

“2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN
EL CONTENIDO DE PIGMENTOS EN LA MICROALGA
CHLORELLA SSP.”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

Ing. Kevin Ángel González Falfán

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro Alvarado Lassman





"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

FECHA: 08/10/2015
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. KEVIN ANGEL GONZALEZ FALFAN
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTENIDO DE
PIGMENTOS EN LA MICROALGA CHLORELLA SSP."

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

M.C. MA.  ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO
TECNOLÓGICO
DE ORIZABA

ggc





"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

FECHA : 18/09/2015

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

KEVIN ANGEL GONZALEZ FALFAN

la cual lleva el título de:

"EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTENIDO DE PIGMENTOS EN LA MICROALGA CHLORELLA SSP."

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. JUAN MANUEL MENDEZ CONTRERAS

SECRETARIO : DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

VOCAL : M.I. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTU

VOCAL SUP. : M.C. MARIA ELENA GARCIA REYES

FIRMA

FIRMA

FIRMA

FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis



AGRADECIMIENTOS

Dr. Juan Manuel Méndez Contreras se le agradece el haberme permitido ser parte de su grupo de investigación, por su dirección en la realización del proyecto, su contribución académica y por sus observaciones constructivas.

Dr. Alejandro Alvarado Lassman se le agradece su disponibilidad, sus observaciones, sus consejos y sus conocimientos impartidos en clase.

M. I. Q. Norma Vallejo Cantú se le agradece su disponibilidad, sus observaciones, contribuciones y sus conocimientos impartidos en clase.

M. C. María Elena García Reyes se le agradece su disponibilidad, observaciones y aportaciones para la conclusión del trabajo, así como sus conocimientos impartidos en clases.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número de registro 544914 para la conclusión de la maestría.

RECONOCIMIENTOS

A continuación se enlistan las presentaciones en congresos como resultado del desarrollo de la tesis.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- 2014 Cartel** Adaptación y monitores de la microalga *Chlorella* spp. a bajas temperaturas. 1^{er} Encuentro Nacional sobre Biotecnología. 7 al 10 de diciembre. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, Tlaxcala, México.
- 2015 Expositor** Efecto de la luz LED azul, concentración de CO₂ y temperatura en la producción de clorofila *a* en la microalga *Chlorella* spp. 27 al 29 de mayo. Congreso Internacional de Investigación de Academia Journals en Ciencias y Sustentabilidad. Tuxpan, Veracruz, México.
- 2015 Cartel** Evaluación de la concentración de CO₂, temperatura y luz LED azul en la producción de biomasa de la microalga *Chlorella* spp. 3 al 5 de junio. XIV Congreso Internacional y XX Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Puebla, Puebla, México.

RESUMEN

EFEECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CONTENIDO DE PIGMENTOS EN LA MICROALGA *Chlorella* spp.

Elaborada por: Ing. Kevin Ángel González Falfán

Dirigida por: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Co-dirigida por: Dr. Alejandro Alvarado Lassman

En los últimos años ha surgido un gran interés en la investigación de las microalgas debido a su capacidad de remoción de metales pesados, absorción de CO₂, por su valor nutrimental y porque a partir de ellas se pueden obtener una gran variedad de compuestos que tienen un alto valor agregado en el mercado.

El objetivo del trabajo fue encontrar las condiciones ambientales (temperatura, iluminación, % CO₂, medio de cultivo) que permitan obtener el mayor contenido de pigmentos fotosintéticos a partir de la microalga *Chlorella* spp.

Para su cumplimiento se realizaron 4 diseños experimentales en orden cronológico. En el primer diseño experimental (2³) se estudió el rendimiento de la microalga en condiciones extremas de iluminación LED azul y temperatura. El segundo diseño experimental (2²) se realizó con una lámpara fluorescente acortándose los niveles de iluminación y temperatura sin suministrar CO₂. En el tercer diseño experimental (2³) se utilizaron las mejores condiciones del diseño experimental 2² suministrándose CO₂ en distintas concentraciones con una iluminación LED azul. En el cuarto diseño experimental (3 x 2) se comparó el medio de cultivo f/2 y BBM.

Los resultados indicaron un incremento en el contenido de pigmentos conforme avanzaron los diseños experimentales, sin embargo, los resultados fueron aún bajos en la productividad (27.53 mg·L⁻¹·d⁻¹) y contenido de pigmentos (clorofila a

2270.65 $\mu\text{g/mL}$, clorofila *b* 670.45 $\mu\text{g/mL}$ y catorenoides totales 815.2 $\mu\text{g/mL}$) comparados con otros autores.

ABSTRACT

EFFECT OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS IN THE CONTENT OF PIGMENTS IN THE MICROALGAE *Chlorella* spp.

Author: Ing. Kevin Ángel González Falfán

Thesis adviser: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Thesis co-adviser: Dr. Alejandro Alvarado Lassman

In recent years there has been great interest in the investigation of microalgae due to its ability to remove heavy metals, by its CO₂ absorption, by its nutritional value and because they can get a variety of compounds that have a market value added.

To accomplish the goals, 4 experimental designs were made in chronological order. In the first experimental design (2³), the yield of microalgae was studied under extreme conditions of temperature and blue LED lighting. The second experimental design (2²) was performed with a shortened fluorescent lamp light levels and temperature without supplying CO₂. In the third experimental design (2³) the best conditions of the experimental design 2² were applied and different concentrations CO₂ were aerated under blue LED lighting. In the fourth experimental design (3 x 2) the culture medium f / 2 and BBM were compared.

The results of experimental designs indicate an increase in photosynthetic pigment content, however, global results shows lower values of productivity (27.53 mg·L⁻¹·d⁻¹) and pigments totals (chlorophyll *a* 2270.65 µg/mL, chlorophyll *b* 670.45 µg/mL and total carotenoids 815.2 µg/mL) if it compare with other authors

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS.....	XII
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	4
1.1 Problemáticas ambientales en México	4
1.2 Emisiones de CO₂ en México.....	4
1.3 Algas verdes	5
1.3.1 Reproducción	5
1.3.2 Microalgas	6
1.3.3 Biocombustibles a partir de microalgas.....	7
1.4 Microalga <i>Chlorella</i> spp.....	8
1.4.1 Aprovechamiento	10
1.5 Condiciones ambientales en el cultivo de las microalgas	11
1.5.1 Luz.....	11
1.5.1.1 Fotoinhibición	13
1.5.1.2 Fotooxidación	14
1.5.2 Temperatura.....	14
1.5.3 Agitación.....	16
1.5.4 Medición del incremento del oxígeno fotosintético.....	16
1.5.5 Medición de la fijación del carbono fotosintético	17
1.5.6 Efecto de la adición de CO ₂ al medio de cultivo.....	17
1.5.7 pH	19
1.5.8 Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas	20
1.6 Metabolismo microbiano.....	20
1.7 Fotosíntesis	21

1.8 Pigmentos	24
1.8.1 Clorofila	25
1.8.1.1 Síntesis de la clorofila	25
1.8.2 Carotenoides	27
1.8.2.1 Síntesis de carotenoides	28
1.8.2.2 Separación.....	29
1.8.2.3 Propiedades físicas y químicas.....	29
1.8.2.4 Propiedades nutrimentales	30
1.9 Biorreactores en microalgas.....	31
1.9.1 Comparación de sistemas de cultivo	31
1.10 Métodos de cosecha de microalgas	32
1.11 Crecimiento microbiano	35
1.12 Microbiología predictiva	36
1.12.1 Modelamiento matemático.....	36
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
2.1 Adaptación de <i>Chlorella</i> spp.....	43
2.2 Caracterización de la biomasa producida por <i>Chlorella</i> spp.....	43
2.2.1 Determinación de la densidad celular.....	43
2.2.1.1 Relación absorbancia - densidad celular	43
2.2.2 Determinación de biomasa por peso seco	44
2.2.3 Pre-tratamiento de la muestra	44
2.2.4 Determinación del contenido de carbohidratos	44
2.2.5 Determinación de proteínas.....	45
2.2.6 Determinación del contenido de lípidos.....	45
2.2.7 Determinación del contenido de pigmentos	46
2.2.8 Determinación de ficobiliproteínas.....	46
2.3 Limpieza de los fotobiorreactores	46

2.3.1 Esterilización química	46
2.3.2 Esterilización por autoclave	47
2.3.3 Adecuación del área de trabajo	47
2.3.4 Adecuación del cultivo	48
2.3.5 Exploración de la región experimental.....	49
2.4 Diseño experimental 2² con luz fluorescente	50
2.5 Aplicación del diseño experimental 2³	50
2.6 Diseño factorial 3 X 2.....	51
2.7 Adaptación en un fotobiorreactor de columna.....	52
2.8 Determinación de parámetros cinéticos	54
2.8.1 Tasa de crecimiento celular	54
2.8.2 Tasa de crecimiento acumulada.....	54
2.8.3 Determinación del modelo matemático corregido de Gompertz.....	55
2.8.4 Productividad de la biomasa.....	55
2.8.4.1 Tasa de fijación del CO ₂	56
2.9 Control de las variables empleadas en los diseños experimentales.....	56
2.9.1 Temperatura.....	56
2.9.2 Nivel de iluminación	57
2.9.3 Alimentación de CO ₂	57
2.9.4 pH.....	57
2.9.5 Alcalinidad total	57
2.9.6 Determinación de oxígeno disuelto	57
CAPÍTULO 3	54
3.1 Diseño experimental 2³ en condiciones extremas de temperatura e iluminación	59
3.1.1 Densidad celular.....	59
3.1.2 pH.....	62
3.1.3 Alcalinidad	63

3.1.4	Análisis de la variable de respuesta lípidos totales	64
3.1.5	Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	68
3.2	Diseño experimental 2².....	68
3.2.1	Análisis de la variable de respuesta peso seco de la microalga <i>Chlorella</i> spp.	69
3.2.2	pH	71
3.2.3	Productividad.....	72
3.2.4	Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos	72
3.2.4.1	Análisis de la variable de respuesta clorofila <i>a</i>	72
3.2.4.2	Análisis de la variable de respuesta clorofila <i>b</i>	74
3.2.4.3	Análisis de los carotenoides totales.....	75
3.3	Aplicación del diseño experimental 2³	76
3.3.1	Densidad celular.....	76
3.3.2	pH	78
3.3.3	Análisis de la variable de respuesta peso seco de la microalga <i>Chlorella</i> spp.	80
3.3.4	Productividad volumétrica	83
3.3.5	Tasa de fijación del CO ₂	83
3.3.6	Análisis de la variable de respuesta carbohidratos	84
3.3.7	Análisis de la variable de respuesta proteínas	86
3.3.8	Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos	88
3.3.8.1	Análisis de la variable de respuesta clorofila <i>a</i>	88
3.3.8.2	Análisis de la variable de respuesta clorofila <i>b</i>	89
3.3.8.3	Análisis de los carotenoides totales.....	91
3.3.9	Monitoreo del oxígeno disuelto	92
3.4	Diseño factorial 3 x 2	93
3.4.1	Análisis de la variable de respuesta peso seco para la microalga <i>Chlorella</i> spp.	95
3.4.2	Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos	96
3.4.2.1	Análisis de la variable de respuesta clorofila <i>a</i>	96
3.4.2.2	Análisis de la variable de respuesta clorofila <i>b</i>	98
3.4.2.3	Análisis de los carotenoides totales.....	100
3.5	Adaptación en un fotobiorreactor de columna.....	102

3.5.1 Densidad celular.....	102
3.5.2 pH.....	103
3.5.3 Modelo matemático de Gompertz.....	103
3.5.4 Tasa de crecimiento acumulada.....	105
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	106
ANEXO A	112
ANEXO B	115
ANEXO C	137
ANEXO D	147
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Producción energética a partir de la biomasa microalgal utilizando diferentes procesos de transformación (Adaptado de Wang et al., 2008)	8
Figura 1.2 Ilustración de la trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad (Contreras-Flores et al., (2003) modificado por Benavente-Valdés et al., 2012).....	11
Figura 1.3 Evolución de la tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa para distintas temperaturas (Abalde et al., (1995), citados en Plasencia, 2012).....	15
Figura 1.4 Dependencia del pH de las especies químicas del sistema carbonato (Cortijo, 2013)	19
Figura 1.5 Clasificación nutricional de los organismos en función de su fuente de energía y fuente de carbono (Adaptado de Tórtora et al., 2007)	21
Figura 1.6 Representación sintetizada del proceso fotosintético (Campbell y Reece, 2007).....	24
Figura 1.7 Componentes principales de la ruta metabólica en la síntesis de la clorofila (Plant and Soil Sciences eLibraryPRO, 2015)	26
Figura 1.8 Estructura de la clorofila (Richmond, 2004).....	27
Figura 1.9 Síntesis de carotenoides C ₄₀ : fiteno, licopeno y β-caroteno (Berg et al., 2008).....	29
Figura 1.10 Propiedades nutricionales de los carotenoides (Adaptada de Primo-Yúfera, 2007)	30
Figura 1.11 Curva representativa de crecimiento de un cultivo de microalgas en un volumen limitado (Romo, 2001).....	36
Figura 1.12 Comparación del ajuste de modelos primarios a los recuentos de bacterias lácticas totales (Cayré et al., 2007)	38

Figura 1.13 Gráfica de la raíz cuadrada de la velocidad relativa de deterioro del bacalao, camarón y lisa, superenfriados (FAO, 2015)	39
Figura 1.14 Captura de pantalla del programa PMP en línea (USDA, 2015)	40
Figura 2.1 Metodología	42
Figura 2.2 Floculación de la microalga	45
Figura 2.3 Montaje final de los fotobiorreactores	48
Figura 2.4 Modificaciones al fotobiorreactor tubular	53
Figura 3.1 Densidad celular promedio a 300 lux	60
Figura 3.2 Densidad celular promedio a 1000 lux	60
Figura 3.3 Comportamiento promedio del pH a 300 lux	62
Figura 3.4 Comportamiento promedio del pH a 1000 lux	63
Figura 3.5 Comportamiento promedio de la alcalinidad total a 300 lux.....	63
Figura 3.6 Comportamiento promedio de la alcalinidad a 1000 lux	64
Figura 3.7 Gráfico de interacciones para la variable de respuesta	66
Figura 3.8 Gráfica de efectos principales para lípidos	66
Figura 3.9 Pigmentos fotosintéticos promedio en condiciones extremas.....	68
Figura 3.10 Densidad celular promedio en el diseño experimental 2 ²	69
Figura 3.11 Gráfica de interacción	70
Figura 3.12 Gráfica de efectos principales	70
Figura 3.13 Monitoreo del pH para los fotobiorreactores (valores promedio)	71
Figura 3.14 Gráfico de efectos principales para la clorofila <i>a</i>	73
Figura 3.15 Gráfica de efectos principales para la clorofila <i>b</i>	74
Figura 3.16 Gráfico de efectos principales para la variable de respuesta carotenoides totales	75
Figura 3.17 Valores promedio para el contenido de pigmentos fotosintéticos	76
Figura 3.18 Densidad celular promedio a 1000 lux en el diseño 2 ³	77
Figura 3.19 Densidad celular promedio a 4000 lux en el diseño 2 ³	77
Figura 3.20 Efecto de las distintas longitudes de onda sobre la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (Kim et al., 2014).....	78
Figura 3.21 Valores de pH promedio a 1000 lux	79

Figura 3.22 Valores de pH promedio a 4000 lux	79
Figura 3.23 Gráfica de interacciones para la variable de respuesta peso seco	81
Figura 3.24 Gráfico de efectos principales para la variable peso seco	82
Figura 3.25 Gráfica de interacciones para la variable de respuesta carbohidratos	85
Figura 3.26 Gráfica de efectos principales para la variable de respuesta carbohidratos	86
Figura 3.27 Gráfica de interacción para la variable de respuesta proteínas	87
Figura 3.28 Gráfica de efectos principales para la variable de respuesta proteínas ..	88
Figura 3.29 Gráfica de efectos principales para la variable clorofila a	89
Figura 3.30 Gráfica de efectos principales	90
Figura 3.31 Gráfica de efectos principales	91
Figura 3.32 Oxígeno disuelto	92
Figura 3.33 Densidad celular promedio	94
Figura 3.34 pH promedio	94
Figura 3.35 Gráfico de interacción para peso seco	95
Figura 3.36 Gráfica de efectos principales	96
Figura 3.37 Gráfica de interacciones	97
Figura 3.38 Gráfica de efectos principales	98
Figura 3.39 Gráfica de interacción	99
Figura 3.40 Gráfica de efectos principales	99
Figura 3.41 Gráfica de interacciones	100
Figura 3.42 Gráfica de efectos principales	101
Figura 3.43 Densidad celular en el fotobiorreactor de columna	102
Figura 3.44 pH en el fotobiorreactor de columna	103
Figura 3.45 Modelo de Gompertz	103
Figura 3.46 Concentración celular y suma progresiva de duplicaciones	105

ANEXO A

Figura AA. 1 Curva de calibración para la microalga <i>Chlorella</i> spp.	112
Figura AA. 2 Curva de calibración para la cianobacteria <i>Arthrospira maxima</i>	112
Figura AA. 3 Curva de calibración para carbohidratos (Método fenol-sulfúrico)	113
Figura AA. 4 Curva de calibración para proteínas (Método de Lowry)	113

ANEXO C

Figura AC. 1 Concentración celular	138
Figura AC. 2 Concentración celular	139
Figura AC. 3 Gráfica de interacción	141
Figura AC. 4 Gráfica de efectos principales	141
Figura AC. 5 a) Gráfico de interacción b) Gráfica de efectos principales	143
Figura AC. 6 Gráfica de interacción	144
Figura AC. 7 Gráfica de efectos principales	144

ANEXO D

Figura AD. 1 Gráfica de interacciones	149
Figura AD. 2 Gráfica de efectos principales	149
Figura AD. 3 Efectos de la concentración del floculante	150

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación científica del género <i>Chlorella</i> (Sistema de información de biodiversidad, 2014)	8
Tabla 1.2 Características de la microalga <i>Chlorella</i> spp. (Adaptado de Arrúe-Zúñiga, 2013 y Alvear-Alayón et al., 2011)	9
Tabla 1.3 Fuentes y aplicaciones de los carotenoides (Adaptada de Primo-Yúfera, 2007)	28
Tabla 1.4 Ventajas y limitaciones entre diferentes fotobiorreactores (adaptada de Dragone et al., 2010)	31
Tabla 1.5 Principales métodos utilizados para la cosecha de las microalgas (Adaptada de Peralta-Ruiz, 2012 y Valladares-Peñaherrera, 2014)	33
Tabla 1.6 Comparación de métodos de cosecha de microalgas (Peralta-Ruiz, 2012)	35
Tabla 1.7 Clasificación de algunos modelos utilizados (Gutiérrez-Barberena, 2011)	37
Tabla 2.1 Descripción de los fotobiorreactores utilizados	47
Tabla 2.2 Factores y niveles del diseño factorial 2^3	49
Tabla 2.4 Valores codificados	49
Tabla 2.4 Condiciones de operación en el diseño 2^2	50
Tabla 2.5 Valores codificados	50
Tabla 2.6 Nuevas condiciones de operación de los fotobiorreactores en el diseño 2^3	51
Tabla 2.7 Condiciones de operación en el diseño 3×2	51
Tabla 2.8 Condiciones de operación del fotobiorreactor de columna	52
Tabla 2.9 Descripción del fotobiorreactor operado (Modificado de Domínguez, 2014)	52
Tabla 3.1 Transformación de Box-Cox	65
Tabla 3.2 Análisis de varianza para lípidos con la variable transformada	65
Tabla 3.3 Análisis de Varianza para la variable de respuesta peso seco	69

Tabla 3.4 Productividad obtenida	72
Tabla 3.5 Análisis de varianza para la variable de respuesta clorofila <i>a</i>	73
Tabla 3.6 Análisis de varianza para la clorofila <i>b</i>	74
Tabla 3.7 Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales	75
Tabla 3.8 Análisis de varianza para la variable de respuesta peso seco	81
Tabla 3.9 Productividad de los fotobiorreactores.....	83
Tabla 3.10 Tasa de fijación del CO ₂	84
Tabla 3.11 Análisis de varianza para la variable de respuesta carbohidratos.....	84
Tabla 3.12 Transformación de Box-Cox	86
Tabla 3.13 Análisis de varianza para la respuesta proteínas transformada.....	86
Tabla 3.14 Transformación de Box-Cox	88
Tabla 3.15 Análisis de varianza para la respuesta clorofila <i>a</i> transformada	88
Tabla 3.16 Transformación de Box-Cox	90
Tabla 3.17 Análisis de varianza para la respuesta clorofila <i>b</i> transformada	90
Tabla 3.18 Transformación de Box-Cox	91
Tabla 3.19 Análisis de varianza para la respuesta carotenoides totales transformada	91
Tabla 3.20 Transformación de Box-Cox	95
Tabla 3.21 Análisis de varianza para la variable de respuesta transformada peso seco	95
Tabla 3.22 Transformación de Box-Cox	96
Tabla 3.23 Análisis de varianza para la respuesta transformada clorofila <i>a</i>	97
Tabla 3.24 Transformación de Box-Cox	98
Tabla 3.25 Análisis de varianza para la respuesta transformada clorofila <i>b</i>	98
Tabla 3.26 Transformación de Box-Cox	100
Tabla 3.27 Análisis de varianza para la variable de respuesta transformada carotenoides totales	100
Tabla 3.28 Parámetros del modelo de corregido de Gompertz	104
Tabla 3.29 Parámetros derivados del modelo de Gompertz.....	104

ANEXO B

Tabla AB. 1 Densidad celular promedio	115
Tabla AB. 2 Alcalinidad promedio	117
Tabla AB. 3 pH promedio	119
Tabla AB. 4 Lípidos promedio	121
Tabla AB. 5 Pigmentos fotosintéticos promedio	121
Tabla AB. 6 Concentración celular promedio	123
Tabla AB. 7 pH promedio	124
Tabla AB. 8 Peso seco.....	124
Tabla AB. 9 Pigmentos fotosintéticos promedio	125
Tabla AB. 10 Concentración celular promedio	125
Tabla AB. 11 pH promedio	127
Tabla AB. 12 Peso seco promedio	128
Tabla AB. 13 Carbohidratos promedio	129
Tabla AB. 14 Proteínas promedio	129
Tabla AB. 15 Pigmentos fotosintéticos promedio	130
Tabla AB. 16 Concentración celular promedio	131
Tabla AB. 17 pH promedio	133
Tabla AB. 18 Peso seco promedio	133
Tabla AB. 19 Pigmentos fotosintéticos promedio	134
Tabla AB. 20 Concentración celular promedio	134
Tabla AB. 21 Peso seco promedio	135
Tabla AB. 22 pH promedio	135

ANEXO C

Tabla AC. 1 Información de la cianobacteria	137
Tabla AC. 2 Condiciones de cultivo para <i>Arthrospira maxima</i> (Adaptado de Ahsan et al., 2008 y Usharani et al, 2012)	137
Tabla AC. 3 Condiciones de operación utilizadas en el diseño 2^2 para <i>Arthrospira maxima</i>	138
Tabla AC. 4 Transformación de Box-Cox	140
Tabla AC. 5 Análisis de varianza para la respuesta transformada peso seco	140
Tabla AC. 6 Análisis de varianza para la respuesta clorofila <i>a</i>	142
Tabla AC. 7 Análisis de varianza para la respuesta carotenoides totales	143
Tabla AC. 8 Contenido de ficocianina en el tratamiento 4	145

ANEXO D

Tabla AD. 1 Parámetros medidos al inicio	147
Tabla AD. 2 Valores utilizados en el diseño experimental 2^2	147
Tabla AD. 3 Resultados obtenidos de la prueba de jarras para la floculación de la microalga	148
Tabla AD. 4 Análisis de varianza para la variable de respuesta eficiencia de floculación	148

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire es un problema global que requiere de medidas para contrarrestarlo, recientemente se han observado variaciones en el clima que representan graves daños a las comunidades. La alteración en zonas de vegetación, derretimiento de glaciares, aumento en el nivel del mar, cambios en las precipitaciones, aumento de la temperatura, etc. se manifiestan como consecuencia de un incremento en la atmósfera de los gases de efecto invernadero.

Los gases de efecto invernadero a lo largo del tiempo han sido emitidos de forma natural por volcanes en erupción, por reacciones microbianas, etc. sin embargo, actividades provocadas por el hombre como son la quema de combustibles fósiles, la quema de biomasa, la deforestación, etc. emiten cantidades que se suman aumentando el efecto del cambio climático. Desde el inicio de la revolución industrial el uso de combustibles fósiles ha ido en aumento, por lo que es necesario tomar medidas que reduzcan el problema. En 2011 México contribuyó con alrededor del 1.4 % (432.3 millones de toneladas) de emisiones de CO₂ por consumo de combustibles fósiles (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2015).

Una de las alternativas para la captura del CO₂ es el uso de microalgas, las cuales toman el CO₂ de la atmósfera para realizar el proceso de fotosíntesis para su crecimiento. Esta propiedad de las algas puede utilizarse para capturar el CO₂ presente en los gases procedentes de la combustión en una planta de generación eléctrica o una planta industrial (Muñoz et al., 2011).

En este trabajo de investigación se eligió a la microalga *Chlorella* spp. debido a que puede soportar unas grandes condiciones de estrés ambiental. Además, se puede obtener de la biomasa un gran contenido de proteínas, lípidos, pigmentos fotosintéticos, etc.

El propósito del trabajo se enfocó en evaluar el efecto de las variables ambientales (temperatura, iluminación, consumo de CO₂ y nutrientes - vitaminas) en el contenido de pigmentos fotosintéticos en la microalga *Chlorella* spp.

Para un cumplimiento específico de los objetivos se realizó el mantenimiento del cultivo con la finalidad de tenerlo listo para inocular, así mismo se procedió a la realización de una serie de diseños experimentales que permitieran evaluar los factores, las posibles interacciones entre ellos y su influencia en la variable de respuesta. Siempre tratando de buscar una mejora en el contenido de pigmentos fotosintéticos con la realización de cada ensayo. Así mismo se determinó el contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas para conocer la variación de los parámetros a la par de la mejora del contenido de pigmentos.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Problemáticas ambientales en México

Durante gran parte del siglo pasado, México fue uno de los países con mayores tasas de deforestación y a inicios de este siglo cerca del 50 % del territorio mostraba signos de degradación en sus suelos; las principales ciudades y zonas urbanas tenían problemas con la calidad del aire y del agua y ahora está dentro de los 15 países con mayores emisiones de gases de efecto invernadero causantes del cambio climático (SEMARNAT, 2014).

1.2 Emisiones de CO₂ en México

De acuerdo con las emisiones por PIB, México está a gran distancia de los principales emisores a pesar de que la intensidad de carbono se redujo de finales de los ochenta de 0.53 a 0.45 kg de CO₂ por dólar en 2011, en ese año el país ocupó el lugar 27 dentro de los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y el lugar 61 a nivel mundial. Según el Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero, la emisión total en 2010 fue cercana a 748 millones de toneladas de CO₂ equivalente, 33.4 % mayor que en 1990. Esta cifra, equivalente al 1.4 % de la emisión total global, colocó a México entre los primeros quince países por su volumen de emisión (SEMARNAT, 2014).

Las alternativas para la mitigación de los efectos del incremento del CO₂ de acuerdo con Muñoz et al., (2011), se dividen en adsorción, separación de gases mediante membranas, absorción, separación criogénica, carbonatación mineral y la captura del CO₂ mediante algas. El cultivo de algas se desarrolla en un fotobiorreactor que, a partir de aguas naturales o residuales y del CO₂ presente en los gases combustión, produce algas microscópicas. Tras un proceso de decantación y secado, se puedan utilizar como biocombustible en sustitución de combustibles fósiles.

1.3 Algas verdes

A los miembros del fílum *Chlorophyta* se le llama algas verdes y la mayoría vive en agua dulce, otras viven en agua salada, en la nieve, en la tierra y en los árboles. Las algas verdes se clasifican de acuerdo a los pigmentos que contienen, la forma en que almacenan su alimento, las sustancias químicas en sus paredes y la presencia o ausencia de estructuras especializadas para el movimiento. Los pigmentos y las sustancias químicas en las paredes celulares son muy parecidos a los de las plantas vasculares; además, generalmente almacenan su alimento en forma de almidón (Bahret et al., 1992).

1.3.1 Reproducción

La reproducción de las algas verdes puede ocurrir de varias maneras. Algunas como la *Chlorella* solo se reproducen asexualmente. En la reproducción asexual, cualquier célula puede sufrir una reproducción, menos la célula basal. La célula se divide varias veces para formar de cuatro a ocho células llamadas zoosporas. Cada una de ellas tiene cuatro flagelos. La pared de la célula vegetal original se rompe y se liberan zoosporas las cuales nadan durante algún tiempo. Después cada una de ellas se asienta y se pega a un objeto. La zoospora pierde sus flagelos, se divide y se desarrolla.

En la reproducción sexual los dos gametos son iguales y móviles, la unión de dos gametos resulta en la formación de un cigoto. El cigoto no tiene flagelos y desarrolla una pared gruesa y dura que lo protege durante una etapa latente de varios meses. Cuando termina el periodo latente, el cigoto diploide pasa por una división meiótica, lo que resulta en la formación de cuatro células flageladas monoploides llamadas meioesporas (Bahret et al., 1992)

1.3.2 Microalgas

Son organismos microscópicos fotosintéticos eucariotas que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica, capaces de producir oxígeno a partir de la radiación solar. Esta actividad la llevan a cabo gracias a la presencia de unas estructuras especiales denominadas cloroplastos, en los cuales se encuentran diversos pigmentos capaces de “atrapar” la luz solar (López-Adrián y Barrientos-Medina, 2005). Tienen una alta capacidad para fijar el CO₂ y aprovechar la energía solar para producir biomasa. Así como son ubicuas, son el primer eslabón en la cadena trófica (Chisti, 2007).

De acuerdo con Graham y Wilcox, (2000) dentro de las microalgas se incluyen organismos que presentan una estructura celular procariota, representadas por la división *Cyanophyta* (cianobacterias) y *Prochlorophyta*. Así mismo, las microalgas que presentan una estructura celular eucariota, representan la división *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Prymnesiophyta*. Las microalgas procariotas carecen de organelos limitados por una membrana y tienen ribosomas más pequeños, mientras que las microalgas eucariotas se definen por la presencia de una doble membrana en el núcleo y organelos como los cloroplastos. Algunas microalgas no son móviles, mientras que otras presentan movimiento por medio de flagelos o flujos de mucilago a través de poros en la pared, con los cuales pueden realizar migraciones verticales en los cuerpos de agua. Una colonia es un conjunto de células de diferentes generaciones, comunicadas entre sí, cuyo número y disposición de células permanece constante a través de la vida del individuo. Un cenobio es un conjunto de células hermanas flageladas o no móviles, cuyo número de células no permanece constante, y las cuales no están comunicadas entre sí.

Abalde et al., (1995) mencionan que las microalgas son similares fisiológicamente y tienen un metabolismo análogo al de las plantas a pesar de las diferencias estructurales y morfológicas entre los representantes de cada división.

Raven et al., (2001) indican que las microalgas evolucionaron a partir de las microalgas verdes o *Chlorophyceae*. Además de que muchas de las sustancias sintetizadas y acumuladas se encuentran también en las plantas.

Cohen, (1986) y Richmond, (1990) justifican la producción de microalgas debido a que muchas especies tienen una velocidad de crecimiento mayor a la de las plantas, lo que a su vez aumenta el rendimiento de biomasa. La manipulación de las condiciones ambientales de muchas especies de microalgas hace que cambien su composición bioquímica induciendo la síntesis, acumulación y concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos, etc. Además, debido a que son unicelulares se asegura que presenten una biomasa con una composición bioquímica homogénea.

Debido a que las cianobacterias carecen de pared celular por su naturaleza procariota, tienen una alta digestibilidad ya que no contienen celulosa, por lo que pueden ser utilizadas para consumo humano como lo es la Spirulina (Borowitzka, 1988).

1.3.3 Biocombustibles a partir de microalgas

De acuerdo con Wang et al., (2008) las microalgas pueden fijar el CO₂ de diferentes fuentes, las cuales pueden ser clasificadas como: CO₂ atmosférico, CO₂ de los gases de combustión de las industrias y CO₂ en forma de carbonatos solubles (NaHCO₃ y Na₂CO₃). Existen varias rutas (Figura 1.1) para convertir la biomasa microalgal a biocombustibles, las cuales pueden ser clasificadas por su conversión bioquímica, reacción química, combustión directa y conversión termoquímica.

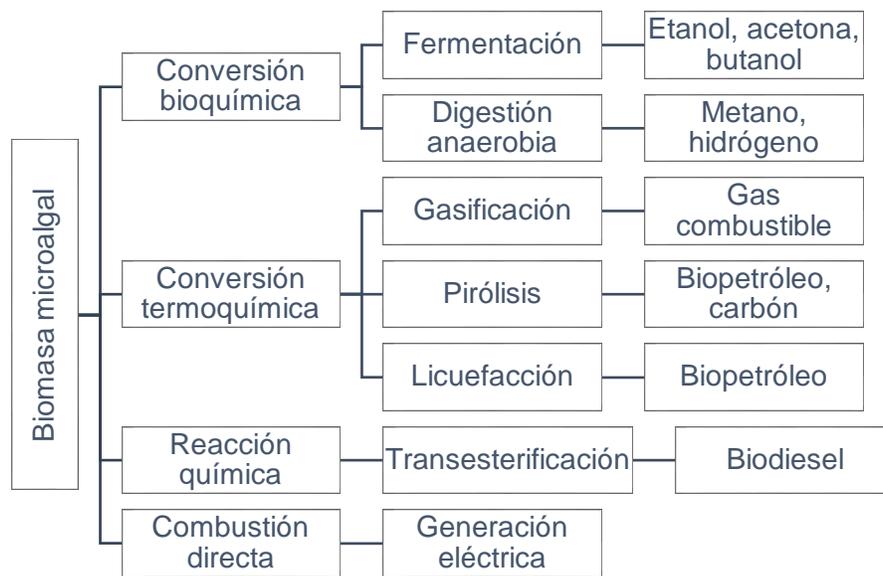


Figura 1.1 Producción energética a partir de la biomasa microalgal utilizando diferentes procesos de transformación (Adaptado de Wang et al., 2008)

1.4 Microalga *Chlorella* spp.

De acuerdo con Kanno y Kazie, (2005) *Chlorella* fue descubierta y nombrada por el Holandés M.W. Beyerinck en 1890. Su nombre proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y del latín *ella*, que significa cosa pequeña.

Tabla 1.1 Clasificación científica del género *Chlorella* (Sistema de información de biodiversidad, 2014)

Reino:	<i>Plantae (Primoplantae)</i>
División:	<i>Chlorophyta</i>
Clase:	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden:	<i>Chlorellales</i>
Familia:	<i>Chlorellaceae</i>
Género:	<i>Chlorella</i>

Es un alga verde de forma elipsoidal que no presenta movimiento, la cual crece en forma unicelular. Se encuentra en forma aislada o formando colonias flojas, con forma

irregular. En ese caso, las células que componen la colonia tienen el mismo tamaño y mantienen su forma esférica. El cloroplasto es parietal, o sea, se halla yuxtapuesto internamente a la membrana celular y tiene la forma de una taza. Las nuevas células de *Chlorella* se forman por división interna de la célula madre en 4 u 8 células hijas, que después se libertan (UANL, 1973).

Chlorella pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase de las *Trebouxiophyceae* (Tabla 1.1) (Infante et al., 2012). La microalga *Chlorella* apareció en la Tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 mil millones de años y fue una de las primeras formas vegetales con un núcleo bien definido, según muestran fósiles datados del período precámbrico (Camacho-Quezada et al., 2015).

De acuerdo con Kanno y Kazie, (2005) la microalga se divide en cuatro células cada veinte horas, por lo que se multiplica rápidamente. Mide cerca de 2 a 10 micras de diámetro, habita en pantanos y lagos en todo el mundo. Tiene una alta concentración de clorofila, variando entre los géneros, lo que permite una mayor transformación energética por medio de la fotosíntesis, la concentración de este pigmento puede incluso superar al contenido en las plantas. En la Tabla 1.2 se muestran algunas características más importantes de la microalga.

Tabla 1.2 Características de la microalga *Chlorella* spp. (Adaptado de Arrúe-Zúñiga, 2013 y Alvear-Alayón et al., 2011)

<i>Chlorella</i> spp.	
Temperatura máxima tolerable (°C)	40 °C
Concentración máxima de CO ₂ tolerada (v/v)	40 %
Productividad volumétrica de biomasa (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	25–250
pH	7-9
Tiempo de duplicación (d)	2.34

La distribución de *Chlorella* es mundial, preferentemente en hábitats acuosos. Es un alga verde unicelular perteneciente a la familia de *Chlorophyceae*. *Chlorella* sp. se clasifica en cuatro tipos: a) esférica con una relación entre los ejes igual a uno, b)

elipsoidal, relación del eje mayor al eje menor es de 1.45 a 1.60, c) esférica o elipsoidal y d) globular para las células sub-esféricas. La célula madura se divide generalmente produciendo cuatro u ocho (y más raramente autosporas, las cuales se liberan por ruptura o disolución de las paredes parenterales (Europa et al., 2012).

Este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales (Sánchez et al., 2008).

Chlorella crece en condiciones autotrófica, heterotróficas y mixotróficas. Cabe mencionar que aparte de los cultivos en condiciones autotróficas, los cultivos heterotróficos son también cultivados. *Chlorella* es la especie más importante en la industria de las microalgas, es cultivada y vendida esencialmente como suplemento alimenticio (Richmond, 2004).

1.4.1 Aprovechamiento

Estudios nutricionales donde se utilizan cultivos de *Chlorella* spp. como suplemento alimenticio, demuestran que estas algas pueden sustituir fuentes alimenticias comunes, aunque su contenido vitamínico depende del genotipo, estudio del ciclo de crecimiento, estado nutricional, intensidad de la luz y otros factores que afectan el desarrollo y metabolismo de las cepas (Quintana-Cabrales et al., 1999).

Los cultivos de microalga *Chlorella* sp. contienen carotenoides, diversas vitaminas, como tiamina, riboflamina, piridoxina, cobalamina, biotina, ácido pantoténico y ácido nicotínico (Quintana-Cabrales et al., 1999). *Chlorella* tiene un alto contenido de aceite, aproximadamente el 50 %, además de una generación de biomasa rápida, lo que la convierte en un candidato idóneo para la obtención de un biocombustible y al mismo tiempo disminuye el impacto al medio ambiente (Shen-Yi et al., 2011).

1.5 Condiciones ambientales en el cultivo de las microalgas

1.5.1 Luz

Para el cultivo de microorganismos fototróficos, la luz es un requerimiento esencial. El suministro de una luz adecuada, al mismo tiempo que se controla la temperatura, no es una tarea sencilla. Exponiendo los cultivos a la luz del día puede obtenerse una iluminación relativamente incontrolada y discontinua. Debe evitarse la exposición directa a la luz del sol, porque la intensidad puede ser demasiado elevada y la temperatura puede subir hasta un punto en donde el crecimiento se detiene. Muchos microorganismos fototróficos pueden tolerar una iluminación continua y su desarrollo es mucho más rápido bajo estas condiciones, por lo que las fuentes de luz artificial son más ventajosas (Stanier et al., 1992).

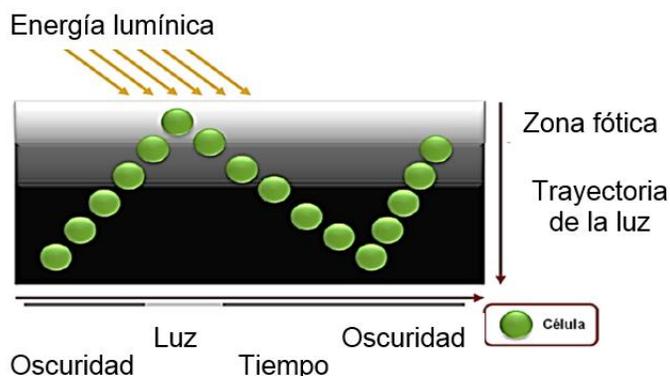


Figura 1.2 Ilustración de la trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad (Contreras-Flores et al., (2003) modificado por Benavente-Valdés et al., 2012)

Lu y Vonshak, (1999) mencionan que las células más próximas a la superficie iluminada no permiten la penetración de la luz hacia el interior del medio de cultivo, produciendo un efecto de sombreado sobre las células alejadas de la superficie en todos los sistemas de cultivo (Figura 1.2). Se ha calculado que la luz penetra solo de 1 a 2 mm más allá de la superficie en algunos tipos de cultivos, por lo que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10-30 %) del volumen total del cultivo.

