



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN DE ENERGÍAS
RENOVABLES

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA
MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*, CULTIVADA EN UN
PROTOTIPO DE ESTANQUE DE CANAL ABIERTO.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN MATERIALES Y SISTEMAS ENERGÉTICOS
RENOVABLES

PRESENTA

KARLA EUGENIA DÍAZ SANTIAGO

DIRECTORES DE TESIS

DR. PASCUAL LÓPEZ DE PAZ

DR. ARNULFO ROSALES QUINTERO

MARZO 2021



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 13 de abril de 2021
Oficio No. DGIP/213/2021
Asunto: Autorización de impresión de tesis

C. Karla Eugenia Díaz Santiago
Candidata al Grado de Maestra en Materiales y
Sistemas Energéticos Renovables
Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables
UNICACH
Presente

Con fundamento en la opinión favorable emitida por escrito por la Comisión Revisora que analizó el trabajo terminal presentado por usted, denominado "*Evaluación del potencial biotecnológico de la microalga chlorella vulgaris, cultivada en un prototipo de estanque de canal abierto*", cuyos directores de tesis son el Dr. Pascual López de Paz y Dr. Amulfo Rosales Quintero, quienes avalan el cumplimiento de los criterios metodológicos y de contenido; esta Dirección General a mi cargo autoriza la impresión del documento en cita, para la defensa oral del mismo, en el examen que habrá de sustentar para obtener el **Grado de Maestra en Materiales y Sistemas Energéticos Renovables**.

Es imprescindible observar las características normativas que debe guardar el documento impreso, así como realizar la entrega en esta Dirección General de un ejemplar empastado.

Atentamente
"Por la Cultura de mi Raza"

Dra. Carolina Orantes García
Directora General



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO

C.c.p. Dr. Pascual López de Paz, Director del Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, UNICACH. Para su conocimiento.
Dr. José Francisco Pola Alberes, Coordinador de Posgrado, Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, UNICACH. Para su conocimiento.
Expediente

*000/gp/gp



Libramiento Norte Poniente No. 1150, Colonia Lajas Maciel
CP 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Tel: (961) 6170440 Ext. 4360
investigacionyposgrado@unicach.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero brindado durante la estancia en la institución, cursando la maestría, el cual fue primordial para lograr esta meta.

Gracias infinitas a mi director de tesis el Dr. Pascual López de Paz, gracias por creer en mí y por apoyo incondicional a cada paso. A mi codirector, el Dr. Arnulfo Rosales Quintero, por su apoyo incondicional en cada etapa de este proyecto, así mismo a mi amiga y paciente asesora M.C. Paula Deyanira Orantes Calleja, por su cariño y compromiso con este proyecto. Sin la asesoría y apoyo de ustedes, esto no hubiera sido posible.

A la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos. A todos los miembros que conforman el Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables, de esta misma casa de estudios, por tan excelente labor que desempeñan. A mis maestros y compañeros por siempre apoyar los proyectos en desarrollo.

Finalmente, a mis amigos y familia por siempre estar conmigo y brindarme esperanza, cariño y amor, cuando las cosas no marchaban bien.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico con todo mi amor a mi hija y a mi esposo, por todo lo maravilloso que siempre me brindan, sin duda son y siempre serán lo que me impulse a seguir adelante. A esa otra parte tan importante de mi vida, que está formada por mis padres, hermanos, suegros y cuñados, quienes nunca dudan en apoyar cada proyecto que emprendo y se enorgullecen tanto o más que yo al lograrlo.

Y finalmente, a Don Amilcar Santiago, gracias hasta donde se encuentre.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	12
1.1 Planteamiento del problema.....	12
1.2 Justificación	13
1.3 Objetivos.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
1.4 Antecedentes	15
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1 Consideraciones generales	23
2.2 Tipos de microalgas.....	25
2.2.1 <i>Chlorella</i>	25
2.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	26
2.3 Sistemas de cultivos para microalgas.....	27
2.3.1 Tipos de sistemas abiertos.....	28
2.3.2 Sistemas cerrados.	31
2.3.3 Parámetros a considerar en un sistema de cultivo.	35
2.4 Métodos de cosechas.....	38
Capítulo 3. Metodología.	40
3.1 Etapa inicial.	40
3.1.1 Adaptación en matraces.....	40
3.1.2 Preparación de los medios de cultivo.....	41
3.1.3. Cultivo de microalgas. Primer escalado.....	41
3.1.4. Recuento celular	42

3.1.5 Cosecha de la biomasa.....	43
3.1.6 Extracción y cuantificación de lípidos.....	44
3.1.7 Remoción de nutrientes.....	45
3.2 Etapa intermedia.....	47
3.2.1 Elección del medio de cultivo.....	48
3.2.2 Escalado a 500 ml.....	48
3.2.3 Diseño experimental.....	49
3.3.4 Análisis estadístico.....	49
Capítulo 4. Resultados y discusión.....	50
4.1 Cinéticas de crecimiento primera etapa.....	50
4.2 Concentraciones de biomasa.....	56
4.3 Concentración de lípidos.....	59
4.4 Remoción de amonio y fosfato.....	61
4.5 Escalado a 500 mL.....	62
4.6 Cinética de crecimiento. Escalado a 500 mL.....	63
4.6 Concentraciones de biomasa. Escalado 500 mL.....	66
4.7 Concentración de lípidos. Escalado a 500 mL.....	68
Capítulo 5. Conclusiones.....	71
Trabajos futuros.....	72
Referencias bibliográficas.....	73
ANEXOS.....	79

Índice de tablas

Tabla 3-1. Medios de cultivo para <i>Chlorella vulgaris</i>	41
Tabla 4-1. Parámetros cinéticos máximos de crecimiento de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> , en cada uno de los tratamientos, en el primer escalado a 100 mL.	55
Tabla 4-2. Rendimiento biomásico máximo (mg/L) de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> , en los diferentes medios de cultivo, en el primera etapa a 100 mL.	57
Tabla 4-3. Rendimiento lipídico máximo (mg/L) de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> , en los diferentes medios de cultivo, en la primera etapa a 100 mL.	60
Tabla 4-4. Caracterización inicial de los medios de cultivo para el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> . Amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}).	61
Tabla 4-5.. Caracterización final de los medios de cultivo para el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> . Amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}).	62
Tabla 4-6. Parámetros cinéticos de crecimiento de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> , en cada uno de los tratamientos, en el segundo escalado a 500 mL.	65
Tabla 4-7. Rendimiento biomásico máximo (mg/L) de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> , en los diferentes medios de cultivo, en el segunda etapa a 500 mL.	67
Tabla 4-8. Rendimiento lipídico máximo (mg/L) de la especie <i>Chlorella vulgaris</i> , en los diferentes medios de cultivo, en el segunda etapa a 500 mL.	69

Índice de figuras.

Figura 2-1 Balsas abiertas de cultivo en Australia	29
Figura 2-2 Diagrama de un reactor Raceway.	30
Figura 2-3 Tanques circulares de la empresa Taiwan <i>Chlorella</i> manufacturing.	31
Figura 2-4 Recipientes para la producción de microalgas en cámaras.	33
Figura 2-5 Ejemplos de algunos sistemas cerrados. a) fotobiorreactor tubular vertical (columna de burbujeo); b) fotobiorreactor plano; c) fotobiorreactor tubular horizontal	34
Figura 3-1 Etapa uno de la experimentación.	40
Figura 3-2 Cultivo de la especie en frascos y a diferentes intensidades de luz. ...	42
Figura 3-3 Extracción de lípidos.	45
Figura 3-4 Realización de la prueba de contenido de nitrógeno.	46
Figura 3-5 Realización de la prueba de contenido de fosfatos.	47
Figura 3-6 Etapa intermedia de experimentación.	47
Figura 3-7 Operatividad del reactor a 3000 luxes.	48
Figura 4-1 Concentración celular de <i>Chlorella vulgaris</i> en el medio de control, expuesta a diferentes intensidades de luz.	50
Figura 4-2 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en los medios Ma y Ma1, sujetos a flujos lumínicos de 1000, 3000 y 5000 luxes.	52
Figura 4-3 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en los medios Mc y Mc1, sujetos a flujos lumínicos de 1000, 3000 y 5000 luxes.	54
Figura 4-4 Concentraciones biomásicas de <i>Chlorella vulgaris</i> en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes intensidades lumínicas.	57
Figura 4-5 Concentraciones lipídicas de <i>Chlorella vulgaris</i> en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes intensidades lumínicas.	59
Figura 4-6 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en los reactores V ₁ , V ₂ , V ₃ para el medio de control (M _b) sujetos a una exposición de 3000 luxes.	63
Figura 4-7 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en los reactores V ₁ , V ₂ , V ₃ para el medio residual con limitación de nutrientes (Ma) sujetos a una exposición de 3000 luxes.	64

Figura 4-8 Concentraciones biomásicas de *Chlorella vulgaris* en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes velocidades en la recirculación del fluido.

..... 67

INTRODUCCIÓN

El aumento poblacional y la necesidad energética en el desarrollo de las actividades de los seres humanos, ha traído consigo dos problemas severos. El primero de ellos, el agotamiento en las reservas de los combustibles fósiles; el segundo está relacionado a la explotación de los mismos y el impacto negativo que tiene en la naturaleza. Se estima que tan solo el CO₂, proveniente de los combustibles fósiles, es responsable del 63% del calentamiento global producido por emisión de gases efecto invernadero, junto al metano con un 19%, y el óxido nitroso, entre otros [1].

En México, el Consejo Coordinador Empresarial y el Programa de Desarrollo del Sistema Eléctrico Nacional (PRODESEN 2018-2032) estiman que la demanda de electricidad en México crecerá a un ritmo medio anual de 3.1% durante los próximos 15 años [2]. Teniendo como prospecto de acuerdo con la Secretaría de Energía (SENER) que para el 2024 se tenga la producción del 24 % del total de la energía producida por el país a través de energías limpias [3]. Ante esto, resulta imperativo para la comunidad científica el desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento de los recursos energéticos renovables.

De acuerdo con los reportes emitidos para la SENER en el 2016, las energías renovables abastecieron el 3% de la demanda energética nacional, siendo mayormente aprovechado el recurso eólico. Aunque en el país existen políticas y proyectos aprobados para el aprovechamiento de la biomasa y su conversión energética, es un sector que aún se encuentra en desarrollo. La biomasa, no solo posee un gran potencial energético también puede ayudar en la disminución de GEI a la atmósfera [2, 4]

En este marco, las microalgas representan una materia prima prometedora por sus múltiples usos, no solo en la industria de alimentos, farmacéuticos y cosméticos, sino también por su capacidad de absorción de CO₂ dentro del proceso fotosintético y un alto contenido de lípidos que bien pueden procesarse para la producción de biodiesel [4]. Estos microorganismos son generalmente fotoautótrofos, es decir obtienen su energía de la luz del sol, sin embargo, algunas de ellas solo necesitan una fuente de carbón para poder sobrevivir (heterótrofas) y están aquellas que su

proceso metabólico lo deben a una fuente de luz y una de carbono, por ejemplo, el CO₂ (mixotróficas) [5].

Para la producción de microalgas existen diferentes formas de cultivos, en cualquiera de ellas se hace necesario el uso de un dispositivo que permita el crecimiento masivo, llamados fotobiorreactores. Un diseño adecuado en estos fotobiorreactores, incluye tomar en cuenta las condiciones medioambientales del lugar donde se ha de hacer crecer a las microalgas, así como las características propias del tipo de microalga con que se ha de trabajar [5].

Por todo lo anterior, en este trabajo se evaluó el potencial biotecnológico de la microalga *Chlorella vulgaris*, cuando esta es cultivada en diferentes medios sintéticos y es sometida a diversos factores físicos de crecimiento. El estrés por nutrientes y por fuente de luz, fueron los primeros parámetros analizados. Obteniendo como resultado que la especie seleccionada, es capaz de crecer en presencia y ausencia de nitrógeno. En este mismo sentido, se trabajó con la especie en medios autótrofos por excelencia y mixotróficos y se determinó la pertinencia de dichos parámetros en respuestas tales como, crecimiento celular, tasa de duplicación, biomasa obtenida y porcentaje de lípidos contenido.

Se demostró que aún en medios sin presencia de nitrógeno, las microalgas pueden crecer, sin embargo, cuando este, es enriquecido con una fuente de carbono orgánica, presenta resultados más satisfactorios en cuanto a concentración celular. En medios con presencia de este nutriente, se alcanzaron concentraciones finales de más de 5×10^6 cél/mL, y en medios enriquecidos con glucosa, los datos son superiores a 3×10^7 , cél/mL. Cabe mencionar, que la densidad de luz para alcanzar tales resultados se dio en experimentos sujetos a de 3000 luxes, por debajo o por encima a este valor los resultados fueron inferiores a las concentraciones antes mencionadas.

Por otra parte, el potencial lipídico fue mayor en aquellos cultivos con ausencia de nutrientes, obteniéndose el mayor porcentaje en un medio con ausencia de nutrientes, pero presencia de carbono orgánico, tal comportamiento se mantuvo desde luego en el rendimiento biomásico.

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1.1 Planteamiento del problema.

La biotecnología ha usado a niveles comerciales en el tema de las microalgas, varios tipos de reactores. Desde aquellos que representan una tecnología muy eficiente hasta los económicamente viables. Debido a que el metabolismo de estas, depende de los procesos microbiológicos asociados a las mismas, para el crecimiento de estos microorganismos en un reactor, se debe tomar en cuenta parámetros físicos y químicos, campo que se encuentra en desarrollo.[6].

En este sentido, serán aceptables aquellos cultivos, en los cuales se pueda obtener una producción microalgal por arriba de los 2 mg/l/día. Sin embargo, los estanques de canales o rodaduras abiertas (Raceway Pond) representan un reto, debido a que la productividad es baja y esto se debe principalmente al poco control que se tiene sobre los parámetros físicos y químicos presentes en las reacciones internas del mismo. Un diseño erróneo tendrá como resultado la presencia de zonas muertas donde el flujo de fluido es lento y la velocidad no uniforme. Esto sin duda llevaría a un impacto negativo en el crecimiento de las microalgas, además, estos diseños desde el punto de vista energético resultan ineficientes [7]

La productividad en los sistemas abiertos, se ve influenciada también por el tipo de microalga con la cual se trabaje, dentro del amplio catálogo de estas, existen aquellas que son sensibles a cambios minúsculos y afectan de manera negativa su ruta metabólica ante alguna alteración; hasta aquellas que son capaces de soportar altas temperaturas. Por tanto, la elección de una cepa en particular por sensible o resistente que esta sea, según la literatura, arrojará resultados particulares para cada proceso evaluativo [8, 9].

1.2 Justificación

La tecnología microalgal para la producción de biodiesel, se ha venido realizando desde hace más de veinte años, sin embargo, ha sido en los últimos años cuando el sector privado y académico han decidido invertir más recursos, esforzándose en hacer de este algo energéticamente y económicamente viable. Pues sus beneficios se encuentran en poder aprovecharlo para la transformación en biodiesel, el tratamiento de aguas residuales y considerarlo como una posible tecnología para el secuestro de dióxido de carbono de industrias [10].

Las producciones de estos microorganismos no requieren estrictamente de condiciones ambientales específicas y pueden producirse desde un laboratorio cuando hay suficiente luz y dióxido de carbono. *Chlorella*, al igual que los demás tipos de microalgas, pueden crecer tanto en aguas marinas hasta residuales, alcanzando la duplicidad de población al cabo de horas, lo que permite al paso de pocos días contar con biomasa utilizable, haciendo énfasis que esta producción, no compite en ningún momento con la producción de semillas u otro alimento. [5, 7, 8].

El costo capital y operativo de esta tecnología, está directamente relacionado con el diseño de sus reactores. En este sentido, los reactores abiertos (estanque de canales abiertos) presentan grandes ventajas en comparación con los reactores cerrados [11]. Su bajo costo de construcción es una de ellas, así también su baja demanda de energía de operación y su fácil proceso de limpieza y manejo comparada con los fotobiorreactores cerrados; esto se debe principalmente a la simpleza de sus materiales [12]. Aunque la eficiencia de estos reactores sea un punto en contra, la literatura ha mostrado que una optimización detallada de sus parámetros de operación desencadenaría una mayor tasa de crecimiento de especies; teniendo como beneficios secundarios, una reducción en energía de suministro e incluso de costos.

1.3 Objetivos

Objetivo general

- ✓ Evaluar el crecimiento y contenido de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en un prototipo de estanque de canal abierto con el fin de conocer su potencial biotecnológico.

Objetivos específicos

- ✓ Cultivar la especie en medios residuales con y sin glucosa y un medio de control.
- ✓ Modificar el contenido de nutrientes en los medios residuales con y sin glucosa.
- ✓ Modificar la disponibilidad de luz en cada uno de los medios.
- ✓ Escalar el mejor tratamiento y medio de control al prototipo de estanque de canal abierto.
- ✓ Realizar cinéticas de crecimiento con el fin de evaluar la concentración de biomasa y remoción de nutrientes.
- ✓ Extraer y determinar el contenido de lípidos de la microalga.

1.4 Antecedentes

Los biocombustibles juegan un papel crucial en la transición de combustibles fósiles a las energías renovables. Estos nuevos combustibles producidos a partir de la biomasa, son un gran logro de la biotecnología, pues sus presentaciones en etanol, metano, hidrógeno, y biodiesel, incluso hacen posible poder obtenerlos de lugares a donde los combustibles derivados del petróleo aún no llegan. Se debe mencionar también la importancia de estos, dentro del marco de la no afectación en la producción alimentaria de cada país, pues la mayoría de estas materias primas no utiliza tierras cultivables y por el contrario aprovecha los desechos orgánicos [1, 4].

Se estima que el biodiesel específicamente, es la tecnología que puede satisfacer la demanda energética del sector transporte en el país, además representaría una ventaja medioambiental en lo que a emisiones de GEI se refiere, pues hay un 20% menos de liberación de CO₂ en comparación con el diésel convencional [13]. La ASTM (American Society for Testing and Material Standard) describe textualmente a este combustible como “ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga, derivados de lípidos” [5].

Los lípidos que son usualmente obtenidos de medios comestibles y algunas plantas tales como el trigo, el maíz o algunas palmeras aceiteras, dan origen a los llamados biocombustibles de primera generación. Los de segunda generación son aquellos que se obtienen de residuos agroindustriales; están además los que obtiene su fuerte energética de la modificación genética, como las algas y algunos otros microorganismos, estos son llamados de tercera generación [6].

Dentro de este sector, en las últimas décadas, una buena parte de las investigaciones se han centrado en poder desarrollar un proceso sustentable para la producción de biodiesel, que incluiría la optimización de los medios de cultivos, una buena manipulación de las cepas y dispositivos que permitan el crecimiento de estos microorganismos a grandes escalas. Sin embargo, aunque la tecnología es medianamente madura, la mayoría de ellos presentan contratiempos en la eficiencia de crecimiento. Muchos han sido los modelos y las modificaciones que se han

presentado a Raceway Pond, y en cada uno de estos estudios se obtiene nuevos avances [5].

