



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA
CMIE-H2-001 EN FOTOBIOREACTORES DISCONTINUOS DE TIPO
TUBULAR Y PANEL

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía
Dra. Vivian Morera Córdova

Autor
Marco Santiago Páez Andrade

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Vivian Morera Córdova
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756346811

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Marco Santiago Páez Andrade

CI: 1721408670

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, hermanos y familiares más cercanos por su motivación, apoyo y amor incondicional.

A la Dra. Vivian Morera Córdova, por su fraternidad, paciencia y ayuda en mi trabajo de titulación.

A la Corporación para la Investigación Energética (CIE) y al Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC).

A la Ing. Diana Flores MSc., por su ayuda en el planteamiento del modelo estadístico.

DEDICATORIA

A mi familia, que por esfuerzo y apoyo continuo, permitieron mi desarrollo profesional y personal.

RESUMEN

La producción de biomasa de microalgas es determinada por las condiciones de cultivo empleadas. Estas pueden ser: intensidad luminosa, aireación, diseño del fotobiorreactor, y presencia o ausencia de soportes físicos internos.

La optimización de las variables descritas es necesaria para obtener en el tiempo de cosecha (8 días) una concentración superior al promedio (1×10^7 cel·mL⁻¹). Por esta razón, el objetivo de la presente investigación fue comparar las condiciones de operación y el diseño del fotobiorreactor en un cultivo de la cepa CMIE-H2-001 (*Chlorococcum* sp.).

Se emplearon fotobiorreactores de tipo panel y fotobiorreactores de tipo tubular, y se evaluaron tres variables: intensidad luminosa de 1500 lux y 3000 lux, la aireación continua o semicontinua y la presencia o no de soporte físico.

La microalga empleada se logró adaptar sin perder productividad a un medio económicamente más barato (solución de nitrofoska 1,5 mL por cada litro), con una producción máxima de $1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ en un fotobiorreactor de tipo tubular con aireación continua, presencia de malla soporte y una intensidad luminosa de 3000 lux. Por otro lado, en un fotobiorreactor de tipo panel, la máxima producción registrada luego de un tiempo de cultivo de ocho días fue de $1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ con ausencia de soporte físico, aireación continua y a una intensidad luminosa de 3000 lux.

El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre los diseños de los fotobiorreactores de tipo panel y de tipo tubular empleados en esta investigación, por lo que se pudo concluir que ambos sistemas de cultivo se pueden ajustar a una producción cercana a $1,3 \times 10^7$ cel·mL⁻¹

ABSTRACT

Biomass production of microalgae is determined by culture conditions that are used. It could be light intensity, airlift system, photobioreactor design and physical support presence or absence.

The optimization of the described variables is necessary to obtain at harvest time (8 days) a higher average (1×10^7 cel · mL⁻¹) concentration. For this reason, the aim of this investigation was to compare operating conditions and photobioreactor design in a CMIE-H2-001 *Chlorococcum sp.* culture.

This investigation used flat and tubular photobioreactors evaluating three variables. First, the light intensity with two levels: 1500 lux and 3000 lux. Second, airlift system with two levels: semicontinuous and continuous aeration. Third, physical support with two levels: presence or absence.

The employed microalgae were able to get adapted into a cheap economic environment without losing productivity (1,5mL Nitrofoska solution per liter) with a maximum production of $1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ in a Tubular photobioreactor with continuous aeration, mesh presence support, and 3000 lux of light intensity. On the other hand, flat photobioreactor achieved a maximum production of $1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ after a culture time of 8 days with continuous aeration, 3000lux of light intensity and absence of physical support. Finally, statistical analysis did not showed significant differences between both photobioreactors types of this investigation, so it could be concluded that both culture systems can be adjusted to production up to $1, \times 10^7$ cel·mL⁻¹

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Formulación del problema.....	3
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo general.....	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Generalidades de las microalgas.....	5
2.2 Cultivo de microalgas.....	6
2.2.1 Requerimientos nutricionales.....	7
2.2.1.1 Carbono.....	7
2.2.1.2 Oxígeno.....	8
2.2.1.3 Nitrógeno.....	9
2.2.1.4 Fósforo.....	10
2.2.1.5 Micronutrientes.....	11
2.2.2 Modos de cultivo de las microalgas.....	11
2.2.2.1 Cultivo discontinuo.....	11
2.2.2.2 Cultivo continuo.....	12
2.2.3 Sistemas de cultivo de las microalgas.....	12
2.2.3.1 Sistemas abiertos.....	12
2.2.3.2 Sistemas cerrados.....	13
2.2.3.3 Fotobiorreactores.....	13
2.2.3.4 Fotobiorreactores de tipo panel.....	14
2.2.3.5 Fotobiorreactores de tipo tubular.....	15
2.2.4 Diseño de fotobiorreactores para el cultivo de las microalgas.....	15
2.2.4.1 Distribución de luz.....	15
2.2.4.2 Burbujeo e intercambio gaseoso.....	16

2.2.4.3 Control de pH y temperatura.....	17
2.3 Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas.....	18
2.3.1 Microalgas empleadas para la nutrición.....	18
2.3.2 Microalgas para la remediación de aguas contaminadas	19
2.3.3 Microalgas para la producción de energía renovable.....	20
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	21
3.1 Preparación de los medios de cultivo	21
3.1.1 Medio de cultivo BG-11	21
3.1.2 Solución de Nitrofoska	21
3.2 Línea celular y condiciones de cultivo	21
3.3 Condiciones de cultivo para fotobiorreactores de 10 L.....	22
3.3.1 Factor 1: tipo de reactor	23
3.3.1.1 Reactor panel.....	23
3.3.1.2 Reactor tubular.....	23
3.3.2 Factor 2: aireación	23
3.3.3 Factor 3: soporte físico.....	24
3.3.4 Factor 4: intensidad luminosa	24
3.4 Diseño experimental	24
3.5 Variable de respuesta: tasa de crecimiento	25
3.6 Análisis estadístico	25
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Crecimiento de las microalgas a escala piloto en fotobiorreactores de tipo panel	26
4.1.1 Intensidad luminosa	26
4.1.2 Aireación	32
4.1.3 Soporte físico	34
4.2 Crecimiento de las microalgas a escala piloto en fotobiorreactores de tipo tubular	36
4.2.1 Intensidad luminosa	36
4.2.2 Aireación	42

4.2.3 Soporte físico	45
4.3 Evaluación de variables	46
4.3.1 Intensidad luminosa	46
4.3.2 Aireación	48
4.3.3 Soporte físico	50
4.4 Comparación estadística.....	50
4.4.1 Estadística descriptiva	50
4.4.2 Análisis de Varianza.....	53
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y	
RECOMENDACIONES	54
5.1 Conclusiones	54
5.2 Recomendaciones	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS	60

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

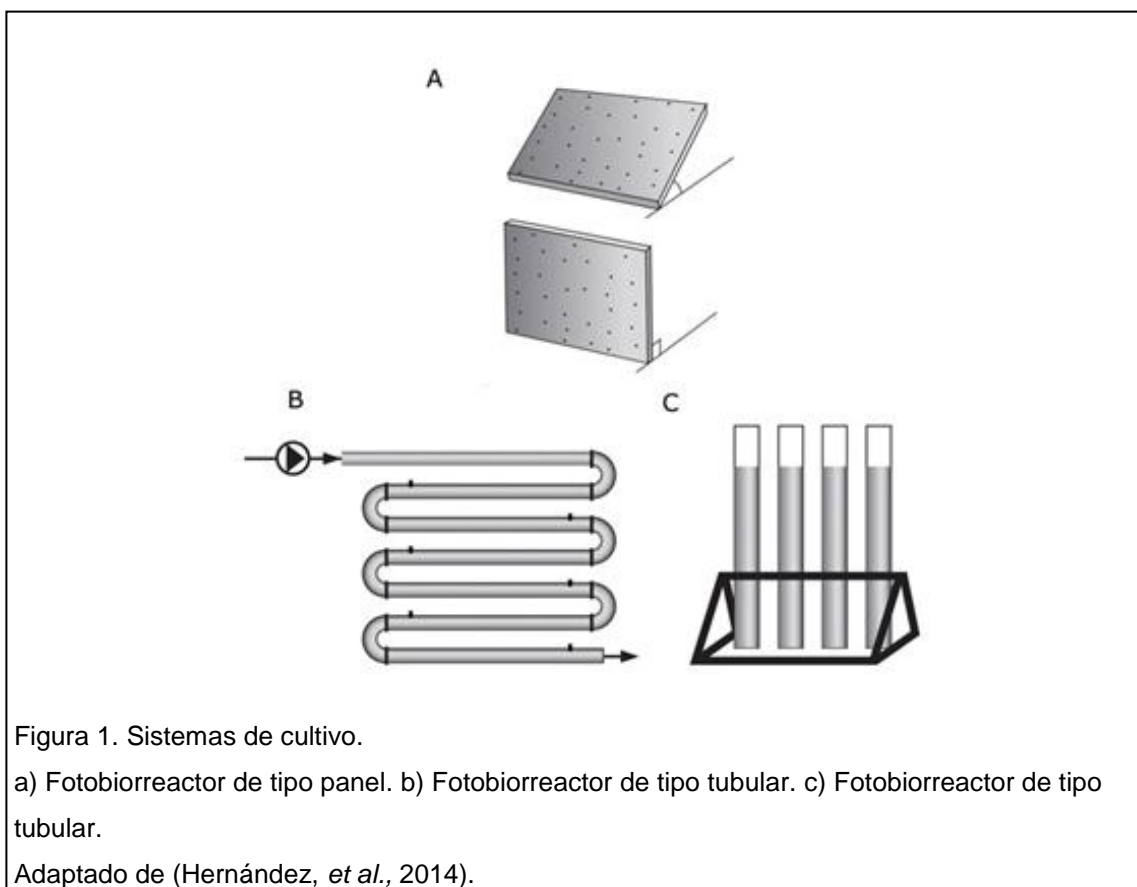
La producción de biomasa de microalgas se realiza con el fin de obtener productos de valor añadido como aceites esenciales, minerales, vitaminas y glúcidos. La mayor parte de la biomasa producida utilizando microalgas se comercializa como alimento y otra parte es usada para la extracción de pigmentos como el beta-caroteno, biofertilizantes, antioxidantes y productos cosméticos producidos por *Dunaliella*, *Arthospira*, *Chlorella* y *Spirulina* (Santos, Arechavala y Martín, 2014).

La biomasa de microalgas también es empleada en la generación de energía renovable. Entre las especies utilizadas para este fin se encuentran: *Cryptocodinium cohnii*, *Prymnesium parvum*, *Phaedactylum tricornutum*, *Chlorella minutissima*, *Schizochytrium sp.*, y *Scenedesmus dimorphus*. Estas microalgas tienen un contenido lipídico del 22 al 40% del total de su biomasa (Marcos, Almazan y Palomin, 2008). A partir de este contenido, las microalgas producen ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos triacilglicéridos (TAG), los cuales son útiles para la generación de energía renovable (Priyadarshani, y Rath, 2012; Santos, *et al.*, 2014).

En la generación de energía renovable, la productividad de la biomasa de microalgas es mayor que la productividad de la biomasa vegetal. Esto se debe a los bajos costos de producción que supone mantener a la biomasa microalgal (Priyadarshani, *et al.*, 2012). Las microalgas necesitan menos espacio para crecer que las plantas y pueden crecer en varios sistemas de cultivo (Santos, *et al.*, 2014). Los sistemas de cultivo más empleados son los sistemas abiertos y los fotobiorreactores, ya que permiten aumentar la eficiencia de la producción. A partir de la primera semana de funcionamiento, estos sistemas de cultivo permiten recuperar alrededor del 50% de la producción total de la biomasa, algo que no ocurre en la generación de biomasa vegetal (Hernández, Revah y Morales, 2011).

Además de su productividad, las microalgas tienen mayor eficiencia fotosintética; el modelo de crecimiento es exponencial, en comparación al modelo lineal de crecimiento de las plantas. El tiempo de adaptación a un medio de cultivo es como promedio de 8 días en comparación al tiempo de adaptación de las plantas que es de alrededor de 1 mes (Hernández y Labbé, 2014; Hernández, *et al.*, 2011; Infante, *et al.*, 2012; Priyadarshani *et al.*, 2012).

El modelo exponencial de crecimiento de las microalgas les permite ajustarse eficientemente a los sistemas de cultivo, dependiendo del sistema que se utilice existen diferencias. Los sistemas abiertos tienen como desventajas: la contaminación que se genera al interior del recipiente del biorreactor, el mezclado deficiente, y la limitación de la luz. En los sistemas cerrados o fotobiorreactores las desventajas son: pérdida de productividad por la fotoinhibición dependiendo de la forma del reactor (Figura 1) (Fernández, 2014; Santos, *et al.*, 2014).



Los sistemas cerrados tienen como desventaja la sobresaturación con oxígeno. Sin embargo, esta se puede eliminar optimizando el burbujeo de aire y por esta razón es el sistema más usado y de mayor productividad. Se dividen en fotobiorreactores de tipo panel y fotobiorreactores de tipo tubular. La contaminación generada al interior de este tipo de sistemas es baja, aumentando la productividad de las microalgas al exponerlas a intensidades altas de luz. Tienen mayor fijación de CO₂, pueden ser diseñados en vidrio, madera o polietileno y pueden ser operados de forma continua o discontinua (Fernández, 2014). Sin embargo, es necesario el estudio de los sistemas y modos de producción y el análisis de los parámetros de crecimiento para maximizar la eficiencia de producción de biomasa de microalgas (Bermúdez, Lodeiros y Morales, 2002; Huang, Chen, Wei, Zhang y Chen, 2010; Cáceres, Aguirre, McAnally, Pares y Leyva, 1988; Santos, *et al.* 2014).

Con el fin de optimizar un fotobiorreactor para la producción de biomasa microalgal, se trabajó con la línea celular CMIE-H2-001 (*Chlorococcum sp.*) en dos sistemas de producción: un fotobiorreactor de tipo panel y un fotobiorreactor de tipo tubular mediante la cuantificación de biomasa variando la intensidad de luz, el soporte físico y la aireación.

1.2 Formulación del problema

El propósito del trabajo fue definir el sistema más adecuado para la producción de biomasa microalgal. Para esto se diseñaron dos fotobiorreactores distintos en condiciones establecidas y se evaluó qué fotobiorreactor es el más adecuado para la producción de la biomasa de *Chlorococcum sp.* CMIE-H2-001. Dentro de la comparación, se incluyó la optimización de la iluminación, el estudio de la influencia de soportes físicos y la influencia de la aireación dentro de los fotobiorreactores.

1.3 Justificación

El uso de biomasa de las microalgas es una alternativa al uso de la biomasa vegetal para varios fines. Los lípidos, glúcidos y metabolitos obtenidos de las microalgas pueden ser convertidos en elementos de consumo humano y animal, por lo que se desea aumentar la producción de biomasa. Los sistemas de cultivo están en constante cambio y optimización, por lo que el *diseño* de los fotobiorreactores y la modificación de sus parámetros de producción influyen directamente en la cantidad de producto que se obtendrá al final del cultivo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Comparar el efecto del diseño y las condiciones de operación que tienen los fotobiorreactores en la producción de biomasa microalgal de la cepa *Chlorococcum sp.* (CMIE-H2-001).

1.4.2 Objetivos específicos

- Diseñar y construir fotobiorreactores de tipo panel y de tipo tubular de un volumen de trabajo de escala piloto de 10 L.
- Escalar de fase de laboratorio a fase piloto (fotobiorreactores de tipo tubular y panel) un cultivo de la cepa *Chlorococcum sp.* (CMIE-H2-001).
- Evaluar el efecto de la aireación, la intensidad luminosa y la presencia de un soporte físico en el crecimiento de la cepa *Chlorococcum sp.* (CMIE-H2-001) en los fotobiorreactores construidos.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de las microalgas

Se conoce como microalgas al conjunto de microorganismos unicelulares eucariotas y procariotas (cianobacterias) que sintetizan una gran cantidad de clorofila *a* y otros pigmentos que define su coloración verde, les permite realizar la fotosíntesis y actuar como productores primarios en la generación de energía química a partir de energía lumínica; varían en cuanto a tamaño, toxicidad, grosor de la pared celular, movilidad y composición química (Gómez, 2007; Moreno, 2010).

Las microalgas son microorganismos que se encuentran en diversos ambientes naturales y presentan varios tipos de adaptaciones para su crecimiento por lo que pueden vivir en agua dulce o salada (García y Martel, 2015). Existen alrededor de 300.000 especies de microalgas, pertenecen al reino Plantae y sus divisiones son: Cryptophyceae, Dinophyceae, Prymnesiophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae, Dictyochophyceae, Euglenophyceae y Chlorophyceae (García, *et al.*, 2015).

Las condiciones necesarias de temperatura, nutrientes, pH, presión, salinidad, aireación y concentración de CO₂ en los medios de cultivo varían entre especies e influyen en la cantidad de biomasa final generada en un tiempo determinado (Moreno, 2010).

El cultivo de microalgas puede ser desarrollado en condiciones extremas o normales, dependiendo de la especie en estudio los requerimientos nutricionales varían. Por ejemplo, algunos cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* crecen en concentraciones de nutrientes altas, pH extremo o salinidad elevada (Borowitzka, 1999). Las estrategias que utilizan las microalgas para adaptarse a las condiciones extremas son varias. Entre las más importantes se puede mencionar: la producción de sustancias mucilaginosas extracelulares para protegerse del estrés hidrodinámico, la

acumulación de moléculas osmorreguladoras en condiciones salinas, la síntesis de pigmentos fotoprotectores para la respuesta a altas intensidades de luz; y la acumulación de lípidos en condiciones limitadas de nitrógeno (Fernández, 2014).

Además de las estrategias de supervivencia que tienen algunas especies de microalgas, las condiciones extremas evitan la contaminación de los cultivos en producción a gran escala, puesto que los cultivos se convierten en selectivos, y de esta manera impiden el crecimiento de otras microalgas que puedan generar competencia en el sistema de cultivo (Fernández, 2014). Las especies de microalgas que no crecen en medios selectivos, desarrollan estrategias de crecimiento diferentes a las microalgas extremófilas y por lo tanto es importante estudiar la influencia que ciertos factores tienen sobre el crecimiento celular; dichos factores podrían ser: cantidad de luz recibida, concentración de CO₂ suministrada, pH, temperatura del cultivo y sistema de producción (Grobbelaar, 2004).