Según Richmond, (2004) la proporción óptima entre la zona iluminada de un reactor y la zona oscura es 15:85. Es decir, un 15 % del reactor correspondería a zona fótica mientras que un 85 % de las algas estarían en la oscuridad en cada momento. El problema del control de la luz como factor de gran influencia en el crecimiento de las algas es la imposibilidad de definirlo mediante un único parámetro, ya que entran en juego intensidades, frecuencia de cambio luz-oscuridad, proporción de duración de los ciclos, hidrodinámica, configuración del reactor o estanque, etc.

La energía necesaria para la fotosíntesis es entregada en forma de luz. La luz es una forma de radiación electromagnética y viaja a una velocidad de $c \sim 3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. La radiación luminosa es aquella que está comprendida entre 380 y 750 nm. Dentro de esta se engloba la radiación que tiene influencia en la fotosíntesis o Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR por sus siglas en inglés).

De acuerdo a la teoría del cuanto, la energía luminosa es entregada en forma de paquetes llamados fotones o cuantos de luz. Estos fotones presentan distintos niveles de energía en función de su frecuencia. La energía (E) asociada a un fotón se determina como el producto de su frecuencia (ν) y de la constante de Planck (1.1) ($h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$).

$$E = h\nu \quad (1.1)$$

La frecuencia y la longitud de onda (λ) están relacionadas por medio de la velocidad de la luz $c = \lambda\nu$, por lo que la expresión se amplía a (1.2):

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1.2)$$

Puesto que la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, un fotón de luz azul (aproximadamente 400 nm) es mayormente energético que uno de luz roja (alrededor de 700 nm). De acuerdo con la Ley de Einstein, una molécula de un compuesto debe absorber la energía de N fotones (N es el número de Avogadro

6.023×10^{23}) para iniciar una reacción. Esta unidad es llamada Einstein ($E = 6.023 \times 10^{23}$ fotones).

El flujo de luz es medido en lumens (lm); la intensidad de la iluminación se expresa en lux ($\text{l}\cdot\text{m}^{-2}$). Los fotobiólogos prefieren medir la irradiancia, que es la magnitud utilizada para describir la potencia incidente por unidad de superficie de todo tipo de radiación electromagnética ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ o $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Dado que las reacciones fotoquímicas en la fotosíntesis dependen del número de fotones incidentes sobre una superficie, es lógico expresar la irradiancia como el número de cuantos (fotones) que llega a la superficie por unidad de tiempo. La intensidad de energía así como la densidad de flujo de fotones fotosintéticos es medida en $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o $\mu\text{mol E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Teniendo en cuenta lo anterior, si se realizan cálculos por diferentes personas, se podría llegar a valores distintos, pero en términos generales algunas equivalencias y sus conversiones son las expresadas en (1.3) (Hanna Instruments, 2008).

$$1 \text{ lux} = 1 \frac{\text{lumen}}{\text{m}^2} = 0.8884 \frac{\text{MJ}}{(\text{m}^2 \cdot \text{h})} = 54 \frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} = 11.81 \frac{\text{W}}{\text{m}^2} \quad (1.3)$$

Martín-Ramos et al., 2010 muestran en su investigación los efectos de las distintas longitudes de onda sobre vegetales, como pueden ser la intensificación de la fotosíntesis, desencadenamiento de fenómenos fotomorfogénicos (activación de fitocromos, alargamiento de entrenudos, etc.) y la provocación de reacciones fotoperiódicas (inducción de la floración en función del fotoperiodo)

1.5.1.1 Fotoinhibición

En una recopilación de información realizada por Hernández-Pérez y Labbe, (2014) recapitulan que la fotoinhibición es la reducción del rendimiento cuántico de los

fotosistemas por disipación del exceso de luz por los sistemas de fotoprotección de las plantas, usualmente es reversible. 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).

1.5.1.2 Fotooxidación

Tadeo y Gómez-Cadenas, (2008) señalan que la fotooxidación o fotodestrucción ocurre cuando los pigmentos fotosintéticos se destruyen por la alta radiación, especialmente por la pérdida de funcionalidad de las proteínas LHCII (proteínas del complejo captador de luz del fotosistema II, que también son conocidas como proteínas antena clorofila *a/b*) que propicia la liberación de las clorofilas, ligadas a estas proteínas, y su destrucción por las clorofilasas (Enzimas que catalizan la hidrólisis de las clorofilas a fitol y clorofilida). En consecuencia, los tejidos verdes disminuyen su concentración de clorofila presentándose una decoloración amarillenta a blanquesina.

1.5.2 Temperatura

La temperatura óptima del cultivo depende de la microalga que se emplee y de sus características, pero el valor óptimo puede variar en función de los demás parámetros. Así, la temperatura óptima en condiciones naturales generalmente no coincide con la temperatura óptima en condiciones de cultivo porque los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en su ambiente natural (Plasencia, 2012).

De acuerdo con Abalde et al., (1995) existe un nivel de iluminación óptimo para cada temperatura de cultivo como se muestra en la Figura 1.3.

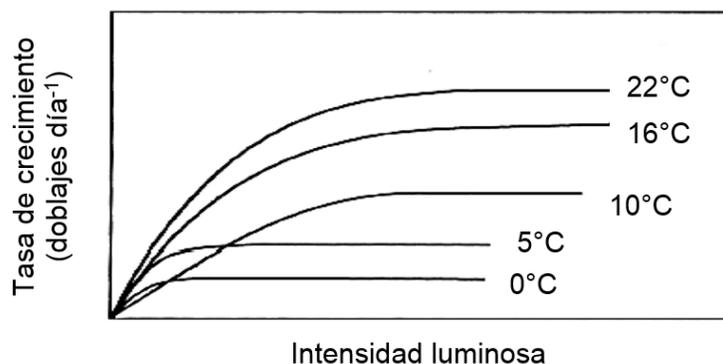


Figura 1.3 Evolución de la tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa para distintas temperaturas (Abalde et al., (1995), citados en Plasencia, 2012)

Mehlitz, (2009) enfatiza que la temperatura óptima para el cultivo de microalgas varía dependiendo del medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada. Sin embargo, se encuentra generalmente entre los 20 y 24 °C. Con temperaturas menores a 16 °C el crecimiento disminuye, mientras que con una temperatura mayor a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C.

Los cambios en la temperatura provocan una alteración en las rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de los carotenoides. Algunas algas aumentan la acumulación de carotenoides a una temperatura de 40 °C en comparación con la tasa obtenida a la temperatura óptima de crecimiento de 28 °C (Benavente-Valdés et al., 2012).

En el libro realizado por Richmond, (2004) se menciona que una temperatura óptima para el crecimiento puede resultar en que las células tengan un tamaño, contenido de carbono celular y nitrógeno mínimos, mientras que a una temperatura por debajo o por encima del nivel óptimo puede incrementarse el volumen celular y el contenido bioquímico.

1.5.3 Agitación

De acuerdo con las fuentes de información de Pástor-Guerrero y Pozo-Castro, (2013) la agitación asegura la distribución homogénea de las células el acceso a los nutrientes dentro del cultivo y mejora la distribución de la luz a las células, asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas. En cultivos a escala, la agitación puede complementarse con la adición de CO₂ para lograr la agitación y enriquecer el cultivo con más carbono para el metabolismo celular.

Becker, (1994) indica que una alta concentración de células fotosintéticamente activas puede provocar que se encuentren concentraciones extremadamente altas de O₂ disuelto en el medio de cultivo. Por lo que una concentración de O₂ superior a la del aire provoca un efecto de inhibición de la fotosíntesis, especialmente si la concentración de CO₂ es baja.

Es posible obtener una respuesta lineal en el carbono de la biomasa con el aporte de masa de carbono (que corresponde a una eficacia de prácticamente del 100 %, esto solo sucede con entradas limitadas de carbono inorgánico y rangos estrechos de pH (Benavente-Valdés et al., 2012).

1.5.4 Medición del incremento del oxígeno fotosintético

La intensa fotosíntesis realizada durante el día en sistemas de cultivo puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto con una saturación mayor al 200 % de saturación de aire. Se cree que una elevada saturación podría afectar la productividad de algas. A una saturación del 200 % existe una reducción del 17 % en la productividad, mientras que a 300 % se reduce en un 25 %. Por lo que se requiere más investigación para demostrar el efecto de altos niveles de oxígeno. Se ha demostrado que existe una disminución en la tasa de fotosíntesis cuando se presentan valores por encima de 20 mg/L de oxígeno disuelto (Molina et al., 2001).

Ugwu et al., (2007) hallaron que en un cultivo de *Chlorella sorokiniana* la productividad de la biomasa y la fluorescencia de la clorofila fueron sustancialmente reducidas cuando el oxígeno disuelto era mayor al 200 % de saturación de aire y cuando la temperatura se elevaba.

La producción del oxígeno fotosintético en los cultivos de algas, puede ser medida mediante un electrodo para oxígeno disuelto, el cual es capaz de detectar cambios del orden de 10 mM. Un electrodo del tipo Clark es el más utilizado, la producción de oxígeno es usualmente expresada en μmol o mg de $\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}(\text{Clorofila}) \text{h}^{-1}$, o por célula h^{-1} . Recientemente, los sensores ópticos para la medición de oxígeno que han sido desarrollados, están basados en la luminiscencia de un luminóforo y miden la concentración de oxígeno mediante una medida puramente física del tiempo. El usuario no necesita calibrar el sensor. Los métodos de medida electroquímicos determinan la corriente o la tensión resultantes de la reducción del oxígeno a iones hidróxido en el cátodo. Para compensar este “consumo de oxígeno”, las moléculas de oxígeno deben difundirse continuamente en el electrolito (Richmond, 2004).

1.5.5 Medición de la fijación del carbono fotosintético

La fijación del carbono fotosintético en un cultivo no puede ser fácilmente monitoreado por un analizador de gases infrarrojo, por lo que electrodos especializados son utilizados para medir la presión parcial del CO_2 (p_{CO_2}) en soluciones. El principio se basa en la relación entre el pH, y la concentración del CO_2 y los bicarbonatos en la solución. La determinación exacta puede ser realizada por medio de un analizador de CHNS/O (Richmond, 2004).

1.5.6 Efecto de la adición de CO_2 al medio de cultivo

De acuerdo con Cortijo, (2013) la adición de CO_2 al medio de cultivo genera las siguientes reacciones (1.4):



El CO₂ que ingresa al medio tiene un paso rápido, ya que sale para equilibrarse con el atmosférico. Alrededor del pH 10.5 se inicia la retención en el medio líquido de CO₂, donde es descompuesto en ácido carbónico, bicarbonatos (se encuentran como una especie química entre el carbonato y el ácido carbónico en lo que se refiere a captación de protones, puede por tanto comportarse como ácido, dando protones al medio y pasando a carbonato, o como base, captando protones del medio y pasando a ácido carbónico, por lo que es anfótero) y finalmente carbonatos.

Aunque en el agua la mayor parte del CO₂ disuelto está como CO₂ rodeado de moléculas de agua, parte estará en la forma de ácido carbónico, de tal forma que cuando se habla en general de ácido carbónico se asume también la parte del gas disuelta, a pesar de que es esta última la forma mayoritaria en la que se encuentra.

Las tres especies químicas del sistema carbonato se pueden convertir de la una a la otra solo variando el pH del sistema. Como se aprecia en la Figura 1.4, para un pH entre 8.3 y 8.4, a 25 °C, prácticamente todo el CO₂ ha desaparecido, siendo el HCO₃⁻ la mayor especie presente del sistema carbonato, y a un pH mayor que 8.4 empieza a aparecer el ion carbonato, convirtiéndolo en un agua incrustante.

Morales, (2002) aconseja que la concentración de CO₂ en los cultivos varíe entre 0.05 % y 5 % (v/v). La concentración de este gas ayuda a disminuir la alcalinidad y amortigua el pH.

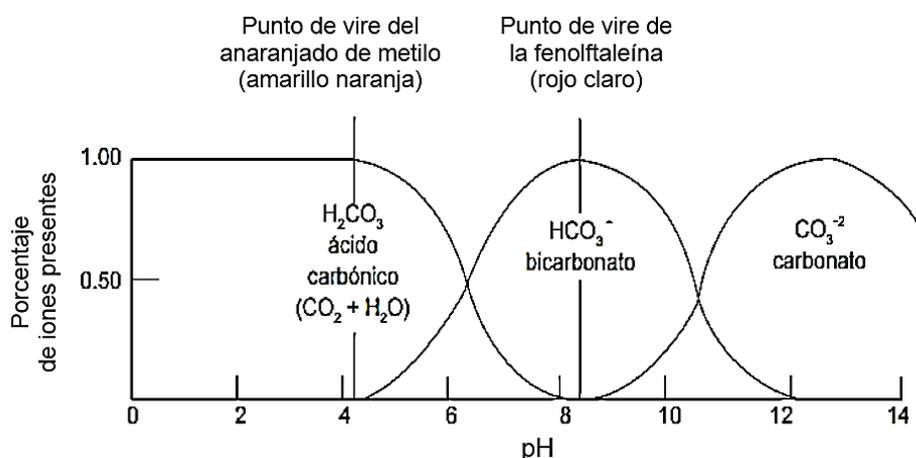


Figura 1.4 Dependencia del pH de las especies químicas del sistema carbonato (Cortijo, 2013)

1.5.7 pH

El desarrollo del pH en el cultivo se ve modificado por factores como la capacidad buffer del medio utilizado, la cantidad de CO₂ disuelto, la temperatura que afecta los gases disueltos y la actividad metabólica. El medio se alcaliniza por el consumo de la fuente de carbono, lo que genera bases como el NaOH. La medición del pH puede convertirse en una evaluación cuantitativa de la cantidad de biomasa en el medio. A mayor biomasa, mayor degradación de bicarbonato y por consiguiente se eleva la concentración de grupos hidroxilos en el medio, aumentándose así el pH (Rodríguez y Triana, 2006).

A niveles de pH alcalinos, la disponibilidad de CO₂ puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Un pH óptimo en el cultivo generalmente es mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con CO₂. El pH se incrementa conforme la edad del cultivo es mayor, esto es debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrientes (Benavente-Valdés et al., 2012).

1.5.8 Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas

Las microalgas y cianobacterias requieren para su crecimiento macronutrientes (fuentes de nitratos, fosfatos y en el caso de las diatomeas la adición de silicatos) y micronutrientes, que fungen como catalizadores de reacciones enzimáticas y procesos fisiológicos para sintetizar compuestos. El desbalance entre la proporción suministrada de éstos nutrientes, se manifiesta como un descenso en el crecimiento o la detención del mismo. Aparte de los micronutrientes y macronutrientes, las vitaminas como la tiamina (B1), Cianocobalamina (B12), y Biotina (B6) son consideradas esenciales para la mayoría de las microalgas (Romo, 2001).

En la elección de un medio de cultivo se debe considerar aspectos la salinidad, la composición y concentración de iones, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH, elementos traza y vitaminas para adecuarlo a las necesidades de la microalga a cultivar (Tecnoplades, 2015).

1.6 Metabolismo microbiano

Algunos microorganismos pueden alimentarse con sustancias inorgánicas mediante la utilización de vías metabólicas no disponibles para las plantas ni para los animales. Los organismos fotoautótrofos (Figura 1.5), utilizan la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente principal de carbono. Estos organismos comprenden bacterias fotosintéticas (bacterias verdes y púrpura y cianobacterias), algas y plantas verdes (Tórtora et al., 2007).

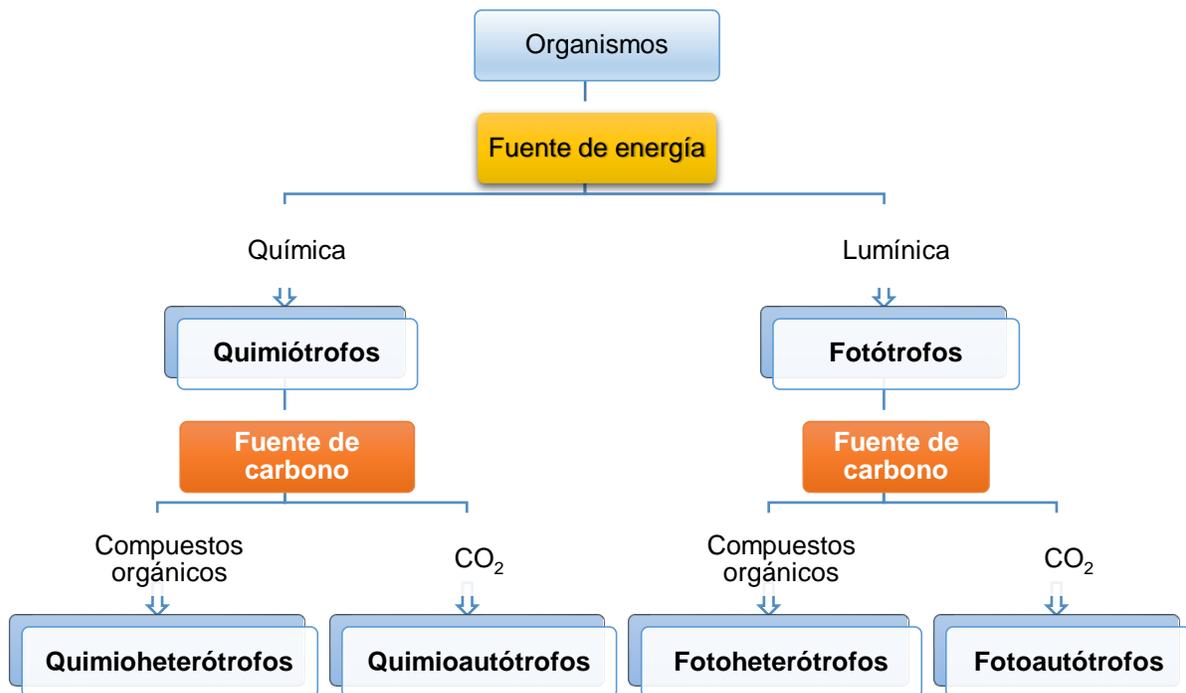


Figura 1.5 Clasificación nutricional de los organismos en función de su fuente de energía y fuente de carbono (Adaptado de Tórtora et al., 2007)

Los tres nutrientes más importantes para el cultivo de microalgas en condiciones autótrofas son el carbono, el nitrógeno y el fósforo. Para obtener altas tasas de crecimiento es esencial el abastecimiento de fuentes inorgánicas de carbono como el CO_2 y el NaHCO_3 . El nitrógeno también es un contribuyente principal de la producción de biomasa y se suministra en forma de nitrato, amonio y urea. El fósforo también influye en el crecimiento de las microalgas, y es proporcionado comúnmente en forma de ortofosfato. Una relación óptima de carbono, nitrógeno y fósforo es crucial para la obtención de una alta productividad de lípidos (Gracida-Álvarez et al., 2013).

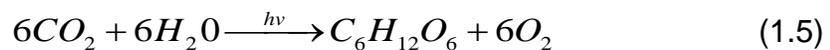
1.7 Fotosíntesis

Existen dos tipos de fotosíntesis, una anoxygenica, que es llevada a cabo por bacterias que utilizan la energía de la luz para extraer los protones y electrones de una gran

variedad de moléculas donadoras, como el sulfuro de hidrógeno (H₂S) obtenido de aguas termales ricas en sulfuro, para reducir el CO₂ para formar moléculas orgánicas. La segunda es la fotosíntesis oxigénica que es producida tanto por microorganismos procariotas (cianobacterias) y eucariotas (algas) (Sánchez-García, 2013).

Las microalgas, cianobacterias y las plantas verdes, emplean la energía de la luz que absorbe la clorofila y se transmite a los electrones externos de la molécula, los cuales escapan de la misma y producen una especie de corriente eléctrica en el interior del cloroplasto como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la fase luminosa de la fotosíntesis, el NADP⁺ a NADPH. El NADP⁺ es una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas. NADPH es su forma reducida, que interviene en la fase oscura de la fotosíntesis (ciclo de Calvin) donde se reduce el CO₂. El NADPH actúa como transportador de energía, la cual se emplea finalmente en sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas (Ruiz-Martínez, 2011).

De acuerdo con Benavente-Valdés et al., (2012) la reacción (1.5) que representa el proceso de la fotosíntesis en forma general es:



Donde $h\nu$ representa la energía lumínica en función de su frecuencia ν y la constante de Planck h . El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH⁻.

Dentro de las células, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos (Figura 1.6), unos orgánulos citoplasmáticos de color verde exclusivos de las células fotosintéticas. En una cámara en su interior se encuentra el estroma, un medio interno donde tienen lugar las reacciones oscuras del ciclo de Calvin. El estroma alberga componentes necesarios para la fotosíntesis, como la principal enzima responsable de la fijación del CO₂: la RBP-carboxilasa o RuBisCO. Es una proteína formada por 16 polipéptidos que cataliza la transformación del CO₂ a una forma orgánica, los pigmentos fotosintéticos

se encuentran en la membrana de los tilacoides, unos sacos que son también llamados lamelas.

Los pigmentos fotosintéticos absorben la energía de los fotones, y la transfieren a los centros de reacción donde es utilizada como catalizador en las reacciones fotoquímicas. Como los pigmentos fotosintéticos tienen enlaces covalentes sencillos que se alternan con enlaces covalentes dobles, se favorece la existencia de electrones libres que no pueden atribuirse a un átomo concreto.

Los fotones deben poseer la energía suficiente para excitar a un electrón de una molécula de pigmento y así poder ascender a posiciones más alejadas del núcleo atómico. En el caso de que el pigmento estuviese aislado, al descender al nivel inicial, la energía captada se liberaría en forma de calor o de radiación de mayor longitud de onda (fluorescencia). Sin embargo, al existir diversos tipos de pigmentos muy próximos, la energía de excitación captada por un determinado pigmento puede ser transferida a otro al que se induce el estado de excitación. Este fenómeno se produce gracias a un estado de resonancia entre la molécula dadora relajada y la aceptora (Richmond, 2004).

La eficiencia de conversión de la energía solar a biomasa por medio de la fotosíntesis oxigénica es del 4-6 % (Richmond, 2004). Según Falkowsky y Raven, (2007) citados en Sánchez-García, (2013) los organismos fotosintéticos usan 8 fotones para capturar o fijar una molécula de CO_2 como carbohidratos (CH_2O), el valor calorífico de un mol de CH_2O es de 468 kJ, la energía media de un mol de fotones en el PAR es de 217 kJ y la eficiencia de conversión teórica máxima a carbohidratos es 468 kJ entonces al multiplicar 8 por 217.4 kJ tenemos que el valor es de 27 %.

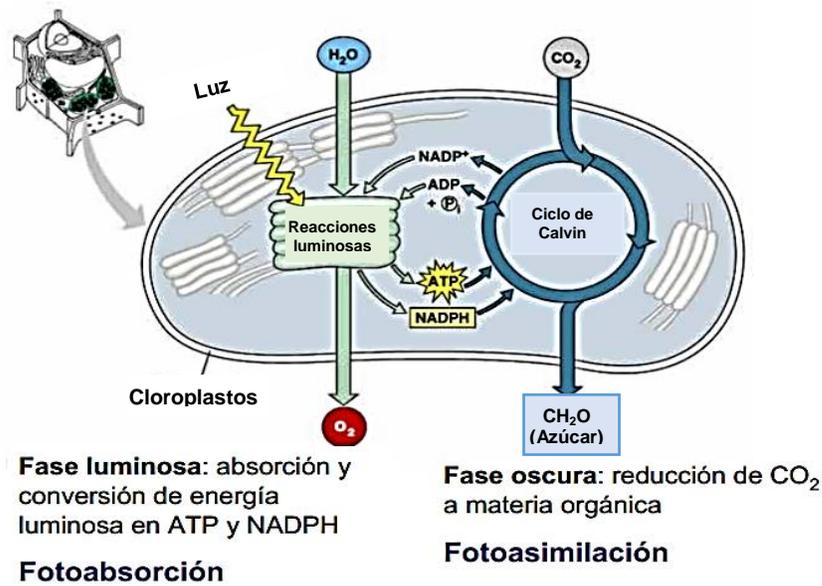


Figura 1.6 Representación sintetizada del proceso fotosintético (Campbell y Reece, 2007)

1.8 Pigmentos

Ronda et al., (1980) mencionan que los pigmentos fotosintéticos microalgales se clasifican en tres grupos: la clorofila, los carotenoides y las ficobilinas, diferenciándose en su composición química y capacidad de absorción de la luz en una determinada longitud de onda.

La concentración de pigmentos fotosintéticos varía ampliamente y depende del metabolismo algal y de factores fisicoquímicos como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Limnología, 2007).

Las clorofilas (pigmentos verdes) y carotenoides (pigmentos de color amarillo o naranja) son lipofílicos y se asocian en los complejos de clorofila-proteína, mientras que ficobilinas son hidrófilicas (Sánchez-García, 2013).

1.8.1 Clorofila

La clorofila *a* es el pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química. Absorbe en la región del rojo (650-700 nm) y azul (400-500 nm). La clorofila *b* tiene un espectro de absorción ligeramente diferente. También existe una clorofila *c*, la cual se puede hallar en algas pardas (Ruiz-Martínez, 2011). El contenido de clorofila del alga fitoplanctónica es entre el 1 y 2 % en peso (Cañizares-Villanueva y Perales, 2012).

Humphrey, (2004) indica que el átomo de magnesio es inestable cuando se aísla de los cloroplastos, por lo que es desplazado fácilmente por el más débil de los ácidos dando lugar a la formación de feofitina, la cual que es de color oscuro. Cuando reacciona con metales se forma una estructura estable de color azul-verde. Cuando la clorofila se expone a ácidos débiles, oxígeno o la luz, se acelera su oxidación, dando lugar a la formación de numerosos productos de degradación.

Las clorofilas, no absorben fotones en la región verde del espectro (entre los 500 y 600 nm), siendo este el color que se refleja o se transmite. La estructura de la clorofila incluye una larga cadena hidrofóbica que se encuentra unida al anillo tetrapirrólico por un enlace tipo éster. Un tetrapirrol se compone de cuatro unidades de pirroles (un anillo heterocíclico y aromático de cinco miembros con la fórmula C_4H_5N) enlazadas por medio de un átomo metálico. Esta cadena es un grupo fitol que hace a la molécula de clorofila insoluble en agua, para mantener a las moléculas de clorofila localizadas dentro de las membranas fotosintéticas del cloroplasto (Plant and Soil Sciences eLibraryPRO, 2015).

1.8.1.1 Síntesis de la clorofila

La clorofila se sintetiza en el cloroplasto, en la primera fase, el aminoácido ácido glutámico es convertido a ácido delta-aminolevulínico. A partir de ahí, varias fases metabólicas son requeridas para la formación de los cuatro anillos que forman los

tetrapirroles. En esta ruta metabólica, la presencia de luz es necesaria durante la reacción que produce la protoporfirina IX (producto intermedio en las rutas biosintéticas de las clorofilas y los grupos hemo). Algunas fases de esta ruta metabólica son mostradas en la Figura 1.7.



Figura 1.7 Componentes principales de la ruta metabólica en la síntesis de la clorofila (Plant and Soil Sciences eLibraryPRO, 2015)

Esta es una ruta metabólica importante debido a que, además de la clorofila, se producen también los tetrapirroles. En ambos casos la ruta es similar hasta el punto donde se sintetiza la protoporfirina IX. Otras enzimas de los cloroplastos se pueden insertar posteriormente en el centro del tetrapirrol, ya sea Mg^{2+} para iniciar la síntesis de clorofila, o bien Fe^{2+} para iniciar la síntesis de grupos hemo. La protoporfirina IX puede también ser exportada del cloroplasto hacia la mitocondria, donde es utilizada para producir grandes cantidades de citocromos (proteínas que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas).

Esta ruta biosintética es también importante porque los grupos hemo sirven de sustrato para la síntesis del fitocromo, una molécula cuya función es actuar

como fotorreceptor fundamentalmente de luz roja y roja lejana, además, es esencial para la fotomorfogénesis normal de la planta (Plant and Soil Sciences eLibraryPRO, 2015).

Clorofilas
 R=–CH₂ en clorofila *a* o –CHO en clorofila *b*
 Clorofila *c* –sin fitol

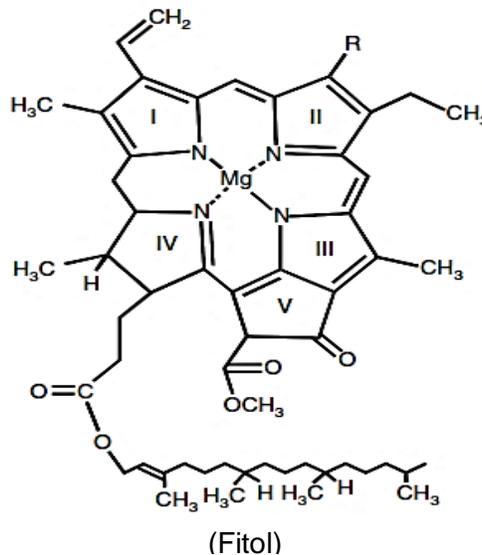


Figura 1.8 Estructura de la clorofila (Richmond, 2004)

Todas las clorofilas son tetrapirroles, por lo que los átomos de nitrógeno están coordinados alrededor de un átomo de magnesio. La clorofila *a* y *b* (Figura 1.8) difieren en que la primera presenta un grupo metilo, mientras que en la segunda, este grupo ha sido oxidado para formar un grupo formol (también conocido como grupo formilo), mientras la clorofila *c* no contiene una cadena lateral de fitol (Richmond, 2004).

1.8.2 Carotenoides

Los carotenoides, son el grupo más representativo de los tetraterpenos, son moléculas con capacidad de absorber energía luminosa en la región del azul (400-500 nm), debido a la presencia de múltiples enlaces dobles conjugados. Estos compuestos están constituidos por carbono e hidrógeno y presentan colores en el rango del amarillo al rojo (Cañizares-Villanueva y Perales, 2012).

Los carotenoides son colorantes poliénicos rojos y amarillos cuya molécula posee un grupo cromóforo de dobles enlaces conjugados en una cadena alifática ramificada (grupos metilos), formada por ocho restos de isopreno, por lo que son tetraterpenos. Algunos son lineales pero la mayor parte tienen uno o dos ciclos. Los carotenoides resultan de sustituir, en los carotenos algunos de los hidrógenos por grupos oxhidrilo, carbonilo, epóxido o carboxilo (Primo-Yúfera, 2007). Las aplicaciones y fuentes naturales de algunos de los pigmentos se mencionan en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Fuentes y aplicaciones de los carotenoides (Adaptada de Primo-Yúfera, 2007)

			Pigmento	Aplicaciones y fuentes naturales
Carotenoides	Carotenoides oxigenados	Xantófilas	Criptoxantina	Papaya, maíz, naranjas, hojas, etc.
			Zeaxantina	Grano de maíz
			Luteína/Zeaxantina	Yema de huevo, hojas en otoño
		Epóxidos	Violaxantina	Pensamiento amarillo, corteza de naranjas y mandarinas, flores amarillas
			Luteoxantina y auroxantina	Pulpa y corteza de naranja
		Aldehídos y cetonas	Capsantina	Frutos maduros del pimiento rojo
			Capsorrubina	
			Cantaxantina	Colorear artificialmente jugos de naranja
			Astaxantina	Color rojo de la langosta, cangrejo y otros mariscos al ser cocidos.
			B-Apo-8'-carotenal (sintético)	Colorear jugo de naranja

1.8.2.1 Síntesis de carotenoides

Sus esqueletos carbonados C_{40} se forman por adiciones de unidades C_5 hasta formar el pirofosfato de geranylgeranilo, un intermediario C_{20} , que luego condensa con otra molécula igual (cola con cola). El fiteno, producto de la condensación C_{40} , se deshidrogena para dar licopeno, por ciclación de los extremos, el licopeno se convierte en β -caroteno (Figura 1.9) (Berg et al., 2008).

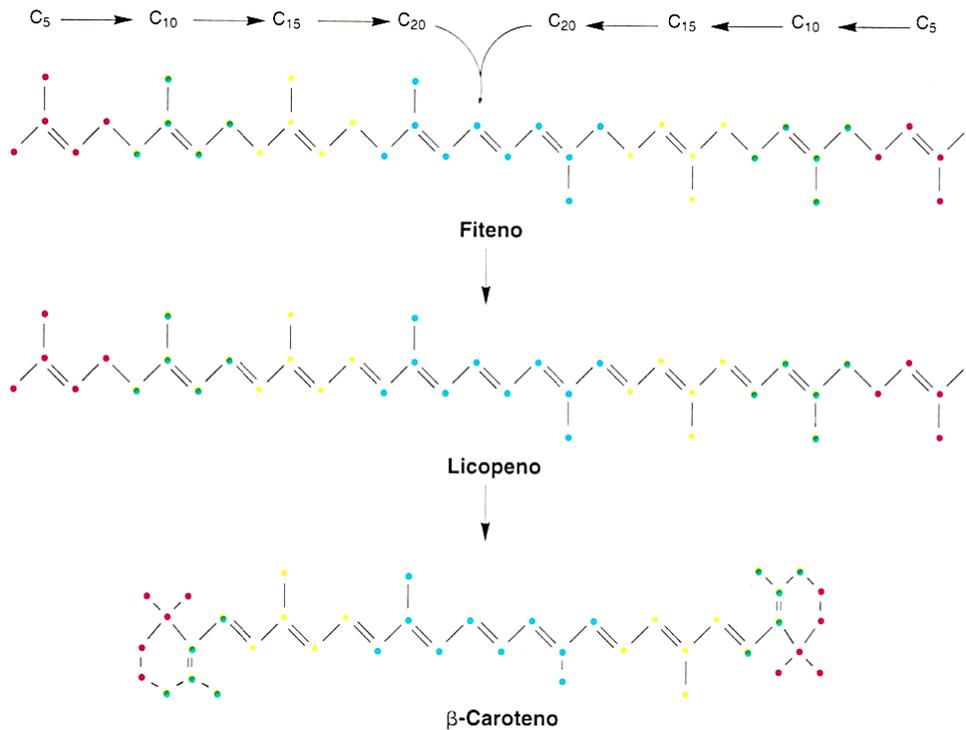


Figura 1.9 Síntesis de carotenoides C₄₀: fiteno, licopeno y β-caroteno (Berg et al., 2008)

1.8.2.2 Separación

Los carotenos son mucho menos polares que los carotenoides oxigenados y se disuelven mejor en éter, éter de petróleo, benceno y mal en metanol. El metanol y etanol disuelven mejor los carotenoides oxigenados (Primo-Yúfera, 2007).

1.8.2.3 Propiedades físicas y químicas

Para la identificación de los carotenoides se usan los espectros y características de absorción. El espectro de absorción del trans-total-β-caroteno posee dos máximos en 452-453 nm y 480-481 nm, por lo que en general puede decirse que la mayor parte de los carotenoides se encuentran en los tejidos vegetales en forma trans-total.

Debido a su naturaleza altamente insaturada, los carotenoides se oxidan fácilmente, hasta llegar a romper la cadena, lo es causa de dificultades en la preparación de estas sustancias y de la alteración del color en los productos agrícolas que los contienen. Frente a los ácidos, los carotenoides son muy inestables, dando reacciones de ciclación e isomerización (Primo-Yúfera, 2007).

1.8.2.4 Propiedades nutrimentales

En la Figura 1.10 se aprecia que el licopeno, la zeaxantina, la xantofila, etc. no tienen actividad provitamínica. La criptoxantina, que tiene un anillo de β -ionona sustituido y el otro no, sí tiene actividad. Sólo los carotenoides que poseen, intacto y no sustituido, por lo menos un anillo de β -ionona, tienen acción de provitaminas A. El β -caroteno puede dar, en principio, dos moléculas de vitamina A, en cambio, la criptoxantina y los α y γ -carotenos solamente una (Primo-Yúfera, 2007).

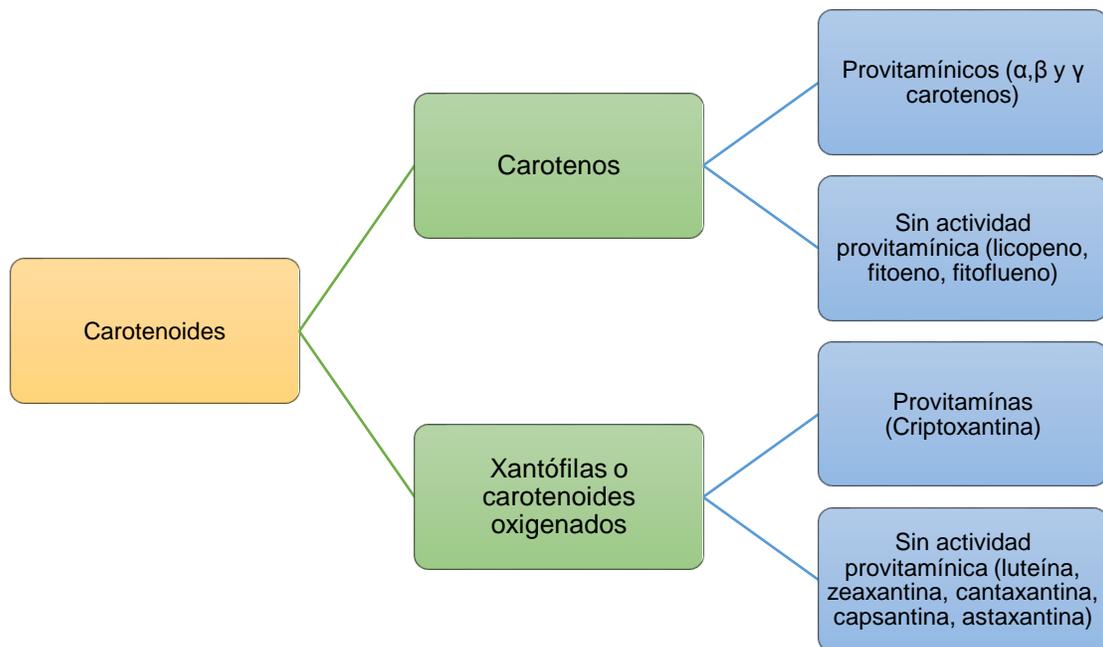


Figura 1.10 Propiedades nutricionales de los carotenoides (Adaptada de Primo-Yúfera, 2007)

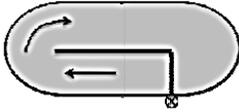
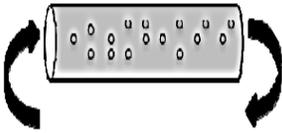
1.9 Biorreactores en microalgas

Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos: los sistemas abiertos incluyen estaques poco profundos, canales abiertos, estanques circulares y tipo carrusel, por otra parte los sistemas cerrados o completamente hidráulicos se conocen como fotobiorreactores. Los sistemas abiertos están expuestos a la intemperie, en cambio, en los sistemas cerrados, el cultivo tiene poco o nulo contacto con el exterior (Contreras-Flores et al., 2003).

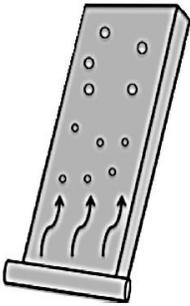
1.9.1 Comparación de sistemas de cultivo

La Tabla 1.4 adaptada de Dragone et al., (2010) muestran la comparación entre los fotobiorreactores y los sistemas abiertos para diferentes condiciones de cultivo y parámetros de crecimiento.

