



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE ENERGÍAS RENOVABLES
INSTITUTO DE INGENIERÍA
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES-JURIQUILLA**

**EFFECTO DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA EN UN CULTIVO
MIXTO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL,
CLOROFILA *A* Y CAROTENOIDES UTILIZANDO CICLOS
SINUSOIDALES DE TEMPERATURA**

TESIS

Que para obtener el título de
Ingeniera en Energías Renovables

PRESENTA

Sady Monserrat García Delgadillo

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Adriana Margarita Longoria Hernández

Temixco, Morelos a 19 de mayo de 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



OF/IER/LIER/048/2021

ASUNTO: Notificación de jurado y fecha para examen profesional mediante aula virtual.

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
DIRECTORA GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente.

Por medio de la presente le informo que el día miércoles 19 de mayo de 2021, a las 10:00 h, mediante Aula Virtual del Instituto de Energías Renovables, habilitada por la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación de la UNAM, la **C. SADY MONSERRAT GARCÍA DELGADILLO**, con número de cuenta 312325671 de la Licenciatura de Ingeniería en Energías Renovables, llevará a cabo la presentación del trabajo de tesis y examen profesional titulado:

“Efecto de la intensidad lumínica en un cultivo mixto para la producción de biomasa microalgal, clorofila a y carotenoides utilizando ciclos sinusoidales de temperatura”

Debido a que el alumno ha cumplido con los requisitos que establece el Reglamento General de Exámenes, el Comité Académico de la Licenciatura de Ingeniería en Energías Renovables, le asigna el Jurado de Examen Profesional integrado por los siguientes académicos.

PRESIDENTE:	DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
VOCAL:	DRA. ALINA JUANTORENA UGÁS
SECRETARIO:	DRA. ADRIANA MARGARITA LONGORIA HERNÁNDEZ
SUPLENTE:	DRA. ANABEL LÓPEZ ORTIZ
SUPLENTE:	DR. PATRICIO JAVIER VALADÉS PELAYO

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente,
“Por mi raza hablará el espíritu”
Temixco, Mor., a 10 de mayo de 2021

Dr. Jorge Alejandro Wong Loya
Coordinador de la LIER
IER-UNAM

JAWL'mfp.



Priv. Xochicalco s/n,
Col. Centro,
62580 Temixco, Morelos, México
T. 01 (777) 362 00 90
(52) 55 56 22 97 00

ier.unam.mx

A mis papás por su amor, apoyo incondicional, soporte, por impulsarme, guiarme y siempre estar ahí, gracias a ustedes sueño en grande.

A mi hermana por ser mi amiga, mi cómplice y una gran compañera de vida.

Sin ustedes no lo hubiera logrado.

AGRADECIMIENTOS

A la vida, a Dios y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme lograr una parte de mis metas.

A la Dra. Adriana Longoria por su aliento, apoyo, confianza y paciencia. Sin su serenidad el trabajo no sería posible.

A los miembros del jurado Dr. Alfredo Martínez Jiménez, Dra. Alina Juantorena Ugás, Dra. Anabel López Ortiz y Dr. Patricio Javier Valadés Pelayo, por su tiempo y valiosos comentarios que me brindaron otra perspectiva del trabajo.

A la Mtra. Dulce Ruiz, por su amistad, su complicidad, su conocimiento y su apoyo durante la etapa de experimentación. A Martha por todo el apoyo brindado en el laboratorio.

A José Campos y Yareli por el apoyo en material y la gran disposición para utilizar el espectrofotómetro.

A mi familia por compartir mis alegrías.

A mis amigas Mariana y Julia, por su amistad incondicional. A Luis, Adrián y Miguel, por las risas, las pláticas y todo el tiempo compartido, sin ustedes esta etapa no hubiera sido la misma.

Por el apoyo económico brindado para adquirir el material y equipo utilizados en la realización del presente trabajo agradezco a los proyectos: DGAPA-PAPIIT-UNAM IN110118 y DGAPA-PAPIIT-UNAM IN109319.

RESUMEN

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos, capaces de adaptarse y crecer en condiciones ambientales extremas, están presentes en la mayoría de los ecosistemas, principalmente acuosos. Debido a la generación de productos de valor agregado han sido utilizadas para consumo humano, consumo animal, en la industria farmacéutica y cosmética y para aplicaciones energéticas.

Para aplicaciones energéticas, específicamente como materia prima para la producción de biomasa presentan ventajas respecto a fuentes vegetales. Necesitan de una fuente de energía lumínica para llevar a cabo la fotosíntesis, que puede ser abastecida con el Sol, el medio acuoso puede ser puro o crecer en aguas residuales, sirviendo como biorremediación, su crecimiento puede llevarse en espacios reducidos, por lo que no compite por el uso de tierra, su tiempo de crecimiento es corto y finalmente son responsables del mayor porcentaje de captura de carbono y de generación de oxígeno.

Aunque pueden crecer en condiciones no favorables, para tener mayor concentración celular es necesario conocer las condiciones óptimas de los cultivos específicos. La luz es el factor más importante a tomar en cuenta, en este estudio se analizaron los efectos de diferentes intensidades de luz y su influencia en la duplicación celular, la tasa de crecimiento neta, la acumulación de los pigmentos clorofila *a*

y carotenoides, el pH y la cantidad de biomasa seca total al final del experimento.

El cultivo microalgal examinado presentó las siguientes características: cultivo microalgal mixto fotoautótrofo, crecido en un sistema cerrado de placa plana, medio de cultivo comercial foliar Bayfolan (®) Forte, en configuración lote.

El cultivo se sometió a tres distintas intensidades de luz, 500, 750 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un comportamiento sinusoidal de la luz, representando así con más precisión la distribución de la radiación diaria. La temperatura presentó dicho comportamiento durante las horas de iluminación, mientras que en el periodo de oscuridad se mantuvo constante. Estas imposiciones se realizaron para conocer la viabilidad del cultivo en condiciones ambientales presentadas en Temixco, Morelos.

Al ser un cultivo microalgal mixto, la mayor ventaja que presenta es la adaptabilidad a las distintas condiciones de crecimiento, en consecuencia el cultivo se adaptó a las tres condiciones de luz, sin embargo, presentó una mayor tasa de crecimiento con 0.016 h^{-1} y un menor tiempo de duplicación celular con 1.72 días a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Al finalizar el periodo de crecimiento se concluyó que los pigmentos como la clorofila *a* y los carotenoides funcionaron como accesorios captadores de luz, debido a que no existe ninguna condición estresante de luz para presentar mecanismos de protección.

Sin embargo, el cultivo que presentó una mayor cantidad de biomasa seca con un rendimiento de 0.2399 g L^{-1} se sometió a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, debido a que se encontraba al inicio de su etapa de crecimiento exponencial, siendo el único cultivo que podría someterse a un mayor tiempo de incubación.

El rango de pH en el que el crecimiento celular es óptimo en todas las condiciones fue entre 6.3 y 6.6, concluyendo que el pH no dependió en gran medida de la intensidad de luz.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	IV
Índice de figuras	IX
Introducción	2
1. Microalgas	6
1.1. Características generales	6
1.2. Fotosíntesis	8
1.2.1. Reacciones en fase luminosa	9
1.2.2. Reacciones en fase oscura	10
1.3. Pigmentos fotosintéticos	11
1.3.1. Clorofilas	11
1.3.2. Carotenoides	13

1.4. Aplicaciones	15
2. Biomasa microalgal: Factores involucrados	17
2.1. Selección de la especie	19
2.2. Luz	20
2.3. Nutrientes	23
2.4. Medios de cultivo	25
2.5. Temperatura	26
2.6. pH	27
2.7. Mezclado	27
3. Técnicas de cultivo para la producción de biomasa microalgal	29
3.1. Tipos de nutrición	29
3.1.1. Fotoautotrófica	29
3.1.2. Heterotrófica	30
3.1.3. Mixotrófica	30
3.2. Modos de cultivo	31
3.2.1. Cultivo lote	31
3.2.2. Lote alimentado	33
3.2.3. Continuo	33
3.3. Sistemas de cultivo	34
3.3.1. Abierto	34

3.3.2. Cerrado	37
4. Materiales y métodos	42
4.1. Microorganismos fotosintéticos	42
4.2. Mantenimiento del cultivo mixto y medio de cultivo .	42
4.2.1. Medio de cultivo comercial	42
4.2.2. Preinóculo y mantenimiento de la cepa	43
4.3. Cultivos experimentales	44
4.3.1. Inóculo	44
4.3.2. Condiciones experimentales	47
4.4. Determinaciones físicas	48
4.4.1. Conteo celular	48
4.4.2. Morfología celular	49
4.4.3. Peso seco	50
4.5. Determinaciones analíticas	50
4.5.1. Determinación de pigmentos	50
5. Resultados y discusión	53
5.1. Determinación de las condiciones generales de cultivo	53
5.2. Influencia de la intensidad de luz en la morfología del cultivo mixto	56
5.3. Efecto de la intensidad de luz en las diferentes etapas del crecimiento microbiano	61
5.3.1. Crecimiento neto	63

