



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISION DE INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
METALURGIA**

**EFFECTO DE LA AGITACIÓN Y ALIMENTACIÓN DE
CO₂ SOBRE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE UN
CULTIVO DE MICROALGAS EN UN
FOTOBIORREACTOR**

TESIS

Que para obtener el Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

LUIS ALONSO SANTOS GARCÍA

Hermosillo, Sonora

Abril de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer al Doctor Juan Antonio Noriega por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto, por su tiempo, apoyo y su paciencia. Fue un camino largo pero por fin logramos esta meta.

Gracias a mis asesores, la Dra. Esther Carrillo y al Dr. Abraham Martin por su apoyo y consejos, que se extiende no solo durante la ejecución de este proyecto, sino también a lo largo de mi formación como ingeniero químico.

Gracias a mis hermanos por haber estado conmigo durante esta etapa de mi vida, de presionar directamente o indirectamente para ser un mejor estudiante y profesionalista.

A mis amigos de la universidad por forzarme a entrar a las clases y de disfrutar esta etapa tan maravillosa como lo ha sido.

Y a todas esas personas que de alguna manera han influido en mí, que estuvieron o están en mi vida, que me han dejado grandes experiencias de esas que no se aprenden a base de cálculos o ecuaciones pero que se valoran para siempre.

DEDICATORIA

Para mí es un honor y un placer dedicar este trabajo a los dos seres queridos más importantes de mi vida, aquellos que han sido mis pilares y que me han motivado a salir adelante. Quienes, con base a regaños, esfuerzo, amor, tolerancia y carácter han formado a la persona que soy.

Aquellos que no se conformaron solo con darme la vida, sino que me dieron la posibilidad de vivir grandes y maravillosas oportunidades como lo es culminar esta etapa.

A mis padres Filemón Santos Alonso y Leonor García Naranjo, no me queda nada más que decirles que es gracias a su paciencia, confianza, empuje, y apoyo por lo que puedo estar aquí. Espero poder regresarles un poco del orgullo que me hace sentir el que sean mis padres.

Los amo mucho y gracias infinitas.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
CONTENIDO.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
Objetivo general.....	5
Objetivo específicos.....	5
REVISIÓN DE LA LITERATURA	6
Cinética de crecimiento.....	6
Modelos cinéticos de crecimiento microbiano.....	8
Validación de modelos cinéticos.....	13
Fotobiorreactores.....	13
Microalgas de acuario.....	15
Cultivo de microalgas.....	17
Requerimientos Físico-Químicos.....	17
Parámetros físicos	17
Requerimientos de pH.....	21
Temperatura	22
Salinidad.....	22
Requerimientos químicos	22
Medio de cultivo para microalgas.	23

Métodos para la determinación de biomasa	24
MATERIALES Y METODOS	26
Descripción general del trabajo.....	26
Materiales y reactivos	28
Medio de cultivo.....	28
Cultivo de microalgas en Fotobiorreactor	28
Técnicas analíticas para el seguimiento del cultivo	32
Medición de la densidad óptica.....	32
Obtención de peso seco	33
Obtención de lípidos	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.	57

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Principales requerimientos Físico-Químicos de los cultivos de microalgas.....	23
Tabla II. Medio Guillard f/2	29
Tabla III. Valores de las líneas de tendencia, obtenidos de las correlaciones de peso seco contra densidad óptica de las corridas 1, 2, 3 y 4.....	39
Tabla IV. Parámetros de la cinética de crecimiento obtenidos a partir del modelo logístico de crecimiento en las corridas experimentales 1 y 2.....	44
Tabla V. Parámetros de la cinética de crecimiento, aplicando el modelo exponencial a las corridas experimentales 1 y 2.....	46
Tabla VI. Parámetros de la cinética de crecimiento de microalga para la corrida experimentación 3 modelo logístico.	47
Tabla VII. Parámetros de la cinética de crecimiento, modelo logístico en la corrida experimentación 4.....	49
Tabla VIII. Parámetros de la cinética de crecimiento para la corrida experimentación 3 modelo exponencial.	50
Tabla IX. Parámetros de cinética de crecimiento modelo exponencial experimentación 4.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de cultivo de volumen limitado.....	6
Figura 2. Diagrama básico de birreactor airlift.....	14
Figura 3. Sistema empleado en el crecimiento de la microalga en la primera fase experimental.....	28
Figura 4. Sistema de cultivo utilizado en el primer escalamiento	30
Figura 5. Preparación del cultivo de microalga de acuario	31
Figura 6. Sistema de suministro de gases en el cultivo de microalga.	31
Figura 7. Cultivo de microalgas en fotobiorreactor instrumentado con agitación y alimentación de Aire 95% y CO2 5%	32
Figura 8. Diagrama de flujo para la medición de densidad óptica.....	33
Figura 9. Diagrama de flujo para determinar peso seco de muestras experimentales..	34
Figura 10. Diagrama de flujo para determinar porcentaje de lípidos.....	36
Figura 11. Seguimiento del crecimiento del cultivo de microalgas a través del tiempo de las corridas 1(♦) volumen 0.5 L, burbujeo de aire; corrida 2(▲) volumen 1.0 L, burbujeo aire; corrida 3 (●) volumen 5.0L, burbujeo de una mezcla Aire 95% -CO2 5% y corrida 4(■) volumen 3.0L, agitación mecánica 240 rpm, burbujeo de una mezcla Aire 95% -CO2 5%.....	37
Figura 12. Correlación entre absorbancia contra el peso seco de la biomasa de microalga de las corridas 1(♦) volumen 0.5 L, burbujeo de aire; corrida 2(▲) volumen 1.0 L, burbujeo aire; corrida 3 (●) volumen 5.0L, burbujeo de una mezcla Aire 95% -CO2 5% y corrida 4(■) volumen 3.0L, agitación mecánica 240 rpm, burbujeo de una mezcla Aire 95% -CO2 5%.....	39
Figura 13. Seguimiento del crecimiento del cultivo de microalgas con peso seco de biomasa contra el tiempo de las corridas experimentales corrida 1(♦) volumen 0.5 L, burbujeo de aire y corrida 2(▲) volumen 1.0 L, burbujeo aire.	41
Figura 14. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo airlift alimentado con burbujeo de aire, corrida 1(♦) volumen 0.5 L y corrida 2(▲) volumen 1.0 L, aplicando el modelo logístico.	43

Figura 15. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo airlift alimentando solamente con burbujeo de aire, corridas experimentales 1(♦) volumen 0.5 L y corrida 2(▲) volumen 1.0 L, aplicando el modelo exponencial.	45
Figura 16. Cinética de crecimiento de una microalga de acuario en un reactor tipo Airlift en un volumen de trabajo de 5.0L alimentado con una mezcla de Aire 95%-CO2 5%, por medio de burbujeo (corrida 3).	47
Figura 17. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo tanque agitado mecánicamente a 240 rpm y alimentado con una mezcla de Aire 95%-CO2 5% (corrida 4).	48
Figura 18. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo tanque agitado alimentado con una mezcla de Aire 95%-CO2 5% por medio de burbujeo, aplicando el, modelo exponencial (corrida 3).	50
Figura 19. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo tanque agitado mecánicamente a 240 rpm y alimentado con una mezcla de Aire 95%-CO2 5% por medio de burbujeo, aplicando el modelo exponencial (corrida 4)	51
Figura 20. Seguimiento del tiempo de crecimiento en horas de la microalga de acuario en el reactor tipo Airlift, corridas 1-3.	53
Figura 21. Seguimiento del tiempo de crecimiento en horas de microalga de acuario en un reactor tipo tanque con agitación mecánica, corrida 4	53
Figura 22. Vista microscópica del cultivo de la microalga	55

RESUMEN

El cultivo de microalgas es primordial para distintas actividades. Una de las principales es para acuicultura debido a que es el principal alimento para la producción de camarón en los estanques de cultivo de este crustáceo. A partir de la biomasa de microalgas se pueden obtener productos de interés como biodiesel o inclusive eliminar compuestos indeseados de otros procesos, como son aguas residuales y CO_2 . En este trabajo se aisló un cultivo de microalga de un acuario domestico que fue capaz de adaptarse a las condiciones ambientales, para así poder implementar técnicas para el seguimiento de su cinética de crecimiento. La experimentación consistió en tres etapas: **la primera** fue el aislamiento de la microalga; **la segunda** en un escalamiento del cultivo de la microalga en volúmenes de trabajo de 0.5, 1.0 y 5.0 L con burbujeo de aire; **la tercera** consistió en variar las condiciones Físico-Químicas de operación del biorreactor utilizando un biorreactor con volumen de trabajo de 5.0 L operado con burbujeo de una mezcla de aire- CO_2 (95% de aire y 5% CO_2) y utilizando un biorreactor con un volumen de trabajo de 3.0 L con agitación mecánica a 240 rpm y alimentado con una mezcla de aire- CO_2 (95% de aire y 5% CO_2) a temperatura de 23°C. El crecimiento del cultivo se monitoreo a diferentes tiempos del crecimiento y se midió por medio de la densidad óptica a 560 nm y por peso seco. Se calcularon los parámetros cinéticos de crecimiento como la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de doblado. Las cinéticas de crecimiento fueron modeladas utilizando las ecuaciones del modelo logístico de crecimiento y el modelo exponencial. El modelo que mejor ajustó los datos experimentales del crecimiento de la microalga fue el modelo logístico de crecimiento en todos los niveles de escalamiento del cultivo de la microalga, obteniéndose coeficientes de determinación superiores a 0.95. La modelación de los datos experimentales utilizando tanto los modelos logístico como exponencial mostraron diferencias notables en los parámetros de crecimiento al aplicar solo alimentación de aire en comparación de la alimentación de la mezcla de Aire 95%- CO_2 5%. Sin embargo se obtuvieron datos muy similares en los parámetros cinéticos de crecimiento al utilizar solo alimentación de mezcla de gases con burbujeo y además al aplicar agitación mecánica, este efecto se pudo observar en las corridas

experimentales 3 y 4; corrida 3 (5.0L, con alimentación con mezcla de Aire 95%-CO₂ 5% con burbujeo) y corrida 4(3.0L, con agitación mecánica 240 rpm y mezcla de Aire 95%-CO₂ 5% con burbujeo), por lo que el aplicar agitación mecánica no contribuyó en mejorar los parámetros cinéticos de crecimiento. Pero al aplicar agitación mecánica al cultivo con la mezcla de gases el tiempo de crecimiento se redujo en 48 h.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos microscópicos (2-200 μm) fotosintéticos, polifacéticos y eucariotas, que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. Las microalgas están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, mares y ríos, pero no están supeditados solo al agua. Se encuentran presentes en el suelo y la mayoría de los ambientes terrestres incluso en los más extremos (Abalde et al, 1995).

Estos organismos han incrementado su atención en los últimos años debido a la capacidad de captar CO_2 además de la facilidad para la producción de ácidos grasos. Estas propiedades han despertado el interés debido a la obtención de biocombustible como otros productos de interés. La siguiente etapa ha sido el desarrollo de bioprocesos que vinculen los descubrimientos científicos a las necesidades comerciales, en esto el diseño y la optimización de biorreactores adecuados para cultivar estos microorganismos son una parte esencial de esta estrategia (Carvajal Alcaraz, 2011).

Sin embargo, para lograr llevar a cabo la transformación de microalgas a productos de interés óptimas condiciones, es necesario conocer cómo se lleva a cabo el crecimiento de estos microorganismos, en donde el crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a través del tiempo. Por tanto, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo (ciclo celular), sino al demográfico. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y su posterior división celular dando origen a nuevos individuos y como consecuencia se tiene el incremento de la población generación tras generación (Brock & Madigan, 1993).

Este crecimiento se rige por la relación entre el tiempo y número de células que se crean en un rango previsto, estudiar y comprender esta relación es la que determina que tan viable es la obtención de productos de interés, así como la optimización del proceso. Varios factores son los que determinan esta relación, tales como intensidad luminosa, pH, temperatura, nutrientes, etc. Sin embargo la captura de carbono a través del cultivo de microalgas se presenta como un nuevo esfuerzo en la reducción de la

concentración de CO_2 en la atmósfera, ya que son microorganismos de rápido crecimiento con velocidad de biofijación de CO_2 relativamente alta, lo que le confiere una ventaja frente a otros sistemas biológicos para la captura de este compuesto (Carvajal, 2011).

Por este motivo en las últimas décadas se ha notado un incremento en el estudio de este fenómeno, ya que la eliminación de este compuesto es vital para una estrategia sustentable en contra del efecto invernadero y el cambio climático. Sin embargo y aun cuando los resultados de dichas investigaciones son favorables, muchas de las industrias siguen sin ver el potencial para la construcción de mecanismos de desarrollo limpio (Protocolo de Kioto, 1997). Entre las razones más destacadas (para la poca adaptación de estos mecanismos) recae en el tiempo de residencia así como en la toleración del CO_2 en algunas especies de microalgas. Además, a todo esto se le debe sumar la obtención y el aislamiento de una especie apta que sea capaz de adaptarse a las condiciones ambientales (Carvajal, 2011).

Por lo tanto este trabajo pretende aportar una contribución para la producción sostenible a largo plazo utilizando una especie de microalga de fácil acceso y bajo costo, así como la optimización del proceso y la correlación de los parámetros analíticos de crecimiento, por lo tanto se plantean los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la agitación y la alimentación de CO_2 sobre los parámetros de la cinética de crecimiento de un cultivo de microalga de agua dulce en un fotobiorreactor.

Objetivo específicos

- Aislar y propagar un cultivo de microalga de un acuario doméstico para obtener un inóculo.
- Correlacionar los datos de biomasa con las mediciones de densidad óptica.
- Obtener los parámetros cinéticos de crecimiento de un cultivo de microalgas bajo condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto del tipo de agitación y la alimentación de CO_2 sobre la cinética de crecimiento.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Cinética de crecimiento

La definición más simple de crecimiento microbiano es el incremento en el número de células o el aumento en la masa microbiana, esto es un componente esencial de la función microbiana, ya que una célula tiene un periodo de vida determinado y la especie se mantiene mediante la división celular dando como resultado del crecimiento continuo de la población celular. Dicho crecimiento se puede modelar matemáticamente, de tal manera que se pueda predecir el aumento de la población celular de un cultivo, esto adquiere relevancia ya que este modelamiento influye en el diseño de biorreactores, el cual da como resultado el crecimiento de la biomasa que se puede obtener, además de controlar los parámetros adecuados para un crecimiento óptimo (Brock & Madigan, 1993).

En la Figura 1 se pueden observar una curva típica del crecimiento para una microalga, en donde se muestran las diferentes fases de crecimiento.