Tabla 1.4 Ventajas y limitaciones entre diferentes fotobiorreactores (adaptada de Dragone et al., 2010)

Sistema de cultivo	Ventajas	Limitaciones
<p>Sistemas abiertos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Relativamente económicos ✓ Facilidad de limpieza ✓ Fácil mantenimiento ✓ Ubicación en suelos no agrícolas ✓ Bajo consumo de energía 	<ul style="list-style-type: none"> × Bajo control de las condiciones de cultivo × Baja iluminación, mezclado y consumo de CO₂
<p>Fotobiorreactor tubular</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Relativamente barato ✓ Mayor área superficial iluminada ✓ Adecuado para cultivos al aire libre ✓ Buena productividad de biomasa 	<ul style="list-style-type: none"> × Gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO₂ a lo largo de los tubos × Difícil limpieza × Cierta grado de crecimiento en la pared × Requiere una gran área de suelo para operar × Fotoinhibición

Continuación de la Tabla 1.4 Ventajas y limitaciones entre diferentes fotobiorreactores (adaptada de Dragone et al., 2010)

Sistema de cultivo	Ventajas	Limitaciones
Fotobiorreactor de columna 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bajo consumo de energía ✓ Alta transferencia de masa ✓ Buen mezclado ✓ Mejor exposición a los ciclos de luz-oscuridad ✓ Bajo esfuerzo de corte ✓ Fácil de esterilizar ✓ Fotoinhibición reducida ✓ Foto-oxidación reducida ✓ Alta eficiencia fotosintética 	<ul style="list-style-type: none"> × Pequeña superficie de área iluminada × Materiales de construcción sofisticados × Disminución del área superficial iluminada al escalar × Caro comparado con los estanques abiertos × Costos de mantenimiento × Escalabilidad modesta × Cierta grado de crecimiento en la pared
Fotobiorreactor de paneles 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Relativamente barato ✓ Fácil limpieza ✓ Mayor área superficial iluminada ✓ Mayor área superficial iluminada ✓ Adecuado para cultivos al aire libre ✓ Bajo consumo de energía ✓ Buena productividad de biomasa ✓ Buen recorrido de luz ✓ Bajo nivel de acumulación de oxígeno ✓ Menor trayectoria de oxigenación 	<ul style="list-style-type: none"> × Dificultad para escalar × Dificultad para controlar la temperatura × Cierta grado de crecimiento en la pared × Estrés hidrodinámico para algunas cepas de algas × Baja eficiencia fotosintética

1.10 Métodos de cosecha de microalgas

Fon-Sing et al., (2011) indican que las propiedades de las microalgas que influyen en su separación son: morfología (filamentosa o unicelular), tamaño, peso específico y carga superficial de la célula (habitualmente carga negativa).

En la recopilación realizada por Valladares-Peñaherrera, (2014) se menciona que el método de cosecha a aplicar depende de las características de las microalgas (densidad de partícula, tamaño) y del valor de los productos que se quiere obtener. El líquido que se obtiene después de la cosecha todavía tiene nutrientes y este debe ser reciclado porque en plantas procesadoras grandes esto implicaría problemas considerables de eliminación. La Tabla 1.5 muestra los principales métodos utilizados para el cosechado de las microalgas.

Tabla 1.5 Principales métodos utilizados para la cosecha de las microalgas (Adaptada de Peralta-Ruiz, 2012 y Valladares-Peñaherrera, 2014)

Método	Fundamento	Ventajas	Desventajas
Sedimentación por gravedad	Separa las partículas sólidas en suspensión por asentamiento gravitacional.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bajo costo ✓ Adecuado para microalgas con tamaño superior a 70 micras 	<ul style="list-style-type: none"> *Velocidades de sedimentación bajas
Floculación	Las partículas dispersas se aglomeran para formar flóculos con una mayor velocidad de sedimentación, mediante la neutralización o reducción de las cargas negativas de las microalgas.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bajo costo ✓ Eficaz a bajas concentraciones de biomasa 	<ul style="list-style-type: none"> *Toxicidad por el tipo de floculante empleado *Riesgo de contaminación por el tipo de floculante empleado
Filtración	Consiste en tres tipos: filtración al vacío, filtración a presión y filtración por gravedad.	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Es sencillo ✓ Adecuado para microalgas mayores a 70 mm. 	<ul style="list-style-type: none"> *Obstrucción rápida de los filtros, formación de tortas de filtración compresibles *Altos costos de mantenimiento

Continuación de la Tabla 1.5 Principales métodos utilizados para la cosecha de las microalgas (Adaptada de Peralta-Ruiz, 2012 y Valladares-Peñaherrera, 2014)

Método	Fundamento	Ventajas	Desventajas
Métodos electrolítico	Neutraliza las cargas de las microalgas mediante el movimiento de las cargas al ánodo formando flóculos sin necesidad de añadir productos químicos	✓ Eficiencias de recuperación del 80-95 %	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Altos costos de operación ✗ Difícil control ✗ No escalable ✗ Riesgo de corto circuito
Método de electroforesis	El hidrógeno generado por la electrólisis del agua se adhiere a los flóculos de microalgas arrastrándolos a la superficie para después ser recolectados.	✓ Es versátil, seguro y selectivo	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Daño del sistema por las altas temperaturas ✗ Ensuciamiento de los cátodos
Flotación	La flotación es un proceso de separación por gravedad en la que el aire es agregado en forma de burbujas para luego llevar las partículas sólidas a la superficie del líquido	✓ Más eficaz y beneficiosa que la sedimentación	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Es costoso
Centrifugación	Separa sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Adecuada a nivel laboratorio y para grandes volúmenes de biomasa ✓ Altas eficiencias de recuperación ✓ Amable con el medio ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Daño a las estructuras celulares ante altas fuerzas gravitacionales ✗ Altos costos energéticos y altos costos de capital inicial

Peralta-Ruiz, (2012) concluyó que la floculación química es económicamente viable (Tabla 1.6) para la implementación de un sistema de cosecha de microalgas con un costo de recolección de \$0.06 US/m³ de caldo de cultivo.

Tabla 1.6 Comparación de métodos de cosecha de microalgas (Peralta-Ruiz, 2012)

Métodos de cosecha	Centrifugación	Floculación	Filtración	Sedimentación por gravedad	Flotación	Técnicas eléctricas
Economía	Bajo	Alto	Bajo	Medio	Bajo	Bajo
Cuidado al medio ambiente	Alto	Alto	Alto	Alto	Medio	Medio
Seguridad	Medio	Alto	Alto	Alto	Bajo	Bajo
Flexibilidad	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Bajo
Controlabilidad	Medio	Alto	Medio	Alto	Medio	Medio
Total	15	23	17	21	11	9

1.11 Crecimiento microbiano

Se reconoce un patrón estándar de crecimiento (Figura 1.11) que comprende las siguientes fases (Romo, 2001):

- **1) Fase de retraso o fase de adaptación**
- **2) Fase de crecimiento exponencial**
- **3) Fase de declinación relativa de crecimiento**
- **4) Fase estacionaria**
- **5) Fase de muerte**

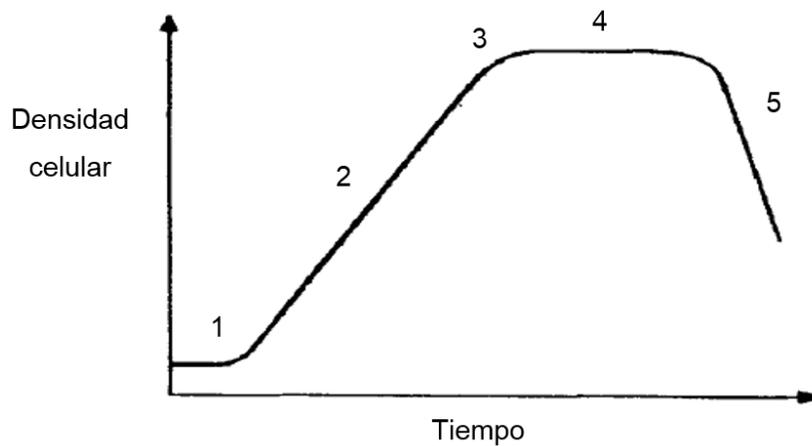


Figura 1.11 Curva representativa de crecimiento de un cultivo de microalgas en un volumen limitado (Romo, 2001)

1.12 Microbiología predictiva

La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones microbianas a los factores ambientales son reproducibles, y que al considerar los ambientes en términos de dominios identificables es posible, a partir de las observaciones del pasado, predecir las respuestas de los microorganismos (Cabeza-Herrera, 2013).

1.12.1 Modelamiento matemático

El modelado matemático permite analizar en forma cuantitativa el comportamiento microbiano en un determinado ambiente o sistema particular. Es realizado, generalmente, asumiendo condiciones constantes para determinar los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento. Sin embargo, condiciones como temperatura, pH o composición de la atmósfera gaseosa no se mantienen constantes durante el almacenamiento refrigerado de los alimentos. Uno de los factores que más fluctúa es la temperatura de almacenamiento y es el más investigado (Cayré et al., 2004).

➤ **Modelos empíricos o matemáticos**

De acuerdo con Gutiérrez-Barberena, (2011) modelos empíricos tales como la función de Gompertz se refieren a la consecuencia práctica y simple de describir los datos en condiciones experimentales en la forma de una relación matemática conveniente. Las ecuaciones polinomiales (1.6) son el denominador común de los modelos empíricos. Estos modelos son fáciles de usar, directos y no es necesario tener conocimientos del proceso en particular.

$$P_{(x)} = a_0X^n + a_1X^{n-1} + \dots + a_{n-1}X + a_n = 0 \tag{1.6}$$

Donde:

$$a_0 \neq 0 \text{ y } n \geq 3$$

Éstos no tienen fundamentos teóricos y son no lineales, los cuales son válidos solo para un rango limitado de las variables fundamentales pero que no tienen algún significado biológico. Es posible la interpretación de la respuesta modelada en términos de fenómenos y procesos conocidos. Los modelos se pueden clasificar en primarios, secundarios o terciarios (Tabla 1.7)

Tabla 1.7 Clasificación de algunos modelos utilizados (Gutiérrez-Barberena, 2011)

Modelos primarios	Modelos secundarios	Modelos terciarios
Función de Gompertz	Modelo Belehradek (modelo de raíz cuadrada)	PMP (Pathogen Modelling Program)
Gompertz modificada	Modelo Ratkowsky (modelo de raíz cuadrada)	Micromodelo de alimentos
Modelo logístico	Modelo de Arrhenius	Predictor de <i>Pseudomonas</i>
Modelo Baranyi	Modelo modificado de Arrhenius (Davey o Schoolfield)	Sistema experto
Modelo de primer orden	Modelos probabilísticos	
Modelo de primer orden modificado	Valores Z	
Valores D de inactivación térmica	Polinomiales o respuesta	
Modelo de declinación de crecimiento de Whiting y Cygnarowicz	Modelos de superficie	
Modelo lineal de tres fases	Redes neuronales artificiales	

- **Modelos primarios**

Característica principal: describen los cambios en el número de bacterias en función del tiempo, bajo ciertas condiciones ambientales y de cultivo.

La respuesta puede ser medida directamente mediante el recuento de colonias viables, formación de toxina, nivel de sustrato o productos metabólicos o indirectamente por absorbancia o densidad óptica. Esto puede generar información sobre los microorganismos como tiempo generacional, duración de la fase, la tasa de crecimiento exponencial y la densidad poblacional máxima (Gutiérrez-Barberena, 2011). La Figura 1.12 muestra un ejemplo de tres modelos aplicados para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas cocidas.

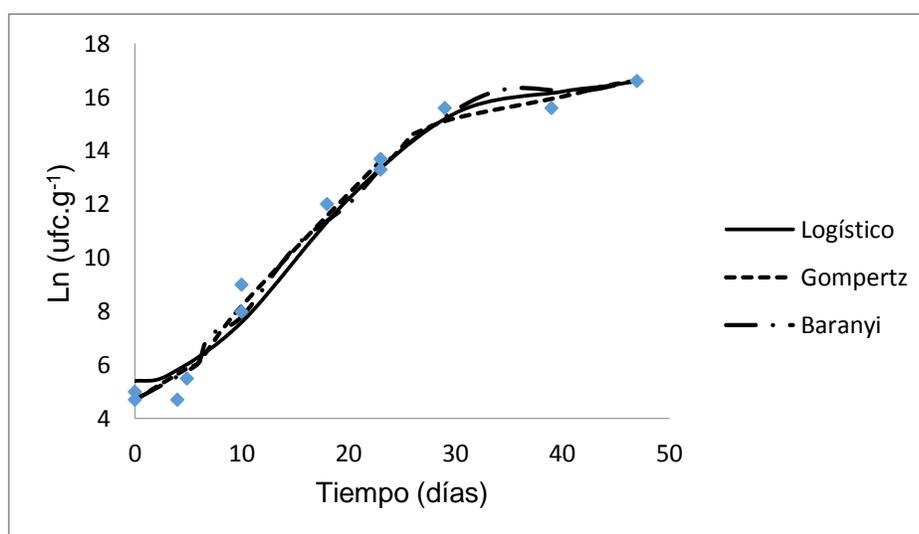


Figura 1.12 Comparación del ajuste de modelos primarios a los recuentos de bacterias lácticas totales (Cayré et al., 2007)

- **Modelos secundarios**

Característica principal: Describen la respuesta de una o más variables de un modelo primario modificando, por uno o más cambios en el cultivo o en las condiciones ambientales (pH, actividad de agua, temperatura).

Por ejemplo, si el efecto de la temperatura en el crecimiento de *Salmonella typhimurium* en carne entre 15 y 40 °C fuera investigado, el organismo crecería a un número de temperaturas en este rango. Para cada temperatura, se podría calcular un tiempo de generación usando un modelo primario. Entonces, se coloca este dato usando un modelo secundario, para que ese efecto de la temperatura sea descrito por una ecuación matemática. Esto permite que el usuario determine el tiempo de generación que se observará a la temperatura T (Gutiérrez-Barberena, 2011). En la Figura 1.13 se observa el modelo de la raíz cuadrada, la línea continua muestra las velocidades relativas de deterioro pronosticadas.

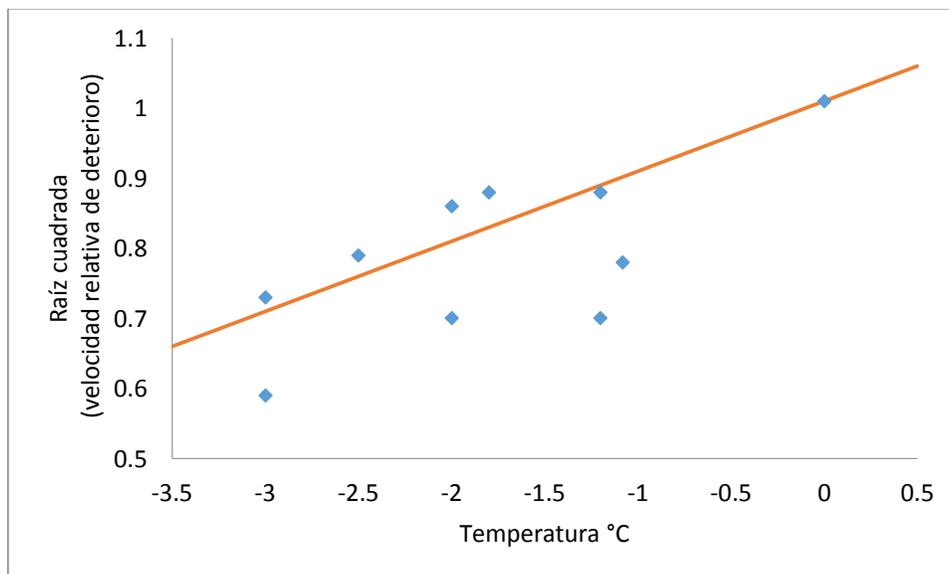


Figura 1.13 Gráfica de la raíz cuadrada de la velocidad relativa de deterioro del bacalao, camarón y lisa, superenfriados (FAO, 2015)

- **Modelos Terciarios**

Características principales: son la aplicación de uno o más modelos primarios y secundarios, incorporados en un paquete de software de computadora (Figura 1.14). En estos modelos se han incorporado varias funciones integradas tales como temperatura, actividad de agua o pH (Gutiérrez-Barberena, 2011).

Con base en los fundamentos teóricos expuestos se desarrolló una metodología que permita el cumplimiento de los objetivos planteados, los cuales buscan lograr la mayor producción de pigmentos fotosintéticos en la microalga *Chlorella* spp. El siguiente capítulo presenta los métodos empleados para tal fin.

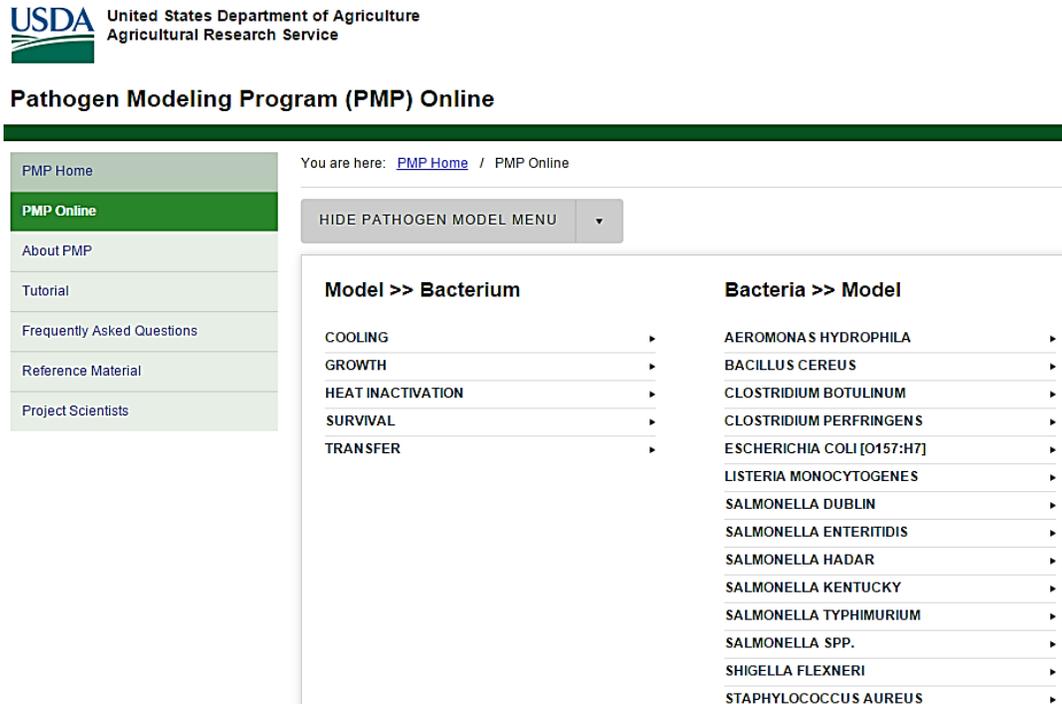


Figura 1.14 Captura de pantalla del programa PMP en línea (USDA, 2015)

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe la metodología empleada para el desarrollo de este trabajo de investigación el cual se dividió en 6 etapas y que se representa de forma general en la Figura 2.1, los números a la izquierda indican el objetivo a cumplir.

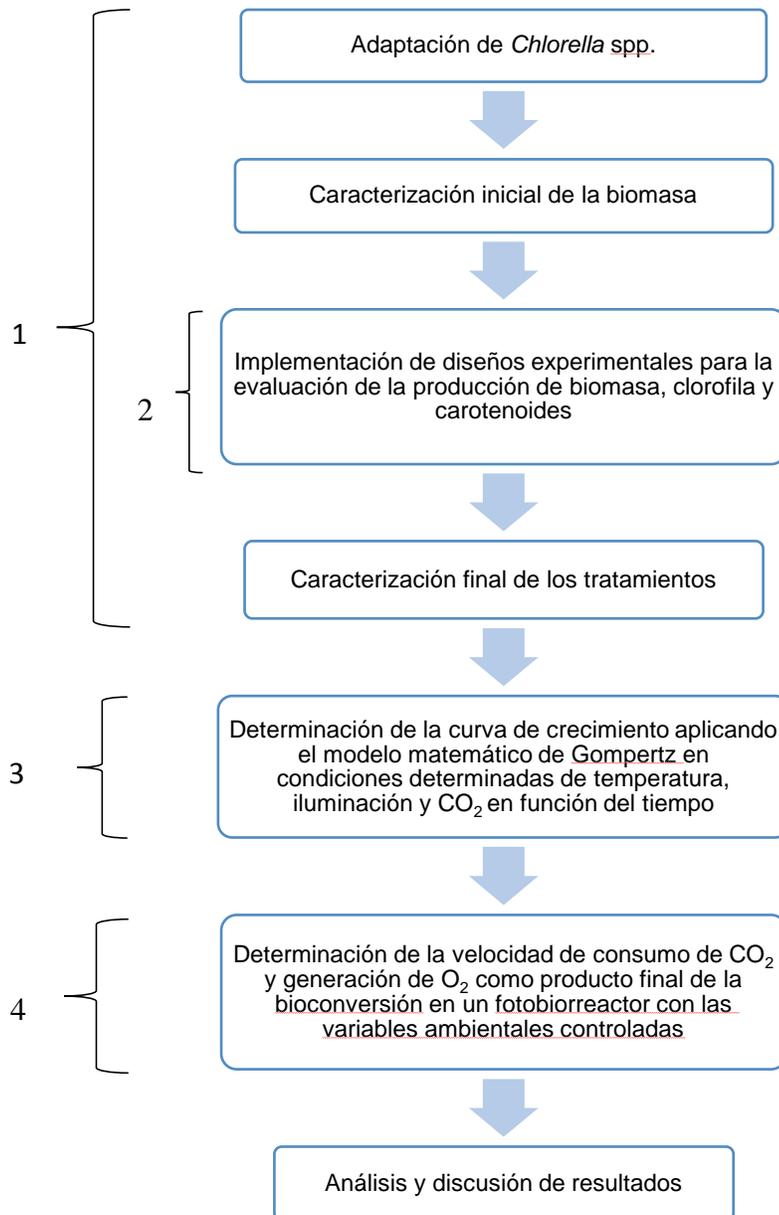


Figura 2.1 Metodología

2.1 Adaptación de *Chlorella* spp.

De acuerdo con la investigación realizada por Caballero (2013), el cultivo de microalgas tiene requerimientos mínimos de nutrientes y vitaminas para lograr un crecimiento adecuado, por lo que se usó la formulación del medio de cultivo (f/2) utilizado en su experimentación. En el trabajo mencionado, se determinó la dosis recomendable de la microalga de agua dulce *Chlorella* spp. obtenida del Centro de Estudios Técnicos del Mar (C. E. T. Mar 07) en Veracruz, Veracruz. Los valores recomendados fueron 1 mL de macronutrientes, 1 mL de micronutrientes y 1 mL de vitaminas.

Durante esta etapa se adaptó la microalga a temperatura ambiente con el objetivo de mantener el cultivo en la fase exponencial de crecimiento para la posterior inoculación de los fotobiorreactores utilizados en el diseño experimental.

2.2 Caracterización de la biomasa producida por *Chlorella* spp.

2.2.1 Determinación de la densidad celular

Para la realización de las curvas de calibración se efectuó un conteo celular con un hematocitómetro o cámara de Neubauer. El cálculo se expresó en células/mL. Cuando la densidad celular era elevada y no permitía el conteo, se procedió a realizar diluciones (1:2, 1:5, 1:10, etc. según haya sido necesario) para facilitar el proceso. En el caso de la formación de colonias flojas, se realizó una disgregación celular mediante un tratamiento en baño ultrasónico por un tiempo no mayor a 5 min.

2.2.1.1 Relación absorbancia - densidad celular

Se realizó una lectura de absorbancia en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 750 nm para *Chlorella* spp. y 560 nm para la cianobacteria *Arthrospira maxima* (Caballero, 2013) y (Domínguez, 2014), del cultivo en fase exponencial y en fase estacionaria efectuando diluciones de la muestra original y realizando el conteo de

células en cada dilución empleando la cámara de Neubauer. Se calculó una curva de calibración (Anexo A) de la microalga relacionando la absorbancia con el número de células contadas en el hematocitómetro.

2.2.2 Determinación de biomasa por peso seco

La biomasa de las microalgas se cuantificó filtrando una cantidad conocida de medio de cultivo, a través de un filtro Whatmann GF/C de 1.2 μm de tamaño de poro, previamente lavado y llevado a peso constante. El peso seco de la muestra se determinó por diferencia de peso (Zhu y Lee, 1997).

2.2.3 Pre-tratamiento de la muestra

Para la determinación de carbohidratos se utilizó una cantidad conocida de muestra, añadiéndose una cantidad de H_2SO_4 1 M y se colocó en un baño ultrasónico, posteriormente se llevó a baño maría, donde se efectuó una hidrólisis ácida, para después centrifugar la muestra. La alícuota para el análisis de proteínas totales se realizó con una cantidad conocida de muestra filtrada a través de un filtro Whatmann GF/C, al cual se le adicionó una cantidad conocida de NaOH 0.5 M aplicando la metodología utilizada por Hernández-Sandoval, (1991) citado en Sánchez-García, (2013).

2.2.4 Determinación del contenido de carbohidratos

La determinación del contenido de carbohidratos, se cuantificó por el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. Las concentraciones se calcularon mediante una curva estándar hecha con glucosa (Anexo A).

2.2.5 Determinación de proteínas

En el análisis del contenido de proteínas se empleó el método de Lowry et al., (1951). Se determinó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. Las concentraciones fueron calculadas por medio de una curva de calibración preparada con un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (Anexo A).

2.2.6 Determinación del contenido de lípidos

El análisis del contenido lipídico de la biomasa se efectuó mediante la floculación de la microalga con un polímero catiónico de alto peso molecular. Se realizó un diseño experimental 2^2 para determinar la dosis adecuada del floculante así como de las rpm necesarias para formar los agregados (Figura 2.2) (Anexo D). La biomasa floculada se secó en estufa a 60 °C durante 6 h, posteriormente se trituró en un mortero.

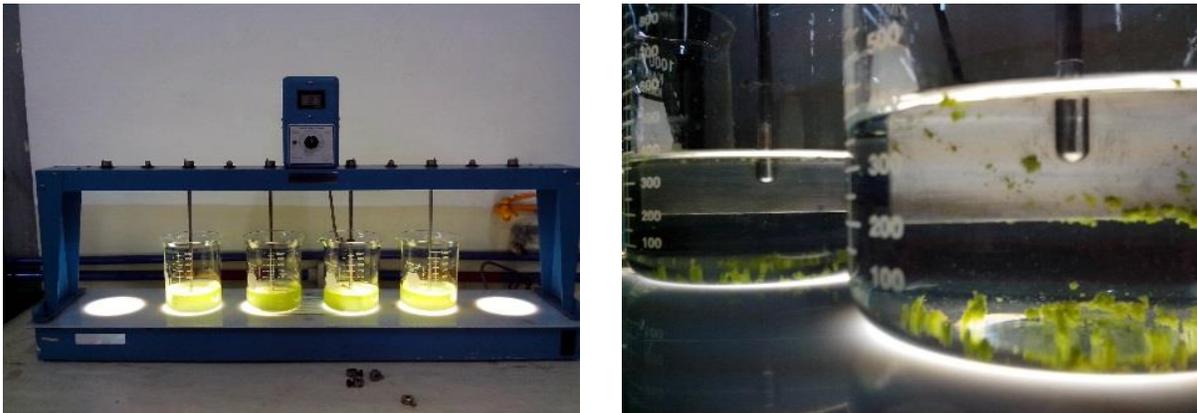


Figura 2.2 Floculación de la microalga

La cuantificación del contenido de lípidos se efectuó con el método reportado por Bligh y Dyer, (1959), empleando cloroformo, metanol y agua. Las ventajas de esta metodología son su alta eficiencia de extracción (95 %) (Domínguez, 2013).

2.2.7 Determinación del contenido de pigmentos

La determinación del contenido de clorofilas se llevó a cabo filtrando un volumen conocido de muestra a través de un filtro de fibra de vidrio GF/C. Para calcular la concentración de clorofila *a* y *b*, se aplicó la fórmula bicromática de Jeffrey y Humphrey, (1957) citados en Ritchie, (2006) y la fórmula para el contenido de carotenoides totales en el extracto de Strickland y Parsons, (1972) citados por Rodríguez-Amaya, (2004). Se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro a las longitudes de onda de 480, 630, 647, 664 y 750 nm, donde esta última se empleó como corrección por turbidez.

2.2.8 Determinación de ficobiliproteínas

Se realizó la extracción con tolueno, al finalizar se midió la concentración de ficocianina como pigmento mayoritario de las ficobiliproteínas. Este método es rápido y sencillo, pero el tolueno es un disolvente orgánico tóxico, por lo que debe manipularse siempre con guantes y en campana extractora según Blumwald y Tel-Or, (1982) citados en Gómez et al., (2009).

2.3 Limpieza de los fotobiorreactores

Al iniciar la experimentación, se aplicó una esterilización física y/o química, para eliminar los posibles residuos de suciedad y biomasa provenientes de experimentos anteriores.

2.3.1 Esterilización química

La metodología se siguió de acuerdo a lo propuesto por Sánchez-Mirón, (2002). Se preparó una solución de ácido clorhídrico, 35 % p/p, y se dejó airear la mezcla por al menos 2 h. Posteriormente el reactor se vació y se enjuagó con agua destilada. Para su esterilización, los reactores fueron lavados con agua destilada y una solución de

hipoclorito de sodio al 10 %, después fueron vaciados y enjuagados con agua estéril. Para comprobar la completa eliminación del cloro se tomó una muestra en un colorímetro al cual se le agregó una pastilla de ortotoluidina.

2.3.2 Esterilización por autoclave

El uso de la autoclave se empleó para materiales, soluciones y medios de cultivo con nutrientes en donde el espacio requerido no era impedimento para su esterilización.

2.3.3 Adecuación del área de trabajo

Para la realización del experimento se ejecutó un arreglo en el montaje de los fotobiorreactores para controlar las variables ambientales y así lograr el estudio del efecto de los parámetros de operación en la obtención de pigmentos fotosintéticos. Debido a que la cantidad de luz externa puede ocasionar ruido durante el análisis de este factor, se decidió aislar el cultivo para evitar interferencias que alteren la respuesta (Figura 2.3).

El cultivo se efectuó en matraces Erlenmeyer de dos litros con un área de iluminación de 0.0701 m². La dosificación de aire se realizó utilizando dos bombas (Elite 802). Las características de los fotobiorreactores se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Descripción de los fotobiorreactores utilizados

Sección	Descripción
Reactores	Matraces Erlenmeyer de 2 L
Capacidad	Volumen de trabajo de 2 L
Área iluminada	0.0701 m ²
Operación	Por lote
Aireación	0.025 vvm

Los fotobiorreactores se mantuvieron en periodos de iluminación de 12 h luz/oscuridad. La iluminación fue proporcionada por cuatro tiras de LED's azules para cada matraz. La iluminancia se ajustó por medio de un control manual para regular el voltaje de alimentación de las tiras.



Figura 2.3 Montaje final de los fotobiorreactores

La Figura 2.3 muestra el arreglo de los 8 fotobiorreactores, los cuales estuvieron alimentados por dos bombas de aire para pecera y colocados a modo de baño maría para el control de la temperatura.

2.3.4 Adecuación del cultivo

Se preparó un cultivo en fase exponencial para consecutivamente inocularlo al 15 – 30 % (v/v) (variando en varios casos, según la concentración celular final deseada) por cada litro de medio de cultivo. El pH del medio se ajustó a 7 con H_2SO_4 o NaOH diluidos según el pH que presentara inicialmente. Posteriormente el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.05 bar por 15 min.

2.3.5 Exploración de la región experimental

Para determinar el efecto de condiciones extremas de temperatura y de iluminación en la producción de pigmentos fotosintéticos de la microalga *Chlorella* spp. se experimentó con valores límite para valorar la producción de pigmentos y la producción de biomasa, los valores se detallan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Factores y niveles del diseño factorial 2³

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Iluminación	300 lux	1000 lux
Temperatura	8°C	37°C
Concentración de CO ₂	2 % (v/v)	5 % (v/v)

En la Tabla 2.3 se muestran las condiciones a las que fue sometido cada fotobiorreactor. Se realizaron dos réplicas para determinar el error experimental, las variables de respuesta fueron el contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales. Durante esta etapa se monitoreó el crecimiento diario, el pH y la alcalinidad durante 15 días. Se realizó un seguimiento diario del incremento del oxígeno disuelto al tratamiento con mayor productividad.

Tabla 2.3 Valores codificados

Matraz	Iluminación	Temperatura	CO₂
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

2.4 Diseño experimental 2² con luz fluorescente

Se realizaron cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen útil de 200 mL. Los fotobiorreactores se mantuvieron en agitación continua mediante aire proporcionado por una bomba de pecera, teniendo como fuente de iluminación una lámpara fluorescente de 30 W con una iluminación 12/12 h. El control de temperatura se describe en la sección 2.9.1. La Tabla 2.4 muestra las condiciones a las que se sometieron los fotobiorreactores y en la Tabla 2.5 se muestran los tratamientos con sus valores codificados.

Tabla 2.4 Condiciones de operación en el diseño 2²

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Iluminación	800 lux	1700 lux
Temperatura	20 °C	28 °C

Tabla 2.5 Valores codificados

Fotobiorreactor	Iluminación	Temperatura
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Como variable de respuesta se midió el peso seco, se monitoreó el pH y el crecimiento celular. El experimento se realizó durante 10 días tomando muestras diariamente a la misma hora.

2.5 Aplicación del diseño experimental 2³

Con base en los resultados obtenidos en el diseño experimental 2² se procedió a aplicar el diseño experimental 2³, salvo que en esta ocasión se acotaron los valores de temperatura y aumentaron los valores de la iluminación a las mejores condiciones obtenidas en el diseño experimental 2² que se especifica en la sección 2.4. Las

variables de respuesta fueron el contenido de carbohidratos, proteínas, clorofila *a* y *b*, carotenoides totales y peso seco. Durante el desarrollo del experimento se monitoreó el pH y el crecimiento celular por 10 días. Los valores aplicados se muestran en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6 Nuevas condiciones de operación de los fotobiorreactores en el diseño 2³

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Iluminación	1000 lux	4000 lux
Temperatura	20 °C	28 °C
Concentración de CO ₂	2 % (v/v)	5 % (v/v)

2.6 Diseño factorial 3 X 2

Se aplicó el diseño factorial con dos factores 3 X 2 con el objetivo de comparar la producción de biomasa con los medios de cultivo f/2 y BBM (Banco Español de Algas, 2015) en la microalga *Chlorella* spp. y bajo tres distintas iluminancias. El volumen de trabajo, fuente de iluminación, ciclos de luz/oscuridad y la agitación fueron las mismas que en los diseños experimentales 2² para *Chlorella* spp. y *Arthrospira maxima*.

La temperatura de operación se mantuvo en condiciones ambiente dentro del laboratorio (25 ± 2 °C). Se realizaron tres réplicas y las variables de respuesta fueron el peso seco y el contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales. Se realizaron las pruebas durante 10 días, monitoreándose diariamente el pH y la concentración celular. La Tabla 2.7 muestra las condiciones en las que se realizaron los experimentos.

Tabla 2.7 Condiciones de operación en el diseño 3 X 2

Factor	Niveles
Iluminación	4000, 2000 y 1000 luxes
Medio de cultivo	F/2 y BBM

2.7 Adaptación en un fotobiorreactor de columna

De acuerdo a las mejores condiciones de iluminación, nutrientes y dosis de CO₂ obtenidas en los diseños experimentales, se modificó el diseño original de un fotobiorreactor de columna utilizado por Caballero, (2013) y Domínguez, (2014). Se realizaron modificaciones al diseño original para poder vigilar el factor temperatura. El control se realizó por medio del baño termocirculador, colocando un recipiente de 2 L de capacidad a modo de baño conteniendo en su interior una bomba de agua para recircular el medio de cultivo a la columna (Figura 2.4).

Tabla 2.8 Condiciones de operación del fotobiorreactor de columna

Parámetro	
Temperatura	25 °C
Iluminación	4000 lux
Concentración de CO ₂	2 % (v/v)
Medio de cultivo	BBM

El recipiente se mantuvo iluminado con 11 tiras LED's. La entrada del medio de cultivo fue por la parte superior y la salida por la inferior de la columna, ambas provenientes del recipiente. El suministro de aire y de CO₂ se realizó por la parte inferior de la columna pasando previamente por un filtro de 0.45 µm para evitar el paso de contaminantes no deseados. La Tabla 2.8 resume las condiciones en las que se operó la columna.

Tabla 2.9 Descripción del fotobiorreactor operado (Modificado de Domínguez, 2014)

Sección	Descripción
Fotobiorreactor	Tubo de acrílico de 4.4 cm de diámetro y 1 m de longitud
Capacidad	Volumen de trabajo 3 L
Iluminación	Lámpara de luz LED y 11 tiras LED's de color azul
Suministro de gas	Difusor de gas en forma esférica

Los fotoperiodos fueron 16:8 h luz/oscuridad. La cantidad de inóculo en fase exponencial fue del 30% v/v. La Tabla 2.12 muestra los datos condensados del diseño del fotobiorreactor. La Tabla 2.9 condensa los parámetros de operación del fotobiorreactor de columna.



Figura 2.4 Modificaciones al fotobiorreactor tubular

- a) Fotobiorreactor de columna. b) Recipiente de intercambio de calor. c) Salida de flujo de la columna y filtro de entrada de aire.

2.8 Determinación de parámetros cinéticos

2.8.1 Tasa de crecimiento celular

La mayoría de las microalgas se reproduce mediante división binaria, la tasa de crecimiento celular se puede obtener directamente en número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de biomasa, utilizando logaritmos en base 2 (2.1) (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

$$\mu_2 = \frac{\ln\left(\frac{x_2}{x_1}\right)}{[t_2 - t_1]} \quad (2.1)$$

Donde:

μ_2 es la velocidad o tasa de crecimiento

x_1 y x_2 es la concentración determinada en los tiempos t_2 y t_1

2.8.2 Tasa de crecimiento acumulada

Para seleccionar el momento más adecuado para la cosecha de los cultivos de microalgas es necesario determinar el inicio y final, por lo que no es fácil reconocerlos utilizando las curvas de dispersión de concentración celular graficada contra el tiempo. Para facilitar esta selección es recomendable graficar contra el tiempo la suma progresiva de las tasas de crecimiento μ_2 diario en la ec. (2.2) (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

$$\sum \mu_2 \quad (2.2)$$

Donde

μ_2 es la suma progresiva de las tasas de crecimiento

2.8.3 Determinación del modelo matemático corregido de Gompertz.

Se modeló el comportamiento de *Chlorella spp.* en función de condiciones determinadas de temperatura, iluminación y % CO₂, de acuerdo al modelo corregido de Gompertz (2.3) (Vásquez-Villalobos et al., 2013).

$$YA = a * \exp[-\exp(b - c * TA)] \quad (2.3)$$

Donde:

YA= log (Nt/N₀); Nt recuento microbiano al tiempo TA (células/mL)

N₀: recuento inicial en el tiempo inicial (células/mL)

a: valor máximo de biomasa

b y c: parámetros del modelo

TA: tiempo (h)

De éstos parámetros se derivan:

λ (tiempo de latencia) = (b-1)/c [h]

μ_{max} (velocidad específica de crecimiento) = a*c [h⁻¹]

G (tiempo de generación) = ln(2)/ μ_{max} [h]

2.8.4 Productividad de la biomasa

La productividad de biomasa se determinó como productividad máxima (P_{max}) de acuerdo con la siguiente expresión (2.4) (Jacob-Lopes et al., 2007).

$$P_{max} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (2.4)$$

Donde

X_0 es la concentración inicial de biomasa (g/L) al tiempo t_0

X_t es la concentración de biomasa (g/L) en cualquier tiempo t

2.8.4.1 Tasa de fijación del CO₂

La tasa de fijación de CO₂ (P_{CO_2}) se evaluó como la relación entre el contenido de carbono en las células y la productividad de biomasa de las microalgas (Jacob-Lopes et al., 2009) de acuerdo con la ecuación (2.5).

$$P_{CO_2} = C_c P_{max} \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (2.5)$$

Donde

C_c es la cantidad de carbono en las células de *Chlorella* spp.

M_{CO_2} es el peso molecular del CO₂

M_C es el peso molecular del carbono

P_{max} es la productividad de la biomasa

2.9 Control de las variables empleadas en los diseños experimentales

Para la realización del experimento en condiciones de operación controladas se realizaron diversos ajustes para controlar temperatura, iluminación y la cantidad de CO₂ suministrado.

2.9.1 Temperatura

El control de temperatura se realizó con ayuda de un baño termocirculador con controlador de temperatura digital Thomas Scientific (modelo 1O110160). Se verificó que la temperatura fuera homogénea en todos los fotobiorreactores.

