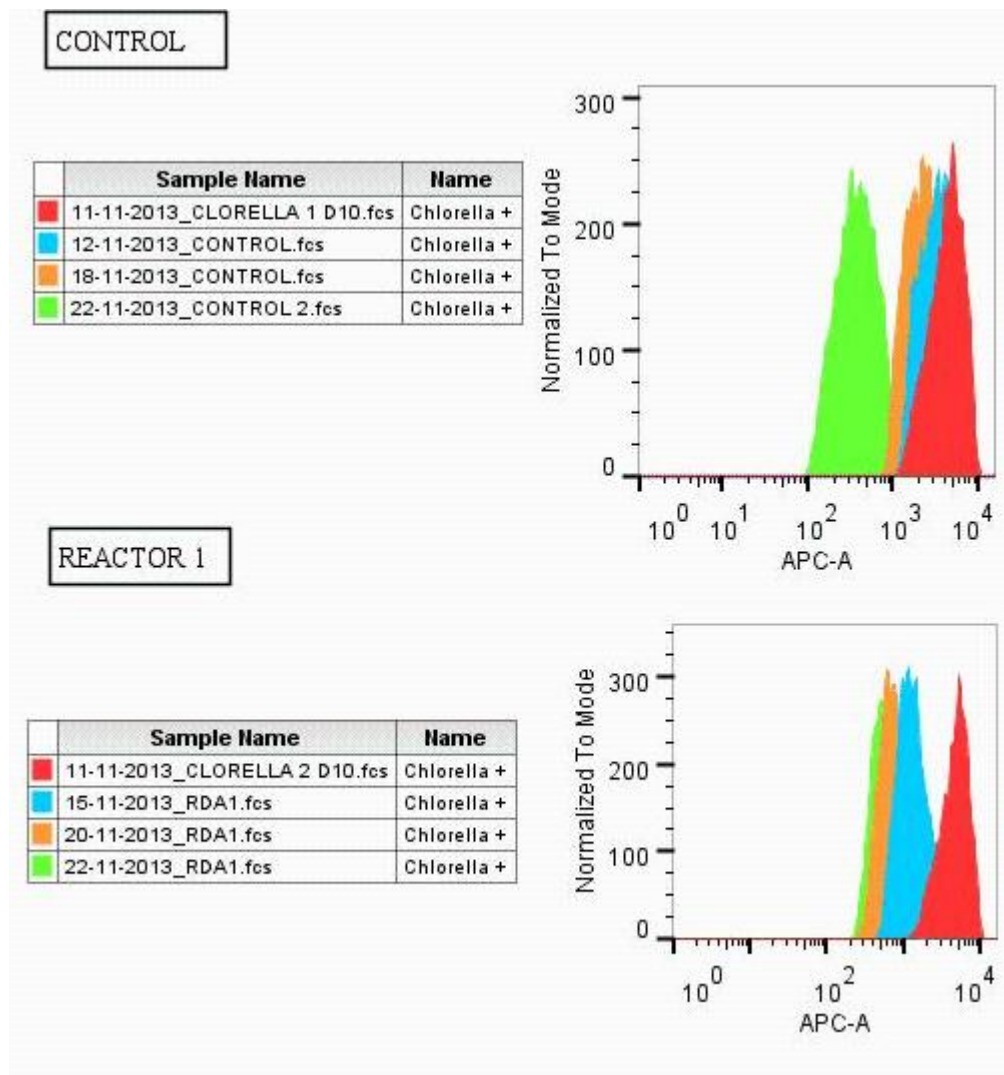
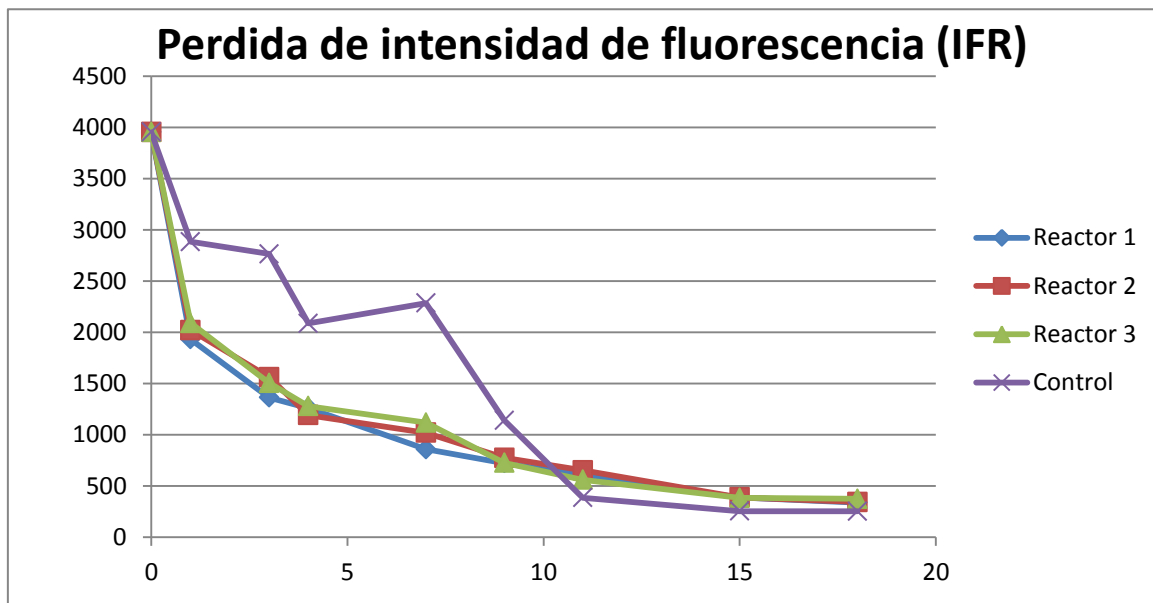