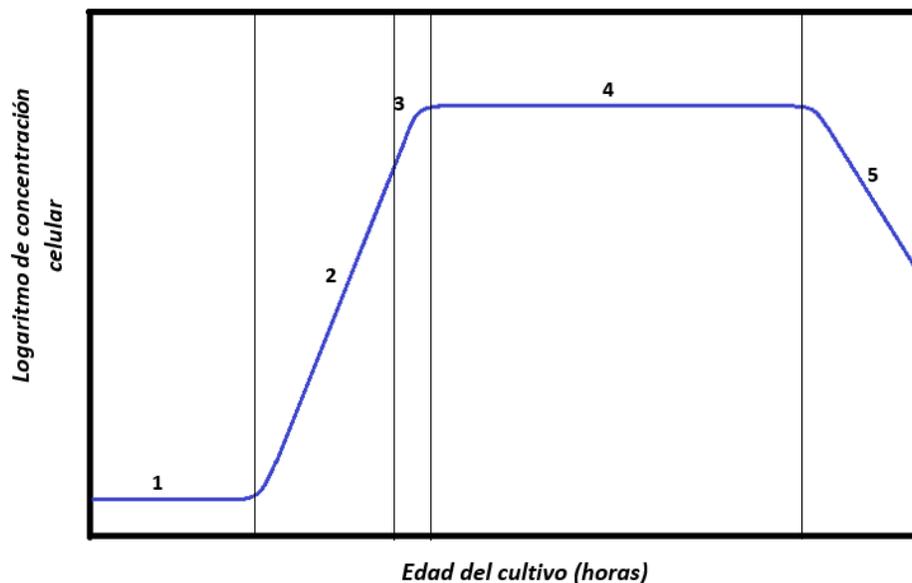


Figura 1. Curva de crecimiento ideal de microalgas en medios de cultivo de volumen limitado.

1. La fase de inducción o lag: se caracteriza por que no hay crecimiento microbiano, ya que en esta fase los microorganismos se adaptan a su nuevo entorno dándose el procesamiento de sustratos según sus necesidades nutricionales (Brock & Madigan, 1993).

2. La fase exponencial: recibe ese nombre debido a que aquí empieza la duplicación celular de manera acelerada, de esta fase se pueden conocer varios parámetros de valor intrínseco al cultivo, uno de los más importantes es el tiempo de duplicación, que es el tiempo en que una célula se duplica (Brock & Madigan, 1993).

Para obtención de dicho tiempo se utiliza como modelo matemático la ecuación diferencial de crecimiento celular, la cual es:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Que al resolver por medio de variables separables y con las condiciones de $t=0$; $X=X_0$ y $t=t_2$; $X=2 X_0$, se obtiene:

$$t_2 = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (2)$$

3. Fase de declinación relativa al crecimiento: en esta fase se manifiesta un decremento en la velocidad de reproducción de la célula, debido a condiciones desfavorables.

4. La fase estacionaria: aquí la velocidad de división celular ha decrecido, a tal grado que las nuevas células son producidas al mismo ritmo que cuando mueren las células viejas por lo tanto el número de células es constante, esto debido a que los nutrientes que se encontraban en el medio de cultivo se van agotando.

5. La fase de muerte celular: en esta etapa ya no es posible la división celular, por lo tanto, las células mueren y su población decrece exponencialmente (Brock & Madigan, 1993).

Modelos cinéticos de crecimiento microbiano.

Como definición, los modelos matemáticos son hipótesis existentes entre las relaciones matemáticas de las variables medibles y no medibles en sistema, procesos o experimentación. Los modelos matemáticos tienen, entre sus principales aplicaciones o utilidades el poder correlacionar datos experimentales y así tener una visión más acertada acerca del proceso en cuestión, hacer una predicción cuantitativa del proceso, reducir costos en diseño experimental y de proceso, considerar o no variables que puedan o no afectar el desarrollo experimental y utilizar el modelamiento matemático para escalar procesos. En general, un modelo matemático de crecimiento está compuesto por 3 partes: la primera corresponde a los principios químicos, físicos y biológicos involucrados en el proceso en cuestión, la segunda son las inferencias que se puedan hacer a partir de los datos existentes previamente y la tercera corresponde a las suposiciones que se deban hacer, con bases y criterios válidos. En las fermentaciones, es una constante que los modelos matemáticos tengan uno o varios parámetros que los describan y que su valor numérico sea desconocido antes de aplicarlo y no sea medible. Respecto a la última parte, las suposiciones que se realizan son necesarias debido a la complejidad de los procesos microbiológicos, estas suposiciones aunque introducen inexactitud a los modelos respecto a ciertas variables, no inciden considerablemente, por ejemplo, en la descripción de las etapas de crecimiento microbiano u otras variables importantes en los procesos microbiológicos (Alcon, 1999).

Actualmente, la microbiología predictiva es un campo de estudio de gran interés. Por medio de esta, es posible describir, predecir, evaluar, optimizar y desarrollar procesos biológicos sin la necesidad de pasar por el ámbito experimental. Para ello, son necesarias correlaciones y parámetros que puedan asociarse a los procesos; es donde los modelos cinéticos de crecimiento juegan un papel fundamental en las investigaciones. Entre los modelos cinéticos de crecimiento microbiano, se encuentran los siguientes:

Ecuación Logística. Esta ecuación, describe el comportamiento de la biomasa en distintos procesos de crecimiento, se representa mediante:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (3)$$

Donde X_m hace referencia a la concentración máxima de biomasa en el proceso, μ es la tasa de crecimiento específica (h^{-1}) y X la concentración de biomasa. Al integrar la ecuación (3) en las condiciones de frontera $X=X_0$ y $t=t_0=0$, se obtiene la ecuación correspondiente al crecimiento de biomasa en función del tiempo (Trinidad, 2014).

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}} \quad (4)$$

Modelo de Monod. Modelo desarrollado en 1942, que describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento sin ningún tipo de proceso de inhibición durante el crecimiento. Este modelo toma solamente en consideración las fases positivas de crecimiento y se asume la población microbiana como homogénea (Trinidad, 2014).

$$\frac{dX}{dt} = X \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (5)$$

Modelo de Moser. Este modelo nació como una modificación al modelo de Monod en 1958, y se considera como una buena aproximación cuando la composición celular es independiente del tiempo de proceso. Se caracteriza porque en su formulación, está implícita la consideración del efecto de la propagación de especies mutantes en la población bacteriana. Este modelo se representa mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad (6)$$

Cuyo acople a un balance de masa y de sustrato para obtener todas las variables en función de la biomasa, se deduce:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{\left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}\right)^n}{K_m + \left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}\right)^n} X \quad (7)$$

Este modelo considera las mismas variables que el modelo de Monod y su única variación es la introducción del parámetro n , cuyo valor es empírico para cada proceso (Trinidad, 2014).

Modelo de Teissier. Modelo propuesto en 1936, previo al modelo de Monod y fundamentado en un punto de partida diferente al mismo, explicando el efecto de las hormonas en el crecimiento de ciertos cultivos. Este introdujo el concepto de deficiencia de crecimiento, hipótesis que resultó mostrando la relación semilogarítmica entre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa (Trinidad, 2014). Este modelo se describe mediante:

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - e^{\left(\frac{-S}{K_S}\right)}\right) \quad (8)$$

Modelo de Haldane. Este modelo desarrollado en 1930, y utilizado ampliamente en sistemas en discontinuo, estudia entre otras cosas, las capacidades de adaptación de microorganismos al medio. Además de esto, es matemáticamente simple para su desarrollo y es una buena representación de la presencia de sustratos inhibitorios en el medio de cultivo (Trinidad, 2014). El modelo de Haldane, se representa por medio de la siguiente ecuación.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_m + S + K_I S^2} \quad (9)$$

Despejando S, en un balance de sustrato para acoplarlo a un balance de masa, da paso a la ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{K_S + S_0 + K_I \left(S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}} \right)^2} X \quad (10)$$

Donde μ_{max} , S, K_S , K_I , corresponden a tasa de crecimiento específico (h^{-1}), concentración de sustrato (g/mL), constante de saturación (g/mL) y constante de inhibición por sustrato (g/mL) (Trinidad, 2014).

Modelo de Contois. Modelo desarrollado en 1959, y que ha sido ampliamente utilizado en la literatura para describir procesos de tipo anaeróbicos, para los casos principalmente donde la etapa de hidrólisis controla en mayor medida la velocidad del proceso fermentativo. Además, este considera que la tasa de crecimiento específica depende de la densidad de población en el medio (Trinidad, 2014).

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S X + S} \quad (11)$$

Modelo de Gompertz. El modelo de Gompertz fue desarrollado inicialmente para describir los procesos de mortalidad en poblaciones humanas. Posteriormente, se desarrolló como un modelo cinético de tipo primarios, es decir, capaz de describir la concentración de biomasa a lo largo del tiempo (Trinidad, 2014). Este modelo es descrito como:

$$X = X_0 C e^{-B(t-M)} \quad (12)$$

Donde C, M y B corresponden a recuentos microbianos cuando el tiempo crece indefinidamente (UFC/MI), tiempo para alcanzar la tasa de crecimiento específica máxima (h) y la velocidad de crecimiento relativo (UFCmL⁻¹h⁻¹).

Variables que a su vez, representan expresiones matemáticas que permiten encontrar parámetros cinéticos de interés.

Tasa de crecimiento específica.

$$\mu_{max} = \frac{BC}{e} \quad (13)$$

Duración de la fase de latencia.

$$LDP = \frac{M - 1}{B} \quad (14)$$

Máxima densidad de población microbiana.

$$MDP = A + C \quad (15)$$

Modelo de Powell. La principal característica de este modelo cinético, es que acopla la transferencia de masa de sustrato a través de la célula a la ecuación de Monod, pues contiene la difusividad del sustrato y la permeabilidad del mismo en la membrana (Trinidad, 2014).

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_m + L) + S} \quad (16)$$

Validación de modelos cinéticos.

La validación de los modelos es uno de los pasos necesarios para realizar una comparación entre los mismos, siendo de gran importancia en este tipo de investigaciones. Para ello, se utilizaron los parámetros obtenidos con cada uno de los modelos estudiados, para simular el crecimiento microbiano a través del tiempo y comparar dicho comportamiento con los puntos experimentales obtenidos. Estos datos obtenidos, se evalúan a partir del coeficiente de correlación obtenido (R^2) y el porcentaje de error de mínimos cuadrados (MSE), calculándose este último a partir de la siguiente ecuación:

$$MSE (\%) = \left(\frac{\sum (y_i - f_i)^2}{n_t} \right) \quad (17)$$

Donde y_i , f_i y n_t corresponden a los datos experimentales obtenidos, datos calculados con el modelo y número total de datos, respectivamente (Trinidad, 2014).

Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores (FBRs) son dispositivos destinados al cultivo masivo de microalgas. Para ello, tienen que mantener un medio estable (temperatura, pH, baja concentración de O_2) y proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento incluyendo la luz. Existen dos filosofías de diseño opuestas. Los reactores abiertos aceptan un control pobre del entorno mientras que los FBR cerrados consiguen unas condiciones estrechamente controladas que permiten a las microalgas crecer a una velocidad óptima a cambio de un mayor costo (Ramírez, 2002).

Fotobiorreactores abiertos

En los fotobiorreactores abiertos el cultivo está en contacto con la atmósfera. Los fotobiorreactores son instalaciones que intentan compensar con un bajo costo una baja productividad debida a un control poco estricto o inexistente de condiciones como el pH o la temperatura. Al estar abiertos son susceptibles a la invasión de otros

microorganismos incluyendo microalgas, por lo que son especialmente adecuados para especies robustas y de rápido crecimiento (Katuwal, 2017).

Sin embargo, pese a estos inconvenientes, la mayoría de las microalgas producidas en el mundo provienen de este tipo de sistemas. Su gran ventaja es que es fácil y económico construirlos en grandes volúmenes incluso de cientos de metros cúbicos (Katuwal, 2017).

Existen dos tipos básicos de fotobiorreactores abiertos: "open ponds" que, como su nombre indican son simples receptáculos del tamaño y forma adecuado y los "raceways" que, además son capaces de suministrar agitación y mezcla, facilitar el intercambio de gases e incluso controlar el pH en cierta medida, este tipo de birreactores serán los que utilizaremos en la parte experimental, ya que se dará una agitación mediante la entrada de gases que producen burbujas, que además de fungir con esta tarea, suministrara la entrada de aire, esta variante de fotobiorreactores son denominados airlift (Katuwal, 2017). La Figura 2 muestra el esquema de un reactor airlift.

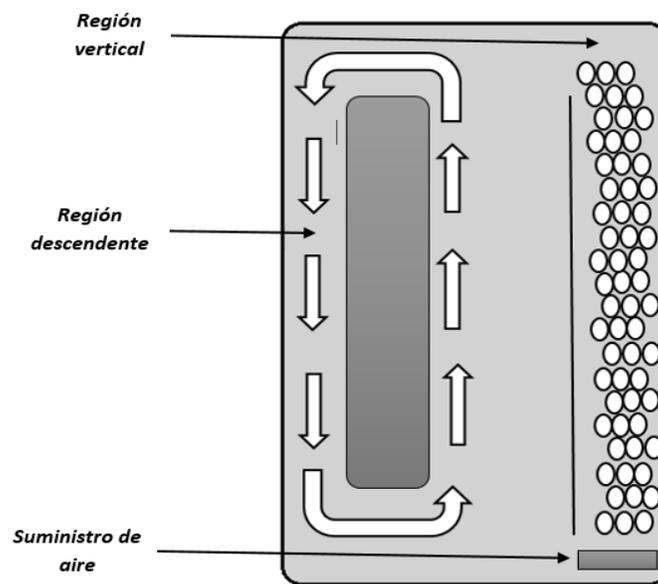


Figura 2. Diagrama básico de birreactor airlift

Microalgas de acuario

Dentro de un ecosistema como el representado por un acuario, existen diferentes microorganismos que pueden ser utilizados como materia prima, entre ellos diferentes especies de microalgas. Por lo general, su presencia es indicativa de problemas ya que modifica los parámetros nutricionales y la estética del acuario. Sin embargo, existen microalgas benéficas para el entorno, ya que están presentes en pequeñas cantidades y son indicativos de una buena calidad de agua, además de eliminar los fosfatos y liberar oxígeno (Abalde et al., 1995).

Existen un sinnúmero de microalgas que crecen en un acuario que van desde marrones, azules, hasta rojas, sin embargo las más importantes son las microalgas verdes. Dentro de este grupo se pueden citar a las responsables de la denominada agua verdosa que son las unicelulares y a las filamentosas. Las unicelulares se presentan libremente en el agua o fijas sobre objetos decorativos y hojas de las plantas en forma de puntos. Su invasión se debe principalmente a un exceso de nutrientes no aprovechados por las plantas y a un fotoperiodo excesivamente largo o como resultado directo de la luz solar. Pueden presentar una gran variedad de formas y tamaños, su reproducción es asexual. Algunas de estas microalgas son muy parecidas a pequeñas plantas, donde se distinguen tallos, hojas y raíces. Otras viven asociadas a hongos formando líquenes (Guaman & Gonzales, 2016).

Taxonómicamente pueden clasificarse en dos divisiones: *chlorophyta* y *charopyta*.