5.4. Efecto en el pH	65
5.5. Efecto en la concentración de clorofila <i>a</i>	68
5.6. Efecto en la concentración de carotenoides	70
5.7. Perspectivas de uso	73
Conclusiones	75
Recomendaciones	77
Bibliografía	79

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Etapas de la fotosíntesis.	9
1.2. Estructura química de la clorofila.	12
1.3. Espectro de absorción y emisión de la clorofila <i>a</i> . . .	13
1.4. Estructura química de los carotenos más comunes en microalgas.	14
2.1. Diagrama esquemático de la fotosíntesis versus irra- diancia.	21
3.1. Curva de crecimiento típica en un cultivo por lotes. .	32
3.2. Sistemas de cultivo abierto.	37
3.3. Sistemas de cultivo cerrado.	40
4.1. Condiciones experimentales durante la preparación del pre-inóculo.	44
4.2. Sistema de cultivo experimental.	46

4.3. Condiciones experimentales.	48
5.1. Evolución celular del cultivo mixto sometido a una intensidad lumínica de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	58
5.2. Evolución celular del cultivo mixto sometido a una intensidad lumínica de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	59
5.3. Evolución celular del cultivo mixto sometido a una intensidad lumínica de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	60
5.4. Comparación de las etapas de crecimiento microbiano en el cultivo mixto.	62
5.5. Comparación de la evolución del crecimiento neto diario del cultivo mixto sometido a diferentes intensidades de luz.	65
5.6. Comparación del pH en un cultivo mixto sometido a diferentes intensidades de luz.	66
5.7. Comparación entre el pH y la tasa de crecimiento diario en diferentes condiciones de luz.	67
5.8. Comparación de la concentración volumétrica de clorofila <i>a</i>	68
5.9. Comparación de la concentración volumétrica de carotenoides.	71

Introducción

Justificación

La demanda global de energía ha ido en aumento debido a la sobrepoblación ocasionando un crecimiento industrial, aumentando el uso de combustibles fósiles y generando gases de efecto invernadero (GEI). El crecimiento de la población llevará a buscar tierra disponible para satisfacer la ingesta calórica y limitará su uso para otros fines [1, 2].

En los últimos años la búsqueda de fuentes alternativas ha encontrado que la biomasa como combustible presenta ventajas al estar naturalmente disponible en forma sólida, pero puede ser convertida a un combustible líquido o gaseoso.

Además, los combustibles derivados de biomasa representan una solución limpia y ambientalmente segura, ya que emiten una cantidad despreciable de gases de efecto invernadero comparados con los combustibles fósiles, al eliminar dióxido de carbono presente en el aire durante su crecimiento. Al utilizar biodiésel como combustible para un motor diésel las emisiones pueden ser hasta un 60 % menores [2].

La biomasa se ha clasificado en generaciones de acuerdo a la materia prima utilizada, la biomasa de primera generación proviene principalmente de granos, de caña de azúcar y de aceites vegetales [3].

El tipo de biomasa de primera generación tiene una importante limitante, como lo es el impacto negativo que se tiene en la cadena de producción de alimentos para consumo humano [4].

Estos impactos han ocasionado el desarrollo de una nueva generación que no amenace la seguridad alimentaria, es por eso que la segunda generación de biomasa se produce con cultivos lignocelulósicos, residuos agroforestales o sus co-productos como lo son la biomasa leñosa o la paja de trigo [3].

El material lignocelulósico de rápido crecimiento como lo es el pasto, es barato, abundante y renovable. Está compuesto por celulosas, hemicelulosas y lignina por lo cuál el mejor proceso para obtener azúcares es la sacarificación, por el bajo consumo de energía [4]. Las desventajas que presenta la segunda generación son el fuerte impacto en el consumo de agua, la amenaza a la biodiversidad debido a la búsqueda de tierras cultivables extensivas y el costo de los pretratamientos en la materia prima. La tercera generación, a partir de microalgas, ha logrado resolver estos aspectos [1, 2].

Las microalgas no compiten por tierra disponible para el cultivo alimenticio, su cultivo es sencillo, ya que pueden crecer en entornos limitados de nutrientes y condiciones ambientales extremas, pueden crecer en agua limpia o residual. Las desventajas que posee son el alto costo durante la etapa de investigación, en la que actualmente se encuentra, el costo de los fotobiorreactores, la facilidad de contaminación en los cultivos y el consumo energético para su cultivo en la etapa de mezclado, filtración, centrifugado y secado [1].

Objetivo general

Evaluar el efecto de la intensidad lumínica en el cultivo mixto microalgal y seleccionar condiciones favorables para el aumento en la producción de biomasa.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes intensidades de luz en la producción de biomasa microalgal en un medio de cultivo comercial.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la producción de biomasa microalgal.
- Evaluar los rendimientos de producción de biomasa en los casos propuestos.
- Analizar el contenido de pigmentos en la producción de biomasa.
- Analizar la influencia en el pH debido a la cinética de crecimiento.
- Definir las condiciones que favorezcan una mayor producción de biomasa microalgal.

Fundamentos teóricos

CAPÍTULO 1

MICROALGAS

1.1. Características generales

Las microalgas son reconocidas como una de las formas de vida más antiguas sobre la tierra [5]. Son un grupo diverso de microorganismos generalmente unicelulares fotosintéticos, existen alrededor de 50000 especies. Son talofitas, su principal pigmento fotosintético es la clorofila *a* [6].

Suelen ser organismos acuáticos, pero se encuentran presentes en todos los ecosistemas. Sus estructuras tienen como función principal la conversión de energía, les permite adaptarse a las condiciones ambientales prevalecientes [5]. Según la biología molecular son un grupo de microorganismos que han adquirido estructuras intracelulares con su propio mecanismo de fotosíntesis, se han reportando más de 200000 especies. Contribuyen a la mitad de la actividad fotosintética global. Existen dos tipos básicos de células en las microalgas: procariontas y eucariotas. [6, 7, 8].

Procariotas

Las procariotas carecen de orgánulos, como los plastos, mitocondria, núcleo y aparato de Golgi. El aparato fotosintético está encerrado en el tilacoide, que consiste en un sistema de membrana que puede organizarse en anillos concéntricos, en haces paralelos o dispersarse en el citoplasma. Tiene una pared celular de cuatro capas, con una capa de lipopolisacáridos que involucran una capa de mureína [6]. Son más similares a las bacterias que a las algas [5]. Su radio varía entre los 0.5 a 3 μm , sus formas varían entre las esféricas, cilíndricas o espirales [9]. La división celular puede ocurrir a través de la fisión binaria, la fisión múltiple y la fragmentación [6].

Eucariotas

Las células eucariotas tienen organelos que controlan las funciones de la célula, como lo son la supervivencia y reproducción [5]. Cuentan con paredes celulares con una capa microfibrilar de celulosa que puede ser delimitada por una capa amorfa. Hay una membrana plasmática que limita el citoplasma, que contiene el núcleo y diferentes organelos. El núcleo es el orgánulo celular más grande, contiene el nucléolo y varias moléculas de ADN distribuidas en cromosomas. Otro orgánulo importante es el retículo endoplásmico, que tiene como función la síntesis y el transporte de proteínas. El cloroplasto contiene una serie de tilacoides que contienen clorofilas como pigmentos asociados. Su reproducción puede ser por división celular, fragmentación y producción de esporas [6, 8].

Por la gran variedad de algas existentes, la clasificación utilizada con mayor frecuencia se basa en los pigmentos presentes:

Microalgas rojas Incluyen principalmente especies marinas multicelulares. Las pocas unicelulares que existen, crecen principalmente en agua dulce. Su estructura celular es esférica con un núcleo excéntrico, contiene un único cloroplasto rodeado por dos membranas con una pirenoide central [10].

Microalgas verde-azules Son organismos procariotas, carecen de organelos. Su presencia abarca desde sistemas acuáticos, hasta terrestres, como el desierto. Son morfológicamente diversos, por ejemplo, existen formas filamentosas unicelulares, coloniales, filamentosas y ramificadas, que a veces forman agregados [8, 11].

Microalgas verdes Son las más comunes, son organismos eucariotes. Pueden encontrarse en agua dulce o agua salada. Incluyen miembros unicelulares y multicelulares que poseen clorofila *a* y *b* en un solo cloroplasto rodeado por dos membranas de envoltura. La clorofila, al ser su principal pigmento fotosintético, es el responsable de la coloración [8, 10].

1.2. Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso fundamentalmente químico mediado por mecanismos biológicos [12]. Es el proceso de mayor escala en la Tierra [13], responsable del balance de carbono y oxígeno [14]. Alrededor de 1.06×10^{14} kg de carbono se fijan anualmente en compuestos orgánicos debido a los organismos fotosintéticos. Este proceso utiliza como fuente de carbono el 0.04 % del CO_2 contenido en el aire [13].