Figura 16: Histogramas de las muestras "control" y "reactor" de días sucesivos superpuestos.

Cuando tomamos los valores de IFR de cada uno de los reactores y el control en días sucesivos (Grafico 1), se puede ver claramente una disminución gradual de este parámetro y que es consecuente en cada repetición de reactor lo cual explica que el método de caracterización es efectivo. Sin embargo se ven hechos curiosos como que en la muestra control que no posee biomasa anaerobia, desde el día seis en adelante se pierde mucho más fluorescencia que las propias muestras de reactores, lo cual puede manifestar que esta pérdida de IFR no esté relacionada con la acción de la biomasa anaerobia.

Grafico 1: Curva de unidades de intensidad de fluorescencia relativa en el tiempo en muestras de biomasa anaerobia con microalgas en repeticiones (reactores) y solo microalga (control).



4.5 Producción de biogás

En general, durante los distintos ensayos del experimento, las producciones de biogás fueron muy bajas, e incluso en ocasiones no se alcanzaron a percibir en el sistema Bioprocess Control™. Uno de los problemas relacionados con el conteo fue la vaporización de líquido desde las botellas a la manguera que llevaba el biogás. A pesar de este factor, los registros de producción de biogás al cabo de 18 días no fueron superiores a 45 ml a partir de botellas de 150 ml. Tomando en cuenta que se incluyeron 3 g/L de DQO y el volumen del reactor es 150 ml, la producción total de biogás debería haber sido de 171 ml y solo se produjo un 26 % de

este valor durante todo el tiempo de observación lo cual da luces de que probablemente la digestión anaerobia no estaba ocurriendo con eficiencia.

Es probable que el diseño de los reactores influyera en la baja producción de metano, como también los ajustes de biomasa/ sustrato por lo cual se requieren otras pruebas para optimizar esa parte del experimento.

4.6 Error inducido por el usuario en el conteo de individuos

Tomando en cuenta el punto de que la centrifugación arrastra todo tipo de moléculas hacia el fondo, se puede considerar erróneo este método de toma de muestra debido a que al tomar solo el sobrenadante, se podría estar diluyendo o concentrando la muestra y generando dificultades para la interpretación de datos. Este punto fue tomado en cuenta y para ello se realizó un experimento en el que se midieron muestras de chlorella sin lodo anaerobio a distintas diluciones con agua destilada, 1:5 y 1:10 en dos repeticiones, para ver el efecto de la diferencia.