Chlorophyta: Son organismos eucariotas, en su mayoría acuáticos fotosintéticos. Todas las especies de este grupo, contienen clorofila a y b y almacenan sustancias de reservas como el almidón. En esta división se encuentran organismos tanto unicelulares como pluricelulares. Aunque la mayoría se desarrollan en agua dulce, existen muchas microalgas de ambientes marinos y son capaces de adaptarse a cualquier variación en su hábitat. En esta división se encuentran *Prasinophyta*, *Chlorophytina*, *Chlorophytina* (Guaman & Gonzales, 2016).

Charopyta: Son los parientes más próximos a las plantas terrestres. Este grupo se clasifican en cinco divisiones: *Mesostigma phyceae*, *Klebsormidium phyceae*, *Zygnematophyceae*, *Coleochaetales* y *Charophyceae*.

Las microalgas verdes se pueden reproducir vegetativamente por fragmentación y sexualmente por medio de hologamia, conjugación, planogamia y oogamia.

- Hologamia: ocurre cuando el alga entera funciona como un gameto, fusionándose con otra igual. Se presentan en las Algas verdes unicelulares.
- Conjugación: este tipo de reproducción ocurre en las algas filamentosas. Para ello, una de las algas toma el rol de macho y la otra de hembra, uniendo ambos filamentos en forma paralela. Entre células de ambos forman tubos de unión por los que pasan contenidos celulares de uno a otro lado. Esto origina una zigospora, que puede permanecer latente por mucho tiempo antes de formar un nuevo filamento.
- Planogamia: consiste en la reproducción mediante gametos móviles, tanto masculinos como femeninos. Ya que ambos contienen flagelos que les permite movilizarse.
- Oogamia: en este caso el gameto femenino es inmóvil, debido a que no tiene flagelos. La fecundación puede ser externa, cuando esta es liberada de la estructura que la formó inicialmente e interna si se mantiene fija.

Las microalgas presentan dos ciclos biológicos el monogenético y digenético, los cuales se describen a continuación.

- Monogenéticos: comprende una única generación con una o dos cargas de cromosoma Y una fase nuclear haploide o diploide.
- Digenéticos: hay una alternancia de dos generaciones, que pueden ser isomórficas o heteromórficas. Dependiendo si la morfología de las dos, son iguales o diferentes; en este caso una de las dos tratará de dominar sobre la otra. En este proceso, una generación será haploide y otra diploide.

Las microalgas verdes pueden presentar diversos tipos de longevidad. Existen especies como la *Codium tomentosum* que son perennes y por lo tanto vivir por muchos años. Pero también existen las estacionales, que si se dan las condiciones de luz y nutrientes adecuados, pueden crecer en forma rápida. (Guaman & Gonzales, 2016).

Cultivo de microalgas

Requerimientos Físico-Químicos

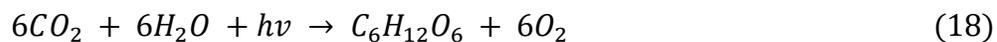
En cultivos masivos la aireación es un factor muy importante para la homogeneización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las microalgas. Al igual que como cualquier otro organismo vivo, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de la microalga. Cada especie presenta un intervalo específico de temperatura, intensidad de luz, bióxido de carbono y oxígeno para la producción de un máximo de crecimiento. Es necesario especificar que la influencia de un solo parámetro no determina el crecimiento óptimo, es el conjunto de parámetros lo que crea determinadas respuestas en el crecimiento de las microalgas (Chaumont, 1993).

Parámetros físicos

Como parámetros físicos se incluye la penetración de la luz en el cultivo. Las microalgas son fotoautótrofas encargadas de convertir energía luminosa en metabólica esto mediante la fotosíntesis, por eso es necesario conocer que es la fotosíntesis.

La microalga es similar a las plantas verdes en este proceso, emplean la energía de la luz del sol para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen (en la fase luminosa de la fotosíntesis) el nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADP⁺ forma oxidada) a su forma reducida NADPH. NADP⁺ es una coenzima que intervine en numerosas vías anabólicas, mientras que NADPH intervine en la fase oscura de la fotosíntesis (ciclo Calvin) donde se reduce el CO₂. El NADPH actúa como transportador

de energía, la cual se emplea finalmente en sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas.



Donde hv representa la energía lumínica en función de su frecuencia ν y la constante de Planck h . el proceso fotosintético de fijación de CO_2 provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación OH^- . En la actualidad se denomina a este proceso fotosíntesis oxigenica (Cantizano, 1990).

La fijación biológica del CO_2 se lleva a cabo por los procesos fotosintéticos de todas las plantas terrestres y un enorme número de microorganismos fotosintéticos (Skjanes et al., 2007). La captura de CO_2 por los ecosistemas vegetales terrestres constituye un componente importante en el balance global de Carbono. Sin embargo, las plantas parecen contribuir sólo con el 3-6% de las emisiones globales de CO_2 en el planeta (Skjanes et al., 2007), mostrando en este sentido, menor eficiencia que los procesos de captura llevados a cabo por microalgas y cianobacterias, quienes reportan una eficiencia de fijación de CO_2 aproximadamente entre 10-50 veces mejor que las plantas (Costa et al., 2000). Los sistemas de captura que involucran microalgas y cianobacterias, además de su eficiencia, revisten importancia gracias a que crecen rápidamente, fijan las mayores cantidades de CO_2 del planeta (González., et al 2011), contienen compuestos valiosos y son cosechadas de manera fácil (Cheng et al., 2006) Cuando se combina la captura de CO_2 , la producción de biocombustibles, y el tratamiento de aguas residuales con sistemas de microalgas, se ofrece una alternativa bastante prometedora para las actuales estrategias de mitigación de CO_2 (Wang et al., 2008) .

Debido a que casi el 50 % de la biomasa de microalgas se compone de carbono (Becker, 1994), este elemento es un componente importante para el crecimiento celular. Cuando se cultivan fotoautotróficamente, todas las microalgas utilizan las fuentes inorgánicas de carbono para sintetizar compuestos. A pesar de que las microalgas son capaces de utilizar el carbono inorgánico en diversas formas (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , Y CO_3^{2-}), estudios detallados acerca de la influencia de la fuente de

carbono en la productividad (biomasa) de las microalgas indican que, a pesar de que el HCO_3 es fácilmente absorbido por las células, ésta es una fuente de carbono pobre en comparación con el CO_2 (Martin, 2010). De hecho, es posible obtener una respuesta lineal en el carbono de la biomasa con el aporte de masa de carbono (que corresponde a una eficacia de prácticamente del 100 %) esto sólo sucede con entradas limitadas de carbono inorgánico y rangos estrechos de pH. Para los cultivos en microalgas se emplea aire enriquecido con CO_2 como aporte nutrimental.

Para lograr una buena fijación de CO_2 se debe considerar en cualquier tipo de reactor un mezclado eficiente que debe ser proporcionado con el fin de producir una dispersión uniforme de las microalgas en el medio de cultivo, eliminando así los gradientes de concentración de luz, nutrimentos (entre ellos CO_2) y temperatura (Contreras et al., 2003).

Se conoce que el exceso de la agitación mecánica es causa de turbulencia, lo que puede originar daños permanentes en la estructura celular afectando el crecimiento y la producción de metabolitos. Por lo contrario, una agitación insuficiente provocará sedimentación y muerte celular. Se han realizado pocos estudios cuantitativos relacionados con el estrés hidrodinámico en cultivos de microalgas en fotobiorreactores del tipo airlift los cuales son sistemas basados en la agitación del cultivo con aire o una mezcla de gases comprimidos (Chisti, 1989; Carvalho y col., 2006). El aumento de la tasa de crecimiento de algunas especies de microalgas cuando se incrementa la turbulencia, es debida a la mejora del suministro de luz y CO_2 . Sin embargo, a niveles mayores de turbulencia, el crecimiento se ve disminuido drásticamente, aumentando simultáneamente la velocidad superficial del gas causando un posible daño celular (Contreras et al., 2003). Los sistemas de mezclas de gases o los sistemas de columnas de burbujeo causan menor daño celular que los sistemas de agitación mecánica. Esto únicamente para el caso de unidades de bombeo de aire, en donde la mezcla se logra por el flujo de líquido que se obtiene por la aspersion del aire al centro del tubo interno, disminuyendo la densidad celular del líquido provocando que este suba.

El líquido fluye hacia abajo a través del tubo exterior, creando así una circulación natural. Aunque estos sistemas parecen causar un menor daño celular, no están

exentos de un esfuerzo cortante causando daño celular en menor medida (Gudin y Chaumont, 1991). Barbosa et al., (2004), reportaron la formación de burbujas en el difusor como el factor principal que conduce a la muerte celular. Por último, se ha reportado el efecto de sombreado mutuo, el cual implica el movimiento celular continuo desde y hacia las zonas de luz y oscuridad. Este efecto se considera esencial para garantizar la alta productividad de biomasa. (Degen et al., 2001; Contreras et al., 2003; Martin, 2010).

Luz

En cultivos de microorganismos fotoautótrofos la disponibilidad de luz determina la velocidad específica a la que se realiza la fotosíntesis y, como consecuencia, determina también la tasa específica de crecimiento. Sin embargo, en todos los sistemas de cultivo, las células más cercanas a la superficie iluminada impiden la penetración de la luz hacia el seno del medio de cultivo y producen un efecto de sombreado sobre las células más alejadas de la superficie. En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2 cm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10 – 30 %) del volumen total del cultivo. Debido a que el medio de cultivo está en constante movimiento, las células solo son expuestas por breves instantes a la luz en ciclos que pueden durar desde milisegundos a unas cuantas décimas de segundo. En condiciones reales el factor que determina la actividad fotosintética es la cantidad de energía disponible para cada célula individual, más que la cantidad de energía luminosa incidente (Lu y Vonshak, 1999; Fernandes et al., 2010). Los parámetros que pueden considerarse básicos para describir la disponibilidad de energía bajo una iluminación intermitente son dos, la relación de los periodos luz/oscuridad (L/O) y la frecuencia de los ciclos L/O. Estos establecen en gran medida el régimen de iluminación, el cual es un indicador de la disponibilidad de luz para una célula individual (Fernández et al., 2002).

La trayectoria de la luz es la distancia transversal que debe recorrer un fotón para pasar a través de un fotobiorreactor (Richmond, 1996), Su magnitud es determinada por diferentes medidas en los diferentes tipos de reactores. Así, la trayectoria de la luz

es determinada por la profundidad de líquido en un reactor de tipo carrusel, por la separación entre las placas en un reactor de placas (horizontal o vertical) o por el diámetro del tubo en un reactor tubular. Las rutas luminosas que mejores resultados han dado en diferentes fotobiorreactores están entre 2.6 y 3.0 cm, sin embargo, en cultivos de alta densidad celular, una trayectoria de la luz de 1 cm aumenta la probabilidad de que las células en promedio estén expuestas a un régimen de iluminación óptimo (Javanmardian y Palsson, 1991). En virtud de lo anterior, actualmente no es recomendable utilizar rutas luminosas de más de 10 cm en ningún tipo de fotobiorreactor. (Oncel y Sukan, 2008)

Requerimientos de pH

Las microalgas tienen diversos requerimientos de pH para su crecimiento. A niveles de pH alcalinos, la disponibilidad de CO_2 puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Un pH óptimo en el cultivo generalmente es mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con CO_2 . En el caso de los cultivos de alta densidad celular, la adición de dióxido de carbono corrige un incremento del pH, el cual puede llegar a un valor límite de 9 para el crecimiento de la microalga.

Algunos autores coinciden que el crecimiento de las microalgas es óptimo a un pH neutro de 7.5 (Linden y Hartmut, 2001; Del Río et al., 2007; Martin, 2010). Por lo general, soluciones amortiguadoras son añadidas a los medios de cultivo con la finalidad de ajustar y mantener el pH del medio (Andersen, 2005). El pH se incrementa conforme la edad del cultivo es mayor, esto es debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrientes. Por lo tanto, es recomendado que el pH inicial del medio de cultivo se ajuste a 6.5 antes de ser inoculado (Martin, 2010). Estudios con *Chlorella vulgaris* han demostrado que pH extremos (alcalinización o acidificación del medio de cultivo) incrementan la producción de calor y las tasas de respiración, comportamiento contrario al observado con *Dunaliella maritima* (Alyabyev et al., 2011).

Temperatura

Con respecto a la temperatura, muchas especies rondan la temperatura óptima entre el intervalo 15 y 20 °C, pocas especies logran crecer a más de 28 °C. Temperaturas bajas en referencia a este intervalo no provocan una muerte en la microalga solo una disminución en el crecimiento, sin embargo temperatura por arriba de los 35°C provocan un colapso en la mayoría de las especies de microalgas (Romo, 2002).

Salinidad

Otro punto de importancia es el intervalo de salinidad, este depende totalmente de la especie. Por lo general en cultivos de microalgas de mar y con poco contacto atmosférico este parámetro no es controlado ya que se utiliza la salinidad presente en el agua de mar, sin embargo al ser una especie de agua dulce y que tiene contacto atmosférico este debe balancearse, convirtiéndose en un parámetro de control del crecimiento de la microalga (Romo, 2002).

Requerimientos químicos

En cuanto a los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento se encuentran los macronutrientes y los micronutrientes. La proporción de estos nutrientes se manifiesta en un descenso o hasta el mismo cese del mismo, por lo que se necesita un equilibrio perfecto para que este no afecte o juegue en contra.

Por macronutrientes se considera una fuente de nitratos/fosfatos (NO_3/PO_4) y con respecto a los micronutrientes son aquellos que se requieren en poca cantidad en comparación con los antes mencionado, sin embargo esto no significa que no sean importantes. Además de estos componentes también son necesarias otras sustancias para el crecimiento. Se sabe que la mayoría de las especies de microalgas son auxotróficas, esto quiere decir que no son capaces de sintetizar todas las vitaminas necesarias y tienen que asimilarlas del medio. Vitaminas como la tiamina (B1), la

cianocobalamina (B12) y la biotina (B6) son consideradas esenciales para la mayoría de las microalgas (Salazar, 2016).

Por todo lo mencionando en la tabla 1 se en listan los principales requerimientos físico-químicos de los cultivos de microalgas y sus valores aproximados. Esto no quiere decir que sean todos los requerimientos necesarios ya que existen algunos requerimientos particulares que se deberán estudiar según la especie y que se utilizaran en las condiciones concretas del cultivo a utilizar, por lo tanto estos datos son solo de referencia (Salazar, 2016).

Tabla I. Principales requerimientos Físico-Químicos de los cultivos de microalgas.

Requerimientos Nutritivos		Requerimientos Físicos	
C	$CO_2; CO_3 \cong$	Luz	2,000 - 4,000 lux
O, H	$O_2; H_2O \cong$	Temperatura	15 - 22°C
N	$N_2NH_4 + NO_3 \cong$	Salinidad	0.37%
P	$PO_4 \cong$	PH	7 - 9
S	$SO_4 \cong$	Redox	
Na, K, Ca, Mg	Sales		
Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales		
Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al	Sales		
Vitaminas	B12, tiamina, biotina		

Fuente: Adaptada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, 1993.

Medio de cultivo para microalgas.