2.9.2 Nivel de iluminación

La medición del nivel de iluminación se evaluó con un luxómetro Steren (modelo HER - 410). Las lecturas se tomaron al nivel de la superficie de los fotobiorreactores.

2.9.3 Alimentación de CO₂

El suministro de CO₂ se realizó para controlar el pH en el medio de cultivo. Se dosificó un flujo de 17.64 mL/min en las concentraciones adecuadas a cada fotobiorreactor.

2.9.4 pH

Se realizaron lecturas diarias del pH con un potenciómetro Orion (modelo 250-A), con el objetivo de medir las variaciones en el medio de cultivo.

2.9.5 Alcalinidad total

Esta determinación se realizó empleando la NOM-AA-036-SCFI-2001. Ávila-López et al., (2010) reportan que existe una dependencia de la tasa de crecimiento sobre la exudación de compuestos orgánicos al medio, generados como producto del metabolismo celular y que a su vez afectan la alcalinidad total del sistema.

2.9.6 Determinación de oxígeno disuelto

El seguimiento del incremento de oxígeno disuelto fue medido por el método yodométrico incluido en la NMX-AA-012-SCFI-2001.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El capítulo describe los resultados obtenidos en las etapas experimentales para el cumplimiento de los objetivos generales y particulares con la finalidad de obtener el mejor tratamiento que ofrezca el mayor contenido de pigmentos fotosintéticos en la microalga *Chlorella* spp. Todos los valores promedio para cada determinación se encuentran en el Anexo B para mayor información.

3.1 Diseño experimental 2³ en condiciones extremas de temperatura e iluminación

3.1.1 Densidad celular

En la Figura 3.1 los fotobiorreactores 3 y 7, los cuales fueron sometidos a una temperatura de 37 °C y 300 lux, no mantuvieron una tendencia de crecimiento similar a la curva teórica de crecimiento microbiano. Mientras que en los fotobiorreactores 1 y 5 tratados con una temperatura de 8 °C y 300 lux, se observó discretamente el comportamiento teórico.

Los fotobiorreactores 1, 3, 5 y 7 fueron tratados con una iluminación de 300 lux, pero con distintos niveles de temperatura y de dosis de CO₂ (2 % y 5 %), en donde se observó que una alta temperatura repercute en el crecimiento, mostrándose más tolerantes a una temperatura baja (8 °C). Aparentemente no se manifestó alguna variante en los niveles aplicados de CO₂ en la densidad celular. En éstos tratamientos la máxima densidad celular no alcanzó a superar el valor de $6.8 \times 10^6 \text{ cel / mL}$ pudiéndose atribuir la causa a una elevada mortalidad que se presenta al someter a la microalga a temperaturas extremas y/o a un efecto inhibitorio por la baja intensidad luminosa.

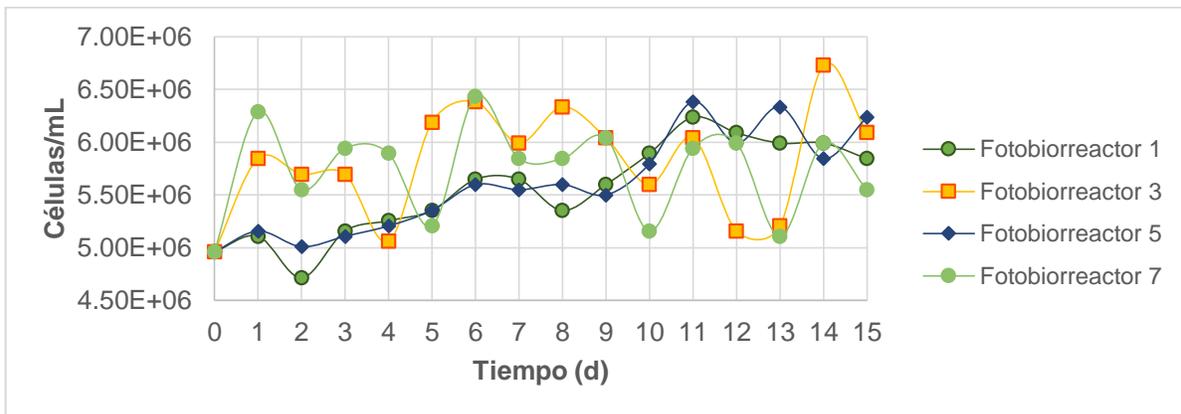


Figura 3.1 Densidad celular promedio a 300 lux

En contraparte, en la Figura 3.2, los fotobiorreactores 2, 4, 6 y 8 con niveles altos de iluminación de 1000 lux, mostraron el mayor crecimiento celular al día 11. El fotobiorreactor 2 tratado con una temperatura de 8 °C y una dosis de CO₂ del 2 %, obtuvo la mayor concentración celular final de $8.35 \times 10^6 \text{ Cel} / \text{mL}$.

Una forma de validar estadísticamente el efecto de estos factores en el crecimiento celular es realizando el análisis estadístico del diseño empleando como variable de respuesta el peso seco como medida del crecimiento celular, sin embargo, en esta etapa, el objetivo estuvo enfocado en medir el contenido de pigmentos en condiciones extremas de iluminación y temperatura.

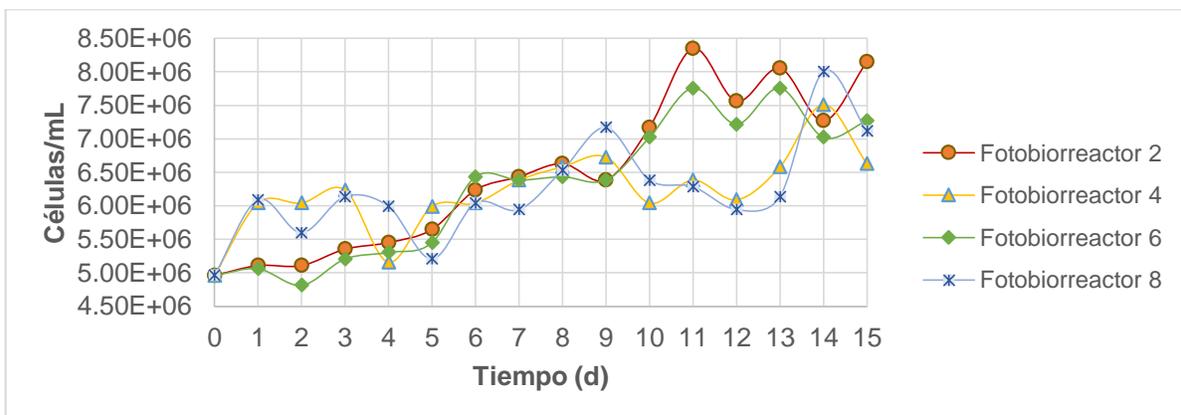


Figura 3.2 Densidad celular promedio a 1000 lux

Caballero, (2013) presentó una densidad celular mayor para esta microalga de $21.45 \times 10^6 \text{ Cel} / \text{mL}$ a una temperatura de 30 °C bajo la iluminación de una lámpara fluorescente.

Como se mencionó en el primer capítulo, la temperatura adecuada para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se encuentra entre 20 y 24 °C, pero a temperaturas menores de 16 °C el crecimiento disminuye, mientras que a temperaturas mayores de 35 °C es letal para mayoría de las microalgas.

Zhang et al., (2015) realizaron un experimento en el cual mostraron que la microalga *Chlorella* sp. era capaz de crecer en un rango de temperaturas de 12 °C a 25 °C, pero a una temperatura de 38 °C difícilmente crecía. En un cultivo por lotes realizado durante 15 días obtuvieron 13.8 mg/L de biomasa a 18 °C.

El propósito del empleo de bajos niveles de iluminación se debe a que en condiciones de baja irradiancia, el nivel de clorofila aumenta para poder captar la energía luminosa y así realizar el proceso fotosintético, es decir, se hace más eficiente el aprovechamiento de la luz. Sin embargo, si las células se aclimatan a niveles altos de iluminación, el nivel de clorofila decrecerá, aumentando el nivel de carotenos (pigmentos accesorios fotoprotectores) para evitar un daño a los fotosistemas (fotooxidación).

Varios autores, entre ellos Rosales-Loaiza et al., (2008) reportan que una baja iluminación incrementa el contenido de pigmentos, mientras que una alta iluminación incrementa la producción de proteína. El nivel alto de iluminación se utilizó a 1000 lux debido a las limitaciones de fábrica de las LED's.

Atta et al., (2013) concluyeron que el uso de la luz LED azul disminuye el tiempo de cultivo de *Chlorella vulgaris*. En su experimentación, pasaron de 10 días de cultivo con una luz fluorescente blanca a 8 días con luz LED azul. Además, se presentó una menor disipación de calor al cultivo y el consumo energético fue bajo. Una ventaja que mencionan es que la longitud de onda de las LED's azules tiene una mayor penetración

en el cultivo, por lo que resulta un recurso energético eficiente para el cultivo a altas densidades celulares.

3.1.2 pH

El comportamiento del pH se mantuvo dentro de los valores aceptables para esta microalga (7 y 9). En la Figura 3.4 y Figura 3.5 se observó el aumento del pH al primer día de cultivo como consecuencia del incremento celular. Es de recalcar que el incremento del pH se relaciona con el incremento de la biomasa que se da en la fase exponencial.

Khalil ZI et al., (2010) citados en Gong et al., (2014) demostraron que *Chlorella* es capaz de crecer en un amplio rango de pH (4-10) teniendo el mayor rendimiento de la biomasa bajo condiciones alcalinas (de 9 a 10).

En la Figura 3.3 los fotobiorreactores 3 y 7 tienen valores superiores de pH en comparación a los fotobiorreactores 1 y 5, como consecuencia del mayor incremento de la densidad celular acaecido durante los primeros días de cultivo.

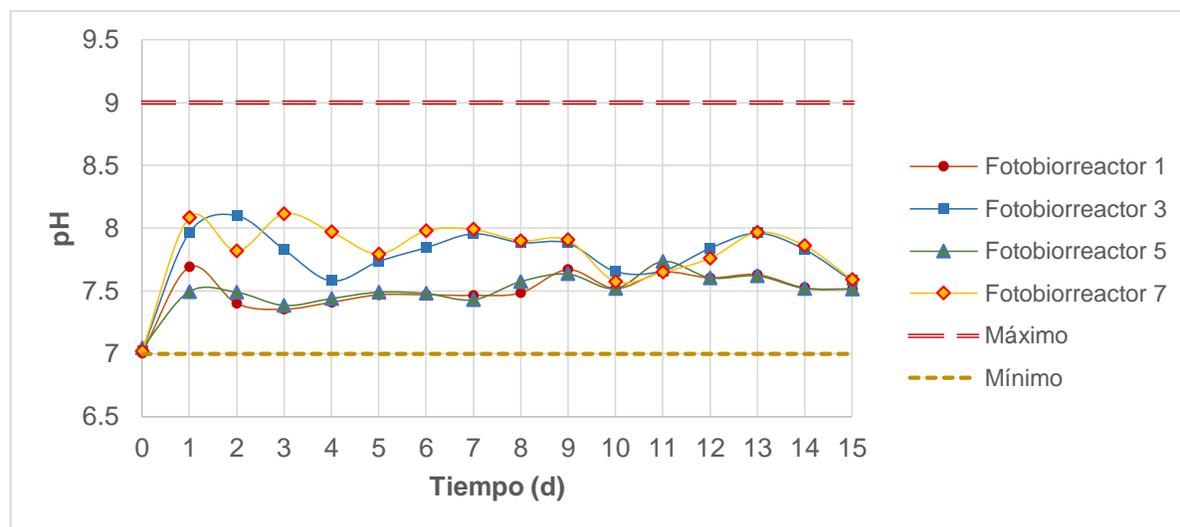


Figura 3.3 Comportamiento promedio del pH a 300 lux

Paralelo al comportamiento del pH observado en la Figura 3.3, en la Figura 3.4 se observa un comportamiento similar para los fotobiorreactores 4 y 8, los cuales exhibieron en el primer día el mayor incremento en la densidad celular, no obstante, al final de la experimentación tienden a decrecer sus valores de pH, por lo que la densidad celular entró en la fase meseta.

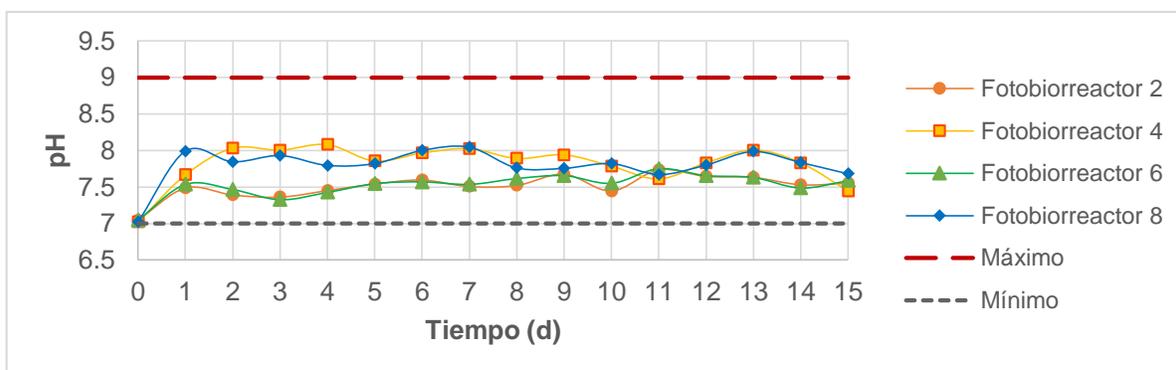


Figura 3.4 Comportamiento promedio del pH a 1000 lux

3.1.3 Alcalinidad

El aumento de la alcalinidad se relaciona con el aumento de la densidad celular del cultivo, por lo que en la Figura 3.5 el valor de la alcalinidad no varió debido al bajo incremento de la densidad celular en estos tratamientos. El valor de la alcalinidad se mantuvo en el rango de 30 y 70 mg de CaCO_3 para todos los tratamientos.

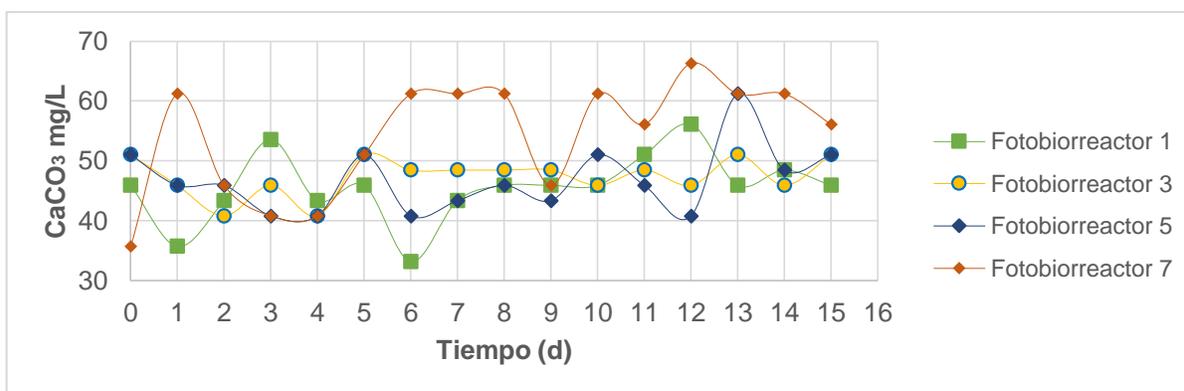


Figura 3.5 Comportamiento promedio de la alcalinidad total a 300 lux

Los fotobiorreactores 2 y 4 mostraron un mayor incremento en la densidad celular, mostrando un aumento en la relación del incremento de la alcalinidad con el crecimiento celular como se observa en la Figura 3.6.

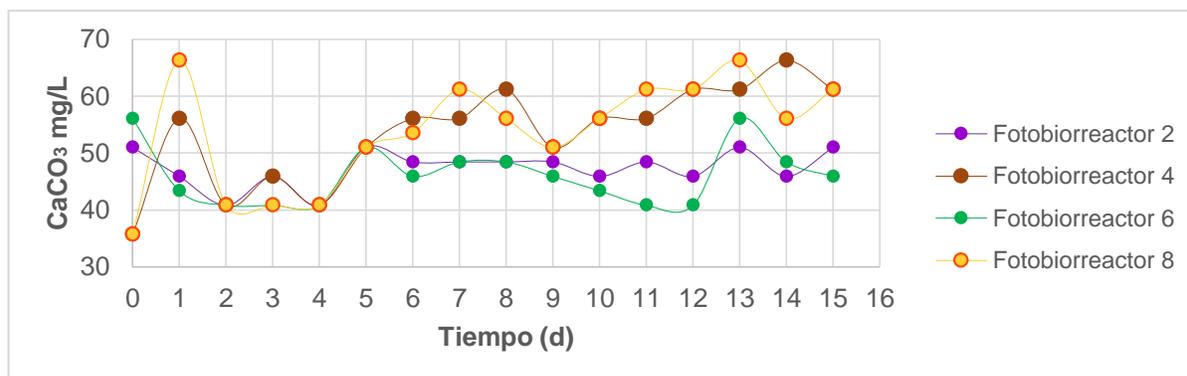


Figura 3.6 Comportamiento promedio de la alcalinidad a 1000 lux

Zhang et al., (2014) plantearon la hipótesis de que el aumento de la alcalinidad después de 8 días de cultivo podría ser debido al consumo de nitrato, la absorción de CO_2 y la exudación de las algas en la fase estacionaria.

3.1.4 Análisis de la variable de respuesta lípidos totales

Se realizó el análisis estadístico del contenido de lípidos mediante el software Minitab versión 17. Se analizó el ANOVA para todos los efectos, pero como no todos resultaron significativos, se procedió a la búsqueda del mejor ANOVA para incluir únicamente los términos que resultaran significativos, no obstante, después del análisis no se realizó debido a que la interacción Iluminación, temperatura y % CO_2 resultó ser significativa. Para no alterar el modelo final y cuidar que fuera jerárquico, se analizaron las gráficas de residuos encontrando una forma de corneta en los residuos contra los ajustados. Dado el valor de p significativo en la mayoría de los tratamientos en el ANOVA y para estar seguros, se procedió a solucionar el problema de falta de normalidad y de varianza constante, aplicando la transformación de

Box Cox (Tabla 3.1) utilizando el programa Minitab, el cuál encontró el mejor valor de λ .

Gutiérrez y de la Vara, (2008) mencionan que en la práctica existen variables que no siguen una distribución normal debido a que en ciertas distribuciones (Poisson, binomial, Gamma, etc.) la media está relacionada con la desviación estándar (variabilidad) y que al cambiar la media de un tratamiento a otro, cambia con ello la variabilidad de la respuesta.

Tabla 3.1 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	-1
λ estimado	-1.49587
IC de 95% para λ	(-3.57037, 0.436629)

El ANOVA para las variables transformadas de todos los tratamientos se muestra en la Tabla 3.2. Se observa que la mayoría de los términos resultaron concluyentemente significativos, a excepción del efecto de la interacción de la iluminación con el % CO₂.

Tabla 3.2 Análisis de varianza para lípidos con la variable transformada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.000655	0.000655	590.85	0.000
Temperatura	1	0.002776	0.002776	2504.57	0.000
% CO ₂	1	0.000035	0.000035	32.00	0.000
Iluminación*Temperatura	1	0.000072	0.000072	64.57	0.000
Iluminación*% CO ₂	1	0.000000	0.000000	0.21	0.659
Temperatura*% CO ₂	1	0.000180	0.000180	162.65	0.000
Iluminación*Temperatura*% CO ₂	1	0.000024	0.000024	21.91	0.002
Error	8	0.000009	0.000001		
Total	15	0.003751			

Los efectos de interacción se muestran en la Figura 3.7. Se observó que para el caso de la interacción “% CO₂*Iluminación” las líneas se notaron paralelas, lo que demostró la poca importancia de la interacción. En la interacción “Iluminación*Temperatura” se evaluó que el efecto en la variable de respuesta iluminación es mayor cuando la temperatura es alta. En la interacción “Temperatura*% CO₂” se observó que cuando

la temperatura aumentó, el % de CO₂ debía ser bajo para aumentar el contenido de lípidos, por otra parte, sucedió lo opuesto al disminuir la temperatura.

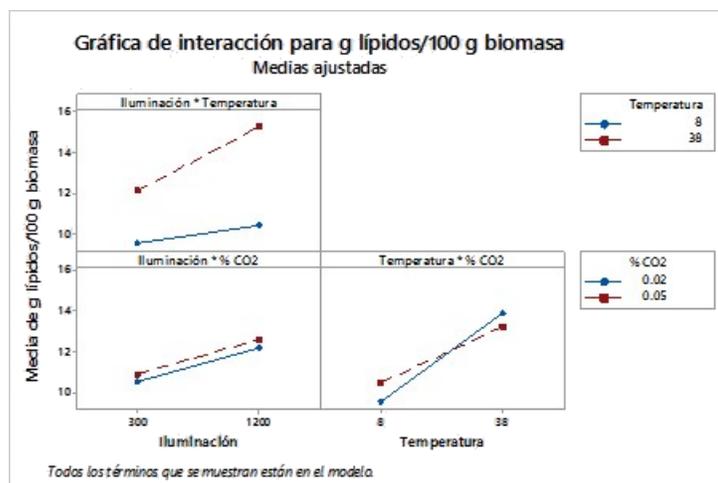


Figura 3.7 Gráfico de interacciones para la variable de respuesta

De acuerdo a la Figura 3.7 y Figura 3.8 se concluyó que las condiciones que incrementaban el contenido de lípidos en la biomasa fueron una iluminación de 1200 lux, una temperatura de 38 °C y un 5 % de CO₂.

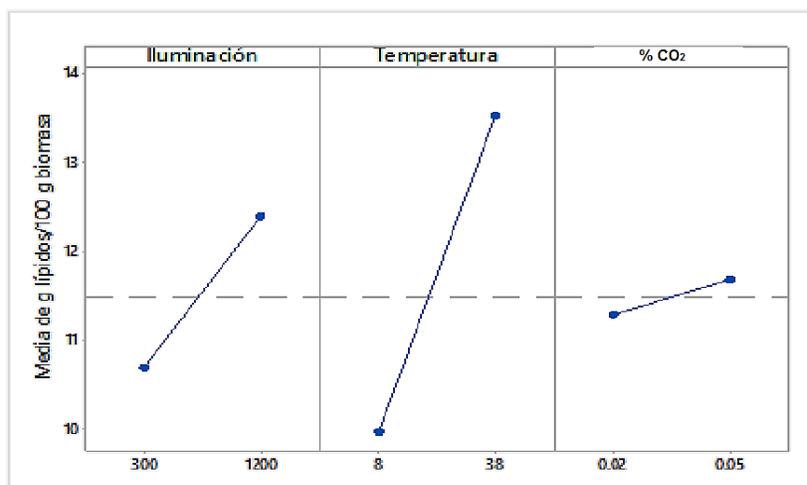


Figura 3.8 Gráfica de efectos principales para lípidos

Domínguez, (2014) reportó un valor de lípidos para *Chlorella* spp. de 13.20 g/100 g biomasa obtenidos en un fotobiorreactor tubular cultivado a temperatura ambiente y teniendo la iluminancia como factor cualitativo empleando una lámpara fluorescente con una concentración del 25 % CO₂. Con la aplicación del diseño experimental se logró el aumento en el contenido de lípidos; el mejor tratamiento logró un valor final de 16.10 g/100 g biomasa.

Converti et al., (2009) concluyeron que la variación de la temperatura y la concentración de nitrógeno influyeron fuertemente en el contenido de lípidos de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Pérez-Pazos y Fernández-Izquierdo, (2011) encontraron que para una mayor síntesis de lípidos en *Chlorella* sp., las mejores condiciones empleaban una longitud de onda de 500 nm (luz azul), una concentración de carbonato de calcio de 1.5 g/L y un fotoperiodo 18:6.

Chersilp y Torpee, (2012) encontraron que un aumento en la intensidad de la luz en las cepas de *Nannochloropsis* sp. y de la microalga marina *Chlorella* sp. incrementa el crecimiento de ambas pero su contenido lipídico se reduce, por lo que una baja intensidad de luz (2000 lux) fue más adecuada para la acumulación de lípidos, concluyendo que los niveles óptimos de intensidad luminosa para el crecimiento celular y para la acumulación de lípidos eran diferentes. Enunciando que para obtener un alto peso seco celular la intensidad de la luz se debe aumentar, pero una baja intensidad de la luz fue más favorable para la acumulación de lípidos.

Zhang et al., (2015) realizaron un estudio con la microalga *Chlorella* sp. encontrando que en un cultivo por lotes mantenido durante 15 días, el contenido de lípidos en la biomasa disminuyó linealmente de un 41.8 % a 6.9 % cuando la temperatura se elevó desde 12 °C hasta 25 °C. Hallando que el rendimiento de lípidos fue casi el mismo a una temperatura de 12 °C y 18 °C, sorprendentemente, a los 25 °C el rendimiento lipídico fue notablemente inferior (8.8 ± 1.8 mg/L).

3.1.5 Contenido de pigmentos fotosintéticos

Se realizó una medición de la clorofila *a*, *b* y carotenoides para ver los efectos que ejercían la iluminación, temperatura y % de CO₂. Los resultados se muestran en la Figura 3.9, al inicio de los tratamientos se realizó una caracterización inicial, sin embargo, se observó que en la mayoría de los tratamientos existió un decremento comparado con el tratamiento inicial.

Los fotobiorreactores 4 y 8 fueron los que mostraron un leve incremento en el contenido. La razón del decremento podría encontrarse en la iluminación baja y las temperaturas extremas. En este caso no se realizó un análisis para cada pigmento fotosintético debido a que no existió un incremento. Por el otro lado, se tomaron en cuenta estos resultados para realizar el experimento 2² en donde se lograron establecer unas condiciones apropiadas para el incremento de los pigmentos.

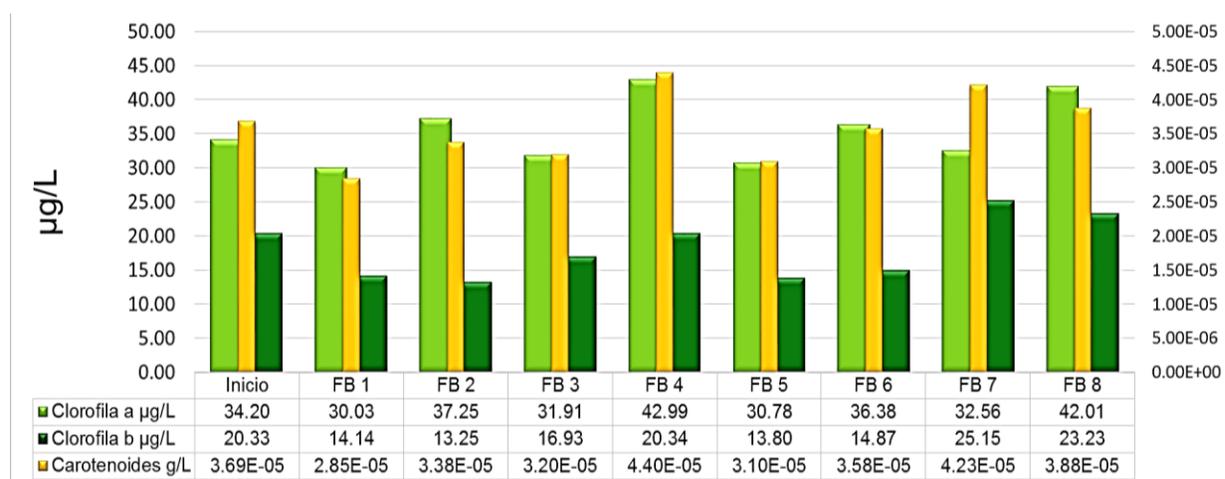


Figura 3.9 Pigmentos fotosintéticos promedio en condiciones extremas

3.2 Diseño experimental 2²

En la Figura 3.10 se muestra el crecimiento celular de la microalga *Chlorella* spp. Se observó que el tratamiento que manifestó un mayor incremento celular fue el

fotobiorreactor 4. Para realizar el análisis estadístico, se midió el crecimiento celular al final de los tratamientos utilizando la variable de respuesta peso seco.

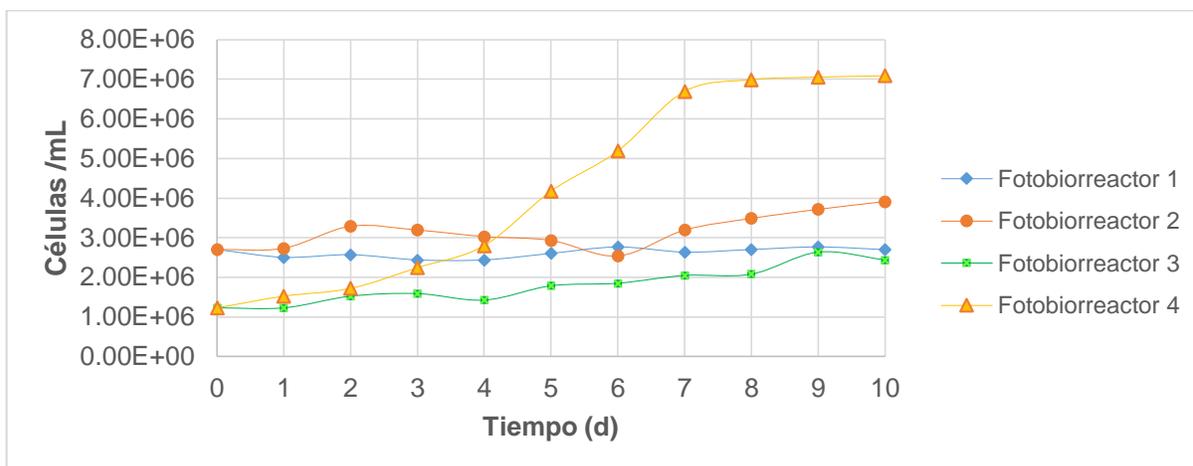


Figura 3.10 Densidad celular promedio en el diseño experimental 2²

3.2.1 Análisis de la variable de respuesta peso seco de la microalga *Chlorella* spp.

De acuerdo a la Tabla 3.3 todos los efectos principales (iluminación y temperatura), así como el efecto de interacción (“Iluminación*Temperatura”) tuvieron un efecto significativo sobre el peso seco.

Tabla 3.3 Análisis de Varianza para la variable de respuesta peso seco

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0.002318	0.000773	588.71	0.000
Iluminación	1	0.000999	0.000999	761.29	0.000
Temperatura	1	0.000527	0.000527	401.29	0.000
Iluminación*Temperatura	1	0.000792	0.000792	603.57	0.000
Error	8	0.000011	0.000001		
Total	11	0.002329			

De la Figura 3.11 se observó que cuando la iluminación fue baja, la temperatura no afectó de manera significativa el peso seco, por el contrario, cuando la temperatura fue alta, la iluminación tenía un efecto importante en el peso seco. Lo anterior tomó sentido

con base en que una alta iluminación y una temperatura adecuada favorecen el incremento de la densidad celular.

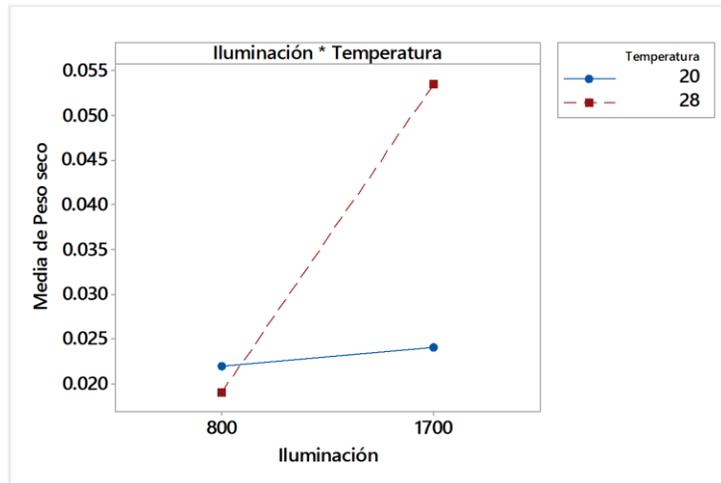


Figura 3.11 Gráfica de interacción

A partir de la Figura 3.12 se desprendió que para un mayor incremento en el peso seco, con una iluminación de 1700 lux y una temperatura de 28 °C se mejoran las condiciones de crecimiento.

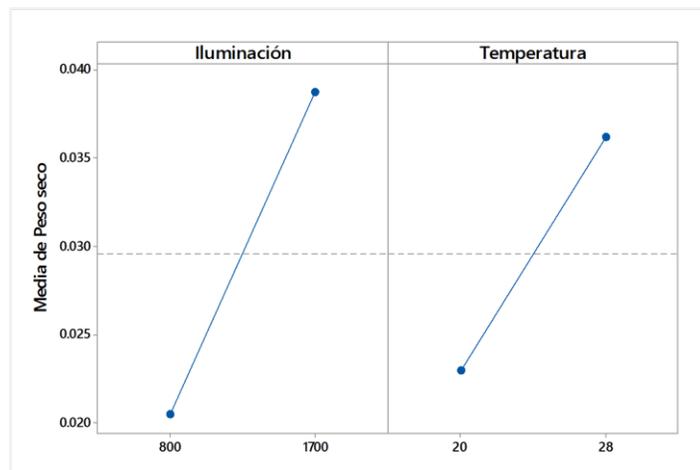


Figura 3.12 Gráfica de efectos principales

Para la realización de la prueba se empleó una lámpara fluorescente. Plasencia, (2012) concluye que es posible el cultivo de microalgas únicamente con luz roja y/o azul de LED's. Además, no observó una diferencia significativa entre la producción con LED's y la producción con lámparas fluorescentes. Obteniendo los mismos resultados, salvo por la combinación de luz roja y azul, repercutiendo en un incremento 30 % superior al cultivo en lámpara fluorescente.

Marchetti et al., (2013) evaluaron el efecto de la luz azul en la composición bioquímica de *Isochrysis* sp. encontrando que la calidad del espectro no afectó la productividad, pero dio lugar a cambios metabólicos. El cultivo bajo la luz azul resultó en altas tasas de fijación del carbono con fotosintatos incorporados en las proteínas principalmente.

En contraparte, Caner et al., (2011) evaluaron el potencial de *Chlorella Kessleri* con luz LED y luz fluorescente. Hallaron más eficiente el uso de la luz florescente en cuanto al incremento de la densidad celular. La luz roja incrementó el peso de la biomasa y la luz azul fue la más eficiente para incrementar el tamaño celular.

3.2.2 pH

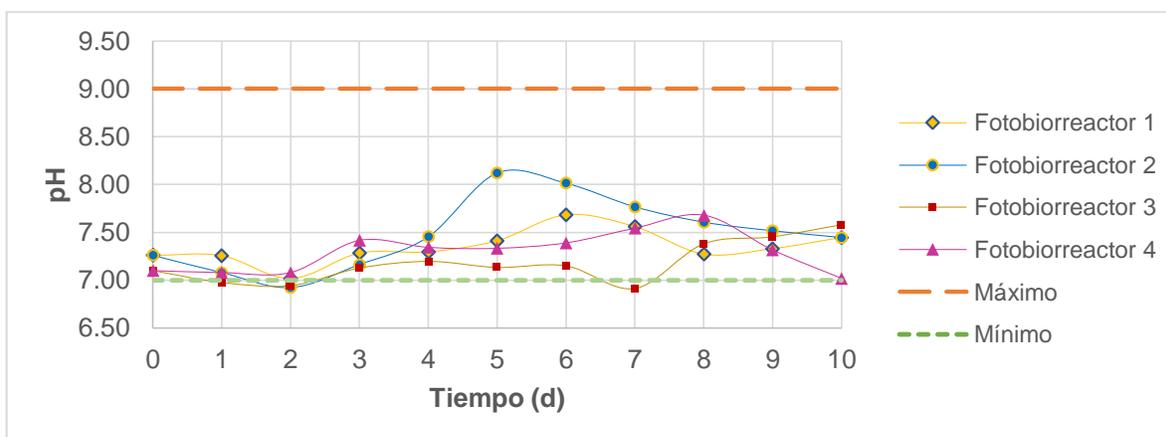


Figura 3.13 Monitoreo del pH para los fotobiorreactores (valores promedio)

La Figura 3.13 ilustra el comportamiento que mantuvieron los fotobiorreactores, se destacó que los tratamientos se conservaron dentro de los rangos aceptables de pH

para *Chlorella* spp., el fotobiorreactor 2 fue el que más elevó el pH. No existió un mayor crecimiento celular posiblemente por causa del incremento de pH, afectando el crecimiento celular e inhibiendo su crecimiento como se observó en el día 6 en la Figura 3.10, pero al día 7 se recuperó el crecimiento coincidiendo con el aumento en el nivel de pH para este tratamiento.

El pH se incrementa conforme la edad del cultivo es mayor, esto es debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrientes. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7, dependiendo de la especie (Benavente-Valdés et al., 2012).

3.2.3 Productividad

La productividad para cada fotobiorreactor se muestra en la Tabla 3.4. Cabe señalar que la productividad no se encontró en el intervalo reportado como adecuado para la microalga en la Tabla 1.2 del capítulo 1 (25-250 mg·L⁻¹·d⁻¹). El fotobiorreactor 4 fue el que mayor productividad presentó.

Tabla 3.4 Productividad obtenida

	Fotobiorreactor			
	1	2	3	4
mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹	0.85	1.05	0.55	4

3.2.4 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos

3.2.4.1 Análisis de la variable de respuesta clorofila a

La Tabla 3.5 muestra los valores obtenidos para las variables de respuesta clorofila a, en ella se observó que el efecto de la iluminación fue significativo, mientras que la temperatura y su interacción con la temperatura no lo fueron. Nótese que el valor del error es grande ya que existió una inconstancia en las observaciones de cada tratamiento. Lo anterior se debió a la variabilidad presentada en la muestra, las microalgas exhibieron una tendencia enérgica a la formación de colonias flojas, lo que

hizo difícil la separación. Otra razón se encontró en el método empleado, Peng et al., (2013) realizaron un estudio comparativo en los métodos de análisis para la clorofila *a* concluyendo que el método por fluorescencia de clorofila *a* fue el mejor para el monitoreo en el lugar y para un monitoreo de emergencia, el método espectrofotométrico fue adecuado para la determinación rutinaria, especialmente para grandes volúmenes de agua. El método por HPLC fue el recomendado por tener una alta precisión, sensibilidad, aplicación a medidas exactas, microanálisis y para la separación de pigmentos.

Tabla 3.5 Análisis de varianza para la variable de respuesta clorofila *a*

Fuente	GL	SC Ajust	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	9209.3	9209.3	6.22	0.037
Temperatura	1	6141.2	6141.2	4.15	0.076
Iluminación*Temperatura	1	348.6	348.6	0.24	0.641
Error	8	11846.3	1480.8		
Total	11	27545.4			

De la Figura 3.14 se muestra que el mayor efecto se produjo con una iluminación alta (1700 lux) y un manejo de temperatura baja (20 °C).

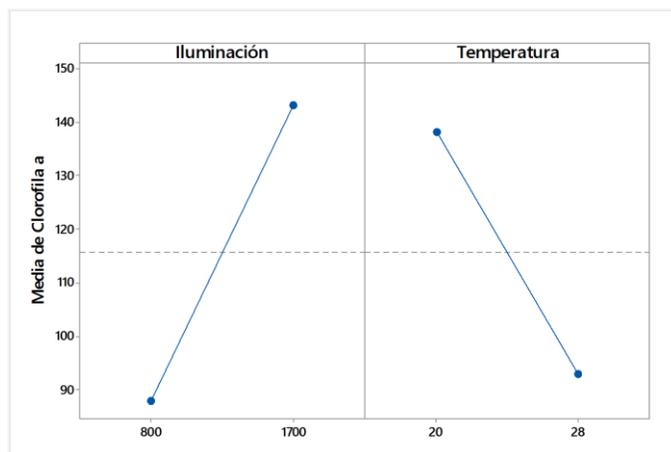


Figura 3.14 Gráfico de efectos principales para la clorofila *a*

3.2.4.2 Análisis de la variable de respuesta clorofila *b*

De la Tabla 3.6 se estimó que la iluminación exhibió un efecto significativo en el contenido de clorofila *b*. La Figura 3.15 mostró que se mejoró el contenido de clorofila *b* al aumentar la iluminación a 1700 lux y controlando la temperatura a 20 °C. Los valores reportados para la especie *Chlorella vulgaris* fueron de 11 µg/mL, la especie se cultivó en aguas residuales, con una alta concentración de CO₂ y alta temperatura (30 °C) según Chinnasamy et al., (2009).