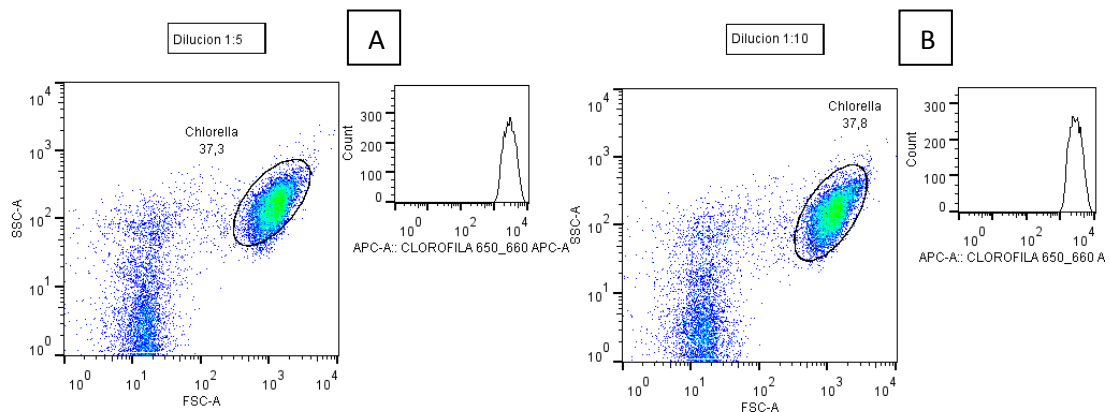
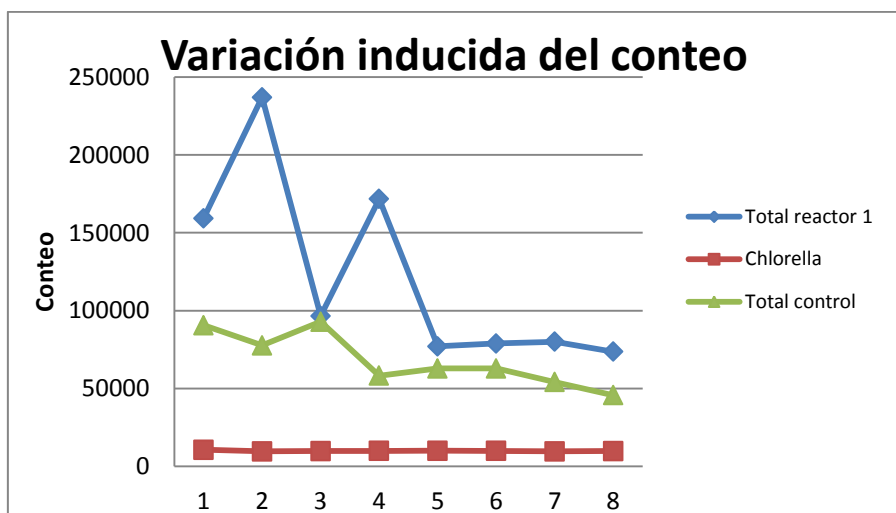


Figura 17: (A) Diagrama de tamaño v/s complejidad celular de muestra de cultivo de *Chlorella sorokiniana* diluida 5 veces con agua e histograma de clorofila. (B) Diagrama de tamaño v/s complejidad celular de muestra de cultivo de *Chlorella sorokiniana* diluida 10 veces con agua e histograma de clorofila.

En la Figura 17 se observa que este efecto no es representativo para la medición de fluorescencia por citometría de flujo, ya que el equipo fue programado para detener el conteo a los 10000 eventos considerados como Chlorella +. Tanto en la dilución 1:5 como en 1:10 la población de chlorella correspondió al 37% del total de eventos y la IFR de clorofila fue de

2880 y 2920 respectivamente. En el caso de los ensayos de digestión anaerobia, visualizados por citometría de flujo, efectivamente hubo una gran cantidad de error en el conteo de eventos, inducido por el método de centrifugación. En el gráfico 2 se muestra una comparación entre el número total de eventos de una muestra de "reactor" (con lodo anaerobio + microalga) y "control" (solo con microalga) y el total de eventos de microalga encontrados. Se observa claramente que el número total de eventos por muestra analizada varía mucho y esto se debe a que algunas muestras tenían mucho más eventos pertenecientes a la biomasa anaerobia que otras.