Muchas han sido las aportaciones con respecto a los medios de cultivo para microalgas de agua de mar, esta creación de medios de cultivo empezó en los años 1890-1893 por un investigador conocido como Miguel (Provasoli et al, 1957) quien observo que las algas marinas crecían mejor en el laboratorio gracias a la adición de

sales de agua de mar. Sin embargo en 1910 dos investigadores (Allen y Nelson) logran simplificar los medios de cultivos, determinando experimentalmente los iones existentes en el agua de mar y los requerimientos de estos por las microlagas, con lo cual elaboran un medio de cultivo simple y eficaz que cubría las necesidades básicas de las microalgas, logrando buenos resultados (Harrison et al., 1980).

También existen medios enriquecidos con aguas de desecho tratados y extractos de suelo, ya que se aprovecha los indigeridos de estiércoles.

Con lo que respecta a microalgas de agua dulce son pocas las aportaciones, ya que, más que nada se hacen modificaciones a los medios existentes para adaptarlos a los requerimientos nutricionales de cada especie, también se adaptan a los costos de producción y facilidad de preparación de los medios. Por lo tanto es necesario conocer las especificaciones nutricionales de la especie con la que se trabaje. En este caso al no conocer la especificaciones, se optó por la implementación del medio Guillard f/2, ya que es la mejor adaptación a las diferentes especies, esto quiere decir que los cambios que se realizan son mínimos, ya que comprende en parte esencial con los requerimientos de las microlagas en general, además ha mostrado ser el medio más utilizado ya que logra buenos resultados obteniendo mayor densidad de población y productividad por volumen de cultivo a nivel experimental como industrial.

Métodos para la determinación de biomasa

La medición de biomasa es importante, ya que se logra obtener un recuento directo de la población celular. Para llevar a cabo esta tarea se cuenta con diferentes métodos como son el conteo celular a través de una cámara de conteo que es de los métodos más comunes. También está la medición de la densidad óptica o absorbancia con ayuda de un espectrofotómetro, este método tiene dos ventajas importantes, la primera es la capacidad de leer varias muestras en un corto tiempo y la segunda, de ser un método de alta precisión. Otro método es la cuantificación de biomasa mediante peso seco (Arnaiz et al., 2000).

En las microlagas de acuario se dificulta la utilización del método de conteo celular, ya que en ocasiones se encuentran más de dos especies conviviendo en el ecosistema.

Por lo que se utilizan los otros dos métodos para la cuantificación de biomasa. A continuación se hace una breve explicación de los métodos utilizados para el monitoreo de la población (Arnaiz et al., 2000).

Densidad óptica. Mediante un espectrofotómetro se determina la concentración de la muestra por densidad óptica, con esto se determina la absorbancia (nm), que se extrapola con la recta patrón antes determinada que corresponde a la especie problema. Así en la intersección de la recta conociendo la concentración se puede calcular la cantidad de microalgas de la muestra problema. Por otro lado conociendo la ecuación de la recta de cada gráfica, según la especie, se determina directamente la concentración de células de la muestra sustituyendo el valor de la absorbancia en esta ecuación (Torretera et al., 1989).

Volumen celular. Mediante centrifugación se obtiene un paquete celular, en el cual desechando el sobrenadante, puede ser pesado y determinado en unidades de peso por volumen (w/v), la cantidad de células o biomasa de la muestra siempre será obtenida en peso seco. Este método es muy útil para grandes volúmenes, sin embargo muestra una desventaja a considerarse, ya que su determinación incluye microorganismos activos además de microorganismo muertos, material inerte y materia orgánica adsorbida. A todo esto se le debe sumar que no es conveniente su utilización cuando los sustratos a degradar son insolubles. A la vez en este método los componentes volátiles de las celular pueden perderse en el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene humedad relativa alta. (Torretera et al., 1989).

MATERIALES Y METODOS

Descripción general del trabajo

El desarrollo de la parte experimental estuvo dividido en tres etapas, con el fin de obtener una investigación satisfactoria:

1. Obtención de cepa de microalga de acuario.
2. Escalamiento del cultivo.
3. Modificación de requerimientos físico-químicos.

1. Obtención de la cepa de microalga de acuario

En esta etapa se obtuvo una cepa de microalga procedente de un acuario doméstico, es con el propósito de implementar un microorganismo adaptado a las condiciones del ambiente, que en este caso fue a ciudad de Hermosillo, Sonora. Para llevar a cabo esta etapa se realizaron los siguientes pasos.

- a) Se obtuvo una muestra de acuario domestico proporcionado por el laboratorio de biotecnología localizado en el segundo piso en el edificio 5Q de la Universidad de Sonora. La muestra proporcionada debía ser el 5% del volumen total del biorreactor, por lo que se proporcionó 25 mL, este no presentaba ninguna turbidez aparente a simple vista.
- b) Antes de iniciar con el cultivo de microalgas, se realizaron pruebas en el birreactor de 500 mL, con el fin de obtener las mejores condiciones de agitación del cultivo por medio de inyección de burbujas de aire y para así evitar la sedimentación de la biomasa.
- c) Cuando se obtuvo la inyección óptima de las burbujas de aire se preparó el medio de cultivo elegido, el cual se preparó con 475 mL de agua desionizada enriquecida con medio Guillard f/2 y 25 mL de inóculo. Una vez preparado el medio de cultivo se inició a la primera corrida experimental.
- d) Se realizaron repeticiones de esta etapa ya que varios factores impidieron el crecimiento óptimo del microorganismo.

2. Escalamiento del cultivo

En esta etapa se realizó un escalamiento de volumen del cultivo de 500 mL a 1000 mL, para luego escalar el volumen del cultivo a un biorreactor de 5L, este escalamiento por fases se hizo con dos objetivos. El primer objetivo fue contar con un inóculo suficiente para poder realizar las pruebas necesarias así como para prevenir inconvenientes de crecimiento asociadas a una baja concentración de inóculo viable. El segundo objetivo fue lograr un aislamiento de la cepa, ya que se observó mediante un análisis microscópico que en la primera etapa al momento de repetir el experimento el cultivo iba disminuyendo la cantidad de especies presentes. Esto se debe a que se puede considerar como un proceso de transferencias sucesivas del cultivo a una escala mayor, sin embargo esto no nos garantiza una cepa 100% pura como la que se obtiene aplicando las técnicas correctas.

También en esta etapa se monitoreó el cultivo experimental desde el tiempo cero de crecimiento. Los cultivos que se monitorearon fueron de los biorreactores de 5L y fueron evaluadas por densidad óptica y peso seco.

3. Modificación de requerimientos físico-químicos.

En ésta última etapa de experimentación se iniciaron dos cultivos: el primero haciendo una variación en la inyección de aire introduciendo una alimentación de CO_2 . El segundo implementado agitadores al biorreactor y utilizando la misma inyección de CO_2 . Los dos experimentos fueron monitoreados a diferentes tiempos del crecimiento de los cultivos. Las muestras del cultivo fueron evaluadas por densidad óptica y peso seco. Los datos obtenidos fueron correlacionados entre estos dos parámetros y además fueron comparados con los datos obtenidos en la segunda etapa. Se obtuvieron los parámetros cinéticos de crecimiento de los cultivos experimentales realizados en esta investigación, además se analizaron los resultados obtenidos en los experimentos de escalamiento y se hicieron comparaciones con datos de la literatura

Materiales y Reactivos

Medio de cultivo.

El medio de cultivo se preparó con agua desionizada obtenida del laboratorio de biotecnología y enriquecida con medio Guillard f/2 (Tabla II). Se utilizaron cuatro soluciones por separado: una solución nitrato/fosfato, una solución de vitaminas, una solución de metales y por ultimo una solución de metasilicatos. Estas soluciones se adicionaron, un mL por cada litro de agua.

Cultivo de microalgas en fotobiorreactor

Para la obtención del cultivo de microalgas se obtuvo agua de una acuario facilitado por el laboratorio de biotecnología de la Universidad de Sonora. Se utilizó 25 ml de agua de acuario y se prepararon 475 ml de medio de cultivo, el cual constaba de agua desionizada y medio Guillard f/2 (Tabla II). Se empleó un reactor de 500 mL y un sistema de mezclado que consistía en una bomba de aire (Hagen, elite802) proveía un flujo volumétrico de 2 L/min de aire que también contribuía con la alimentación de CO_2 . La Figura 3 muestra el sistema empleado para la obtención del cultivo de microalgas.

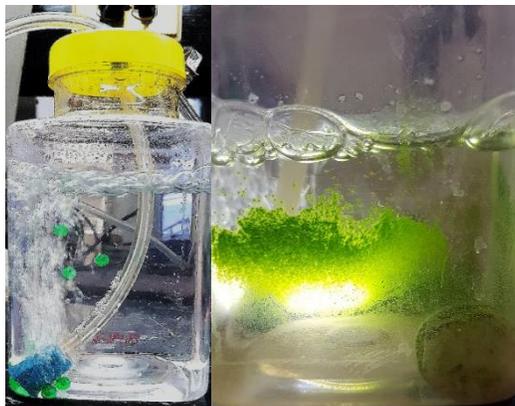


Figura 3. Sistema empleado en el crecimiento de la microalga en la primera fase experimental

Tabla II. Medio Guillard f/2

Constituyentes	Formula	Unidades
Nutrientes Principales		g/L de agua destilada
Nitrato de Sodio, granulado y refinado	$NaNO_3$	75
Fosfato de Sodio monobásico	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5
Silicato de sodio metasoluble	$Na_2SiO_3 \cdot H_2O$	30
Metales Traza		g/100 mL de agua destilada
<i>Solución Primaria</i>		
Sulfato de Cúprico, cristales finos	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.98
Sulfato de Zinc, cristales finos	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.2
Cloruro de Cobalto, cristales finos	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1.0
Cloruro Manganoso, cristales finos	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	18.0
Molibdato de Sodio, cristales finos	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.63
<i>Solución secundaria</i>		g/L de agua destilada
Cloruro Férrico	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3.15
EDTA Disodico	$Na_2 - EDTA$	4.36
<i>Metales Traza o Alternativamente</i>		1 mL de c/u
EDTA Férrico	$Fe - EDTA$	5.0
Vitaminas		1 mL de c/u
<i>Solución Primaria</i>		g/L de agua destilada
Biotina cristalizada	$C_{10}H_{14}N_2O_3S$	0.1
Cianocobalamina	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1.0
<i>Solución secundaria</i>		Cantidad en 100 mL de agua destilada
Biotina	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	1 mL
Cianocobalamina (B12)	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	1 mL
Tiamina Clorhídrica (B1)	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$	20mg

Fuente: Adaptada de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, 1993.

Una vez que se obtuvo el inoculo suficiente, se procedió a escalar el volumen del cultivo, pasando primero a un reactor de 1L de volumen. Utilizando 50 mL de inoculo obtenido en la fase experimental uno, y 950 ml de agua destilada. En la Figura 4 se muestra el sistema experimental utilizado.



Figura 4. Sistema de cultivo utilizado en el primer escalamiento

Para el escalamiento del cultivo de las microalgas en el fotobiorreactor en un volumen de 5L se prepararon cuatro litros de agua desionizada enriquecida y filtrada además de 250 ml de inoculo. También se utilizó un sistema de agitación con aireación, el cual proveía de CO_2 al sistema Figura 5. La Figura 3 muestra los elementos mencionados anteriormente para iniciar el cultivo de la microalgas.



Figura 5. Preparación del cultivo de microalga de acuario

El frasco del biorreactor, junto con todas sus partes fue lavado y esterilizados en una autoclave (121 ° C, 15 psi, 15 min). Una vez enfriado se procedió a llenar con el medio de cultivo y se inoculo con la cepa de microalga activada previamente. Este procedimiento fue utilizado para la segunda etapa y para la tercera etapa sin embargo se hicieron las modificaciones ya mencionadas.

Para el inicio de la tercera etapa se utilizó el mismo fotobiorreactor, operado de manera batch con un volumen de trabajo de cinco litros, la temperatura se mantuvo constante a 23 °C. Se alimentó al biorreactor una mezcla de gases con la ayuda de una bomba de aire (Hagen, elite802) y un dosificador. La corriente contenía 95% de aire y 5% de CO_2 (2.2 L/min y 56 mL/min respectivamente), la iluminación fue de forma continua y proporcionada por tres lámparas led de luz blanca 7.2 W, Figura 6.



Figura 6. Sistema de suministro de gases en el cultivo de microalga.

La segunda experimentación de la tercera etapa se hizo con los procedimientos antes mencionados, sin embargo se cambió de fotobiorreactor. La Figura 7 muestra el sistema empleado, en este caso se usó un biorreactor de vidrio con un volumen de trabajo de tres litros. En el cual se utilizó 150 mL de inoculo y 2850 mL de medio de cultivo. Se alimentó con una mezcla de gases que contenía 95% de aire y 5% de CO_2 (1.75 L/min y 45 mL/min respectivamente) y una agitación de 240 rpm mediante un cabezal mezclador (Stir-Pak, SSM34 90 VDC) y un control de velocidad (Stir-Pak, 230 VAC).



Figura 7. Cultivo de microalgas en fotobiorreactor instrumentado con agitación y alimentación de Aire 95% y CO₂ 5%

Técnicas Analíticas para el Seguimiento del Cultivo

Medición de la densidad óptica

Mediante un espectrofotómetro (Rayleigh, 4255) se determinó la concentración celular de las muestras experimentales, tomadas durante el crecimiento celular, por densidad óptica a una longitud de onda de 560 nm. Con los datos obtenidos de la densidad óptica se construyó una gráfica contra el tiempo y se obtuvo la ecuación de la recta. Conociendo la ecuación de la recta de cada gráfica, se determina directamente la concentración de células en cada tiempo de monitoreo sustituyendo el valor de la absorbancia del eje Y en esta ecuación (Torretera y col., 1989).

En la Figura 8 se muestra el procedimiento para la obtención de las lecturas de densidad óptica. Para la lectura de la muestra el procedimiento es el siguiente, primero se calibra el equipo con un blanco agua desionizada y enriquecida a cero de

absorbancia. Se homogeniza la muestra y se toma un volumen de aproximadamente un mililitro y se deposita en una celda para espectrofotómetro. Posteriormente, se procede a leer en la densidad óptica a una longitud de onda de 560 nm donde no exista interferencia por pigmentos. Por último se registra la absorbancia.