2.2 Cultivo de microalgas

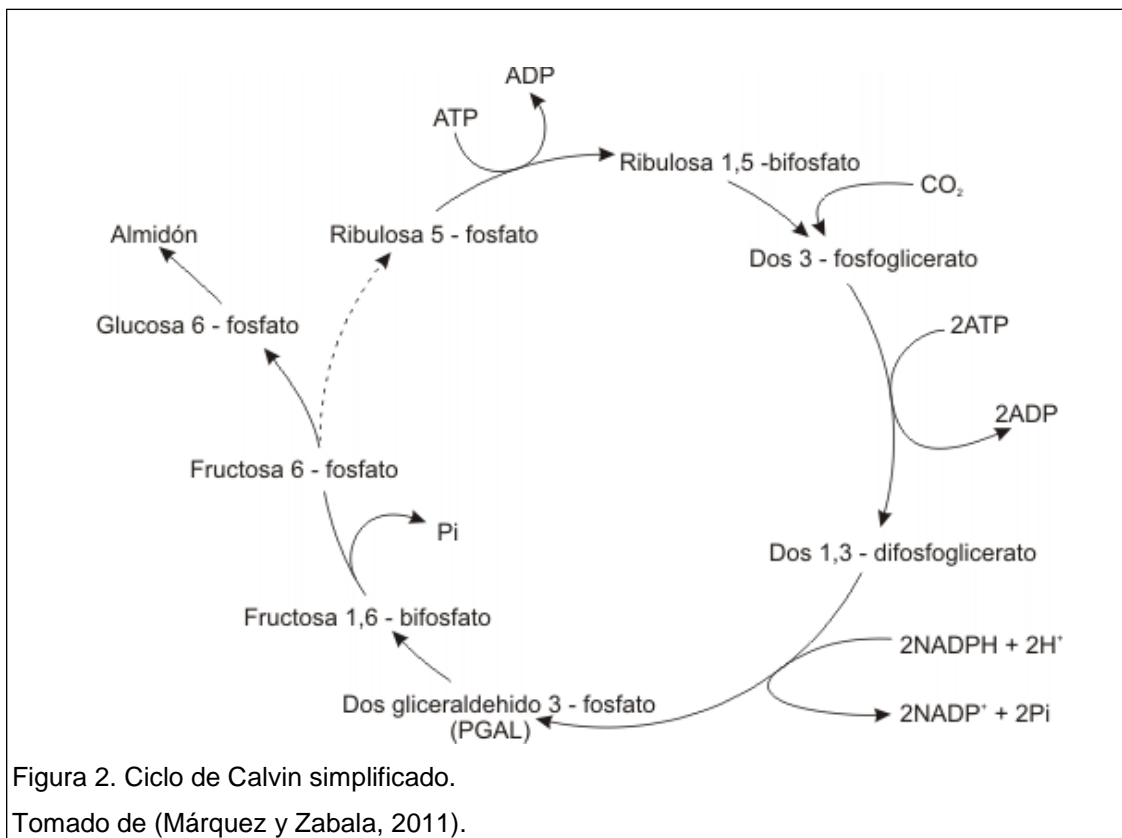
Para el cultivo de las microalgas, es necesario el estudio de varios factores. El primer factor es el requerimiento nutricional de la microalga para su crecimiento. En este desempeña un papel fundamental la fuente de carbono y la intensidad de luz que aprovecha la microalga para realizar fotosíntesis. El segundo factor es el modo de operación en el que va a trabajar el sistema de cultivo. Para este caso se debe decidir si el modo discontinuo es más adecuado que el modo continuo para la producción de una determinada concentración de microalgas. El tercer factor es el sistema de cultivo. Es necesario reconocer qué sistema es más eficaz para la producción de un determinado volumen de biomasa microalgal y tener claras cuáles son las desventajas y las ventajas que aportan los sistemas abiertos frente a los sistemas cerrados o viceversa. Finalmente, el diseño de un sistema de cultivo bajo un modo de operación es uno de los principales factores que necesitan ser evaluados y optimizados. El diseño óptimo de un sistema abarca criterios de

luz, burbujeo, control de temperatura y control de pH, y le permite a la microalga alcanzar la mayor concentración de biomasa al final del tiempo de crecimiento (Grobbelaar, 2004; Richmond, 2000).

2.2.1 Requerimientos nutricionales

2.2.1.1 Carbono

Para lograr el crecimiento óptimo de las microalgas es importante determinar la cantidad de los diferentes nutrientes a añadir en el medio de cultivo. Uno de los nutrientes más importantes es aquel que constituye la fuente de carbono en el medio de cultivo. Las microalgas fijan el carbono en forma de CO_2 y lo unen al sustrato ribulosa 1,5 bifosfato a partir de la proteína Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa (RuBisCO) para generar una molécula inestable de seis carbonos (3-ceto-2-carboxiarabinitol-1,5-bifosfato). Esta molécula se hidrolizará formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato, de tres carbonos cada una, en el ciclo de Calvin (Figura 2). El metabolismo del carbono finalmente le proporciona a la microalga una molécula de glucosa por cada seis moléculas de CO_2 suministradas (Fernández, 2014; Grobbelaar, 2004).



La fijación de CO_2 al material celular le permite tener un crecimiento óptimo y una productividad notable. El CO_2 además, aumenta el pH del medio debido a los grupos hidroxilos desprendidos de la reacción. En este caso el pH del medio se puede controlar añadiendo ácido acético para mantener las condiciones de operación estables. Por otra parte, la sobresaturación de oxígeno en el medio, generada como resultado de las reacciones del ciclo de Calvin, puede inhibir el crecimiento de las microalgas y es un aspecto importante a considerar durante la optimización de los cultivos (Grobbelaar, 2004).

2.2.1.2 Oxígeno

El O_2 que se incorpora a la biomasa es el de la molécula de CO_2 fijada en el ciclo de Calvin. El O_2 liberado al medio de cultivo proviene de la molécula de agua. Si la cantidad de O_2 disuelto en el agua sobresatura el medio de cultivo, la afinidad de la enzima RuBisCO cambia de CO_2 a O_2 e inhibe la fotosíntesis,

lo que provoca la pérdida de productividad (Contreras, Peña, Flores y Cañizares, 2003).

Existen reportes de reducción de productividad de biomasa microalgal por sobresaturación de oxígeno en el medio de cultivo. Una de ellas ha demostrado que la saturación del 200% de O₂ en el medio de cultivo reduce en un 17% la productividad y que saturaciones del 300% de O₂ reduce en un 25% la productividad de biomasa, por lo que es conveniente mantener cultivo axénicos de microalgas sin el efecto de la sobresaturación de O₂ en el medio de cultivo (Fernández, 2014; Hernández, *et al.*, 2014).

2.2.1.3 Nitrógeno

El nitrógeno que se suministra a la microalga en el medio de cultivo le permite producir proteínas y nucleótidos que son parte de la biomasa. Cuando se abastece de nitratos al medio de cultivo, las microalgas desnitrifican el nitrato (NO₃⁻) hasta nitrógeno inorgánico (N₂) (Ecuación 1); una vez que se obtiene el nitrógeno inorgánico, este es ingresado como NH₂ a las proteínas de la microalga (Fernández, 2014).



El nitrógeno en el medio de cultivo no se emplea en altas concentraciones para el crecimiento de las microalgas que serán utilizadas posteriormente con fines energéticos, debido a que los medios de cultivo con limitación de nitrógeno y concentraciones salinas altas activan y aumentan la síntesis y acumulación de lípidos y glúcidos dentro de la célula, probablemente por la modificación de algunas rutas metabólicas como resultado del estrés (Ho, Chen y Chang, 2012).

Sin embargo, la falta total de este elemento junto con el aumento de la concentración de lípidos, influyen en la producción de las proteínas necesarias para el mantenimiento de las microalgas, define la producción de los metabolitos y reduce la producción de biomasa. Por ejemplo, se conoce que la adición de NH_4^+ incrementa el contenido de ficobiliproteínas en la especie *Spirulina platensis*, y la deficiencia de nitrógeno influye en la producción de esta proteína, incidiendo directamente en la captación de luz para la fotosíntesis. (Fernández, 2014; Hernández, *et al.*, 2014).

2.2.1.4 Fósforo

El fósforo es un macroelemento que se encuentra en menor proporción que el resto en la biomasa (1% en relación al peso seco), se suministra en el medio de cultivo como fosfatos o fosfatos ácidos (PO_4^{-3} , HPO_4^{-2}) y son utilizados por las microalgas en la síntesis de enzimas, lípidos y ácidos nucleicos; por lo que la deficiencia de este elemento es otro factor influyente en la limitación del crecimiento de las microalgas (Fernández, 2014; Grobbelaar, 2004; Hernández, *et al.*, 2014).

En los medios de cultivo puede ocurrir la precipitación del fósforo debido a que este elemento interacciona con el CO_2 y con los metales como Fe y Co. Este problema se puede evitar si se añaden agentes quelantes al medio de cultivo para mantener estables las fuerzas químicas presentes (Grobbelaar, 2004). Cuando las fuerzas químicas del medio de cultivo se mantienen estables, el fósforo está disponible para las microalgas. Sin embargo, es conveniente manejar una relación de proporción de nitrógeno y fósforo (N: P) óptima para el crecimiento de las microalgas (7.3 g de nitrógeno por cada 1 g de fósforo) (Escudero, 2013).

2.2.1.5 Micronutrientes

Los micronutrientes presentes en el medio de cultivo mantienen la presión osmótica y el equilibrio de los electrolitos. Algunos micronutrientes componen parte de la biomasa o de las proteínas, como es el caso del Mg, ión central en el núcleo de la porfirina de las clorofilas. Se emplean Cl, K, Ca, Mg y sulfatos en mayor medida en los medios de cultivo (Fernández, 2014).

Existen otros micronutrientes utilizados en menor cantidad por las microalgas, estos son: Mn, Cu, Co, Zn, Mo, V, Si. Estos microelementos actúan como cofactores de enzimas, productores de vitaminas y mantienen la pared celular. Su concentración en el medio de cultivo es tan baja que su exceso puede ser tóxico para las microalgas (Grobbelaar, 2004).

2.2.2 Modos de cultivo de las microalgas

2.2.2.1 Cultivo discontinuo

El cultivo discontinuo se refiere al cultivo que tiene un determinado tiempo de crecimiento y la biomasa se cosecha al final del lapso especificado. Las microalgas en cultivos discontinuos tienen una fase de latencia o adaptación al medio de cultivo, una etapa de crecimiento exponencial y finalmente la cosecha. Una vez que termina la etapa exponencial de un cultivo discontinuo, la biomasa se puede utilizar para un siguiente cultivo. Entre sus principales características se encuentran la facilidad de operación y la poca manipulación del medio de cultivo ya que este se añade una sola vez al inicio del proceso. A partir de un cultivo discontinuo se puede calcular la velocidad de crecimiento específica de una microalga y se pueden optimizar los parámetros de crecimiento (Escudero, 2013; Shuler y Kargi, 2002; Torrentara y Tacon, 1989).

2.2.2.2 Cultivo continuo

El cultivo continuo es aquel que tiene un volumen constante en un tiempo indefinido, al sistema se le añade medio de cultivo fresco y se obtiene biomasa disuelta en sustrato a una velocidad constante. Se emplea en industrias o en estudios en los que el volumen de medio de cultivo puro es grande. La concentración de microorganismos al interior del sistema no varía con el tiempo (Stanier, Ingraham, Wheelis, Painter, 1992).

2.2.3 Sistemas de cultivo de las microalgas

La cantidad de biomasa de microalgas depende del sistema de cultivo empleado el cual puede variar desde recipientes de volúmenes bajos hasta piscinas. Los materiales no deben ser tóxicos para la especie manejada y pueden ser de plástico, madera y vidrio. Los sistemas de cultivo pueden ser abiertos o cerrados dependiendo de la necesidad del operador y para decidir qué sistema se debe emplear, es necesario definir el volumen de trabajo, los balances de masa y las condiciones de operación para optimizar el crecimiento de las microalgas (Torrentara, *et al.*, 1989).

2.2.3.1 Sistemas abiertos

Los sistemas abiertos son biorreactores formados por circuitos cerrados de canales pocos profundos. En ellos el medio de cultivo es impulsado mediante el empleo de paletas. Presentan desventajas como el requerimiento de áreas grandes de terreno, la baja productividad, la difícil optimización de los parámetros de crecimiento de la microalga, la fácil contaminación de los medios de cultivo y la recuperación costosa de los productos (Marcilla, *et al.*, 2011). Estos sistemas son utilizados solamente para la producción intensiva de microalgas (Figura 3).



Figura 3. Sistema abierto: biorreactor conocido como biorreactor de tipo carrusel usado para el cultivo intensivo de microalgas.

Tomado de (Benavente, Montañez, Aguilar, Méndez y Valdivia, 2012).

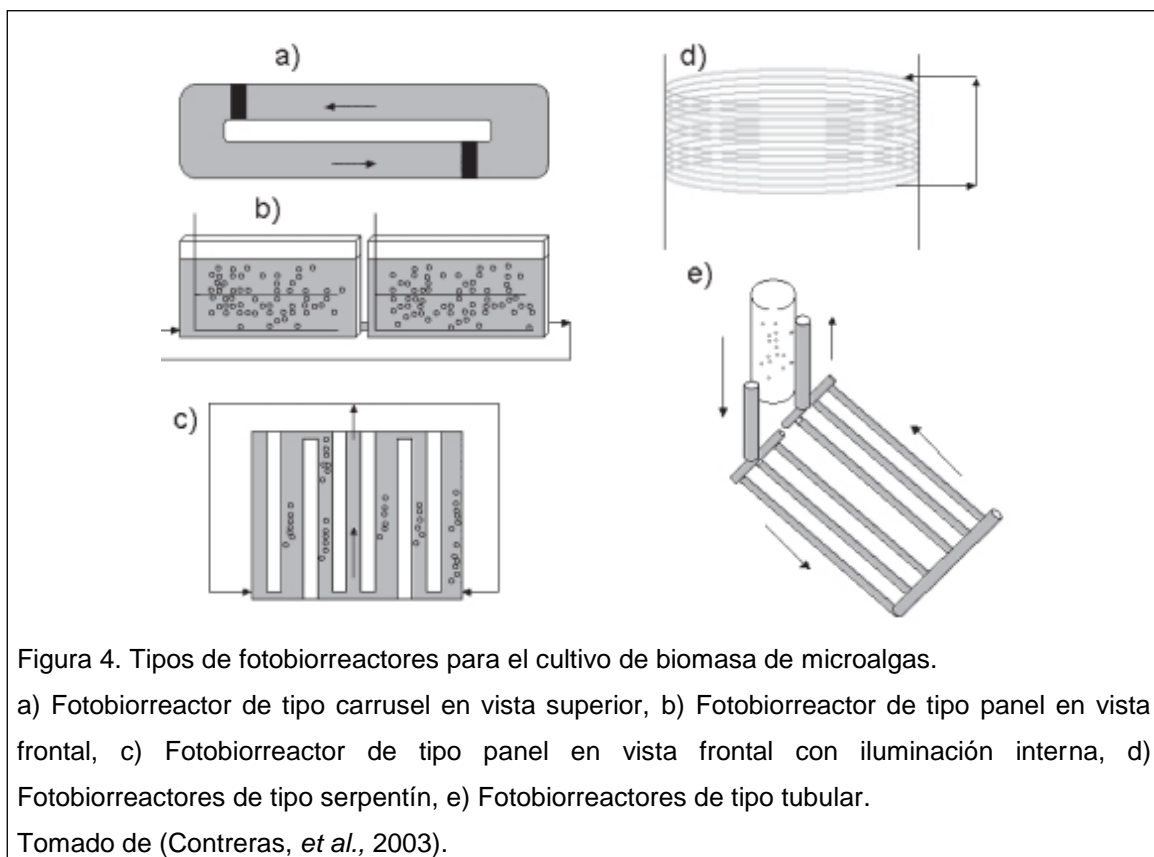
2.2.3.2 Sistemas cerrados

Los sistemas cerrados son fotobiorreactores que se caracterizan por no interactuar con agentes fisicoquímicos externos a él. Por esta razón, los sistemas cerrados permiten calcular los balances de masa y energía; la optimización de la adición de sustrato; la cantidad final de biomasa esperada y las condiciones de cultivo que son: la temperatura del medio, el pH y la velocidad de crecimiento. Estos sistemas presentan más ventajas que los sistemas abiertos ya que se logra menor contaminación, mayor productividad, y la fácil optimización de los parámetros de crecimiento (De Tremblay, Perrier, Chavarie y Archambault, 1992; Shuler, *et al.*, 2002; Torrentara, *et al.*, 1989).

2.2.3.3 Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores son biorreactores que aprovechan la luz solar o artificial para el crecimiento de las microalgas, pueden ser sistemas abiertos o cerrados y pueden tener modo discontinuo o continuo de operación. El primer postulado sobre biorreactores para la producción de biomasa de microalgas se realizó en 1950, donde se deseaba emplear la luz solar y el agua marina para obtener cultivos masivos de microalgas con el fin de alimentar al ser humano.

A partir de 1950 hasta la actualidad, los fotobiorreactores han variado tanto (Figura 4), que el análisis del diseño y las condiciones de operación son un estudio de vital importancia para la optimización del proceso de producción de biomasa microalgal (Richmond, 2000).



2.2.3.4 Fotobiorreactores de tipo panel

Es un tipo de biorreactor cerrado que emplea luz solar como parte de su funcionamiento para el crecimiento de microalgas y su modo de operación puede ser continuo o discontinuo (Contreras, *et al.*, 2003). Los fotobiorreactores de tipo panel tienen una mezcla uniforme cuando el burbujeo es firme y una alta eficiencia en el uso de la luz proporcionada por el operador además de un fácil control de temperatura, y una alta transferencia gaseosa (Borowitzka, 1999).

2.2.3.5 Fotobiorreactores de tipo tubular

Este tipo de fotobiorreactor fue propuesto por primera vez por Tamiya en 1950, y estudiado por varios autores (Hu *et al.*, 1998; Richmond, Boussiba, Vonshak y Kopel, 1993; Grobbelaar, 2004). Los fotobiorreactores de tipo tubular son un sistema cerrado que utiliza tramos de tubería de forma horizontal o vertical y tienen las mismas cualidades y beneficios que los fotobiorreactores de tipo panel (Contreras, *et al.*, 2003).

Existen algunas diferencias entre los fotobiorreactores de tipo panel y de tipo tubular. Entre ellas podemos mencionar la superficie de iluminación, el control de temperatura y la influencia de la luz en la fotoinhibición de una microalga. Este fenómeno se genera en la zona fótica a causa de problemas en la optimización del burbujeo de gas (Richmond, 2000; Richmond, *et al.*, 1993).

2.2.4 Diseño de fotobiorreactores para el cultivo de las microalgas

El diseño de un fotobiorreactor se basa en la distribución de la luz, en la optimización del burbujeo e intercambio gaseoso, en el control de pH y temperatura, y en los costos de operación (Contreras, *et al.*, 2003).

2.2.4.1 Distribución de luz

Las microalgas usan fotones para realizar la fotosíntesis. Cuando se aumenta la intensidad luminosa en un sistema de cultivo, la fotosíntesis aumenta hasta la constante de saturación (E_k). A partir de E_k el aumento de la intensidad luminosa no influye en la tasa de fotosíntesis (Figura 5).

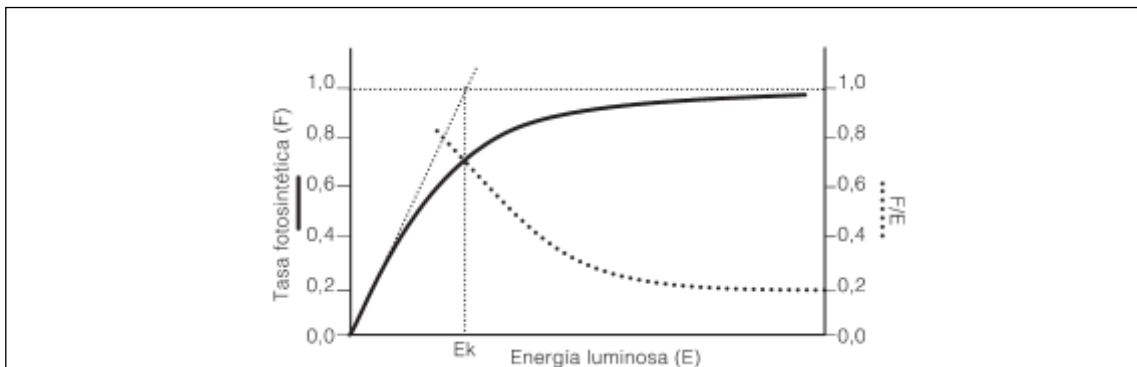


Figura 5. Efecto de la energía luminosa (E) en la tasa fotosintética (F). La eficiencia fotosintética viene dada por la relación entre E y F (F/E) en donde E_k es la constante de saturación.

Adaptado de (Richmond, 2000).

Si se sobrepasa E_k los fotones presentes en el medio hacen que las microalgas sufran la fotoinhibición. La fotoinhibición generada en un cultivo altera la productividad de la fotosíntesis y baja la concentración de la biomasa porque muchas microalgas mueren (Richmond, 2000).