Grafico 2: Se explica la variación entre distintas muestras sucesivas en el tiempo, del número total de individuos contados (en una muestra de "reactor" y una de "control") y el número de individuos identificados como "chlorella". La cantidad de chlorella (Rojo) permanece constante por el hecho de que siempre se ajusta la medición en 10000 eventos de chlorella.



La dificultad vendría cuando quisiéramos conocer inclusive los eventos de chlorella que están desintegrándose (perdiendo integridad celular por efecto mecánico). Para este caso sería de necesidad utilizar toda la muestra obligatoriamente, inclusive el lodo anaerobio lo cual permitiría cuantificar los eventos de *chlorella* van retirándose de la población objetivo y por lo tanto desintegrándose.

4.7 Análisis de imágenes por microscopía confocal

En esta sección se muestran algunas imágenes de distintos días dentro del ensayo de degradación de microalga

Se presentan imágenes obtenidas el día cinco de la digestión anaeroba tanto de muestras control como de muestras de reactor (Figura 18) En estas imágenes se utilizó la tinción de calcofluor para pared celular Se puede apreciar que en ambos casos la pared celular se mantiene integra.

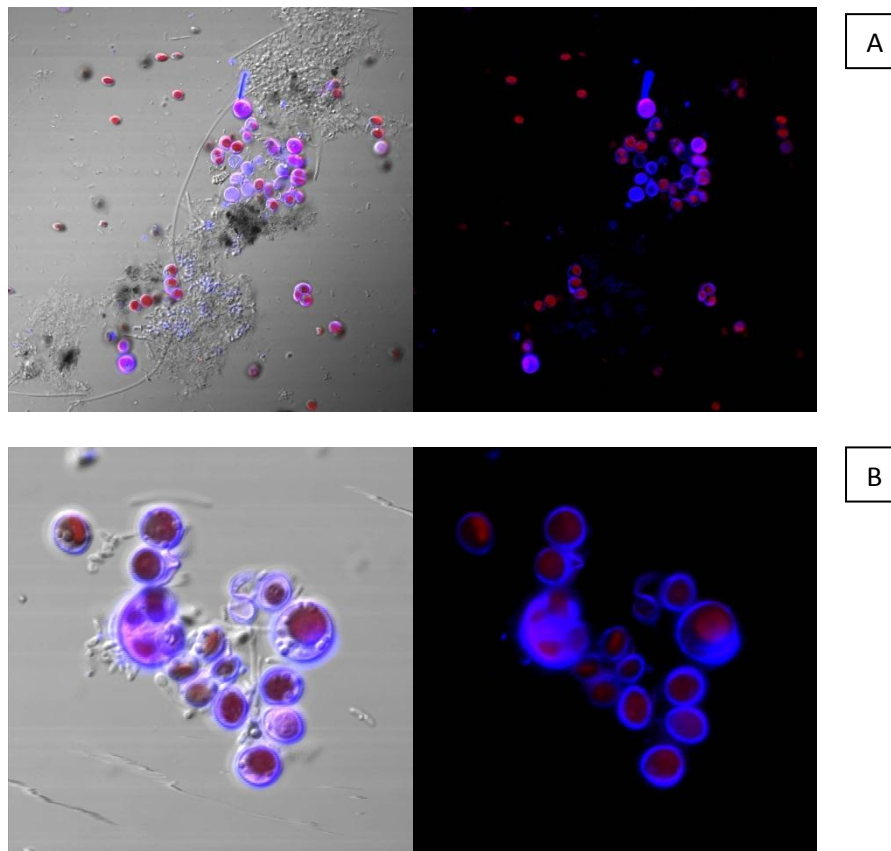
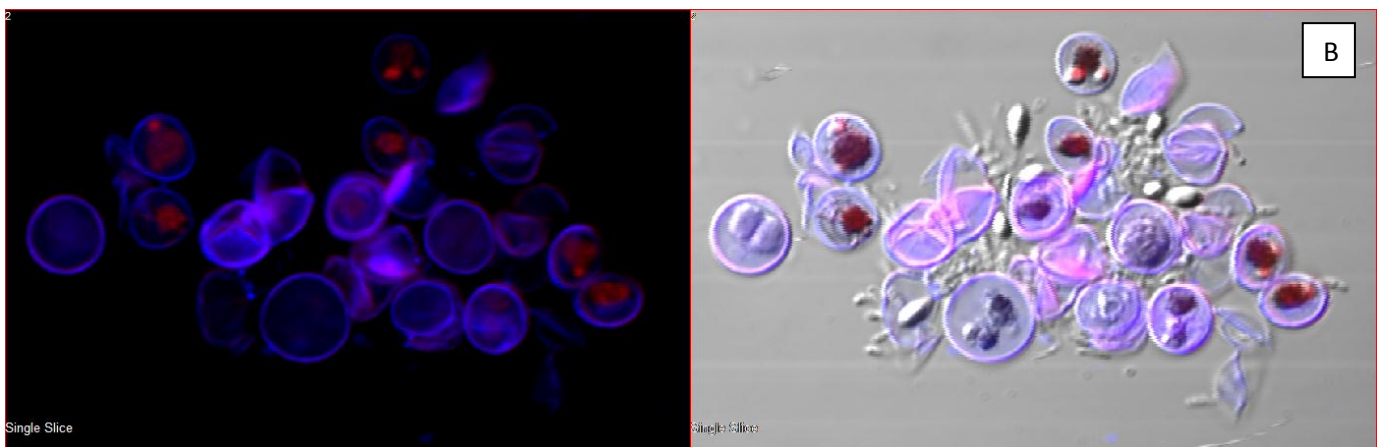
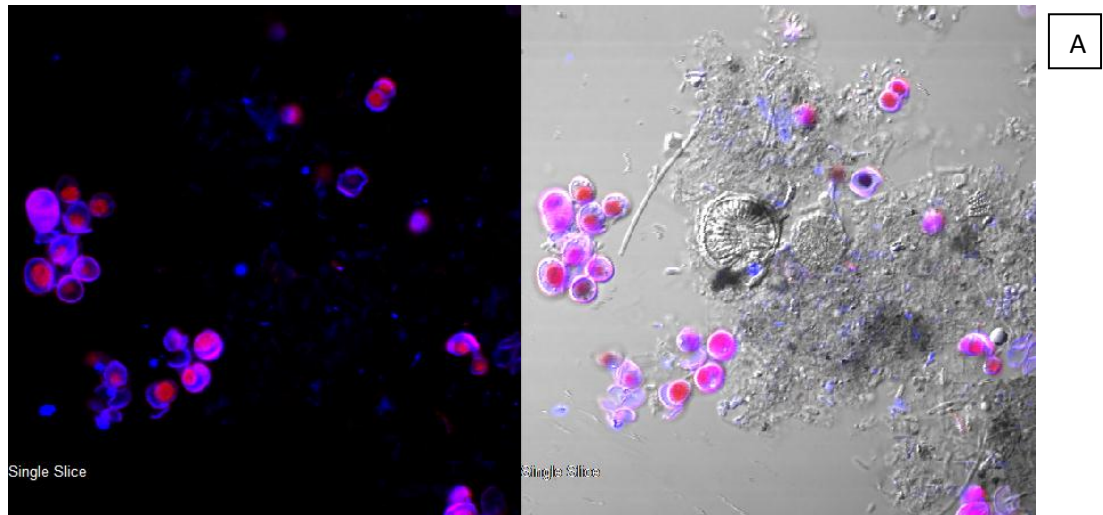


Figura 18: (A) Fotografía de microscopía confocal en distintos canales de microalga en reactor (Azul: Calcofluor, Rojo: clorofila). (B) Fotografía en distintos canales de microalga en la botella control.

Al día once se ve una destrucción mucho mayor en la pared celular de la microalga libre, sin embargo en la microalga en contacto con la biomasa anaerobia da la impresión de que aún quedan individuos saludables,(Figura 19) lo cual puede explicar los resultados dados por la

citometría de flujo. Es probable que la biomasa microalgal haya sufrido mayores daños en el sistema sin biomasa anaerobia.

Figura 19: Imágenes de microscopía confocal a los 11 días en digestión anaerobia (A) Fotografía en distintos canales de microalga en reactor. (B) Fotografía en distintos canales de microalga en la botella control.