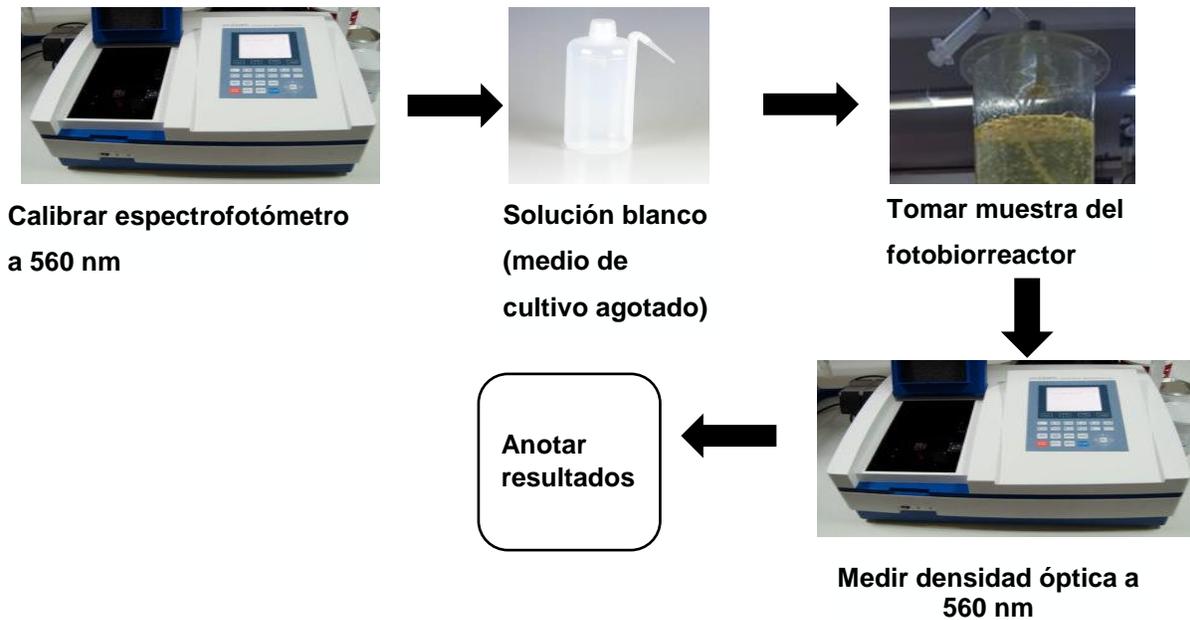


Figura 8. Diagrama de flujo para la medición de densidad óptica

Obtención de peso seco

En la Figura 9 se muestra el procedimiento para la obtención de peso seco. Se utilizó una membrana millipore para la filtración con tamaño de poro de 0.45 μm y 47 mm de diámetro S-Pak (Millipore), se pesó en una balanza analítica y se colocaron en un plato de aluminio y se resguardaron en un desecador. Se midieron alícuotas del cultivo de 10 ml las cuales se agitaron con un vortex para homogenizar la muestra de cultivo y se filtraron a través de la membrana millipore, utilizando un sistema de vacío. Posteriormente, se secaron a una temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 6

horas. Después del secado, las muestras se dejaron reposar en un desecador por aproximadamente 2 horas para que alcanzaran el equilibrio de la temperatura ambiente. Después de este tiempo, las membranas se pesaron con la biomasa seca y se obtuvo el peso seco por diferencia sustituyendo los datos en la Ec. 19.

$$\text{peso seco } \left(\frac{g}{ml}\right) = \frac{(\text{peso de plato} + \text{muestra seca}) - (\text{peso inicial plato} + \text{membrana})}{\text{volumen de muestra}} \quad (19)$$

Todo el material utilizado fue previamente esterilizado en la autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

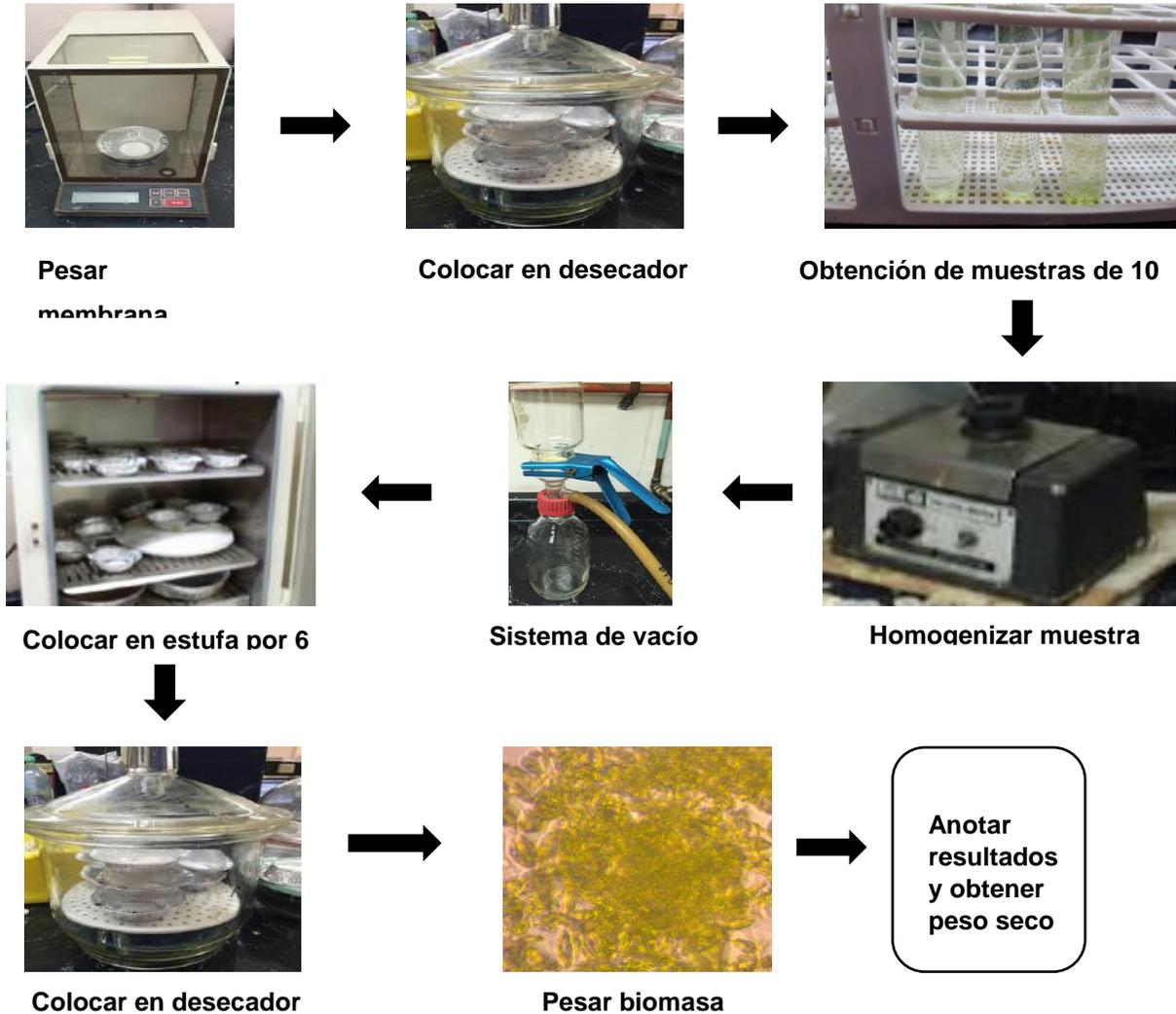


Figura 9. Diagrama de flujo para determinar peso seco de muestras experimentales

Obtención de lípidos

En la Figura 10 se muestra un diagrama para la obtención de lípidos de la biomasa. Para este proceso se utilizó el método Bligh and Dyer, el cual consiste en usar una solución compuesta de 1 mL cloroformo, 2 mL de metanol y 1 mL de agua por cada gramo de biomasa.

Primero se concentró un paquete celular de microalgas a partir de un volumen de cuatro litros, del cual se obtuvieron aproximadamente tres gramos de biomasa. Después se procedió agregar los solventes orgánicos para la extracción de lípidos. Primero se agrega una mezcla de cloroformo y metanol, en una relación 1:2, esto quiere decir que por cada gramo de muestra se agregaba 1 mL de cloroformo y 2 mL de metanol. Se homogenizaron por 2 minutos. Finalizado el tiempo de mezclado se adiciona cloroformo y agua en 1:1. Se mezcló por 1 minuto y se dejó reposar por 30 minutos.

Pasados el tiempo se obtuvo una separación de capas, donde la capa de cloroformo contiene los lípidos extraídos. Se extrajo esta capa de cloroformo y se colocó en un rotavapor (Buchi, R205). Mediante la destilación se separa el cloroformo de los lípidos, para esto se pesa el contenedor más la muestra. Se inicia el proceso de destilación con el roto vapor. Finalizado el tiempo se procede a pesar el contenedor con los lípidos, y por medio de una diferencia de pesos se saca el porcentaje de lípidos que contenía la muestra inicial



Obtención de muestra



**Separación por método
Bligh and Dyer**



**Pesar muestra en
contenedor**



**Obtención
del
porcentaje
de lípidos**



**Peso de contenedor con
lípidos obtenidos**



Destilación con roto vapor

Figura 10. Diagrama de flujo para determinar porcentaje de lípidos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La Figura 11 muestra la relación entre la densidad óptica y el tiempo en el crecimiento de la microalga en cuatro corridas experimentales.

La corrida experimental 1 y 2 corresponde a la primera fase en el biorreactor de 5L con mezclado mediante aeración con burbujeo.

La corrida experimental 3 muestra el crecimiento del cultivo en biorreactor de 5L con un volumen de trabajo de 5L. Con una mezcla de gases, 95% de aire y 5% de CO_2 (2.2 L/min y 56 mL/min respectivamente) suministrados por un compresor y un dosificador de gases.

La corrida 4 muestra el crecimiento del cultivo con una alimentación de 95% de aire y 5% de CO_2 (1.75 L/min y 45 mL/min respectivamente) y una agitación de 240 rpm, en fotobiorreactor de 4L. Con un volumen de trabajo de 3L

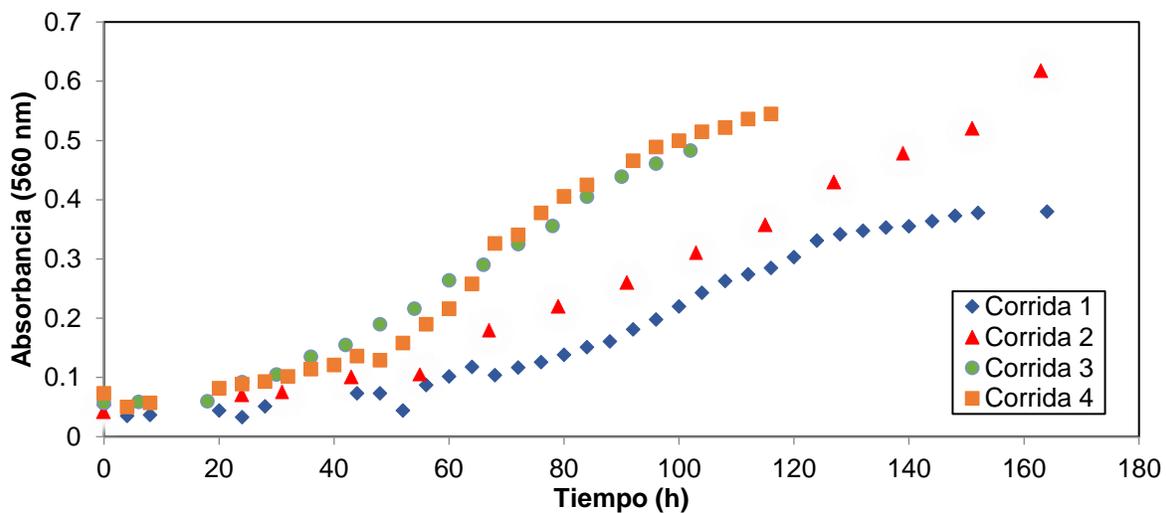


Figura 11. Seguimiento del crecimiento del cultivo de microalgas a través del tiempo de las corridas 1(◆) volumen 0.5 L, burbujeo de aire; corrida 2(▲) volumen 1.0 L, burbujeo aire; corrida 3 (●) volumen 5.0L, burbujeo de una mezcla Aire 95% - CO_2 5% y corrida 4(■) volumen 3.0L, agitación mecánica 240 rpm, burbujeo de una mezcla Aire 95% - CO_2 5%.

En la Figura 11 se observa que las corridas 1 y 2 tiene un comportamiento similar siendo la comprobación que la experimentación presenta reproducibilidad (más adelante se comprueba este punto) en las mismas condiciones. Se puede observar que la lectura de absorbancia máxima de las corridas 1 y 2 es menor que las presentadas en las corridas 3 y 4. Esto implica que la adición de una alimentación de CO_2 y agitación mecánica favoreció la concentración de biomasa.

También se observa que el tiempo de crecimiento disminuyó al adicionar una mezcla de aire y de CO_2 , teniendo un tiempo de residencia de 160 h aproximadamente en las corridas 1 y 2. A diferencia de las corridas 3 y 4 que presentan un tiempo de crecimiento de 120 h aproximadamente.

Con respecto a los datos obtenidos en densidad óptica, se obtuvo una máxima lectura entre 0.5 y 0.6, esto cae dentro de las presentadas en la literatura. Ortiz et al., (2011), muestra que para especies como *chlorella sorokiniana* presentaron lecturas de absorbancia máxima de 0.130 a una longitud de onda de 560 nm en el mismo medio de cultivo. Otras especies como la *chaetoceros muelleri* presentaron absorbancias de hasta 0.8 lo que es un indicativo de la concentración final de biomasa (Salazar, 2016).

La Figura 12 muestra la correlación entre absorbancia y concentración celular del peso seco de la biomasa de las corridas experimentales mostradas en la Figura 11, en donde se utiliza la misma simbología.

Al realizar el análisis de correlación en los datos de densidad óptica contra el peso seco de la biomasa de la microalga se obtuvieron coeficientes de determinación mayor a 0.95, lo que muestra un criterio de validación del experimento. También se observa que el método es lineal ya que presentan resultados directamente proporcionales a la obtención de peso seco.