Se trata de un proceso único donde los organismos convierten los compuestos inorgánicos CO_2 y H_2O , utilizando la energía luminosa, en materia orgánica como la glucosa. También se puede expresar como una reacción redox impulsada por la energía de los fotones, en la que el CO_2 y el agua se convierten en carbohidratos y oxígeno [14, 15].

Se inicia cuando la luz es captada por los complejos de antenas, que están formados por pigmentos que capturan la luz [12]. La clorofila, que es el pigmento principal, puede absorber solo una parte de la radiación solar, en el rango de longitud de onda de 400 - 700 nm, a este espectro se le conoce como radiación fotosintéticamente activa, PAR por sus siglas en inglés; los fotones inician una compleja red de reacciones químicas en las que se produce la glucosa [14].

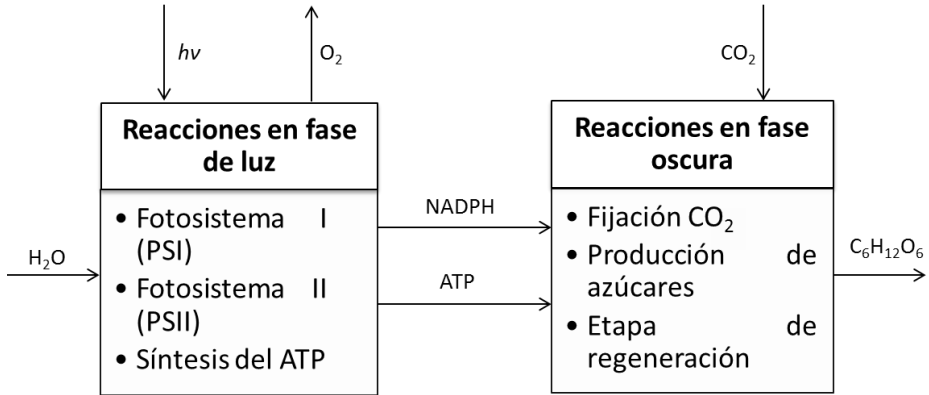


Figura 1.1: Etapas de la fotosíntesis. Adaptado de [14].

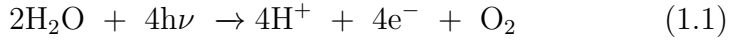
Se divide tradicionalmente en dos etapas: fase luminosa y fase oscura (figura 1.1) [15]. Durante la primera etapa la radiación solar divide el agua, en hidrógeno y oxígeno, que reaccionan con compuestos en los cloroplastos y se producen dos compuestos químicos intermedios involucrados en el proceso de fotosíntesis, los cuáles son reactivos en la segunda etapa [14].

1.2.1. Reacciones en fase luminosa

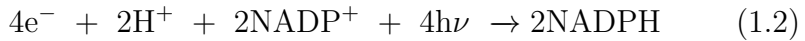
Éstas reacciones ocurren en las membranas de los tilacoides que contienen clorofila [14]. Implican la captura de energía lumínica y su posterior conversión en portadores de energía, como el dinucleótido fosfato de nicotidamina adenina (NADPH) y el trifosfato de adenosina (ATP), utilizados para la fijación de CO_2 . La fotólisis del agua proporciona los electrones necesarios a lo largo de las reacciones de fase luminosa y como subproducto se origina la liberación de oxígeno [12].

Involucra tres reacciones principales: el fotosistema I (PSI), el fotosistema II (PSII) y la síntesis de ATP en un proceso de fosforilación.

El PSII captura la luz con longitud de onda menor a 680 nm, utilizada para separar el agua en protones, oxígeno y electrones (ecuación 1.1).



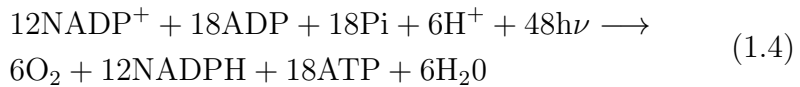
El oxígeno formado se libera al ambiente, mientras que los electrones se transportan al PSI, y los protones a la síntesis del ATP. El PSI captura luz con longitud de onda menor a 700 nm, utiliza los electrones del PSII, para así producir la forma reducida del NADPH (ecuación 1.2).



En la tercera reacción, el ATP es sintetizado a partir de difosfato de adenosina (ADP) y ortofosfato inorgánico (Pi), que se reciclan de las reacciones de la fase oscura (ecuación 1.3).



Por lo que si se suman las ecuaciones 1.1, 1.2 y 1.3, se obtiene la reacción global en la etapa de luz (ecuación 1.4) [14, 15].



1.2.2. Reacciones en fase oscura

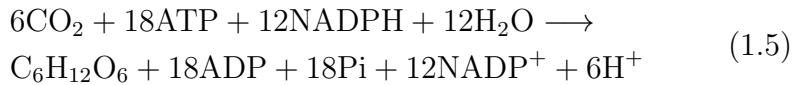
Se denominan oscuras ya que no necesitan luz, ocurren simultáneamente con las reacciones de luz. El mecanismo encargado de fijar el carbono se denomina ciclo de Calvin Benson. Incluye tres fases: fijación, reducción y regeneración del CO_2 [12].

Fase de carboxilación o fijación. En esta etapa se lleva a cabo la reacción mediante la cual se fija el CO_2 al azúcar de 5-carbonos, bisfosfato de ribulosa, para formar dos moléculas de fosfoglicerato. Es catalizada por la enzima Rubisco.

Fase de reducción. La fosforilación del fosfoglicerato necesita ATP para formar difosfoglicerato y ADP, posteriormente el difosfoglicerato se reduce a fosfogliceraldehído utilizando NADPH.

Fase de regeneración. El fosfato de ribulosa se regenera para una fijación adicional de CO_2 , realizándose a través de una serie compleja de reacciones. La generación de azúcares de 5-carbonos, a partir de azúcares de 6 y 3-carbonos se realiza gracias a las enzimas transcetolasa y aldolasa.

Los productos finales primarios de la fotosíntesis son los carbohidratos, pero también se sintetizan ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos [12, 15]. La reacción global de la fase oscura en la fotosíntesis se describe enseguida (ecuación 1.5) [14].



1.3. Pigmentos fotosintéticos

Las microalgas al ser organismos fotosintéticos son una fuente de compuestos bioactivos como polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas, esteroides y algunos componentes farmacéuticos. Los pigmentos son productos con valor agregado ya que pueden ser utilizados para la alimentación, la cosmética o la salud [16].

Existen dos grupos principales de pigmentos fotosintéticos presentes en las algas verdes: clorofila (pigmentos verdes) absorben en el espectro azul (450-475 nm) y rojo (630-675 nm), y los carotenoides (pigmentos amarillos), absorben a 400-550 nm. Dependiendo de las condiciones de cultivo, principalmente de la disponibilidad de luz y la cantidad de nitrógeno presente, se generarán en diferentes cantidades [17].

1.3.1. Clorofilas

La principal clase de pigmentos presentes en todos los organismos fotosintéticos son las clorofilas, responsables de la absorción de luz durante la fotosíntesis [13]. La estructura básica (figura 1.2) es un

anillo formado por cuatro pirroles, un tetrapirrol o porfirina. El Mg^{2+} en el centro de la porfirina está unido a los átomos de N por enlaces coordinados y covalentes [18].

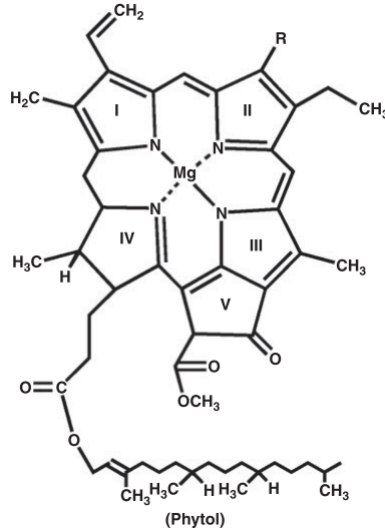


Figura 1.2: Estructura química de la clorofila. Recuperado de [7].

Los tipos de clorofilas se identifican por letras o por grupo taxonómico. Las clorofilas *a*, *b*, *c*, y *d* difieren en sus sustituyentes de grupo lateral en el anillo tetrapirrol [7, 13]. En las microalgas, las principales son las clorofilas *a* y *b*, se diferencian con la presencia de un grupo 7-metilo para la clorofila *a*, y un grupo 7-formilo para clorofila *b* [18]. Funcionan como pigmentos antena de captación de luz y como cofactores de transferencia de electrones. Cada pigmento absorbe aproximadamente 10 fotones por segundo de la radiación solar directa [19].

Las variaciones en la clorofila dan como resultado la absorción de energía luminosa a diferentes longitudes de onda, debido a los enlaces simples y dobles alternados, absorbe de manera eficiente la energía [18]. El espectro de absorción de la clorofila *a* (figura 1.3) tiene dos bandas, una azul y otra roja, haciendo el color característico verde. La banda en la parte azul tiene un pico en 430 nm y en la parte roja el pico es a 662 nm, al disolverse en éter [13].