5 CONCLUSIÓN

El presente trabajo de investigación permitió desarrollar métodos para ver el estado de la microalga *Chlorella sorokiniana* cuando se encuentra en contacto con la biomasa anaerobia y compararlo tanto con su estado natural como en condiciones de stress. Fue posible la utilización de herramientas como la citometría de flujo y la microscopía confocal para llevar a cabo este objetivo. Se pudo conocer a través de estas técnicas, el estado de la integridad de la pared celular con el marcador de pared calcofluor y también conocer el estado de viabilidad celular con la cantidad de intensidad de fluorescencia relativa generada por la clorofila del alga en cada caso. De esto se desprende que ambas son herramientas óptimas para la observación y caracterización de este tipo de parámetros.

Sin embargo se concluye que no se puede relacionar la intensidad de fluorescencia relativa de la microalga, a través de este método de observación por citometría de flujo, con la degradación de esta por parte de la biomasa anaerobia, ya que la pérdida de IFR es un acontecimiento que ocurre naturalmente en el alga en condiciones de stress. Además, este método no permite cuantificar con exactitud los individuos de *Chlorella sorokiniana* que van siendo desintegrados anaeróbicamente y que por lo tanto desaparecen de la población objetivo. De esto se plantea la necesidad de relacionar el número de individuos registrados como microalga saludable, con el volumen de muestra utilizada para el análisis en muestreos sucesivos, permitiendo de esta manera cuantificar la cantidad de individuos que van siendo degradados.

Los datos obtenidos de la relación entre la producción de biogas, IFR y tinción de pared celular, explican, para este trabajo, que el efecto de la biomasa anaerobia sobre *Chlorella sorokiniana* fue muy escaso y probablemente exista dificultades para la degradación del alga por parte de la biomasa anaerobia bajo las condiciones en que se diseñó el experimento. Además, la microalga parece ser capaz de sobrevivir a tales condiciones.

6 LITERATURA CITADA

Amengual-Morro C., Moyà G., Martínez-Taberner A.,(2012). Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. *Journal of Environmental Management* 95 S71-S76.

APHA. (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 20th ed., Washington DC, USA.,

Blumreisinger M., Meindl D. and Loos E. (1983). Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry* 22: 1603-1604,

Barsanti L., Gualtieri P.,(2006). *Algae, Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*..CRC Press

Chader, S., Hacene, H., Agathos, S. N. (2009). Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 4941–4946.

Chen Y., Cheng J., Creamer K., (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99: 4044–4064

Cheremisinoff P.,(2002) *Handbook of water and wastewater treatment technologies*. Ed. Butterworth Heinemann.

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

Collet P., Hélias A., Lardon L., Ras M., Goy R., Steyer J., (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology* 102: 207–214

Demirel B., Scherer P., (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7:173–190

Deublein D. y Steinhauser A. (2008). *Biogas from waste and renewable resources, an introduction*. Ed. Willey-VCH.

Gapasin, R. S. ., Bombeo, R., Lavens, P., Sorgeloos, P., & Nelis, H. (1998). Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162: 269–286.

- Fernandes T., Keesman K., Zeeman G., van Lier J., (2012). Effect of ammonia on the anaerobic hydrolysis of cellulose and tributyrin. *Biomass and bio energy* 47: 316–323
- Forbes B., Sahm D., Weissfield A., (2007). *Bailey & Scott Diagnostic Microbiology*. Ed. Medica Panamericana.
- Henze, M., (2008). *Biological Wastewater Treatment: principles, Modelling and Design*. IWA Publications, London.
- Hongyang S., Yalei Z., Chunmin Z., Xuefei Z., Jinpeng L., (2011). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater *Bioresource Technology* 102: 9884–9890
- Hyoun K., Seong I., Myeong H., Gon S., Bae H., (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast Fermentation. *Bioresource Technology* 153: 47–54
- Jeihanipour A., Niklasson C., Taherzadeh M., (2011). Enhancement of solubilization rate of cellulose in anaerobic digestion and its drawbacks *Process Biochemistry* 46:1509–1514
- Kim S., Park J., Cho Y., Hwang S., (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions *Bioresource Technology* 144: 8–13
- Lardon L., Elias A., Sialve B., Steryer J., Bernard O., (2009). Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae *Environmental science & technology* vol. 43, N°. 17.
- Liu Y., Chen W., Li D., Huang Z., Shen Y., Liu Y., (2011) Cyanobacteria-/cyanotoxin-contaminations and eutrophication status before Wuxi Drinking Water Crisis in Lake Taihu, China. *Journal of Environmental Sciences*, 23(4): 575–581.
- Mahasneh IA. (1997) Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella* spp. (Chlorophyta). *Cytobios*. 90:362-363.
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., & Karube, I. (2000). Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 12: 263–267.
- Mambeli R., Geraldo T., da Silva R., (2014) The electric energy potential of landfill biogas in Brazil. *Energy Policy* 65: 150–164