El diseño primario de un estanque de canal abierto (Raceway pond) fue propuesto y experimentado desde 1950 y constan de un circuito de bucles y canales por donde circula el cultivo, mezclado mediante una rueda de paletas (paddlewheel) que homogeniza los nutrientes y los microorganismos. Los primeros reportes, arrojan que las cepas mayormente utilizadas fueron de la familia *Chlorella*, debido al soporte de alto estrés en condiciones tanto ambientales como de laboratorio [13, 12].

Existe una extensa experiencia en ingeniería de fotobiorreactores y en tratar de remediar algunos de los grandes problemas que algunos diseños presentan, por ejemplo los RWP convencionales deben maximizar la productividad al evitar la fotoinhibición y la fotolimitación de microorganismos cultivados, esto se puede lograr parcialmente agregando o haciendo diferentes modificaciones a cada uno de los componentes mecánicos del mismo, así como un control detallado de los parámetros medioambientales que intervienen [14].

La literatura menciona que en el año 2013 se diseñó un modelo innovador que permitiera eliminar o reducir la incidencia de regiones de estancamiento dentro del flujo del RWP. Tal desarrollo mejoró potencialmente la productividad de las algas, esto se logró diseñando una curva de bajo consumo de energía para el canal, trabajando con la *Chlorella protothecoides*, en un Medio de Cultivo Básico (MCB) igual manera se logró impactar en la reducción de gastos operativos en un 5%. [15].

En ese mismo año, en la universidad de Florencia, Italia, investigadores trabajaron en la revisión del consumo de energía en un estanque piloto. Ellos, mencionan que el poder reducir la columna de agua dentro del RWP, estaría íntimamente relacionado a la reducción de energía que se necesita para hacer funcionar la rueda de paletas que induce el movimiento del flujo dentro del estanque. El autor menciona que el problema principal de la poca eficiencia de los RWP, obedece a que la parte experimental y teórica acerca del funcionamiento del mismo se habían abordado hasta ese entonces por separado, por tanto, en ese trabajo se propuso evaluar las

pérdidas de presión en las curvas convencionales y comparar los resultados con los datos disponibles en la literatura [16].

Para las actividades experimentales, se construyó y operó un estanque de referencia equipado con una rueda de paletas convencional. Luego, se diseñó y realizó un estanque innovador implementando las soluciones originales identificadas a través del estudio teórico. El diseño innovador que nombraron como IRP II, consistía en instalar una hélice para reemplazar la rueda de paletas, entonces la potencia medida fue igual a 28.8 W: constituyendo un ahorro del 65% en comparación con el caso anterior bajo la misma geometría del estanque. Por lo tanto, la eficiencia total real se elevó en un 6.9% [16].

Dos años más tarde dos laboratorios en China, trabajaron en los mezcladores o deflectores dentro del RWP, el fin en el primer caso fue desarrollar nuevos deflectores de canaleta ascendente y descendente que generaron secuencialmente vórtices de líquidos en el sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario a las agujas del reloj; con esto pretendían aumentar la velocidad vertical del líquido entre el área oscura inferior y el área de luz superior en un estanque [17] .

Los deflectores del canal ascendente y descendente disminuyeron el tiempo de mezcla del líquido y aumentaron el coeficiente de transferencia de masa en un 41% y un 25%, respectivamente. Además, la velocidad vertical del líquido aumentó de ~ 0.5 cm / s a ~ 6.1 cm / s y el efecto de luz intermitente entre el área oscura inferior y el área de luz superior, al verse mejorado permitió el aumento en el rendimiento de la biomasa en un 32.6%. De igual manera, este trabajo dejó la premisa que, si se desarrollan aireadores de microburbujas y se incorporan al fondo del RWP, se aumentaría el área interfacial gas-líquido, y esto permitiría mejorar el crecimiento de las microalgas [17].

El segundo caso tuvo como objetivo reducir la zona muerta y mejorar el efecto de la luz intermitente. Para ello se instalaron deflectores de flujo y ala, utilizando CFD para conocer la hidrodinámica y las características de la luz dentro del RWP y poder optimizar los parámetros estructurales de dichos deflectores [18].

Reportan que hicieron pruebas a 6 geometrías diferentes de mezcladores antes de elegir los de flujo axial, así también realizaron pruebas en 2 modelos pilotos de RWP, con y sin deflectores. Mezclaron las dimensiones del reactor hasta obtener el modelo en que obtuvieron la mayor conversión de biomasa. Dentro de los resultados mencionan que, optimizaron el área de la zona muerta disminuyéndola en un 60.42%; la concentración de biomasa en el estanque con deflector de ala fue 30.11% superior al del estanque de control (sin deflectores) [18] .

Para el 2016, el investigador Zongbo Yang, trabaja en la mejora del crecimiento de las microalgas desde dos vertientes. La primera para mejorar el coeficiente de transferencia de masa y la tasa de crecimiento de las microalgas instalando aireadores de pequeñas burbujas que permitieran mejorar el tiempo de mezcla en el gas y el líquido como las investigaciones anteriores habían apuntado. Para ello se utilizó una bomba de agua en lugar de una rueda de paletas como fuente de impulso, con ello el tiempo de generación de burbujas disminuyó en un 21% y el coeficiente de transferencia de masa aumentó en un 25%. La velocidad de la solución aumentó en un 11 % y el rendimiento de la biomasa de las microalgas aumentó en un 18% [19].

Este trabajo permitió vislumbrar que las profundidades del cultivo y la concentración de la cosecha deben optimizarse con la bomba de agua para disminuir aún más el costo de energía de operación del sistema de cultivo.

EL segundo trabajo del mismo autor se analiza sistemáticamente el movimiento de las algas en un campo de flujo de vórtice. Él, junto con sus colaboradores diseñan deflectores de canal ascendente con el fin de disminuir el periodo de luz-oscuridad al interior de RWP. Señalan que estos deflectores ayudarían a un cambio en la dirección del flujo de fluido y con ello se producirían campos de flujo de vórtice que aumente la eficiencia en la producción de la biomasa. Sus resultados se centran en que usando deflectores de canal ascendente el rendimiento de la biomasa aumento aproximadamente el 22%; sin cambiar la velocidad de la paleta. Reportan haber utilizados dos sistemas de cultivos para poder comparar los resultados finales, uno de ellos incluía el uso de los mezcladores ascendentes y el otro no; bajo

las mismas condiciones de laboratorio (15% de CO₂ y una velocidad en paletas de 30 rpm) [20].

Dentro del trabajo que realizan, mencionan haber tomado de referencia para la verificación de la optimización de uno de los parámetros del RWP, el trabajo realizado en la Universidad de Italia, anteriormente [16]. Aquí la modificación de la rueda de paletas se hizo en cuanto a longitud, se pasó de 45 cm en el primer diseño a 55 cm en el segundo. Mencionan que una mayor longitud en la pala dio como resultado una mayor transmisión de energía cinética en el fluido de cultivo, esto se traduciría a una mayor homogeneidad de activos participantes y con esto disminución de zonas de sedimentación y zonas muertas. Pues una parte del fluido pudo circular directamente a través del lado superior del deflector y otro por la parte inferior, ya que la distancia desde el deflector del canal ascendente hacia la rueda de paletas era de solo 20 cm [20].

Este trabajo, al igual que sus antecedentes dejan una premisa. En este caso los investigadores mencionan que los trabajos posteriores deberían optimizar las profundidades del fluido y así se obtendrían diferentes intensidades de luz y con ello se podría reducir la cantidad de energía que se requiere para la rueda de paletas y aumentaría el rendimiento de la biomasa por unidad de área.

Durante todo el año pasado, los trabajos de optimización de los RWP, involucran el uso de la herramienta de CFD pues se ha convertido en una herramienta útil en el análisis de sistemas de interés práctico, que no solo incluyen fenómenos físicos involucrados con el movimiento de fluidos; con tales fenómenos, como se ha visto hasta hoy, se puede identificar la transferencia de masa, cantidad de movimiento, energía y especie química (que puede reaccionar o no) de una región a otra; como los trabajos hasta ahora reportados [21].

En Beijing, los investigadores estuvieron trabajando en la optimización en el consumo de energía en la rueda de paleta, pues tal como se menciona anteriormente, su ciclo de trabajo se ve afectado por dos variantes principalmente, una de ellas su geometría y la segunda la altura en la columna de agua del RWP. El trabajo reportado construye un estanque piloto y 3 más para pruebas, la premisa

era que, modificando la geometría en las paletas del estanque, disminuiría el alto consumo en Watts de las mencionadas; se probaron cuchillas tipo *back curved*, *forward curved*, *flat* y *zig-zagged* [22].

Los cuatro prototipos trabajaron a la misma velocidad de rotación, para no alterar el experimento. De acuerdo a lo que la simulación arrojó las paletas con mayor eficiencia ($n= 0.56$) serían las de tipo *flat*, sin embargo, su uso se contraponía al alto consumo energético, en lo experimentado. Así pues, se tuvo que determinar que el prototipo con mayor eficiencia sería aquel que considerase tres parámetros, velocidad del fluido, consumo de energía y eficiencia de las paletas. El valor máximo de eficacia en el RWP fue de $n=0.50$, utilizando cuchillas planas a 11 rpm y 15 cm de profundidad de cultivo. En este trabajo también se propusieron correlaciones empíricas de números no dimensionales relacionados con los parámetros de operación y la geometría de las cuchillas para cuatro cuchillas de rueda de paletas [22].

Otro de los trabajos del 2018 fue dentro del laboratorio de energía limpia, en la universidad de Zhejiang, en China. Lo que los investigadores proponen es utilizar un tipo de mezclador diferente a lo reportado hasta entonces; les llamaron deflectores cónicos permutados (mezcladores colocados en sitios intercalados). Según lo reportado, estos deflectores generarían un flujo de vórtice vertical y horizontal para intensificar la mezcla y la transferencia de masa dentro del RWP. Acoplado a este modelo, se tenía un aireador tubular en el fondo del estanque, su función principal sería mantener la homogeneidad en las muestras en caso de que los deflectores no llegasen a cumplir con su objetivo [23].

Después de correr la simulación y contraponerla con el experimento se concluyó que los deflectores cónicos permutados producían un fluido con movimiento de vórtice antes y después de pasar por dichos mezcladores. Esto obedecía principalmente a la estrategia utilizada para su colocación; el aireador de burbujas no intensificó su mecanismo de trabajo, en comparación con los trabajos anteriormente reportado [19]. Se reportó que la productividad de la biomasa de la microalga utilizada (*espirulina*), aumentó en un 39.6% [23].

El investigador menciona que en estudios venideros se deberían analizar la trayectoria del flujo de las células de las microalgas y la interacción de las burbujas en el estanque, esto mediante la modificación con los deflectores propuestos.

Para mitad del mismo año, se trabajó principalmente en impactar en la mejora del rendimiento de los estanques de canales abiertos, proponiendo un nuevo tipo RWP, al cual, los investigadores llaman de gran profundidad. Como se ha mencionado anteriormente, los RWP, son dispositivos baratos pero poco eficientes y su problemática obedece, como mencionan autores anteriores [16, 17, 19, 20], a la escasa altura que la columna de agua puede alcanzar y por ende a la productividad de biomasa por unidad de área, que se logra con tal geometría. Ante esto, se propuso un novedoso diseño de estanque, el cual modificaría su profundidad hasta alcanzar 1 m.

Este estanque tuvo acoplado un aireador en una de las curvas, con el fin de contrarrestar las zonas muertas producidas por la poca luz en la gran columna de agua. Para esta investigación se utilizó un diseño piloto y se pudo configurar 3 tipos de paletas y diferentes velocidades de agitación. Lo que se obtuvo fue, en presencia de un aireador, el consumo de energía en las paletas es menor; una mayor velocidad de agitación conlleva a un mayor suministro de energía de este mismo componente, pero menor número de zonas muertas, lo que aumentaría la productividad de la biomasa [10].

Con el diseño de alta profundidad, la relación del consumo de energía por unidad de volumen entre la tasa de transferencia de masa fue menor en comparación con los RWP de altura convencional, por lo que los autores consideran que colocando al aireador y modificando su geometría se podría obtener una mayor producción de microalgas [10].

Durante este año, las investigaciones se han inclinado por seguir en la línea de los estanques de altas profundidades, y ver cómo se puede lograr la mayor eficiencia optimizando algunos de sus parámetros. Uno de los trabajos más recientes llevó a investigar los efectos de variar las relaciones entre la longitud del canal y su ancho y cómo con ayuda de un impulsor de flujo se logra reducir las zonas muertas, el

consumo de energía , el esfuerzo de corte, en una sola frase, mejorar la eficiencia general del RWP [7].

Se partió de un diseño piloto rectangular y a partir de ello se simularon 15 geometrías diferentes para los deflectores centrales, tres relaciones L/A y 10 tipos de deflectores centrales; aunque en gran parte de la investigación corroboran los datos obtenidos en la investigación anterior del mismo autor [7], el aporte significativo lo da el hecho de demostrar que para mantener una velocidad mínima del fluido en el RWP, la longitud del canal debe ser 10 veces la de su ancho, ya que solo así se logra un balance entre el menor número de zonas muertas y el requerimiento en la potencia del estanque. Así pues, que la mayor parte de la disipación de energía se produce en los extremos del deflector central y si se realizan cambios bruscos en la dirección del flujo llevan a una caída de presión significativa. Esta caída de presión se puede minimizar si las formas del deflector central son semicirculares pues resultan más eficientes; ayudando a la disminución en las zonas muertas en un 28%, en comparación con un estanque tradicional [7].

Los deflectores centrales representan un componente de suma importancia para el fluido y que su uso depende el balance energético que se realice por cada RWP; pues, aunque un estanque puede ser más productivo entre más deflectores, estos elevarían los costos de producción.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Consideraciones generales

Las microalgas y las cianobacterias son microorganismos unicelulares que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Esto es, son capaces de generar biomasa orgánica a partir de CO₂ y luz, usando al agua como dador de electrones, oxidándola a O₂. Microalgas y cianobacterias difieren en muchos aspectos, especialmente en que las primeras son eucariotas y las segundas son procariotas, pero desde el punto de vista de la ingeniería de procesos, lo relevante es que crecen usando luz como energía y CO₂ como fuente de carbono. Por supuesto, tienen requerimientos nutricionales distintas, especialmente teniendo en cuenta que muchas cianobacterias pueden fijar N₂ atmosférico, mientras que las microalgas necesitan especies nitrogenadas como nitrato, amonio o aminoácidos [24].

Las microalgas son las plantas con mayor crecimiento de la tierra (100 veces más rápido que los árboles) y pueden crecer en distintas condiciones ambientales, tales como: pH, temperatura, nutrientes, disponibilidad de luz, etc. El cultivo de microalgas no es una actividad nueva, más de sesenta años de investigación en ficología aplicada avalan un conocimiento actual sobre producción masiva de microalgas que ha permitido su uso como alimento en la acuicultura de especies marinas, la depuración de aguas residuales y la producción de compuestos para sectores como la dietética y la cosmética. Se trata de productos cuyo valor de mercado permite llevar a cabo de forma rentable este tipo de actividad económica [25].

No obstante, las algas son empleadas hoy en día en numerosas partes del mundo para el tratamiento de aguas residuales, pero a pequeña escala. La capacidad de las algas de eliminar del agua, tanto nitrógeno como fósforo, entre otros, las convierte, sin embargo, en una posibilidad real para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, demostrándose que en la eliminación del fósforo pueden ser tan eficientes como el tratamiento químico convencional [26].

Sus principales ventajas son el menor costo, ya que no son necesarios productos químicos, y la recuperación de los nutrientes en forma de biomasa que puede ser empleada como fertilizante. Diversos autores han estudiado el consorcio algas-bacterias para la depuración de aguas residuales, en el que las primeras generan el oxígeno necesario para la respiración de las segundas, cuya descomposición a su vez proporciona los nutrientes necesarios, junto a la energía lumínica, para la fotosíntesis. En los últimos años, la Unión Europea ha apostado firmemente por la obtención de nuevas fuentes de energía limpias, como los biocombustibles [25].

El objetivo es que en el año 2020 un 20% de la energía producida en Europa provenga de energías renovables. La motivación para este cambio de postura es no solamente la necesidad de reducir el uso de derivados de petróleo y, consecuentemente, la dependencia de los países exportadores, sino también el reducir las emisiones de los gases de efecto invernadero [27].

En consecuencia, la investigación actual en el campo de la producción y el cultivo de microalgas se desarrolla en varios frentes, como el de la ingeniería: diseño de fotobiorreactores que aprovechen óptimamente la luz, la simulación de dinámica de fluidos para estudiar el efecto en la productividad de las condiciones hidrodinámicas y de la agitación, el estudio del empleo de membranas para inyectar el CO₂ en el cultivo, la modelación de los procesos de toma de nutrientes, etc. Estudios orientados en definitiva a maximizar la productividad y disminuir el consumo energético [25].

Además del campo de la ingeniería, en biotecnología se están realizando por ejemplo estudios microbiológicos que pretenden reducir la energía requerida en un reactor para la fotosíntesis, reduciendo en los sistemas fotosintéticos de las microalgas el tamaño de la antena que recoge la luz, de tal forma que se permite que cada uno de ellos tome sólo la luz que necesita. De esta manera la luz que se suele disipar en forma de calor y fluorescencia en el reactor y su superficie, penetra

en el cultivo aumentando la eficiencia general [28]. De esta forma se puede también disminuir la energía de agitación.

2.2 Tipos de microalgas

Según sus necesidades, la producción de microalgas se divide en:

- Autótrofas: Almacenan energía química en moléculas de carbohidratos que construyen ellos mismos. La comida es energía química almacenada en moléculas orgánicas. Los alimentos proporcionan la energía para hacer el trabajo y el carbono para construir cuerpos. Debido a la mayoría de los autótrofos transforman la luz solar para producir alimentos, el proceso que usan se conoce como fotosíntesis. Sólo tres grupos de organismos: las plantas, las algas y algunas bacterias son transformadores de la energía. Los autótrofos producen comida para su propio uso, pero hacen lo suficiente para mantener otra vida también. Casi todos los demás organismos dependen absolutamente de estos tres grupos por los alimentos que producen. Los productores, como también son conocidos los autótrofos, comienzan las cadenas tróficas que alimentan a todos los seres vivos [12].
- Heterótrofa: no pueden producir su propio alimento, por lo que deben comer o absorberlo. Por esta razón, los heterótrofos son también conocidos como los consumidores. Los consumidores incluyen todos los animales y hongos y muchos protistas y bacterias. Adicionalmente las microalgas, usan el carbono orgánico del medio en ausencia de luz [5, 29].
- Mixotrófica: muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen, por lo tanto, de compuestos orgánicos y del CO₂. [25].