Algunos autores han descrito que los cultivos pueden inhibirse por sobreexposición lumínica (Richmond, 2000). Sin embargo, se conocen algunos sistemas de cultivo que continúan creciendo y aprovechan de mejor manera la sobresaturación lumínica debido a la optimización del burbujeo. Estos sistemas de cultivo se llaman fotobiorreactores de alta densidad celular. En este tipo de fotobiorreactor se pueden obtener concentraciones de biomasa microalgal superiores a 3 gL^{-1} o $1 \times 10^9 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ luego de una semana de cultivo (Contreras, 2003).

2.2.4.2 Burbujeo e intercambio gaseoso

El burbujeo, la aireación o el mezclado pueden ser realizados mediante el empleo de paletas como en el caso de los fotobiorreactores de tipo carrusel, o por medio de bombas como en el caso de los fotobiorreactores de tipo panel y de tipo tubular. Esto facilita el intercambio gaseoso entre el cultivo y la atmósfera (Contreras, 2003).

El mezclado evita la sedimentación de las microalgas y le permite a cada célula el acceso a la zona fótica. Cuando se optimiza el mezclado los fotobiorreactores pueden generar productividades altas debido a que el intercambio gaseoso es adecuado (Contreras, *et al.*, 2003; Richmond, 2000).

El intercambio gaseoso realizado por las microalgas es necesario durante la etapa de cultivo debido al posible cambio de afinidad de la proteína RuBisCO hacia el O₂. Una sobresaturación de O₂ inhibe la fotosíntesis, evita la fijación del CO₂, baja el rendimiento del crecimiento de la microalga y la productividad del sistema. Por otra parte, el sistema es afectado por el cambio del pH y esto genera una modificación drástica en el cultivo. Es por ello que el mezclado eficiente es fundamental (Fernández, 2014; Grobbelaar, 2004).

2.2.4.3 Control de pH y temperatura

El pH es un factor importante para el crecimiento de las microalgas. El cambio de este puede afectar la polaridad de los compuestos del medio de cultivo y como resultado la disponibilidad de los nutrientes se ve comprometida (Ramirez, Queiroz y Jacob, 2013).

Además, la modificación brusca del pH generada por el crecimiento microalgal, puede generar precipitaciones de sales que contienen grupos hidroxilo y fosfatos. Este fenómeno de precipitación deteriora el medio de cultivo y no le permite crecer a la célula (Grobbelaar 2004).

El aumento de la temperatura en un fotobiorreactor puede disminuir la solubilidad de CO₂ en el medio. Lo que afecta su captación con la consecuente disminución de la productividad fotosintética y de biomasa microalgal (Contreras, 2003). Además, la baja concentración de CO₂ presente en el medio, puede afectar la afinidad de la proteína RuBisCO modificando totalmente las condiciones de operación (Grobbelaar 2004). Este tipo de

problemas ocurren a partir de los 40°C y los fotobiorreactores más susceptibles a tener estos problemas son los de tipo panel (Ramirez, *et al.*, 2013).

2.3 Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas

La biomasa de microalgas puede ser empleada en algunos campos. A continuación se destacan los principales usos de la biomasa microalgal.

2.3.1 Microalgas empleadas para la nutrición

Aproximadamente el 90% del peso seco de una microalga contiene proteínas, lípidos y glúcidos lo que representa una fuente nutricional para animales y una posible fuente proteica para la nutrición humana. La fácil digestibilidad de la biomasa microalgal hace que estos microorganismos constituyan una fuente de alimento apetecida (Morris, Quintana, Amarales y Hernandez, 1999).

Existen estudios de digestibilidad en especies como *Chlorella vulgaris* en el que la digestibilidad por los humanos alcanzó el 75% (Spolaore, Joannis, Duran, Isambert, 2006). Además, se conoce que géneros como *Dunaliella*, *Spirulina* y *Haematococcus*, son utilizados como fuente de alimento por su alta producción de vitamina C, beta-caroteno, antioxidantes y ácidos grasos esenciales. Otros géneros como *Arthrospira* presentan algunos efectos positivos como el alivio de la hiperlipidemia, la protección contra daños renales y la supresión de la hipertensión (Priyadarshani, *et al.*, 2012).

La biomasa microalgal es empleada fundamentalmente en la nutrición animal. Para este fin se utiliza el 30% de la producción de biomasa de microalgas para el consumo en la ganadería y para los animales domésticos de microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. Esto se debe a su fácil digestibilidad, a sus beneficios en la salud, al aumento de la respuesta inmune y a la reducción de la infertilidad (Spolaore, *et al.*, 2006).

En la acuicultura, la principal fuente de alimento son las microalgas. Los géneros más usados son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, y *Chaetoceros*. Estas microalgas se emplean en los primeros estados larvarios de muchos peces, crustáceos y moluscos y facilitan el crecimiento y engorde (Hernández, *et al.*, 2014).

2.3.2 Microalgas para la remediación de aguas contaminadas

Las microalgas no solo tienen importancia en el ámbito nutritivo de especies animales. Algunas especies de microalgas han sido empleadas en el tratamiento de aguas residuales y en la remoción de metales pesados de aguas contaminadas (Gómez, 2007). Un claro ejemplo es la especie *Nannochloris oculata*, capaz de eliminar un pesticida organoclorado persistente, tóxico, carcinogénico y teratogénico denominado lindano (Hexaclorociclohexano) con una eficiencia del 68,2% a concentraciones de 0.5mgL^{-1} (Moha, Pérez, Ríos, Ortega y Legaspi, 2012). Varios autores informan porcentajes de remoción de nitratos y óxidos de nitrógeno desde 69%-100% empleando géneros en cultivo mixto de *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Micractinium*, *Synechocystis*, *Gleocapsa* y *Phormidium* (Hernández, *et al.*, 2014).

Otros contaminantes como el amonio, son removidos completamente de aguas residuales cuando se cultiva *Chlorella sp.*, y también reducen el contenido de fosfatos en 80,9% (Wang, *et al.*, 2010).

La remoción de nitratos y fosfatos empleando microalgas alcanzan un porcentaje superior a 50% debido a que la composición química de las microalgas necesita gran cantidad de estos elementos. Además, varias microalgas son capaces de utilizar metales en concentraciones bajas para adherirlos en su material celular como cofactores de proteínas u otros destinos bioquímicos. Un claro ejemplo son los cultivos mixtos de *Chlorella* y *Scenedesmus* empleados para la remoción de Fe, Zn, Mn, Ni y Cr (Hammouda, Gaber y Abdelraouf, 1995).

2.3.3 Microalgas para la producción de energía renovable

Las microalgas son el recurso ideal para la producción de biocombustibles, debido a que estas producen triacilglicéridos (TAG). Además, las tasas de crecimiento elevadas, su fácil adaptación a medios de cultivo, su facilidad para crecer en espacios terrestres pequeños y no cultivables sin necesidad de agua potable y su productividad fotosintética elevada les permite a las microalgas competir con la biomasa vegetal por la producción de energía renovable (Ho, *et al.*, 2012).

Bajo ciertas condiciones de cultivo, muchas de las especies de microalgas son capaces de almacenar altas concentraciones de lípidos que son materia prima para la generación de energía renovable, estas especies son *Crypthecodinium cohnii*, *Prymnesium parvum*, *Phaedactylum tricornutum*, *Chlorella minutissima*, *Schizochytrium sp.*, y *Scenedesmus dimorphus*. Pueden contener lípidos en su célula hasta en un 40% y producen ácidos grasos poliinsaturados capaces de transesterificarse y formar como producto final biodiesel (Fernández, 2012; Gómez, 2007; Marcos, *et al.*, 2008; Priyadarshani, *et al.*, 2012; Santos, *et al.*, 2014).

3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Preparación de los medios de cultivo

3.1.1 Medio de cultivo BG-11

Se prepararon cuatro soluciones madre acorde al protocolo de Rippka (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman y Stanier, 1979). La primera contenía 150 g de NaNO_3 , 7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 3.6 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disueltos en 100 mL de agua destilada. La segunda solución contenía 4 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de EDTA y 2 g de Na_2CO_3 disueltos en 100 mL de agua destilada. La tercera solución contenía 0.6 g de ácido cítrico y 0.6 g de citrato de sodio disueltos en 100 mL de agua destilada. La cuarta solución contenía 2.82 g de H_3BO_3 , 1.81 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.22 g de FeCl_3 disueltos en 10 mL de agua destilada. Una vez preparadas las soluciones madre, se mezcló 10 mL de la solución 1, 10 mL de la solución 2, 10 mL de la solución 3 y 1 mL de la solución 4. Posteriormente se aforó a 1L con agua destilada. La solución resultante fue autoclavada a 121°C y 104 kPa durante 15 minutos.

3.1.2 Solución de Nitrofoska

Se añadió 1.5 mL del estimulante foliar Nitrofoska®foliar 10-4-7-0.2 MgO en 1L de agua destilada. La solución resultante fue autoclavada a 121°C y 104 kPa durante 15 minutos.

3.2 Línea celular y condiciones de cultivo

Para esta investigación se utilizó la microalga *Chlorococcum sp.* Se partió de 500 mL de un starter de 1×10^7 cel·mL⁻¹ en medio BG-11.

El crecimiento de la microalga a escala de laboratorio se realizó en envases que contenían 200 mL de medio BG-11. Se inoculó el medio con un volumen de starter de 20 mL que permitió obtener una concentración inicial de 1×10^6 cel·mL⁻¹. Los recipientes fueron incubados durante 8 días a 25 °C con suministro de aire continuo; además, al cuarto de cultivo se añadió 10 mL de medio fresco.

Una vez que se alcanzó la concentración 1×10^7 cel·mL⁻¹ en envases de 200 mL se procedió a aumentar la escala a 500 mL y posteriormente a 2000 mL.

Luego de 8 días de cultivo en 200 mL la microalga tuvo una concentración de 1×10^7 cel·mL⁻¹ por lo que se escaló a 500 mL. Los cultivos que iniciaron en escala de 500 mL tuvieron una concentración de 1×10^6 cel·mL⁻¹.

Luego de obtener cultivos en 500 mL a una concentración de 1×10^7 cel·mL⁻¹ se escaló a 2000 mL, estos cultivos iniciaron su etapa de crecimiento a una concentración de 1×10^6 cel·mL⁻¹.

El cultivo a escala de laboratorio operó en modo discontinuo en sistema abierto debido a que se interrumpió el sistema a la mitad del tiempo de crecimiento para añadir medio de cultivo BG-11. Esto se realizó con el fin de compensar la pérdida de volumen que fue generada por el burbujeo del cultivo en envases de 200 mL.

3.3 Condiciones de cultivo para fotobiorreactores de 10 L

Se recuperó la biomasa de los cultivos de 5 L con una concentración de 1×10^7 cel·mL⁻¹ mediante centrifugación durante 10 minutos a 25000 rpm. La biomasa recuperada fue inoculada en fotobiorreactores de tipo panel y tubular.

Cada fotobiorreactor contenía 10 L de solución de Nitrofoska. A partir de esta escala se modificaron los factores de estudio. Estas fueron: tipo de reactor (panel o tubular), aireación (continua o semicontinua), malla soporte (presencia o ausencia) e intensidad luminosa (1500 lux o 3000 lux).

3.3.1 Factor 1: tipo de reactor

3.3.1.1 Reactor panel

El reactor panel se diseñó en vidrio. Sus dimensiones fueron: espesor de vidrio (ev) 4 mm, altura (h) 50 cm, ancho (a) 35 cm, profundidad (p) 7.5 cm, volumen disponible (Vd) 13.125 L, volumen de trabajo (Vt) 10 L y relación volumen de trabajo-volumen disponible (RVt-Vd) 19/25.

3.3.1.2 Reactor tubular

Se diseñó el reactor tubular en policarbonato transparente de 250 micrones. Sus dimensiones fueron (h) 110 cm, (a) 32 cm, (Vd) 13.024 L, (Vt) 10 L, (RVd-Vt) 19/25. Además, se realizó una división del fotobiorreactor de tipo tubular para conformar un tipo de "V" con cada lado de 55 cm.

3.3.2 Factor 2: aireación

Para la aireación se emplearon bombas de pecera marca POWER 2000 de doble salida. Las salidas fueron conectadas a tubos de plástico para pecera con las siguientes dimensiones: largo (l) 5 cm, diámetro (d) 0.5 cm.

Para ambos tipos de fotobiorreactores, los dos tubos de plástico fueron unidos a un dispersor de aire de aluminio de dos salidas y éste a su vez a un tubo de plástico para pecera de (l) 100 cm y (d) 0.5 cm (Figura 6).

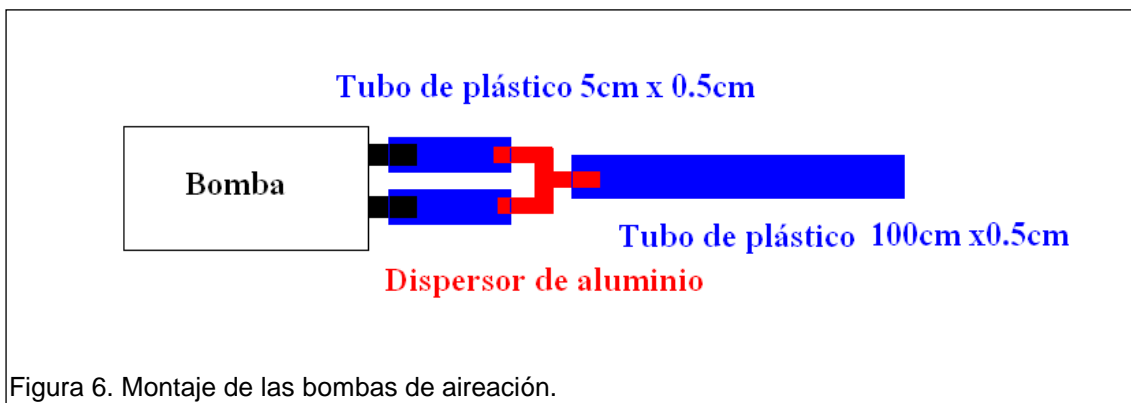


Figura 6. Montaje de las bombas de aireación.

Para la aireación continua, la bomba se mantuvo en funcionamiento durante todo el tiempo de cultivo, para la aireación semicontinua la bomba se mantuvo en funcionamiento durante 8 horas cada día.

3.3.3 Factor 3: soporte físico

El soporte físico es una malla de material geotextil transparente de 0.01 mm de espesor y 0.05 mm de diámetro entre poros.

La malla de soporte físico se colocó al interior del fotobiorreactor panel y del fotobiorreactor tubular con el fin de evaluar el efecto de esta en el crecimiento de la microalga CMIE-H2-001.

3.3.4 Factor 4: intensidad luminosa

Para la iluminación se emplearon lámparas Voltech® de (l) 32 cm, (h) 3 cm de 8 W y se midió la intensidad luminosa con un luxómetro HoldPeak® HP-881A.

3.4 Diseño experimental

La mezcla aleatoria de las variables a analizar permitió trabajar con un diseño factorial completamente aleatorio. Con esto se obtuvieron 16 tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Modificaciones de los factores de estudio propuestos

Nombre del tratamiento	Tipo de reactor	Aireación	Malla soporte	Intensidad luminosa
A	Panel	Continuo	Presencia	1500 lux
B	Panel	Continuo	Presencia	3000 lux
C	Panel	Continuo	Ausencia	1500 lux
D	Panel	Continuo	Ausencia	3000 lux
E	Tubular	Semicontinuo	Presencia	1500 lux
F	Tubular	Semicontinuo	Presencia	3000 lux
G	Tubular	Semicontinuo	Ausencia	1500 lux
H	Tubular	Semicontinuo	Ausencia	3000 lux
I	Panel	Semicontinuo	Presencia	1500 lux
J	Panel	Semicontinuo	Presencia	3000 lux
K	Panel	Semicontinuo	Ausencia	1500 lux
L	Panel	Semicontinuo	Ausencia	3000 lux
M	Tubular	Continuo	Presencia	1500 lux
N	Tubular	Continuo	Presencia	3000 lux
O	Tubular	Continuo	Ausencia	1500 lux
P	Tubular	Continuo	Ausencia	3000 lux

A todos los tratamientos se les suministró diariamente durante 10 minutos CO_2 a una concentración de $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; la concentración inicial de todos los fotobiorreactores en el primer día fue de $1 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.5 Variable de respuesta: tasa de crecimiento

Para la medición de las concentraciones celulares de microalgas se trabajó con una cámara de Neubauer Superior Marienfield. Se procedió a extraer 1 mL del cultivo en crecimiento cada día y se realizó el recuento celular. Se tomaron medidas de cada tratamiento por triplicado desde el primer día de cultivo hasta el octavo día.

3.6 Análisis estadístico

Se construyeron curvas de crecimiento con los datos del recuento celular. A partir de los datos recolectados se pudo realizar una prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0,05 para lo cual se utilizó el software estadístico SPSS 2.0 y la calculadora de valor P para calcular las frecuencias observadas obtenidas

(<http://www.graphpad.com/quickcalcs/pValue1/>).

4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Crecimiento de las microalgas a escala piloto en fotobiorreactores de tipo panel

4.1.1 Intensidad luminosa

Los fotobiorreactores de tipo panel empleados en esta investigación fueron operados en modo discontinuo en sistema cerrado. Además, estos fueron diseñados en vidrio con dimensiones de altura, ancho y profundidad específicas que permitieron el fácil manejo de la disposición a la luz y la aireación (Figura 7).

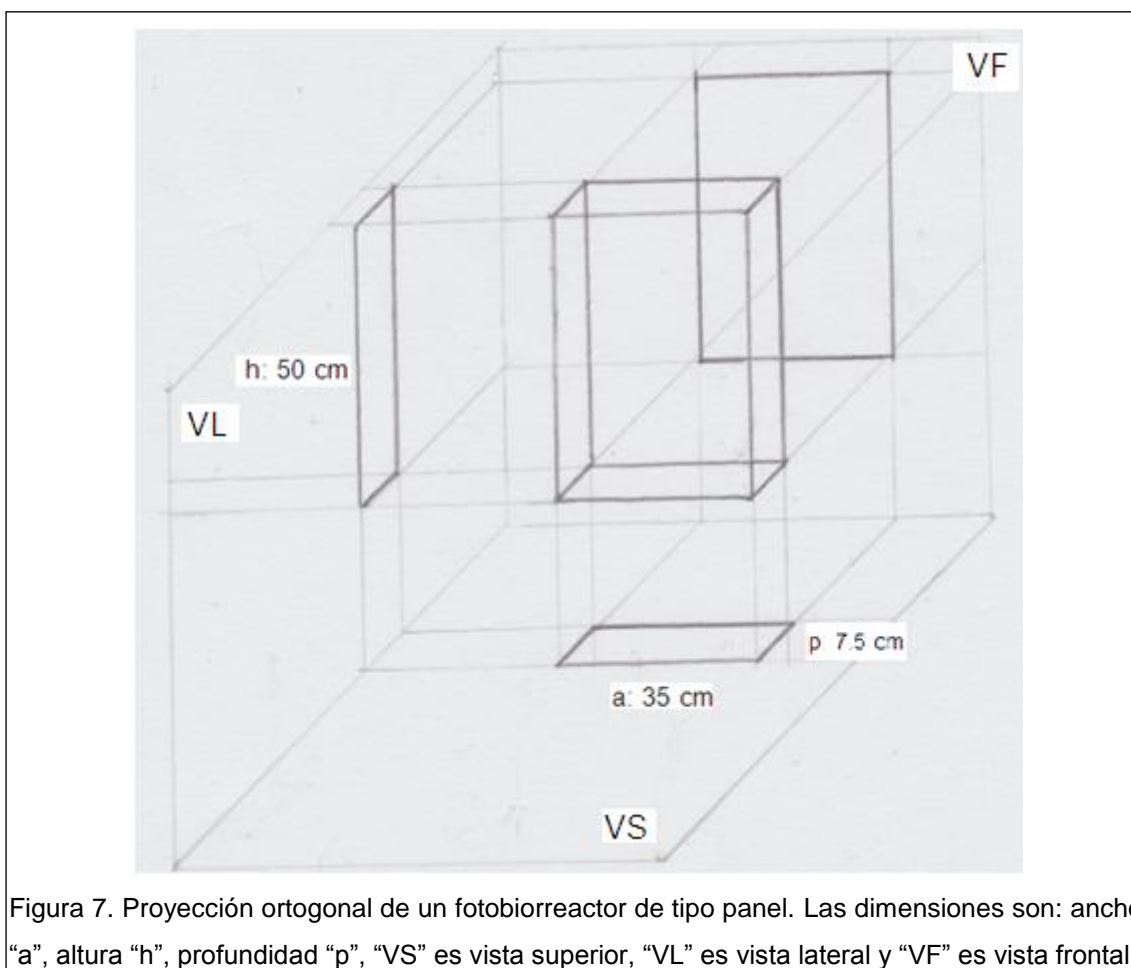


Figura 7. Proyección ortogonal de un fotobiorreactor de tipo panel. Las dimensiones son: ancho "a", altura "h", profundidad "p", "VS" es vista superior, "VL" es vista lateral y "VF" es vista frontal.