Tabla 3.6 Análisis de varianza para la clorofila *b*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	1627.9	1627.9	15.58	0.004
Temperatura	1	307.9	307.9	2.95	0.124
Iluminación*Temperatura	1	164.4	164.4	1.57	0.245
Error	8	836.0	104.5		
Total	11	2936.3			

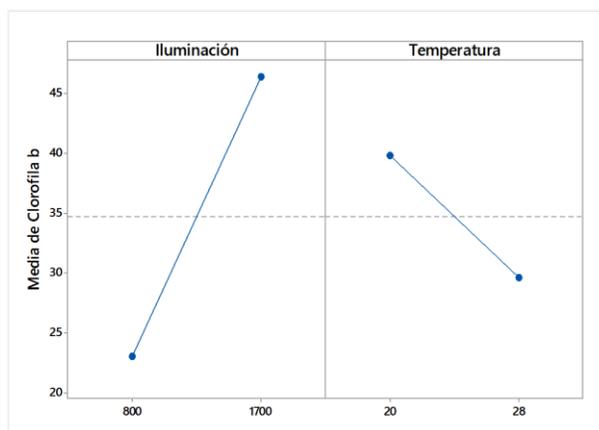


Figura 3.15 Gráfica de efectos principales para la clorofila *b*

En este experimento el mejor valor alcanzado para la clorofila *a* fue de 0.16 µg/mL y para la clorofila *b* de 0.05 µg/mL, por lo que los valores encontrados no estaban dentro del rango conveniente. Una de las probables causas fue que los niveles de iluminación no resultaron los mejores, por lo que no se logró un crecimiento adecuado, otra causa pudo deberse a que el medio de cultivo no fue el indicado. Para dar una respuesta a

las cuestiones se realizaron nuevos ensayos en los que se tomaron en cuenta las hipótesis mencionadas.

3.2.4.3 Análisis de los carotenoides totales

En la Tabla 3.7 se muestra el análisis de varianza para la variable de respuesta carotenoides totales. En ella se observó que la fuente de significancia fue la iluminación; aparte se menciona que los valores marcados en cero se debieron a que se trabajó con 5 cifras antes del punto por lo que los valores fueron ínfimos.

Tabla 3.7 Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.000000	0.000000	7.69	0.024
Temperatura	1	0.000000	0.000000	2.00	0.195
Iluminación*Temperatura	1	0.000000	0.000000	1.79	0.217
Error	8	0.000000	0.000000		
Total	11	0.000000			

De la Figura 3.16 se encontró que es posible el incremento del contenido de carotenoides totales con una iluminación de 1700 lux y manteniendo una temperatura de 20 °C.

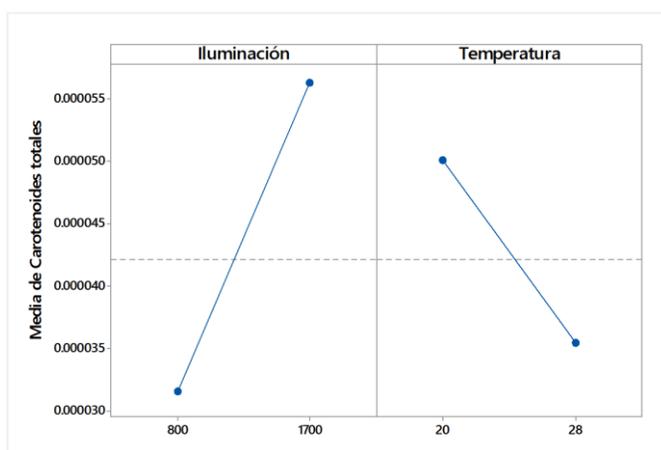


Figura 3.16 Gráfico de efectos principales para la variable de respuesta carotenoides totales

Fernández-Cordero, (2013) estudió la producción de carotenoides en la microalga

Chlorella sorokiniana para la producción de luteína, encontrando que las condiciones más favorables para el crecimiento de la biomasa fueron similares para la producción de luteína.

Zhang et al., (2013) estudiaron el efecto de la limitación de nitrógeno para la producción de aceite de la microalga *Chlorella sorokiniana* encontrando que un medio limitado en nitrógeno como factor estresante puede acelerar la acumulación de lípidos, pero conlleva a una baja en la fotosíntesis. El contenido de clorofila y carotenoides aumentó con el tiempo; durante la etapa final de formación de gotas de aceite obtuvo un contenido de carotenoides de $0.743 \pm 0.038 \mu\text{g/mL}$ en limitación por nitrógeno (sin NaNO_3) y un contenido de $4.823 \pm 0.161 \mu\text{g/mL}$ sin limitación por nitrógeno.

El mejor resultado obtenido en esta experimentación fue de $0.059 \mu\text{g/mL}$, por lo que se tomaron en cuenta éstos valores para realizar modificaciones posteriores a los niveles factoriales (Figura 3.17).

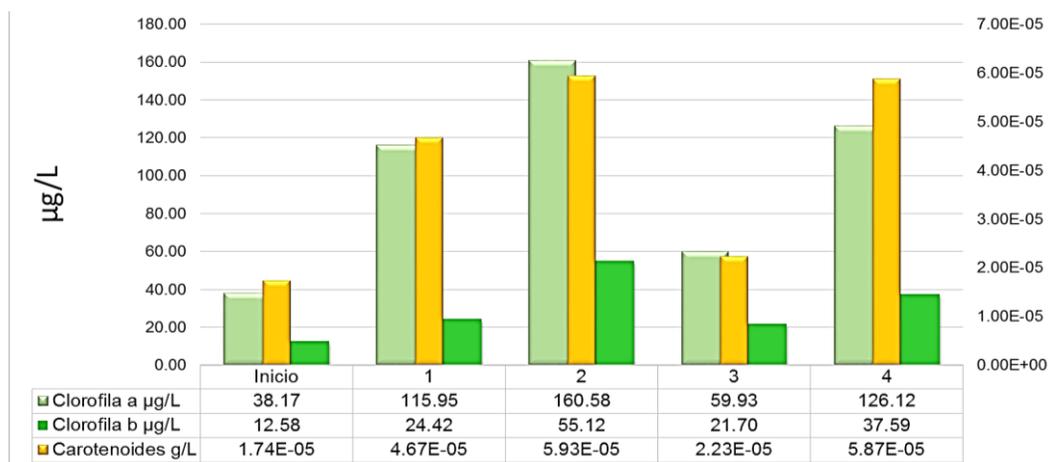


Figura 3.17 Valores promedio para el contenido de pigmentos fotosintéticos

3.3 Aplicación del diseño experimental 2^3

3.3.1 Densidad celular

Partiendo de la Figura 3.18 se observó que existió un mayor crecimiento celular en los fotobiorreactores 1 y 5, los cuales fueron tratados con 1000 lux bajo una temperatura

de 20 °C, contrastando con los fotobiorreactores 3 y 7 tratados a una temperatura de 28 °C. El tratamiento 1 alcanzó la mayor densidad celular con un valor de $3.59 \times 10^6 \text{ cel} / \text{mL}$.

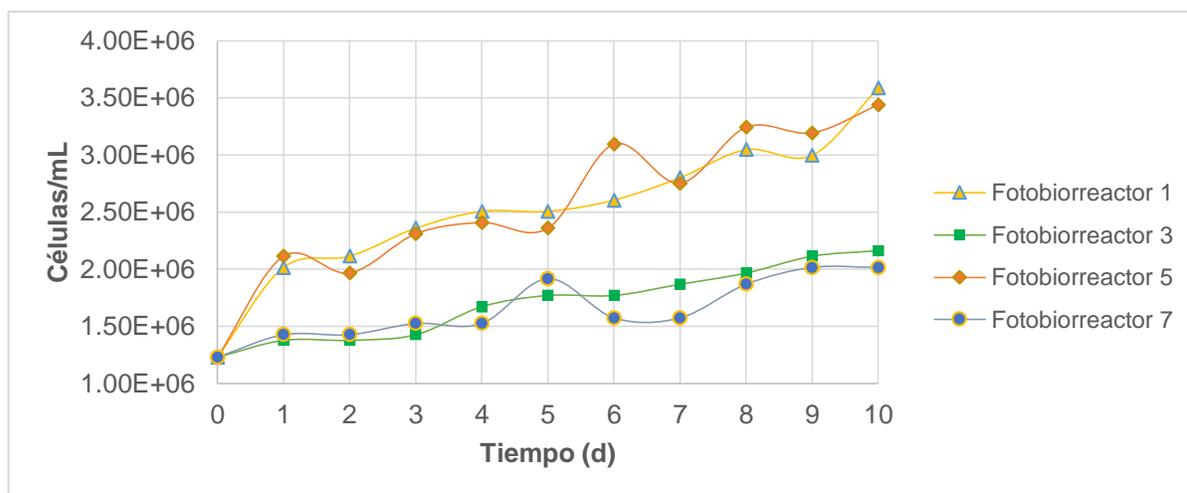


Figura 3.18 Densidad celular promedio a 1000 lux en el diseño 2³

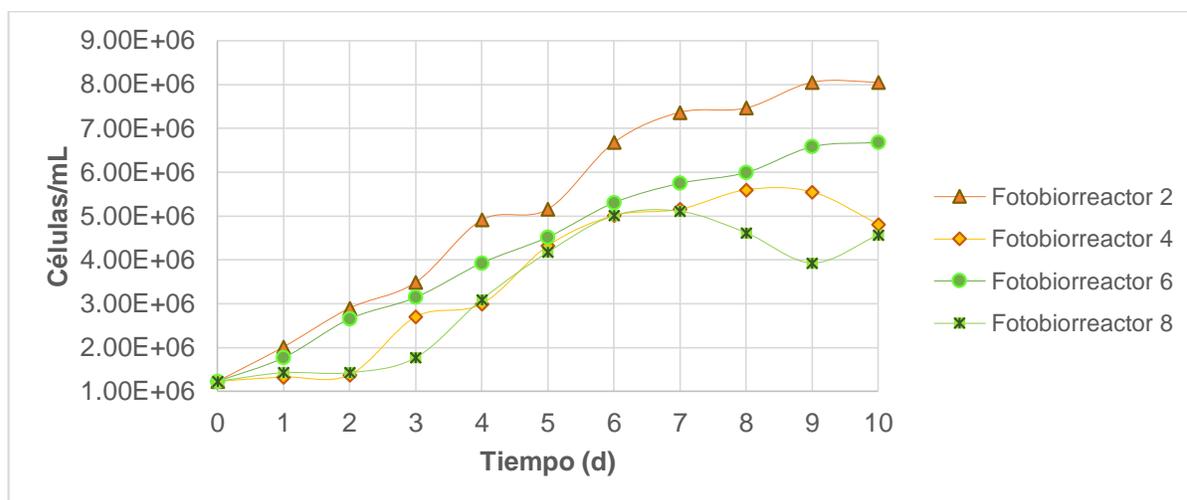


Figura 3.19 Densidad celular promedio a 4000 lux en el diseño 2³

El tratamiento 2 con una iluminación de 4000 lux y una temperatura de 20 °C obtuvo una densidad celular de $8.05 \times 10^6 \text{ cel} / \text{mL}$ (Figura 3.19). Remarcando que una alta iluminación promueve el crecimiento así como una temperatura adecuada.

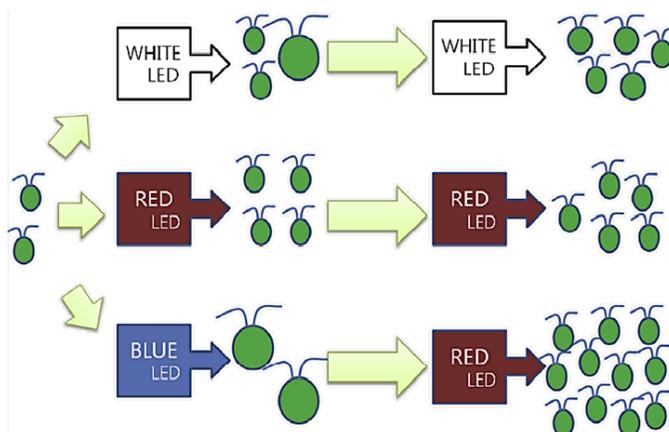


Figura 3.20 Efecto de las distintas longitudes de onda sobre la microalga *Chlorella vulgaris* (Kim et al., 2014)

Kim et al., (2014) presentaron un interesante modelo putativo usando *Chlorella vulgaris* para explicar el efecto de las distintas longitudes de onda sobre el crecimiento de la microalga (Figura 3.20). La luz azul puede aumentar el tamaño de las células, mientras que la luz roja tiene un efecto sobre la división celular, por lo que proponen el uso de luz LED azul para hacer las células más grandes, puesto que estas tienen un enorme potencial para la división celular. Posteriormente proponen una iluminación roja para ayudar a promover la división celular.

3.3.2 pH

El pH para la iluminación a 1000 lux (Figura 3.21) se mantuvo dentro del rango aceptable hasta el día 4, partiendo del quinto día se mostró un decremento en los fotobiorreactores 3 y 7 provocado posiblemente por la adaptación de la microalga a una temperatura de 28 °C. En los fotobiorreactores 1 y 5 se observó una disminución que inició a partir del día 9 motivada por la finalización de la fase exponencial del cultivo.

En la Figura 3.22 se observó que el comportamiento del pH asemejó una curva de crecimiento teórica para todos los tratamientos. En el día 1 se observó que el primer

fotobiorreactor en iniciar el incremento de pH fue el 2, seguidos al segundo día con los demás tratamientos.

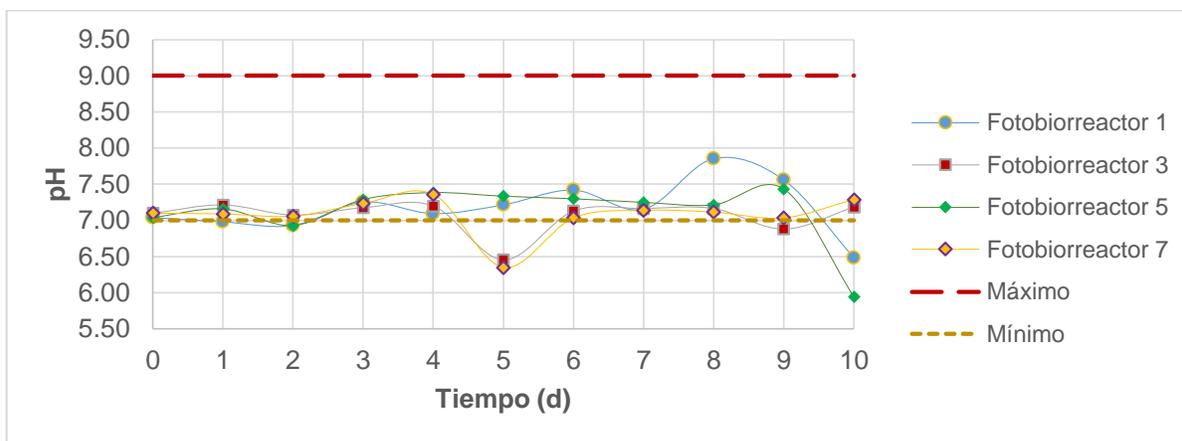


Figura 3.21 Valores de pH promedio a 1000 lux

Es trascendente que la elevación de pH se relacionó con el incremento de la densidad celular, decayendo en el día 4 hasta el día 10. Este comportamiento es explicado por el inicio de la fase meseta del cultivo en los tratamientos. El valor del pH llegó hasta 9.4 evidenciando que es factible la adición mayor de CO₂ durante la etapa de mayor incremento para lograr mantenerlo dentro de los rangos aceptables.

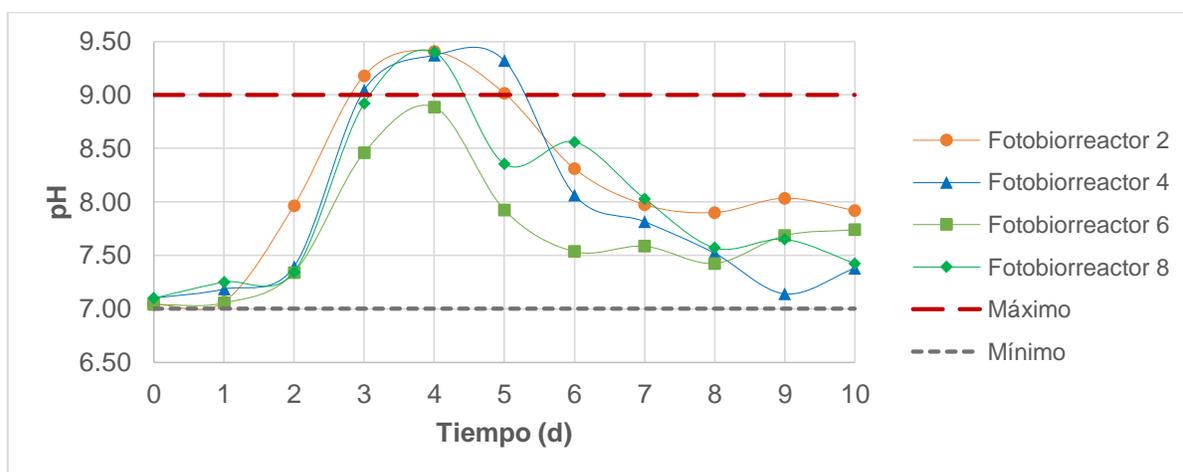


Figura 3.22 Valores de pH promedio a 4000 lux

Un valor de pH por encima de 9 no se considera adecuado por algunos autores, sin embargo, Fulke et al., (2010) estudiaron la biomitigación del CO₂, la formación de calcita y la producción de precursores simultáneos de biodiesel usando *Chlorella* sp. La microalga fue cultivada en Medio Basal Bold (BBM). Las condiciones óptimas que establecieron para obtener un alto contenido lipídico y para la producción de biomasa fueron un pH de 9.2, una temperatura de 33 °C y un 3 % CO₂.

Richmond y Grobbelaar, (1986) indicaron que si el pH aumenta a niveles de 9, el carbonato puede precipitar y por lo tanto los nutrientes no se encontrarán disponibles. El pH del medio de cultivo es un indicador de la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como de las formas en las que se puede presentar el carbono en el medio. Debido a que el pH tiene un efecto en la solubilidad de varios compuestos metálicos, un incremento puede ocasionar una deficiencia en metales traza. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que una alta temperatura (28 °C) afecta el crecimiento.

Mejía-Rendón et al., (2013) evaluaron el efecto de la concentración de CO₂ en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo cuatro diferentes tipos de iluminación LED. La más alta producción de biomasa se obtuvo con LED blanca y con un 8.5 % de CO₂. Sugiriendo que la microalga no es capaz de adaptar la producción de pigmentos fotosintéticos para absorber fuentes de luz de las que normalmente ha desarrollado. Es importantísimo señalar que encontraron que el crecimiento de la microalga fue mejor bajo la luz azul cuando se le suministró una concentración menor de CO₂ y la biomasa se mantuvo baja.

3.3.3 Análisis de la variable de respuesta peso seco de la microalga *Chlorella* spp.

En la Tabla 3.8 se muestra el mejor ANOVA con todos los efectos significativos. Es claro que no fueron significativos los efectos de la interacción “Iluminación*% CO₂” ni la interacción “Temperatura*Iluminación*% CO₂”.

Tabla 3.8 Análisis de varianza para la variable de respuesta peso seco

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.002352	0.002352	1147.44	0.000
Temperatura	1	0.000210	0.000210	102.56	0.000
% CO ₂	1	0.000042	0.000042	20.61	0.001
Iluminación*Temperatura	1	0.000020	0.000020	9.88	0.010
Temperatura*% CO ₂	1	0.000020	0.000020	9.88	0.010
Error	10	0.000021	0.000002		
Total	15	0.002666			

De la Figura 3.23 observó una interacción de la iluminación con la temperatura en donde se apreció que están casi paralelas, lo que visualmente es evidencia de una baja importancia de la interacción, por otro lado, en la interacción de la temperatura con el % CO₂ se valoró que en su nivel alto da prácticamente lo mismo utilizar la misma dosis de CO₂. Una explicación plausible es que el CO₂ se ve favorecido a baja temperatura porque no se ve afectada su solubilidad, contrario a altas temperaturas, en las cuales la solubilidad del CO₂ se ve disminuida afectando el crecimiento de la microalga.

Barajas-Solano et al., (2012) monitorearon el secuestro de CO₂ por *Chlorella vulgaris* obteniendo mejores resultados para la producción de biomasa con un 3.8 % v de CO₂ y disminuyendo la concentración de nitrógeno. Por el contrario, con un 2.3 % v de CO₂ obtuvieron una menor cantidad de biomasa.

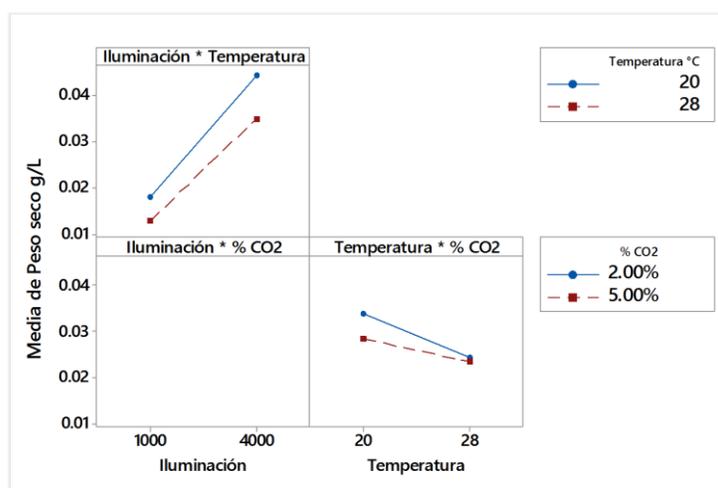


Figura 3.23 Gráfica de interacciones para la variable de respuesta peso seco

En la gráfica de efectos principales (Figura 3.24) se muestra que las mejores condiciones para la obtención de biomasa fueron una iluminación de 4000 lux, una temperatura de 20 °C y una concentración de CO₂ del 2 %.

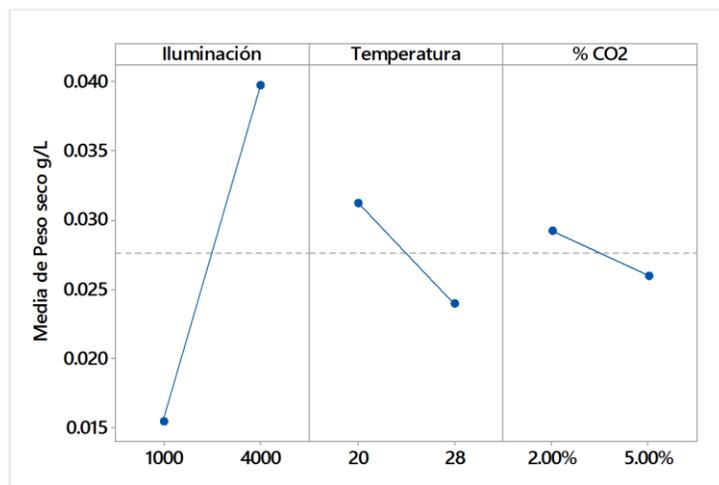


Figura 3.24 Gráfico de efectos principales para la variable peso seco

Contrastando con la dosificación del 2 % de CO₂, Zheng et al., (2012) realizaron pruebas con *Chlorella vulgaris* a partir de un medio de cultivo compuesto en parte por residuos lipídicos extraídos de la biomasa microalgal (LMBRs en inglés). Encontrando que el crecimiento de las microalgas se inhibió con un 0.03 % de CO₂ en comparación con un cultivo aireado al 5 %. Obteniendo un crecimiento óptimo al 5 %. Además, concentraciones mayores al 5 % resultaron perjudiciales para las microalgas llegando inclusive a mermar el crecimiento. Citan que la razón pudo ser un alto nivel de CO₂ y un bajo pH del medio de cultivo, lo que puede disminuir la actividad de la Ribulosa 1, 5 - Bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa (RuBisCO) provocando un efecto inhibitorio en el crecimiento. Es muy probable que ésta diferencia se deba al tiempo en el que se suministró el CO₂, ya que realizaron la aireación continuamente en sus experimentaciones.

3.3.4 Productividad volumétrica

La mayor productividad obtenida fue en el fotobiorreactor 2 que correspondió al mejor tratamiento para la obtención del peso seco. La Tabla 3.9 muestra las productividades obtenidas para cada tratamiento.

Tabla 3.9 Productividad de los fotobiorreactores

Fotobiorreactor	Productividad promedio mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹
1	1.1362
2	3.9362
3	0.436
4	2.7362
5	0.7362
6	3.2362
7	0.4362
8	2.5362

La productividad continuó en niveles inferiores, presentando una baja con respecto al diseño experimental 2² para *Chlorella* spp. con lámpara fluorescente. A pesar de los resultados en cuanto a la productividad empleando luz LED azul, se tuvo un incremento en el contenido de pigmentos fotosintéticos.

Quevedo et al., (2008) señalaron que cuando las productividades obtenidas son bajas y se pretende comparar con las de otros investigadores, resulta que estas últimas son mayores. Esto se debe a que los experimentos se realizaron en cultivos en continuo y semi-continuo, donde las productividades son mayores comparadas con un cultivo por lotes.

3.3.5 Tasa de fijación del CO₂

La tasa de fijación de CO₂ se muestra en la Tabla 3.10, los valores se relacionan con la biomasa puesto que un parámetro importante de ésta ecuación es que toman en consideración el carbono fijado por la microalga para su crecimiento. El fotobiorreactor 2 presentó la mayor tasa de fijación de CO₂.

Tabla 3.10 Tasa de fijación del CO₂

Fotobiorreactor	Promedio tasa de fijación g·L ⁻¹ ·d ⁻¹
1	0.192
2	0.665
3	0.074
4	0.462
5	0.124
6	0.547
7	0.074
8	0.428

García-Cubero, (2014) reportó una tasa de fijación de CO₂ de 0.6 g·L⁻¹·d⁻¹ para *Chlorella* sp. en un cultivo por lotes durante 8 días, por lo que se obtuvieron valores similares en el tratamiento 2.

3.3.6 Análisis de la variable de respuesta carbohidratos

Se realizó un análisis de varianza para evaluar el contenido de carbohidratos. La Tabla 3.11 muestra que la mayoría de los factores y sus interacciones fueron significativos, con excepción de la interacción “Iluminación*Temperatura”, la cual no ejerció un efecto significativo.

Tabla 3.11 Análisis de varianza para la variable de respuesta carbohidratos

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	27.3224	27.3224	128.67	0.000
Temperatura	1	4.4451	4.4451	20.93	0.002
% CO ₂	1	12.7509	12.7509	60.05	0.000
Iluminación*Temperatura	1	0.2025	0.2025	0.95	0.357
Iluminación*% CO ₂	1	8.0278	8.0278	37.80	0.000
Temperatura*% CO ₂	1	4.1599	4.1599	19.59	0.002
Iluminación*Temperatura*% CO ₂	1	1.9893	1.9893	9.37	0.016
Error	8	1.6988	0.2123		
Total	15	60.5966			

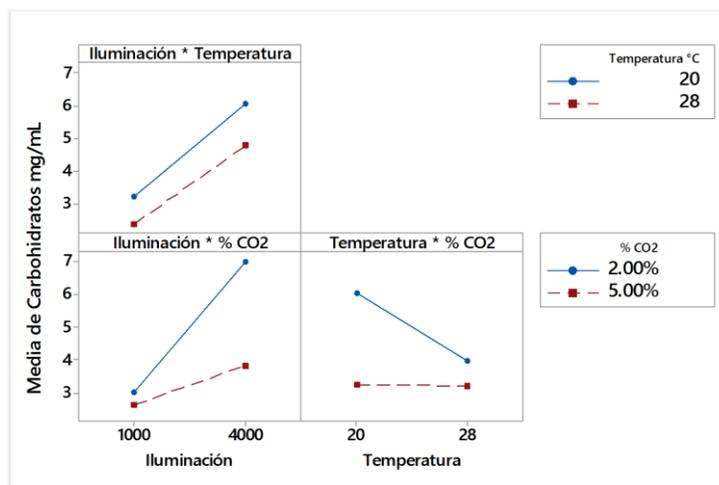


Figura 3.25 Gráfica de interacciones para la variable de respuesta carbohidratos

En la Figura 3.25 se observó claramente que la iluminación con la temperatura van casi paralelas, lo que visualmente apoya la no interacción. En el efecto de la temperatura con el % de CO₂ se apreció que la dosis tiene un mayor efecto con una alta iluminación, mientras que con la temperatura el efecto fue mayor a un bajo nivel.

En la Figura 3.26 se obtuvieron las condiciones adecuadas para un mayor contenido de carbohidratos estableciéndose una iluminación de 4000 lux, una temperatura de 20 °C y una dosis de CO₂ del 2 %.

Romero et al., (2000) evaluaron el crecimiento y la composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en un residual pesquero, obtuvieron una máxima producción a un pH de 9, una temperatura de 35 °C y un rango de CO₂ de 1-5 %. Al día 7 obtuvieron una concentración de carbohidratos totales de 800 y 1100 µg/mL, por lo que los resultados obtenidos en las pruebas continuaron resultando bajos. El mejor tratamiento tuvo una concentración final de 8.53 µg/mL a los 10 días.

Marchetti et al., (2013) evaluaron el efecto de la luz azul y blanca en la composición bioquímica y la actividad fotosintética en *Isocrysis* sp. en un quimiostato a dos distintas tasas de dilución. Encontraron que el contenido de carbohidratos fue más bajo

en luz azul que bajo luz blanca para ambas tasas de dilución. Mientras que para la clorofila a y la actividad fotosintética el contenido fue más alto.

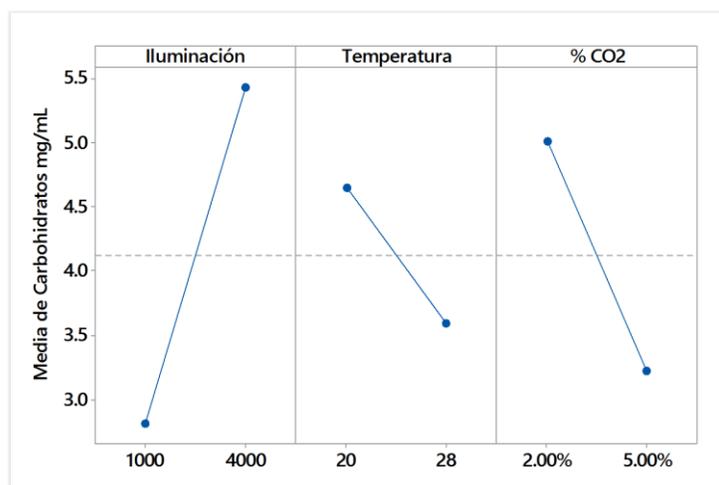


Figura 3.26 Gráfica de efectos principales para la variable de respuesta carbohidratos

3.3.7 Análisis de la variable de respuesta proteínas

Se realizó una transformación de Box-Cox para estabilizar la varianza. La Tabla 3.12 muestra el valor de lambda.

Tabla 3.12 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0.5
λ estimado	0.473744
IC de 95% para λ	(0.193244, 0.745244)

Tabla 3.13 Análisis de varianza para la respuesta proteínas transformada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.7627	0.76272	65.67	0.000
Temperatura	1	9.8243	9.82429	845.94	0.000
% CO ₂	1	0.0034	0.00344	0.30	0.597
Iluminación*Temperatura	1	0.3994	0.39942	34.39	0.000
Error	11	0.1277	0.01161		
Total	15	11.1176			

La Tabla 3.13 muestra el mejor análisis de varianza para la respuesta transformada, se observó que el efecto del % CO₂ no resultó significativo ni los que se omitieron.

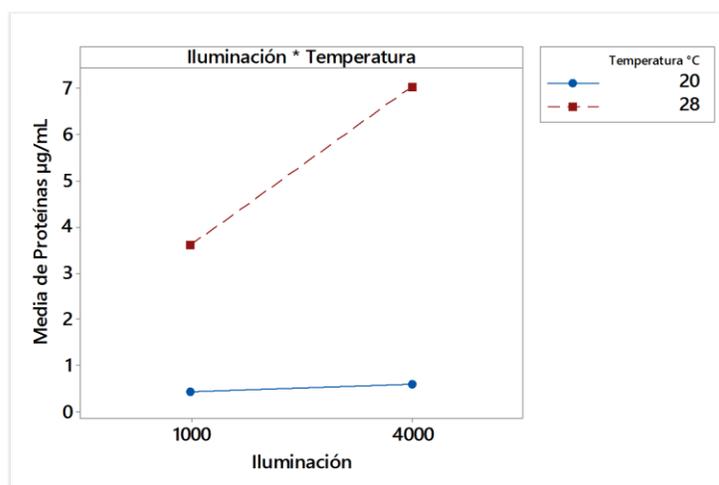


Figura 3.27 Gráfica de interacción para la variable de respuesta proteínas

En la Figura 3.27 se evaluó que el efecto de la temperatura es mayor cuando la iluminación es alta, teniendo un efecto opuesto a baja temperatura. Marchetti et al. (2013) observaron que en *Isochrysis* sp. el contenido de proteínas incrementó con luz azul y con una alta tasa de dilución, reduciéndose el contenido de carbohidratos. Por lo que la luz azul resulta en una mejora de la actividad fotosintética, así como en una alteración del metabolismo del carbono relacionada con el aumento en la síntesis de proteínas.

La Figura 3.28 muestra las mejores condiciones obtenidas para la producción de proteínas (4000 lux, 28 °C, 2 % CO₂).

Chacón et al., (2004) reportaron un valor proteico de 461.5 ± 48 µg/mL para *Chlorella* sp. cultivada en fase estacionaria en agua residual filtrada. Sin embargo, el resultado obtenido en el mejor tratamiento en este diseño experimental fue bajo (7.51 µg/mL).

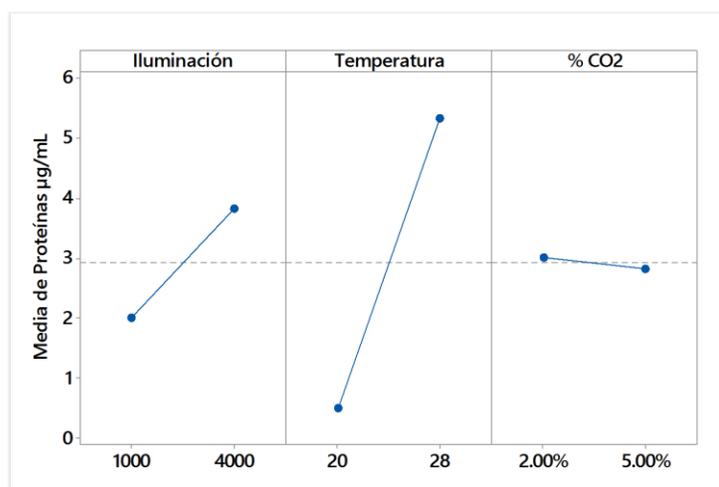


Figura 3.28 Gráfica de efectos principales para la variable de respuesta proteínas

3.3.8 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos

3.3.8.1 Análisis de la variable de respuesta clorofila a

Se realizó una transformación de la variable de respuesta para estabilizar la varianza. En la Tabla 3.14 se muestra el valor de lambda estimado para la transformación Box-Cox.

Tabla 3.14 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0.5
λ estimado	0.444974
IC de 95% para λ	(0.0674743, 0.835474)

Tabla 3.15 Análisis de varianza para la respuesta clorofila a transformada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	19.000	19.000	9.20	0.010
Temperatura	1	327.691	327.691	158.65	0.000
% CO ₂	1	0.073	0.073	0.04	0.854
Error	12	24.786	2.065		
Total	15	371.550			

El mejor ANOVA con los efectos significativos se muestra en la Tabla 3.15. Se observó que el factor CO₂ no fue significativo.

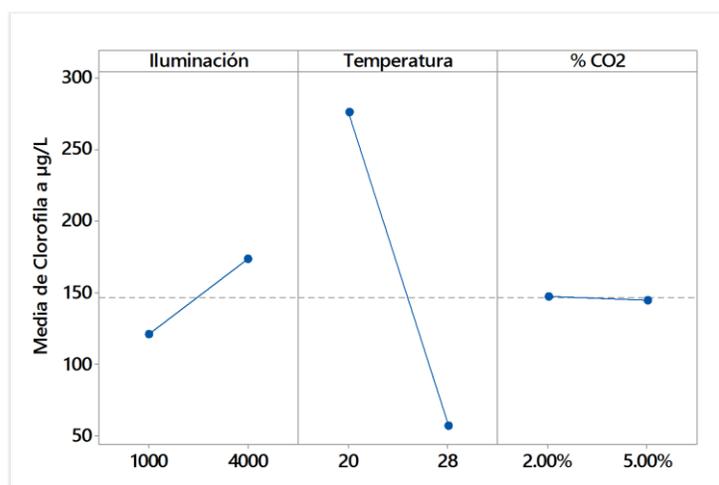


Figura 3.29 Gráfica de efectos principales para la variable clorofila *a*

En la Figura 3.29 se muestra la gráfica de efectos principales. Se pudo concluir que para la mejor obtención de clorofila *a* se necesitaba una iluminación de 4000 lux, una temperatura de 20 °C y una dosis de CO₂ del 2 %.

Se destacó que los valores representaron un incremento sustancial con respecto al diseño experimental 2³ en condiciones extremas y al diseño experimental 2² con luz fluorescente. La razón se debió al incremento en los niveles de iluminación, factor que como ya se analizó, provocó una gran influencia en la producción de biomasa y en el contenido de pigmentos.

Marchetti et al., (2013) señalaron que en un cultivo con luz LED azul y un bajo suministro de CO₂, el contenido de carbohidratos disminuye y el de proteínas aumenta. Mientras que para la clorofila *a* y la actividad fotosintética el contenido es mayor.

3.3.8.2 Análisis de la variable de respuesta clorofila *b*

La Tabla 3.16 muestra el valor de lambda estimado para la estabilización de la varianza. De la Tabla 3.17 se observó que en congruencia con los demás análisis para el contenido de pigmentos fotosintéticos, el efecto del CO₂ no es significativo, teniendo

mayor influencia la temperatura y la iluminación. Los datos mostrados corresponden al mejor análisis de varianza.

Tabla 3.16 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0.5
λ estimado	0.545429
IC de 95% para λ	(0.253929, 0.862929)

Tabla 3.17 Análisis de varianza para la respuesta clorofila *b* transformada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	7.714	7.714	8.83	0.012
Temperatura	1	108.799	108.799	124.51	0.000
% CO ₂	1	0.095	0.095	0.11	0.748
Error	12	10.485	0.874		
Total	15	127.093			

En la Figura 3.30 las condiciones adecuadas para un mayor contenido de clorofila *b* coexistieron una iluminación de 4000 lux, una temperatura de 20 °C y 2 % de CO₂. Se subraya que el contenido mejoró comparado con las experimentaciones anteriores, causado por un aumento en los niveles de iluminación y una temperatura no extrema para la microalga.

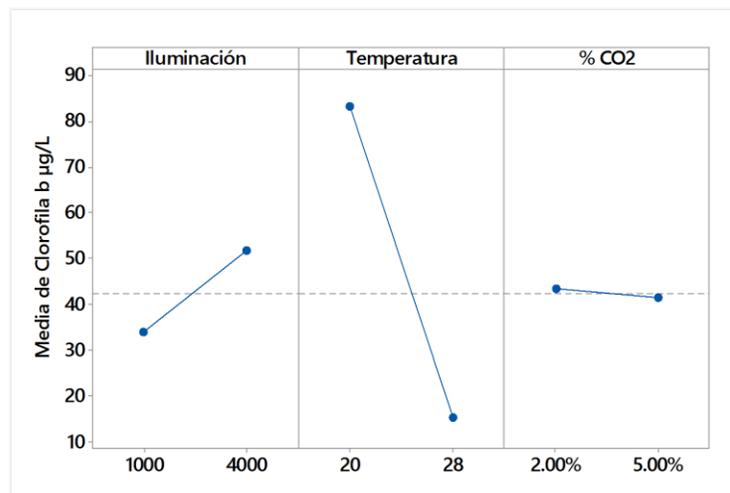


Figura 3.30 Gráfica de efectos principales

3.3.8.3 Análisis de los carotenoides totales

En la Tabla 3.18 se muestra el valor de lambda estimado para la estabilización de la varianza.