2.2.1 *Chlorella*

El género *Chlorella*, comprende el grupo de microalgas Clorofíceas, que se caracterizan por ser cosmopolitas y frecuentes en lagos alcalinos, marinos y lagunas en general. *Chlorella* es una de las microalgas con abundante contenido de proteína

y que desde los tiempos de la II Guerra Mundial fue utilizado como suplemento alimenticio por su fácil reproducción y potencial nutritivo, capaz de estimular, aunque de forma parcial, el buen desarrollo de los procesos vitales del organismo humano. Se cultiva de forma intensiva y el sistema por lote es el más utilizado a gran escala por su bajo riesgo de contaminación, fácil implementación y sus amplios rangos de tolerancia a niveles de pH, salinidad, temperatura y luminosidad [29, 30]

2.2.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris es un alga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que es entre 100 y 1,000 veces menor a 1 mm. El color verde lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis. Esta característica le da nombre *Chlorella* al género, que significa pequeña verde. Se reproduce muy rápidamente y de forma asexual. Para eso precisa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y pequeñas cantidades de minerales [31]

Dada su mayor producción lipídica y de biomasa respecto a otras especies, *Chlorella vulgaris* resulta idónea para su explotación como fuente de ácidos grasos para la producción de biodiesel, con una composición lipídica promedio de 27.8%. Esta especie es fácilmente adaptable a diferentes condiciones de cultivo y sustratos, característica deseable para cultivos a gran escala, y presenta un corto ciclo de crecimiento, disminuyendo los riesgos de contaminación con especies no deseadas [30].

El alga verde unicelular *Chlorella vulgaris* es probablemente uno de los primeros organismos que surgieron en el planeta Tierra. Los archivos fósiles indican que la *Chlorella* data de hace al menos 540 millones de años. Sus células establecieron el cianotipo para las células de las plantas que crecieron en la tierra debido a su habilidad para adaptarse a grandes cambios climáticos y a su poderosa vitalidad. Su supervivencia notable se debe a dos características fundamentales:

- Pared celular casi irrompible la cuál es capaz de coexistir en lugares con concentraciones altas de pesticidas, toxinas y metales pesados.
- Reproducción a una proporción asombrosa, se rejuvenece en nuevas células en un tiempo de 17 a 20 horas [32].

2.3 Sistemas de cultivos para microalgas.

En la producción de organismos fotoautótrofos existen 2 diseños básicos: cultivos abiertos, donde la biomasa está expuesta a las condiciones medioambientales; y cerrados, denominados fotobiorreactores o PBR (por sus siglas en inglés), con poco o ningún contacto con el medio externo [33].

Un sistema de cultivo es diseñado en base a diversos criterios: la biología de la(s) especie(s) a cultivar; forma del cultivo; requerimientos nutricionales, lumínicos y resistencia al estrés; relación de la superficie iluminada/ volumen del reactor que determina la velocidad de crecimiento; orientación e inclinación; tipo de sistemas de mezcla y dispersión de gases; sistemas de limpieza y de regulación de la temperatura; transparencia y durabilidad del material; capacidad de escalado [34]. Por último, son también importantes bajos costos de construcción y operación para fines comerciales. La elección del tipo de sistema de cultivo es compleja, siendo importante determinar el tipo y valor del producto final desarrollado a partir de la biomasa, además de la disponibilidad de recursos hídricos y/o suelo [35].

Los sistemas abiertos se llevan utilizando desde los años 50 y son uno de los más comunes en la producción comercial de microalgas [34].

Dentro de estos sistemas se pueden clasificar en aguas superficiales naturales, como estanques, lagunas y lagos, y en estanques artificiales, ya que para la producción de microalgas es necesario principalmente una fuente de luz, agua y CO₂. Los sistemas abiertos no necesitan grandes inversiones y mantenimiento y de fácil escalado, pero su control es más complicado por lo que determina que estos sistemas tengan bajas productividades y eficiencia, además de ser más susceptibles a contaminaciones por otras algas o bacterias, aunque suponga un menor costo [9].

Los sistemas artificiales presentan diferentes diseños: inclinados (incluidos de capa fina), circulares y los más comunes y extendidos los estanques de carrusel o canales (Raceway). Los elementos de control en estos sistemas no son muy sofisticados y los reactores están muy condicionados por el ambiente donde se localizan.

El manejo de este tipo de sistemas suele ser más sencillo y son los reactores más utilizados en el mundo debido a la baja inversión necesaria. Los rendimientos en estos sistemas son muchos más bajos, si los comparamos con los sistemas cerrados y más susceptibles a las condiciones ambientales, ya que no se puede controlar la temperatura del agua, CO₂, evaporación e iluminación, por lo que el crecimiento del cultivo depende de las condiciones del medio y en general se produce en los meses más cálidos, aunque en estas latitudes es posible la producción a lo largo de todo el año, con rendimientos variables. En este tipo de sistema se produce una gran cantidad de microalgas, pero ocupa grandes áreas [36].

Por otra parte, ya que la atmósfera solo contiene 0.03 – 0.06 % de CO₂ es de esperarse que la transferencia de masa sea limitada lo cual puede disminuir el crecimiento celular. En general, para el cultivo en sistemas abiertos se buscan cepas de microalgas que puedan crecer bajo condiciones en las que otros organismos les resultaría difícil desarrollarse como pH altos o bajos, temperaturas específicas, requerimientos nutritivos específicos, etc. [9].

La ventaja que tienen los sistemas abiertos es que son muy baratos y fáciles de construir ya que básicamente lo que se hace es construir estanques, además del bajo costo de funcionamiento.

2.3.1 Tipos de sistemas abiertos

✓ Balsas

Las balsas abiertas son piscinas artificiales de agua con una profundidad limitada donde las microalgas crecen sin ningún elemento de mezclado, por lo tanto, no son considerados fotobiorreactores estrictamente al no manipular las condiciones naturales. El control del crecimiento del cultivo es escaso [9].



Figura 2-1 Balsas abiertas de cultivo en Australia [5]

✓ Canales o Raceways

Los denominados canales o Raceways suelen ser canales de hormigón ovalados y pocos profundos (de 15-30 cm) en forma de circuito cerrado, donde el cultivo circula y se mezcla para favorecer la estabilidad del crecimiento y productividad de las microalgas. Se suelen propulsar mediante paletas, hélices, inyectoras de aire, etc. por lo cual, en este caso, existe agitación que mejora el crecimiento de la biomasa. El suelo y paredes suelen estar recubiertos por una capa de plástico inerte.

Las limitaciones de los sistemas abiertos dificultan el mantenimiento en el tiempo de cultivos monoalgales, por lo que su empleo a gran escala se ha limitado a ciertas estirpes de crecimiento vigoroso en medios selectivos y resistentes a condiciones de intemperie.

Debido a la poca profundidad de estos canales, la difusión desde la atmósfera permite a las microalgas obtener el CO_2 necesario para su crecimiento de la atmósfera, pero no obstante para mejorar los rendimientos se pueden controlar determinados parámetros, como el suministro de CO_2 para el control del pH, mediante difusores en el fondo del estanque o colocar reflectantes de luz para poder aumentar la profundidad de los mismos. La agitación es un factor muy importante

para evitar la adhesión celular y permitir la homogeneización del cultivo, pero sin dañar las células [9, 34, 36].

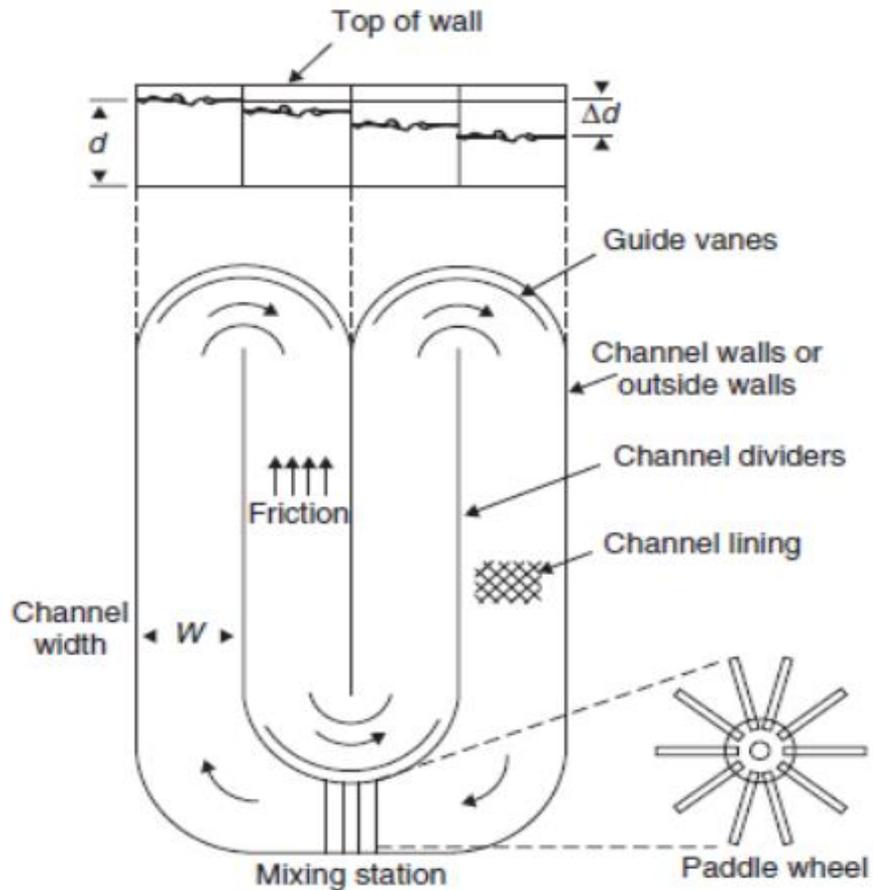


Figura 2-2 Diagrama de un reactor Raceway [25]

Aunque la productividad en estos sistemas es mayor que en las balsas, no son capaces de obtener altas concentraciones celulares. Otras desventajas de estos sistemas es el control de la temperatura o la presencia de contaminantes, además hay serias limitaciones en la profundidad y la turbulencia del cultivo [36].

Actualmente, el 95 % de la producción de microalgas se basa en sistemas abiertos (raceways o estanques abiertos circulares). Estos sistemas presentan una baja tasa de fijación de CO₂, estimándose que entre el 20-50 % del gas inyectado es efectivamente fijado por las microalgas [9] [26].

✓ Piscinas inclinadas

La turbulencia en estos sistemas se genera por la propia gravedad, pero presentan una serie de inconvenientes como una elevada evaporación, superficie que ocupa elevada, la sedimentación de las células en las partes donde la velocidad de flujo es menor, así como el coste energético de bombear el cultivo de nuevo a la parte superior.

✓ Tanques Circulares

Estos sistemas presentan varios inconvenientes, como la superficie que ocupan, los elevados costos de construcción suelen ser de hormigón y el alto consumo de energía, en estos estanques la agitación se realiza mediante una pala que gira recorriendo toda la superficie. A pesar de su elevado costo de construcción y operación son unos de los más usados en Japón, Taiwan e Indonesia para la producción de *Chlorella*. Estos dos sistemas están ya casi no se usan a nivel comercial [9].



Figura 2-3. Tanques circulares de la empresa Taiwan Chlorella manufacturing [25].

2.3.2 Sistemas cerrados.

Conociendo los problemas relacionados con los sistemas abiertos, especialmente la imposibilidad de obtener cultivos puros (un solo tipo de microorganismo), se desarrollan los sistemas cerrados. Gracias a ellos es posible producir una sola cepa de microalga y aportar un ambiente controlado al cultivo, ya que estos sistemas se encuentran aislados del ambiente exterior, por lo tanto, sin contacto directo con la atmósfera, esto supone una reducción de la contaminación, un mayor control de las

condiciones de cultivo y en general una mayor rentabilidad. El principal inconveniente es su coste [4]

Estos sistemas presentan una mayor productividad frente a los sistemas abiertos (raceways) consiguiendo una mayor eficiencia en la utilización y fijación del CO₂ inyectado. Permiten mantener condiciones idóneas para el crecimiento de una microalga concreta, a la vez que dificultan la invasión por organismos contaminantes, posibilitando así el mantenimiento de cultivos monoalgales [24].

En los fotobiorreactores cerrados pueden mantenerse valores de densidad celular más elevados que en los abiertos, alcanzando mayor productividad que estos, aunque el costo de construcción, mantenimiento y operación de los sistemas cerrados son considerablemente mayores. Si bien, su utilización a escala industrial se justifica por la obtención de productos de alto valor añadido, como son los complementos nutricionales y alimenticios para el sector acuícola. Estos fotobiorreactores son sistemas flexibles que pueden ser optimizados de acuerdo con las características biológicas y fisiológicas de las algas cultivadas [4, 9].

Dependiendo de su forma o diseño este tipo de reactores ofrecen mejor control sobre las condiciones del cultivo y los parámetros de crecimiento (pH, temperatura, mezclado, CO₂ y O₂), prevenir la evaporación, reduce las pérdidas de CO₂, permite obtener una alta densidad de microalgas, y una mayor productividad volumétrica.

Todos los fotobiorreactores suelen tener el equipamiento necesario para el crecimiento de las microalgas: aireación, agitación e intercambio de gases, medio proporcionado a la velocidad adecuada, estabilización de pH, iluminación e intercambio de calor [9].

2.3.2.1 Tipos de Fotobiorreactores abiertos.

✓ Cámara de microalgas

Son sistemas cerrados a pequeña escala, con el fin de aumentar el volumen. Existen recipientes de tamaños y formas muy diversas, en los cuales se mantiene el cultivo en condiciones muy controladas de temperatura, luz, etc. La luz aplicada es artificial mediante tubos fluorescentes que permiten una distribución homogénea

de luz y de la radiación ultravioleta, así como control de la temperatura ya que emiten poca cantidad de calor.

En función de las necesidades de cada tipo de cultivo se puede elegir diferentes tipos de materiales con distintas características de espectro lumínico, en la fig. 2,4 se puede observar diferentes tipos de recipientes para escalar y mantener los diferentes tipos de microalgas.

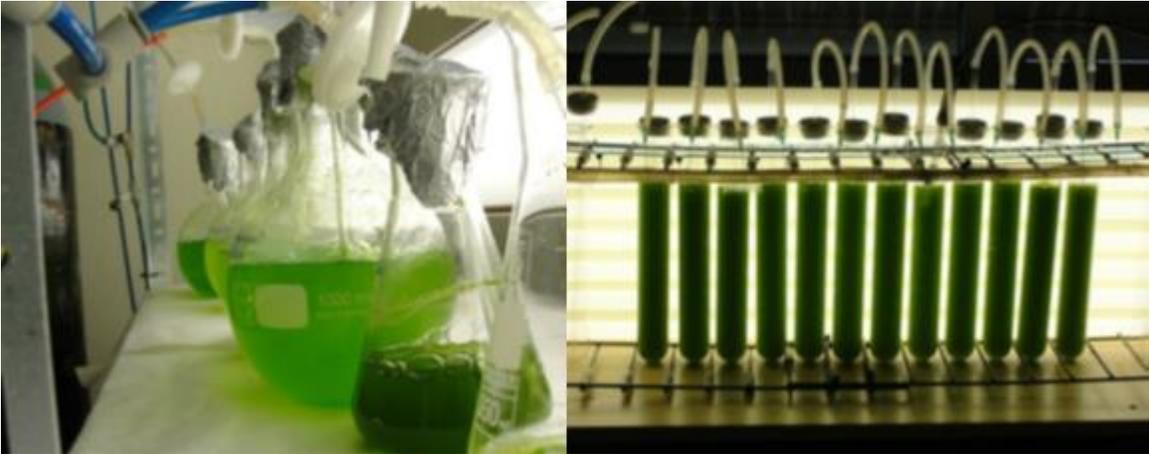


Figura 2-4. Recipientes para la producción de microalgas en cámaras [32].

✓ Fotobiorreactores

Un fotobiorreactor es un sistema cerrado forzado al máximo para la obtención de un mayor crecimiento de la microalga que se quiere cultivar. Estos sistemas de fotobiorreactores se caracterizan por el control y regulación de la mayoría de los parámetros de crecimiento de la microalgas (temperatura, CO₂, pH, etc.), así que a su vez se reducen el riesgo de contaminaciones y las pérdidas de CO₂. La luz no incide directamente en las células, sino que atraviesa unas paredes transparentes para llegar a ellas. En estos fotobiorreactores cerrados el intercambio de gases entre el cultivo y la atmósfera está muy limitado, y suele producirse acumulación de oxígeno en su interior que con un sencillo burbujeo de aire en el interior se libera [4, 24, 33].

Los fotobiorreactores cerrados se pueden clasificar según su diseño y su modo de operación. Desde el punto de vista del diseño se clasifican en:

- Planos o tubulares.
- Horizontales, verticales, inclinados o espirales.
- Serpentes (tubos acodados con circulación en serie).
- Múltiples (circulación en paralelo desde un colector repartidor a uno recogedor).

Desde el punto de vista del modo de operación se clasifican:

- Impulsado o agitados por aire o bombas.
- Reactores de una fase (el intercambio de gases se realiza en una cámara separada).
- Reactores en dos fases, el intercambio de gases se realiza a lo largo de todo el reactor.

La elección del tipo de fotobiorreactor debe realizarse haciendo un estudio previo de la especie a cultivar, donde se debe saber la resistencia de esa alga a las condiciones ambientales o hidrodinámicas, costes de operación, la necesidad de esterilidad, el valor del producto final y de la disponibilidad de recursos como el agua y suelo [9].

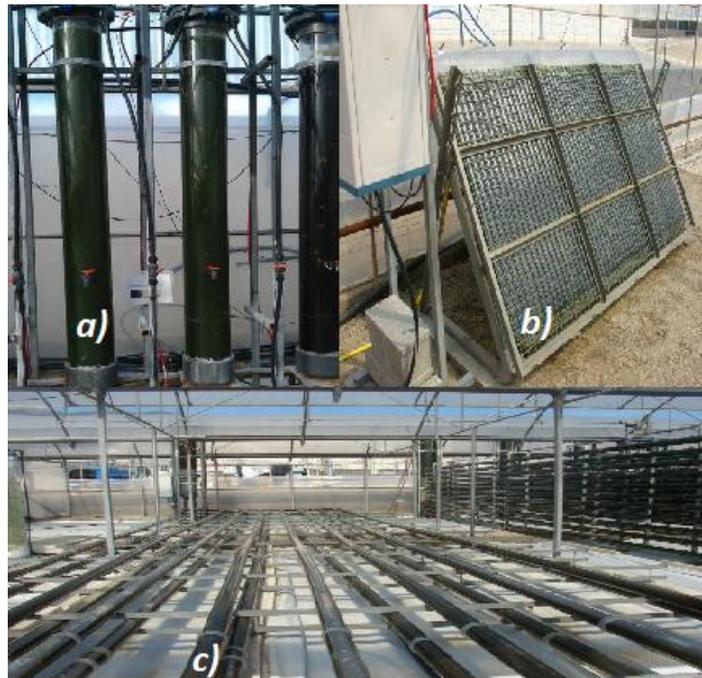


Figura 2-5. Ejemplos de algunos sistemas cerrados. a) fotobiorreactor tubular vertical (columna de burbujeo); b) fotobiorreactor plano; c) fotobiorreactor tubular horizontal [5]

2.3.3 Parámetros a considerar en un sistema de cultivo.

- ✓ Especie de microalgas.

La elección de las especies a cultivar depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante. Las especies algales predominantes dentro de un sistema abierto dependen de factores ambientales, operacionales y parámetros biológicos. En un sistema cerrado se pueden lograr cultivos monoespecíficos aislados del medioambiente [33].

Algunas especies presentes en aguas contaminadas son utilizadas en tratamientos de aguas residuales por su elevada tolerancia. Además, varias de éstas también son utilizadas para fines comerciales específicos [33]. Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium* han sido registrados en aguas residuales desde distintas procedencias. Varias de éstas son comercialmente interesantes para la alimentación humana y/o animal, la obtención de biocombustibles, aceites esenciales, pigmentos, entre otros usos [33, 34].