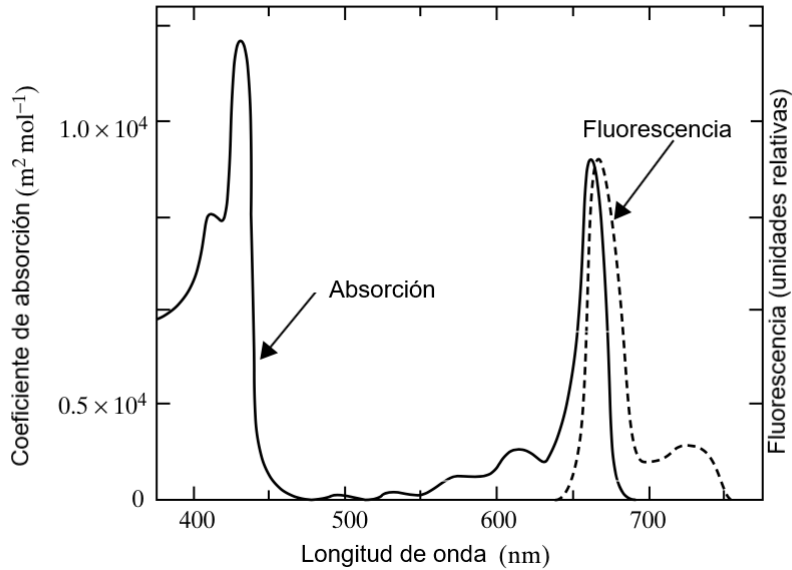


Figura 1.3: Espectro de la absorción y emisión de la clorofila *a* disuelto en éter. Recuperado de [13].

1.3.2. Carotenoides

Los carotenoides son de los pigmentos más diversos y generalizados que se encuentran en la naturaleza. Su rango de absorción se encuentra entre los 400 - 550 nm, los colores amarillos, naranjas y rojos. Son un grupo de isoprenoides lipofílicos sintetizados por organismos fotosintéticos, bacterias y hongos no fotosintéticos. La estructura central C40 consta de ocho unidades de isopreno que forman una cadena poliénica con dobles enlaces conjugados (figura 1.4). Tienen un sistema extendido de electrones π que sustenta la capacidad para absorber tanto la radiación ultravioleta como la luz visible [7, 20].

Los carotenos y las xantofilas son los principales grupos de carotenoides. El licopeno y β -caroteno son carotenos que no poseen ningún sustituyente, son hidrocarburos. Las xantofilas son moléculas que contienen oxígeno, por ejemplo, la luteína y la zeaxantina con grupos -OH [21].

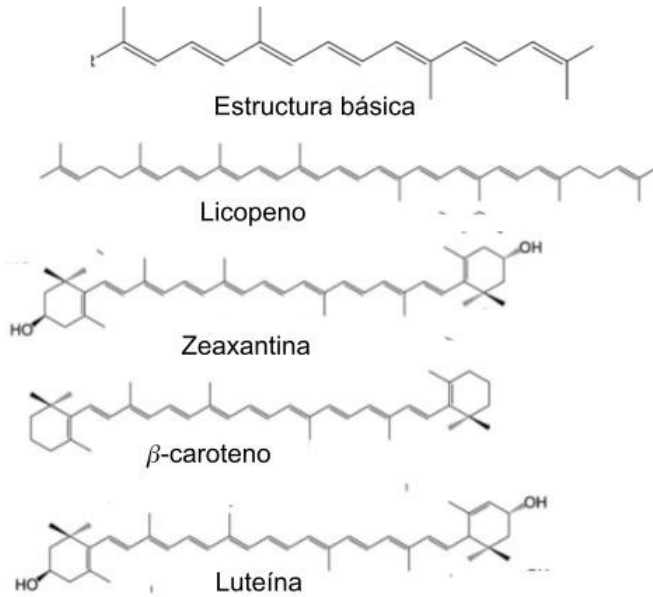


Figura 1.4: Estructura química de los carotenos más comunes en microalgas. Adaptado de [22].

Tienen importantes funciones en el aparato fotosintético, funcionan como pigmentos accesorios de recolección de luz, componentes estructurales para el ensamblaje de fotosistemas, moderadores de enfriamiento no fotoquímico y eliminadores de especies reactivas de oxígeno en organismos fotosintéticos [23].

Específicamente en las algas, los carotenoides protegen a la clorofila de los efectos de una exposición excesiva a la luz. Además el β -caroteno protege a la célula de los radicales libres. Ciertas microalgas en condiciones desfavorables para su desarrollo, se defienden produciendo metabolitos secundarios a través de la vía de la carotenogénesis [21].

1.4. Aplicaciones

Las microalgas son organismos interesantes para las aplicaciones biotecnológicas por las rápidas tasas de crecimiento y su estructura sencilla. Estos productos van desde nutrientes para el ganado, productos para farmacéuticos, pigmentos y otras aplicaciones industriales y energéticas, incluidos los biocombustibles. La producción de carbohidratos y proteínas en algunas especies puede llegar hasta el 50 % de peso seco [8, 24].

Microalgas para la farmacéutica

Son una fuente potencial de varios suplementos alimenticios y biomateriales utilizados en la industria farmacéutica, por ejemplo, el omega-3, ácidos grasos, clorofila, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) [8].

Microalgas en la cosmética

Son utilizados en productos cosméticos como anti-envejecimiento y anti-irritantes. Se encuentran en lociones de protección solar y productos para el cabello. Por ejemplo, la *Arthospira* es rica en proteína, se utiliza en la reparación del envejecimiento precoz de la piel y la *Chlorella vulgaris* contiene colágeno [25].

Microalgas en consumo humano

Debido a su amplia variedad de composición química y su gran valor nutricional, se pueden utilizar en una variedad de productos alimenticios, las más utilizadas son: la *Chlorella*, la *Spirulina* y la *Dunaliella*. Se comercializan en forma de tabletas, cápsulas, jarabes o en polvo como aditivo alimentario [5, 25].

Microalgas en la alimentación animal

Las microalgas desempeñan un papel importante en los alimentos de alto grado para la nutrición animal, desde la acuicultura hasta el ganado [8]. Las evaluaciones nutricionales y toxicológicas en las microalgas han demostrado que son un valioso complemento alimenticio o sustituto debido a la alta concentración de minerales, vitaminas y proteínas con un menor número de calorías, resultando en un mejor sistema inmune, mayor fertilidad, control de peso, piel y pelaje saludable y brillante [5, 8].

Microalgas como combustible

Las microalgas se utilizan como combustible por las numerosas ventajas que presentan, entre las cuáles destacan: la productividad es mayor al crecer en un medio líquido y así se evita la limitación de agua y nutrientes, es de los organismos fotosintéticos más productivos, no requiere de tierra cultivable, puede realizarse al aire libre o en sistemas cerrados y controlados. Al requerir una fuente enriquecida de CO_2 , se pueden colocar junto a las centrales eléctricas que funcionan con combustibles fósiles y cuyos gases de combustión son ricos en CO_2 [26].

Las microalgas contienen proteínas, carbohidratos y lípidos; los lípidos se pueden convertir en biodiésel, los carbohidratos en bioetanol o biohidrógeno y las proteínas en la materia prima para biofertilizante por ejemplo. La biomasa microalgal se puede procesar mediante el uso de conversión termoquímica y bioquímica. Los procesos termoquímicos se puede dividir en gasificación, licuefacción, pirólisis y combustión directa; los procesos bioquímicos se puede dividir en digestión anaeróbica, fermentación y actividad fotobiológica [27].

CAPÍTULO 2

BIOMASA MICROALGAL: FACTORES INVOLUCRADOS

La bioenergía es un tipo de energía renovable derivada de fuentes biológicas. La biomasa, considerada la materia prima, puede ser utilizada directamente como combustible sólido, o convertirse en combustible líquido o gaseoso. Además es una fuente viable por ser una energía limpia y amigable con el ambiente [28].

Las microalgas son una alternativa viable para ser utilizada como biomasa, al ser una fuente renovable y eficiente gracias a la habilidad de convertir la energía lumínica en compuestos útiles, en un período corto de tiempo [29]. Se ven involucrados tres grandes factores para su crecimiento: luz, agua y una fuente de carbono [30].

Entre las ventajas que presentan sobre las plantas, en relación con los biocombustibles, se encuentran las siguientes:

- Son capaces de producir durante todo el año, además de tener un período de cosecha menor [2, 5].
- Los medios de cultivo son baratos [25].