Tabla 3.18 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0.5
λ estimado	0.528048
IC de 95% para λ	(0.0705477, 1.01255)

De la Tabla 3.19 concluyó que el CO₂ no presentó un efecto significativo en el contenido de carotenoides totales. Los factores que más influyeron fueron la temperatura y la iluminación.

Tabla 3.19 Análisis de varianza para la respuesta carotenoides totales transformada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.000025	0.000025	24.36	0.000
Temperatura	1	0.000058	0.000058	56.94	0.000
% CO ₂	1	0.000000	0.000000	0.00	0.987
Error	12	0.000012	0.000001		
Total	15	0.000094			

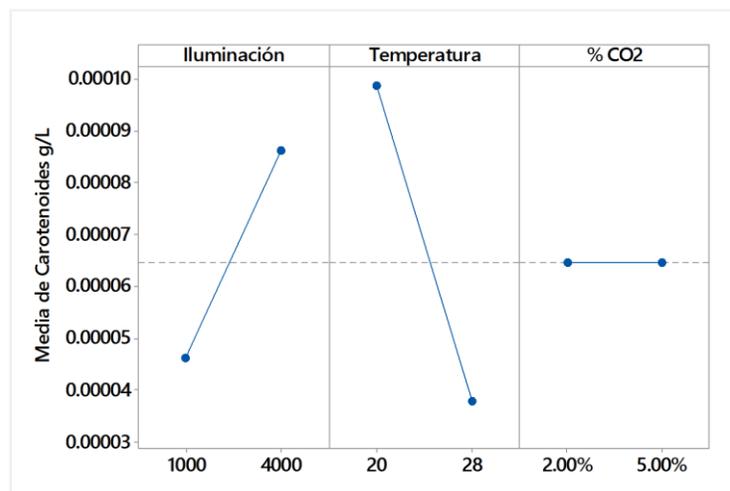


Figura 3.31 Gráfica de efectos principales

De la gráfica de efectos principales (Figura 3.31) se ultimó que las mejores condiciones

fueron similares a las del contenido de clorofila *a* y *b* para los factores (4000 lux, 20 °C, 2 % CO₂).

En una recopilación realizada por Schulze et al., (2014) indicaron que la luz azul, probablemente a través de los fotoreceptores como las fototropinas, induce la acumulación de pigmentos en varias especies. Sin embargo, debido a que la energía de los fotones azules es mayor que la que se necesita para realizar la fotosíntesis, la luz puede dar como resultado una extinción no fotoquímica (NPQ) [Forma importante de protección contra la fotoinhibición en la que el exceso de energía puede ser disipado en forma de radiación de calor (2.5 %), o entre el 1 y el 4 % como luz roja visible (fluorescencia) (Taiz y Zeiger, 2006)]. Por lo que para proteger al aparato fotosintético de especies reactivas de oxígeno, algas y plantas acumulan pigmentos fotoprotectores (como las xantofilas).

3.3.9 Monitoreo del oxígeno disuelto

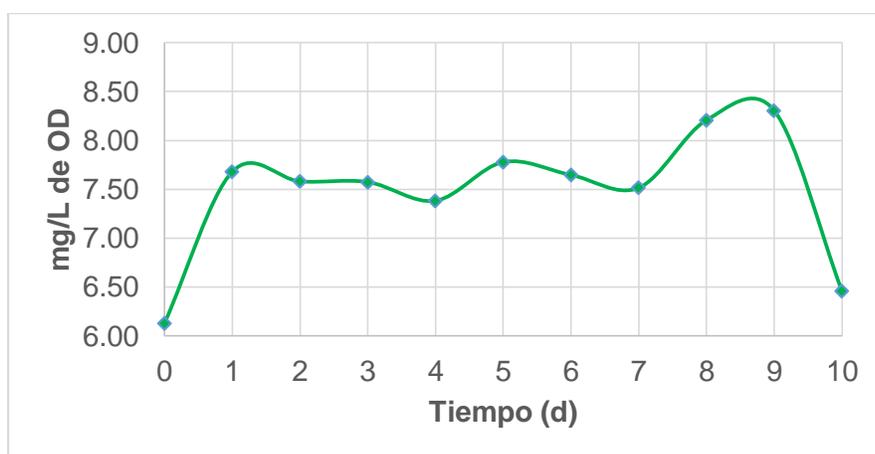


Figura 3.32 Oxígeno disuelto

El monitoreo del oxígeno disuelto (Figura 3.32) se realizó para el fotobiorreactor 2, el cuál presentó las mejores condiciones de crecimiento. Los niveles se mantuvieron en un rango de 6 y 8.5 mg/L de oxígeno disuelto (OD), incrementándose a partir del primer día, el aumento en los niveles oxígeno se correspondió con la fotosíntesis realizada

por la microalga. Al día 10 se alcanzó la fase meseta observándose que el nivel de oxígeno disuelto decreció.

Rendón-Castrillón et al., (2015) aludieron que cuando el oxígeno se llega a encontrar en concentraciones mayores a 40 mg/L, se puede llegar a inhibir el crecimiento (fotorrespiración) provocando el efecto Warburg. Para evitar este inconveniente es necesario agitar el cultivo para que exista un intercambio con la atmósfera y el oxígeno pueda llegar al equilibrio.

Los valores de OD en la microalga se encontraron dentro de los límites aceptables de acuerdo con Muñoz-Peñuela et al., (2011), quienes evaluaron el efecto del medio de cultivo en el crecimiento y producción de proteínas en *Chlorella vulgaris* monitoreando valores de OD. Ellos reportaron un rango de 6.2-7.5 mg/L de OD a temperaturas de 23 y 26.5 °C.

Ruíz-Martínez, (2011) menciona que los niveles de oxígeno disuelto se deben controlar para evitar la inhibición de la fijación del carbono por parte de la RuBisCo, favorecida por una alta iluminación, temperatura y una falta de CO₂. Además, muchas algas no sobreviven más de 2 o 3 h con una sobresaturación de oxígeno. En cultivos de alta densidad se pueden alcanzar valores de 40 mg/L pudiendo generar radicales de oxígeno.

3.4 Diseño factorial 3 x 2

En la Figura 3.33 se observa que el Medio Basal Bold o Bristol (BBM) presentó un mayor incremento en la densidad celular comparado con los otros tratamientos. La densidad celular alcanzada fue de $3.76 \times 10^7 \text{ cel} / \text{mL}$ a los 10 días. Caballero (2013) obtuvo una densidad celular de $3.13 \times 10^7 \text{ cel} / \text{mL}$ a los 15 días de cultivo en un fotobiorreactor de columna con un flujo de 40 mL/min, obteniéndose un mejor resultado cambiando el medio de cultivo.

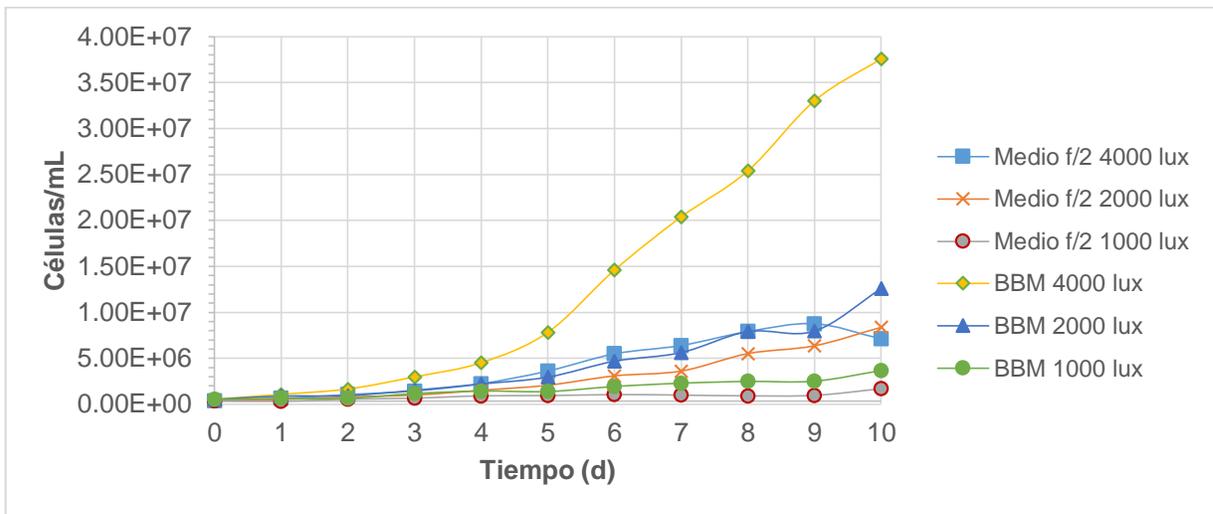


Figura 3.33 Densidad celular promedio

El pH se mantuvo dentro del rango aceptable para la microalga, se observó que el cultivo en medio Bold con una iluminación de 4000 lux incrementó el pH hasta el día 9 debido al efecto de la fase exponencial sobre el medio de cultivo. El medio f/2 con una iluminación de 1000 lux mantuvo un pH inestable posiblemente por causas del bajo efecto de la iluminación en la fotosíntesis (Figura 3.34).

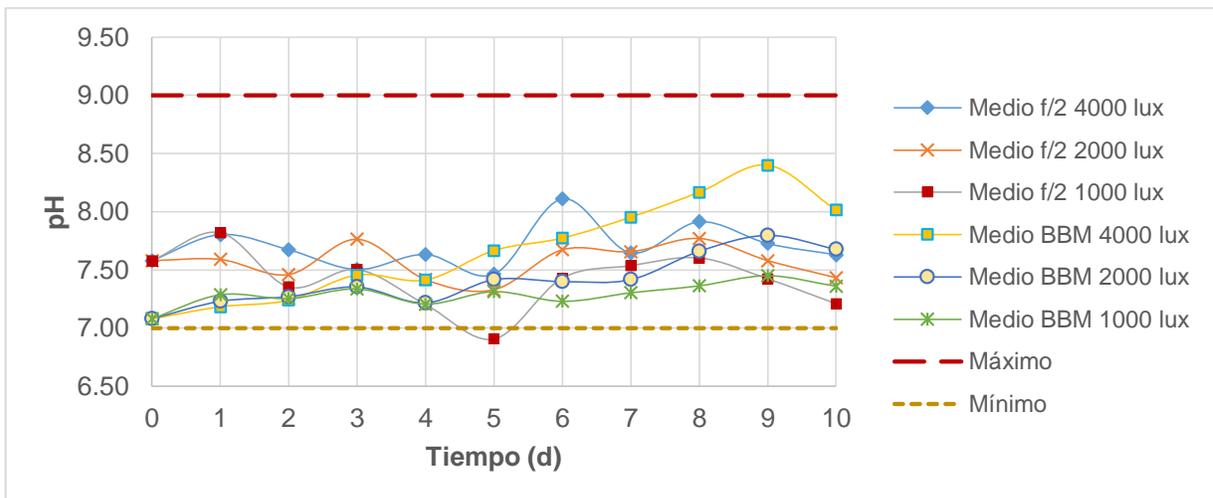


Figura 3.34 pH promedio

3.4.1 Análisis de la variable de respuesta peso seco para la microalga *Chlorella* spp.

Se realizó una transformación de Box-Cox para estabilizar la varianza, la Tabla 3.20 muestra el valor de lambda estimado.

Tabla 3.20 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0
λ estimado	-0.113327
IC de 95% para λ	(-0.515827, 0.238173)

De la Tabla 3.21 se pudo concluir que el medio de cultivo, la iluminación y la interacción de ambos tienen un fuerte efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Tabla 3.21 Análisis de varianza para la variable de respuesta transformada peso seco

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio	1	1.3861	1.38614	224.37	0.000
Iluminación	2	7.5766	3.78829	613.20	0.000
Medio*Iluminación	2	1.4201	0.71007	114.94	0.000
Error	12	0.0741	0.00618		
Total	17	10.4570			

En la Figura 3.35 se observa el efecto que tuvo la iluminación. Con 4000 lux y con el medio Bristol se alcanzó un mayor peso seco, en cambio con el medio f/2 no se consiguió un incremento con respecto a los tratamientos con 2000 lux y 4000 lux.

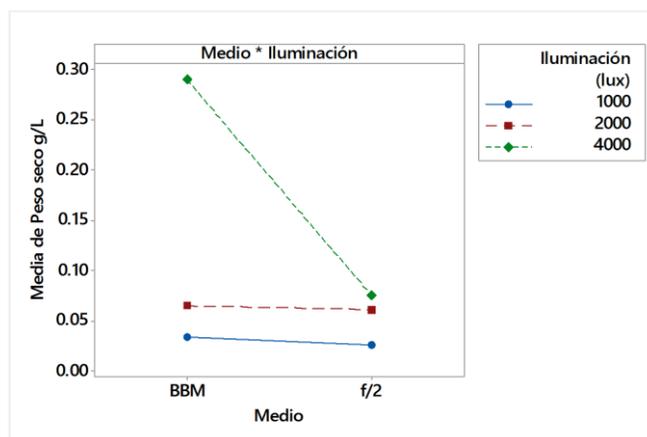


Figura 3.35 Gráfico de interacción para peso seco

De la gráfica de efectos principales (Figura 3.36) se observó que en el efecto de la iluminación predominan sus componentes lineales ya que la línea tiene una curvatura perceptible.

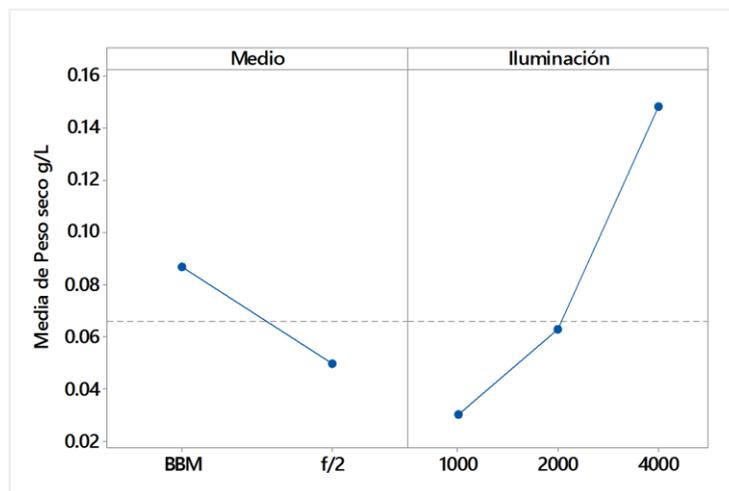


Figura 3.36 Gráfica de efectos principales

Se demostró que a mayor iluminación (4000 lux) y con el medio Bristol se logró un mayor peso seco.

3.4.2 Análisis del contenido de pigmentos fotosintéticos

3.4.2.1 Análisis de la variable de respuesta clorofila a

En la Tabla 3.22 se muestra la transformación para estabilizar las varianzas, así como el valor de lambda estimado para la transformación de la variable de respuesta.

Tabla 3.22 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0
λ estimado	0.0991386
IC de 95% para λ	(-0.191361, 0.381639)

En el análisis de varianza de la Tabla 3.23 se muestran los efectos y la interacción que resultaron significativos. Los resultados se esparaban debido a que un alto nivel de iluminación junto con un adecuado medio de cultivo potenciarían la densidad celular.

Tabla 3.23 Análisis de varianza para la respuesta transformada clorofila a

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio	1	1.5242	1.52418	148.88	0.000
Iluminación	2	12.5967	6.29837	615.23	0.000
Medio*Iluminación	2	0.2359	0.11796	11.52	0.002
Error	12	0.1228	0.01024		
Total	17	14.4797			

De la gráfica de interacciones (Figura 3.37) se dilucidó que con una iluminación de 4000 lux en medio Bold se obtuvieron mejores resultados, mientras que con el medio f/2 al mismo nivel de iluminación también resultó significativo, pero sin llegar a presentarse un incremento en el contenido de clorofila a.

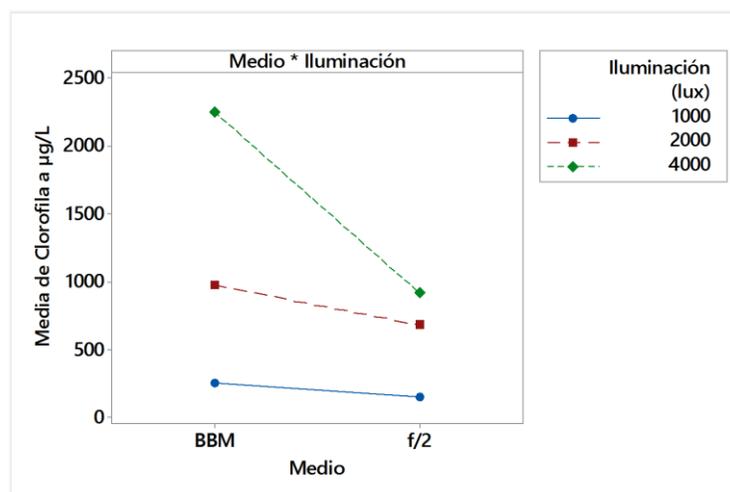


Figura 3.37 Gráfica de interacciones

En la gráfica de efectos principales (3.38) se encontró que las mejores condiciones para aumentar el contenido de clorofila a se lograban con una iluminación de 4000 lux y utilizando el medio Bold.

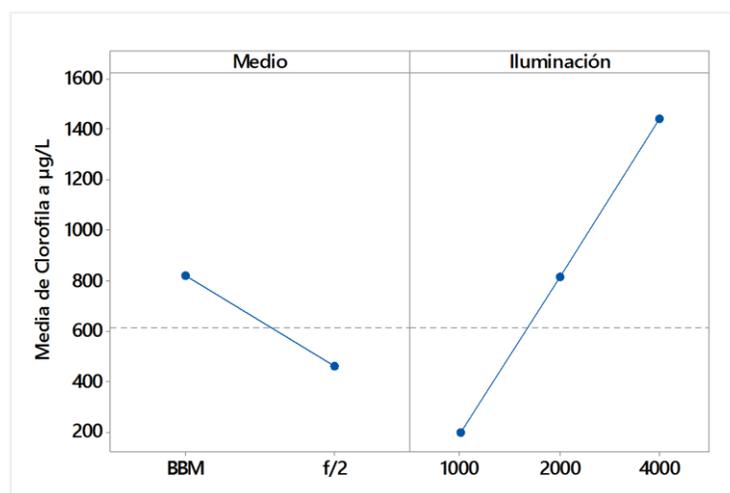


Figura 3.38 Gráfica de efectos principales

3.4.2.2 Análisis de la variable de respuesta clorofila *b*

El común denominador para todos los análisis del contenido de pigmentos fue que los valores adecuados para los factores resultaron los mismos para la clorofila *a*, *b* y carotenoides. Es útil mencionar que igualmente fue necesario en estos casos realizar una transformación de Box-Cox para la variable de respuesta (Tabla 3.24).

Tabla 3.24 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0.5
λ estimado	0.368549
IC de 95% para λ	(0.0210485. 0.725049)

Se muestra en la Tabla 3.25 que los factores y su interacción fueron significativos

Tabla 3.25 Análisis de varianza para la respuesta transformada clorofila *b*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio	1	86.022	86.022	190.78	0.000
Iluminación	2	495.654	247.827	549.62	0.000
Medio*Iluminación	2	60.251	30.125	66.81	0.000
Error	12	5.411	0.451		
Total	17	647.338			

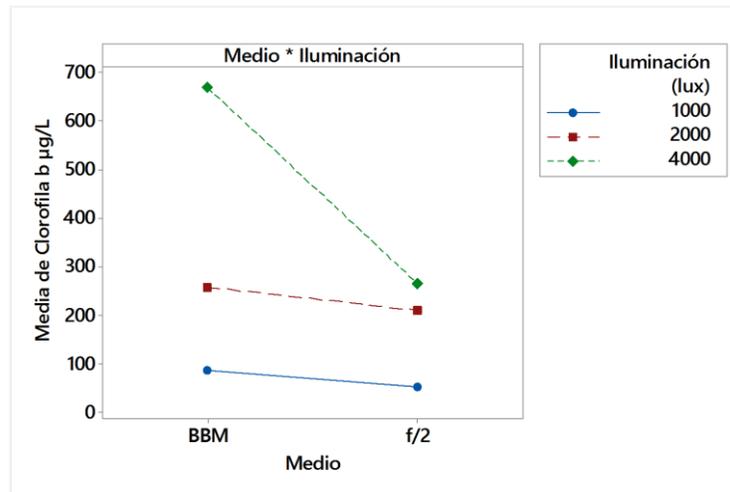


Figura 3.39 Gráfica de interacción

En la Figura 3.39 se manifestó que el contenido de clorofila *b* fue mayor cuando se utilizó una iluminación de 4000 lux y el medio de cultivo Bold. Las observaciones para la interacción y para la gráfica de efectos principales fueron similares a las de las variables clorofila *a* y *b*. Las mejores condiciones se encontraron a 4000 lux y con el medio Bold.

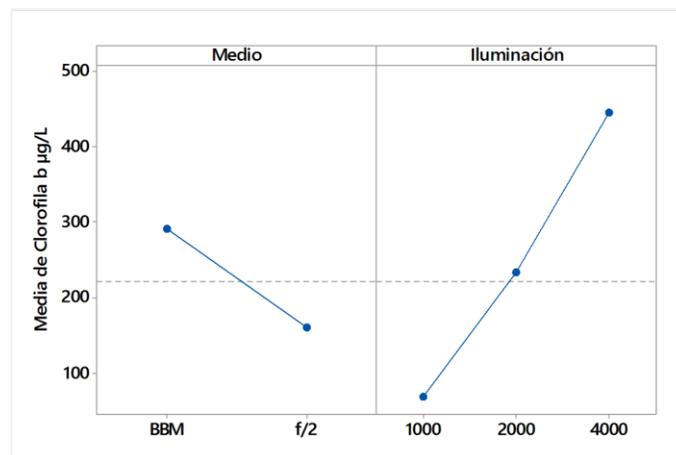


Figura 3.40 Gráfica de efectos principales

3.4.2.3 Análisis de los carotenoides totales

En la Tabla 3.26 se muestra el valor de lambda estimado para la transformación de Box-Cox.

Tabla 3.26 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	0.5
λ estimado	0.283089
IC de 95% para λ	(-0.0684113. 0.644589)

Tabla 3.27 Análisis de varianza para la variable de respuesta transformada carotenoides totales

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Medio	1	0.000114	0.000114	198.92	0.000
Iluminación	2	0.000660	0.000330	577.05	0.000
Medio*Iluminación	2	0.000071	0.000035	61.73	0.000
Error	12	0.000007	0.000001		
Total	17	0.000851			

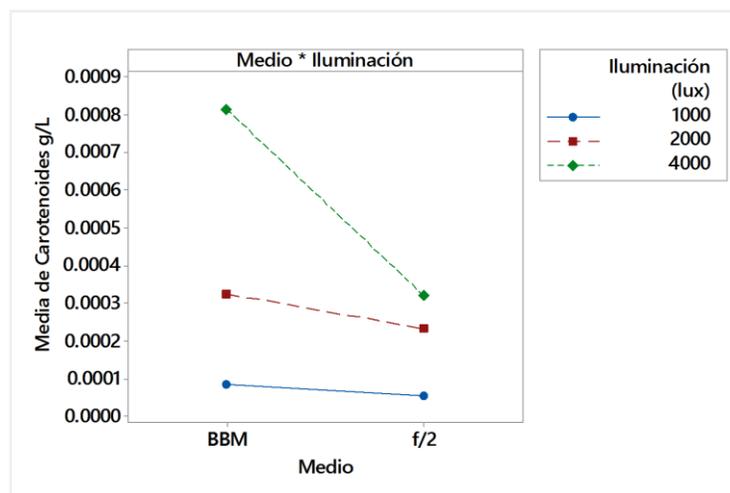


Figura 3.41 Gráfica de interacciones

En la Tabla 3.27 se observa que el efecto de la temperatura, iluminación y su interacción fueron fuertemente significativos. En la Figura 3.41 se observó un efecto similar en la interacción presentada en la clorofila *a* y *b* con el medio f/2. En la Figura 3.41 se muestra que las mejores condiciones para un mayor aumento en el contenido

de carotenoides totales coexistieron con una iluminación de 4000 lux y con el medio de cultivo Bold.

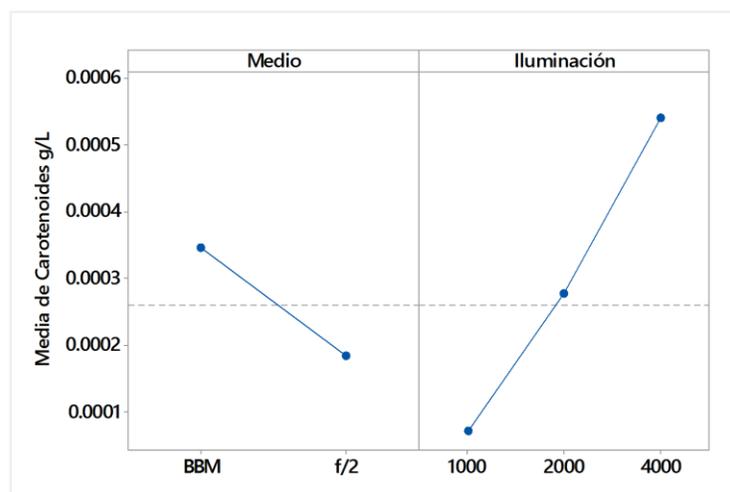


Figura 3.42 Gráfica de efectos principales

El medio Bold obtuvo un gran rendimiento en comparación con el medio f/2, superándolo en los valores de biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos.

Kondo et al., (2013) encontraron para la microalga *Chlorella fusca* que la biosíntesis de clorofila y la acumulación de carotenoides fueron promovidas cuando se aumentó el KNO_3 de 0.25 g/dm^3 a 0.5 g/dm^3 , disminuyendo en cantidades menores. La concentración de clorofila se incrementó cuando adicionaron CH_3COONa obteniendo una máxima concentración de clorofila con 0.25 g/dm^3 . Además, una concentración de 2.5 g/dm^3 de NaCl aumentó la concentración de clorofila y carotenoides. El metabolismo de las microalgas se activó mediante la producción de solutos orgánicos como respuesta al estrés de la presión osmótica debido a la diferencia de concentración iónica.

Barajas-Solano et al., (2012) utilizaron *Chlorella vulgaris* para estudiar el efecto de la inyección continua de CO_2 sobre la productividad de la biomasa. Utilizaron una temperatura de $23 \text{ }^\circ\text{C}$, un fotoperiodo 12:12 y un flujo continuo de CO_2 del 2.3 y 3.8 % v.

Concluyeron que variando la relación carbono/nitrógeno, disminuyendo la concentración de nitrógeno se obtiene una mayor productividad de la biomasa.

3.5 Adaptación en un fotobiorreactor de columna

3.5.1 Densidad celular

La densidad celular de la microalga (Figura 3.43) alcanzó un valor de $3.69 \times 10^7 \text{ cel} / \text{mL}$ al día 13, mostrando en el escalamiento del cultivo bajo LED azul un comportamiento similar a los cultivos con un volumen de 200 mL del diseño experimental 3 x 2 realizados en matraces erlenmeyer con iluminación fluorescente. Se destacó que para alcanzar la misma cantidad de densidad celular se necesitaron tres días más, puesto que la densidad celular al día 10 fue de $3.38 \times 10^7 \text{ cel} / \text{mL}$. Esta diferencia se puede atribuir al efecto del escalamiento, ya que no siempre la microalga se comporta igual en pequeños y mayores volúmenes de cultivo.

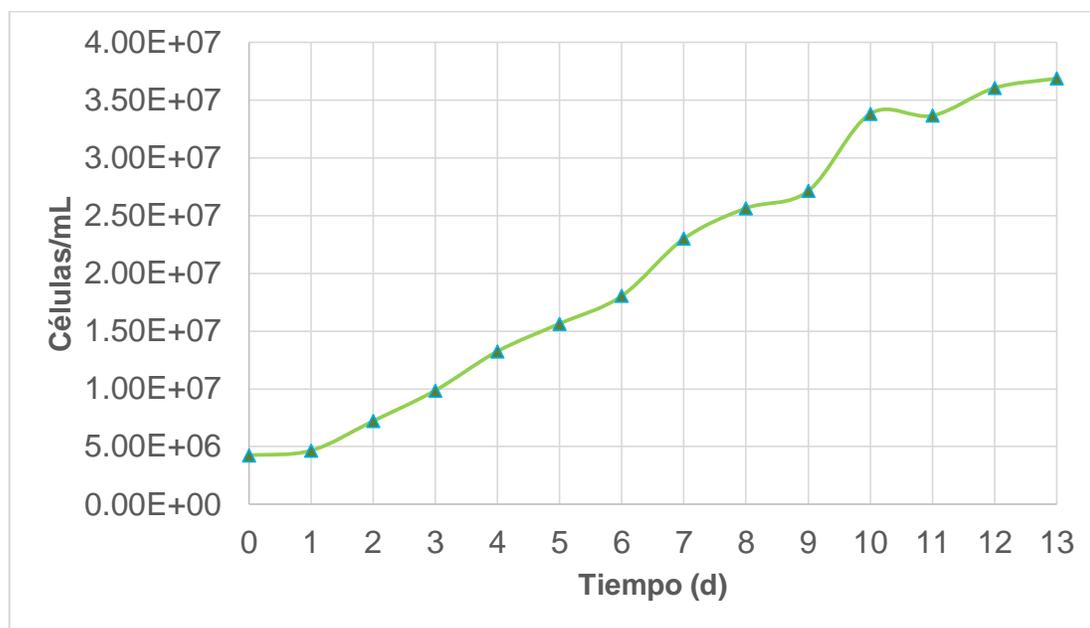


Figura 3.43 Densidad celular en el fotobiorreactor de columna

3.5.2 pH

De la Figura 3.44 se observó que el comportamiento del pH se relacionó con el incremento de la biomasa, mostrando su valor más alto al día 5. Es importante hacer notar que a pesar de haberse suministrado una dosis de CO₂ del 2 %, el pH se elevó a niveles por encima de 9.

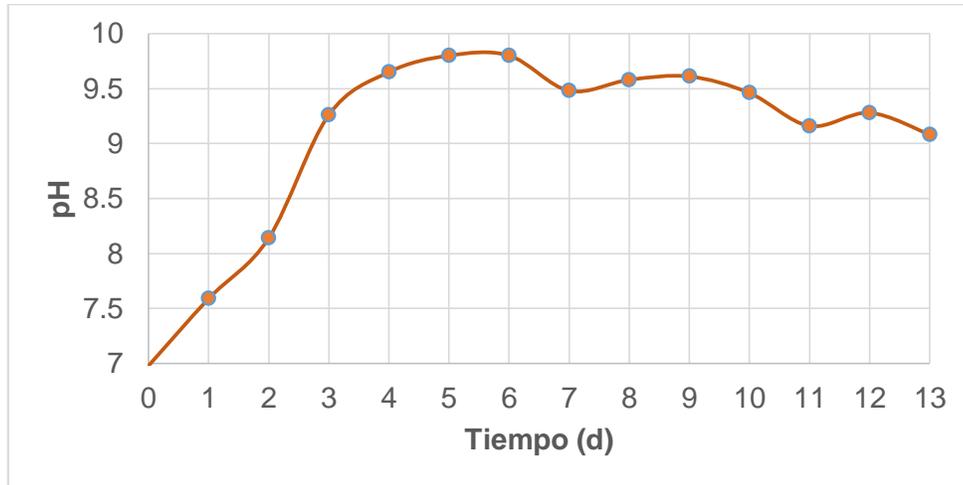


Figura 3.44 pH en el fotobiorreactor de columna

3.5.3 Modelo matemático de Gompertz

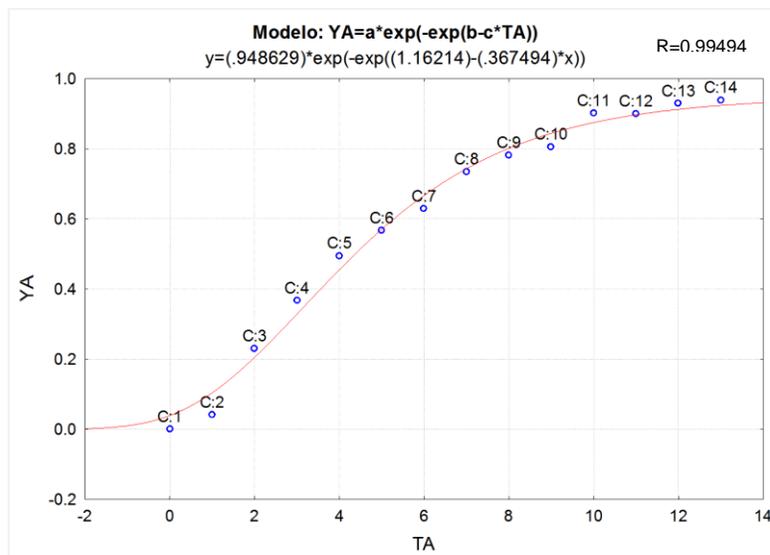


Figura 3.45 Modelo de Gompertz

El modelo fue calculado tomando como base los resultados del crecimiento celular en el fotobiorreactor de columna con ayuda del programa Statistica 7.0. El ajuste fue de $R=0.99494$. En la Figura 3.45 se observa en la parte superior el modelo utilizado y debajo aparece el modelo con los valores sustituidos de los parámetros a, b y c. En la Tabla 3.28 se muestran los parámetros del modelo corregido de Gompertz.

Tabla 3.28 Parámetros del modelo de corregido de Gompertz

Significado		
a	Valor máximo de la biomasa	0.948629
b	Parámetros del modelo	1.162139
c		0.367494

En la Tabla 3.29 se observan los parámetros derivados del modelo. La velocidad específica de crecimiento fue baja comparada con Caballero, (2013), quien en sus ensayos con un fotobiorreactor tubular obtuvo a los 15 días una velocidad específica de crecimiento de $\mu=0.69 \text{ d}^{-1}$. Esto se explica debido a que la microalga con la que trabajó no era la misma, ya que meses después de su experimentación la microalga se inhibió, volviéndose a solicitar la reposición de la microalga.

Tabla 3.29 Parámetros derivados del modelo de Gompertz

Significado		
λ	Tiempo de latencia (d)	0.4412
μ_{\max}	Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	0.3486
G	Tiempo de generación	1.9883

Vásquez-Villalobos et al., (2013) realizaron una comparación de un modelo matemático de Gompertz, un modelo logístico y uno por redes neuronales artificiales para *Spirulina* sp. El modelamiento por redes neuronales artificiales *Backpropagation* tuvo una buena precisión con respecto al modelo corregido de Gompertz mostrando coeficientes de correlación (R) de 0.0993 y 0.0994 respectivamente con respecto a sus datos experimentales, recomendando la utilización del modelo matemático corregido de Gompertz ya que permitió obtener los parámetros de la cinética de crecimiento de manera directa.

3.5.4 Tasa de crecimiento acumulada

En la Figura 3.46 se observó que el crecimiento exponencial terminó al día 9 de acuerdo con la suma de duplicaciones progresivas o tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$), días después la pendiente de $\sum\mu$ disminuyó, lo que indicó que se entró a la fase meseta del cultivo ya que en los días subsecuentes no aumentó el valor de $\sum\mu$.

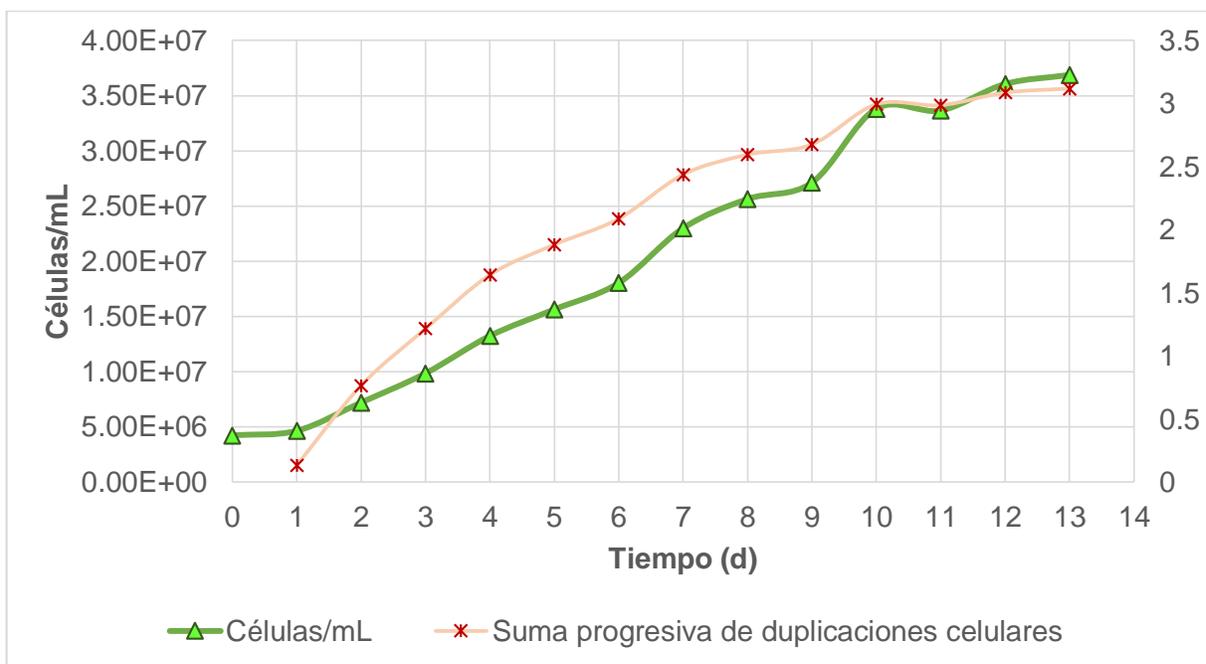


Figura 3.46 Concentración celular y suma progresiva de duplicaciones

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Condiciones extremas de temperatura (8 °C, 38 °C) e iluminación (300 lux, 1200 lux) ocasionan una baja velocidad de crecimiento ($\mu=0.021 \text{ d}^{-1}$) en la microalga inhibiendo y/o retardando el crecimiento celular.

Con una iluminación LED azul (1200 lux), un fotoperiodo 12:12, una temperatura de 38 °C y un 5 % de CO₂ se incrementa el contenido de lípidos. Una iluminación LED azul baja influye en un mayor contenido de lípidos posiblemente debido a que la luz azul y una temperatura alta alteran la ruta de síntesis de lípidos, los efectos de la luz azul están bien estudiados en las plantas, pero no es el caso de las microalgas, ya que no se conocen con detalle los efectos de una iluminación azul en la síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos. El contenido de pigmentos fotosintéticos se inhibió en la mayoría de los tratamientos con respecto a los valores presentados en la caracterización inicial. Se comprobó que existe una fuerte relación entre el incremento de la densidad celular y el efecto que tiene sobre el pH. La alcalinidad total no presentó valores inusuales a los recomendados, al inicio aumentó su valor como consecuencia del incremento de la biomasa, sin embargo se mantuvo estable posiblemente por el lento crecimiento celular mostrado en los tratamientos.

Con luz fluorescente la microalga presentó un mayor contenido de peso seco, sin embargo, en el contenido de pigmentos fotosintéticos mostró un mejor desempeño la iluminación proporcionada por LED's azules. La luz LED azul pudo influir en el proceso fotosintético ya que posee una mayor penetración al medio de cultivo comparado con la luz fluorescente. Una mayor intensidad de iluminación aumenta el contenido de biomasa, sin embargo, el contenido de pigmentos no es proporcional al incremento de la biomasa debido a que cada célula recibe la iluminación de manera individual para realizar la fotosíntesis, por lo que que no todas las células reciben una iluminación homogénea a lo largo del tiempo de cultivo.