- ✓ Luz

La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo [37]. En ausencia de limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica, hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz. Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo [33].

Los cultivos microalgales exteriores suelen sufrir fotoinhibición en las principales horas del día debido a la alta intensidad lumínica. Bajo ciertas condiciones, los cultivos con mayor densidad celular ($> 3 \text{ g L}^{-1}$) son capaces de utilizar la luz incidente con mayor eficiencia en comparación con cultivos convencionales diluidos [37]. Esto

se debe al autosombreado, donde las células más cercanas a la superficie dan sombra a las capas inferiores, con células más alejadas de la superficie.

Un sistema de mezcla eficiente permitirá un acceso periódico de todas las células a la luz, de lo contrario, será perjudicial puesto que la intensidad lumínica decrece con el aumento de la turbidez. En sistemas HRAP (High Rate Algal Ponds), el mecanismo de paletas provee una eficiente mezcla vertical permitiendo una exposición intermitente de las células a la luz [33].

✓ Temperatura.

La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C.

En un sistema de cultivo cerrado, la temperatura se puede controlar por varios mecanismos, tales como rociadores de agua, inmersión del colector solar en piscinas, reactor dentro de un invernadero, etc. (Martínez 2008). Por el contrario, en un sistema de cultivo abierto es muy difícil de controlar, aunque se pueden realizar ciertas acciones simples para disminuir el efecto, como cubrir los estanques con plásticos transparentes [34].

✓ pH Y CO₂

El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO₂ [33].

Como en los otros parámetros, cada especie necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo pH 8 el más indicado para especies dulceacuícolas. Por encima o debajo de éste, presentan un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas [34, 35]

El pH puede controlarse con un sistema automatizado de inyección de CO₂, o incluso, con adición de ácido o base permitiendo además, suministrar CO₂ necesario para cultivos de alta productividad [35].

Las necesidades de CO₂ pueden ser considerables, por lo que los costos asociados pueden ser también elevados para un cultivo comercial de ahí la importancia de buscar una forma económica de mitigar estos costos [4]. Así, se han realizado variados estudios sobre las capacidades de diferentes microalgas para la fijación de CO₂ desde diversas fuentes gaseosas, considerándose altamente eficientes en este proceso. De esta manera, se ha sugerido la creación de cultivos comerciales para trabajar en conjunto con fuentes generadoras de CO₂, como cogeneradores. También han sido utilizadas en la depuración de biogás a partir de digestión anaerobia, limpiando el gas resultante de CO₂ y H₂S y elevando su capacidad calorífica, aunque la literatura sobre la técnica aún es escasa [35].

La adición de CO₂ ha demostrado mejorar la productividad en HRAPs a escala experimental en tratamiento de aguas residuales, aumentando la productividad incluso a más del doble. Se trata de hecho, de una práctica estándar en todos los sistemas para producción de algas comerciales [35].

✓ Nutrientes

El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) y se incorpora como nitrato (NO₃⁻) o como amonio (NH₄⁺) [35]. Es también un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas. Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20%, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40% [5, 8].

Sin embargo, usando la limitación de nitrógeno para estimular la acumulación de lípidos en las células de algas, a menudo reduce la producción de algas, lo que sugiere que las 2 condiciones, alto contenido en lípidos y alta productividad, pueden ser mutuamente excluyentes [11].

El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía. Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su deficiencia en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4^- [33].

✓ Oxígeno disuelto.

La intensa fotosíntesis realizada durante el día en sistemas de cultivo puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto a saturación > 200%. Se cree que una elevada saturación podría afectar la productividad de algas. En 2014, [33] menciona que a una saturación del 200% existe una reducción del 17% en la productividad, mientras que a 300% se reduce en un 25%. Todavía se requiere más investigación para demostrar el efecto de altos niveles de oxígeno [35].

2.4 Métodos de cosechas

Uno de los principales problemas en el cultivo de microalgas es el método de recuperación o cosecha, ya sea para la producción de biomasa con valor comercial, para el tratamiento de aguas residuales y/o para la captura de CO_2 . De hecho, es considerado el paso más complejo y costoso del sistema, el cual depende en gran medida de las características del cultivo, tanto técnicas como biológicas [33].

La selección del método de cosecha es de gran importancia para la economía de la producción de biocombustibles puesto que puede encarecer el costo total de la producción entre un 20-30% [4]. En la actualidad, las tecnologías de cosecha aún deben ser más eficientes y económicas para mejorar la viabilidad comercial del cultivo de microalgas, en especial, si está orientado a generación de biocombustibles [4, 33].

Entre los métodos de recuperación de la biomasa se pueden encontrar centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación. La centrifugación es un excelente método para la separación de la biomasa, ya que es rápido y eficaz, pero económicamente inviable para la recolección a gran escala al ocupar mucha

energía y requerir de equipos especializados. Esta técnica es factible cuando el valor de los productos resultantes es elevado.

La sedimentación por gravedad es un método común de recolección de biomasa. Pese a que es rudimentario, se perfila como el más eficiente método en relación con su efectividad y costo de ejecución. Además, funciona para varios tipos de microalgas y es energéticamente eficiente [33].

La filtración es un método comúnmente utilizado para la separación sólido-líquido. Es considerado eficiente en la separación de células grandes, como *Spirulina*, pero no para especies de menor tamaño como es el caso de *Chlorella* y *Scenedesmus* [11]. Estos métodos tienden a ser costosos en energía, con reemplazos frecuentes de membrana y bombeo continuo de la biomasa. A pesar de ello, se continúa avanzado en el mejoramiento técnico del proceso.

La flotación de la biomasa de algas ha probado ser un método prometedor en la recolección de algas unicelulares pequeñas y en ensayos a escala de laboratorio. La técnica consiste en la adición de gases, como el ozono o aire, que interactúan con la carga de las paredes celulares, permitiendo la flotación de las microalgas y subsecuente separación. Pero la utilización de ozono es una desventaja al incrementar los costos.

La floculación convencional trabaja por el mecanismo de dispersión de carga. La adición de sales metálicas (como aluminio) hace que interactúen con la carga negativa de las microalgas permitiendo la agregación. De este modo, se puede combinar con sedimentación, filtración o flotación, haciendo estos procesos más eficientes. Sin embargo, los residuos de esta técnica hacen inviable su utilización cuando los productos necesiten cierto grado de pureza, en especial para alimentación.

Las microalgas pueden generar un proceso de autofloculación que es la agregación espontánea que da como resultado la sedimentación de la microalga. Ésta puede ocurrir de forma natural o inducida por la limitación de carbono o de otros factores abióticos [33].

Capítulo 3. Metodología.

3.1 Etapa inicial.

En esta primera etapa, se cultivó a la especie en tres medios de diferentes composiciones, y se establecieron los parámetros físico-químicos de cada uno, de acuerdo a la bibliografía consultada. Así mismo, se determinó el crecimiento celular de la microalga, antes y después de ocurrido cada uno de los experimentos primarios. La imagen 6, muestra el desarrollo de tal etapa.

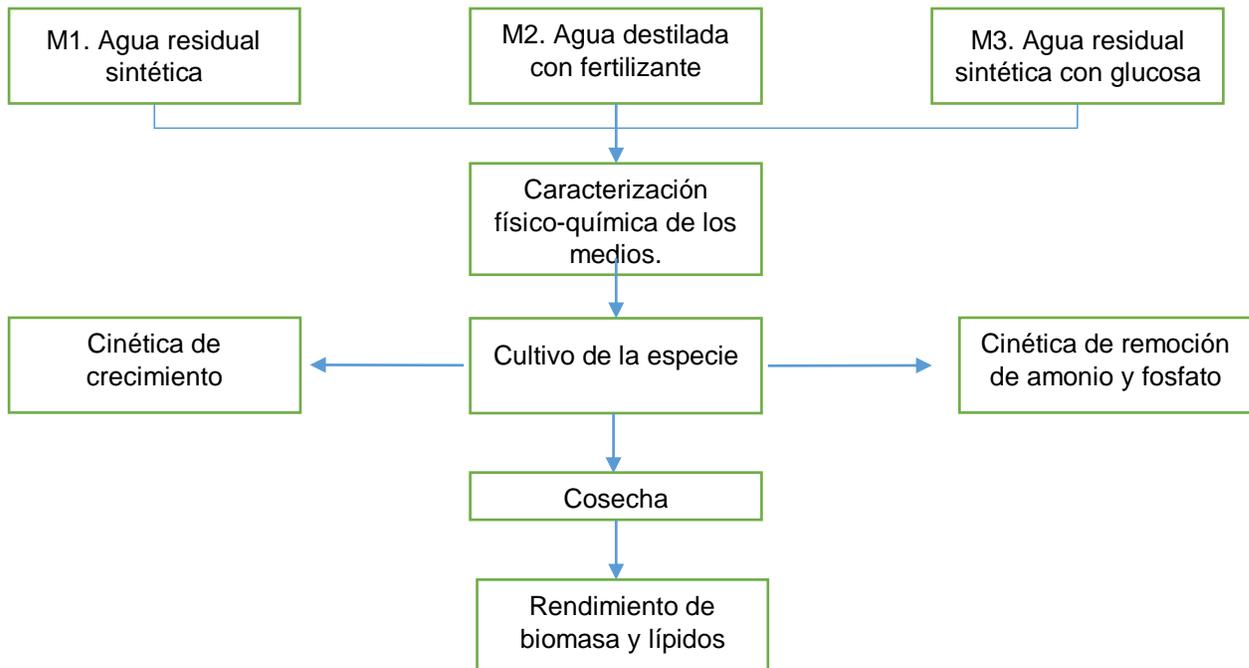


Figura 3-1. Etapa uno de la experimentación.

3.1.1 Adaptación en matraces.

En matraces Erlenmeyer de 250 ml, se inocularon 50 ml de la especie, enriquecidos con 150 ml de medio BG11. Tal medio, fue preparado de acuerdo con el protocolo establecido (Anexo 1), y esterilizado en autoclave a una temperatura de 121 °C a 15 psi, durante 15 min.

El cultivo se mantuvo dentro del laboratorio del IIIER, a una temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 25 días, tiempo en cual se pudo verificar mediante la observación constante un crecimiento lineal de la especie. La fuente de luz, se proporcionó mediante lámparas LED de 30 W de la marca Philipis, trabajando a un fotoperiodo

12 : 12 del ciclo luz/ oscuridad. La inyección de CO₂, de cada matraz fue mediante la agitación diaria de por lo menos 20 segundos.

3.1.2 Preparación de los medios de cultivo.

Los medios de cultivo con los cuales se hizo crecer a la microalga, son los descritos en la tabla 1.

Tabla 3-1. Medios de cultivo para *Chlorella vulgaris*.

<i>Medios</i>	<i>Descripción del medio.</i>
<i>M_a y a₁</i>	Agua residual sintética
<i>M_b</i>	Agua destilada con fertilizante
<i>M_c y c₁</i>	Agua residual sintética con glucosa.

Ma y a1. Agua residual sintética con/sin nitrógeno.

Mb. Medio de control con fertilizante.

Mc y c1. Medio residual sintético con glucosa con/sin nitrógeno.

El agua residual sintética (M_a), se preparó de la siguiente manera (por cada litro):

NaCl, 7mg; CaCl₂, 4 mg; MgSO₄·7H₂O, 2 mg; K₂HPO₄, 21.7 mg; KH₂PO₄, 8.5 mg; Na₂HPO₄, 33.4 mg y NH₄Cl, 3 mg. [39]. Para el caso del agua residual sintética sin nitrógeno (M_{a1}) , se prescindió de los 3 mg de NH₄Cl

Para el medio de control (M_b), se utilizó agua destilada enriquecida con fertilizante comercial de marca Bayfolan Forte, a una relación de 1 ml por cada litro de medio obtenido [40]. La composición del fertilizante utilizado se especifica más adelante (Anexo 2).

Para los medios en condiciones mixotróficas con y sin nitrógeno (M_c y M_{c1}) se añadió 10 g/L de dextrosa monohidratada a la composición inicial de los medios residuales sintéticos (M_a y M_{a1}) [41].

Los medios, se llevaron a esterilización en autoclave a 121 °C a 15 psi, durante 20 min [39].

3.1.3. Cultivo de microalgas. Primer escalado.

Se utilizaron botellas de vidrio con capacidad de 145 ml Por cada medio se establecieron dos réplicas, teniendo un total de seis experimentos, por cada nivel

de iluminación; todos con un volumen total del 100 ml, de los cuales 10 ml corresponde a la porción del inóculo antes mencionado. El blanco utilizado correspondió al medio Mb.

La luz se suministró en tres diferentes niveles, el primero contó con un flujo luminosa de 1000 luxes, el segundo nivel con 3000, mientras que el tercer nivel con 5000 luxes (ver fig. 3-2); proporcionados por diferentes arreglos de lámparas LED. Todos sometidos a un fotoperiodo de 12: 12; la temperatura a la cual se mantuvo a cada experimento fue 24 ± 2 °C, durante un lapso de 18 días.



Figura 3-2. Cultivo de la especie en frascos y a diferentes intensidades de luz.

3.1.4. Recuento celular

El recuento celular de la adaptación, una vez transcurrido los 25 días, se realizó con ayuda de una cámara Neubauer, de 0.1 mm de profundidad, al cual se le añadió 0.1 μ L de la dilución 1: 10 ml de inóculo/ agua destilada, obteniendo 6.78×10^6 cel/ ml [38] .

Por cada uno de los tratamientos se recolectaron alícuotas de 1 ml en viales previamente esterilizados, cuidando de tener una distribución homogénea de las células en todo el cultivo. A 1 ml de la recolección, se le agregó 9 ml de agua destilada, una vez hecha la dilución, se homogenizó, agitándola de manera vigorosa y con ayuda de una pipeta Pasteur, se extrajo 1 ml de muestra para colocarla en la cámara, la cual se observó en un microscopio marca AMSCOPE modelo AST36OB-3M utilizando el lente con aumento de 40X, para obtener un dato más preciso, la prueba se realizó por triplicado. Se registraron todas las células presentes en cada uno de los cuatro cuadrantes válidos; la concentración celular de cada tratamiento se obtuvo finalmente con ayuda de la fórmula [38]:

Ecuación 3.1

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil$$

Donde:

C = Concentración celular (cél/ml)

N = Promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 µl)

dil = Factor de dilución

10⁴ = Factor de conversión de 0.1 µl a 1 ml

La tasa de crecimiento específica para cada medición, se calculó mediante la siguiente ecuación [42]:

Ecuación 3.2

$$\mu_e = \frac{Ln_{N_f} - Ln_{N_0}}{Ln 2 (t_f - t_0)}$$

Donde:

µ_e = tasa de crecimiento específica (días⁻¹)

N_f = Concentración celular final (cél/ml)

N₀ = Concentración celular inicial (cél/ml)

t_f = Tiempo final del crecimiento (días)

t₀ = Tiempo inicial del crecimiento (días)

3.1.5 Cosecha de la biomasa.

Después de transcurridos 20 días y haber alcanzado fase estacionaria, se colocó 7 ml de cultivo en tubos de ensaye. Con ayuda de una bomba de vacío y filtros de fibra de vidrio de 47 mm marca Whatman, previamente puestos a peso constante; se homogenizó la muestra y utilizando una pipeta Pasteur, se filtraron 2 ml con el fin de retener las células algales en el mismo.

Los filtros con la biomasa, se llevaron en sobres enumerados a un horno con temperatura de 60 °C, por un tiempo de 12 hrs, posterior a este tiempo, se pasaron

a un desecador por 1.5 hrs para luego ser pesados. El procedimiento se repitió hasta lograr un peso constante [38].

El peso seco total, se obtuvo por diferencia de pesos entre los filtros (con y sin muestra), apoyados en la siguiente ecuación:

Ecuación 3.3

$$PST = \frac{PSFM - PSF}{VF}$$

Donde:

PST = Peso seco total (mg/mL)

PSFM = Peso del filtro con muestra

PSF = Peso del filtro vacío

VF = Volumen del cultivo filtrado.

3.1.6 Extracción y cuantificación de lípidos.

Se extrajeron 30 ml de cultivo y se colocaron en tubos para centrifuga de 50 ml (a), se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y luego se añadieron 3 ml de la mezcla cloroformo: metanol (1:2) sin agua. Los tubos se refrigeraron, a 4 °C durante 24 hrs.

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 3500 rpm por 20 min a. Se recuperó el extracto con apoyo de una pipeta Pasteur y se pasó a un tubo nuevo esterilizado (b), para agregar 4 ml cloroformo – metanol (1:2) a la pastilla celular sobrante. La biomasa residual, se llevó nuevamente a centrifugar, repitiendo el periodo anterior con 4 ml más de la mezcla, con el fin de seguir extrayendo lípidos. Se agregó al tubo (b) 11 ml de agua destilada, para poder eliminar el exceso de agua en la capa superior, se agitó; para obtener la mezcla bifásica se dejó reposar por 24 hrs(ver fig. 3-3).

Los tubos con la mezcla bifásica se metieron al horno para la evaporación del cloroformo por un tiempo 12 hrs hasta mantener un peso constante [42].



Figura 3-3. Extracción de lípidos.

La cuantificación de lípidos se realizó por diferencia de pesos, entre el tubo (c) vacío y llevado a peso constante y el tubo conteniendo la muestra, después de la evaporación. El porcentaje se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lípidos} = 100 \frac{PTL - PTV}{P}$$

Donde:

PTL: Peso del tubo con lípidos (mg)

PTV: Peso del tubo vacío (mg)

P: Peso de la muestra (mg)

3.1.7 Remoción de nutrientes.

Con el fin de conocer parámetros tales como calidad de agua y consumo de nutrientes presentes en los cuatro medios empleados ($M_{a y a1}$, $M_{c y c1}$) y el medio de control (M_b), se utilizó la metodología de caracterización de aguas residuales para medir al principio y al final, el contenido de nitrógeno presente en forma de amonio y de fosfato en forma de ortofosfatos [43].

3.1.7.1 Amonio (NH_4^+).

La medición del contenido de nitrógeno, se hizo al principio con una disolución *madre* de 1000 ppm, preparada con 4.714 g de sulfato de amonio anhidro, al cual se le agregó agua destilada hasta aforarlo a 1 L, a la solución se agregó 0.3 ml de cloroformo. A esta disolución *primaria o madre*, se le realizó la dilución *intermedia* a 10 ppm. De esta segunda, se colocaron 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 (ver fig. 3.4) ml en tubos de reacción y se completaron a 10 ml con agua destilada, al mismo tiempo que se preparó un blanco con 10 ml de solo agua destilada. Finalmente se procedió con la adición de tres reactivos colorantes.