Para obtener la capacidad total de intensidad luminosa en cada sistema de cultivo, se dispuso a cada fotobiorreactor de tipo panel sobre una base de granito a 3 cm de distancia de la pared, a 10 cm de distancia entre fotobiorreactores de frente y a 9 cm de distancia entre fotobiorreactores lateralmente (Figura 8).

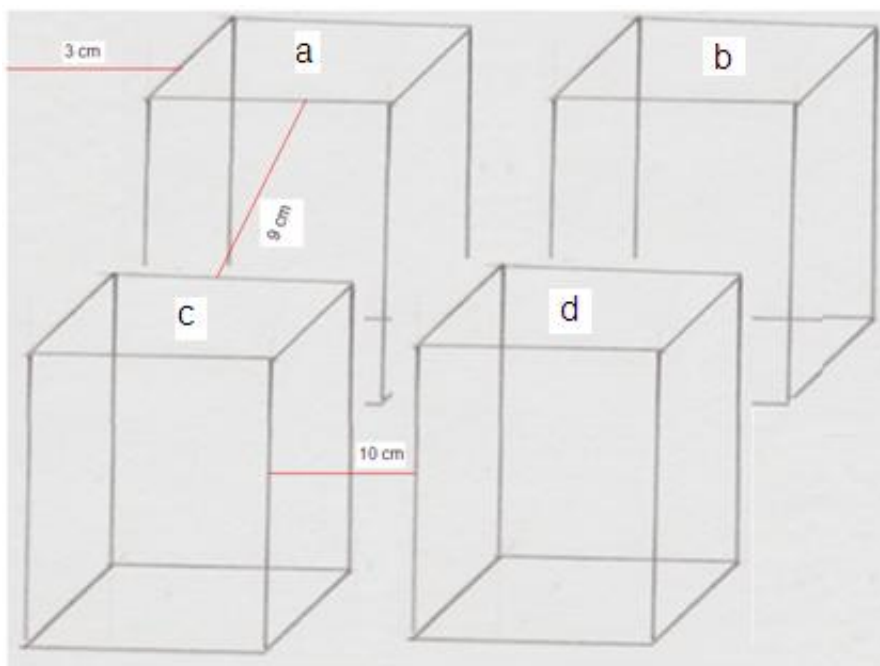


Figura 8. Distancia entre fotobiorreactores de tipo panel.

- a) Desde la pared hasta el fotobiorreactor "a" hay una distancia de 3cm, ocurre lo mismo desde la pared hasta el fotobiorreactor "c".
- b) Entre fotobiorreactor "a" y "b" hay una distancia de 10cm, ocurre lo mismo entre "c" y "d".
- c) Entre fotobiorreactor "b" y "d" hay una distancia de 9cm, ocurre lo mismo entre "a" y "c".

La intensidad luminosa generada a partir de esta configuración espacial fue de 1500 lux para una lámpara y de 3000 lux para dos lámparas, lo que fue comprobado mediante un luxómetro. La disposición de cada lámpara fue específica para cada fotobiorreactor de tipo panel (Figura 9 y 10).

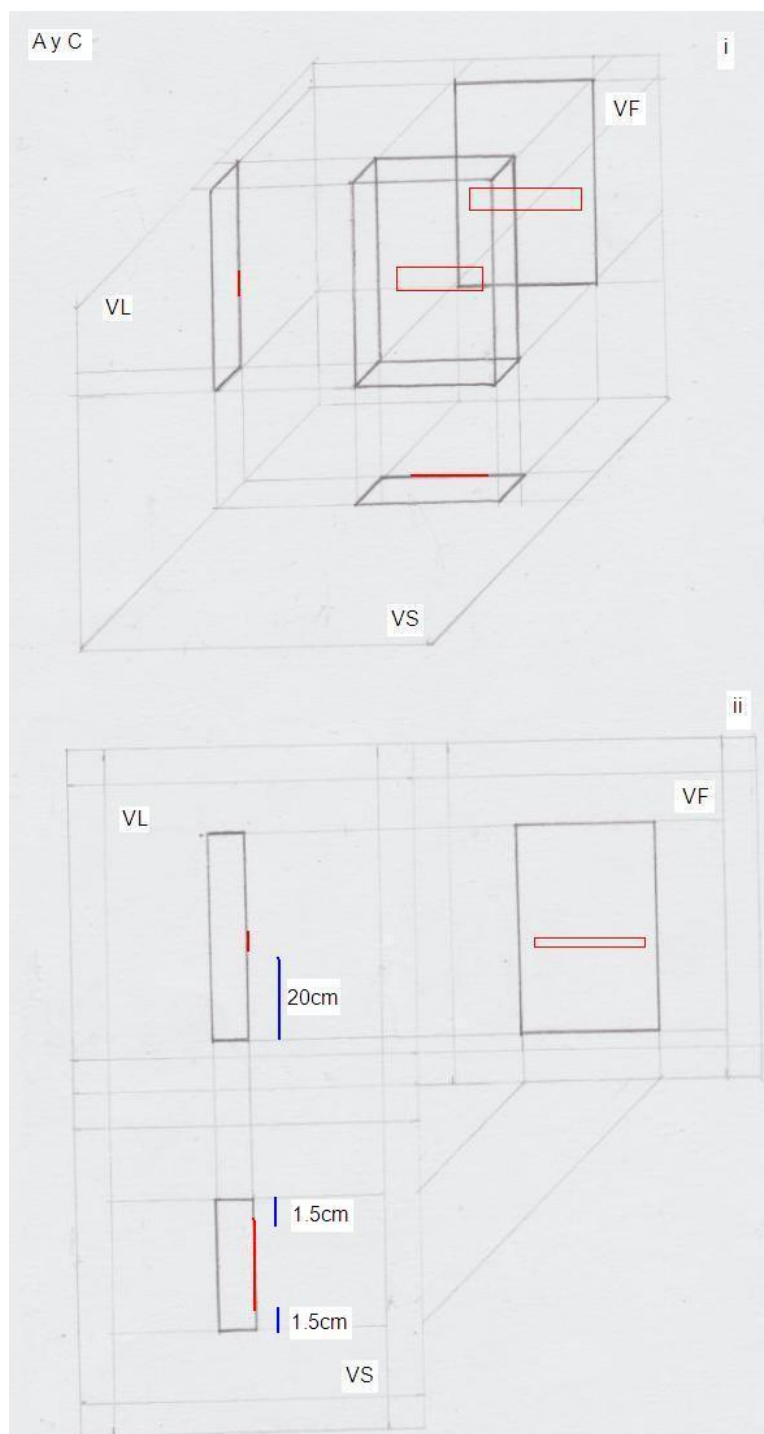


Figura 9. Primera disposición de lámparas para fotobiorreactores de tipo panel.

- i. Proyección ortogonal de un fotobiorreactor de tipo panel, donde "VS" es vista superior, "VF" es vista frontal, "VL" es vista lateral y de color rojo se aprecia la disposición de la lámpara. Esta configuración fue empleada para el fotobiorreactor "a" y para el fotobiorreactor "c" mencionados en la Figura 8.
- ii. Abatimiento de un fotobiorreactor de tipo panel.

En el abatimiento, en VL se observa en color azul la distancia desde la base del fotobiorreactor hasta el borde de la base de la lámpara, en VS se observa en color azul la distribución del ancho del fotobiorreactor (35 cm) y la disposición de la lámpara, en (VF) en color rojo se observa cómo queda colocada la lámpara. Para una observación del material concreto diríjase al anexo 3.

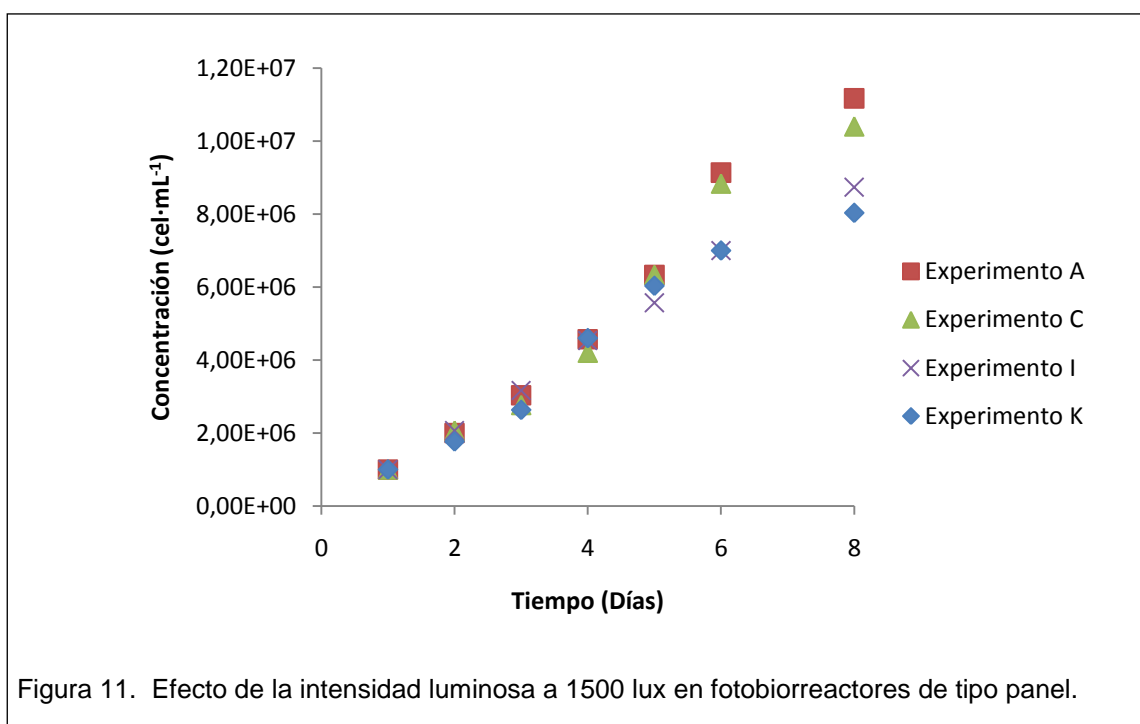


Figura 10. Segunda disposición de lámparas para fotobiorreactores de tipo panel.

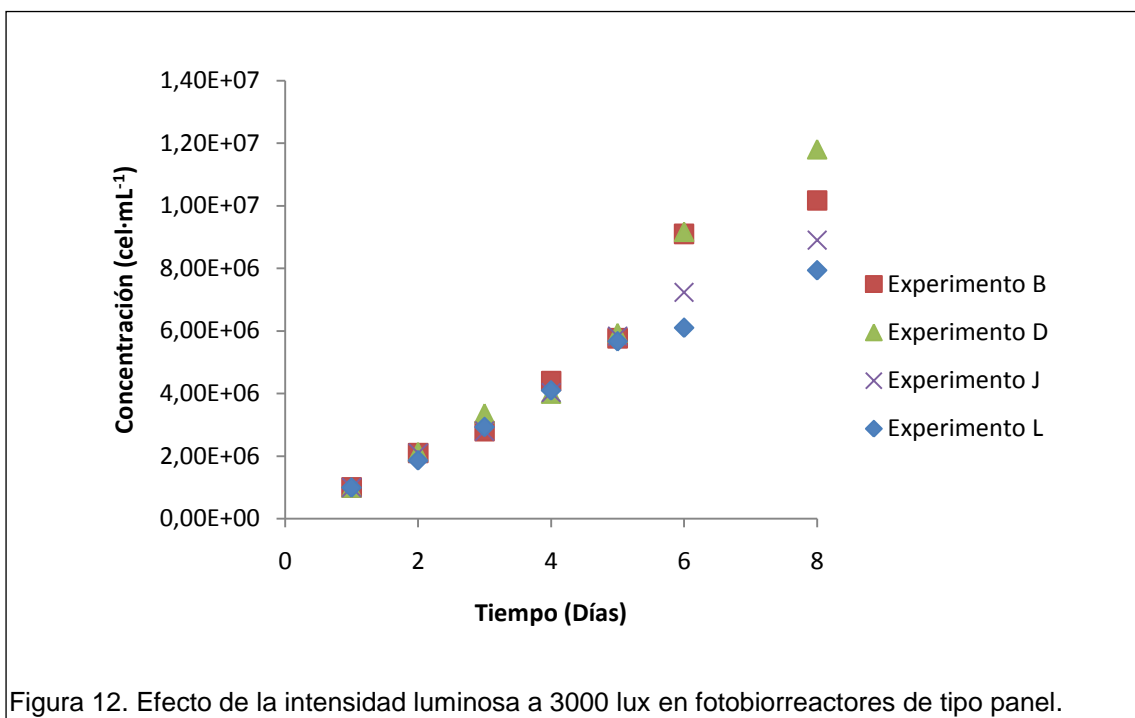
- i. Proyección ortogonal de un fotobiorreactor de tipo panel, esta configuración fue empleada para el fotobiorreactor "b" y para el fotobiorreactor "d" mencionados en la Figura 8.
- ii. Abatimiento de un fotobiorreactor de tipo panel.

En el abatimiento, en VL se observa en azul la distancia desde la base del fotobiorreactor hasta el borde de la base de la primera lámpara (20 cm) y de la segunda lámpara (3 cm), en VS se observa en azul la distribución del ancho del fotobiorreactor (35 cm) y la disposición de las lámparas, en VF en rojo se observa cómo quedan colocadas las lámparas y la distancia entre la primera y la segunda lámpara.

Las curvas de crecimiento realizadas determinaron que la concentración de biomasa microalgal obtenida en fotobiorreactores de tipo panel fue mayor cuando la disposición de luz irradió una intensidad luminosa de 3000 lux en 8 días de cultivo (Figura 11 y 12).

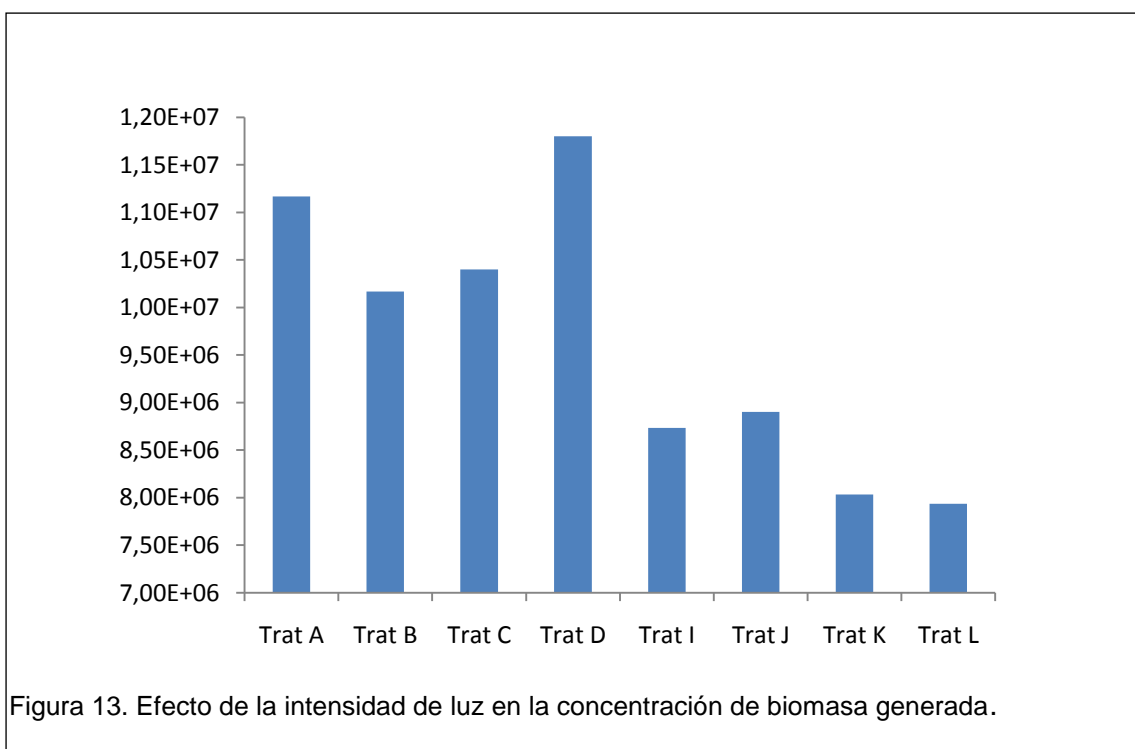


Para el efecto de la intensidad luminosa a 1500 lux, en 8 días de cultivo el tratamiento con mayor concentración ($1,12 \times 10^7 \pm 9,07 \times 10^5$ cel·mL⁻¹) fue "A". El resultado más bajo fue del tratamiento "K" ($8,03 \times 10^6 \pm 3,79 \times 10^5$ cel·mL⁻¹).



Para el efecto de la intensidad luminosa a 3000 lux en fotobiorreactores de tipo panel, a mayor concentración ($1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹) y la menor concentración ($7,93 \times 10^6 \pm 2,52 \times 10^5$ cel·mL⁻¹) durante 8 días de cultivo fue para el tratamiento “D” y el tratamiento “L”, respectivamente.

El efecto del factor intensidad luminosa en el crecimiento de las microalgas se puede apreciar a continuación (Figura 13).



4.1.2 Aireación

Para montar el sistema de aireación propuesto en la metodología se realizó un corte en el vidrio de 7.5 cm de cada fotobiorreactor de tipo panel (Figura 14).