La luz azul al ser mayormente energética aumenta la eficiencia de la fotosíntesis, pero se debe tener cuidado de no llegar a una fotooxidación debido a que se puede causar daño en los fotosistemas por la alta intensidad lumínica. No se encontró en la literatura científica un estudio detallado de los efectos de la luz LED azul en la microalga *Chlorella* spp. Sin embargo, recientemente se han realizado estudios con otras especies de microalgas que ayudan a tener una idea de sus efectos.

Con una iluminación de LED's azules se obtuvo un mejor contenido de carbohidratos con 4000 lux, una temperatura de 20 °C y un 2 % de CO₂. Las mejores condiciones para un aumento del contenido de proteínas fueron una iluminación de 4000 lux, una temperatura de 28 °C y un 2 % de CO₂. Para obtener un mayor contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales se necesitó una iluminación de 4000 lux y una temperatura de 20 °C, una dosis indistinta de CO₂ puede ser administrada. Se conoce que el contenido de proteínas aumenta con una iluminación azul y que el contenido de carbohidratos disminuye debido a que la luz azul altera el metabolismo del carbono relacionado con la producción de proteínas debido a que la luz azul hace más eficiente la fotosíntesis. El oxígeno disuelto se mantuvo dentro de los valores recomendados así como el nivel de pH. La tasa de fijación de CO₂ se comportó conforme a los valores reportados por otros autores. Sin embargo, se recalca que los resultados de este párrafo son solo para la iluminación proporcionada por LED's azules, por lo que es necesario realizar una comparación con luz fluorescente.

Con luz fluorescente, el medio f/2 no resultó el adecuado para el crecimiento de la microalga a pesar de aumentar los niveles de iluminación. El medio BBM presentó mejores resultados en el incremento de la biomasa y contenido de pigmentos fotosintéticos. El medio f/2 no resultó adecuado para el crecimiento de la microalga ya que el medio recomendado por Caballero, (2013) se utiliza comunmente con agua de mar la cual contiene muchos nutrientes, por lo que al usar agua destilada la dosis recomendada no fue la suficiente ya que no contiene los nutrientes que contiene el agua de mar. El medio BBM contiene una gran cantidad de nutrientes inorgánicos, lo cual permitió un gran crecimiento comparado con el medio f/2 preparado con agua

destilada. El pH con el medio Bold se eleva hasta valores de 8.5 en matraces de 200 mL. Las mejores condiciones para el incremento de pigmentos fotosintéticos son el uso del medio Bristol con una iluminación de 4000 lux ya que una mayor iluminación combinada con una adecuada disponibilidad de nutrientes aumentan la eficiencia fotosintética en la microalga, promoviendo la división celular. La microalga se comportó de manera similar con luz azul, durante el escalamiento el pH del medio se elevó a valores por encima de 9 a pesar de tener una dosis del 2 % de CO₂.

El modelo de Gompertz mostró un buen ajuste de los datos ($R=0.994$), lo que permitió obtener de manera rápida y confiable los parámetros derivados para el análisis de los parámetros cinéticos de la biomasa. La fase exponencial con el medio Bold tuvo una duración de 9 días.

Utilizando el medio de cultivo Bristol con la microalga *Chlorella* spp. se encontró un peso seco de 0.291 ± 0.025 g/L a los 10 días de cultivo, no obstante, no se logró alcanzar valores de productividad reportados en la literatura. Se realizó un diseño experimental 2² con *Arthrospira maxima* (Anexo C) en donde resultó una productividad análoga a la obtenida por *Chlorella*, a pesar de que la iluminación no fue la adecuada, la cianobacteria mostró un peso seco de 0.262 ± 0.0043 g/L con una iluminación de 1700 lux, mientras que la microalga *Chlorella* alcanzó valores de similares de peso seco con 4000 lux de iluminación.

La floculación resulta un método de cosecha barato, rápido y eficaz. El uso de un polímero catiónico de alto peso molecular resulta útil debido a que neutraliza las cargas negativas de las microalgas. Para obtener mayor eficiencia de remoción en la recuperación de la microalga se necesitó una concentración de floculante de 2000 ppm y una velocidad de agitación de 170 RPM (Anexo D).

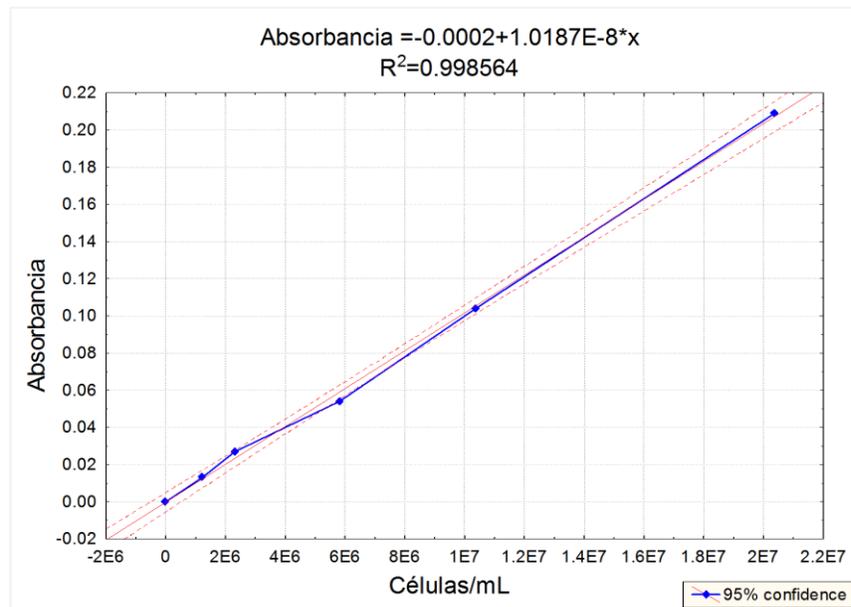
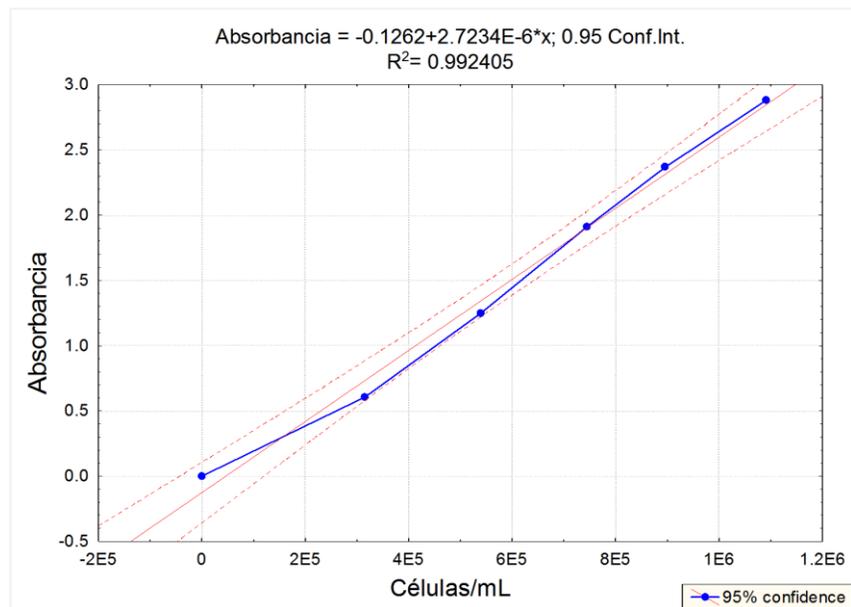
Recomendaciones

- Identificar las especies presentes en *Chlorella* spp. por medio de alguna técnica de identificación molecular y aislarlas para su estudio con diferentes condiciones de cultivo.
- Realizar la comparación de distintas longitudes de onda en la producción de carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos fotosintéticos.
- Realizar el seguimiento del oxígeno disuelto por medio de un electrodo para oxígeno disuelto, así como la medición de la irradiancia por medio de un medidor PAR.
- Realizar el análisis elemental de la microalga utilizando el analizador de CHNS/O para conocer la composición total de carbono absorbido.
- Evaluar métodos de cosecha de la microalga como pueden ser la electrofloculación, centrifugación, filtración, floculación, etc.
- Realizar pruebas para evaluar los mejores pre-tratamientos para la extracción de lípidos, carbohidratos y proteínas.
- Realizar la determinación rutinaria para evaluar el contenido de lípidos por el método de Rojo de Nilo.
- Medir la fluorescencia de la clorofila por medio de un fluorómetro para una lectura rápida.
- Determinar el perfil lipídico y el perfil de aminoácidos en la microalga.
- Evaluar el crecimiento de la microalga con niveles de iluminación superiores a 4000 lux y observar el efecto del crecimiento sobre el pH, oxígeno disuelto, pigmentos fotosintéticos, proteínas, carbohidratos, etc.
- Comparar diferentes especies de microalgas para evaluar compuestos de valor biológico en específico.
- Investigar y probar nuevos medios de cultivo, además de realizar modificaciones en su composición para evaluar el efecto sobre la biomasa.
- Probar nuevas fuentes de iluminación, diferentes longitudes de onda, combinaciones y distintos fotoperiodos.

- Evaluar cultivos en modo semi-continuo para valorar la productividad de la biomasa a largo plazo.
- Probar cultivos en fotobiorreactores tipo Airlift para evaluar la productividad de la biomasa.
- Evaluar el crecimiento en condiciones autótrofas y heterótrofas, así como el crecimiento con consorcios bacterianos.
- Evaluar la eliminación de nitrógeno y fósforo de aguas residuales usando sistemas microalga-bacteria en condiciones de crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico.
- Evaluar el crecimiento en condiciones axénicas y no axénicas.
- Evaluar la influencia de la temperatura en la solubilidad del CO₂ en el medio de cultivo.
- Aislar y purificar pigmentos fotosintéticos con alto valor agregado en el mercado.
- Determinar el coeficiente de transferencia de masa para un adecuado escalamiento del fotobiorreactor.
- Evaluar la tasa fotosintética de la microalga con diferentes condiciones de cultivo.
- Investigar el uso de biopelículas para inmovilizar microalgas en el tratamiento de aguas residuales.

ANEXO A

ANEXO A

Figura AA. 1 Curva de calibración para la microalga *Chlorella* spp.Figura AA. 2 Curva de calibración para la cianobacteria *Arthrospira maxima*

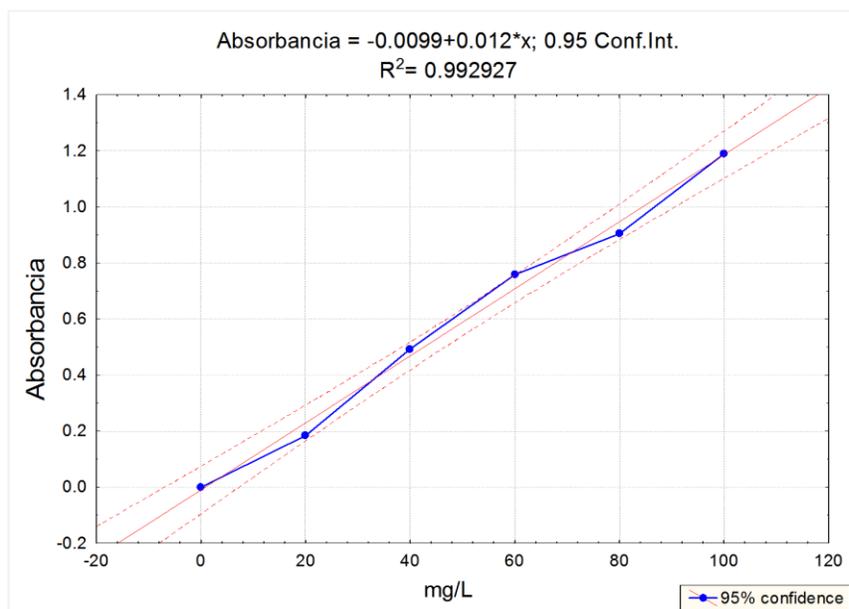


Figura AA. 3 Curva de calibración para carbohidratos (Método fenol-sulfúrico)

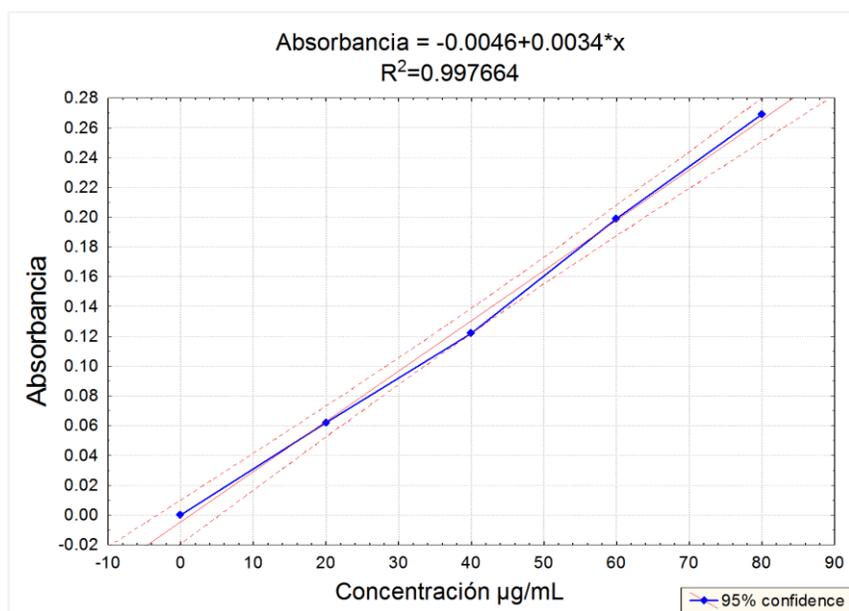


Figura AA. 4 Curva de calibración para proteínas (Método de Lowry)

ANEXO B

ANEXO B

Diseño experimental 2³ en condiciones extremas de temperatura e iluminación

Tabla AB. 1 Densidad celular promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4
0	4.96E+06	4.96E+06	4.96E+06	4.96E+06
1	5.11E+06	5.11E+06	5.84E+06	6.04E+06
2	4.72E+06	5.11E+06	5.70E+06	6.04E+06
3	5.16E+06	5.35E+06	5.70E+06	6.24E+06
4	5.26E+06	5.45E+06	5.06E+06	5.16E+06
5	5.35E+06	5.65E+06	6.19E+06	5.99E+06
6	5.65E+06	6.24E+06	6.38E+06	6.04E+06
7	5.65E+06	6.43E+06	5.99E+06	6.38E+06
8	5.35E+06	6.63E+06	6.33E+06	6.58E+06
9	5.60E+06	6.38E+06	6.04E+06	6.73E+06
10	5.89E+06	7.17E+06	5.60E+06	6.04E+06
11	6.24E+06	8.35E+06	6.04E+06	6.38E+06
12	6.09E+06	7.56E+06	5.16E+06	6.09E+06
13	5.99E+06	8.05E+06	5.21E+06	6.58E+06
14	5.99E+06	7.27E+06	6.73E+06	7.51E+06
15	5.84E+06	8.15E+06	6.09E+06	6.63E+06

Continuación de la Tabla AB. 1 Densidad celular promedio

Día	Promedio Fotobiorreactor 5	Promedio Fotobiorreactor 6	Promedio Fotobiorreactor 7	Promedio Fotobiorreactor 8
0	4.96E+06	4.96E+06	4.96E+06	2.50E+06
1	5.16E+06	5.06E+06	6.29E+06	3.07E+06
2	5.01E+06	4.81E+06	5.55E+06	2.82E+06
3	5.11E+06	5.21E+06	5.94E+06	3.10E+06
4	5.21E+06	5.30E+06	5.89E+06	3.02E+06
5	5.35E+06	5.45E+06	5.21E+06	2.62E+06
6	5.60E+06	6.43E+06	6.43E+06	3.05E+06
7	5.55E+06	6.38E+06	5.84E+06	3.00E+06
8	5.60E+06	6.43E+06	5.84E+06	3.30E+06
9	5.50E+06	6.38E+06	6.04E+06	3.62E+06
10	5.79E+06	7.02E+06	5.16E+06	3.22E+06
11	6.38E+06	7.76E+06	5.94E+06	3.17E+06
12	5.99E+06	7.22E+06	5.99E+06	3.00E+06
13	6.33E+06	7.76E+06	5.11E+06	3.10E+06
14	5.84E+06	7.02E+06	5.99E+06	4.05E+06
15	6.24E+06	7.27E+06	5.55E+06	3.60E+06

Tabla AB. 2 Alcalinidad promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1 CaCO ₃ mg/L	Promedio fotobiorreactor 2 CaCO ₃ mg/L	Promedio fotobiorreactor 3 CaCO ₃ mg/L	Promedio fotobiorreactor 4 CaCO ₃ mg/L
0	45.9	51	35.7	35.7
1	35.7	45.9	56.1	56.1
2	43.35	40.8	43.35	40.8
3	53.55	45.9	53.55	45.9
4	43.35	40.8	43.35	40.8
5	45.9	51	45.9	51
6	33.15	48.45	56.1	56.1
7	43.35	48.45	61.2	56.1
8	45.9	48.45	51	61.2
9	45.9	48.45	45.9	51
10	45.9	45.9	61.2	56.1
11	51	48.45	56.1	56.1
12	56.1	45.9	61.2	61.2
13	45.9	51	71.4	61.2
14	48.45	45.9	61.2	66.3
15	45.9	51	56.1	61.2

Continuación de la Tabla AB. 2 Alcalinidad promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 5 CaCO ₃ mg/L	Promedio fotobiorreactor 6 CaCO ₃ mg/L	Promedio fotobiorreactor 7 CaCO ₃ mg/L	Promedio fotobiorreactor 8 CaCO ₃ mg/L
0	51	56.1	35.7	35.7
1	45.9	43.35	61.2	66.3
2	45.9	40.8	45.9	40.8
3	40.8	40.8	40.8	40.8
4	40.8	40.8	40.8	40.8
5	51	51	51	51
6	40.8	45.9	61.2	53.55
7	43.35	48.45	61.2	61.2
8	45.9	48.45	61.2	56.1
9	43.35	45.9	45.9	51
10	51	43.35	61.2	56.1
11	45.9	40.8	56.1	61.2
12	40.8	40.8	66.3	61.2
13	61.2	56.1	61.2	66.3
14	48.45	48.45	61.2	56.1
15	51	45.9	56.1	61.2

Tabla AB. 3 pH promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4
0	7.005	7.045	7.02	7.02
1	7.69	7.485	7.965	7.665
2	7.4	7.39	8.1	8.03
3	7.355	7.36	7.83	8.005
4	7.41	7.45	7.58	8.08
5	7.47	7.54	7.735	7.855
6	7.47	7.595	7.845	7.965
7	7.465	7.505	7.955	8.025
8	7.485	7.52	7.885	7.89
9	7.67	7.675	7.88	7.94
10	7.52	7.445	7.655	7.785
11	7.65	7.735	7.66	7.61
12	7.605	7.645	7.84	7.83
13	7.63	7.63	7.96	8.005
14	7.525	7.53	7.83	7.83
15	7.515	7.55	7.58	7.445

Continuación de la Tabla AB. 3 pH promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 5	Promedio fotobiorreactor 6	Promedio fotobiorreactor 7	Promedio fotobiorreactor 8
0	7.045	7.045	7.02	7.02
1	7.495	7.535	8.085	7.99
2	7.49	7.465	7.82	7.845
3	7.385	7.325	8.115	7.93
4	7.44	7.425	7.97	7.795
5	7.49	7.545	7.795	7.82
6	7.48	7.57	7.98	8
7	7.43	7.535	7.99	8.045
8	7.575	7.615	7.9	7.76
9	7.635	7.655	7.905	7.755
10	7.52	7.55	7.575	7.82
11	7.735	7.75	7.65	7.67
12	7.605	7.655	7.76	7.8
13	7.62	7.63	7.965	7.985
14	7.52	7.485	7.86	7.835
15	7.515	7.585	7.59	7.68

Tabla AB. 4 Lípidos promedio

Fotobiorreactor	Promedio g lípidos/100g de biomasa
1	9.24
2	9.82
3	12.21
4	16.10
5	9.92
6	11.12
7	12.06
8	14.58

Tabla AB. 5 Pigmentos fotosintéticos promedio

Pigmento	Promedio inicial	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2
Clorofila <i>a</i> µg/L	34.20	30.03	37.25
Clorofila <i>b</i> µg/L	20.33	14.14	13.25
Carotenoides g/L	3.69E-05	2.85E-05	3.38E-05

Continuación de la Tabla AB. 5 Pigmentos fotosintéticos promedio

Pigmento	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4	Promedio fotobiorreactor 5
Clorofila <i>a</i> µg/L	31.91	42.99	30.78
Clorofila <i>b</i> µg/L	16.93	20.34	13.80
Carotenoides g/L	3.20E-05	4.40E-05	3.10E-05

Continuación de la Tabla AB. 5 Pigmentos fotosintéticos promedio

Pigmento	Promedio fotobiorreactor 6	Promedio fotobiorreactor 7	Promedio fotobiorreactor 8
Clorofila <i>a</i> µg/L	36.38	32.56	42.01
Clorofila <i>b</i> µg/L	14.87	25.15	23.23
Carotenoides g/L	3.58E-05	4.23E-05	3.88E-05

Diseño experimental 2²

Tabla AB. 6 Concentración celular promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4
0	2.70E+06	2.70E+06	1.23E+06	1.23E+06
1	2.51E+06	2.74E+06	1.23E+06	1.53E+06
2	2.57E+06	3.29E+06	1.53E+06	1.72E+06
3	2.44E+06	3.19E+06	1.59E+06	2.25E+06
4	2.44E+06	3.03E+06	1.43E+06	2.80E+06
5	2.60E+06	2.93E+06	1.79E+06	4.18E+06
6	2.77E+06	2.54E+06	1.85E+06	5.19E+06
7	2.64E+06	3.19E+06	2.05E+06	6.69E+06
8	2.70E+06	3.49E+06	2.08E+06	6.99E+06
9	2.77E+06	3.72E+06	2.64E+06	7.05E+06
10	2.70E+06	3.91E+06	2.44E+06	7.09E+06

Tabla AB. 7 pH promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4
0	7.26	7.26	7.10	7.10
1	7.26	7.08	6.98	7.08
2	7.02	6.92	6.94	7.08
3	7.28	7.16	7.13	7.42
4	7.30	7.45	7.20	7.34
5	7.41	8.12	7.13	7.33
6	7.68	8.01	7.15	7.39
7	7.56	7.77	6.91	7.54
8	7.27	7.61	7.38	7.68
9	7.33	7.52	7.45	7.32
10	7.45	7.45	7.58	7.02

Tabla AB. 8 Peso seco

Fotobiorreactor	Promedio g/L
Inicial	0.0135
1	0.0220
2	0.0240
3	0.0190
4	0.0535

Tabla AB. 9 Pigmentos fotosintéticos promedio

	Inicio	Fotobiorreactor 1	Fotobiorreactor 2	Fotobiorreactor 3	Fotobiorreactor 4
Clorofila <i>a</i> µg/L	38.17	115.95	160.58	59.93	126.12
Clorofila <i>b</i> µg/L	12.58	24.42	55.12	21.70	37.59
Carotenoides g/L	1.74E-05	4.67E-05	5.93E-05	2.23E-05	5.87E-05

Aplicación del diseño experimental 2³

Tabla AB. 10 Concentración celular promedio

Día	Promedio Fotobiorreactor 1	Promedio Fotobiorreactor 2	Promedio Fotobiorreactor 3	Promedio Fotobiorreactor 4
0	1.23E+06	1.23E+06	1.23E+06	1.23E+06
1	2.02E+06	2.02E+06	1.38E+06	1.33E+06
2	2.11E+06	2.90E+06	1.38E+06	1.38E+06
3	2.36E+06	3.49E+06	1.43E+06	2.70E+06
4	2.51E+06	4.91E+06	1.67E+06	3.00E+06
5	2.51E+06	5.16E+06	1.77E+06	4.32E+06
6	2.60E+06	6.68E+06	1.77E+06	5.01E+06
7	2.80E+06	7.37E+06	1.87E+06	5.16E+06
8	3.05E+06	7.46E+06	1.97E+06	5.60E+06
9	3.00E+06	8.05E+06	2.11E+06	5.55E+06
10	3.59E+06	8.05E+06	2.16E+06	4.81E+06

Continuación de la Tabla AB. 10 Concentración celular promedio

Día	Promedio Fotobiorreactor 5	Promedio Fotobiorreactor 6	Promedio Fotobiorreactor 7	Promedio Fotobiorreactor 8
0	1.23E+06	1.23E+06	1.23E+06	1.23E+06
1	2.11E+06	1.77E+06	1.43E+06	1.43E+06
2	1.97E+06	2.65E+06	1.43E+06	1.43E+06
3	2.31E+06	3.14E+06	1.53E+06	1.77E+06
4	2.41E+06	3.93E+06	1.53E+06	3.10E+06
5	2.36E+06	4.52E+06	1.92E+06	4.18E+06
6	3.10E+06	5.30E+06	1.57E+06	5.01E+06
7	2.75E+06	5.75E+06	1.57E+06	5.11E+06
8	3.24E+06	5.99E+06	1.87E+06	4.62E+06
9	3.19E+06	6.58E+06	2.02E+06	3.93E+06
10	3.44E+06	6.68E+06	2.02E+06	4.57E+06

Tabla AB. 11 pH promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4
0	7.04	7.04	7.10	7.10
1	6.98	7.07	7.22	7.19
2	6.93	7.97	7.08	7.40
3	7.26	9.18	7.18	9.05
4	7.10	9.41	7.20	9.37
5	7.22	9.02	6.46	9.32
6	7.42	8.31	7.13	8.07
7	7.16	7.98	7.17	7.82
8	7.86	7.90	7.17	7.52
9	7.56	8.04	6.88	7.14
10	6.49	7.92	7.19	7.38

Continuación de la Tabla AB. 11 pH promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 5	Promedio fotobiorreactor 6	Promedio fotobiorreactor 7	Promedio fotobiorreactor 8
0	7.04	7.04	7.10	7.10
1	7.16	7.06	7.09	7.25
2	6.93	7.34	7.06	7.35
3	7.29	8.46	7.24	8.92
4	7.39	8.89	7.36	9.40
5	7.34	7.93	6.35	8.36
6	7.30	7.54	7.04	8.56
7	7.25	7.59	7.14	8.03
8	7.22	7.43	7.12	7.57
9	7.44	7.69	7.04	7.65
10	5.95	7.74	7.29	7.43

Tabla AB. 12 Peso seco promedio

	Promedio g/L
Inicio	0.009
Fotobiorreactor 1	0.020
Fotobiorreactor 2	0.048
Fotobiorreactor 3	0.013
Fotobiorreactor 4	0.036
Fotobiorreactor 5	0.016
Fotobiorreactor 6	0.041
Fotobiorreactor 7	0.013
Fotobiorreactor 8	0.034

Tabla AB. 13 Carbohidratos promedio

Fotobiorreactor	Promedio $\mu\text{g/mL}$
Inicio	1.55
1	3.57
2	8.53
3	2.43
4	5.53
5	2.89
6	3.61
7	2.37
8	4.05

Tabla AB. 14 Proteínas promedio

Fotobiorreactor	Promedio $\mu\text{g/mL}$
Inicio	2.07
1	0.326
2	0.709
3	3.525
4	7.510
5	0.532
6	0.488
7	3.694
8	6.591

Tabla AB. 15 Pigmentos fotosintéticos promedio

	Inicio	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2
Clorofila <i>a</i> µg/L	21.62	280.10	278.45
Clorofila <i>b</i> µg/L	6.58	54.16	83.37
Carotenoides g/L	1.60E-05	5.84E-05	1.07E-04

Continuación de la Tabla AB. 15 Pigmentos fotosintéticos promedio

	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4	Promedio fotobiorreactor 5
Clorofila <i>a</i> µg/L	37.17	88.97	224.04
Clorofila <i>b</i> µg/L	11.10	24.21	64.64
Carotenoides g/L	2.14E-05	6.20E-05	7.36E-05

Continuación de la Tabla AB. 15 Pigmentos fotosintéticos promedio

	Promedio fotobiorreactor 6	Promedio fotobiorreactor 7	Promedio fotobiorreactor 8
Clorofila <i>a</i> µg/L	332.33	41.04	73.83
Clorofila <i>b</i> µg/L	104.77	9.31	21.45
Carotenoides g/L	1.31E-04	2.12E-05	5.76E-05

Diseño factorial 3 x 2

Tabla AB. 16 Concentración celular promedio

Día	4000 lux	2000 lux	1000 lux
	Promedio	Promedio	Promedio
0	3.6E+05	3.6E+05	3.6E+05
1	6.4E+05	5.3E+05	3.3E+05
2	1.0E+06	8.0E+05	5.5E+05
3	1.4E+06	9.9E+05	6.6E+05
4	2.2E+06	1.5E+06	9.1E+05
5	3.6E+06	2.1E+06	9.4E+05
6	5.5E+06	3.1E+06	1.0E+06
7	6.4E+06	3.6E+06	9.9E+05
8	7.9E+06	5.5E+06	9.1E+05
9	8.8E+06	6.4E+06	9.7E+05
10	7.1E+06	8.4E+06	1.7E+06

Continuación de la Tabla AB. 16 Concentración celular promedio

Día	4000 lux	2000 lux	1000 lux
	Promedio	Promedio	Promedio
0	5.3E+05	5.3E+05	5.3E+05
1	1.1E+06	8.8E+05	6.4E+05
2	1.7E+06	9.4E+05	6.4E+05
3	3.0E+06	1.5E+06	1.2E+06
4	4.5E+06	2.2E+06	1.4E+06
5	7.8E+06	2.9E+06	1.4E+06
6	1.5E+07	4.7E+06	1.9E+06
7	2.0E+07	5.6E+06	2.3E+06
8	2.5E+07	7.9E+06	2.5E+06
9	3.3E+07	8.0E+06	2.5E+06
10	3.8E+07	1.3E+07	3.7E+06

Tabla AB. 17 pH promedio

Día	Medio f/2			BBM		
	4000 lux	2000 lux	1000 lux	4000 lux	2000 lux	1000 lux
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
0	7.58	7.58	7.58	7.08	7.08	7.08
1	7.80	7.59	7.82	7.18	7.23	7.29
2	7.67	7.46	7.35	7.24	7.27	7.25
3	7.50	7.76	7.50	7.46	7.35	7.34
4	7.63	7.42	7.20	7.41	7.22	7.21
5	7.46	7.33	6.91	7.67	7.42	7.31
6	8.11	7.67	7.43	7.77	7.40	7.23
7	7.65	7.66	7.54	7.95	7.42	7.30
8	7.91	7.77	7.60	8.17	7.66	7.36
9	7.73	7.58	7.42	8.40	7.80	7.45
10	7.63	7.43	7.21	8.01	7.68	7.36

Tabla AB. 18 Peso seco promedio

Medio	Iluminación	Promedio g/L
F/2	4000 lux	0.076
	2000 lux	0.061
	1000 lux	0.027
Bold	4000 lux	0.291
	2000 lux	0.065
	1000 lux	0.035

Tabla AB. 19 Pigmentos fotosintéticos promedio

Pigmento	Medio F/2			BBM		
	Promedio 4000 lux	Promedio 4000 lux	Promedio 2000 lux	Promedio 1000 lux	Promedio 2000 lux	Promedio 1000 lux
Clorofila a µg/L	923.07	2270.65	974.82	254.98	685.04	154.67
Clorofila b µg/L	267.58	670.45	259.30	86.23	211.18	53.30
Carotenoides µg/L	322.93	815.20	325.60	86.93	234.13	57.60

Diseño experimental 2² para la cianobacteria *Arthrospira maxima*

Tabla AB. 20 Concentración celular promedio

Día	Promedio fotobiorreactor	Promedio fotobiorreactor	Promedio fotobiorreactor	Promedio fotobiorreactor
	1	2	3	4
0	6.73E+04	6.73E+04	6.69E+04	6.69E+04
1	6.96E+04	7.18E+04	6.96E+04	6.97E+04
2	7.36E+04	7.45E+04	7.13E+04	7.29E+04
3	7.59E+04	7.80E+04	7.06E+04	7.46E+04
4	7.66E+04	8.01E+04	7.28E+04	8.01E+04
5	7.79E+04	8.54E+04	7.34E+04	8.56E+04
6	7.88E+04	8.99E+04	7.31E+04	9.12E+04
7	7.94E+04	9.35E+04	7.24E+04	1.01E+05
8	8.04E+04	9.99E+04	7.24E+04	1.16E+05
9	8.18E+04	1.03E+05	7.67E+04	1.37E+05
10	8.66E+04	1.15E+05	8.29E+04	1.49E+05

Tabla AB. 21 Peso seco promedio

	Promedio g/L
Inicio	0.082
Fotobiorreactor 1	0.131
Fotobiorreactor 2	0.175
Fotobiorreactor 3	0.106
Fotobiorreactor 4	0.262

Tabla AB. 22 pH promedio

Día	Promedio fotobiorreactor 1	Promedio fotobiorreactor 2	Promedio fotobiorreactor 3	Promedio fotobiorreactor 4
0	9.38	9.38	9.70	9.70
1	9.55	9.55	9.70	9.70
2	9.62	9.63	9.75	9.79
3	9.74	9.70	9.76	9.80
4	9.76	9.74	9.83	9.82
5	9.81	9.80	9.89	9.88
6	9.80	9.81	9.92	9.90
7	9.78	9.76	9.93	9.94
8	9.27	9.61	9.98	10.02
9	9.57	9.80	10.01	10.05
10	9.91	9.95	9.98	10.01

ANEXO C

ANEXO C

Diseño experimental 2² con la cianobacteria *Arthrospira máxima*

La cianobacteria *Arthrospira maxima* fue utilizada por Domínguez (2014) para evaluar las dosis de CO₂ en el desempeño de un fotobiorreactor de columna. La cianobacteria se obtuvo de la Colección de Microorganismos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), ubicado en el Distrito Federal.

La Tabla AC. 1 muestra los datos generales de la cepa utilizada y la Tabla AC. 2 muestra las condiciones de cultivo toleradas.

Tabla AC. 1 Información de la cianobacteria

Nombre	<i>Arthrospira maxima</i>
Acrónimo	CDBB A-1484
Aislador	M. Lefevre (1963)

Tabla AC. 2 Condiciones de cultivo para *Arthrospira maxima* (Adaptado de Ahsan et al., 2008 y Usharani et al, 2012)

Factor	Valor
Temperatura	15-40 °C
Iluminación	2000-10000 lux
pH	8.5-10.5

Metodología

Para evaluar el desempeño de la cianobacteria en la producción de biomasa, se realizó la experimentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 200 mL. El medio de cultivo fue el utilizado por Domínguez (2014), el cual es una modificación del medio mineral estándar (SOT) de Ogawa y Terui (1970). La agitación, iluminación, ciclos de luz/oscuridad y el control de temperatura fueron

análogos a las condiciones del diseño experimental 2² (Capítulo 2, sección 2.4) para la microalga *Chlorella* spp. La Tabla AC. 3 muestra las condiciones de operación a las que se sometieron los fotobiorreactores. Se monitoreó el pH y crecimiento celular, como variable de respuesta se midió el peso seco, el contenido de clorofila *a* y carotenoides totales. El contenido de ficocianina se midió en el tratamiento con mayor producción de biomasa. Las pruebas se realizaron durante 10 días tomando muestras diariamente a la misma hora.

Tabla AC. 3 Condiciones de operación utilizadas en el diseño 2² para *Arthrospira maxima*

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Iluminación	800 lux	1700 lux
Temperatura	20 °C	32 °C

Concentración celular

De la Figura AC. 1 se observó que la mayor concentración celular se encontró en el fotobiorreactor 4 sometido a una iluminación alta (1700 lux) y a una temperatura alta (32 °C) mostrando una concentración celular promedio de $1.49 \times 10^5 \text{ cel / mL}$, por otra parte, la menor concentración se obtuvo el fotobiorreactor 3 tratado con una iluminación de 800 lux y con una temperatura de 32 °C. Para un estudio estadístico se procedió al análisis de la variable de respuesta peso seco.

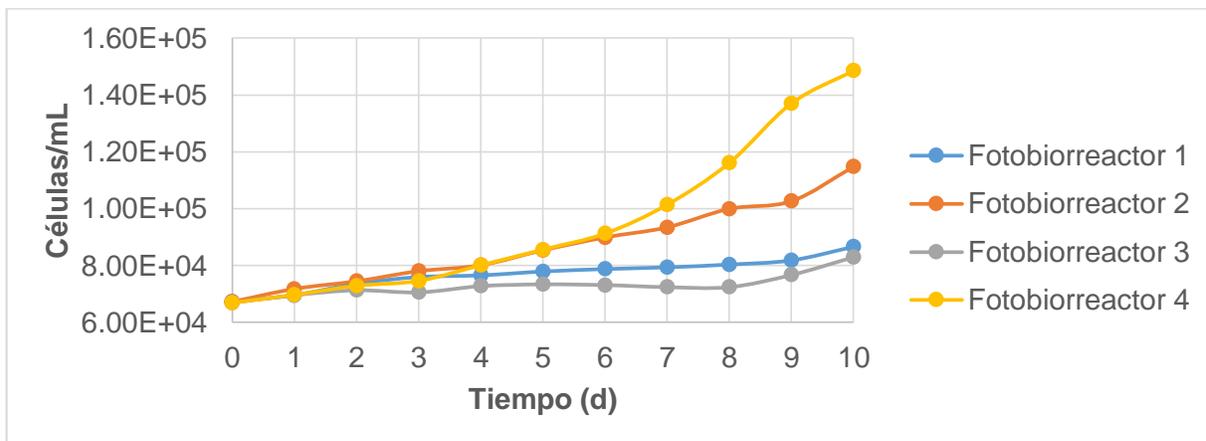


Figura AC. 1 Concentración celular

pH

El pH se mantuvo dentro del rango aceptable para la microalga, se observó un incremento del valor conforme aumentaba la densidad celular y el tiempo de cultivo (Figura AC. 2). En los fotobiorreactores 1 y 2 tratados con una temperatura de 20 °C se observó una disminución del pH al día 8 como consecuencia de la disminución en la velocidad de crecimiento, la causa pudo encontrarse en el efecto de la baja temperatura, la cual no es adecuada para su cultivo, sin embargo, se observó una recuperación en la densidad celular (Figura AC. 1) al día 10. Es interesante advertir que el descenso en la densidad celular se manifestó en el nivel del pH un día antes; así mismo, la estabilización de la velocidad de crecimiento se recuperó al día 10, como posible consecuencia del incremento del pH. Esto se puede imputar a una recuperación del efecto fotosintético para fijar el CO₂.

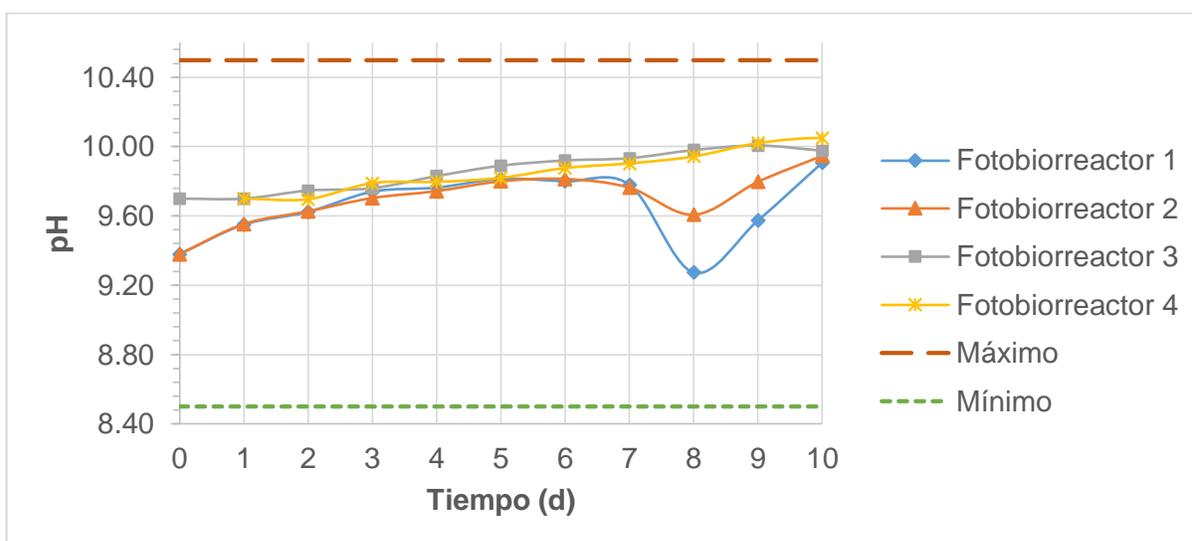


Figura AC. 2 Concentración celular

Romero-Maza et al. (2011) evaluaron el contenido de lípidos, ácidos grasos, exopolisacáridos y minerales de *Arthrospira maxima* en fotobiorreactores durante 30 días en medio Zarrouk. Obtuvieron al día 20 una concentración de 1.4 ± 0.015 g/L. Sus valores de pH se mantuvieron entre 10 y 11 (promedio 10.5 ± 0.70).