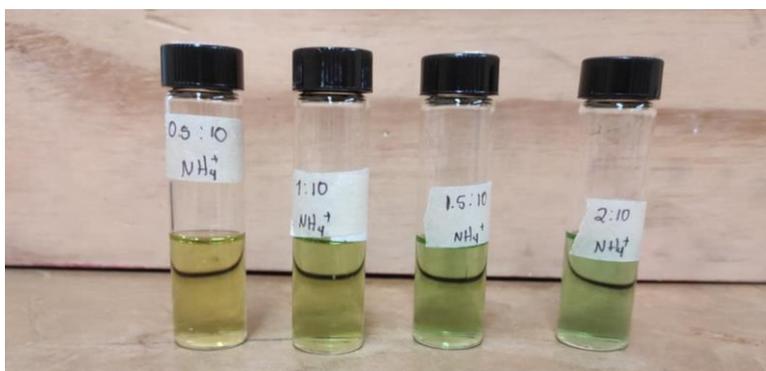


Figura 3-4. Realización de la prueba de contenido de nitrógeno.

Para las pruebas de amonio inicial y final, se recolectó 1 ml de los medios sujetos a prueba y de control, el cual se diluyó con agua destilada hasta aforarlo a 50ml, respectivamente. Se tomó 5ml de esta segunda solución, según cada medio, y se les agregó 0.2 ml de los tres reactivos colorante. Finalmente se midió la absorbancia a 630 nm.

3.1.7.2 Fosfato (PO_4^{3-})

La medición del contenido de nitrógeno, se hizo al principio con una disolución *madre* de 1000 ppm, preparada con 4.394 g de fosfato de potasio monobásico anhidro, al cual se le agregó agua destilada hasta aforarlo a 1 L, a la solución se agregó 0.3 ml de cloroformo. A esta disolución *primaria o madre*, se le realizó la dilución *intermedia* a 10 ppm. De esta segunda, se colocaron 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 (ver fig. 3.5) ml en tubos de reacción y se completaron a 10 ml con agua destilada,

al mismo tiempo que se preparó un blanco con 10 ml de solo agua destilada. Finalmente se procedió con la adición de dos reactivos colorantes.



Figura 3-5. Realización de la prueba de contenido de fosfatos.

Para las pruebas de amonio final, se recolectó 1 ml de los medios sujetos a prueba y de control, el cual se diluyó con agua destilada hasta aforarlo a 50 ml, respectivamente. Se tomó 5 ml de esta segunda solución, según cada medio, y se les agregó 0.4 ml de los dos reactivos colorante. Finalmente se midió la absorbancia a 880 nm.

3.2 Etapa intermedia.

Después de analizar los resultados del contenido de lípidos de la biomasa algal, por cada tratamiento realizado, se avanzó a segunda parte experimental, bajo la siguiente ruta:

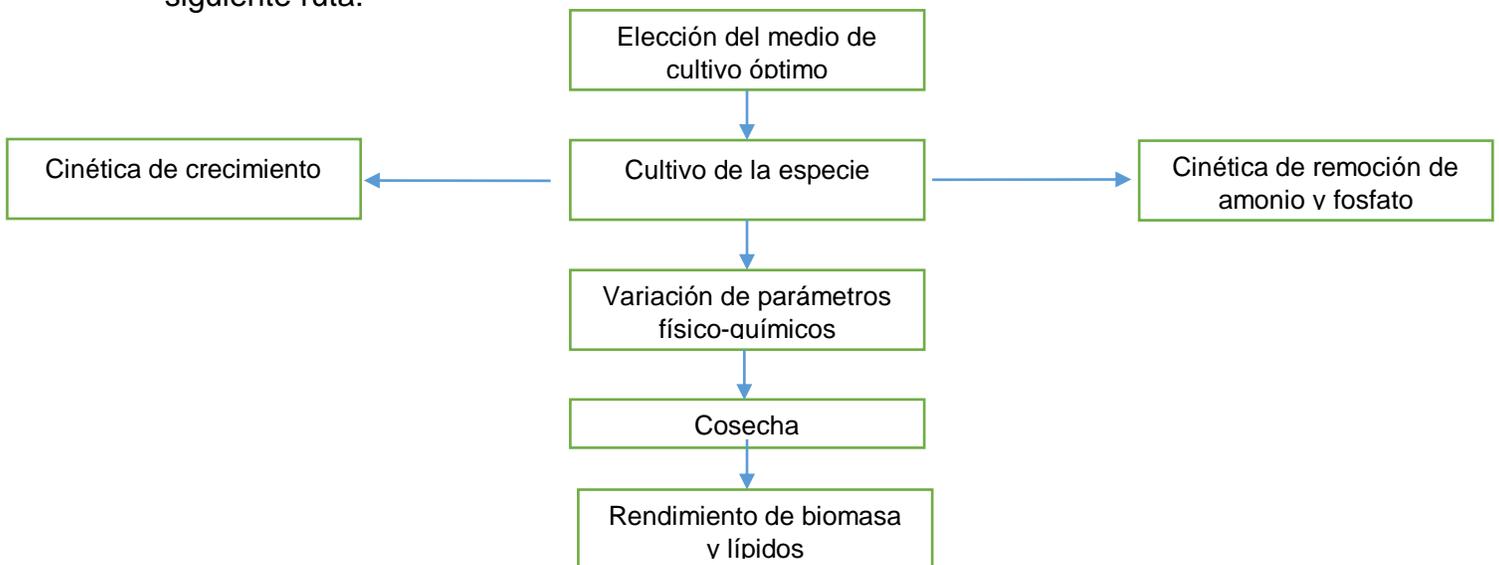


Figura 3-6. Variación de los parámetros físico-químicos del cultivo.

3.2.1 Elección del medio de cultivo.

De acuerdo con los porcentajes lípidicos y concentración celular, obtenidos en la etapa anterior, el medio residual con glucosa sin nitrógeno (M_c) fue seleccionado para la siguiente etapa, pues presentó mejores resultados, en las mediciones antes mencionadas, en comparación con los demás medios; su constitución de compuestos, fue la misma que la descrita anteriormente.

3.2.2 Escalado a 500 ml.

Se utilizaron biorreactores rectangulares de vidrio con capacidad de 800 ml (22x5x8 cm) trabajando a una profundidad de 5 cm (ver fig. 3.7), con el fin de simular el comportamiento de los sistemas abiertos. Por cada medio se establecieron dos réplicas, teniendo un total de seis experimentos, incluyendo el medio de control. Todos con un volumen total del 500 ml, de los cuales 50 ml corresponde a la porción del inóculo trabajado en la fase anterior. El blanco utilizado correspondió al medio Mb.



Figura 3-7. Operatividad del reactor a 3000 luxes.

Cada biorreactor, contó con un sistema de agitación instalado en el interior, el cual fue proveído por una bomba de recirculación de fluidos de 3 W y trabajando a 1.5, 3 y 4.5 cm/s, respectivamente; trabajando durante un tiempo de 12 hrs [15]. La luz se suministró mediante lámparas LED de 24 W y 3000 luxes, trabajando en un fotoperiodo luz – oscuridad 12: 12; la temperatura a la cual se mantuvo a cada experimento fue 26 ± 2 °C, durante un lapso de 10 días.

Debido a la pérdida por evaporación en cada uno de los biorreactores, propio de cada sistema abierto [8, 9], el sistema se clasificó como semicontinuo, por lo que

después de 48 hrs, se suministraron diversas cantidades de cada medio, a fin de mantener el volumen inicial de trabajo [10].

3.2.3 Diseño experimental.

Los experimentos se realizaron con apoyo del software para el diseño factorial multiniveles Minitab, en dependencia de iluminación y medios contra concentración, biomasa, lípidos y remociones de nutrientes. Se obtuvo un total de 30 experimentos, con una consideración de duplicación por cada uno.

3.3.4 Análisis estadístico.

Con el fin de analizar la influencia significativa de las variables de estudio, sobre los resultados obtenidos, estos se analizaron estadísticamente con un estudio de varianza (ANOVA), para la agrupación de información se utilizó el método Turkey, con un nivel de confianza del 95% y un nivel significativo $\alpha = 0.05$.

Capítulo 4. Resultados y discusión.

Chlorella vulgaris, como una de las especies de microalgas, ha sido estudiada en numerosas ocasiones, siempre que su uso lleve fines industriales o de biorremediación [44]. Ha resultado idónea como fuente de producción de ácidos grasos utilizables en la producción de biodiesel, esto se debe principalmente a su adaptabilidad a diferentes cultivos [45]. Una forma de conocer su interacción y aprovechamiento de esta, en los medios, es mediante una toma progresiva de su tasa de crecimiento durante los días de cultivo, así como el análisis de parámetros iniciales y finales que serán descritos a continuación.

4.1 Cinéticas de crecimiento primera etapa.

Con base en las especificaciones expuestas en la sección 3.1 se logró tener las condiciones adecuadas para el crecimiento de la microalga en el medio de control Mb, con el transcurrir de los días la tonalidad fue cambiando de un verde claro a un verde más oscuro debido al incremento en la concentración de la biomasa microalgal, lo cual indicaba el consumo de nutrientes.

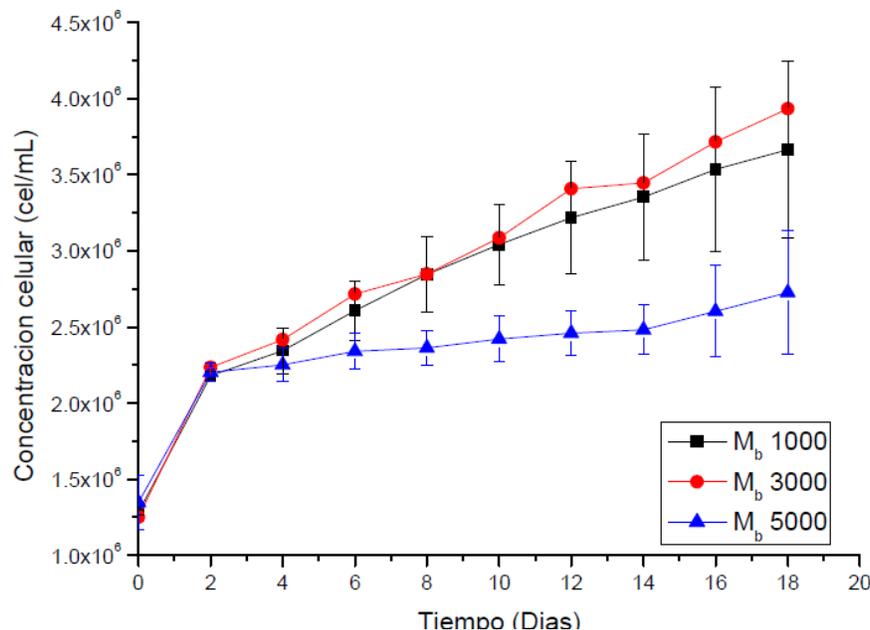


Figura 4-1. Concentración celular de *Chlorella vulgaris* en el medio de control, expuesta a diferentes intensidades de luz.

La fig. 4.1 muestra la cinética de crecimiento del alga para el medio de control (M_b). Se observa que la fase de *lag*, no excede el día dos para las tres intensidades de luz, de la misma forma, para las tres condiciones se logra llegar a la etapa de regulación a partir del día 6. Para el caso de M_b 1000, después del día 6, se observa un comportamiento similar del alga hasta llegado el día 12, cuando pasa de $2.84 \times 10^6 \pm 2.50 \times 10^5$ a $3.04 \times 10^6 + 2.64 \times 10^5$ cél/ml. Para los casos de M_b 3000 y M_b 5000, los incrementos celulares permanecen siendo significativos, hasta el día 14 y 20 respectivamente. Si bien, M_b 3000, presentó una mayor concentración celular al término del experimento, es de notar que la diferencia se marcó entre los días 12 y 14, cuando pasó de $3.09 \times 10^6 \pm 3.37 \times 10^5$ cél/ml a $3.41 \times 10^6 \pm 1.06 \times 10^6$ cél/ml, después de esto, se empieza a notar la desaceleración de la especie, mientras que M_b 5000 mantuvo un incremento constante entre los días 6 al 20 con valores registrados de $2.25 \times 10^6 \pm 1.09 \times 10^5$ cél/ml y $2.73 \times 10^6 \pm 4.09 \times 10^5$ cél/ml, respectivamente.

La especie duró en promedio 2 días en fase exponencial en los tres medios, momento durante el cual, los cultivos en las tres intensidades de luz, manejaron valores relativos de concentración con $2.20 \times 10^6 \pm 2.7 \times 10^4$ cél/ml, $2.23 \times 10^6 \pm 4.55 \times 10^3$ cél/ml y $2.20 \times 10^6 \pm 5.91 \times 10^4$ cél/ml. Un comportamiento similar se presenta en el estudio de Ramos et al. [46], al mencionar que el crecimiento de las algas se mantiene sin cambios significativos en los medios de control, siempre que los experimentos sean *indoor*, y es, hasta llegada la fase de desaceleración cuando las variaciones en los tratamientos empiezan a producir cambios notables en el cultivo.

Por lo anterior, en el presente trabajo, los objetivos apuntaron a trabajar con un medio viable económicamente, siempre que su procedencia sea residual. Castillo et al. [51] menciona en su investigación, que la utilización de las microalgas en la biorremediación de aguas residuales, provenientes de efluentes municipales, son una alternativa de cultivo, por el ahorro que representa tanto en agua y nutrientes

(N, P, K), al tiempo que remueven amonio, fosfato, reducen la presencia de organismos patógenos y generan O₂, proveniente del proceso fotosintético [46]. Gonzalez-Delgado et al. [47], puntualiza en su estudio que la disponibilidad o supresión de nutrientes en los medios de cultivo de las microalgas es un factor crítico para la obtención de metabolitos con valor agregado, según sea el objetivo de cada investigación. Chisti [44], menciona además que las algas verdes como *Chlorella*, presentan incrementos en su contenido lipídico, cuando están bajo estrés nutricional, siendo esta situación mutuamente excluyente al crecimiento celular. Por ello, se evaluó el impacto de dicha teoría en el crecimiento celular de la microalga, en los medios M_a y M_{a1}.

En la fig 4.2, se observa el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris*, en los medios M_a y M_{a1}, sujetas a las tres condiciones de luz. Se puede observar, que, para ambos medios, el crecimiento fue significativamente mayor, cuando la especie fue expuesta a 3000 luxes ($\sim 50 \pm 2.68 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) con $2.84 \times 10^6 \pm 1.05 \times 10^5$ en el caso de M_a y $5.30 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5$ cél/ml para M_{a1}, dando una disparidad total de $2.46 \times 10^6 \pm 3.18 \times 10^4$ cél/ml. Las concentraciones más bajas se registraron a 1000 y 5000 luxes para M_a y M_{a1}, respectivamente; $2.50 \times 10^6 \pm 1.59 \times 10^5$ cél/ml en el primer caso y $3.32 \times 10^6 \pm 2.46 \times 10^5$ cél/ml en el segundo. Existiendo una diferencia significativa entre ambos tratamientos de $8.14 \times 10^5 \pm 8.64 \times 10^4$ cél/ml.

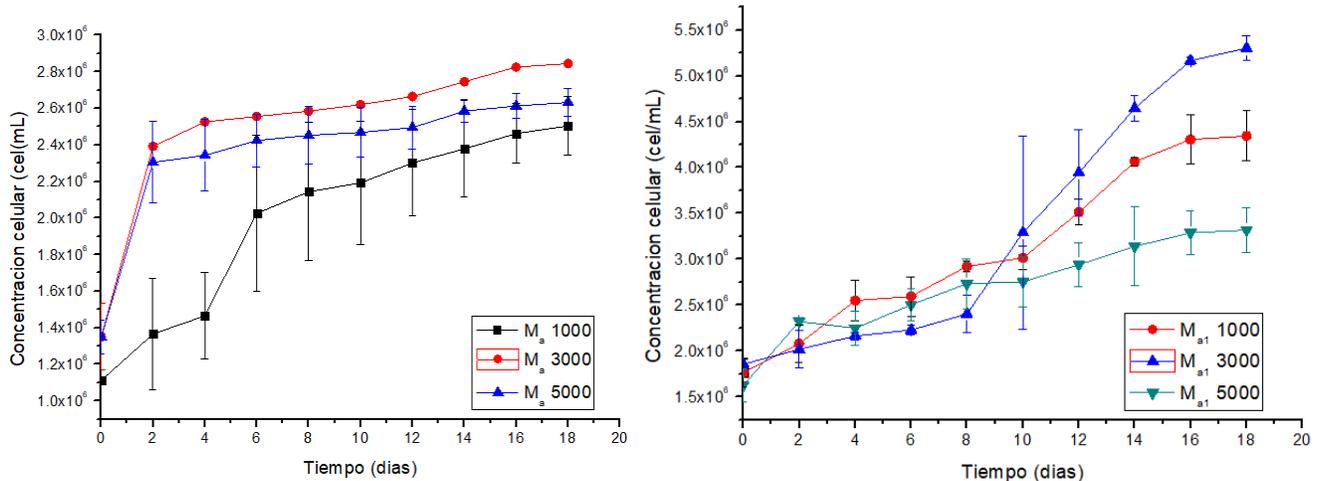


Figura 4-2. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los medios M_a y M_{a1}, sujetas a flujos lumínicos de 1000, 3000 y 5000 luxes.

Ramos et al. [30], reporta similares efectos del flujo luminoso sobre la concentración celular, trabajando al mismo fotoperiodo que el presente estudio, dando como referencia que sus valores bajos se registraron a densidades lumínicas altas y prolongados ciclos de oscuridad, aun en medios con disponibilidad de nutrientes. Las diferencias significativas, evaluadas en este trabajo, en cuanto a velocidades y tasas de crecimiento, así como a la densidad celular final obtenida en ambos medios, concuerdan con los resultados obtenidos por Rosales et al. [48] y Montero et al. [45], al mencionar que la gran desventaja de la estrategia de estrés fisiológico por nutrientes, está asociado a la reducción de la división celular y con ello a la baja velocidad de crecimiento microalgal.

El comportamiento de la microalga en ambos tratamientos, es desigual, en el caso del medio M_a , la especie expuesta a 3000 y 5000 luxes, comienza su fase exponencial, luego del día 2, mientras que la muestra trabaja a 1000 luxes, lo hace hasta llegado el día 6. Después de ello, se mantiene conforme a las fases que Arredondo et al. [38], menciona en su trabajo. Para el caso de M_{a1} , el comportamiento en la primera fase, es favorable para el medio a mayor flujo luminoso, alcanzando al día 4 un promedio de $2.72 \times 10^5 \pm 4.32 \times 10^4$ cél/ml más en comparación con sus inmediatos inferiores. Transcurrido poco más de la mitad del experimento, se empieza a evidenciar los efectos negativos en el cultivo, del estrés por sobreexposición y falta de luz, comportamiento que comparte con el medio ausente de nutrientes. En la etapa final, M_{a1} 3000, presenta diferencias significativas en comparación con el resto, $9.58 \times 10^5 \pm 6.78 \times 10^4$ cél/ml más que M_{a1} 1000 y $1.99 \times 10^6 \pm 1.41 \times 10^5$ cél/ml más que M_{a1} 5000.

Ortíz et al. [49], menciona en su trabajo, la adaptabilidad del género *Chlorella* a crecer en condiciones ambientales y nutricionales variadas, esto permite utilizarla tanto en medios autótrofos como heterótrofos, sin embargo, el cuello de botella de ambos medios a escala comercial, sigue siendo la conversión poco eficiente de energía a fin de lograr una productividad rentable por área de cultivo [50]. Por una parte, los medios autótrofos presentan una limitante por luz, mientras que los

cultivos heterótrofos incrementan sus costos por mantenimiento de parámetros y el uso de fuentes de carbono orgánico. Una alternativa para especies como *Chlorella vulgaris*, es que su crecimiento se dé en cultivos mixotróficos, en los cuales se aproveche una fuente tanto orgánica como inorgánica de carbono en presencia de luz, en donde simultáneamente se pueda fijar el CO₂, presente en su ambiente, llevando a cabo así, la fotosíntesis [36, 50].