- Tienen un crecimiento rápido porque en la etapa exponencial su período de duplicación es corto [5, 25].
- Ayudan a la biofijación del CO₂ residual, mejorando la calidad del aire [5]. Algunos reportes muestran que aproximadamente 1 kg de biomasa seca fija 1.83 kg de CO₂ [2].
- Su cultivo es en medio acuoso, pero necesitan menor cantidad de agua que los cultivos terrestres, reduciendo la carga en las fuentes de agua dulce [5].
- Al ser cultivada en aguas residuales, existe una biorremediación eliminando NH₄⁺ y NO₃ [2].
- No requiere utilizar herbicidas o pesticidas [5].
- Reducen significativamente la competencia entre alimentos y biocombustibles [25].

Otra característica esencial del cultivo de microalgas es la adaptación a los diferentes medios, a condiciones ambientales extremas de luz y temperatura y los bajos requerimientos nutricionales [2]. También, al variar las condiciones de crecimiento, la composición bioquímica de la biomasa se modifica, característica que puede ser utilizada para los fines que más convengan [5]. Los productos que se originan durante el crecimiento y que pueden ser aprovechados son los ácidos grasos, los lípidos, los pigmentos y las proteínas [2].

Entre las condiciones, ya estudiadas, que favorecen la productividad de los sistemas de cultivo se encuentran: un mezclado adecuado que proporcione a todas las células las mismas condiciones y así evitar la presencia de gradientes, alta capacidad de transferencia de CO₂ y evitar la acumulación de oxígeno, una relación superficie-volumen alta para aumentar la concentración celular y la productividad volumétrica y un efectivo control de los parámetros como la temperatura, el pH, nutrientes y el CO₂ [17, 31].

2.1. Selección de la especie

La selección de la especie de microalgas con la que se va a trabajar es importante para tratar de garantizar una producción eficiente y económicamente viable para los productos deseados [24]. Las especies y cepas varían en términos de productividad de nutrientes y luz, la tasa de crecimiento específica y la adaptabilidad a nuevas condiciones ambientales [6].

Para biocombustibles, es de interés la eficiencia fotosintética, los co-productos de valor agregado, la generación de elevadas cantidades de carbohidratos y lípidos, la tolerancia a temperatura y luz, requisitos nutrimentales, altas concentraciones de masa celular y la información disponible [32]. Al ser utilizada para biocombustibles puede existir cierto grado de impureza en el cultivo [33].

Para la selección de la especie se debe tener en cuenta la fisiología del crecimiento, la producción de metabolitos en función de la calidad y variedad, la robustez del cultivo en términos de resiliencia, adaptabilidad y estabilidad [6].

Existen dos formas de cultivo, los definidos y los mixtos. Los cultivos mixtos contienen mezclas probadas, pueden incluir diferentes géneros, especies o cepas de organismos. La adaptabilidad de condiciones del cultivo es su principal ventaja, los inconvenientes son la calidad inconsistente de los productos finales y que la proporción de organismos no es constante. Los cultivos definidos o axénicos son cultivos con cepas caracterizadas, aisladas individualmente [34].

2.2. Luz

La intensidad luminosa es uno de los más importantes factores a considerar para el cultivo de biomasa microalgal, ya que se tratan de organismos fotosintéticos [35]. La luz es radiación electromagnética, se consideran longitudes de onda entre los 10^{-3} a los 10^{-8} m [15]. Se debe suministrar continuamente porque las células no pueden acumularla [36]. Las microalgas solo pueden utilizar la radiación fotosintéticamente activa, PAR, por sus siglas en inglés [35].

La PAR comprende entre los 400 a 700 nm, representa aproximadamente un 50 % de la luz solar [33].

El cultivo generalmente es sometido a fluctuaciones continuas en la irradiancia, debido a la fuente de luz [12], también dentro de los cultivos, derivada del sombreado generado por las células, por la profundidad y densidad celular del cultivo [35].

Para enfrentar estos cambios, los organismos han desarrollado mecanismos de fotoaclimatación [15]. El tiempo en el que se presenta esta característica puede ir desde segundos hasta días, cuando existe un período de fotoaclimatación largo involucra cambios a nivel óptico, biofísico, bioquímico, fisiológico y ultra-estructural [37].

La fotoaclimatación se define como el cambio en la fisiología celular y bioquímica asociada con la fotosíntesis, como el cambio en el contenido de pigmentos [38].

Las células, al exponerse a la luz absorben una parte, otra la dispersan y otra cantidad pasa a través de ella sin interaccionar [12]. La intensidad puede afectar la velocidad de la fotosíntesis [28].

Es por eso que la relación entre fotosíntesis e irradiancia es una medida para evaluar las respuestas ecofisiológicas a la luz [39]. La herramienta más utilizada para analizar la respuesta de crecimiento fotosintético es la curva P/I (figura 2.1), que correlaciona la fotosíntesis neta y la irradiancia. La curva puede dividirse en tres regiones, la región limitada de luz, la región saturada de luz y la región de fotoinhibición [37].

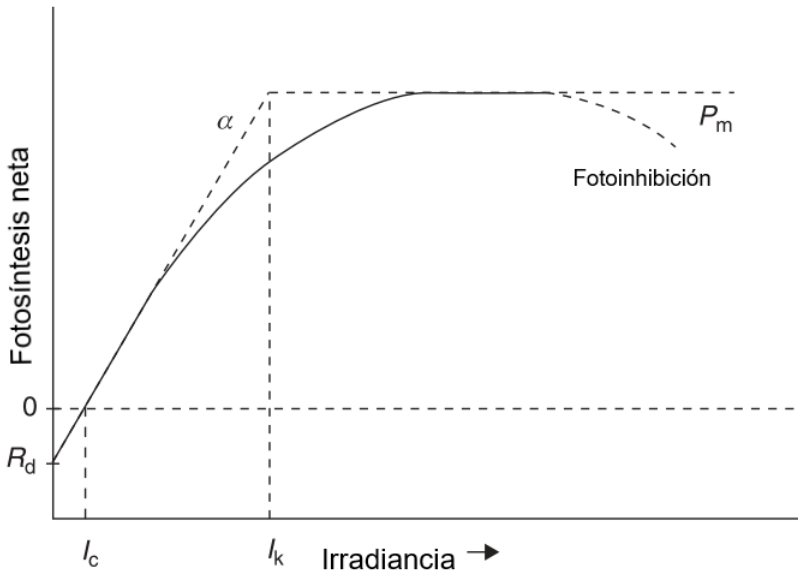


Figura 2.1: Diagrama esquemático de la fotosíntesis versus irradiancia. La tasa de saturación se denota P_{max} . La relación entre la fotosíntesis y la irradiancia se denomina α . La irradiancia de saturación es I_k , y la irradiación de compensación se denomina como I_c . Adaptado de [37].

En condiciones de **limitación**, la tasa de fotosíntesis y crecimiento celular aumentan con la intensidad de la luz [28], el organismo aumenta la pigmentación, es decir, aumenta el número de unidades fotosintéticas o cambia el tamaño de los complejos que captan la luz [15].

La **saturación** ocurre cuando la absorción de fotones es igual a la tasa de transporte de electrones para la fotosíntesis [28].

Más allá de la saturación ocurre la **fotoinhibición**, debido a la alta exposición a la luz [28]. Se define como la degradación de proteínas clave a altas intensidades de luz, provocando una disminución del rendimiento de fotosíntesis a lo largo del tiempo [38]. Puede ser reversible o irreversible, dependiendo del estrés lumínico y la cantidad de tiempo de exposición a éstas condiciones [33].

En esta etapa se dañan los receptores de luz de los cloroplastos, disminuyendo la producción de clorofilas, pero aumenta la producción de carotenoides [24], ya que son pigmentos fotoreguladores, los cuales proporcionan una fotoprotección efectiva al dispersar el exceso de energía lumínica. También provoca la fotooxidación de los componentes del PSII [12]. Las condiciones ambientales que reducen el metabolismo de carbono, como las altas temperaturas y la deficiencia de nitrógeno, hacen más susceptible al cultivo [37].

La luz puede suministrarse también por fuentes artificiales, son las más utilizadas a escala laboratorio. Pueden ser lámparas halógenas, bombillas incandescentes, lámparas fluorescentes y LED's. Se escogerá dependiendo de la calidad espectral de luz que se quiera suministrar, consumo eléctrico, eficiencia de conversión, el costo, entre otros [40].

Los LED's, o diodos emisores de luz, se prefieren porque proporcionan una longitud de onda específica, tienen un bajo consumo de energía, pueden utilizarse para simular grandes y homogéneas densidades de flujo de fotones [31]. Además, en comparación con otras fuentes artificiales de luz, su vida útil es más larga, presentan tolerancia al repetitivo encendido y apagado y no generan calentamiento [40].

A nivel comercial, los reactores de placa plana con paneles LED's incluidos son producidos por Photon Systems Instruments, una empresa de República Checa [31].

Las longitudes de onda deben ser óptimas para los fines convenidos. Por ejemplo, se sabe que el espectro blanco produce un crecimiento de intermedio a bajo [24]. Las longitudes de onda rojas (600 - 700 nm) y azules (400 - 525 nm) son absorbidas por las clorofilas *a* y *b*, siendo las más efectivas [40]. Las longitudes de onda azul mejoran el PSI, además tienen un efecto en la acumulación de lípidos, mientras que las longitudes de onda rojas mejoran el PSII y ayudan a la acumulación de biomasa [12].