Análisis de la variable de respuesta peso seco

Para minimizar el efecto de la variabilidad de la varianza (heterocedasticidad) se realizó la transformación de Box-cox, la Tabla AC. 4 muestra el valor de lambda estimado.

Tabla AC. 4 Transformación de Box-Cox

λ redondeado	2
λ estimado	1.63527
IC de 95% para λ	(0.501767. 2.72277)

En el análisis de varianza para la respuesta transformada (Tabla AC. 5) se observó un concluyente efecto significativo de la iluminación, temperatura y la interacción de ambas.

Tabla AC. 5 Análisis de varianza para la respuesta transformada peso seco

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.003792	0.003792	746.04	0.000
Temperatura	1	0.000770	0.000770	151.57	0.000
Iluminación*Temperatura	1	0.001434	0.001434	282.13	0.000
Error	8	0.000041	0.000005		
Total	11	0.006037			

De la Figura AC. 3 se observó que una temperatura de 32 °C y una iluminación de 1700 lux favorecerían un mayor peso seco, sin embargo, con una iluminación de 800 lux se obtuvo mayor peso seco a 20 °C que a 32 °C, Las mejores condiciones en esta experimentación para un mayor peso seco fueron una iluminación de 800 lux y una temperatura de 32 °C (Figura AC. 4).

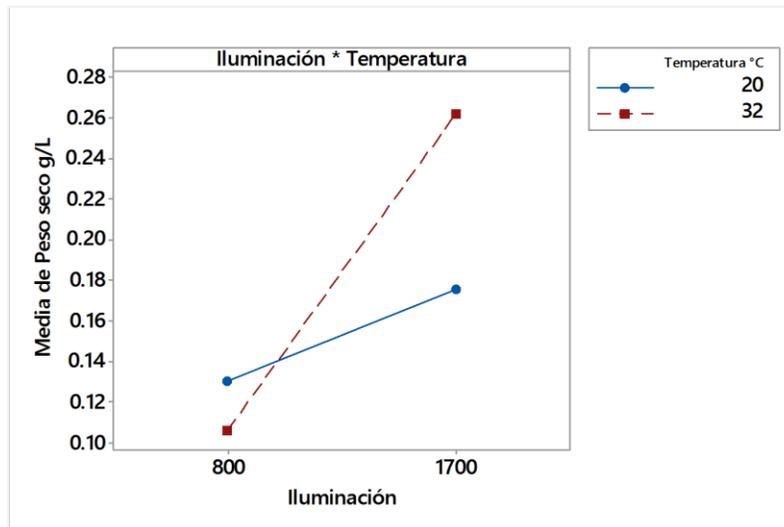


Figura AC. 3 Gráfica de interacción

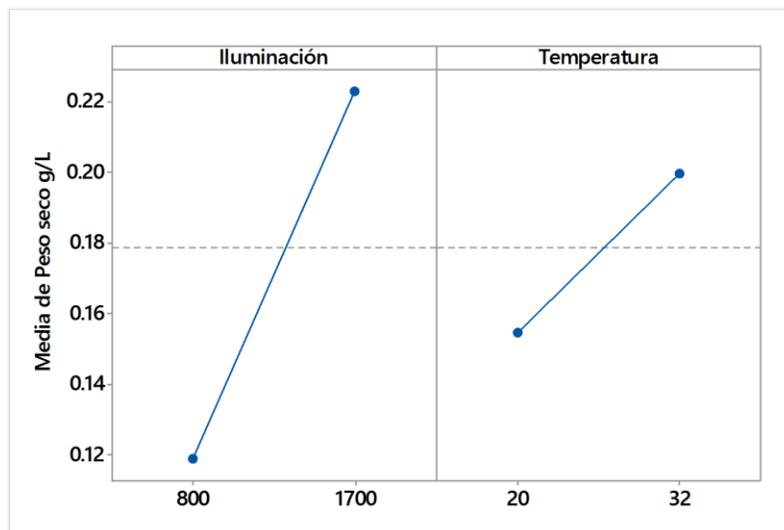


Figura AC. 4 Gráfica de efectos principales

Lamela y Márquez-Rocha (2000) obtuvieron un mayor contenido de biomasa en *Arthrospira maxima* a los 6 días de cultivo (2.7 ± 0.06 g/L), mientras que en ésta experimentación se lograron 0.262 ± 0.004 g/L. Las causas de la diferencia abismal se pueden atribuir al nivel de iluminación utilizado. Ellos trabajaron con cuatro lámparas fluorescentes bajo iluminación continua con una intensidad de $230 \mu\text{mol}$

Einstein $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (aproximadamente 12420 lux) y a 23 °C, por lo que como se ha comprobado, la iluminación tiene un fuerte efecto significativo.

Rincón-Rodríguez et al. (2013) produjeron harina de *Spirulina maxima* para emplearse en la dieta para peces, usaron en los cultivos piloto medio Zarrouk en proporción 25:75 con agua destilada, una temperatura de 29 °C, fotoperiodo 12:12 y un pH de 9.05 ± 0.5 . Para su escalamiento emplearon Na_2CO_3 al 20 % y un fertilizante foliar comercial. Obtuvieron un peso seco de 4.56 g/L con un contenido proteico de 33.9 g/100 g de biomasa seca.

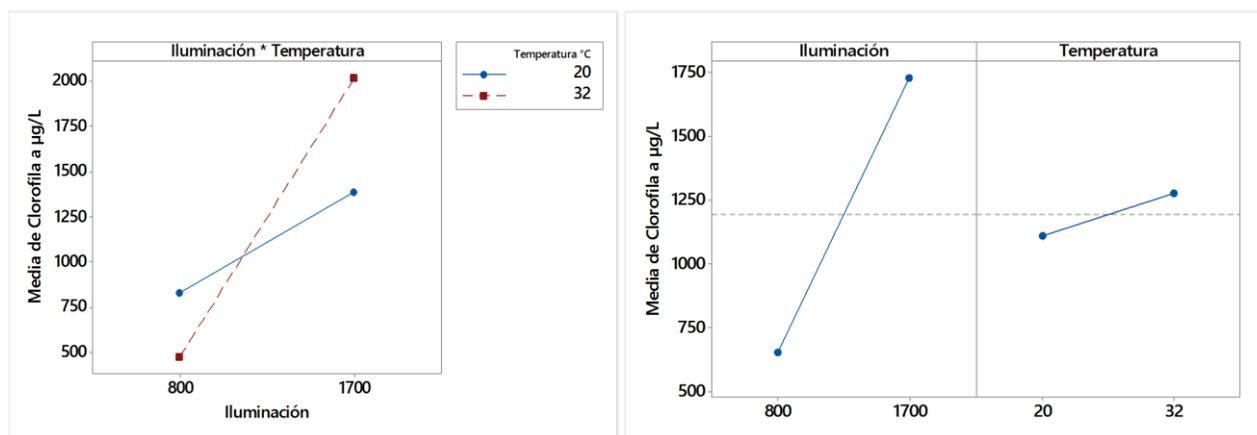
Análisis del contenido de clorofila a

El análisis de varianza muestra que la iluminación y su interacción con la temperatura fueron significativos, la temperatura no ejerció un efecto sobre el contenido de clorofila a (Tabla AC. 6).

Tabla AC. 6 Análisis de varianza para la respuesta clorofila a

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	3470419	3470419	65.12	0.000
Temperatura	1	83901	83901	1.57	0.245
Iluminación*Temperatura	1	798270	798270	14.98	0.005
Error	8	426345	53293		
Total	11	4778934			

Las observaciones con respecto al gráfico de interacción resultaron similares con respecto al análisis de la variable de respuesta peso seco, la única diferencia se debió a la influencia de la temperatura. Para un mayor peso seco la temperatura tiene un gran influjo, no mostrando el mismo efecto para los pigmentos fotosintéticos (Figura AC. 5a).



a)

b)

Figura AC. 5 a) Gráfico de interacción b) Gráfica de efectos principales

Para obtener un mayor contenido de clorofila a se necesitó una temperatura de 32 °C y una iluminación de 1700 lux (Figura AC. 5b).

Análisis del contenido de carotenoides totales

En la Tabla AC. 7 se observó que los mayores efectos significativo los presentaron la iluminación y su interacción con la temperatura.

Tabla AC. 7 Análisis de varianza para la respuesta carotenoides totales

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Iluminación	1	0.000000	0.000000	65.74	0.000
Temperatura	1	0.000000	0.000000	1.90	0.206
Iluminación*Temperatura	1	0.000000	0.000000	9.21	0.016
Error	8	0.000000	0.000000		
Total	11	0.000000			

Con una temperatura de 32 °C y con iluminación de 1700 lux se consiguió el mayor contenido de carotenoides totales. La interacción se dio en niveles bajos de iluminación y temperatura, no resultando atractivos para el interés de la investigación (Figura AC. 6).

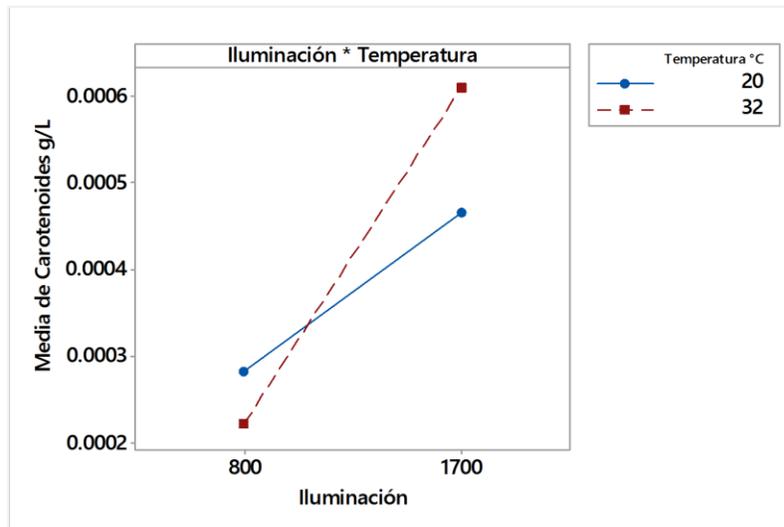


Figura AC. 6 Gráfica de interacción

En la Figura AC. 7 se observa que se obtuvo una mayor cantidad de carotenoides totales con una iluminación de 1700 lux y con una temperatura de 32 °C.

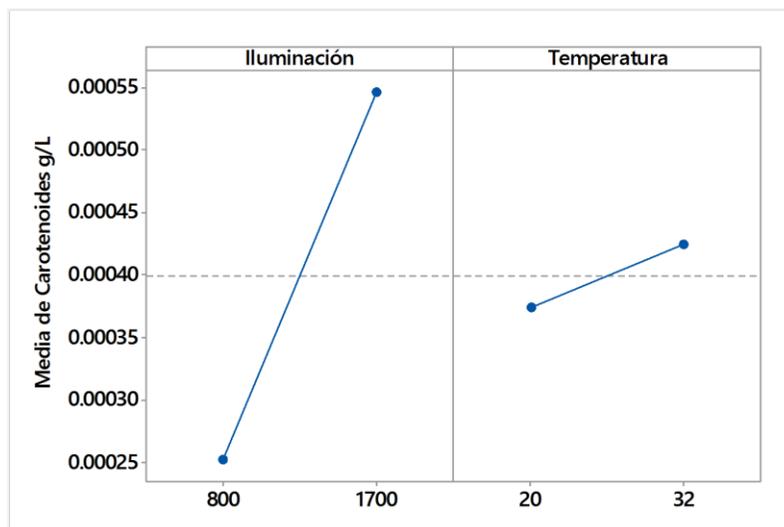


Figura AC. 7 Gráfica de efectos principales

Contenido de ficocianina

La Tabla AC. 8 muestra un incremento del contenido de ficocianina al día 10, llegando casi a doblar su contenido inicial.

Tabla AC. 8 Contenido de ficocianina en el tratamiento 4

Ficocianina	Inicio	Promedio fotobiorreactor 4
µg/mL	1.485	2.835

Las ficobiliproteínas de *Arthrospira máxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg²⁺ (Gallardo et al. 2010).

La C-ficocianina pertenece a un grupo de polipéptidos denominados ficobiliproteínas que se encuentra naturalmente en las cianobacterias y en las algas del género *Rhodophyta* y *Crptophyta*. Las clases más comunes de ficobiliproteínas son la ficoeritrina, la C-ficocianina y la alo-ficocianina (Marín-Prida et al. 2015).

ANEXO D

ANEXO D

Floculación de la microalga *Chlorella* spp.

Metodología

Se utilizó un polímero catiónico de alto peso molecular como floculante, las condiciones de la experimentación se muestran en la Tabla AD. 1

Tabla AD. 1 Parámetros medidos al inicio

	Valor
pH inicial:	7.18
pH final:	7.35
Tiempo de agitación:	2 min
Volumen:	400 mL
Dosis del floculante	0.5 mL
Absorbancia inicial 750 nm:	0.07

La eficiencia de la floculación se calculó con la ec. (AD.1) tomándose las lecturas en el espectrofotómetro UV utilizando como blanco agua destilada.

$$\% \text{ de eficiencia de la floculación} = \frac{Abs_{inicial} - Abs_{final}}{Abs_{inicial}} \times 100 \quad (\text{AD.1})$$

Se utilizó un diseño experimental 2^2 para evaluar el efecto de la concentración del floculante y de las RPM en un equipo de prueba de jarras. La Tabla AD. 2 muestra los niveles de los factores utilizados.

Tabla AD. 2 Valores utilizados en el diseño experimental 2^2

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Concentración (ppm)	1000	2000
RPM	80	170

Resultados

En la Tabla AD. 3 se muestran los valores obtenidos después de someter el medio de cultivo en el equipo de prueba de jarras.

Tabla AD. 3 Resultados obtenidos de la prueba de jarras para la floculación de la microalga

Prueba	RPM	Concentración ppm	Absorbancia final	Eficiencia de floculación (%)
1	80	1000	0.017	75.7142857
2	170	1000	0.005	92.8571429
3	80	2000	0.015	78.5714286
4	170	2000	0.003	95.7142857
Duplicado				
Prueba	RPM	Concentración ppm	Absorbancia final	Eficiencia de floculación (%)
1	80	1000	0.017	75.7142857
2	170	1000	0.004	94.2857143
3	80	2000	0.013	81.4285714
4	170	2000	0.003	95.7142857

Se realizó el análisis de varianza como variable de respuesta la eficiencia de la floculación. De la Tabla AD. 4 se observa que el efecto de las rpm y de la concentración tiene un gran efecto significativo en la floculación de la microalga, mientras que la interacción de ambos factores no influye en esta.

Tabla AD. 4 Análisis de varianza para la variable de respuesta eficiencia de floculación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
RPM	1	563.520	563.520	441.80	0.000
Concentración ppm	1	20.663	20.663	16.20	0.016
RPM*Concentración ppm	1	2.296	2.296	1.80	0.251
Error	4	5.102	1.276		
Total	7	591.582			

Del gráfico de efectos principales (Figura AD. 1) se corrobora claramente la no interacción del efecto de las RPM con el efecto de la concentración del floculante al presentarse las líneas paralelas.

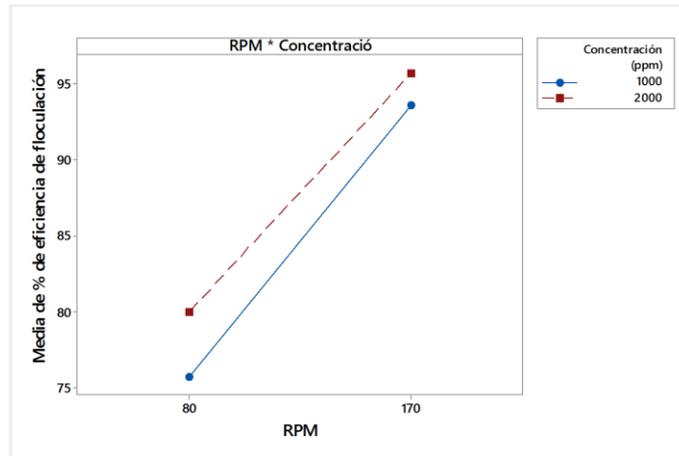


Figura AD. 1 Gráfica de interacciones

En el gráfico de efectos principales (Figura AD. 2) se observa que el efecto de las RPM en la eficiencia es mayor cuando se encuentra en su nivel alto (170 RPM), mientras que un nivel alto del floculante (2000 ppm) mejora la floculación

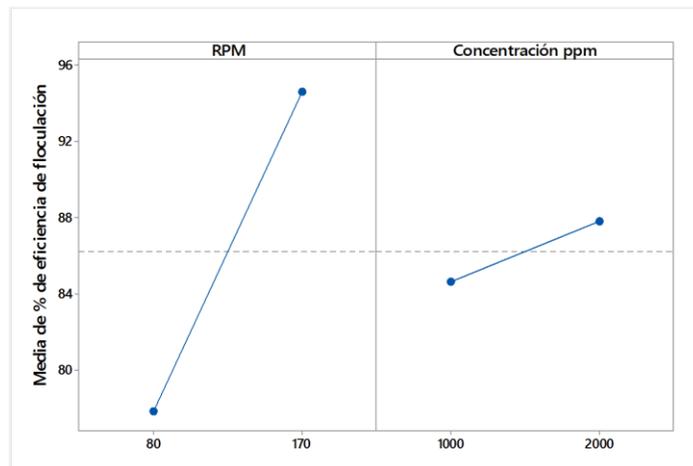


Figura AD. 2 Gráfica de efectos principales

Para obtener una mayor eficiencia de remoción en la recuperación de la microalga se necesita una concentración de floculante de 2000 ppm y una velocidad de agitación de 170 RPM.

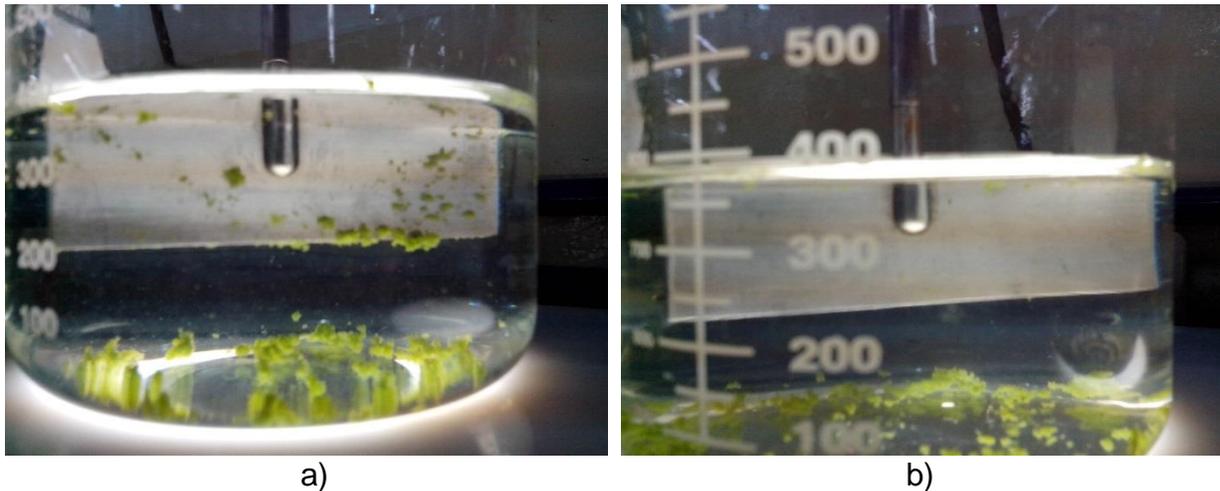


Figura AD. 3 Efectos de la concentración del floculante

En la Figura AD. 3 a) se prestó atención debido a que los flóculos fueron atraídos al metal ya que se encontraban cargados negativamente por la misma naturaleza del floculante bajo una concentración de 2000 ppm, sin embargo, se obtuvo una mayor eficiencia de floculación con este tratamiento a pesar del efecto de atracción electrostática. Mientras que en la Figura AD. 3 b) se observó una nula atracción de los flóculos hacia el metal ya que la concentración empleada del floculante fue baja, pero en este caso la eficiencia de floculación fue menor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J. P., Torres, E y Herrero, C. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. La Coruña: Servicio de Publicaciones, 210.

Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M., Huntington, T. C., and Hasan, M. R. 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals. FAO Fisheries and Aquaculture Circular.

Alvear-Alayón, M. R., Castillo-Saldarriaga, C. R. y Henao-Argumedo, D. L. 2011. Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Tesis de licenciatura. Universidad de Cartagena. Colombia.

Arredondo-Vega B.O. y Voltolina. D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. México.

Arrúe-Zúñiga, R. 2013. Reduction of Carbon Footprint by means of *Chlorella* sp. cultures in photobioreactors. Journal of Technological Possibilism. **2**(3): 2013

Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., and Wahidin, S. 2013. Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Bioresource technology. **148**: 373-378.

Ávila-López, M. A., Forja, J. y Lubian, L. M. 2010. Contribución de bases orgánicas a la alcalinidad en cultivo de microalgas marinas: *Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis gaditana* y *Nannochloris atomus*. Póster presentado al XV Seminario Ibérico de Química Marina.

Banco mundial. 2014. Indicadores de desarrollo mundial (WDI). <http://datos.bancomundial.org/indicador/EN.ATM.CO2E.PC/countries/MX-CN-US-BR-IN?display=graph> (consultado abril, 2014).

Bahret, M., Chaves, J., Courts, G. y D'alessio, N. 1992. Biología. Ed. Prentice Hall. EUA.

Banco Español de Algas. 2015. Medios de agua dulce. <http://marinebiotechnology.org/es/component/virtuemart/medios-de-cultivo/medios-de-agua-dulce/bbm-detail?Itemid=0> (consultado Mayo 2015).

Band, S.C. J. 1997. Generación biotecnológica para la producción de microalgas. *Ciencia y Mar*. **1**(1): 23-30.

Barajas-Solano, A. F., Godoy-Ruiz, C. A., Monroy-Dávila, J. D., Barajas-Ferreira, C. y Kafarov, V. 2012. Mejoramiento del secuestro de CO₂ por *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio. *Revista ION*. **25**(2): 39-47.

Becker, E. 1994. *Biotechnology and Exploitation of Algae. The Indian Approach*. Deutsche Gesellschaft Für Technische Zusammenarbeit GmbH, Eschborn, Germany. 216.

Benavente-Valdés, J. R., Montañez, J. C., Aguilar, C. N., Méndez-Zavala, A. y Valdivia, B. 2012. Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. **4**(7).

Berg, J. M., Stryer, L. y Tymoczko, J. L. 2008. Bioquímica. Editorial Reverté. España.

Bligh, E. G. y Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J. Biochem. Physiol*. **37**: 911-917.

Borowitzka, M. A. 1988. Vitamins and fine chemicals. In Borowitzka, M. A., Borowitzka, L.J. (eds), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 153–196.

Caballero, G. M. 2013. Desarrollo del proceso de bioconversión del CO₂ contenido en biogás a O₂ y biomasa a partir de microalgas. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Cabeza-Herrera, E. 2013. Fundamentos de microbiología predictiva: Aplicaciones teóricas y prácticas. Universidad de Pamplona. Colombia.

Campbell, N. y Reece, J. 2007. Biología. Ed. Médica Panamericana. España.

Camacho-Quezada, R. D., Escalera-Castillo, C. P., Campos-Toscuente, V. L., González-Pacheco, M. A., y Vázquez-Cervantes, G. I. 2009. Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. www.feriadelasciencias.unam.mx/antteriores/feria17/ (consultado febrero, 2015)

Caner, K. O. Ç., Anderson, G. A., Bulent, K. O. Ç. and Vatandaş, M. 2011. Biodiesel Potential of *Chlorella Kessleri* Grown under LED and Fluorescent Illumination Sources. Tarım Makinaları Bilimi Dergisi. **7**(4).

Cañizares-Villanueva, R. O. y Perales, H. V. 2012. Producción de carotenoides a partir de las microalgas. http://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/wp-content/uploads/2012/09/IMPRIMIBLE_Microalgas.pdf (consultado marzo, 2014)

Cayré, M., Vignolo, G. y Garro, O. 2004. Modelo dinámico para el crecimiento de bacterias lácticas sobre emulsiones cárnicas. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/8-Exactas/E-072.pdf> (consultada octubre, 2014).

Cayré, M. E., Vignolo, G. M. y Garro, O. A. 2007. Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas. Información tecnológica. **18**(3): 23-29

Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., y Morales, E. 2004. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. **38**(2).

Cheirsilp, B., and Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*. **110**: 510-516.

Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., and Das, K. C. 2009. Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*. **10**(2): 518-532.

Chisti, F. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. **25** (2007): 294–306.

Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B. y Cañizares-Villanueva, R. O. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. **28**(8): 450-456.

Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., and Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. **48**(6): 1146-1151.

Cortijo, D. 2013. Desalcalinización del agua mediante intercambio iónico. *Ingeniería Industrial*. **31**: 221-238.

Domínguez, S. V. 2014. Evaluación del desempeño de *Chlorella* spp. y *Spirullina maxima* en el proceso de bioconversión de dióxido de carbono contenido en biogás a oxígeno y biomasa. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A. A. y Teixeira, J. A. 2010. Third generation biofuels from microalgae. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. **2**(3):1355-1366.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.

Europa, E., Valdivia, V., Sánchez, R., Manzo, P., Colín, F., García, A. y Butrón, R. 2012. Uso terapéutico de algunos microorganismos, microalgas, algas y hongos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* **43**(4).

Fernández-Cordero, B. 2013. Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla. España.

FAO. 2015. Cambios en la calidad y duración en almacén del pescado enfriado. <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s07.htm> (consultado septiembre, 2015)

Fon-Sing, S., Isdepsky, A., Borowitzka, M. A., and Moheimani, N. R. 2011. Production of biofuels from microalgae. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.* **18**(1): 47-72.

Fulke, A. B., Mudliar, S. N., Yadav, R., Shekh, A., Srinivasan, N., Ramanan, R., Krishnamurthi, K., Saravana, S. and Chakrabarti, T. 2010. Bio-mitigation of CO₂, calcite formation and simultaneous biodiesel precursors production using *Chlorella* sp. *Bioresource technology.* **101**(21): 8473-8476.

Gallardo, C. Á., Cano, E., López, G. E., Blas, V., Olvera, R., Franco, M., & Ortiz, R. 2010. Las ficobiliproteínas de *Spirulina maxima* y *Pseudanabaena tenuis* protegen contra el daño hepático y el estrés oxidativo ocasionado por el Hg²⁺. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* **41**(2): 30-35.

García-Cubero, R. 2014. Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla. España.

Gracida-Álvarez U.R., Corona-Cruz A.I., Sacramento-Rivero J.C. 2013. Optimización de la productividad de lípidos en microalgas mediante modificaciones a las condiciones de cultivo. Foro de Ciencias Químicas y Bioquímicas. [http://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD_10/Quimica Farmaceutica/40.pdf#page=15](http://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD_10/Quimica_Farmaceutica/40.pdf#page=15) (consultado marzo, 2015)

Graham, L. K., and Wilcox, L. W. 2000. The origin of alternation of generations in land plants: a focus on matrotrophy and hexose transport. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **355**(1398): 757-767.

Gómez, N., Donato, J. C., Giorgi, A., Guasch, H., Mateo, P. y Sabater, S. 2009. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. Capítulo 12: Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Fundación BBVA. España.

Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., and Yang, J. 2014. Effects of Light and pH on Cell Density of *Chlorella Vulgaris*. *Energy Procedia*. **61**: 2012-2015.

Gutiérrez-Barberena, M. E. 2011. Modelos sugeridos como herramienta para la microbiología predictiva en la industria de los alimentos. Tesis de maestría. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Gutiérrez, H. P. y R. de la Vara S. 2008. Análisis y diseño de experimentos. M Graw-Hill Companies, Inc. México.

Hanna Instruments. 2008. Instrumentos de análisis para agricultura. www.hannainst.es/catalogo-productos (consultado diciembre, 2014)

Hernández-Sandoval, F. E. 2004. Calidad de *Thalassiosira fluviatilis* (Bacillariophyceae) cultivada con dos fuentes de nitrógeno y su efecto en el desarrollo de larvas protozoa de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.

Hernández-Pérez, A. y Labbe, J. I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. Rev. biol. mar. oceanogr. **49**(2): 57-173 <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001> (consultado diciembre, 2014)

Humphrey, A. M. 2004. Chlorophyll as a color and functional ingredient. Journal of food science. **69**(5): C422-C425.

Infante, C., Ángulo, E., Zárate, A., Flores, J., Barrios, F. y Zapata, Z. 2012. Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. Avances en Ciencias e Ingeniería. **3**(2): 159-164.

Jacob-Lopes, E., Ferreira-Lacerda, L. y Teixeira-Franco, T. 2007. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nægeli* in a bubble column photobioreactor. Biochemical Engineering Journal. **40**: 27–34.

Jacob-Lopes, E., Gimenes-Scoparo, C. H., Queiroz, M. I. y Teixeira-Franco, T. 2009. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. Energy Conversion and Management. **51**: 894–900.

Kanno, T. y Kazie, U. 2005. *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicado por Woodland Publishing. pg63.

Kim, D. G., Lee, C., Park, S. M., and Choi, Y. E. 2014. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. Bioresource technology. **159**:240-248.

Kondo, K., Okamoto, S., y Matsumoto, M. 2013. Effects of Cultivation Conditions on Chlorophyll Biosynthesis and Carotenoid Accumulation of the Microalga *Chlorella Fusca*. Journal of Chemistry and Chemical Engineering. **7**(5): 431.

Lamela, T., y Márquez-Rocha, F. J. 2000. Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias Marinas*. **26**(4): 607-619.

Limnología. 2007. Medición de pigmentos fotosintéticos. <http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/limnologia/> (consultado marzo, 2015)

López-Adrián, S. y Barrientos-Medina, R. C. 2005. La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán. México.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall. K. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Lu, C. and Vonshak, A. 1999. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. *J. Appl. Phycol.* 11: 355-359.

Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E. Robert, R. and Cadoret, J. P. 2013. Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of *Isochrysis* sp. (T-iso). *Journal of applied phycology*. **25**(1): 109-119.

Marín-Prida, J., Llópiz-Arzuaga, A., Pavón, N., Pentón-Rol, G., y Pardo-Andreu, G. L. 2015. Aplicaciones de la c-ficocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas/applications of c-phycocyanin: methods of purification and pharmacological properties. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. **1**(1).

Martin-Ramos, P., Navas-Gracia, L. M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Martin-Gil, J., Martin-Bravo, E., Chamorro-Posada, P. y Duran-Altisent, J. M. 2010. Diodos emisores de luz para irradiación de plantas. *Scribd*.

Martin, F. P. H. 2010. Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. National University Of Singapore. Singapur.

Martínez-Silva, A. S. 2010. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyta*: volvocales) cultivada en diferentes medios. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. México.

Mehlitz, T. H. 2009. Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors. Tesis de maestría. Faculty of California Polytechnic State University. EUA.

Mejía-Rendón, S., Roldan, G. J. C. and Voroney, R. P. 2013. Effect of carbon dioxide concentration on the growth response of *Chlorella vulgaris* under four different LED illumination. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. **2**(3): 125-131.

Meléndez- Martínez, A., Vicario, I. M. y Heredia, F. J. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. **57**(2):109-117.

Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C. y Marco, E. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PPC 7120 en función del pH y CO₂. INCI. Caracas. **27**(7):822-832.

Muñoz-Peñuela, M., Ramírez-Merlano, J. A., Otero-Paternina, A. M., Medina-Robles, V. M., Cruz-Casallas, P. E., y Velasco-Santamaría, Y. M. 2012. Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. **25**(3): 438-449.

Norma Oficial Mexicana NMX-AA-036-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. México.

Norma Mexicana NMX-AA-012-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de oxígeno disuelto en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. México.

Ogawa, T. and Terui, G. 1970. Studies on the growth of *Spirulina platensis*. I. On the pure culture of *Spirulina platensis*. J. Ferment. Technol. **48**: 361–367.

Pástor-Guerrero, V. P. y Pozo-Castro, A. C. 2013. Evaluación del rol de la iluminación, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana. Perú.

Peng, F., Liu, S. B., Xu, H. Y., and Li, Z. Q. 2013. A Comparative Study on the Analysis Methods for Chlorophyll-a. In Advanced Materials Research. **726**: 1411-1415.

Peralta-Ruiz, Y. Y., Pardo-Cárdenas, Y., Canchila-Romero, H. y Kafarov, V. 2012. Implementación de la metodología de síntesis y análisis de proceso a la etapa de cosecha de microalgas para la producción de biodiesel. Prospect. **10**(1): 132-144.

Pérez-Pazos, Jazmín-Vanessa y Fernández-Izquierdo, P. 2011. Synthesis of neutral lipids in *Chlorella* sp. under different light and carbonate conditions. CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro. **4**(4): 47-58.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012253832011000200004&lng=en&tlng=en (consultado agosto 2015)

Plant and Soil Sciences eLibraryPRO. 2015. Los pigmentos vegetales y la fotosíntesis. <http://plantandsoil.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1011797732&topicorder=3&maxto=10&mintto=1> (consultado marzo, 2015)

Plasencia, A. J. 2012. Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs. Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid. España.

Primo-Yúfera, E. 2007. Química Orgánica Básica y Aplicada: De la molécula a la industria. Editorial Reverté. España.

Quevedo, C., Morales, V. y Acosta, C. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. Revista de la facultad de química farmacéutica. **15**(1):25-31.

Quintana-Cabrales, M. M., Hernández-Nazario, L. H., Morris-Quevedo, H. y Fernández-González, M. 1999. Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella* sp. Revista Cubana de Alimentos y Nutrición. **13**(1):9-13.

Rendón-Castrillón, L. J., Ramírez-Carmona, M. E., y Vélez-Salazar, Y. 2015. Microalgas para la industria alimenticia. Universidad Pontificia Bolivariana. Colombia.

RAVEN, P. H. y EVERT, R. E. 2001. Biología vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Richmond, A., and Grobbelaar, J. U. 1986. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. Biomass. **10**(4): 253-264.

Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. U. K.

Rincón-Rodríguez, D. D., Semprún-Avenidaño, A. M., Dávila-Ojeda, M. J., Velásquez-Gonzalez, H. A., Morales-Avenidaño, E. D., y Hernández-Rangel, J. L. 2013. Producción de harina de *Spirulina máxima* para ser empleada como ingrediente en la elaboración de dietas para peces. Zootecnia Tropical. **31**(3): 187-192.

Ritchie, R. J. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, metanol and etanol solvents. Photosynth Res. **89**: 27-41

Ronda, A., Funes, F. y Pérez, L. 1980. Crecimiento y desarrollo de las gramíneas en Cuba, 2: Efecto de tres intervalos de corte en el rendimiento de ocho gramíneas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola (Cuba)*. **14**(2): 175-181.

Rodríguez-Amaya, D. B., and Kimura, M. 2004. HarvestPlus handbook for carotenoids analysis. Ed. HarvestPlus. U. S. A.

Rodríguez, C. A. R. y Triana, S. F. C. 2006. Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (= *Arthrospira*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

Romero-Maza, L., Guevara, M., Arredondo-Vega, B., Gómez, B., Licett, B., y Freites, L. 2011. Contenido de lípidos, ácidos grasos, exopolisacáridos y minerales de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Agronomía Trop.* **61**(3-4): 231-240.

Romero, T., Miyashita, H., y Kurano, N. 2000. Crecimiento y composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en residual pesquero. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. **34**(2).

Romo, P. A. K. 2001. Manual para el cultivo de microalgas. Memoria técnica profesional. UABCS.

Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C., y Morales, E. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (*Chroococcales*) en función de la irradiancia. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*. **56**(2).

Ruiz-Martínez, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Tesis de maestría. Universidad Politécnica de Valencia. España.

Sánchez, E., Garza, M., Almaguer, V., Sáenz, I. y Liñán, A. 2008. Estudio cinético de isotermas de adsorción de Ni(II) y Zn(II) utilizando biomasa del alga *Chlorella* sp. Inmovilizada. Ciencia UNAL. **11**(2): 168-176.

Sánchez-García, L. 2013. Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar "air-lift". Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. C., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. and Chisti, Y. 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. Enzyme and Microbial Technology. **31**:1015-1023.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. y Painter, P. R. 1992. Microbiología. Editorial Reverté, S. A. España.

Schulze, P. S., Barreira, L. A., Pereira, H. G., Perales, J. A., and Varela, J. C. 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. Trends in biotechnology. **32**(8): 422-430.

SEMARNAT. 2014. Plan nacional de desarrollo 2013-2018 PROMARNAT. <http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/Documents/PROMARNAT%202013-2018.pdf> (consultado mayo, 2014)

SEMARNAT. 2015. Emisión Nacional de Gases de Efecto Invernadero. http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/05_atmosfera/5_2_2.html (consultado agosto, 2015)

Shen-Yi, C., Chien-Ya, K., Tzu-Ting, H., Chia-Jung, L., Seow-Chin, O., Chun-Da, C., Jo-Shu, C. and Chih-Sheng, L. 2011. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. Bioresource Technology. **102**:9135-9142.

Sistema de Información de Biodiversidad. Navegador taxonómico. <http://www.sib.gov.ar/index.php> (consultado noviembre, 2014)

Tadeo, F. R., y Gómez-Cadenas, A. 2000. Fisiología de las plantas y el estrés. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona, Mc Graw-Hill, 481-490.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Publicacions de la Universitat Jaume I. España

Tórtora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. Ed. Médica Panamericana. España.

UANL.1973. Curso intensivo de hidrobiología aplicada a la ingeniería sanitaria para preservar la vida acuática y prevenir la contaminación ambiental. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020082346/1020082346.html> (consultado febrero, 2015)

USDA. 2015. Pathogen Modeling Program (PMP) Online. <http://pmp.errc.ars.usda.gov/default.aspx> (consultado septiembre, 2015)

Usharani, G. 2012. Spirulina Cultivation A Review. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive. **3**(6).

Valladares-Peñeherrera, F. V. 2014. Diseño de una planta de extracción de aceite a partir de microalgas (*Chlorella* sp). Tesis de licenciatura. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador.

Vásquez-Villalobos, V., Artega, P., Chaname, K., and Esquivel, A. 2013. Mathematical modeling and through artificial neuronal networks of the *Spirulina* sp. growth in a photobioreactor with fluorescent light source and solid state lighting. Scientia Agropecuaria. **4**: 199-209

Wang, B., Li, Y., Wu, N. and Lan, C. Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. Appl. Microbiol Biotechnol. **79**: 707-718.

Zhang, Y. M., Chen, H., He, C. L., and Wang, Q. 2013. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3. PLoS One, **8**(7): e69225.

Zhang, Q., Wang, T., and Hong, Y. 2014. Investigation of initial pH effects on growth of an oleaginous microalgae *Chlorella* sp. HQ for lipid production and nutrient uptake. Water Science and Technology. **70**(4): 712-719.

Zhang, Q., Zhan, J. J., and Hong, Y. 2015. The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient removal characteristics of *Chlorella* sp. HQ. Desalination and Water Treatment. 1-6.

Zheng, H., Gao, Z., Yin, F., Ji, X., and Huang, H. 2012. Effect of CO₂ supply conditions on lipid production of *Chlorella vulgaris* from enzymatic hydrolysates of lipid-extracted microalgal biomass residues. Bioresource technology. **126**: 24-30.

Zhu, C. J. and Lee, Y. K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. Journal of Applied Phycology. **9**: 189-194.