En la fig. 4.3, se muestra el crecimiento de la especie en un medio residual enriquecido con una fuente de carbono orgánico, con y sin limitación de nutrientes, trabajando a tres flujos luminosos distintos.

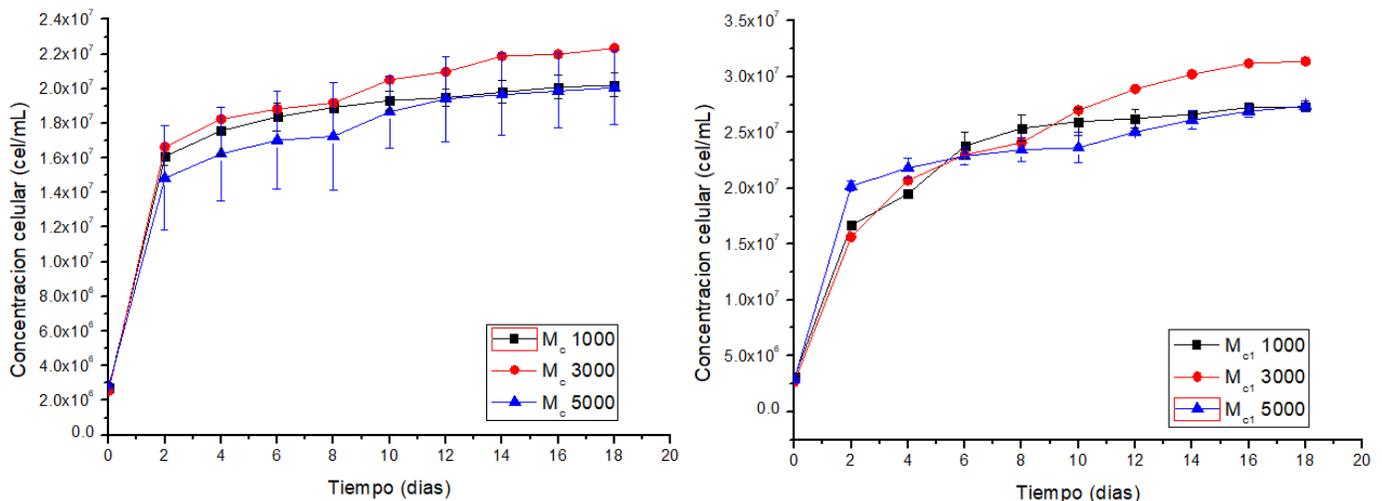


Figura 4-3. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los medios M_c y M_{c1} , sujetos a flujos lumínicos de 1000, 3000 y 5000 luxes.

Los gráficos de lado izquierdo, muestran al medio M_c , el cual presentó concentraciones al inicio del cultivo muy similares entre sí, con un promedio de $1.50 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^6$ cél/ml, llegados al día 4, cuando comienzan su crecimiento exponencial. Mientras que los gráficos referentes al medio M_{c1} , presentan un promedio de $1.80 \times 10^7 \pm 2.12 \times 10^6$ cél/ml, en la misma fase. Hasta este punto, las variables de estudios, no mostraban cambios significativos en los tratamientos.

Para la mitad del experimento, el crecimiento de la especie en M_{c1} , había aumentado en un 25% aproximadamente, con un promedio celular de $2.43 \times 10^7 \pm 9.89 \times 10^5$

cél/ml, en comparación con un aumento del 18.5% del medio Mc, con un promedio de $1.84 \times 10^7 \pm 1.05 \times 10^6$ células/ml. La diferencia significativa apunta, a lo señalado anteriormente por Rodríguez et al. [41], cuando menciona en su investigación, que, aun trabajando en medios heterótrofos, el estímulo que afecta en mayor medida el crecimiento celular, es la deficiencia del nitrógeno en el medio, pues al igual que en el presente trabajo, la falta de condiciones fisiológicas impidió el aumento de la división celular, llegados al día 7 de 16 en experimentación.

Sin embargo, el estímulo por disposición de luz, comenzó a marcar diferencias en ambos medios, a partir de la fase de desaceleración, cuando los medios Mc 3000 y Mc1 3000, comenzaron a presentar duplicaciones mayores por día, en comparación a los inmediatos inferiores. Este comportamiento, se mantuvo hasta finalizar la experimentación, alcanzando concentraciones finales de $2.23 \times 10^7 \pm 1.13 \times 10^6$ células/ml y $3.14 \times 10^7 \pm 1.95 \times 10^6$ células/ml, respectivamente.

Tabla 4-1. Parámetros cinéticos máximos de crecimiento de la especie *Chlorella vulgaris*, en cada uno de los tratamientos, en el primer escalado a 100 mL.

Medio de cultivo	Concentración celular (cel/ml)	Concentración inicial (cel/ml)	Concentración celular final (cel/ml)	Tasa de crecimiento específica (μ) (generaciones/día)	Tiempo de generación (tg) (día)	Divisiones por día (k)
M_a^1	$1.35 \times 10^6 \pm 1.82 \times 10^{5**a}$		$2.84 \times 10^6 \pm 1.85 \times 10^{5**}$	0.08 ^a	41.1	0.1
M_a^2	$1.85 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4^b$		$5.30 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5$	0.12 ^a	10.4	0.1
M_b^3	$1.26 \times 10^6 \pm 2.27 \times 10^4^c$		$3.93 \times 10^6 \pm 1.15 \times 10^6$	0.11 ^a	14.3	0.2
M_c^4	$2.54 \times 10^6 \pm 7.73 \times 10^4^d$		$2.23 \times 10^7 \pm 1.13 \times 10^6$	0.24 ^b	33.8	0.3
M_{c1}^5	$2.70 \times 10^6 \pm 3.87 \times 10^5^e$		$3.14 \times 10^7 \pm 1.95 \times 10^6$	0.28 ^b	22.1	0.4

*Medio de dos repeticiones. ** Los promedios (\pm error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

1 Agua residual sintética sin amonio.

2. Agua residual sintética con amonio.

3. Agua destilada enriquecida con fertilizante

4. Agua residual sintética sin amonio con glucosa.

5. Agua residual sintética con amonio con glucosa.

En un estudio reportado por García et al. [52], *Chlorella vulgaris*, al igual que la mayoría de especies de microalgas, limitan su crecimiento cuando en el medio

existen limitantes de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. En su estudio, con un *bloom* de microalgas, en donde la de mayor presencia, es la misma que utilizada en el presente estudios; las tasas de crecimiento no tuvieron diferencias significativas en medios sintéticos con presencia de nutrientes, alcanzando valores de 0.16 ~ 0.18, menores a los reportados en la tabla 4.2, para los medios con amonio.

Por otra parte, Ortiz et al. [50], reporta en su investigación que los medios autótrofos presentan mayores concentraciones celulares, en comparación con los mixotróficos, con datos de 1.8×10^8 cél/ml y 1.2×10^8 cél/ml respectivamente, superando incluso a los datos obtenidos para M_{c1} . Sin embargo, en el presente trabajo, los medios M_{a1} y M_{c1} (condiciones mixotróficas), obtuvieron concentraciones superiores al compararlo con M_a y M_c (condiciones autótrofas). Esto puede atribuirse a que, la glucosa, utilizada como fuente de carbono orgánico en este trabajo, fue fácilmente metabolizada por las microalgas por ser un paquete de energía química de fácil absorción, situación que se comparte con lo presentado por Rodríguez et al. [41].

4.2 Concentraciones de biomasa.

El rendimiento de biomasa de *Chlorella vulgaris* oscila entre 400 ~ 800 mg/L, según los reportes de Castilla et al. [47], en la fig. 4.4, se observan los resultados de la concentración de biomasa en los medios con presencia y ausencia de nutrientes, así como el medio de control, expuestos a los tres flujos lumínicos diferentes. El medio mixotrófico, con ausencia de nitrógeno presentó el rendimiento mayor, con un promedio de ~ 530 mg/L. En un estudio similar Rodríguez et al. [41], reporta que *Chlorella*, presenta mejores productividades en medios con enriquecimiento de carbono orgánico y ausencia de nutrientes, en comparación con medios autótrofos sin modificación, con valores de 590 mg/L y 160 mg/L, respectivamente. Valores similares a los obtenidos en esta investigación por el medio M_c .

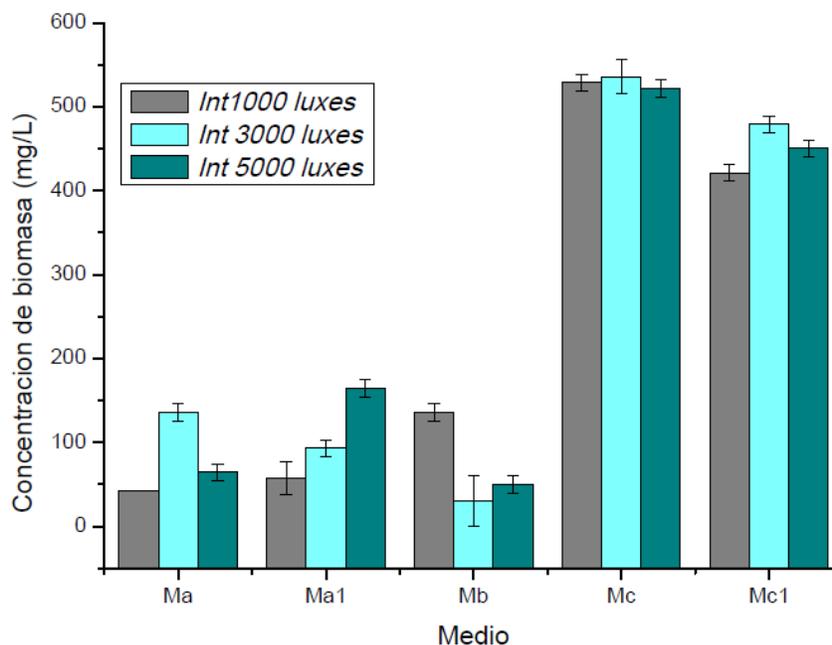


Figura 4-4. Concentraciones biomásicas de *Chlorella vulgaris* en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes intensidades lumínicas.

Yanx et al.[19], en su investigación, atribuye este comportamiento, a la disposición que especies como *Chlorella vulgaris* tienen, para modificar su ruta metabólica en la asimilación de xilosa, monosacárido con mayor precio comercial en comparación con la glucosa utilizada en el presente trabajo; reportando un rendimiento de biomasa de 2.4 g/L, superior al de esta investigación.

Tabla 4-2. Rendimiento biomásico máximo (mg/L) de la especie *Chlorella vulgaris*, en los diferentes medios de cultivo, en el primera etapa a 100 mL.

Medio de cultivo	Cantidad de muestra filtrada (mL)	Rendimiento máximo (mg/L)
<i>M_a</i>¹	10	*135.71 ± 10.10** ^a
<i>M_{a1}</i>²	10	92.86 ± 10.10 ^a
<i>M_b</i>³	10	307.14 ± 30.30 ^c
<i>M_c</i>⁴	10	535.71 ± 20.20 ^b
<i>M_{c1}</i>⁵	10	478.56 ± 10.10 ^d

*Medio de dos repeticiones. ** Los promedios (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

1. Agua residual sintética sin amonio 3000 luxes.
2. Agua residual sintética con amonio 3000 luxes.
3. Agua destilada enriquecida con fertilizante 3000 luxes.
4. Agua residual sintética sin amonio con glucosa 3000 luxes.
5. Agua residual sintética con amonio con glucosa 3000 luxes.

Los promedios del rendimiento máximo de los medios autótrofos M_a y M_{a1} , no presentaron diferencias significativas, como se observa en la tabla 4.2. Sin embargo, existe una disparidad notable entre los medios autótrofos y mixotróficos, tal es el caso de M_a y M_c , con una diferencia de 400 ± 200 mg/L y en los medios M_{a1} y M_{c1} con una diferencia de 385.71 ± 272.74 mg/L, representando en cada caso más del 100%. Li et al.[22], reporta en su investigación, que la concentración de la biomasa se duplicó de 1.69 g/L a 3.43 g/L, cuando el nitrógeno en el medio de cultivo se agotó y había existencia de una fuente de carbono orgánico, caso que se comparte en el presente trabajo.

Rodríguez et al. [41], reporta un rendimiento biomásico de 590 mg/L, en un medio mixotrófico sin limitación de nutrientes, utilizando una concentración de 20 g/L de dextrosa monohidratada como fuente de carbono orgánico, esto representa el doble de la concentración utilizada en el presente trabajo, sin embargo, el rendimiento de M_c es solo 55 mg/L menos, en comparación al trabajo citado. El ahorro del 50 % en la utilización de la fuente de carbono orgánico, con respecto a la referencia, habla de una reducción de costos en la producción microalgal de esta investigación.

Nzayizenga et al. [53], menciona en su investigación la importancia de optimizar las fuentes de luz en los cultivos, flujos luminosos por debajo de 3000 luxes ($\sim 50 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), presentaron una producción de biomasa menor a 300 mg/L, rendimientos similares a los obtenidos por M_a y M_{a1} , los cuales trabajaron al mismo flujo. En la misma investigación, se plantea el uso de fuentes de luz más intensas para mejorar el rendimiento biomásico, sin embargo, los efectos del aumento en el flujo luminoso, en los cultivos del presente trabajo, fueron contraproducente a este parámetro. Por su parte, Ortiz et al. [50], explica que medios enriquecidos con fertilizantes (N, P, K), presentan mejores rendimientos de biomasa, cuando las concentraciones utilizadas del mismo, oscilan entre 1 – 5 % v/v; como se reporta en el medio de control M_b .

4.3 Concentración de lípidos.

El contenido lipídico de cada medio, en sus tres exposiciones, se presentan en la fig. 4.5.

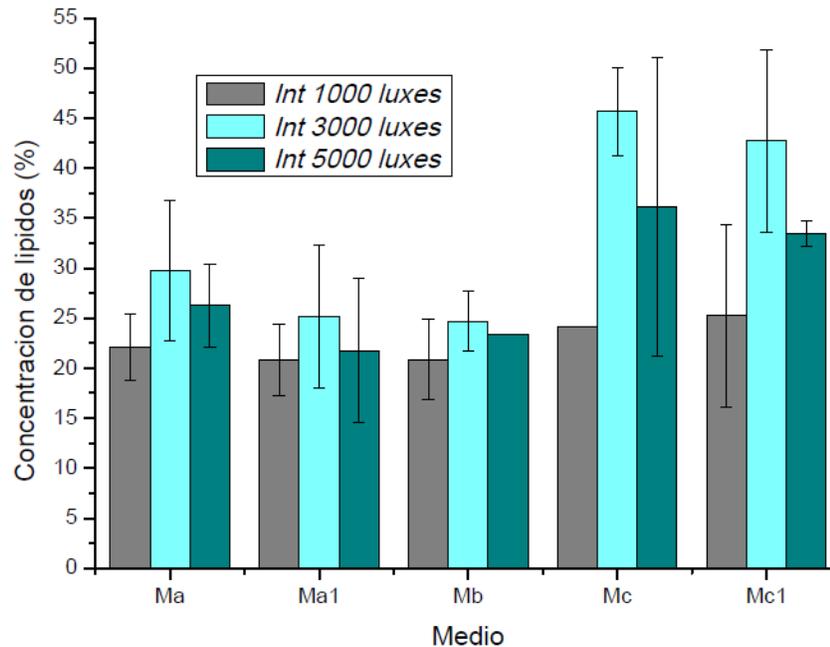


Figura 4-5. Concentraciones lipídicas de *Chlorella vulgaris* en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes intensidades lumínicas.

De acuerdo con el análisis realizado, se aprecia que los medios M_a y M_{a1} (autótrofos) presentan menores rendimientos lipídicos, en comparación con los medios M_c y M_{c1} (mixótrofos), con porcentajes que oscilan entre 20 ~ 26 % y 25 ~ 46%, respectivamente. Sin embargo, los medios M_a y M_{a1} , presentan rendimientos similares con M_b . Sacristán et al. [54], reporta en su investigación que *Chlorella vulgaris*, presentó un rendimiento lipídico de 22.9 %, en agua residual artificial, sin enriquecimiento de nutrientes extras, como en el caso de M_a y M_{a1} .

Por otra parte, Liang et al. [55], reporta, que un medio autotrófico sin fuente de nitrógeno, *Chlorella vulgaris* presentó un rendimiento del 33 ± 1 % contra el 36 ± 1 % en un medio mixotrófico al 1% v/v de fuente de carbono orgánico. Tales resultados, difirieren al de la presente investigación, en el primer caso los medios M_a y M_{a1} , no superan al 26 % en rendimiento lipídico y en el segundo suceso, el rendimiento de M_{c1} a 3000 luxes es superior en 8%, con respecto a tal referencia.

Tabla 4-3. Rendimiento lipídico máximo (mg/L) de la especie *Chlorella vulgaris*, en los diferentes medios de cultivo, en la primera etapa a 100 mL.

Medio de cultivo	Cantidad de muestra utilizada (mL)	Rendimiento máximo (mg/L)
<i>M_a</i>¹	30	* 40.36 ± 6.96** ^a
<i>M_{a1}</i>²	30	23.36 ± 7.12 ^a
<i>M_b</i>³	30	75.85 ± 2.95 ^b
<i>M_c</i>⁴	30	244.60 ± 4.41 ^c
<i>M_{c1}</i>⁵	30	204.40 ± 9.11 ^c

*Media de dos repeticiones. ** Los promedios (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

1 Agua residual sintética sin amonio 3000 luxes.

2. Agua residual sintética con amonio 3000 luxes.

3. Agua destilada enriquecida con fertilizante 3000

4. Agua residual sintética sin amonio con glucosa 3000 luxes.

5. Agua residual sintética con amonio con glucosa 3000 luxes.

El análisis de la información, arrojó que los medios M_a y M_{a1} , no presentan diferencias significativas entre sí, más sí hay disparidad con los medios restantes, como lo muestra la tabla 4.3. Esto lo podemos atribuir a la composición del medio, pues M_c y M_{c1} , son medios en mixotrofia, mientras que los medios restantes son puramente autótrofos. Rodríguez et al. [41], informa que los rendimientos de *Chlorella*, en medios con diferencias de composición, como las reportadas en la presente investigación, oscilan entre 6 ~ 12% para medios puramente autótrofos, y de 16 ~ 38 % para medios mixotrofos, en ambos casos los medios aquí reportados superan tales resultados. Es importante, resaltar que M_a y M_c , presentan mejores resultados en la acumulación de lípidos, en comparativa con M_{a1} y M_{c1} , efecto que se buscaba desde el inicio de la investigación, pues según lo reportado por Castillo et al. [47], someter a las especies como *Chlorella vulgaris* a un estrés por nutrientes, impactaría directamente en la síntesis de ácidos grasos, incrementando así la producción de lípidos, logrando un rendimiento máximo de 305.71 mg/L, valor que supera a lo obtenido en el presente trabajo, aun en medios con adición de glucosa.