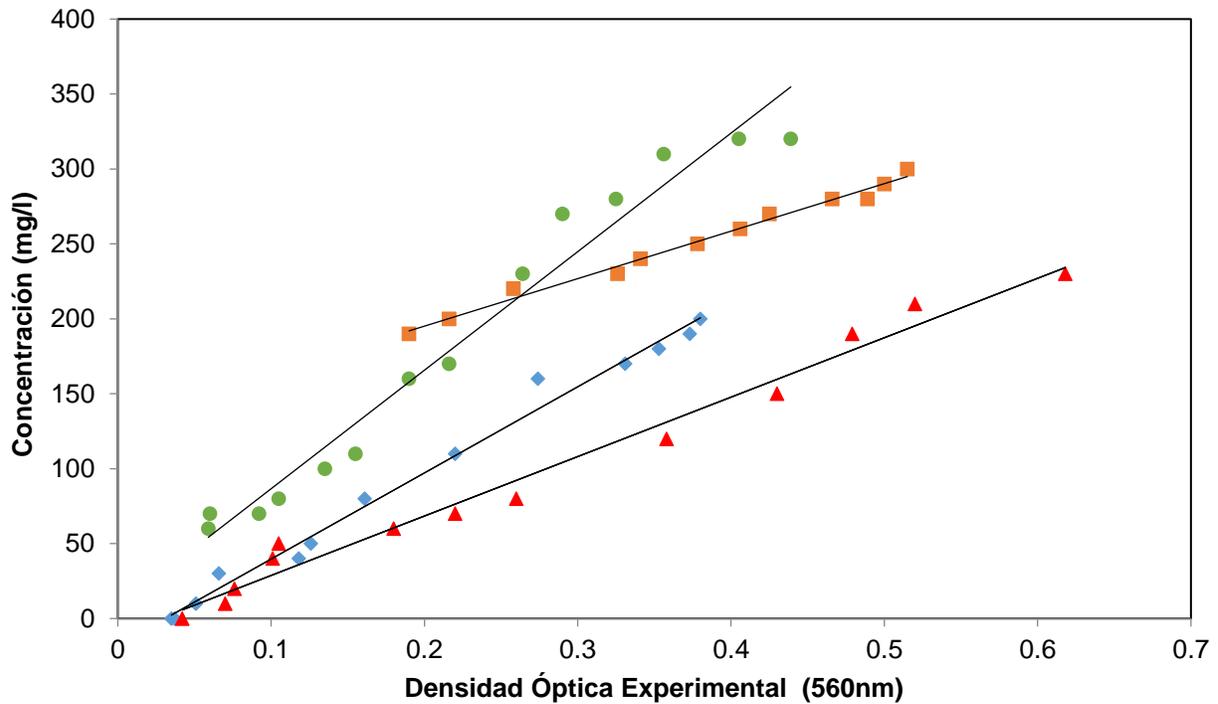


Figura 12. Correlación entre absorbancia contra el peso seco de la biomasa de microalga de las corridas 1(♦) volumen 0.5 L, burbujeo de aire; corrida 2(▲) volumen 1.0 L, burbujeo aire; corrida 3 (●) volumen 5.0L, burbujeo de una mezcla Aire 95% - CO₂ 5% y corrida 4(■) volumen 3.0L, agitación mecánica 240 rpm, burbujeo de una mezcla Aire 95% -CO₂ 5%.

Los valores obtenidos en la correlación peso seco contra densidad óptica se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Valores de las líneas de tendencia, obtenidos de las correlaciones de peso seco contra densidad óptica de las corridas 1, 2, 3 y 4.

Parámetro	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4
Pendiente	574.72	396.56	758.53	347.45
Ordenada	-17.783	-10.901	6.8282	118.81
Coef. Determinación R ²	0.9895	0.9819	0.9547	0.982

Con estos datos se obtiene la concentración celular mediante una ecuación lineal, teniendo el cambio de concentración con respecto a la densidad óptica a través del tiempo (pendiente). También es posible apreciar concentración de biomasa inicial de la fase experimental (ordenada).

En la Figura 13 se muestran las corridas experimentales 1 y 2. Se puede apreciar que durante las primeras 28 horas, el cultivo se estuvo adaptando a las condiciones del medio de cultivo que lo rodeaba. Estos valores, obedecen al objeto para el cual los modelos cinéticos en mención, representan una mejor aproximación a los datos experimentales. La etapa de crecimiento exponencial se registró aproximadamente entre las 28 y las 160 horas. Posterior a esta fase, se esperaría que el microorganismo entre en fase estacionaria, pero la concentración en algunos puntos la concentración es mayor que las anteriores. Este repunte en el crecimiento microbiano, puede asociarse al fenómeno de crecimiento diaúxico, el cual consiste en que el microorganismo ha agotado su fuente de carbono principal, pero entra en una nueva fase de adaptación para empezar a consumir otro sustrato presente en el medio. Este fenómeno presentado, se asocia al consumo de un sustrato complejo, en el que no es conocida la cantidad de fuentes de carbono disponibles en el mismo (Inada et al., 1996).

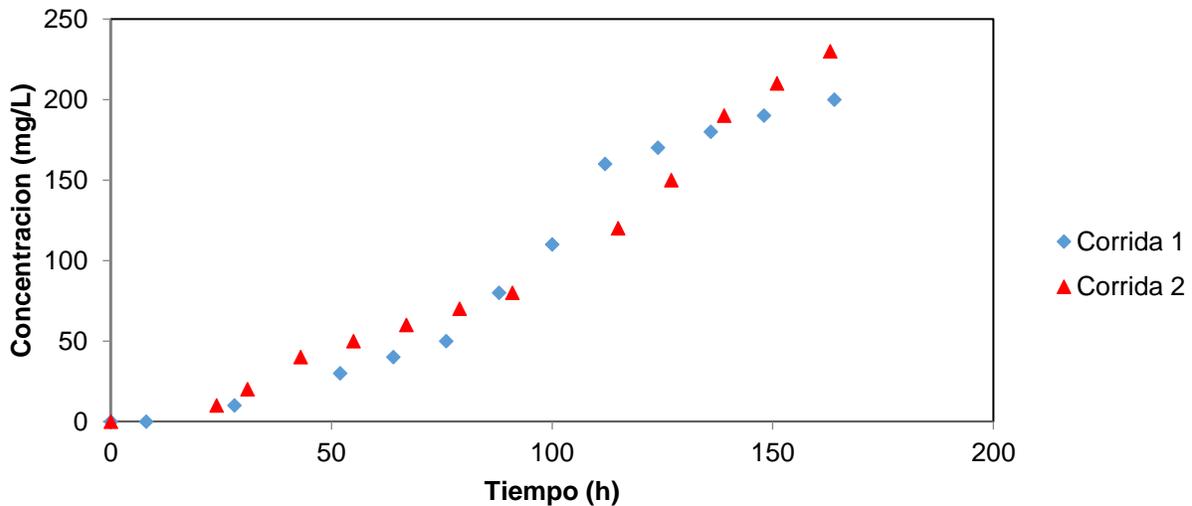


Figura 13. Seguimiento del crecimiento del cultivo de microalgas con peso seco de biomasa contra el tiempo de las corridas experimentales corrida 1(◆) volumen 0.5 L, burbujeo de aire y corrida 2(▲) volumen 1.0 L, burbujeo aire.

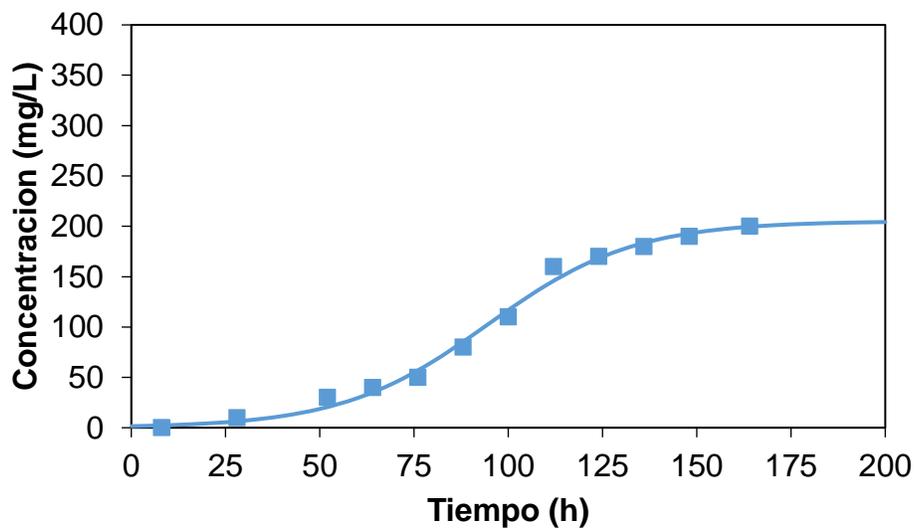
De los modelos descritos anteriormente (Página 7), se observan aquellos cuya variable independiente es el tiempo. El modelo que mejor ajustó los datos experimentales del crecimiento de la microalga fue el modelo logístico de crecimiento, esto mediante ajuste no lineal a la ecuación. De esta forma se obtuvieron los parámetros cinéticos para el crecimiento de la microalga.

La Figura 14 muestra la cinética de crecimiento ajustada a la ecuación del modelo logístico de crecimiento. Este ajuste se hizo para las corridas experimentales uno y dos, ya que aún no se modificaban ningún parámetro fisicoquímico.

Los valores obtenidos en la experimentación no se ajustan de forma perfecta a ningún modelo presentado, debido en primer lugar a errores de medición. Sin embargo ni obteniendo las mediciones más precisas se lograría un ajuste perfecto y esto más que nada se debe a que cualquier modelo matemático es una simplificación del mundo real que si tuviera en cuenta todos los factores que influyen en un conjunto de variables sería inmanejable.

Por lo tanto se optó por hacer un ajuste mediante regresión no lineal de los datos, esto consiste en representar datos que se obtienen a partir de los modelos descritos y compararlos con los experimentales logrando obtener el menor error posible en cada medición hecha. La finalidad de este proceso es poder representarlos con pocos parámetros cinéticos que muestren las características del crecimiento presentado por el cultivo de microalgas. Con esto realizado se obtiene un modelo que trata de explicar variables que tienen importancia en función de otro conjunto de variables mejor conocidas o más fáciles de medir.

Como se puede observar en la Figura 14, con los datos ajustados se encuentra que el modelo logístico se adaptó de manera satisfactoria a nuestro experimento logrando obtener parámetros de interés.



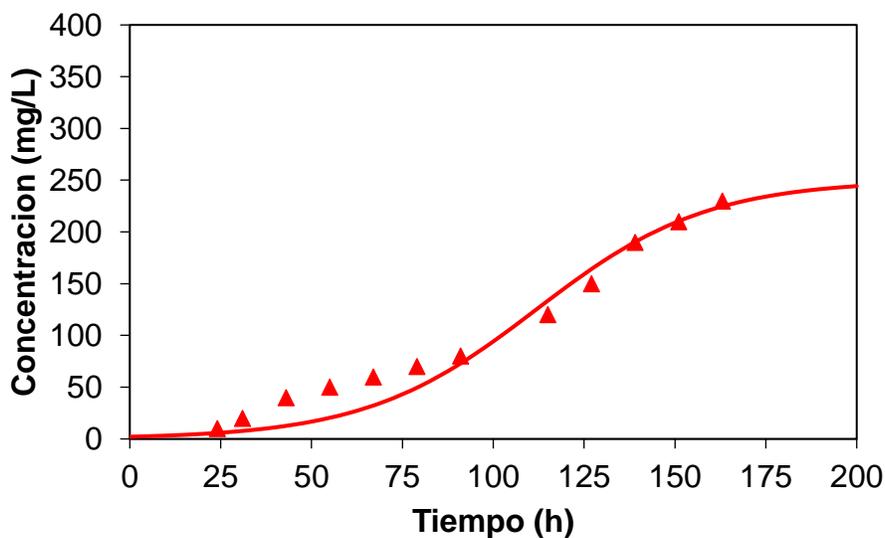


Figura 14. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo airlift alimentado con burbujeo de aire, corrida 1(♦) volumen 0.5 L y corrida 2(▲) volumen 1.0 L, aplicando el modelo logístico.

En la Tabla IV se muestran los parámetros obtenidos de la cinética de crecimiento de las corridas experimentales uno y dos obtenidas a partir del modelo logístico. Por los datos obtenidos en ambas corridas se puede asumir que hay una buena reproducibilidad del experimento, la velocidad específica de crecimiento celular (μ) en ambas experimentaciones es similar, obteniendo un error de 19.35%, siendo un error bajo.

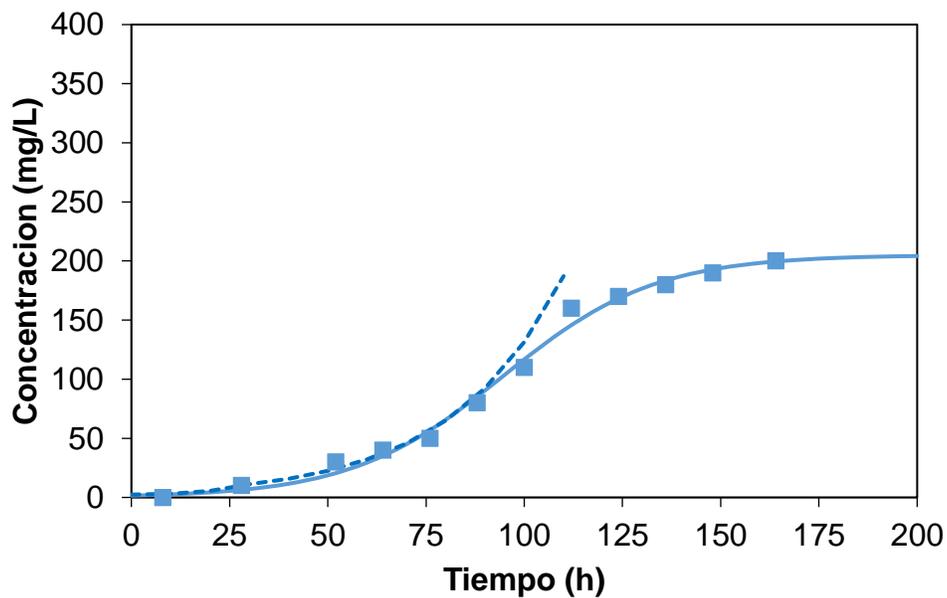
También es necesario mencionar que los tiempos de doblado (t_d) entran dentro del rango de error aceptable. Además los datos arrojados por el ajuste del modelo logístico son congruentes con lo desarrollado en la experimentación, esto si tomamos en cuenta la concentración inicial (X_0), ya que se observa que tenemos una concentración baja que aumenta según el tiempo avanza, de ser lo contrario tendríamos un problema con la interpretación de los datos o el mismo desarrollo.

Tabla IV. Parámetros de la cinética de crecimiento obtenidos a partir del modelo logístico de crecimiento en las corridas experimentales 1 y 2.

Parámetro	Corrida 1	Corrida 2	Promedio
X_0 (mg/L)	2.23	3.5	2.865
X_∞ (mg/L)	205	250	227.5
μ (h^{-1})	0.051	0.042	0.0465
t_{lag} (h)	7.2	12	9.6
t_d (h)	13.4	16.2	14.8
Coef. Determinacion R^2	0.991	0.946	0.9685

Gracias al coeficiente de determinación podemos observar un buen ajuste de datos mediante el modelo logístico, sin embargo se utilizó un segundo modelo que es el exponencial, esto con la finalidad de hacer una comparativa y realizar un mejor análisis.

La Figura 15 muestra la aplicación del modelo exponencial en los datos experimentales obtenidos en las corridas uno y dos.