2.3. Nutrientes

Los requisitos nutricionales cuantitativos y cualitativos del cultivo deben determinarse para optimizar el crecimiento y la formación de productos [9]. Se debe proporcionar carbono, oxígeno, hidrógeno, los cuáles se obtienen del agua y del aire [6, 25]. Además se debe proporcionar calcio, manganeso, magnesio, hierro, sulfuros, potasio y fósforo, selenio, en menores cantidades [24].

Los nutrientes necesarios se pueden clasificar en dos categorías: macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son necesarios en concentraciones mayores a 10^{-4} mol/L. Los micronutrientes se adicionan en una concentración menor a 10^{-4} mol/L [9].

Los macronutrientes son el carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), hidrógeno (H), fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg) y potasio (K) [41].

El *carbono*, los organismos fotoautótrofos lo obtienen del CO_2 . En las fermentaciones aeróbicas, aproximadamente el 50 % del carbono se incorpora a las células y el restante se utiliza como fuente de energía. Una gran fracción se convierte en productos y aproximadamente un 30 % se convierte en masa celular en las fermentaciones anaeróbicas [9].

En cultivos extensivos el CO_2 de la atmósfera no es suficiente, por lo que se agrega generalmente HCO_3 [6].

El *nitrógeno*, es el segundo nutriente en importancia, en peso seco corresponde aproximadamente hasta el 14%. Generalmente se adiciona como sales de amonio, proteínas o péptidos. El crecimiento está influenciado por este nutriente, siendo un factor limitante para la composición celular, como el aumento de polisacáridos o una mayor producción de carotenoides.

Fósforo, es alrededor del 3% de peso seco. Influye en el proceso metabólico de las células, en el proceso de transferencia de energía y la biosíntesis del ADN. Se adiciona en formas de sales de fosfato inorgánico, como el KH_2PO_4 y K_2HPO_4 . La disponibilidad afecta la cantidad de carbohidratos y lípidos [6, 9, 25].

Respecto al *oxígeno*, se requiere para ser un aceptor de electrones terminal en el metabolismo aeróbico de los compuestos de carbono, se introduce al ambiente a través de la inyección de aire por burbujeo o por aireación superficial. Como se encuentra presente en el medio, nunca es un factor limitante [9, 32].

El *azufre* representa el 1% de peso seco. Se encuentra en proteínas y coenzimas. Las sales de sulfato ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) representan la fuente más común. El *potasio* y el *magnesio* son cofactores para algunas enzimas. Se requieren para el metabolismo de carbohidratos, particularmente, el magnesio se encuentra en las paredes celulares y membranas [9].

Respecto a los micronutrientes, la falta de estos elementos aumenta la fase de adaptación, disminuyendo la tasa de crecimiento. Se pueden clasificar en dos categorías, los elementos traza necesarios, como el hierro, el zinc y el manganeso y los necesarios en condiciones específicas como el cobre, el cobalto, el molibdeno, el calcio, el sodio, el níquel y el selenio [9].

2.4. Medios de cultivo

Para el cultivo de microalgas es necesario contar con una fuente que proporcione el medio acuoso. Generalmente se tienen tres tipos: agua dulce, es baja en sales y generalmente no contiene nitrógeno ni fósforo; agua salada, es viable para utilizar con organismos resistentes a grandes concentraciones de sal; finalmente aguas residuales, donde las células toman los nutrientes que se encuentran presentes en las mismas pero la cantidad de contenidos inorgánicos difieren bastante [42].

Los medios de cultivo pueden dividirse en dos categorías, los medios definidos, aquellos que contienen cantidades específicas de los compuestos químicos puros con composiciones conocidas, usualmente son costosos, la ventaja que acarrear es la mejor reproducibilidad y control de los resultados. Los medios complejos son menos costosos porque contienen compuestos naturales donde la composición química no se conoce exactamente, proporcionan los factores de crecimiento necesarios, resultando en un mayor rendimiento celular [9].

El crecimiento celular está fuertemente influenciado por la concentración y tipo de nutrientes proporcionados [24], se selecciona de acuerdo a las necesidades de las microalgas y su propósito. Los macronutrientes se suministran en concentraciones de g/L, mientras que los micronutrientes en el orden de mg/L [6].

Usualmente, las microalgas se cultivan utilizando fertilizantes comerciales diluidos en agua natural. Por otro lado, entre los medios de cultivo definidos más conocidos se encuentran: COMBO, BG 11, ES, ASP, F/2, Aquil, ESAW, Bold's Basal, N-11, Chu #10 [6, 24].

Los requisitos del medio de cultivo se determinan al conocer la productividad y composición de la biomasa. Sin embargo, la cantidad exacta se conoce en los cultivos con condiciones limitantes de nutrientes [35].

2.5. Temperatura

La temperatura juega un papel crítico en la productividad de la biomasa microalgal, debido a la influencia en la composición bioquímica a través de las rutas metabólicas, cinética de enzimas y conformación de estructuras vitales [24, 28]. Se pueden clasificar en dos grupos, las células euriotérmicas, que soportan grandes fluctuaciones de temperatura, y las células estenotérmicas que no presentan esta tolerancia [24].

El rango óptimo de crecimiento se encuentra entre los 20 °C y los 25 °C [40]. Pero se han estudiado los efectos en varias especies en el rango de 4 °C a 35 °C, por ejemplo, *Chlorella vulgaris* tiene una tasa de crecimiento máxima a los 15 °C [28], esto se debe a que la actividad fotosintética y el metabolismo de la mayoría de las especies puede ocurrir entre los 15 °C y los 30 °C [40].

La variación diaria puede llevar a una disminución en la producción de lípidos [25]. También afecta la intensidad de luz requerida para una productividad óptima. Las células presentan una mayor tolerancia a una mayor intensidad de luz, si se encuentran en temperaturas cercanas a las óptimas [40]. El sobrecalentamiento, debido a la absorción de calor por radiación de la fuente de luz [35], disminuye la tolerancia a los flujos de luz de alta intensidad, por el estrés ocasionado [40], dañando e incluso matando las células [35].

En los fotobiorreactores cerrados las temperaturas pueden ser mayores que la ambiental [33], si la temperatura supera los 40 °C, la función de separación de carga del PSII se inhibe y desactiva la actividad de desarrollo de energía [40], por lo cuál se necesita un control adecuado, y en ocasiones contar con sistemas de enfriamiento adicionales [33].

2.6. pH

El pH de los cultivos desempeña un papel importante en la regulación de la absorción de los nutrientes esenciales, incluidos el nitrato y el fosfato [24]. Influye en la composición y la vida útil de las microalgas y determina la disponibilidad y la solubilidad del CO₂ [28].

La ionización de los metabolitos bioquímicos, la precipitación de los fosfatos y la solubilidad y disponibilidad de los elementos traza también son dependientes del pH del medio de cultivo [24]. El cambio en este parámetro puede afectar la penetrabilidad de las células y efectuar la aglomeración de sales inorgánicas [25].

El pH óptimo de las especies más cultivadas se encuentra en un rango de 7 a 9, es crucial mantener este rango porque puede ocurrir un colapso completo del cultivo, debido a la interrupción de los procesos celulares [33]. Aunque toleran grandes intervalos, el rendimiento se reduce [35].

En condiciones alcalinas, las microalgas capturan fácilmente el CO₂ [25], pero también se retrasa la finalización del ciclo celular al aumentar la flexibilidad de la pared celular evitando su ruptura [43]. El pH ácido altera la capacidad de absorción de nutrientes e interfiere con los procesos celulares, ya que puede interferir con la penetrabilidad de la célula [28].

2.7. Mezclado

En su hábitat natural, las microalgas existen con una densidad celular aproximada a 10³ células/ml, con distancias entre ellas de 100 μ m. Cuando se realiza un cultivo de microalgas, éstas llegan a tener una densidad de hasta 10⁹ cel/ml. Resultado de la gran concentración de células, es necesario implementar un sistema de mezclado [33], ya que se ha observado que el sombreado mutuo es un factor limitante en el crecimiento [24]. También afecta la transmisión de luz, aumenta la tasa de consumo de CO₂, ocasionando mayor oxígeno disuelto en el cultivo [33] y produce gradientes de temperatura [35].

El mezclado del cultivo se puede realizar mediante aireación, bombeo o agitación mecánica. Previene la sedimentación gravitacional de las células, garantiza la distribución uniforme de luz y nutrientes, facilita la transferencia de calor y se tiene un intercambio de gases eficiente [33]. A pesar de los beneficios que conlleva la agitación, como las altas tasas de crecimiento celular, la mezcla rápida se asocia con daño celular [24]. Los principales factores que determinan la sensibilidad es el tipo de microalga, la composición y el grosor de la pared celular. Las burbujas pequeñas son las que mayor daño causan [35].