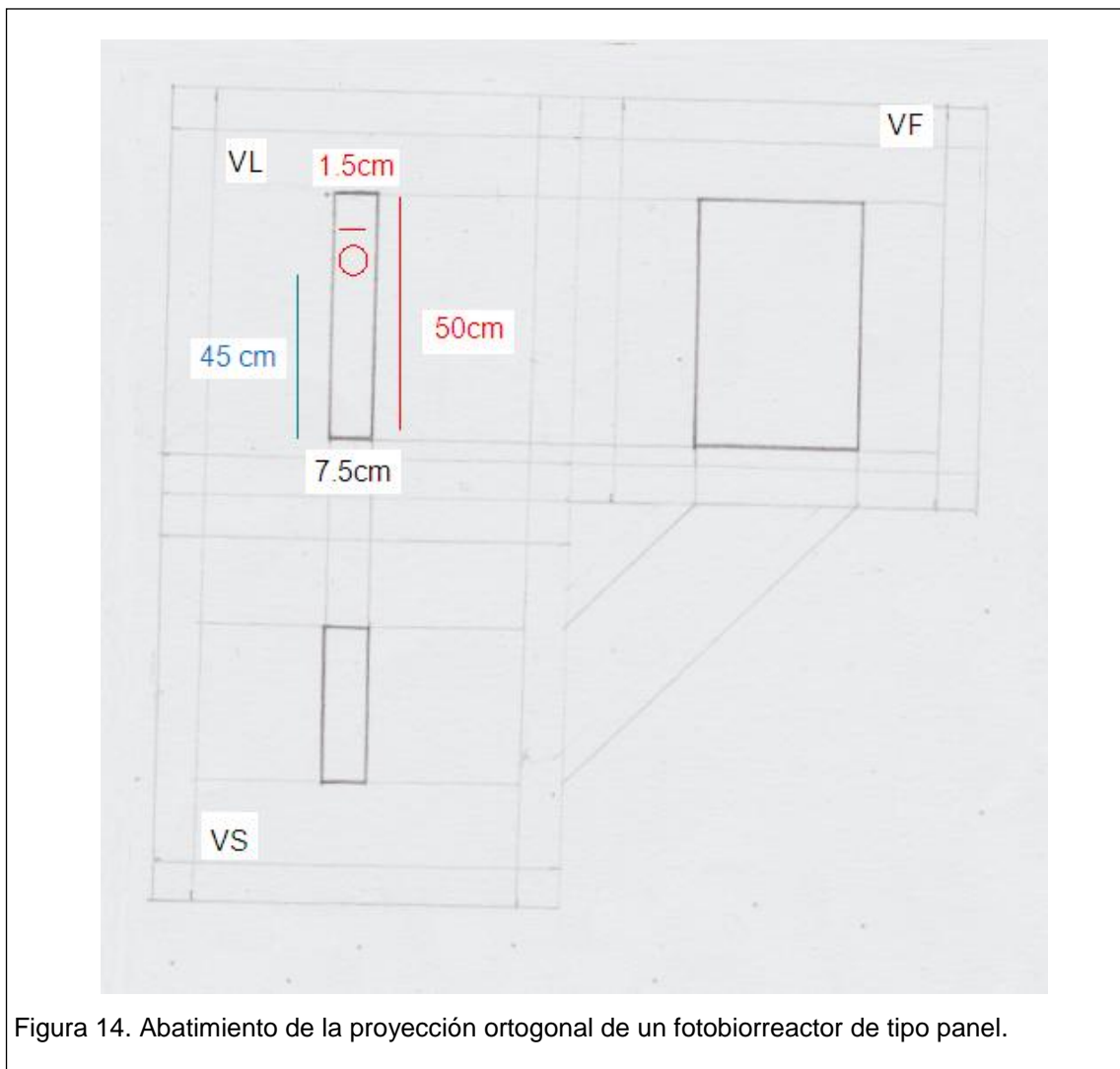
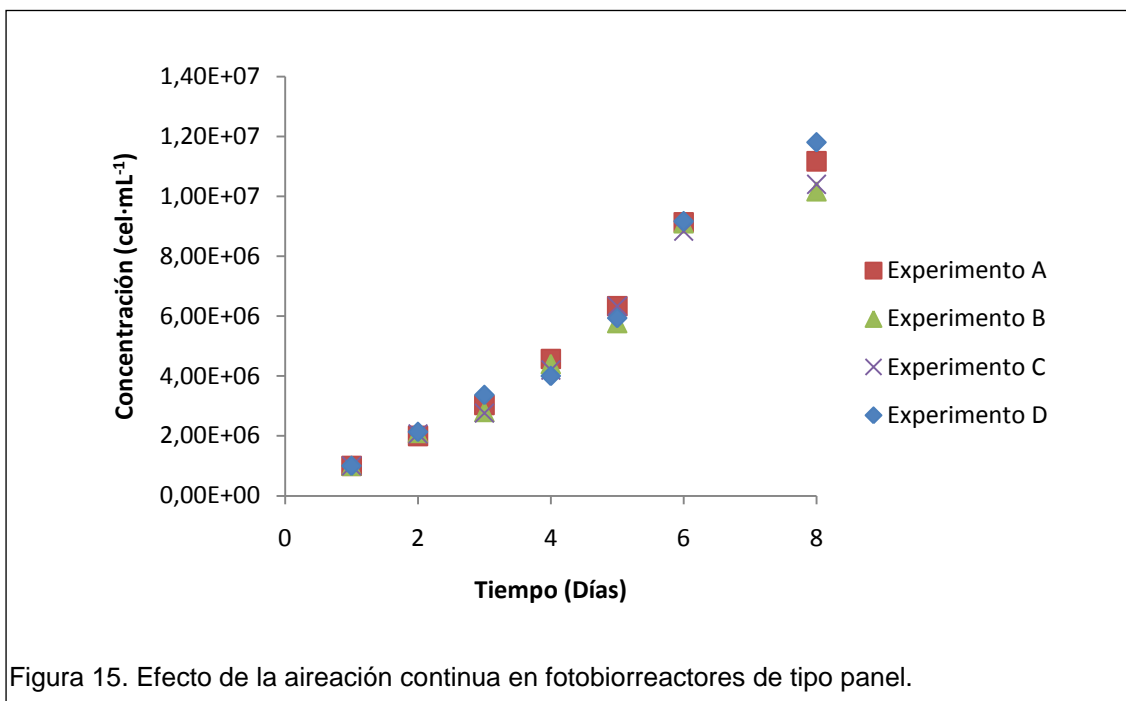


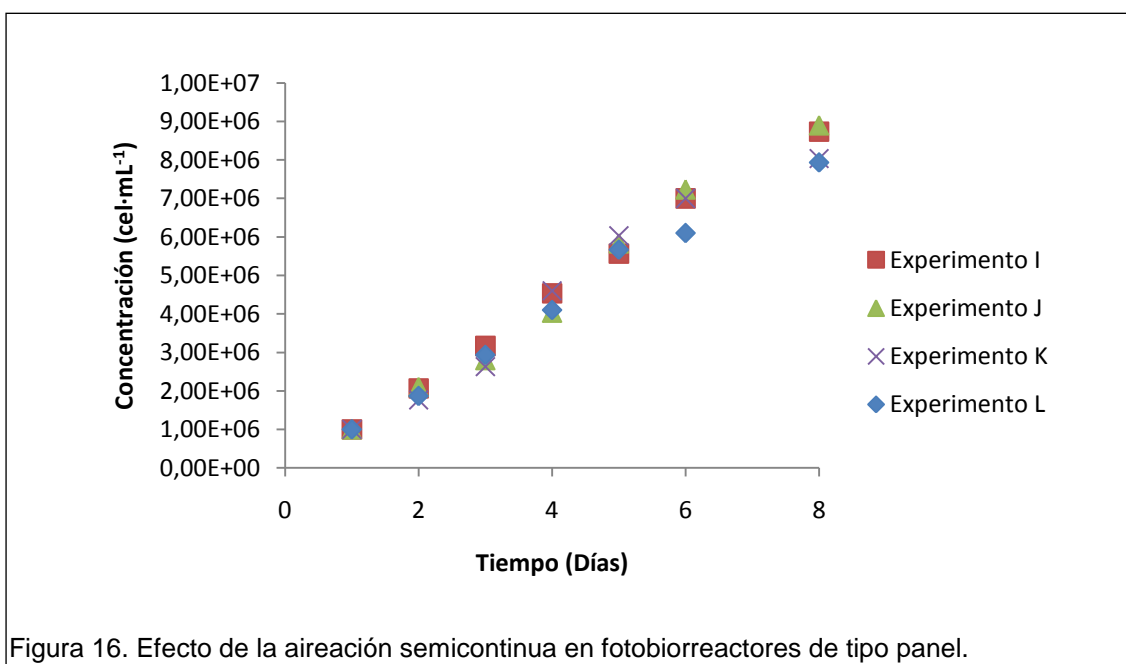
Figura 14. Abatimiento de la proyección ortogonal de un fotobiorreactor de tipo panel.

La perforación lateral del vidrio de (p) 7.5 cm para la conexión del tubo de aireación fue realizado a 45 cm desde la base del fotobiorreactor. El diámetro de la perforación realizada fue de 1.5 cm y fue centrada en el vidrio. Para una observación del material concreto diríjase al anexo 3.

Las curvas de crecimiento realizadas determinaron que la concentración de biomasa microalgal obtenida en fotobiorreactores de tipo panel fue mayor cuando la aireación fue continua (Figura 15 y 16).



Para el efecto de la aireación continua, el tratamiento con mejor resultado fue “D” ($1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹). El tratamiento con el resultado más bajo fue el experimento “B” ($1,02 \times 10^7 \pm 9,29 \times 10^5$ cel·mL⁻¹) durante 8 días de cultivo.



Para el efecto de la aireación semicontinua ($8\text{h}\cdot\text{día}^{-1}$), el tratamiento con mejor resultado ($8,90 \times 10^6 \pm 1,00 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el tratamiento con el resultado más bajo ($7,93 \times 10^6 \pm 2,52 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) en 8 días de cultivo fue para “J” y “L”, respectivamente.

4.1.3 Soporte físico

La malla geotextil empleada como soporte físico para la microalga fue colocada en el interior del fotobiorreactor de tipo panel desde la tapa hacia el fondo del reactor (Figura 17).

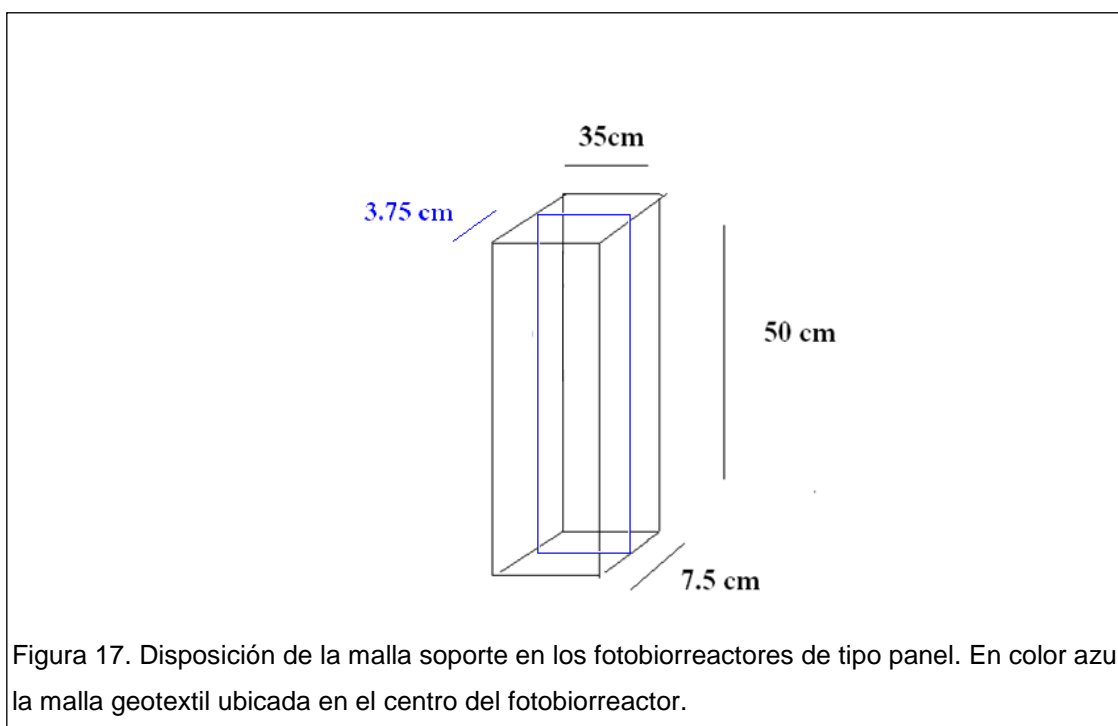


Figura 17. Disposición de la malla soporte en los fotobiorreactores de tipo panel. En color azul la malla geotextil ubicada en el centro del fotobiorreactor.

Las curvas de crecimiento realizadas determinaron que la concentración de biomasa microalgal obtenida en fotobiorreactores de tipo panel fue mayor cuando no se coloca el soporte físico (Figura 18 y 19).

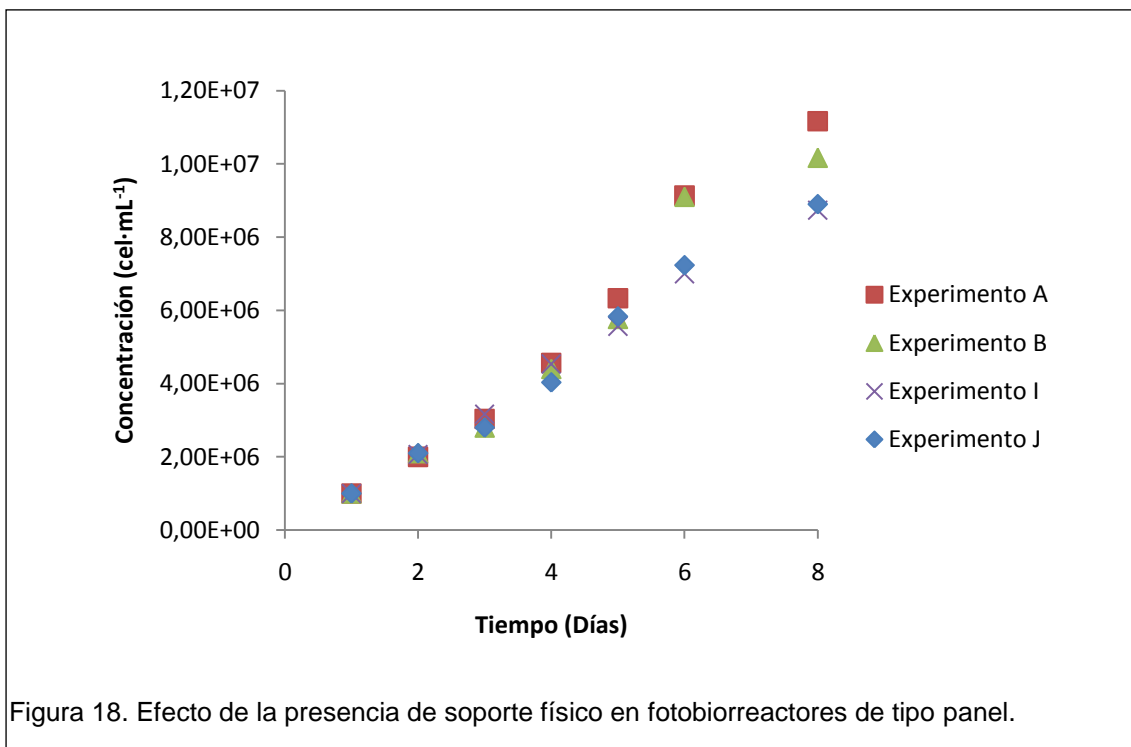


Figura 18. Efecto de la presencia de soporte físico en fotobiorreactores de tipo panel.

Para el efecto de la presencia de soporte físico en fotobiorreactores de tipo panel, el tratamiento con mejor resultado fue el del experimento “A” ($1,12 \times 10^7 \pm 9,07 \times 10^5$ cel·mL⁻¹). El tratamiento con el resultado más bajo fue el experimento “I” ($8,73 \times 10^6 \pm 2,52 \times 10^5$ cel·mL⁻¹).

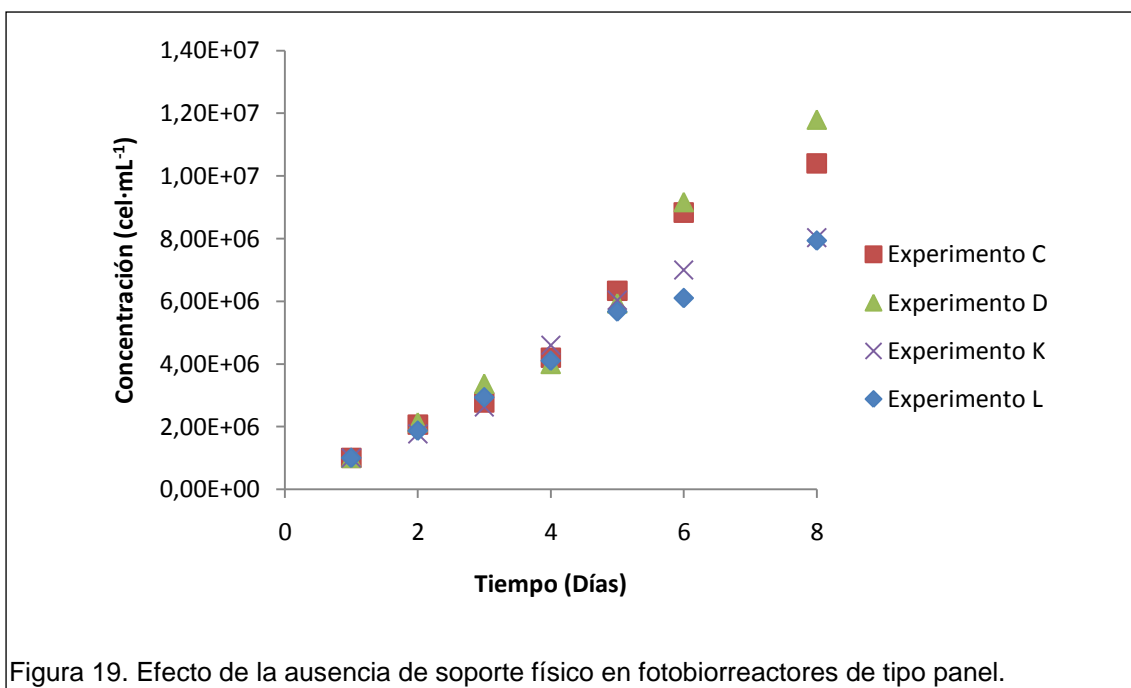


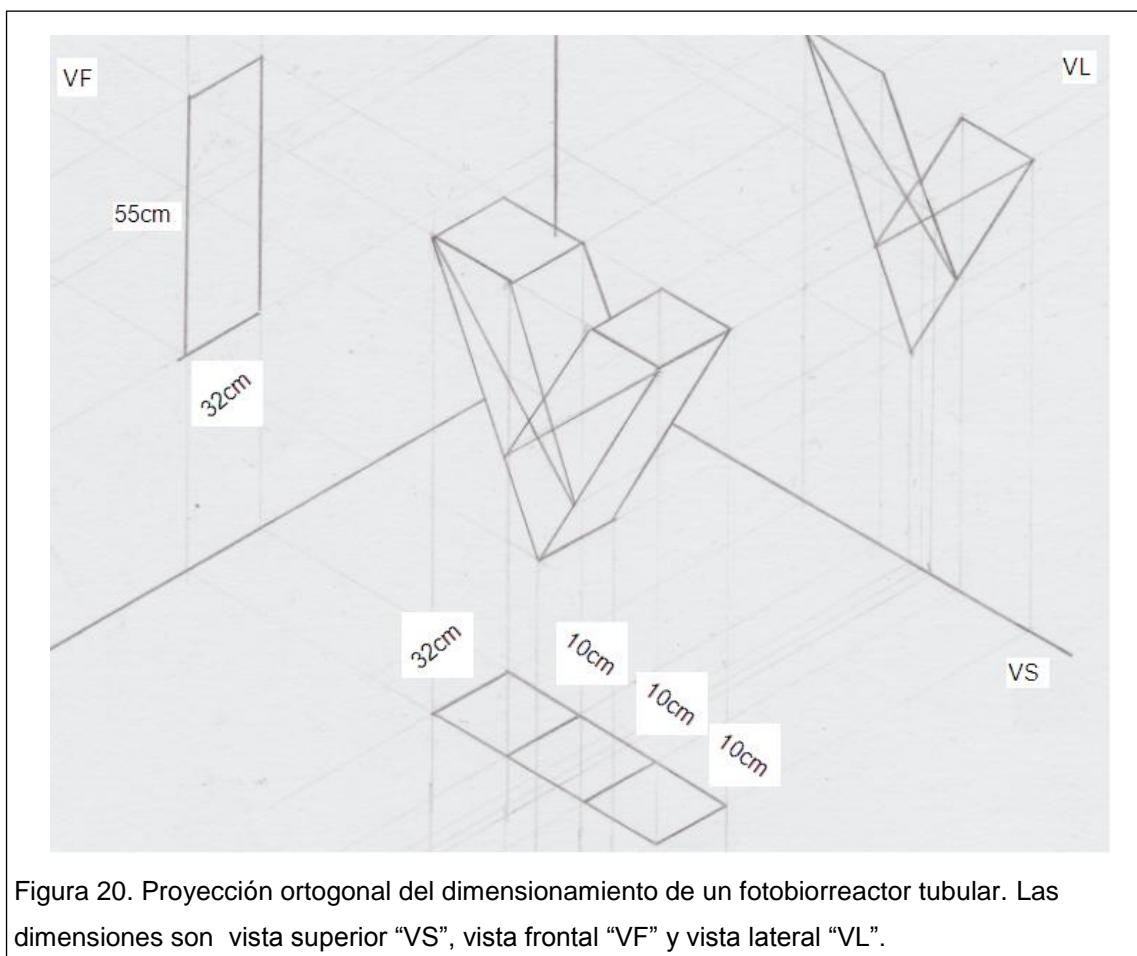
Figura 19. Efecto de la ausencia de soporte físico en fotobiorreactores de tipo panel.