Mejía Sanchez G.(1996) Digestión anaerobia. UADY.

MINENERGIA, PNUD, FAO y GEF.(2011) Manual de biogás.

Mussnug J ., Klassen V., Schlüter A., Kruse O., (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150: 51–56

Nair K. V. K., Kannan V. and Sebastian S. (1983). Bio-gas generation using microalgae and macrophytes. *Indian Journal of Environmental Health* 24: 277-284,

Narihiro T., Sekiguchi Y., Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18: 273–278.

REN 21 (2013). Renewables 2013 global status report.

Ríos S., Torres C., Torras C., Salvadó J., Mateo-Sanz J., Jiménez L., (2013). Microalgae-based biodiesel: Economic analysis of downstream process realistic scenarios. *Bioresource Technology* 136 : 617–625

Sato M., Murata Y., Mizusawa M., Iwahashi H., Oka S.,(2004). A Simple and Rapid Dual fluorescence Viability Assay for Microalgae. *Microbiology and Culture Collections* 20. 53- 59

Sialve B., Bernet N., Bernard O., (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* 27: 409–416

Subashchandrabose S., Ramakrishnan B ., Megharaj M.,Venkateswarlu K., Naidu R., (2013). Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International* 51: 59–72

Tabatabaei M., Rahim R., Abdullah N., Wright A.G., Shirai Y., Sakai K., Sulaiman A., Hassan M.A., (2010). Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater Treatments. *Process Biochemistry* 45: 1214–1225

Vanthoor-Koopmans M., Wijffels R., Barbosa M.J., Eppink M., (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology* 135: 142–149

Watanabe K., Takihana N., Aoyagi H., Hanada S., Watanabe Y., Ohmura N., Saiki H., Tanaka H., (2005). Symbiotic association in *Chlorella* culture. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 187–196

Wang B, Li Y, Wu N, Lan C. (2008) CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(5):707–18.

Xu L., Weathers P., Xiong X., Liu C., (2009) Microalgal bioreactors: Challenges and Opportunities. *Engineering Life and Sciences* 9 : 178–189

Yerkes, D.W., Boonyakitombut, S., Speece, R.E., (1997). Antagonism of sodium toxicity by the compatible solute betaine in anaerobic methanogenic systems. *Water Science and Technology* 37: 15–24.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1

Medio M8A

El medio M8A para microalgas es líquido y para realizarlo, se preparan previamente cuatro soluciones stock que se combinan en el momento de la preparación.

Soluciones stock

Macronutrientes:

(100x) (1L)	Composición	Concentración stock	Concentración en el medio (g/L)
Stock I (P-buffer)	KH ₂ PO ₄ (K ₂ HPO ₄)	74 (94,715 g)	0,74
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O(Na ₂ HPO ₄)	26 (20,74 g)	0,26
Stock II (Ca-Mg salts)	MgSO ₄ * 7H ₂ O	40	0,4
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,3	0,013
	KNO ₃	-	3

Fe:

(100x) (1L)	Composición	Concentración stock	Concentración en el medio (g/L)
Stock III (Fe)	EDTA	11,6	0,116
	NA ₂ EDTA * 2H ₂ O	3,72	0,0372

Micronutrientes:

Stock IV (trazas)	H3BO3	0,0062	6,18*10 ⁻⁵
	MnCl2 * 4H2O	1,2980	1,30*10 ⁻²
	ZnSO4 * 7H2O	0,3200	3,20*10 ⁻³
	CuSO4 * 5H2O	0,1830	1,83*10 ⁻³

Preparación de soluciones stock

Todas estas soluciones están concentradas 100x y preparadas en una botella de 1L (usamos botellas de 2,5L).