CAPÍTULO 3

TÉCNICAS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL

3.1. Tipos de nutrición

3.1.1. Fotoautotrófica

Las microalgas fotoautótrofas convierten la radiación solar y el CO_2 absorbido por los cloroplastos en ATP y O_2 mediante la oxidación de sustratos que se utilizan posteriormente para producir energía que sustenta el crecimiento. Utilizan como fuente de energía luz artificial o natural [6]. La luz artificial intenta replicar y mejorar las condiciones de crecimiento natural. Es importante comprender los espectros de absorción de luz de los pigmentos de las algas para elegir la luz artificial, además de que ésta permite la producción continua, pero con una entrada de energía mayor [5]. Se puede aumentar el contenido de lípidos en la producción de microalgas al limitar el contenido de nutrientes como el nitrógeno [42].

3.1.2. Heterotrófica

El cultivo heterótrofo es la condición en la cual las microalgas utilizan compuestos orgánicos como fuentes de carbono producidos por otros organismos para satisfacer sus necesidades energéticas [6]. Pueden obtenerlas durante el crecimiento, como sacarosa, glucosa, lactosa, galactosa, glicerol y fructosa [42]. Al ser el crecimiento independiente de la luz, permite posibilidades de escalamiento más simples, al proporcionar un alto grado de control del crecimiento y menores costos de cosecha [5]. La desventaja que presenta es la contaminación debido a la fuente de carbono orgánico, lo que no facilita su uso en exteriores, además de que los costos aumentan por el costo del sustrato [42].

También hay microalgas fotoheterótrofas, que usan la luz como fuente de energía y compuestos orgánicos como nutrientes, o quimioheterótrofas si oxidan los compuestos orgánicos para obtener energía [6].

3.1.3. Mixotrófica

Algunas microalgas son mixotróficas, están presentes simultáneamente la heterotrofia y la autotrofia, excepto en condiciones de oscuridad total, donde la heterotrofia predomina [6]. Significa que son capaces de realizar la fotosíntesis y de ingerir materiales orgánicos [5]. Las microalgas utilizan como fuente de carbono el CO_2 . El CO_2 que liberan las células a través de la respiración queda atrapado en el medio y es reutilizado en presencia de luz, además asimilan compuestos orgánicos [42].

La capacidad para procesar sustratos orgánicos significa que el crecimiento celular no depende estrictamente de la fotosíntesis, por lo tanto no es un factor absolutamente limitante. Es adecuado para la producción de compuestos característicos del metabolismo. Se obtiene más biomasa y una mayor acumulación de lípidos [42]. Las desventajas que presenta es el riesgo de contaminación debido al carbono orgánico y el incremento en costos [6].

3.2. Modos de cultivo

3.2.1. Cultivo lote

El cultivo lote o Batch es el método más utilizado para cultivo microalgal, debido a su facilidad de operación, su mínimo riesgo de contaminación y el poco mantenimiento asociado.

En un sistema de cultivo lote sencillo, se coloca en un fotobiorreactor una cantidad definida de medio de cultivo (nutrientes necesarios para el crecimiento) e inóculo microalgal para ser crecidos en las condiciones más favorables. En un cultivo lote, el crecimiento celular se ve afectado por el sustrato limitante o por la inhibición de crecimiento, ocasionando cambios y diferentes fases de crecimiento, con una fluctuación en la productividad [6, 7].

Una curva típica de crecimiento incluye las siguientes fases: (1) fase de adaptación, (2) fase de crecimiento exponencial, (3) fase de desaceleración, (4) fase estacionaria y (5) fase de muerte (figura 3.1) [44].

La **fase de adaptación** ocurre inmediatamente después de la inoculación. Se refiere al periodo de adaptación fisiológico de las células a las condiciones nuevas y los cambios en los nutrientes. Esta etapa se ve afectada cuando la concentración celular del inóculo o la cantidad de nutrientes no fueron suficientes para el crecimiento [6, 44].

Durante la **fase de crecimiento exponencial** las células ya se adaptaron a las nuevas condiciones. Se alcanza el máximo crecimiento debido a la rápida multiplicación celular, ocasionando el crecimiento. Se ve limitado por la cantidad de sustratos y la luz.

Posteriormente las células entran en la **fase de desaceleración**. La concentración celular ya no aumenta debido al agotamiento de algún nutriente esencial o la acumulación de subproductos dañinos. El cambio en el tamaño de la célula es resultado de un crecimiento no balanceado en esta fase [44].

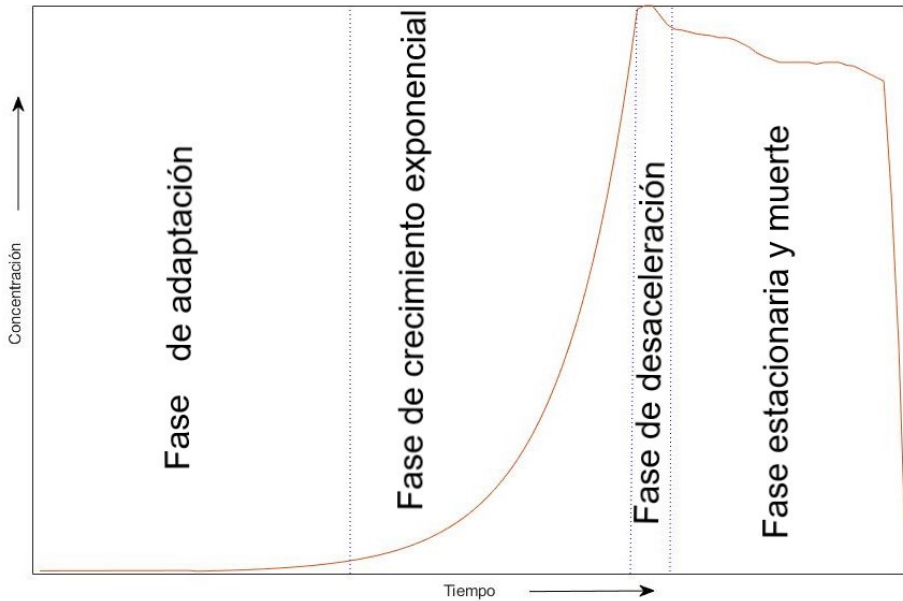


Figura 3.1: Curva de crecimiento típica en un cultivo por lotes. Adaptado de [44].

Cuando los sustratos solubles en el medio de cultivo se agotan inicia la **fase estacionaria**. La tasa de crecimiento neta es igual a cero, ocurriendo así alguna o todas de las siguientes aseveraciones: la concentración celular neta permanece constante pero las células viables disminuyen, una segunda etapa de crecimiento se desarrolla y las células pueden no estar multiplicándose pero pueden tener un metabolismo activo. Finalmente ocurre la **fase de muerte** donde las células ya no son viables [7, 44].

3.2.2. Lote alimentado

El método lote alimentado o Fed Batch, es un cultivo semicontinuo, utilizado principalmente en escala industrial. Su característica esencial es la forma continua o discontinua de agregar medio fresco, pero las células y los productos permanecen en el reactor. El cultivo se cosecha periódicamente o al final del ciclo de cultivo, resultando en la variabilidad del volumen y la tasa de dilución. El estado cuasi estable se logra cuando la concentración de biomasa y otros parámetros varían en un patrón de repetición cíclico. Este tipo de método es adecuado para la producción de metabolitos no asociados al crecimiento microalgal o para evitar la inhibición por sustrato [6, 7].

3.2.3. Continuo

La característica principal es que el suministro de medio de cultivo fresco se hace de manera homogénea y continua, además el cultivo se elimina de forma continua. Al reponer el sustrato limitante se genera el crecimiento celular continuo, produciendo condiciones ambientales de cultivo constantes para la formación de productos y por lo tanto, suministra productos de calidad uniforme. En este tipo de sistemas hay un control de las condiciones de cultivo que permite obtener una mayor productividad volumétrica porque representa un tiempo de respuesta menor, menor espacio requerido y menores costos asociados [6, 7, 45].

Se han desarrollado varios modos de operación para el cultivo de microalgas como [6]:

Quimiostato Se mantiene constante la tasa de crecimiento específica, se utiliza en investigaciones para evaluar el efecto del pH, la temperatura o la concentración de sustrato. El control se realiza alimentando el cultivo con medio fresco que contiene los nutrientes limitantes.

Turbidostato La turbidez se mantiene constante en el sistema de cultivo, utilizando un sensor óptico que mide la turbidez, conectado a una bomba que entrega el medio fresco a una velocidad variable.

Luminostato La transmisión de luz se mantiene de manera continua mediante un sensor que mide la luz que llega a la parte posterior del fotobiorreactor, de acuerdo a la intensidad de luz, la concentración celular se manipula para alcanzar el régimen deseado.

3.3. Sistemas de cultivo

Los sistemas de cultivo microalgal se han clasificado en dos grandes grupos: abiertos y cerrados, siendo los últimos los fotobiorreactores (FBR) [24]. El método de cultivo depende del tipo de cepa, la fuente de nutrientes y el costo [42].