Para el efecto de la ausencia de soporte físico en fotobiorreactores de tipo panel, el tratamiento “D” obtuvo la mayor concentración ($1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹), mientras que el tratamiento “L” generó la menor concentración ($7,93 \times 10^6 \pm 2,52 \times 10^5$ cel·mL⁻¹).

4.2 Crecimiento de las microalgas a escala piloto en fotobiorreactores de tipo tubular

4.2.1 Intensidad luminosa

Los fotobiorreactores de tipo tubular empleados en esta investigación fueron operados en modo discontinuo en sistema cerrado. Además, estos fueron diseñados en policarbonato de 250 micrones con dimensiones de altura, ancho y profundidad específicas que permitieron el fácil manejo de la disposición a la luz y la aireación (Figura 20).



En VF se observa que la altura (h) es de 55 cm, la altura total del fotobiorreactor extendido es de 110 cm. En VS se observa la longitud que ocupa la altura del fotobiorreactor doblado, extendido cubre 110 cm, doblado en conformación de V ocupa 30 cm. El volumen disponible del fotobiorreactor de tipo tubular es de 13.024 L y el volumen de trabajo en esta investigación fue de 10 L.

El material de policarbonato transparente es bidimensional, por lo que no se puede apreciar las tres dimensiones necesarias para el volumen disponible como en el fotobiorreactor de tipo panel. Sin embargo, el volumen total fue medido con agua destilada hasta llenar completamente todo el espacio. Además, se observó que el volumen de trabajo de 10 L no cumple con una profundidad de 3.7 cm como se espera en el dimensionamiento. Esto se debe a la conformación en "V" propuesta.

Los fotobiorreactores se colocaron sobre una base doble de aluminio. Esta disposición permitió manejar de forma óptima la intensidad luminosa irradiada a cada sistema (Figura 21).

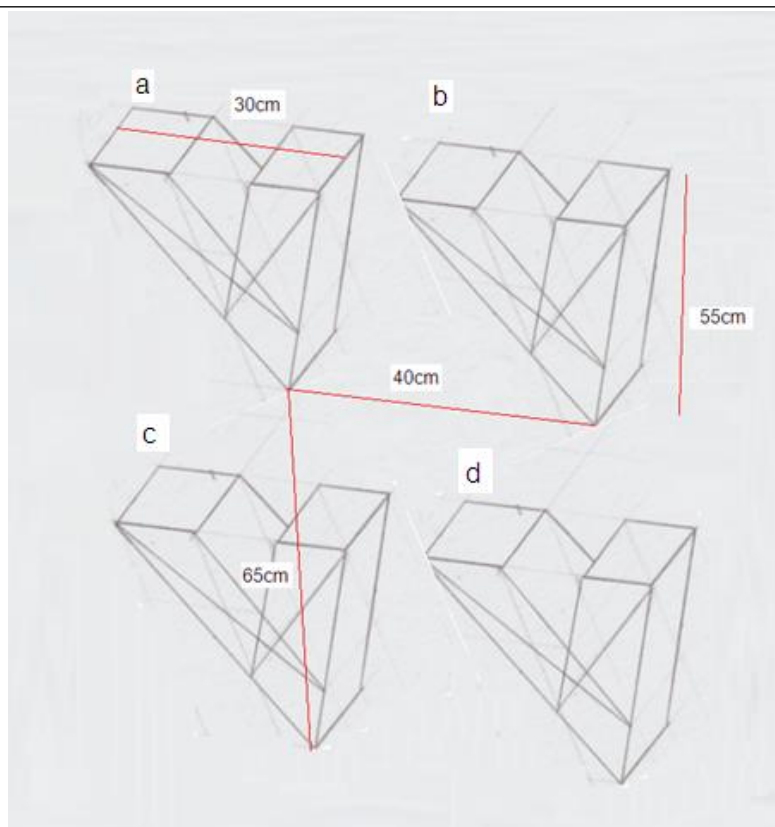


Figura 21. Disposición de los fotobiorreactores de tipo tubular.

- i. Los fotobiorreactores fueron dispuestos sobre una base doble de aluminio, la altura de la base de aluminio es de 125 cm desde el piso y desde la pared hacia la base de aluminio hay una distancia de 30 cm.
- ii. La distancia entre el vértice del fotobiorreactor "a" y del fotobiorreactor "b" es de 40 cm, ocurre lo mismo entre los fotobiorreactores "c" y "d".
- iii. La distancia entre el vértice del fotobiorreactor "a" y del fotobiorreactor "c" es de 65 cm, ocurre lo mismo entre los fotobiorreactores "b" y "d".

La intensidad luminosa generada a partir de esta configuración espacial fue de 1500 lux para una lámpara y de 3000 lux para dos lámparas, esto fue comprobado mediante un luxómetro. La disposición de cada lámpara fue específica para cada fotobiorreactor (Figura 22 y 23).

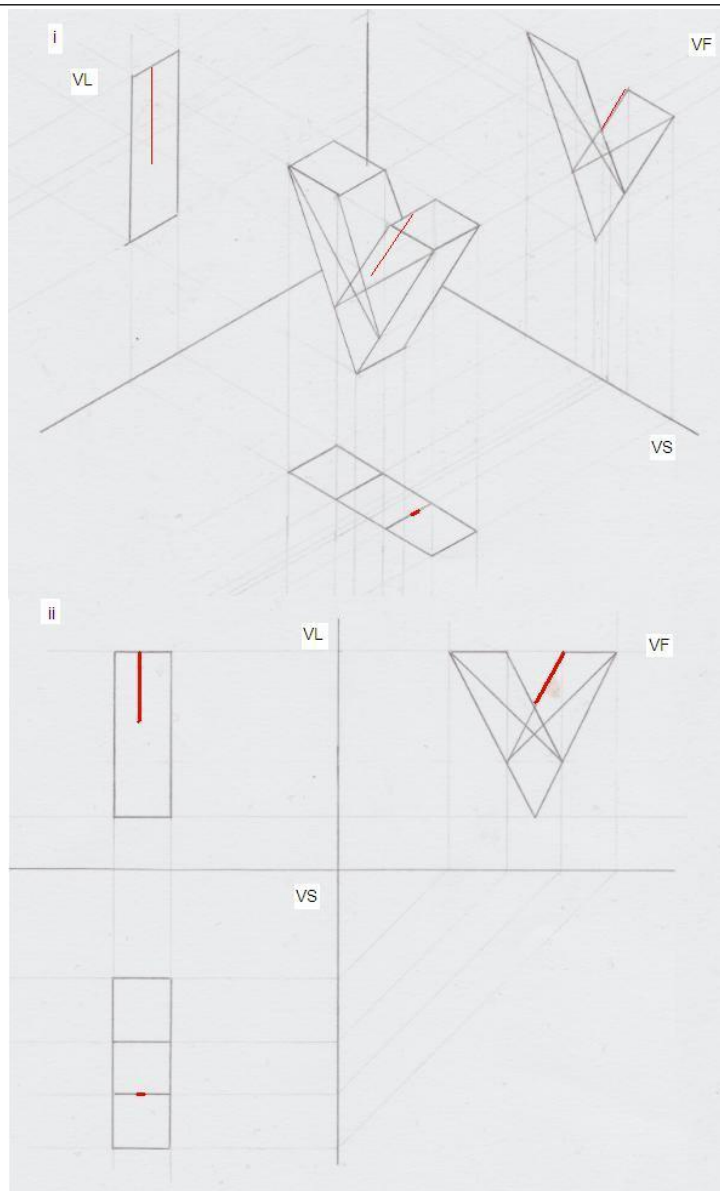


Figura 22. Primera disposición de lámparas para fotobiorreactores de tipo tubular.

- i. Proyección ortogonal de un fotobiorreactor de tipo tubular, esta configuración fue empleada para el fotobiorreactor “a” y “d” mencionados en la Figura 20.
- ii. Abatimiento de un fotobiorreactor de tipo tubular.

En el abatimiento, en VL se puede apreciar en color rojo la disposición de la lámpara en relación al recubrimiento de policarbonato del fotobiorreactor. La distancia desde el borde derecho e izquierdo hasta la lámpara es de 14 cm. En VS y VF se puede observar en color rojo el lugar que ocupa la lámpara en el fotobiorreactor de tipo tubular.

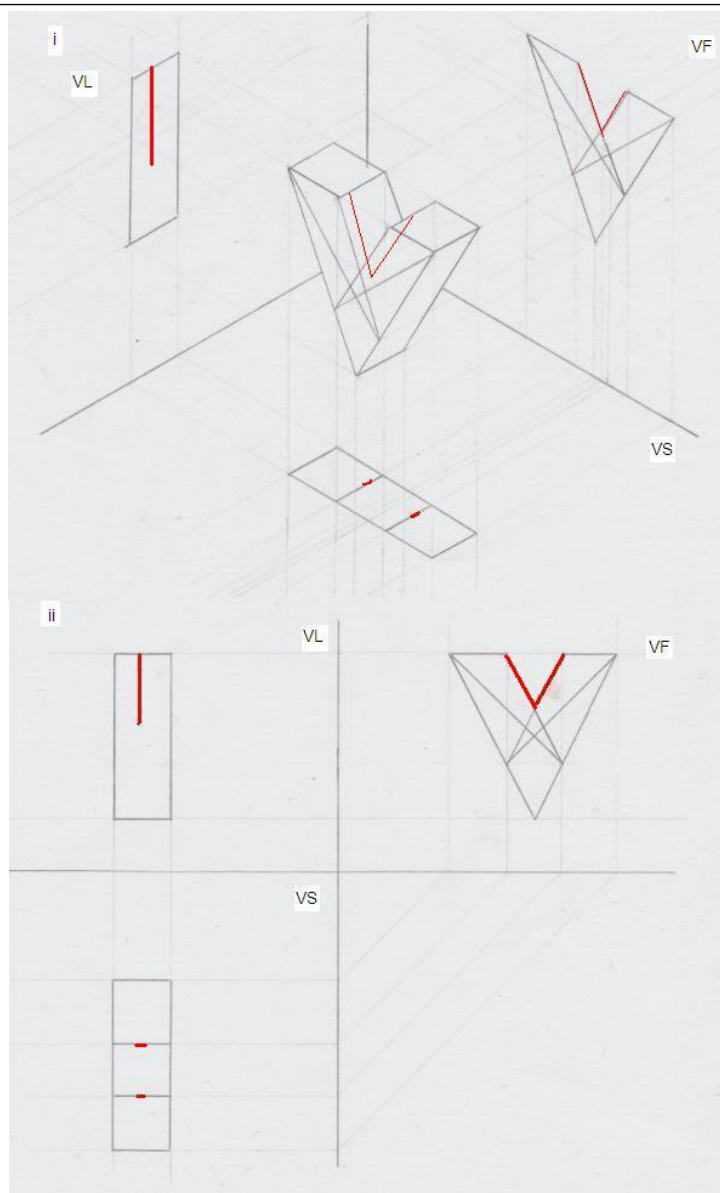


Figura 23. Segunda disposición de lámparas para fotobiorreactores de tipo tubular.

- i. Proyección ortogonal de un fotobiorreactor de tipo tubular, esta configuración fue empleada para el fotobiorreactor “b” y “c” mencionados en la Figura 20.
- ii. Abatimiento de un fotobiorreactor de tipo tubular.

Las curvas de crecimiento realizadas determinaron que la concentración de biomasa microalgal obtenida en fotobiorreactores de tipo tubular fue mayor cuando la disposición de luz irradió una intensidad luminosa de 3000 lux en 8 días de cultivo (Figura 24 y 25).

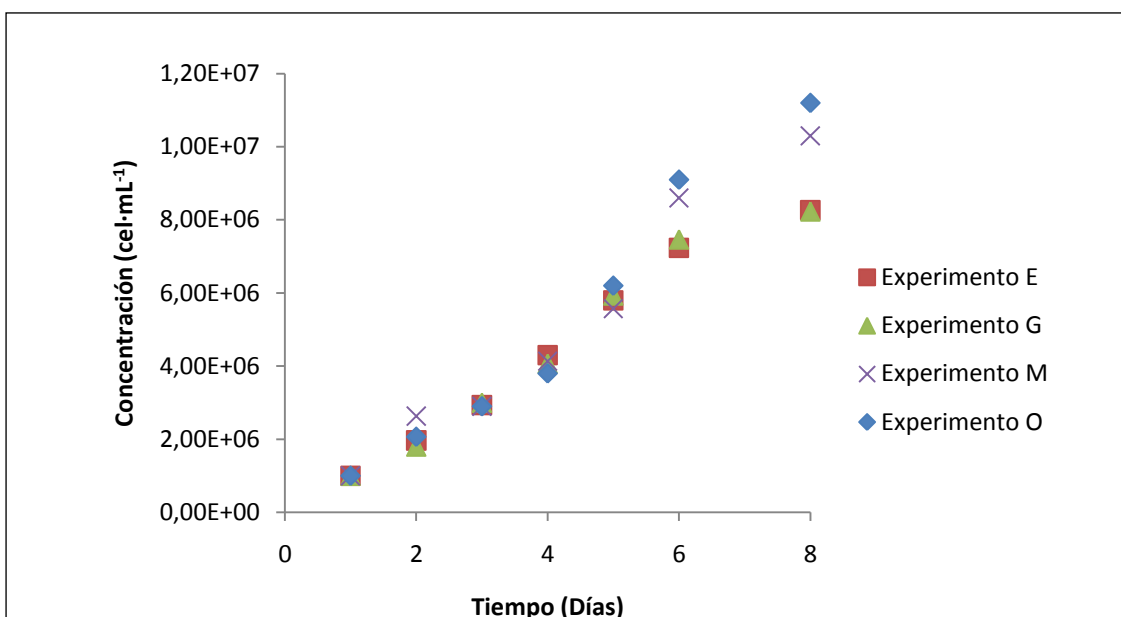


Figura 24. Efecto de la intensidad luminosa a 1500 lux en fotobiorreactores de tipo tubular.

Para el efecto de la intensidad luminosa a 1500 lux, la mayor concentración ($1,12 \times 10^7 \pm 1,57 \times 10^6$ cel·mL⁻¹) se obtuvo en el tratamiento "O" mientras que la menor concentración fue del tratamiento "G" ($8,23 \times 10^6 \pm 6,66 \times 10^5$ cel·mL⁻¹) durante 8 días de cultivo.

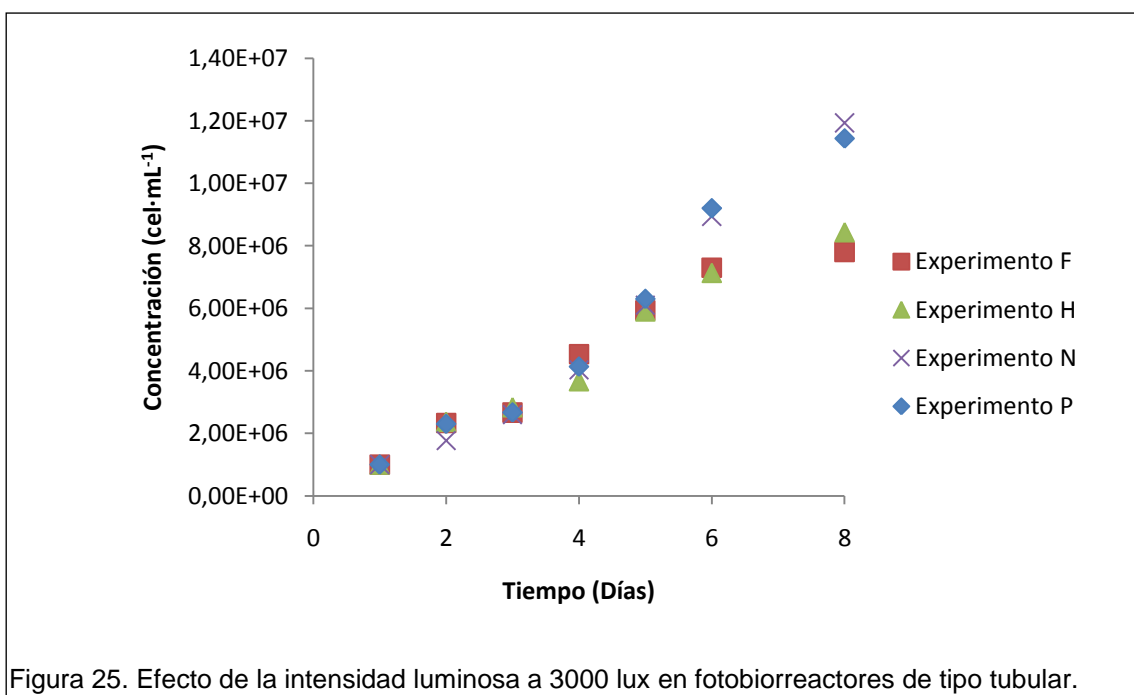
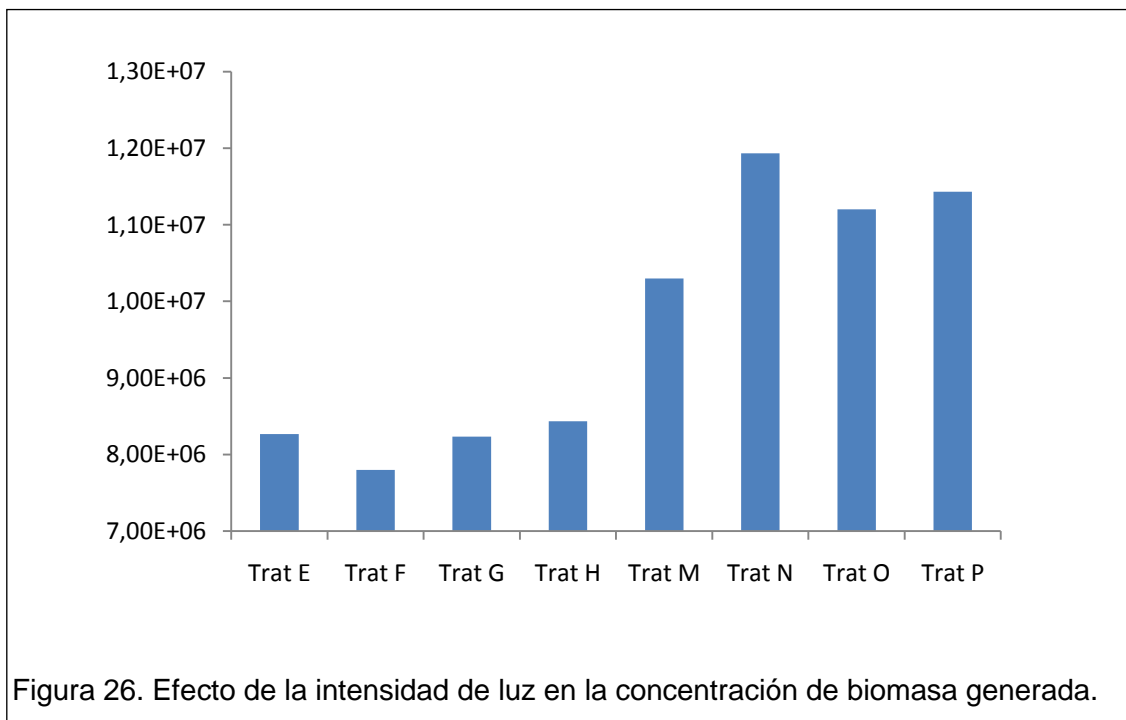


Figura 25. Efecto de la intensidad luminosa a 3000 lux en fotobiorreactores de tipo tubular.