4.4 Remoción de amonio y fosfato.

El porcentaje de remoción de nutrientes antes del periodo de cultivo en cada uno de los medios utilizados, se muestra en la tabla 4.4.

Tabla 4-4. Caracterización inicial de los medios de cultivo para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}).

Medio de cultivo	NH_4^+ (PPM)	PO_4^{3-} (PPM)
M_a^1	0.99 ± 0.04	*1.50 ± 0.04** ^a
M_{a1}^2	1.07 ± 0.03	1.64 ± 0.13 ^a
M_b^3	3.40 ± 0.75	2.39 ± 0.08 ^b
M_c^4	1.75 ± 0.04	1.42 ± 0.08 ^c
M_{c1}^5	1.16 ± 0.01	1.42 ± 0.02 ^c

*Media de dos repeticiones. ** Los promedios (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

1. Agua residual sintética sin amonio.

2. Agua residual sintética con amonio.

3. Agua destilada enriquecida con fertilizante.

4. Agua residual sintética sin amonio con glucosa.

5. Agua residual sintética con amonio con glucosa.

De acuerdo al análisis, los medios M_a y M_{a1} , no presentaron diferencias significativas en el contenido inicial de ambos parámetros, caso similar al de los medios M_c y M_{c1} . Sin embargo, el medio de control (M_b), mostró notables diferencias en su contenido de amonio y fosfato, con el resto de los medios; casi el doble en comparación con el medio residual más sobresaliente M_c , con 3.40 y 1.75 ppm, respectivamente.

Después de transcurrido el tiempo de cultivo, los valores de remoción para cada uno de los medios fueron variados, tales datos se presentan en la tabla 4.5. Los medios residuales entre sí no presentaron diferencias significativas, caso contrario al medio de control, el cual presentó valores finales superiores a 3 ppm. Para los casos de M_a y M_{a1} , los valores iniciales y finales de concentración de nitrógeno en forma amonio, fueron similares, tales resultados se asocian a que ambos medios fueron diseñados con limitación de nutrientes y se presume que los datos aquí reportados, se deben a que la especie fijó tal compuesto en el medio sintético de crecimiento.

Tabla 4-5.. Caracterización final de los medios de cultivo para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}).

Medio de cultivo	NH_4^+ (PPM)	PO_4^{3-} (PPM)
M_a^1	0.85 ± 0.03	*1.38 ± 0.01** ^a
M_{a1}^2	0.97 ± 0.01	0.98 ± 0.01 ^a
M_b^3	3.29 ± 0.82	2.02 ± 0.10 ^b
M_c^4	0.87 ± 0.04	1.34 ± 0.02 ^a
M_{c1}^5	0.87 ± 0.01	0.99 ± 0.04 ^a

*Medio de dos repeticiones. ** Los promedios (± error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

1. Agua residual sintética sin amonio.
2. Agua residual sintética con amonio.
3. Agua destilada enriquecida con fertilizante.
4. Agua residual sintética sin amonio con glucosa.
5. Agua residual sintética con amonio con glucosa.

Ramos et al. [46], reporta en su trabajo una remoción de amonio NH_4^+ , del 21.48%, con un medio residual sintético, mientras que en la presente investigación valores similares de remoción se alcanzaron en los medios M_c y M_{c1} con 25.1 y 24.3 % respectivamente. Sin embargo, Sacristán et al. [54], menciona que los medios enriquecidos con fertilizante NPK, asimilaron nitrógeno en un porcentaje mayor al 50%, valor que supera al del presente trabajo con el medio de control, M_b , con tal solo 5% en remoción de tal nutriente.

Para el caso de la remoción de fosfato total disuelto, los valores mayores se presentaron para M_a y M_{c1} , con el 40 y 30 % respectivamente. García et al. [52] menciona en su investigación que la buena asimilación de este nutriente se relaciona directamente con los procesos metabólicos de las microalgas que dan lugar a un crecimiento biomásico de la especie.

4.5 Escalado a 500 mL.

Para el avance a esta etapa, se analizaron los diferentes parámetros descritos en apartados anteriores, la significancia de cada uno y el impacto en la producción de biomasa y lípidos, por lo cual se decidió trabajar como medio para escalar al M_c , un medio que tenía limitaciones de nutrientes, pero una fuente de carbono orgánico.

Como menciona Castillo et al. [47], para que las microalgas puedan competir dentro del sector energético como una fuente prometedora, los procesos biotecnológicos empleados deberán garantizar no solo una buena cosecha de la biomasa sino también una buena acumulación de lípidos.

4.6 Cinética de crecimiento. Escalado a 500 mL.

La evaluación periódica de la concentración celular en esta etapa, se resume en la fig. 4.6, para los reactores que sirvieron como medio de control.

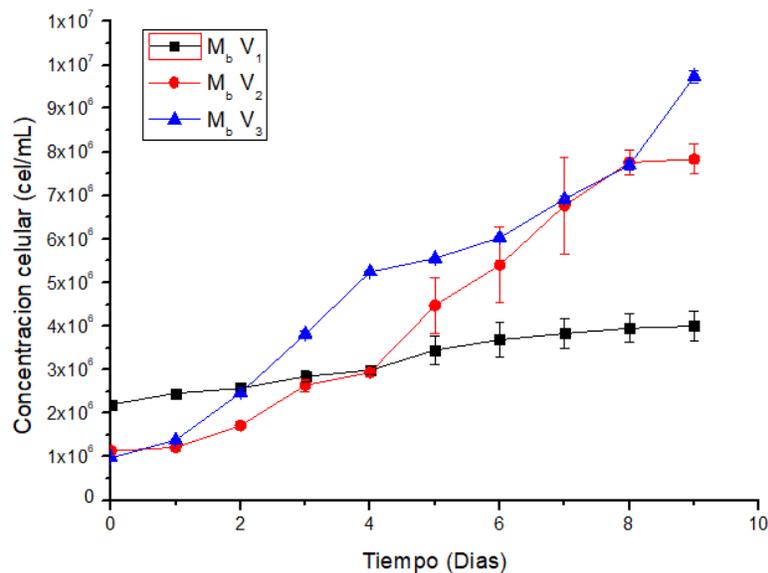


Figura 4-6. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los reactores V_1 , V_2 , V_3 para el medio de control (M_b) sujetos a una exposición de 3000 luxes.

La concentración inicial de los tres reactores difirió por algunas unidades, esto debido a que la cantidad de inóculo utilizado para el inicio de esta etapa, excedía al volumen obtenido en la etapa anterior.

Considerado lo anterior, se puede notar que la fase *lag*, no supera el día dos para los tres reactores, esto se puede atribuir a lo mencionado por Castillo et al. [47], cuando habla de la adaptabilidad de especies como *Chlorella vulgaris*, a trabajar en distintos medios y ambientes; así pues, trascurridos 5 días de experimentación, es cuando las diferencias en concentración se empiezan a evidenciar. Para el caso de V_3 , se puede decir que sigue dentro de la fase exponencial, logrando una concentración de $5.25 \times 10^6 \pm 9.09 \times 10^3$ cel/ml, siendo entonces $2.26 \times 10^6 \pm 1.60$

$\times 10^5$ veces mayor que V_1 , el cual para este tiempo se encontraba en fase estacionaria, y $2.31 \times 10^6 \pm 1.63 \times 10^5$ veces mayor que V_2 .

Tales diferencias, resultaron de la disparidad de condiciones de trabajo de dichos reactores. La relevancia de una mayor velocidad en cuanto a concentración obtenida, en el presente trabajo, guarda gran relación con los resultados obtenidos por Sawant et al. [10], cuando menciona la importancia de la velocidad para la obtención de un *mixed* adecuado de macro y micro nutrientes que cada medio contiene y del cual se alimentan las microalgas.

Para el caso del medio residual, el comportamiento de la especie en los tres reactores mantiene relación con el medio de control. En la figura 4.7, se puede observar el seguimiento de cada experimento.

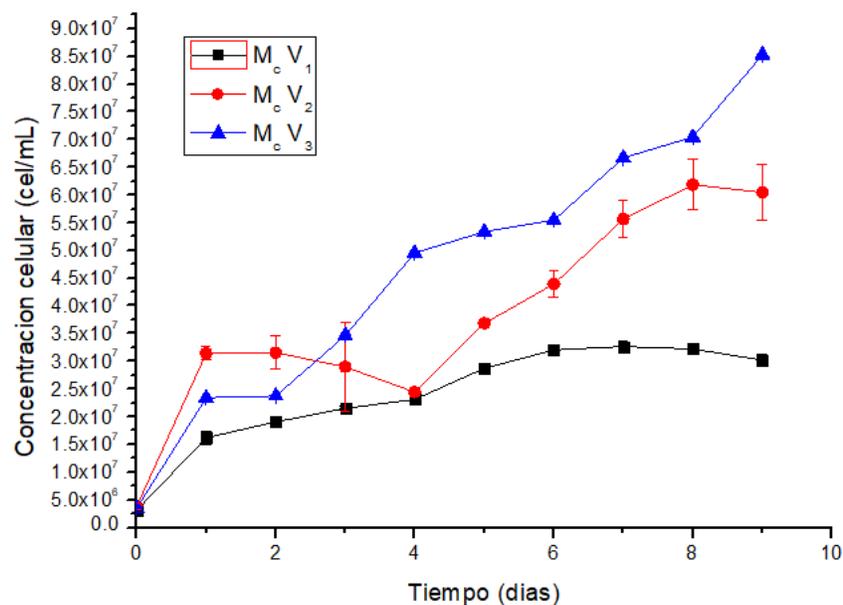


Figura 4-7. Cinéticas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los reactores V_1 , V_2 , V_3 para el medio residual con limitación de nutrientes (Ma) sujetos a una exposición de 3000 luxes

Puesto que, al inicio de la experimentación con este medio, los valores en concentración de los inóculos fueron similares, la fase de adaptación se dio en un día. Sin embargo, las fases posteriores para los tres reactores, tuvieron diferencias notorias, al día 5, V_1 , mantiene la fase estacionaria con un valor en concentración

de $2.31 \times 10^7 \pm 1.55 \times 10^5$ cél/ml, el reactor V_2 disminuye su densidad por $4.59 \times 10^6 \pm 3.25 \times 10^5$, situación que se puede atribuir a la falta de alimento dentro del mismo, producto del acelerado crecimiento que venía dando. Para el caso de V_3 , mantiene continuidad de condiciones, según lo descrito por Arredondo et al [38].

Al igual que los gráficos del medio de control, en el medio residual, se puede observar el impacto positivo que tiene el incremento de la velocidad en el crecimiento de la especie. En la tabla 4.6, se puede analizar con mayor claridad, tales resultados.

Tabla 4-6. Parámetros cinéticos de crecimiento de la especie *Chlorella vulgaris*, en cada uno de los tratamientos, en el segundo escalado a 500 mL.

Medio de cultivo	Concentración		Tasa de crecimiento específica (μ) (generaciones/día)	Tiempo de generación (tg) (día)	Divisiones por día (k)
	celular (cel/ml)	Concentración inicial celular final (cel/ml)			
M_c^{V1}	$3.19 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5$ d	$3.02 \times 10^7 \pm 1.05 \times 10^6$	0.25 ^b	0.55	0.3
M_c^{V2}	$3.81 \times 10^6 \pm 5.42 \times 10^5$ e	$6.05 \times 10^7 \pm 5.01 \times 10^6$	0.30 ^b	29.9	0.4
M_c^{V3}	$3.53 \times 10^6 \pm 8.02 \times 10^5$ f	$8.53 \times 10^7 \pm 1.26 \times 10^5$	0.35 ^b	11.5	0.5
M_b^{V1}	$2.20 \times 10^6 \pm 8.64 \times 10^4$ ** a	$4.01 \times 10^6 \pm 3.32 \times 10^5$ *	0.06 ^a	16.8	0.1
M_b^{V2}	$1.13 \times 10^6 \pm 8.96 \times 10^4$ b	$7.84 \times 10^6 \pm 3.46 \times 10^5$	0.21 ^b	11.9	0.3
M_b^{V3}	$1.05 \times 10^6 \pm 8.55 \times 10^4$ c	$9.73 \times 10^6 \pm 1.41 \times 10^6$	0.25 ^b	4.65	0.3

*Media de dos repeticiones. ** Los promedios (\pm error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

V1. Reactor con velocidad de 1.5 cm/s

V2. Reactor con velocidad de 3.0 cm/s

V3. Reactor con velocidad de 4.5 cm/s

V_3 para ambos medios, reportó mejores resultados en comparación con sus contiguos. Como se menciona anteriormente, algunos autores reportan mejores resultados en reactores donde el mezclado de los nutrientes es eficiente gracias a velocidades altas en el fluido. Esto a su vez, permite que el número de zonas

mueras dentro del estanque sea menor, como reporta Sawant et al [7, 10] en dos de sus investigaciones, al mencionar que la velocidad está directamente relacionada al adherencia de las microalgas a las paredes del reactor. Las velocidades bajas permiten que las especies se peguen no solamente al circuito recirculador del fluido, sino a las paredes del mismo estanque, ocasionando con esto un estancamiento y con el paso de los días, la creación de una zona donde la luz no podrá penetrar de manera eficiente como la hacía en un principio. Funcionando de esta manera como una zona muerta o sumidero, donde las microalgas que ya se encuentran en estado de descomposición, empezaran a tomar a las que aún se encuentran en buen estado.

Por el contrario, una velocidad alta, asegura un número menor de zonas muertas, gracias al movimiento continuo del fluido. Cabe mencionar, que el concepto de velocidad alta, no está estandarizado, más bien obedece a la velocidad optima que se pueda alcanzar en el arreglo de los elementos de cada estanque, así como a la geometría de los mismos. Como bien explica Liffman et al. [15], los elementos espaciales entre cada uno de los elementos, es crucial si se desea un gasto energético mínimo y un rendimiento del reactor aceptable. En tal investigación, se establece que los cocientes entre largo y ancho del canal, deben ser bajos, como el caso, del presente trabajo.

4.6 Concentraciones de biomasa. Escalado 500 mL.

Para la cosecha de la biomasa microalgal, en esta etapa, se utilizó el método de sedimentación por gravedad, en su trabajo Lui et al.[12], menciona que esta separación de materia prima del medio acuoso, presenta bajos costes, ya que no requiere de algún reactivo o equipo especializado. El único menoscabo a considerar, es el tiempo que se necesita para tal recuperación, ya que, para el presente trabajo, tuvieron que transcurrir 12 h para la obtención total de la biomasa.

En fig. 4.8, se puede observar la concentración de biomasa en cada uno de los reactores, considerado las diferencias entre medios de cultivo y velocidades de trabajo, dentro del mismo. Es claro que, las velocidades de recirculación dentro del reactor, indujeron a varianzas significativas en este parámetro, siendo los reactores

con V3, quienes presentaron mejores resultados, tanto en el medio residual como el de control.

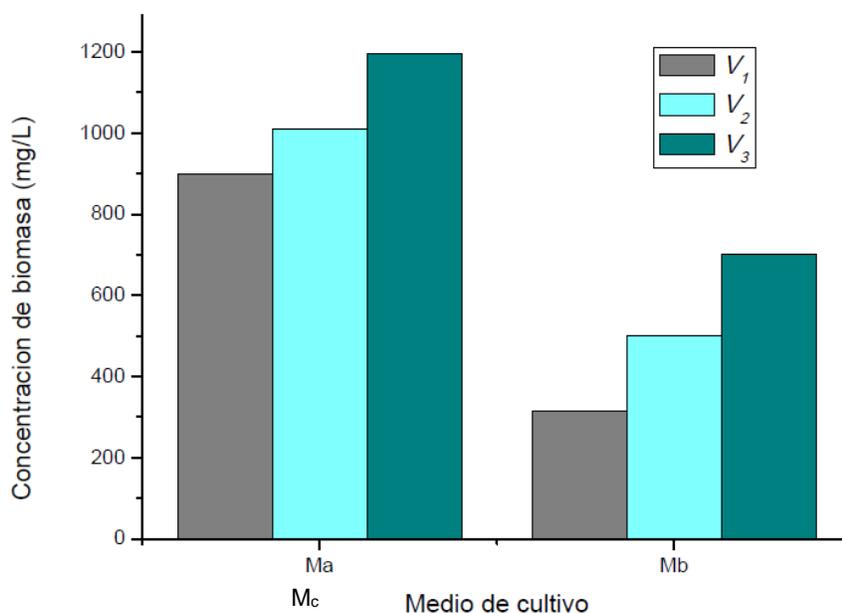


Figura 4-8. Concentraciones biomásicas de *Chlorella vulgaris* en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes velocidades en la recirculación del fluido.

Tales resultados, son similares con los obtenidos por Liang et al. [55], en reactores con cultivos mixotróficos. En dicho trabajo, se reporta que un cultivo con el 1% de glucosa añadida v/v, produjo 1206 ± 20 mg/L, al cabo de 6 días de experimentación; mientras que, para el presente trabajo, el medio M_c obtuvo un rendimiento biomásico de 1195 ± 14.2 mg/L, después de 10 días. Los resultados más detallados del rendimiento en cada uno de los reactores, se registraron en la tabla 4.7.

Tabla 4-7. Rendimiento biomásico máximo (mg/L) de la especie *Chlorella vulgaris*, en los diferentes medios de cultivo, en el segunda etapa a 500 mL.

Medio de cultivo	Cantidad de muestra filtrada (mL)	Rendimiento máximo (mg/L)
M _c ^{V1}	10	*314.28 ± 28.57** ^a
M _c ^{V2}	10	500 ± 35.12 ^b
M _c ^{V3}	10	700 ± 49 ^c
M _b ^{V1}	10	900 ± 63.05 ^d
M _b ^{V2}	10	1010 ± 37.8 ^e
M _b ^{V3}	10	1195 ± 14.2 ^f

*Media de dos repeticiones. ** Los promedios (\pm error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

V1. Reactor con velocidad de 1.5 cm/s

V2. Reactor con velocidad de 3.0 cm/s

V3. Reactor con velocidad de 4.5 cm/s

Los reactores con el medio sintético presentaron diferencias significativas en V_1 contra V_2 y V_3 respectivamente, como se explicó en el parámetro anterior, muchos autores tales como Hartmann et al.[56], mencionan que la mezcla adecuada dentro del medio de cultivo, servirá como aporte de energía importante a la hora de estimar la productividad biomásica total del reactor. Esto debido principalmente, a que el efecto abiótico, impactaría directamente en la disminución de la fotoinhibición, como resultado de menos zonas muertas dentro de las partes mecánicas y fijas de tal dispositivo.

Este mismo comportamiento se presenta en el medio de control, teniendo así, el menor rendimiento el reactor V_1 , con 314.28 ± 28.57 mg/L. Es importante notar que, de acuerdo al análisis hecho, las diferencias significativas se dan, entre este último reactor reportado, V_2 y V_3 respectivamente, teniendo entonces, una distancia de casi 200 mg/L en los tres casos.