Todas las soluciones stock son estables cuando se almacenan adecuadamente. La solución stock I debe ser almacenada a 4°C y en oscuridad (bote opaco y en el refrigerador). Las soluciones stock II,III,IV pueden ser almacenadas a T° ambiente en oscuridad.

Preparación del medio de cultivo:

Considerando un volumen final de 1L y para una concentración de 0-10g dw/L en el medio:

1. Cogemos un vaso con una mosca y mientras se agita, añadimos 10mL de stock I (Na-P buffer).
2. Añadimos 10 mL de la stock IV (elementos traza).
3. Añadimos 3,0035g urea por litro de medio para hacer experimentos. Usando nitratos el consumo de CO2 incrementa drásticamente. Añadimos sólo 3g de KNO3 por litro de medio para mantener la estirpe. Esta cantidad de nitrógeno puede producir entre 3,5 y 7g de peso seco de microalga por litro. Para obtener más densidad necesitamos más de estos 3g/L. Pero, usualmente el crecimiento a altas densidades celulares se hace en biorreactores con control de pH. En este caso NO3⁻ puede ser añadido como solución de HNO3.
5. Añadimos 0,42g de NAHCO3 por litro (5mM de HCO3) para evitar la pérdida de CO2.
6. Autoclavar este volumen de medio a 121°C

7. Autoclavar separadamente 10mL de stock II y III y añadirlo al medio
8. Llenar la botella hasta 1L con agua.

7.2 Anexo 2

Determinación Sólidos Totales (ST) y Sólidos Volátiles (SV)

Sólidos Totales

1. Tomar muestra y dejar agitando con agitador magnético.
2. Enumerar crisoles con lápiz grafito y dejar en estufa a 105° C por 30min.
3. Sacar crisoles de estufa y ponerlos en desecador hasta disminución de la T° (20 min)
4. Pesar crisoles en balanza analítica.
5. Agregar un determinado volumen de muestra a cada crisol y dejar nuevamente en estufa a 105° C por 24h.
6. Sacar crisoles de la estufa y dejar en desecador hasta disminución de la T° (20 min.)
7. Medir peso de crisoles en balanza analítica.

Sólidos Volátiles

8. Dejar crisoles en mufla a 550°C por 2h. (si el contenido de sólidos es grande, tapar crisoles con papel aluminio)
9. Sacar crisoles, dejándolos en DESECADOR DE VIDRIO hasta disminución de T° (40 min).
10. Medir peso de crisoles en balanza analítica.

Planilla toma de datos:

N°	Crisol (C) (g)	Volumen (mL)	C+ST (g)	C+SF (g)	ST (g/L)	SV (g/L)
1						
2						
3						

Cálculos:

$$\text{Sólidos Totales (ST)} : \text{ST} = \frac{(C+ST)-C}{v} \times 1000$$

$$\text{Sólidos Volátiles (SV)}: \text{SV} = \frac{(C+ST)-(C+SF)}{v} \times 1000$$

7.3 Anexo 3

Medición de Demanda Química de Oxígeno (DQO)

1. Realizar dilución a muestra considerando rango de curva calibración (0-1000 mg DQO/L)
2. Agregar 2,5 mL de muestra en tubos de DQO. (Considerar la medición del blanco adicionando 2,5mL de agua a un tubo DQO)
3. Ambientar soluciones catalítica y digestora (esto se realiza adicionando cantidades predeterminadas en vaso precipitado)
4. Llevar tubos de DQO a campana.
5. Adicionar 1,5mL de solución digestora normal1 (solución Naranja)
4. Adicionar 3,5mL de solución catalítica (Botella papel aluminio)

5. Tapar correctamente tubos de DQO y posteriormente agitar en vortex. (tener cuidado ya que la reacción exotérmica de los ácidos provocará aumento de T° en los tubos de DQO).
6. Digerir solución a 150° C por 2h (Digestor HACH)
7. Retirar tubos de digestor y dejar enfriar a T° Ambiente
8. Medir concentración en Espectrofotómetro HACH (Al prender el equipo se debe especificar el programa de medición de DQO, el cual se encuentra en "Programas de usuario")

NO OLVIDAR LA PREPARACIÓN DEL BLANCO