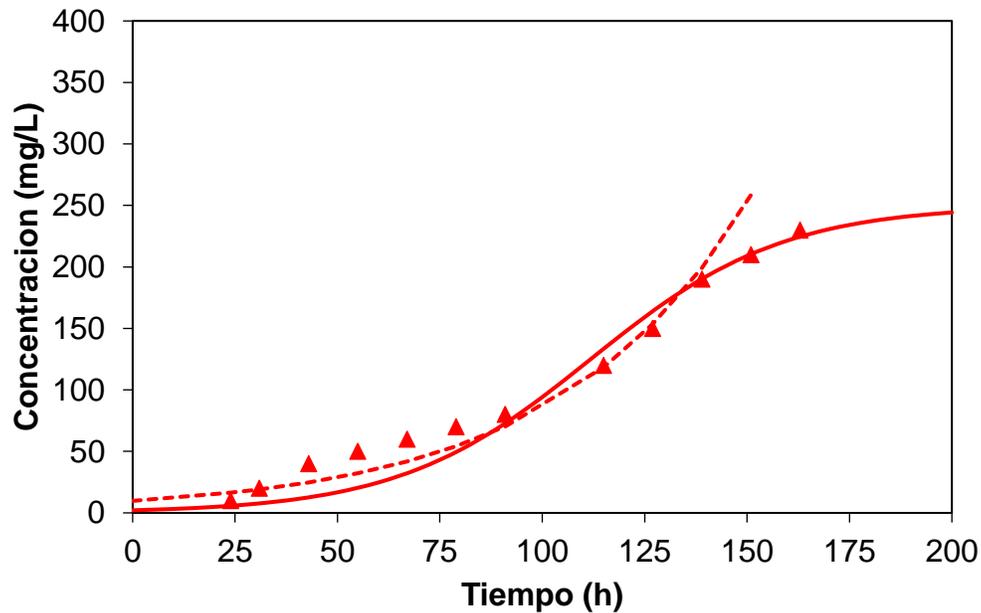


Figura 15. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo airlift alimentando solamente con burbujeo de aire, corridas experimentales 1(◆) volumen 0.5 L y corrida 2(▲) volumen 1.0 L, aplicando el modelo exponencial.

La línea punteada nos muestra el comportamiento de los datos según el modelo exponencial que se obtuvo, a simple vista se logra observar un ajuste correcto, sin embargo es necesario analizar los datos obtenidos de ambos modelos. Cabe destacar que el ajuste por medio del modelo exponencial se realizó solo a la fase de crecimiento exponencial.

En la Tabla V se muestran los parámetros de la cinética de crecimiento, modelo exponencial de las corridas experimentales 1 y 2.

Tabla V. Parámetros de la cinética de crecimiento, aplicando el modelo exponencial a las corridas experimentales 1 y 2.

Parámetro	Corrida 1	Corrida 2	Promedio
X_0 (mg/L)	5.50	16.44	10.97
X_∞ (mg/L)	200	200	200
μ (h^{-1})	0.0294	0.0217	0.0255
t_{lag} (h)	28	24	26
t_d (h)	23.6	31.9	27.75
Coef. Determinacion R^2	0.976	0.8912	0.9336

Como se puede observar se obtuvo un buen ajuste de datos con el modelo exponencial debido al coeficiente de determinación superior a 0.95. De los datos mostrados en la tabla anterior, se debe mencionar una mayor diferencia entre el tiempo de doblado (t_d), con todo esto también muestra una buena opción para la reproducibilidad del experimento. Ambos modelos podrían utilizarse a un nivel de mayor de producción, no obstante es recomendado utilizar el modelo logístico ya que toma consideraciones importantes, una de esas consideraciones es que los nutrientes del medio de cultivo no son inagotables por lo tanto la reproducción celular es finita. Dichas consideraciones no se toman en cuenta en el modelo exponencial.

Las Figuras 16 y 17 muestran los datos ajustados al modelo logístico, se puede observar un coeficiente de determinación, siendo una buena opción para modelar el sistema a una escala mayor.

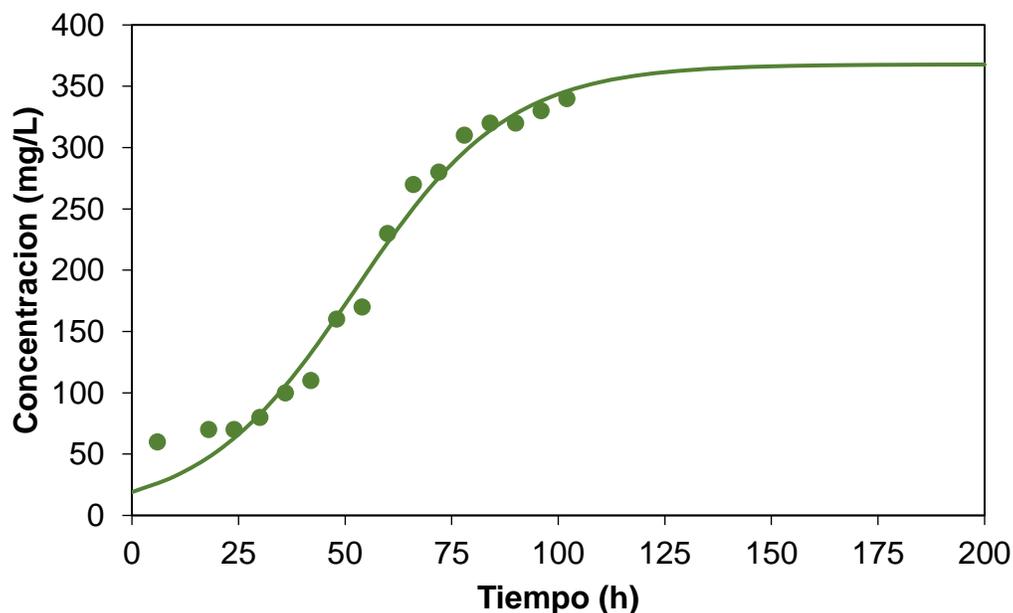


Figura 16. Cinética de crecimiento de una microalga de acuario en un reactor tipo Airlift en un volumen de trabajo de 5.0L alimentado con una mezcla de Aire 95%-CO₂ 5%, por medio de burbujeo (corrida 3).

En la Tabla VI se muestran los parámetros de la cinética de crecimiento para la corrida experimentación 3 obtenidos por el modelo logístico, haciendo una comparativa con los obtenidos por el mismo modelo para las corridas de experimentación 1 y 2.

Tabla VI. Parámetros de la cinética de crecimiento de microalga para la corrida experimentación 3 modelo logístico.

Parámetro	Corrida 3	Corrida 1 y 2
X_0 (mg/L)	19	2.865
X_∞ (mg/L)	367.8	227.5
μ (h ⁻¹)	0.055	0.0465
t_{lag} (h)	18.4	9.6
t_d (h)	12.4	14.8
Coef. Determinacion R^2	0.982	0.9685

Los datos de la tabla VI muestran una velocidad específica de crecimiento celular (μ) mayor para la corrida 3, esto significa que el tiempo de doblado (t_d) disminuya, bajando el tiempo de residencia en aproximadamente 2 horas, al cambiar la alimentación de la mezcla de aire y CO_2 con burbujeo.

La Figura 17 muestra la modelación de los datos obtenidos en la cinética de crecimiento de la corrida experimental 4, aplicando el modelo logístico.

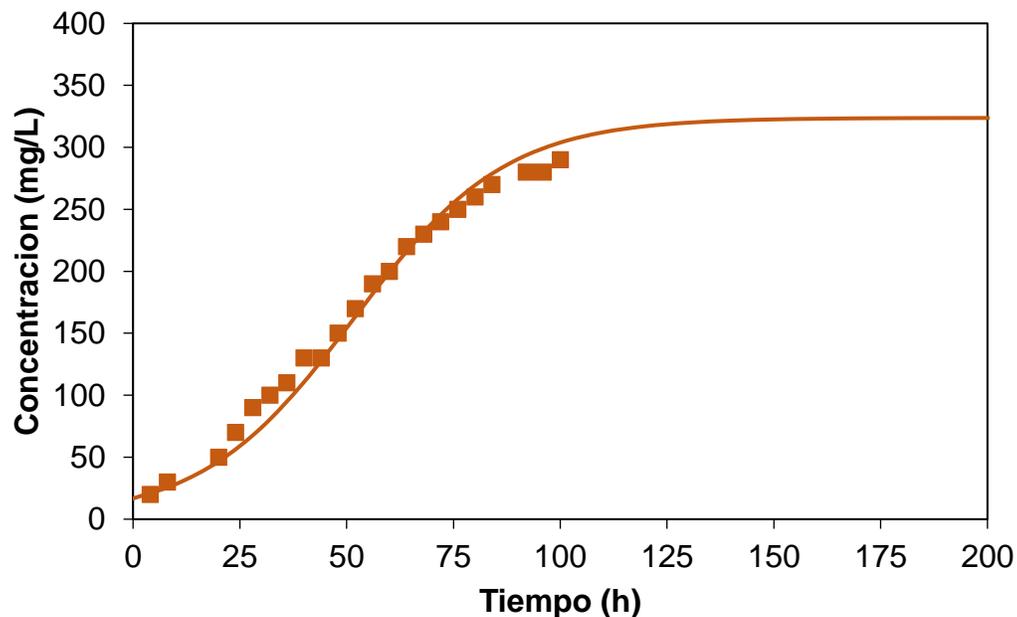


Figura 17. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo tanque agitado mecánicamente a 240 rpm y alimentado con una mezcla de Aire 95%- CO_2 5% (corrida 4).

En la Tabla VII se muestran los parámetros obtenidos de la cinética de crecimiento de la corrida experimental cuatro obtenidas a partir del modelo logístico, con una comparativa con las experimentaciones 1, 2 y 3 obtenidas con el mismo modelo.

Tabla VII. Parámetros de la cinética de crecimiento, modelo logístico en la corrida experimentación 4.

Parámetro	Corrida 4	Corrida 1 y 2	Corrida 3
X_0 (mg/L)	16.71	2.865	19
X_∞ (mg/L)	300	227.5	367.8
μ (h^{-1})	0.056	0.0465	0.055
t_{lag} (h)	17.08	9.6	18.4
t_d (h)	12.4	14.8	12.4
Coef. Determinacion R^2	0.984	0.9685	0.982

Primeramente se puede observar una mejora en la velocidad específica de crecimiento celular (μ) con respecto a las obtenidas en las experimentaciones 1 y 2, lo cual disminuye considerablemente el tiempo de doblado (t_d).

Con respecto a la experimentación 3, se puede observar que no se observan cambios en los parámetros, dando como resultado tiempo de doblado (t_d) y velocidad específica de crecimiento celular (μ) similares. Esto significa que la agitación mecánica no representa una mejora en nuestro sistema.

Para las corridas 3 y 4 se aplicó un análisis con el modelo logístico y exponencial, con la finalidad de encontrar el modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales. En Las Figuras 18 y 19 se muestran la aplicación de los dos modelos a los datos experimentales en las corridas 3 y 4.

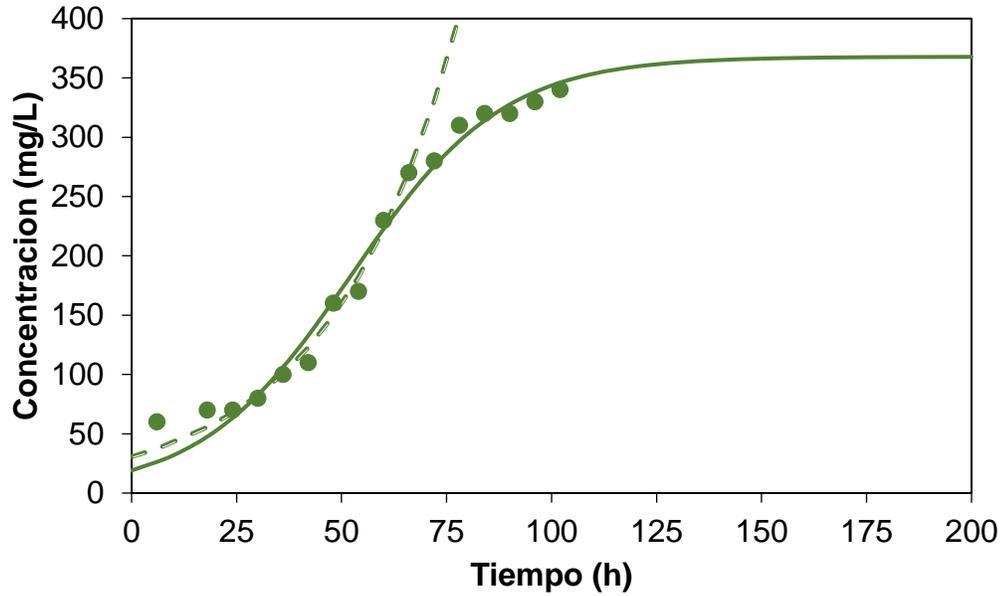


Figura 18. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo tanque agitado alimentado con una mezcla de Aire 95%-CO₂ 5% por medio de burbujeo, aplicando el, modelo exponencial (corrida 3).

En la Tabla VIII se muestran los parámetros de la cinética de crecimiento para la corrida experimentación 3 obtenidos por el modelo exponencial, haciendo una comparativa con los obtenidos por el mismo modelo para las corridas de experimentación 1 y 2.

Tabla VIII. Parámetros de la cinética de crecimiento para la corrida experimentación 3 modelo exponencial.

Parámetro	Corrida 3	Corrida 1 y 2
X_0 (mg/L)	12.1	10.97
X_∞ (mg/L)	300	200
μ (h ⁻¹)	0.0283	0.0255
t_{lag} (h)	32.78	26
t_d (h)	24.5	27.75
Coef. Determinacion R ²	0.896	0.9336

Al igual que en el modelo logístico se puede observar cambios significativos en los parámetros, dando como resultado tiempo de doblado (t_d) menor con respecto a la experimentación 1 y 2, en este caso en una reducción de aproximadamente 3 horas. Con estos resultados se puede afirmar que en ambas ocasiones el agregar una alimentación de CO_2 conlleva a un aumento en la velocidad específica de crecimiento (μ).

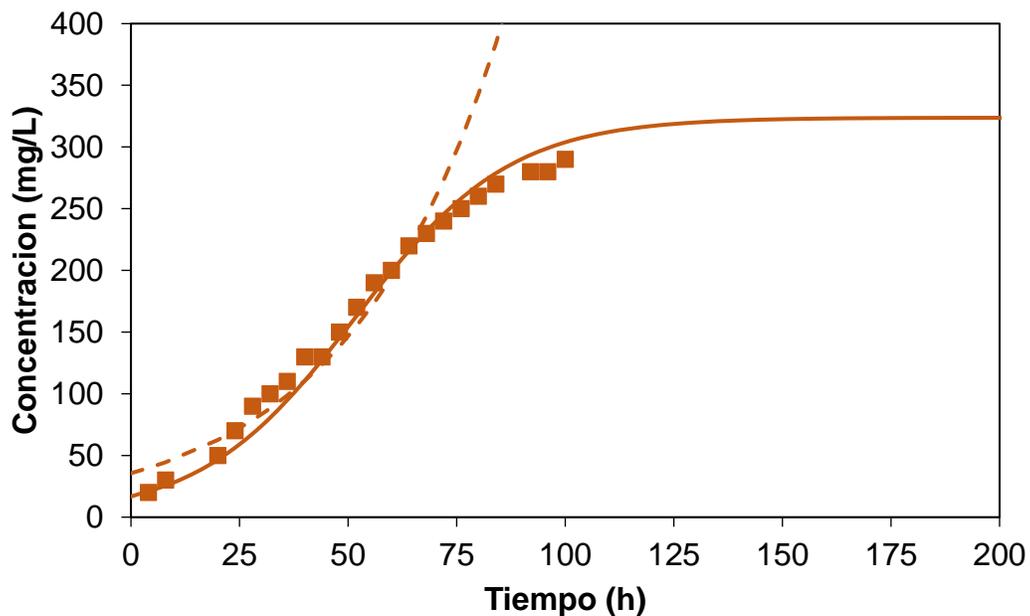


Figura 19. Cinética de crecimiento microalga de acuario en un reactor tipo tanque agitado mecánicamente a 240 rpm y alimentado con una mezcla de Aire 95%- CO_2 5% por medio de burbujeo, aplicando el modelo exponencial (corrida 4)

En la Tabla IX se muestran los parámetros obtenidos de la cinética de crecimiento de la corrida experimental cuatro obtenidas a partir del modelo exponencial, haciendo una comparativa con los obtenidos en las experimentaciones 1, 2 y 3.