Para el efecto de la intensidad luminosa a 3000 lux, el experimento con mejor resultado fue el experimento "N" ($1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5$ cel·mL⁻¹). El resultado más bajo fue del experimento "F" ($7,80 \times 10^6 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹).

El efecto del factor intensidad luminosa en el crecimiento de las microalgas se puede apreciar a continuación (Figura 26).



4.2.2 Aireación

Para montar el sistema de aireación propuesto en la metodología se realizó un corte en el ancho del policarbonato de 32 cm, En VL se observa en color rojo la distancia desde la base del fotobiorreactor tubular hasta el lugar de corte, el corte realizado fue de 1 cm horizontalmente y fue centrado entre los 32 cm de longitud del ancho. En VF y VS se observa en color rojo el lugar que ocupa el corte en el fotobiorreactor tubular (Figura 27).



Figura 27. Abatimiento de la proyección ortogonal del corte realizado al polietileno del fotobiorreactor tipo tubular para la conexión del tubo de aireación.

Las curvas de crecimiento realizadas determinaron que la concentración de biomasa microalgal final obtenida en fotobiorreactores de tipo tubular aumenta cuando el burbujeo es continuo (Figura 28 y 29).

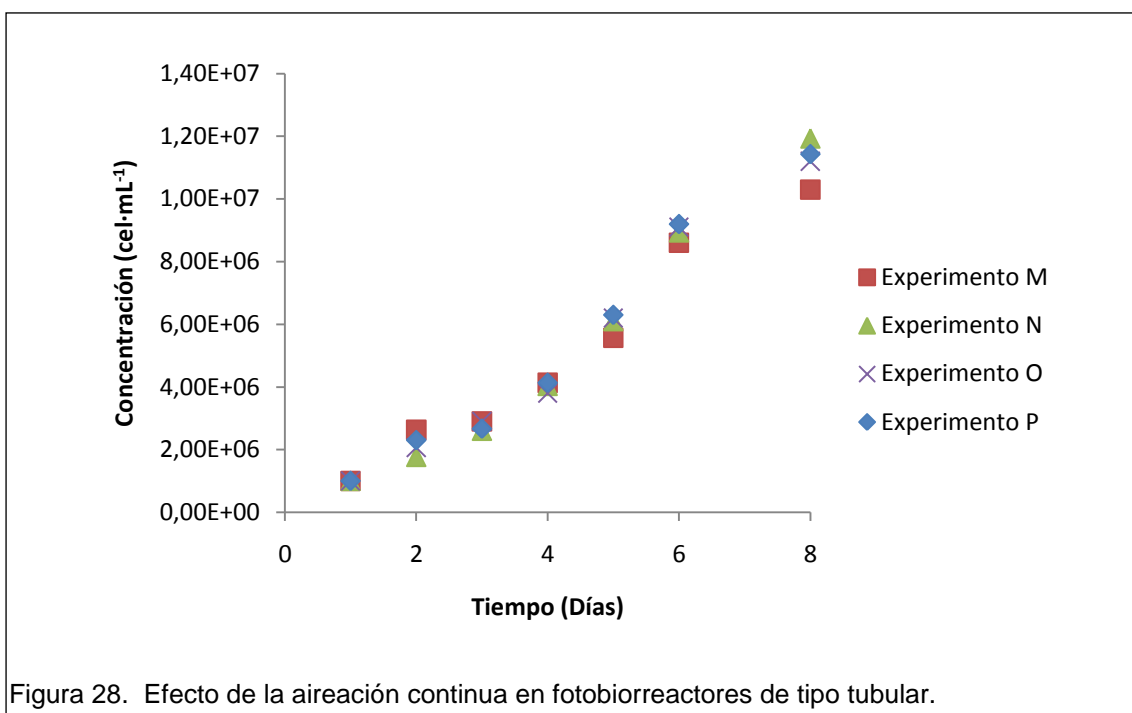


Figura 28. Efecto de la aireación continua en fotobiorreactores de tipo tubular.

Para el efecto de la aireación continua en fotobiorreactores de tipo tubular, el mejor resultado fue del tratamiento “N” ($1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5$) $\text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. El resultado más bajo fue del tratamiento “M” ($1,03 \times 10^7 \pm 1,91 \times 10^6$) $\text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ a los 8 días de cultivo.

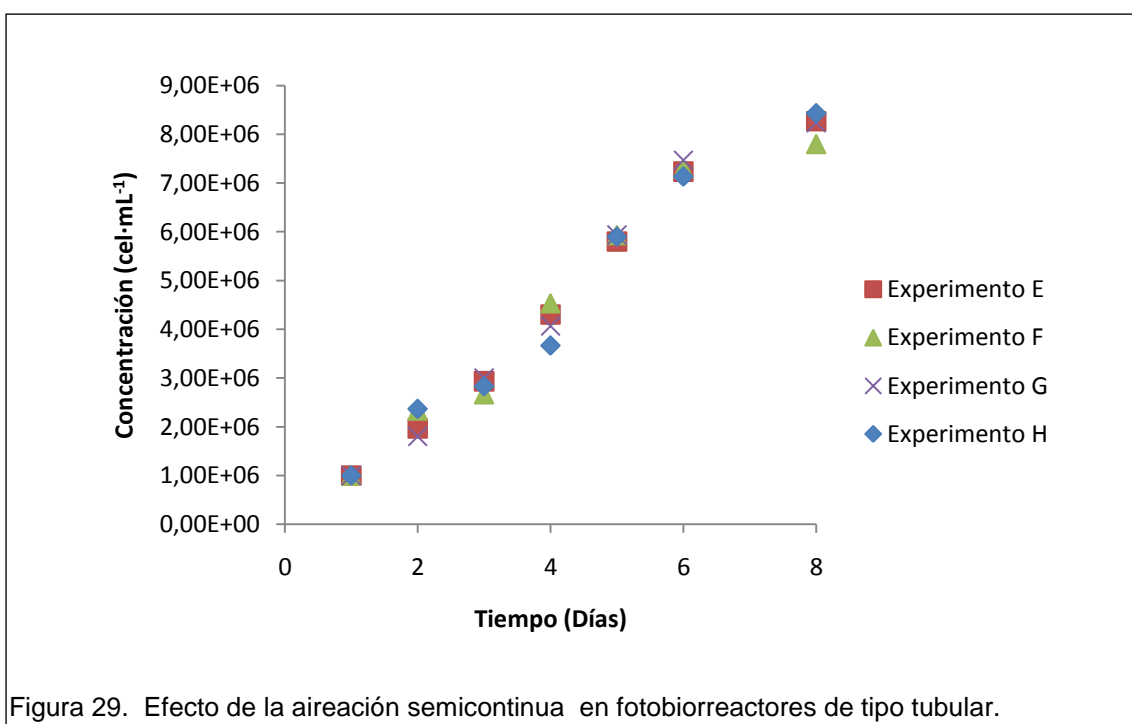


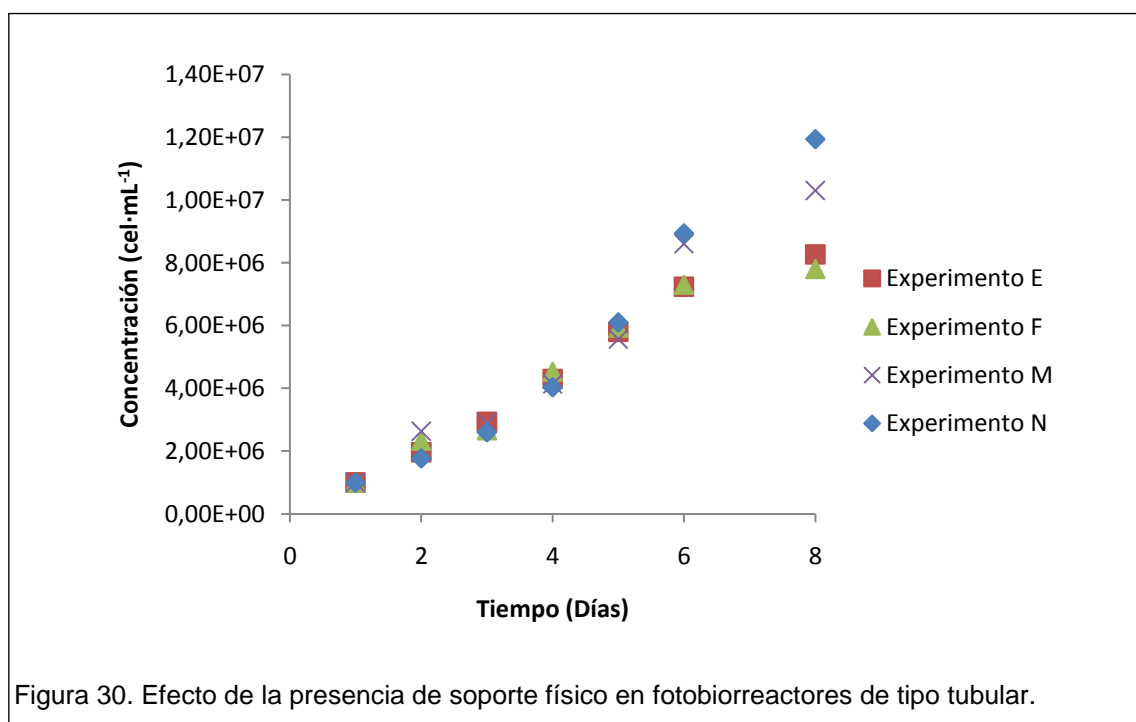
Figura 29. Efecto de la aireación semicontinua en fotobiorreactores de tipo tubular.

Para el efecto de la aireación semicontinua ($8\text{h}\cdot\text{día}^{-1}$) en fotobiorreactores de tipo tubular, el mejor resultado fue del tratamiento “H” ($8,43\times 10^6 \pm 6,43\times 10^5$) $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. El resultado más bajo fue del tratamiento “F” ($7,80\times 10^6 \pm 2,65\times 10^5$) $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$.

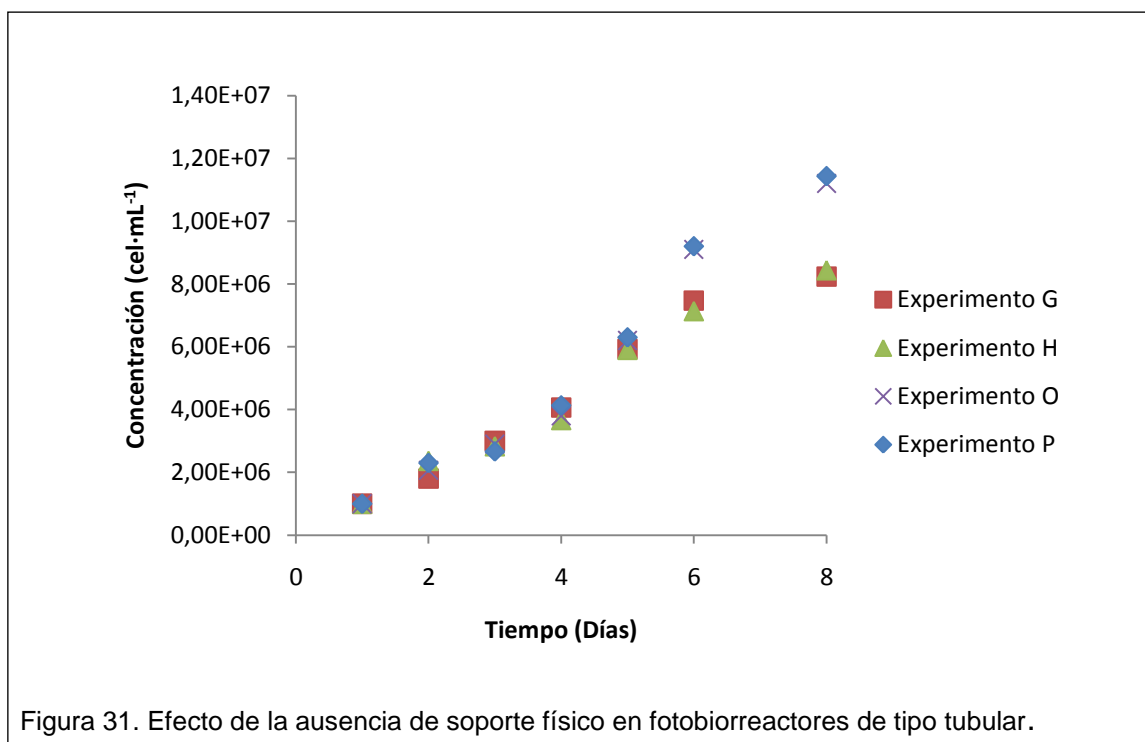
4.2.3 Soporte físico

La malla geotextil empleada como soporte físico para la microalga fue colocada en el interior del fotobiorreactor de tipo tubular y se utilizó el mismo corte realizado para la aireación para poder introducir la malla.

Las curvas de crecimiento realizadas determinaron que la concentración de biomasa microalgal final obtenida en fotobiorreactores de tipo tubular no se ve afectada por la presencia o ausencia de un soporte físico en 8 días de cultivo (Figura 30 y 31).



La mayor concentración obtenida ($1,19\times 10^7 \pm 5,13\times 10^5$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) en presencia de soporte físico fue del tratamiento “N” y la menor concentración ($7,80\times 10^6 \pm 2,65\times 10^5$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) fue del experimento “F” en 8 días de cultivo.



En ausencia de soporte físico a los 8 días de evaluación, se obtuvo una concentración máxima ($1,14 \times 10^7 \pm 1,78 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) y mínima ($8,23 \times 10^6 \pm 6,66 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) para los tratamientos “P” y “G”, respectivamente.

4.3 Evaluación de variables

4.3.1 Intensidad luminosa

La optimización de la disposición de la luz al exterior de un fotobiorreactor es un factor necesario para incrementar la concentración de biomasa microalgal al final del tiempo de cultivo (Richmond, 2004). Los niveles evaluados de intensidad luminosa en esta investigación se ajustan a lo referenciado en la literatura (Rubio, Sierra, Ruiz, Sandoval, 2014) en donde emplearon una intensidad luminosa promedio de 2000 lux. Esta intensidad es necesaria para que las microalgas aprovechen los fotones emitidos para realizar la fotosíntesis.

Otras investigaciones reportan haber empleado intensidad luminosa variable desde 81,30 lux hasta 1497 lux en fotobiorreactores diseñados en material acrílico, obteniendo concentraciones de biomasa microalgal de $4,5 \times 10^3 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ (González, Sol, Franco, 2014). Esta concentración de biomasa microalgal ($4,5 \times 10^3 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) es menor a la obtenida en esta investigación ($1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ para fotobiorreactores panel y tubular, respectivamente). La diferencia de concentraciones entre lo citado y lo obtenido se debe al tiempo de cultivo y al material del fotobiorreactor.

Por otro lado, existen reportes en los que se aprovechó la intensidad luminosa del sol en fotobiorreactores de tipo tubular de un volumen de 50 L con la microalga *Nannochloropsis gaditana* (Mantecón, Unamunzaga, Cañavate, 2003). En el reporte citado, se obtuvieron concentraciones máximas de $1,263 \times 10^9 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ y mínimas de $5,27 \times 10^8 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ al final de 32 días de cultivo. Contrastando estos valores con las concentraciones obtenidas ($1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $8,03 \times 10^6 \pm 3,79 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la máxima y mínima concentración respectivamente para fotobiorreactores de tipo panel y $1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $8,23 \times 10^6 \pm 6,66 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la máxima y mínima concentración, respectivamente para fotobiorreactores de tipo tubular) corrobora que la disposición de la luz, así como la intensidad luminosa irradiada a los fotobiorreactores, es necesaria para obtener mayor cantidad de biomasa microalgal al final de un tiempo establecido.

Además, existen investigaciones (Tredici, Zitelli, 1998) que informan sobre el efecto del diseño del fotobiorreactor y la intensidad luminosa en la captación de luz. En este reporte se menciona que un fotobiorreactor de tipo tubular absorbe más luz solar en horas de la tarde que un fotobiorreactor de tipo panel debido a su conformación espacial. Sin embargo, a diferencia del reporte de Tredici (1998), en esta investigación los fotobiorreactores de tipo panel y de tipo tubular generan concentraciones de biomasa microalgal semejantes ($1,18 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $1,19 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ para fotobiorreactores panel y tubular,

respectivamente), por lo no hay una diferencia significativa entre ambos diseños de fotobiorreactores usados en esta investigación.

Finalmente, se puede observar que la concentración de biomasa final no solo depende de la microalga empleada y del tiempo de cultivo, sino también de la intensidad luminosa irradiada, del diseño del fotobiorreactor y del material con el que fue construido.

4.3.2 Aireación

La optimización del burbujeo o aireación va de la mano con la optimización de la intensidad luminosa (Richmond, *et al.*, 1993). Los niveles evaluados en esta investigación fueron de aireación continua (burbujeo durante todo el tiempo de crecimiento) y semicontinua (8h·día⁻¹), y los valores de concentración máximos obtenidos fueron para aireación continua.

Para los fotobiorreactores de tipo panel se obtuvieron concentraciones de $1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ y para los fotobiorreactores de tipo tubular se obtuvieron concentraciones de $1,19 \times 10^7 \pm 5,13 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ en aireación continua. En esta investigación no hay una diferencia significativa en la concentración de biomasa final obtenida para fotobiorreactores de tipo panel o de tipo tubular empleando aireación continua. Sin embargo, existen reportes que informan que los fotobiorreactores de tipo tubular generan menor concentración de biomasa microalgal que los fotobiorreactores de tipo panel debido a que tienen problemas de mezclado a causa de la mala aireación, estos cálculos son necesarios para la optimización de cualquier tipo de fotobiorreactor a emplearse (Richmond, *et al.*, 1993; Ugwu, Aoyagi, Uchiyama, 2008).

Los fotobiorreactores de tipo tubular de esta investigación alcanzan la misma concentración de biomasa microalgal que los fotobiorreactores de tipo panel debido a su configuración espacial en forma de “V” en 8 días de cultivo. Esto evita que las microalgas se peguen a las paredes del fotobiorreactor tubular, permite un mezclado uniforme y mantiene constante la liberación del exceso de oxígeno que se obtiene como producto de la fotosíntesis.

Esto no ocurre en otras investigaciones (Richmond, *et al.*, 1993), ya que en ese caso los fotobiorreactores tubulares construidos son tubos alargados. La configuración espacial del estudio citado, fotoinhibe el crecimiento microalgal debido a la sobresaturación de O₂, favorece la fijación de las microalgas a las paredes del fotobiorreactor y no permite la llegada de fotones a la base del fotobiorreactor. En contraste con el diseño en “V” del fotobiorreactor tubular empleado en esta investigación, este diseño tiene una mejor distribución de aire alrededor de todo el sistema, generando concentraciones de biomasa microalgal semejantes a las de un fotobiorreactor de tipo panel.