4.7 Concentración de lípidos. Escalado a 500 mL.

El mejoramiento en la producción de lípidos para las microalgas, como ya los expertos han mencionado depende directamente de la especie con la que se trabaje, y su adaptabilidad a parámetros bióticos y abióticos de crecimiento, por tanto y como se mencionó con anterioridad un rendimiento lipídico superior al 20% resultaría satisfactorio, según datos recopilados y reportados por Castillo et al. [47], para *Chlorella vulgaris*. Como se aprecia en la fig 4.9, los resultados tanto en el medio de control, como el medio sintético superan dicha cantidad para la presente investigación.

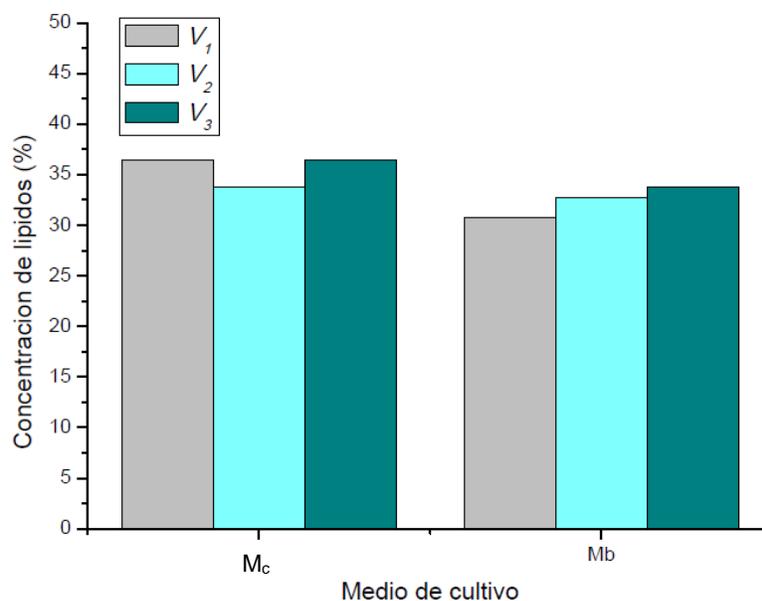


Figura 4-9 Concentraciones lipídicas de *Chlorella vulgaris* en cada uno de los tratamientos expuestos a las diferentes velocidades en la recirculación del fluido.

Aunque el medio sintético es superior en porcentaje lipídico, cabe resaltar que, entre el porcentaje más bajo para Mb y más alto para Mc, solo existe una diferencia de 5.70 %. Es importante recordar que el rendimiento se mide, en función de cuánto lípido contiene la cantidad de biomasa obtenida en cada caso, sin importar en este punto, cuál es el reactor con mayor cantidad de biomasa microalgal. Tales resultados se comparan con los obtenidos por Liang et al. [55], por ser experimentos en donde el parámetro ‘medio de cultivo’, es evaluado. Para tal investigación, se utilizó, como en este caso medios tanto autótrofos como mixotróficos, logrando entonces, rendimientos superiores en ~ 10%.

Tabla 4-8. Rendimiento lipídico máximo (mg/L) de la especie *Chlorella vulgaris*, en los diferentes medios de cultivo, en el segunda etapa a 500 mL.

Medio de cultivo	Cantidad de muestra filtrada (mL)	Rendimiento máximo (mg/L)
M_c^{V1}	30	$328 \pm 13.73^{**a}$
M_c^{V2}	30	340 ± 7.3^b
M_c^{V3}	30	435 ± 9.53^c
M_b^{V1}	30	96.66 ± 7.3^d
M_b^{V2}	30	161 ± 3.3^e
M_b^{V3}	30	234 ± 7.66^f

*Media de dos repeticiones. ** Los promedios (\pm error estándar) dentro de cada columna sin superíndice común difieren significativamente a $P < 0.05$, realizando un análisis de varianza (ANOVA).

V1. Reactor con velocidad de 1.5 cm/s

V2. Reactor con velocidad de 3.0 cm/s

V3. Reactor con velocidad de 4.5 cm/s

De acuerdo al análisis realizado los rendimientos máximos de cada reactor, en términos de mg/L, presentan diferencias significativas en todos los casos, como lo muestra la tabla 4.8. Analizando el caso de V1, en ambos medios, las razón superan las 3 unidades, estos resultados los podemos atribuir a lo mencionado por Fernández et al. [13], cuando menciona que una especie como *Chlorella vulgaris*, puede incrementar su contenido lipídico al triple, cuando crece en un medio sin nitrógeno, como el caso de Mc; luego de 9 días de cultivo. Debido principalmente a una modificación en la ruta metabólica del alga, que la obliga a sintetizar más rápido los ácidos grasos ante el escaso enlace de luz – biomasa.

Capítulo 5. Conclusiones.

La especie puede crecer en medios tanto autótrofos como mixotrofos, siendo estos últimos una elección más viable, si lo que se desea es tener un rendimiento total aceptable. Sin embargo, la elección del medio dependerá del producto final deseado en cada caso. Para este trabajo en particular, se necesitaba que la relación biomasa-lípidos fuera simbiótica, por las implicaciones energéticas del mismo.

Se determinó que un medio con la ausencia de nitrógeno y enriquecimiento de carbono orgánico, presenta mejores concentraciones celulares, rendimiento de biomasa y lípidos, en comparación con un medio de donde se dispongan tanto de macro como de micronutrientes. Así mismo, se estableció que la exposición a diversas densidades lumínicas, repercuten en discrepancias significativas de los parámetros antes mencionados.

Una limitada fuente de luz, produjo valores de concentraciones bajas y una fuente de sobreexposición, solo encareció el coste total del mismo, sin impactar en la modificación de tal parámetro. Por tanto, una fuente de luz ~ 3000 luxes resultó ser la mejor opción para el cultivo.

Por otra parte, se demostró que, en cultivos a escala piloto, en donde se utiliza una fuente de circulación de fluido, la velocidad, como factor abiótico, es determinante para la producción de materia orgánica.

Finalmente, el potencial de la especie no se limitó a fines energético, además se corroboró su capacidad para ser utilizada como tratamiento en la biorremediación de aguas residuales.

Trabajos futuros.

Dado el acotado tiempo para la ejecución del proyecto, los alcances de mismo son limitados, sin embargo, esta investigación y su pertinente uso, deberá enriquecerse con la ejecución de las siguientes actividades.

- Publicar la actual investigación en una revista científica, para la divulgación y retroalimentación de la misma.
- Analizar el rendimiento del biodiesel obtenido a través de los ácidos grasos obtenidos en esta investigación.
- Analizar el potencial bioenergético de otra especie, cuando es sometida a cambios abióticos de crecimiento.
- Estudiar de la pertinencia de los métodos de extracción de lípidos y su impacto en el rendimiento del biodiesel.
- Optimizar elementos geométricos de los biorreactores para conocer el impacto de estos, en la producción de biomasa y concentración de lípidos.

Referencias bibliográficas.

- [1] European Union, «European Commission,» abril 2017. [En línea]. Available: https://ec.europa.eu/commission/index_en.
- [2] Consejo Coordinador Empresarial , «Consejo Coordinador Empresarial,» 2014. [En línea]. Available: <http://www.cce.org.mx/>. [Último acceso: 14 Marzo 2019].
- [3] Gobierno de México, «SENER. Secretaria de Energía,» gob.mx, [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/sener>. [Último acceso: 09 Marzo].
- [4] F.G.Acién, «Photobioreactors for the production of microalgae,» de *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, Woodhead Publishing, 2017, pp. 1-44.
- [5] S. Banerjee y S. Ramaswamy, «Dynamic process model and economic analysis of microalgae cultivation in open raceway ponds,» *Algal Research*, vol. 26, pp. 330-340, 2017.
- [6] D. J. L. S. de K. Yeow, «Producción de hidrógeno a partir de microalgas,» *Biofuels from Algae*, vol. 112, pp. 189-204, 2014.
- [7] S. H. C. S.S.Sawanta, «Energy efficient design of high depth raceway pond using computational fluid dynamics,» *Renewable Energy*, vol. 133, pp. 528-537, 2019.
- [8] H. A. C. U. Ugwu, «Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operation and Applications,» *Biotechnology*, vol. 11, nº 3, pp. 127-132, 2012.
- [9] A. M. G. Céspedes, «Cajamar. Caja rural de la sociedad cooperativa de crédito,» junio 2016. [En línea]. Available: <https://www.cajamar.es/pdf/bd/agroalimentario/innovacion/formacion/actividades-de-transferencia/018-microalgas2-1467367279.pdf>. [Último acceso: abril 2019].
- [10] H. C. S.S.Sawanta, «Computational and experimental studies of high depth algal raceway pond photo-bioreactor,» *Renewable Energy*, vol. 118, pp. 152-159, 2018.
- [11] M. G. M. J. A. VieiraCosta, «An Open Pond System for Microalgal Cultivation,» de *Biofuels from Algae*, Elsevier, 2014, pp. 1-22.

- [12] Z. Sun. ,J. Liu, Z.-G. Zhou, «Algas para biocombustibles.» de *Manual de Producción de Biocombustibles.*, Woodhead, 2016, pp. 673-698.
- [13] J. M.-M. A. M.-O. J. B.-C. L.C. Fernández-Linares, «PRODUCCIÓN DE BIOCMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS,» *Ra Ximhai*, vol. 8, nº 3, pp. 101-115, 2012.
- [14] M. P. D. C. D. Chiaramonti, «Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible,» *Applied Energy*, vol. 102, pp. 101-111, 2013.
- [15] K. Liffman, «Comparing the energy efficiency of different high rate algal raceway pond designs using computational fluid dynamics,» *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 91, nº 2, pp. 221-226, 2013.
- [16] D. Chiaramonti, «Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible,» *Applied Energy*, vol. 102, pp. 101-111, 2013.
- [17] J. Cheng, «Enhanced flashing light effect with up-down chute baffles to improve microalgal growth in a raceway pond,» *Bioresource Technology*, vol. 190, pp. 29-35, 2015.
- [18] S. X. C. Y. X. W. S. W. W. C. Q. Zhang, «Installation of flow deflectors and wing baffles to reduce dead zone and enhance flashing light effect in an open raceway pond,» *Bioresource Technology*, vol. 198, pp. 150-156, 2015.
- [19] J. C. Z. Yang, «Improving microalgal growth with small bubbles in a raceway pond with swing gas aerators,» *Bioresource Technology*, vol. 216, pp. 267-272, 2016.
- [20] J. C. Z. Yang, «Decrease in light/dark cycle of microalgal cells with computational fluid dynamics simulation to improve microalgal growth in a raceway pond,» *Bioresource Technology*, vol. 220, pp. 352-359, 2016.
- [21] M. S. V. W. V. y Rodríguez, «Dinámica de fluidos computacional,» Instituto de ingeniería de la UNAM, Enero - Febrero 2018. [En línea]. Available: <http://www.iingen.unam.mx/es-mx/Publicaciones/GacetaElectronica/Enero-Febrero2018/Paginas/Dinamicadefluidos.aspx>. [Último acceso: 13 abril 2019].
- [22] Q. Z. Y. Li, «Evaluation of power consumption of paddle wheel in an open raceway pond,» *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 37, nº 7, pp. 1325-1336, 2018.

- [23] J. Cheng, «Alternatively permutated conic baffles generate vortex flow field to improve microalgal productivity in a raceway pond,» *Bioresource Technology*, vol. 249, pp. 212-218, 2018.
- [24] «Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas,» Universidad de Almería, junio 2015. [En línea]. Available: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>. [Último acceso: 28 abril 2019].
- [25] Malgas, «Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica,» AST Ingeniería S.L., Cabueñes, Asturias, 2013.
- [26] J. Hoffman, «Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae.,» *Journal of Phycology*, vol. 34, pp. 757-763, 1998.
- [27] L. P. Wackett, «Microbial-based fuels: science and technology,» *Microbial Biotechnology*, pp. 211-225, 2008.
- [28] E. R. Stephens, «Future prospects of microalgal biofuels production systems,» *Trends in plant*, vol. 15, pp. 554-564, 2010.
- [29] M. M. Astocondor, «Scielo.org,» [En línea]. Available: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a23v28n4.pdf>. [Último acceso: 25 Mayo 2019].
- [30] P. A. Ramos, «Raco. CAT,» [En línea]. Available: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/viewFile/312011/402106>. [Último acceso: 05 junio 2019].
- [31] «Biblioteca Plan Ceibal,» [En línea]. Available: https://contenidos.ceibal.edu.uy/fichas_educativas/_pdf/ciencias-naturales/reino-protista/002-chlorella-vulgaris.pdf. [Último acceso: 05 junio 2019].
- [32] «EcuRed,» [En línea]. Available: https://www.ecured.cu/Chlorella_Vulgaris. [Último acceso: 12 julio 2019].
- [33] A. Hernández Pérez y J. Labbé , « Microalgae, culture and benefits,» *Biología Marina y Oceanografía*, vol. 49, nº 2, pp. 157-173, 2014.
- [34] B. MA, «Commercial production of microalgae:,» *Journal of Biotechnology*, vol. 70, pp. 313-332, 1999.

- [35] M. L., «Eliminación de CO₂, con microalgas autóctonas,» Tesis doctoral , Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León , Guanajuato., 2008.
- [36] E. Molina, «Microalgae, mass culture methods.,» Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology, 2010.
- [37] C. Contreras-Flores y C. L. Peña, «Avances en el diseño,» *Biología Marina y Oceanografía*, vol. 49, nº 2, p. 159, 2014.
- [38] B. O. Arredondo Vega y D. Voltolina, NIMIEN TO DE CEPAS DE MICROALGAS Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal, Baja California Sur: CIB, 2015.
- [39] L. Xiang y W. Kaijun, «Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and,» *Bioresource Technology*, vol. 283, pp. 184-190, 2019.
- [40] J. C. Cartagena, «EVALUACIÓN DEL USO DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EN LA REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA PTAR EL SALITRE A NIVEL LABORATORIO,» FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, BOGOTÁ D.C., 2017.
- [41] G. Rodriguez Castillo y C. Amarelo Santos, «Study of morphological and physiological characteristics of *Chlorella protothecoides* oriented to lipid production for biofuel,» *Tecnología en Marcha*, vol. 29, nº 3, pp. 3-11, 2016.
- [42] L. Ochoa García, «Univerdidade Da Caruãa.sl,» Junio 2016. [En línea]. [Último acceso: Marzo 2020].
- [43] L. G. M. E. y. T. S. A. Ruíz Marín, «Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater,» *Bioresource Technology*, pp. 58-64, 2010.
- [44] C. Y., «Biodiesel from microalgae,» *Biotechnology Advances*, 2007.
- [45] Y. A. ., M. A. G. L. M. H. J. V. G. J. R. T. Montero, «Cultivo de microal- gas para la producción de biodiesel,» La Habana, 2012.
- [46] R. Ramos y R. Pizarro, «Growth and bioremediation capacity of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola lalandi*,» *Biología Marina y Oceanografía*, vol. 53, nº 1, pp. 75-86, 2018.

- [47] O. Castillo, S. Torres Badajoz, C. Núñez Colín, V. Peña Caballero, C. Herrera Méndez y J. Rodríguez Núñez, «Biodiesel production from microalgae: progress and biotechnological prospects,» *Hidrobiológica*, vol. 27, nº 3, pp. 337-352, 2017.
- [48] Á. González-Delgado, A. F. Barajas Solano y A. M. Ardila Álvarez, «Biomass and protein production of *Chlorella vulgaris* via the design of selective culture media.,» *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera.*, vol. 18, nº 3, pp. 451-461, 2017.
- [49] A. Rosales Quintero y R. Meza Gordillo, «Efecto del fotoperiodo y privación de nutrientes en la producción de lípidos, clorofila y proteína en la microalga *Chlorella vulgaris*,» Chetumal, Quintana Roo, México., 2018.
- [50] M. Ortiz Moreno, C. Cortés Castillo, J. Sánchez Villarraga y J. Padilla, «Evaluating microalgae *Chlorella sorokiniana* growth in different culture mediums in autotrophic and mixotrophic conditions,» *ORINOQUIA*, vol. 14, pp. 230-240, 2012.
- [51] A. Ardila Álvarez, Y. López Matos, M. Vásquez Cáceres y Á. González Delgado, «Obtaining lipids and carbohydrates from microalgae via design of selective culture media,» *Tecno Lógicas*, vol. 20, nº 38, pp. 83-94, 2017.
- [52] C. C. García Gozalbes, Z. Arbib y J. A. P. Vargas Machuca, «Growth Kinetics and Nutrient Uptake of Microalgae in Urban Wastewaters with Different Treatment Levels.,» *Water Technology and Sciences*, vol. 6, nº 1, pp. 49-68, 2015.
- [53] J. C. Nzayisenga, X. Farge, S. L. Groll y A. Sellstedt, «Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater,» *Biotechnol Biofuels*, vol. 4, pp. 7-16, 2020.
- [54] M. Sacristán de Alva, V. M. Luna Pabello, E. Cadena Martínez y A. F. Alva Martínez , «Biodiesel production from microalgae and a cyanobacteria grown in different qualities of water,» *Agrociencia*, vol. 48, pp. 271- 284, 2014.
- [55] Y. Liang, N. Sarkany y Y. Cui, «Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions,» *Biotechnol* , vol. 31, pp. 1043-1049, 2009.
- [56] P. Hartmann, D. Demory, C. Combe y R. Hamauda, «Growth Rate Estimation of algae in Raceway Ponds: A novel Approach,» *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 47, nº 3, pp. 6216-6221, 2014.

- [57] A. Guldhe, S. Kumari, L. Ramanna, P. Ramsundar, P. Singh, I. Rawat y F. Bux, «Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation,» *Journal of Environmental Management* , nº 203, pp. 299-315, 2017.
- [58] N. Abdel-Raouf, A. A. Al-Homaidan y I. Ibraheem, «Microalgae and Wastewater Treatment,» *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 19, pp. 257-275, 2012.
- [59] T. P. Lam, T.-M. Lee, C.-Y. Chen y J.-S. Chang, «Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds,» *Bioresource Technology*, 2017.
- [60] A. Verma , X. Wei y A. Kusiak, «Predicting the total suspended solids in wastewater: A data-mining approach,» *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, nº 26, pp. 1366-1372, 2013.
- [61] F. Zahra Mennaa, Z. Arbib y J. A. Perales , «Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and algal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability,» *Water research*, nº 83, pp. 42-51, 2015.
- [62] K. E. Dickinson, C. G. Whitney y P. J. McGinn, «Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD,» *Algal Research*, nº 2, pp. 127-134, 2013.
- [63] P. J. McGinn, K. E. Dickinson, K. C. Park, C. G. Whitney, S. P. MacQuarrie, F. J. Black, J.-C. Frigon, S. R. Guiot y S. J. O'Leary, «Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater,» *Algal Research*, nº 1, pp. 155-165, 2012.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla. Composición del fertilizante orgánico foliar Bayfolandd Forte (% en peso/peso)

Nitrógeno Total (N)	11.470
Potasio (K ₂ O)	6.000
Boro (B)	0.036
Cobre (Cu)	0.040
Fierro (Fe)	0.050
Molibdeno (Mo)	0.005
Zinc (Zn)	0.080
Clorhidrato de tiamina	0.004
Fósforo (P ₂ O ₅)	8.000
Azufre (S)	0.230
Calcio (Ca)	0.025
Cobalto (Co)	0.002
Manganeso (Mn)	0.036
Magnesio (Mg)	0.025
Ácido indol acético	0.003