Tabla IX. Parámetros de cinética de crecimiento modelo exponencial experimentación 4.

Parámetros	Corrida 4	Corrida 3	Corrida 1 y 2
X_0 (mg/L)	34.17	12.1	10.97
X_∞ (mg/L)	300	300	200
μ (h^{-1})	0.033	0.0283	0.0255
t_{lag} (h)	3.2857	32.78	26
t_d (h)	21	24.5	27.75
Coef. Determinacion R^2	0.922	0.896	0.9336

Hay un cambio notable con respecto a las experimentaciones 1 y 2 cuando observamos los parámetros de tiempo de doblado y velocidad específica de crecimiento, no obstante al compararlos con la experimentación se observa un cambio mínimo con respecto a estos mismos parámetros, dando resultados similares.

Como se puede observar, el modelo exponencial se adaptó de buena manera, no obstante de nuevo el modelo logístico es el que mejor se ajusta a los datos experimentales. Por lo tanto con certeza se puede afirmar que para todas las experimentaciones hechas en el presente trabajo, es el que mejor predijo el comportamiento del cultivo en el escalamiento de volumen de 5 L (corrida 1,2 y 3) y 3L (corrida 4) respectivamente. Esto principalmente a que el coeficiente de determinación en el modelo logístico fue superior a 0.95 en las tres experimentaciones. Por su parte el modelo exponencial obtuvo un coeficiente por debajo de 0.95

Por otro lado, las diferencias entre los parámetros cinéticos de la corrida 3 y 4 resultan imperceptibles en ambos modelos. Resultando un tiempo de doblado igual, por lo que al incorporar agitación mecánica al sistema no representa una gran aportación. Todo lo contrario ya que este esfuerzo mecánico se traduce en gastos y pérdidas monetarias.

En las figuras 20 y 21 se observa el tiempo del crecimiento del cultivo en horas. En la Figura 20 se puede apreciar que el cultivo creció en 144 horas en el fotoreactor Airlift con suministro de aire con burbujeo, mientras que en la Figura 21 se puede observar

que el tiempo de crecimiento del cultivo de la microalga fue de 96 horas en un tanque tipo agitado con alimentación de CO_2 , bajo estas condiciones el tiempo de crecimiento del cultivo se redujo en 48 h en relación con el cultivo en el fotoreactor Airlift.



Figura 20. Seguimiento del tiempo de crecimiento en horas de la microalga de acuario en el reactor tipo Airlift, corridas 1-3

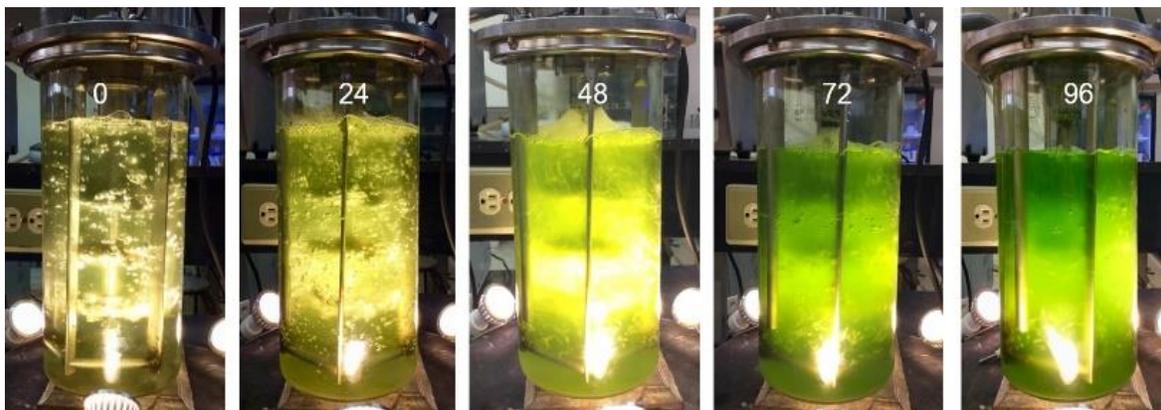


Figura 21. Seguimiento del tiempo de crecimiento en horas de microalga de acuario en un reactor tipo tanque con agitación mecánica, corrida 4

Una de las características principales de las microalgas es la producción de ácidos grasos. De la extracción de lípidos obtenida del cultivo de microalgas se obtuvo un 12.3%. En la literatura algunos autores reportan datos de 23.51 % para cultivos de microalga *Chlorella sp* (Rubio, 2013). En otros estudios se reportan valores de 5%-24% para la misma cepa antes mencionada y valores de 5% y 4% para microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Spirulina* respectivamente (Batista, 2013).

Considerando estos datos, se abre la posibilidad para la utilización de esta microalga para productos de interés, sin embargo es necesario más estudios para determinar su viabilidad.

El comportamiento de esta microalga fue algo que se debe tomar en cuenta, ya que a simple vista se pudo observar cómo se producían cambios, por ejemplo menos sedimentación durante los diferentes crecimientos consecutivos que se realizaron de los cultivos, así como una mayor homogenización de la microalga y menor cantidad de biomasa que se adhirieron a las paredes del birreactor.

Además se decidió observar al microscopio. Lo primero a notar fue que al paso de las cosechas, la microalga aislaba por su cuenta para obtener una cepa más limpia, por lo cual se hicieron varios escalamientos antes de iniciar la fase experimental.

El segundo punto que se observó fue la intrusión de agentes microbiológicos como protozoos y hongos que no pertenecían a la cepa de microalgas, se piensa que provenían del agua utilizada para esa corrida, lo más interesante fue la respuesta por parte del cultivo, en la Figura 22, se puede apreciar como encierran a estos agentes microbiológicos y después de un tiempo desaparecen.

Muchos estudios han demostrado que las microalgas son muy efectivas en el tratamiento de aguas residuales especialmente porque tienen la capacidad de remover nutrientes y compuestos xenobióticos en estas aguas. Especies como *Scenedesmus Quadricauda*, *Chlorella Miniata*, *Chlorella Vulgaris* y *Chlorella Sorokiniana* destacan por eliminar de manera eficiente metales pesados en las aguas residuales, además de poder crecer en medios contaminados (Forero, 2007).

Este comportamiento del cultivo abre la posibilidad para la utilización del cultivo de microalga para el uso de tratamiento de aguas residuales, para así lograr un mayor aporte hacia un mundo sustentable, sin embargo se requieren estudios que confirmen o descarte dicha posibilidad.

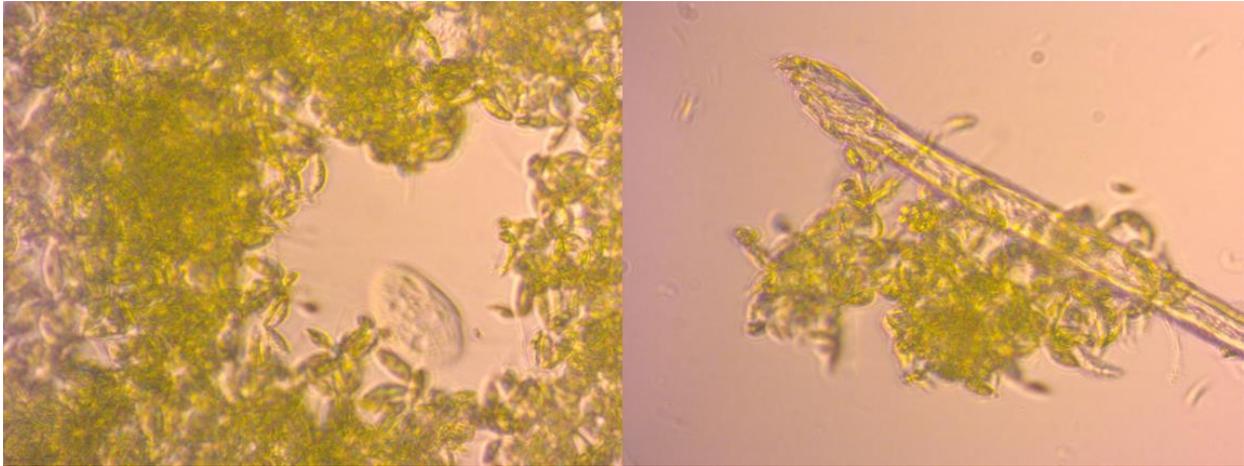


Figura 22. Vista microscópica del cultivo de la microalga

CONCLUSIONES.

Se logró obtener de manera satisfactoria una cepa de microalga que no se vea afectada por los parámetros ambientales del laboratorio (temperatura, dureza de agua, pH del agua, etc.).

La alimentación de la mezcla de aire- CO_2 y la agitación mecánica al cultivo de microalga redujo el tiempo de crecimiento en 48 h. Dando hincapié a la búsqueda la alimentación óptima de CO_2 para mejorar el proceso.

La agitación no presentó una mejora en los parámetros cinéticos de crecimiento, sin embargo la literatura nos muestra que esto debería ser lo contrario por lo que se necesita un análisis más profundo del estudio de esta variable.

El modelo matemático que mejor ajustó los datos experimentales fue el modelo logístico de crecimiento. Obteniendo los parámetros cinéticos de crecimiento de interés de la microalga para su futura utilización en escalamientos de mayor volumen de operación.

La observación al microscopio del cultivo de microalga sugiere la posibilidad de aplicarla en varios usos, que van desde la utilización en tratamiento de aguas residuales hasta una posible obtención de biocombustibles, además de una mejora al proceso descrito para obtener condiciones óptimas de crecimiento de la microalga.

En general, el trabajo representó horas de observación continuas, días, semanas, meses en la que no se presentaban cambios, no obstante se hicieron modificaciones adecuadas para lograr el éxito y la satisfacción de lograr la culminación de este trabajo de tesis, esperando haber aportado las bases para las futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abalde J., Cid A., Fidalgo J.P., Torres E., Herrero C. 1995. Microalgas Cultivo y Aplicaciones Servicio de publicaciones, Universidad de la Coruña. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias. La Coruña España.
- Alcon A. M. (1999). Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano, Tesis Ph.D. Madrid, Universidad Complutense de Madrid
- Ana Paula Batista, Luísa Gouveia, Narcisa M. Bandarra, José M. Franco, Anabela Raymundo, 2013. Comparision of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research* 2 (2): 164–173
- Barbosa MJ, Janssen M, Ham N, Tramper J and Wijffels RH. 2003. Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnology and Bioengineering*
- Bitog JP, Lee IB, Yoo JI, Hwang SB, Hong SW and Seo IH. 2009. Development of a large-sized photobioreactor for microalgae production. In Proceedings of the 2009 CIGR International Symposium of the Australian Society for Engineering in Agriculture, Brisbane, Queensland, Australia, September
- Bligh, E., G. & Dyer, W., J. 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, Canada.
- Bolaños, E. R. A. 2008. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista de colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*.
- Brito, D., Caña, E., Guevara, M., Subero, & Colivet, J. 2016. Efecto de tres fuentes de nutrientes en la producción de biomasa y pigmentos de la microalga dulce acuícola *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*.
- Brock, T. & M. Madigan. 1993. *Microbiología*. 6ta Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.
- Carmen Arnáiz, Laura Isac y Julián Lebrato. 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Universidad de Sevilla. España.
- Carvajal Alcaraz, (2011), Fijación de CO₂ en cultivos y sus implicaciones en el cambio climático, Universidad de Murcia, Murcia, España.
- Cantizano, J. G. 1990. Fraccionamiento de la productividad primaria en un ecosistema microbiano: fotosíntesis oxigenica, fotosintesi anoxigenica y fijación a oscuras, trabajo experimental en el programa de “Biotecnología microbiana”
- Carvalho, P., Meireles, A. and Xavier, F. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Programs*
- Contreras, C. (2003), Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Instituto Tecnológico de Celaya, México.

Forero, R. (2007). Aproximación a la problemática del manejo y tratamiento de las aguas residuales del corregimiento de Arauca (Palestina), Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Gomez A, Jaimes N, 2010 Estudio de la incidencia del suministro de CO₂ en el crecimiento de las microalgas en un fotobiorreactor a escala laboratorio Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

Guaman Bumeo, Gonzales Romero, 2016, Catalogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce de ecuador.

Katuwal Sarmila. 2017. Designing and Development of a Photobioreactor for Optimizing the Growth of Micro Algae and Studying Its Growth Parameters, South Dakota State University, Dakota del sur, EE.UU.

Liang Y, Sarkany N and Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*

Linden JS and Hartmut. 2001. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*

López-Elías, J. A., Voltolina, D., Nieves-Soto, M. & Figueroa Ortiz, L. 2004. Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México. Cruz Suárez, LE, Ricque Marie, D., Nieto López, MG, Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 16-19.

Lorenz RT and Cysewski GR. 2000. Commercial potential of *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*

Lou HP and Al-Dahhan MH. 2004. Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnology and Bioengineering*

Lu C and Vonshak A. 1999. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. *Journal of Applied Phycology*.

Luis Guillermo Ramírez Mérida, Leila Queiroz Zepka, Eduardo Jacob-Lopes, 2002 *Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacteria*, Universidad de Carabobo, España.

Ortiz Moreno Martha, Cortes Castillo Caroll, Sánchez Julián, Padilla Jorge, Otero Angélica. 2011. Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas, Universidad de los Llanos, Colombia.

Romo Piñer Abril Karim (2002), Manual para el cultivo de microalgas, Universidad autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.

Rubio Fernández D, Chica Claudia, Parra Mónica, 2013. Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación, Universidad de América de Bogotá, Colombia.

Salazar Rodríguez Astrid Alexis (2016), Estandarización de Técnicas de Análisis para el Seguimiento del Crecimiento de la Microalga *Chaetoceros muelleri*, Universidad de Sonora, Hermosillo, México

Sanchez-Saavedra, M. P. 1989. Diseño de un biodigestor aeróbico de alimentación periódica y utilización de los nutrientes producidos para el cultivo de microalgas

Shuler Michael L, Fikret Kargi (2001). *Bioprocess Engineering Basic Concepts*

T. Inada, K. Kimata, and H. Aiba, 1996, Mechanism responsible for glucose–lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model, *Genes to Cells*, vol. 1, no. 3, pp. 293–301.

TORRENTERA, B. L. & TACON, A. G. J. 1989. La Producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. In: FAO (ed.) II. Cultivo de microalgas. Roma.

Trinidad Bello Adalberto (2014), Modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.