Existen reportes en los que se discute ampliamente la optimización del burbujeo en fotobiorreactores de tipo tubular (Molina, Fernández, Ación, Chisti, 2001). En el reporte de Molina, *et al.*, (2001) se informa que en el caso de velocidades de burbujeo superiores a 1ms⁻¹, las microalgas pueden morir a causa del estrés mecánico producido y por esa razón genera sedimentación en la base del fotobiorreactor.

Para finalizar, en los fotobiorreactores de tipo panel y de tipo tubular empleados en esta investigación, no se observó sedimentación de biomasa en la base, por lo que se podría asumir que el burbujeo no fue superior a 1ms⁻¹ o que la microalga empleada no fue afectada por el estrés mecánico.

4.3.3 Soporte físico

Se implementó un soporte físico para evaluar la influencia del mismo en el aumento de la concentración de biomasa microalgal. Sin embargo, para fotobiorreactores de tipo panel, la concentración de biomasa microalgal obtenida fue menor en presencia de un soporte físico ($1,12 \times 10^7 \pm 9,07 \times 10^5$ cel·mL⁻¹) que en su ausencia ($1,18 \times 10^7 \pm 2,65 \times 10^5$ cel·mL⁻¹).

4.4 Comparación estadística

4.4.1 Estadística descriptiva

A continuación se presentan los estadísticos descriptivos de la producción final (tomados al octavo día de cultivo) de biomasa de los fotobiorreactores de tipo panel (Tabla 2) y de los fotobiorreactores de tipo tubular (Tabla 3).

Tabla 2. Resultados de los estadísticos descriptivos aplicados a la producción final de biomasa en fotobiorreactores de tipo panel.

Estadísticos descriptivos						
Tratamiento	N réplicas	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Varianza
A	3	1,02E+7	1,20E+7	1,11E+7	9,07E+5	8,23E+11
B	3	9,10E+6	1,08E+7	1,01E+7	9,29E+5	8,63E+11
C	3	9,10E+6	1,18E+7	1,04E+7	1,35E+6	1,83E+12
D	3	1,15E+7	1,20E+7	1,18E+7	2,64E+5	7,00E+10
I	3	8,50E+6	9,00E+6	8,73E+6	2,52E+5	6,33E+10
J	3	8,80E+6	9,00E+6	8,90E+6	1,00E+5	1,00E+10
K	3	7,60E+6	8,30E+6	8,03E+6	3,78E+5	1,43E+11
L	3	7,70E+6	8,20E+6	7,93E+6	2,51E+5	6,33E+10

Tabla 3. Resultados de los estadísticos descriptivos aplicados a la producción final de biomasa en fotobiorreactores de tipo tubular.

Estadísticos descriptivos						
Tratamiento	N réplicas	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Varianza
E	3	7,90E+6	8,80E+6	8,26E+6	4,72E+5	2,23E+11
F	3	7,60E+6	8,10E+6	7,80E+6	2,64E+5	7,00E+10
G	3	7,50E+6	8,80E+6	8,23E+6	6,65E+5	4,43E+11
H	3	7,70E+6	8,90E+6	8,43E+6	6,42E+5	4,13E+11
M	3	9,20E+6	1,25E+7	1,03E+7	1,90E+6	3,63E+12
N	3	1,15E+7	1,25E+7	1,19E+7	5,13E+5	2,63E+11
O	3	9,40E+6	1,23E+7	1,12E+7	1,57E+6	2,47E+12
P	3	9,50E+6	1,30E+7	1,14E+7	1,77E+6	3,16E+12

El fotobiorreactor panel con mejores resultados fue el experimento "D". Sus condiciones de operación fueron de aireación continua, ausencia de soporte físico a una intensidad luminosa de 3000 lux. La mínima concentración de biomasa microalgal registrada fue de 1.15×10^7 cel·mL⁻¹, la máxima fue de 1.20×10^7 cel·mL⁻¹, la media dio un resultado de 1.18×10^7 cel·mL⁻¹ y la desviación estándar 2.65×10^5 cel·mL⁻¹. El fotobiorreactor tubular con mejores resultados fue el experimento "N". Sus condiciones de operación fueron de aireación continua, presencia de soporte físico a una intensidad luminosa de 3000 lux. La mínima concentración de biomasa microalgal registrada fue de 1.15×10^7 cel·mL⁻¹, mientras que el valor máximo de concentración registrado fue de 1.25×10^7 cel·mL⁻¹. La media de los datos dio como resultado un valor de 1.19×10^7 cel·mL⁻¹ y la desviación estándar 5.13×10^5 cel·mL⁻¹.

Estas concentraciones se ajustan a la literatura (Bermúdez, Lodeiros, Morales 2002). En el estudio citado se obtuvo una concentración de 4.2×10^7 cel·mL⁻¹ luego de 14 días de cultivo, lo que además corrobora en que el diseño del fotobiorreactor y las condiciones de operación en 8 días de cultivo, modifica la concentración final de biomasa en un tiempo de cultivo establecido.

Además, se encuentra en el rango de resultados propuestos en el estudio de fotobiorreactores de tipo panel (Zmora, Richmond, 2004) donde se informa que los fotobiorreactores de tipo tubular logran alcanzar concentraciones de hasta 5×10^9 cel·mL⁻¹ luego de 30 días con relación a 8 de este estudio.

Por otro lado, existen reportes en donde se obtuvieron concentraciones superiores a la de esta investigación (2×10^9 cel·mL⁻¹) en un fotobiorreactor iluminado con diodos luego de 5 días de cultivo (Lee, Palson, 1994). Esto demuestra que la cantidad de biomasa obtenida puede incrementar considerablemente cuando se irradia una mayor cantidad de intensidad luminosa.

Para finalizar, es importante señalar que el fotobiorreactor de tipo panel con los resultados más bajos de esta investigación fue el experimento "L". Sus condiciones de operación fueron aireación semicontinua, ausencia de soporte físico a una intensidad luminosa de 3000 lux. La concentración mínima registrada fue de 7.70×10^6 cel·mL⁻¹ y la máxima concentración fue de 8.20×10^6 cel·mL⁻¹, con una media de 7.93×10^6 cel·mL⁻¹ y una desviación estándar igual a 2.52×10^6 cel·mL⁻¹. Para el fotobiorreactor de tipo tubular, el resultado más bajo fue del experimento "F". Sus condiciones de operación fueron aireación semicontinua, presencia de soporte físico a una intensidad luminosa de 3000 lux. La mínima concentración registrada fue de 7.60×10^6 cel·mL⁻¹, mientras que la máxima fue de 8.10×10^6 cel·mL⁻¹. La media obtuvo un valor de 7.80×10^6 cel·mL⁻¹ y la desviación estándar de 2.65×10^5 cel·mL⁻¹.

Esta concentración de biomasa supera algunos reportes científicos en donde se obtuvo un valor de $4,5 \times 10^3$ cel·mL⁻¹ (González, Sol, Franco, 2014), por lo que el diseño de los fotobiorreactores empleados en esta investigación tienen mejoras en la producción de biomasa.

4.4.2 Análisis de Varianza

Se realizó un Análisis de varianza para determinar si existe diferencia estadística entre variables. Los valores de P obtenidos del análisis de varianza no son menores a 0.05 a un nivel de confianza de 95%, por lo tanto no existen diferencias significativas entre los dos diseños de fotobiorreactores empleados en esta investigación y en su producción final de biomasa en 8 días de cultivo (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA).

Análisis de varianza						
OV	SC	GI	CM	Fo	p<0,05	
A	3,06E+10	1	3,06E+10	1,52E-04	0,99	NS
B	6,85E+13	1	6,85E+13	3,40E-01	0,56	NS
C	5,63E+09	1	5,63E+09	2,80E-05	0,99	NS
D	6,01E+11	1	6,01E+11	2,99E-03	0,95	NS
AB	6,81E+11	1	6,81E+11	3,38E-03	0,95	NS
AC	4,56E+11	1	4,56E+11	2,27E-03	0,96	NS
AD	1,81E+11	1	1,81E+11	8,98E-04	0,97	NS
BC	7,66E+11	1	7,66E+11	3,81E-03	0,95	NS
BD	8,56E+11	1	8,56E+11	4,25E-03	0,94	NS
CD	2,76E+11	1	2,76E+11	1,37E-03	0,97	NS
ABC	1,05E+12	1	1,05E+12	5,22E-03	0,94	NS
ABD	4,56E+11	1	4,56E+11	2,27E-03	0,96	NS
ACD	1,16E+12	1	1,16E+12	5,75E-03	0,93	NS
BCD	5,06E+10	1	5,06E+10	2,52E-04	0,98	NS
ABCD	3,15E+12	1	3,15E+12	1,57E-02	0,9009	NS

Nota: "NS" es no significativo; "SC" es Suma de cuadrados; "GI" es Grados de libertad; "CM" es cuadrado medio; "Fo" y "p" son valores de contraste. Origen de variación corresponde a los factores estudiados, para este caso A: Fotobiorreactor; B: Aireación; C: Soporte físico; D: Intensidad luminosa; la combinación de letras corresponde a la interacción de variables.

5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La microalga *Chlorococcum sp.* CMIE-H2-001 se logra adaptar eficientemente a medios de cultivo más baratos (de BG-11 a solución de Nitrofoska) sin disminuir su concentración a los 8 días de cultivo.

La aireación óptima en la producción de biomasa de la cepa *Chlorococcum sp.* CMIE-H2-001 en ambos fotobiorreactores es la aireación continua.

La iluminación óptima en la producción de biomasa de la cepa *Chlorococcum sp.* CMIE-H2-001 en ambos fotobiorreactores es a 3000 lux.

En presencia de soporte físico existe mayor concentración de biomasa al final de 8 días de cultivo en fotobiorreactores de tipo tubular.

En ausencia de soporte físico los fotobiorreactores de tipo panel al final de 8 días de cultivo presentan mayor concentración de biomasa.

El diseño de los fotobiorreactores le permite a la microalga *Chlorococcum sp.* CMIE-H2-001 alcanzar una concentración de biomasa cercana a $1,2 \times 10^7 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$.

No se observó diferencias significativas en la producción de biomasa entre el diseño de fotobiorreactores panel y tubular propuestos en esta investigación y por lo tanto, se puede concluir que cualquiera de los dos tipos de fotobiorreactores pueden ser usados para la producción de biomasa de microalgas.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda estudiar el efecto de suministro de CO₂ en fotobiorreactores para el cultivo de microalgas.

Se sugiere ampliar la diferencia del nivel del factor aireación (8 h·día⁻¹ frente a 24h·día⁻¹) puesto que, aunque ninguna variable resultó ser estadísticamente significativa, el valor de contraste de la variable aireación (B) fue relativamente más bajo.

Se sugiere analizar si el soporte físico influye en la dispersión de la iluminación y en la velocidad de crecimiento microalgal.

Se recomienda analizar la cantidad de intensidad luminosa necesaria para fotoinhibir a una microalga en este tipo de fotobiorreactores para trabajar con rangos tolerables y reducir el consumo de energía innecesario.

Se recomienda obtener el tiempo que demora en llegar a una microalga a la fase de muerte celular para determinar el tiempo máximo de un cultivo en los fotobiorreactores estudiados.

Si se desea trabajar más de una semana de tiempo de cultivo con fotobiorreactores, es importante evaluar en escala de laboratorio si la línea celular con la que se trabajará puede producir mayor concentración que 1x10⁷ cel·mL⁻¹ sin entrar en una etapa de crecimiento constante o a una etapa de muerte celular.

REFERENCIAS

- Benavente, J., Montañez, J., Aguilar, C., Méndez, A. y Valdivia, B. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores
- Bermúdez, J., Lodeiros, C. y Morales, E. (2002). Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad.
- Borowitzka, M. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters.
- Cáceres, C., Aguirre, A., McAnally, L., Pares, G., Leyva, G. (1988). CULTIVO SEMICONTINUO DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica* K. Recuperado el 02 de noviembre de 2015, de <http://biblioweb.tic.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1988-2/articulo321.html>
- Contreras, C., Peña J., Flores, L. y Cañizares, R. (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas.
- De Tremblay, M., Perrier, M., Chavarie, C. y Archambault, J. (1992). Optimization of fed-batch culture of hybridoma cells using dynamic programming: single and multi feed cases.
- Escudero Santiago, R. (2013). Planta de producción de microalgas con fines energéticos.
- Fernández, J. (2014). Ingeniería de procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Recuperado el 02 de Noviembre 2015 de <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/index.html>
- Fernández, J. (2012). Biocombustibles derivados del maíz.
- García, G. y Martel, A. (2015). Usos y aplicaciones de macroalgas, microalgas y cianobacterias en agricultura ecológica. Recuperado el 02 de Noviembre de 2015 de <http://fci.uib.es/Servicios/libros/conferencias/seae/Usos-y-aplicaciones-de-macroalgas-microalgas-y.cid221515>
- Gómez, L. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos.

- González, C., Sol, M. y Franco, M. (2014). Estimación de Iluminación en un Fotobiorreactor Productor de Biomasa a Partir de Microalgas.
- Grobbelaar, J. (2004). Algal Nutrition– Mineral Nutrition.
- Hammouda, O., Gaber, A. y Abdelraouf, N. (1995). Microalgae and wastewater treatment.
- Hernández, A. y Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios.
- Hernández, E., Revah, S. y Morales, M. (2011) PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR TUBULAR AIRLIFT (FBTA) EN CONDICIONES AMBIENTALES.
- Ho, S., Chen, C. y Chang, J. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N
- Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., y Miyachi, S. (1998). Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor.
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., y Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Barrios, F. y Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular.
- Lee, C. y Palsson, B. (1994). High density algal photobioreactors using light emitting diodes. *Biotechnol.*
- Mantecón, E., Unamunzaga, C. y Cañavate, J. (2003) Diseño de un fotobiorreactor tubular para el cultivo masivo al exterior de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana* en la Bahía de Cádiz.
- Marcilla, A., García J., Gómez, A., García, A., Beltrán, M. y Catalá, L. (2011). Sistema de reactor abierto para microalgas. Recuperado el 22 de Noviembre de 2015 de <http://www.google.com/patents/WO2011113974A1?cl=es>
- Marcos, F., Almazan J. y Palomino, M. (2008). Biodiesel de Algas.

- Márquez, S. y Zabala, E. (2011). Guías temáticas: Fotosíntesis. Recuperado el 02 de Noviembre de 2015 de <http://genomasur.com/lecturas/Guia08.htm>
- Moha, J., Pérez, I., Ríos, E., Ortega, L. y Legaspi, I. (2012). *Nannochloris oculata*: Una alternativa para la biorremediación del lindano.
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F. y Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures.
- Moreno, J. (2010). Evaluación del crecimiento y carotenogénesis de cuatro cepas de microalgas marinas bajo condiciones de estrés por iluminación a temperatura y salinidad constantes. Recuperado el 02 de Noviembre de 2015 de <http://www.bidi.uson.mx/TesisIndice.aspx?tesis=20804>
- Morris, H., Quintana, M., Almarales, A. y Hernández L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de la *Chlorella vulgaris*.
- Priyadarshani, I. y Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review.
- Ramirez, L., Queiroz, L., y Jacob, E. (2013). Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacterias.
- Richmond, A. (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view.
- Richmond, A., (2004). Algal Nutrition—Mineral Nutrition.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A. y Kopel, R. (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M. y Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria.
- Rubio, D., Sierra, J., Ruiz, S. y Sandoval, J., (2014). Diseño de un fotobiorreactor Airlift a escala banco.
- Santos, A., Arechavala, Y. y Martín, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas.
- Shuler, M. y Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering*. New York: Prentice Hall.

- Spolaore, P., Joannis, C., Duran, E. y Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae.
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., Painter, P. (1992). Capítulo 7: Crecimiento microbiano. En Microbiología Segunda Edición (195-208). España: Reverté.
- Torrentara, L. y Tacon, A. (1989). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis
- Tredici, R. y Zittelli, C. (1998). Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors.
- Ugwu, C., Aoyagi, H. y Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J. y Ruan, R. (2010). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp.
- Zmora, O. y Richmond A. (2004). Microalgae Production for Aquaculture.

ANEXOS

Anexo 1. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Término	Símbolo
Ancho	a
Altura	h
Centímetros	cm
Diámetro	d
Espesor de vidrio	ev
Grados de libertad	gl
Hipótesis nula	H0
Hipótesis alternativa	H1
KiloPascales	kPa
Largo	l
Litros	L
Mililitros	mL
Profundidad	p
Relación volumen de trabajo-volumen disponible	RVt-Vd
Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa	RuBisCO
Concentración de células por cada mL	cel·mL ⁻¹
Vista frontal	VF
Vista lateral	VL
Vista superior	VS
Volumen disponible	Vd
Volumen de trabajo	Vt
Triacilglicéridos	TAG

Anexo 2. ESCALA DE LABORATORIO

Alícuota inicial de la cepa CMIE-H2-001.



Escalado de la cepa CMIE-H2-001 a envases de 200 mL.

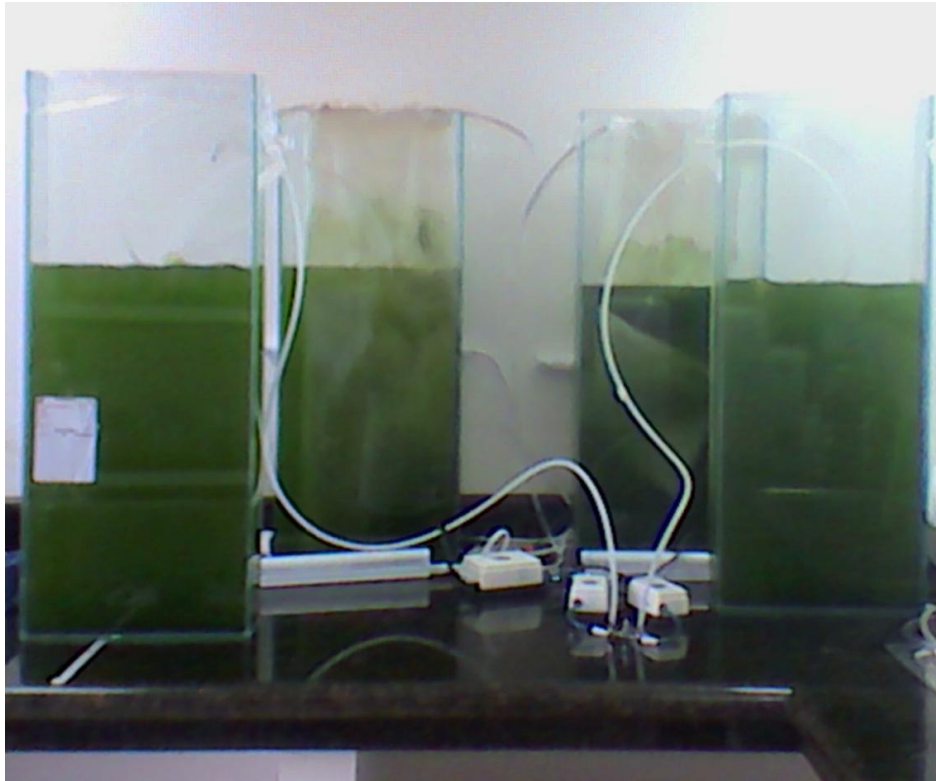


Adaptación y escalado a 5 L.



Anexo 3. ESCALA PILOTO

Montaje de los reactores de tipo panel.



Vista superior del fotobiorreactor de tipo panel.



Vista lateral de los fotobiorreactores de tipo panel.



Vista superior del fotobiorreactor de tipo tubular.



Vista lateral de los fotobiorreactores de tipo tubular