3.3.1. Abierto

Los sistemas abiertos hacen referencia a la exposición directa del medio de cultivo al ambiente, generalmente se utilizan para la producción de biomasa de forma comercial debido al costo que representa una estructura a gran escala [46].

Además, este método ha sido utilizado desde 1950 por las ventajas que trae consigo: al ser una estructura al aire libre es fácil de construir con costos menores y generalmente un gran tiempo de vida útil, aunado a una mayor capacidad de producción en términos volumétricos, comparado con los sistemas cerrados. Las desventajas que presenta es la susceptibilidad a las condiciones climáticas adversas, la evaporación y la dificultad de mantener un ambiente estéril o controlado [6].

Estos sistemas pueden ser clasificados en [46]:

- Lagunas y estanques poco profundos
- Sistemas inclinados o en cascada
- Estanques circulares
- Estanques de canales

Lagunas y estanques poco profundos

Son los sistemas más simples utilizados para el cultivo microalgal. Son construidos en sistemas naturales con una profundidad no mayor a 1 metro para permitir el paso de la luz, siendo uno de los sistemas más económicos. Al no contar con un sistema de agitación, hace que este tipo de sistemas presente desventajas como lo son la lenta difusión de nutrientes debido a la flotación de algas muertas restringiendo el paso de la luz solar evitando el crecimiento, además la disolución del dióxido de carbono del aire al agua limitando la tasa de crecimiento [42].

También se han utilizado para la producción de algas para consumo humano. Uno de los registros más antiguos es en el lago de Texcoco, México, donde los aztecas solían cosechar *Arthrospira* (*Spirulina*). En 1970 Sosa Texcoco Co. cultivó *Arthrospira maxima* en las partes externas de un evaporador solar en espiral. El área de estanque era de 40 ha y producía al año alrededor de 300 t de microalga [46].

Sistemas inclinados

En los estanques inclinados (figura 3.2), el cultivo de microalgas fluye por una superficie inclinada, en la parte inferior se recolecta y es bombeada a la parte superior de la pendiente. Fue diseñado originalmente en los años 60's en República Checa por Setlík y colaboradores [47]. Durante el día el cultivo es bombeado, en la noche se colecta en

un tanque para tener aireación y ser mezclado, reduciendo el costo de bombeo y el grado de enfriamiento del medio [46].

Son los únicos sistemas al aire libre capaces de alcanzar altas concentraciones celulares (hasta 10 g/L), son adecuados para microalgas tolerantes al bombeo repetido, como *Chlorella* y *Scenedesmus*. Debido a la turbulencia generada, permite la existencia de delgadas capas de cultivo, menores a 2 cm, proporcionando relaciones de superficie-volumen mayores [6].

Estanques circulares

Se derivan de la innovación para el tratamiento de aguas residuales. Consiste en un reactor con un brazo giratorio ubicado en el centro con una profundidad alrededor de 0.3 m, obteniendo así una mejor mezcla del cultivo (figura 3.2). Debido a las restricciones mecánicas del brazo giratorio el área no excede los 10000 m². Se utiliza principalmente en Asia para la producción de *Chlorella* sp. La desventaja que presenta es el costo de construcción y el gasto energético que conlleva el brazo mecánico [6, 42, 46].

Estanques de canales

Son los sistemas artificiales más utilizados, presentan una forma ovalada de bucle cerrado con una profundidad entre 0.2 y 0.5 m (figura 3.2). El mezclado se induce por el movimiento continuo de una rueda de paletas, que evita la sedimentación de las algas. Se utiliza para la producción comercial de microalgas y para el tratamiento de aguas residuales [6].

Algunas de las ventajas que presenta es que es un sistema relativamente barato, de fácil mantenimiento y bajo consumo energético. Pero presenta limitaciones como la baja productividad debido a un mezclado deficiente, el requerimiento de grandes extensiones de tierra y su uso está limitado a pocas especies de algas [5].



Figura 3.2: Diagrama de sistemas de cultivo abierto. Adaptado de [6, 48].

3.3.2. Cerrado

Un fotobiorreactor se define como un sistema de cultivo para organismos fotoautotrófos, donde los fotones, necesarios para llevar a cabo la fotosíntesis, atraviesan las paredes del reactor. Por lo tanto, el intercambio directo de gases, líquidos (por ejemplo, lluvia) y partículas (microbios, insectos, polvo), entre el cultivo y la atmósfera está fuertemente limitado, haciéndolo un sistema cerrado [7].

Han sido desarrollados debido a los problemas que han presentado los sistemas abiertos [24]. Por ejemplo, se resuelve el aspecto de la contaminación. Se puede cultivar solo una especie de alga, pudiendo ser utilizada en la industria farmacéutica y cosmética [5]. También se caracterizan por tener un diseño técnico más flexible, pérdidas de CO_2

menores, condiciones reproducibles y existe un cierto control de ellas, cuentan con una mayor relación superficie-volumen, incrementando así la producción volumétrica [6, 46].

Existe una gran variedad de diseños pero se pueden agrupar en tres grandes grupos: tubulares, placa plana y en columna (figura 3.3). Todos presentan las mismas desventajas: la dificultad de escalamiento y el alto costo que tienen asociado [5].

Tubulares

Son el diseño cerrado más desarrollado para el cultivo de microalgas a escala industrial. Generalmente es un arreglo transparente de tubos de vidrio o plástico, donde el medio se recircula con bombas permitiendo que el O_2 y el CO_2 se intercambien con el medio y como mecanismo para el mezclado [33, 35].

Entre sus ventajas destacan que se alcanza una alta productividad de biomasa dependiendo de la especie que se coloque, la facilidad para tener un ambiente estéril, mayor superficie para captar la luz, es escalable y se puede utilizar en exteriores [5, 6].

El arreglo tubular puede ser alineado horizontalmente, verticalmente, inclinado o en hélice y el diámetro de los tubos es generalmente menor a 0.1 m. Sus limitaciones de diseño son la longitud de los tubos, que depende de la acumulación potencial de O_2 y el agotamiento del CO_2 , además de la variación del pH a través de ellos [5].

Otra limitación que presenta es la dificultad de establecer un control en la temperatura, si se coloca un termostato el costo aumenta considerablemente y puede dificultar su implementación. Otro aspecto a considerar es la adherencia de las células a las paredes de los tubos complicando la transferencia de luz [49]. Si se trata de un sistema en el exterior, las desventajas que presenta son el uso de grandes extensiones de tierra y el riesgo de foto-inhibición [6].

Columna

La estructura de los fotobiorreactores de columna vertical consiste en cilindros con radios de hasta 0.2 m y alturas hasta 4 m. Los radios suelen ser pequeños para aumentar la relación superficie-volumen [33]. Tienen un rociador de aire en la parte inferior, los cuáles generan burbujas mejorando la transferencia de masa [42]. La agitación constante también mezcla suavemente el cultivo teniendo muy poco daño celular [33].

Ofrecen el mezclado más eficiente, las mayores tasas de transferencia de masa volumétrica y las mejores condiciones de crecimiento controlables. Son de bajo costo, compactos y fáciles de operar monosépticamente [5, 49]. Las burbujas también ayudan a expulsar el oxígeno producido por las microalgas, ayudando a la tasa de crecimiento, ya que una alta concentración de oxígeno en el medio de cultivo inhibe la difusión fuera de los centros de reacción, haciéndola el proceso limitante del cultivo [42].

El inconveniente que presenta es la restricción de altura, asociada con las limitaciones de transferencia de gas y la resistencia de los materiales. Por ejemplo, en las columnas altas, se pueden establecer gradientes de CO_2 , matando a las algas y a su vez creando gradientes de pH. También aumenta el tiempo de residencia del O_2 generado por las algas, alcanzando un nivel inhibitorio [33].

Placa plana

Es el más común de los fotobiorreactores, consiste en dos hojas de vidrio transparentes o semi-transparentes que asemejan una caja rectangular que se conectan hacia la fuente de luz [42]. Se han desarrollado desde 1953 por Milner [49].

La trayectoria de luz es estrecha y se caracteriza por una gran relación entre la superficie iluminada y el volumen. El espesor juega un papel importante ya que determina la longitud de la trayectoria de la luz, permitiendo una mejor difusión y distribución de la misma [33]. Debido a esto es adecuada para cultivos en interiores y exteriores

[42]. Para la mezcla se utiliza una bomba en la cual el cultivo tiene una mejor transferencia de gas y una mejor depuración de biomasa [35].

Entre las ventajas que posee es la productividad de biomasa debida a su gran superficie de iluminación, facilidad de limpieza, baja acumulación de oxígeno, además de que se favorece la inmovilización de las algas [5, 6, 49].

Sus limitaciones recaen en la dificultad de escalamiento, dificultad en el control de temperatura, hay un crecimiento en las paredes y el daño causado a las células por el estrés hidrodinámico [5, 42].



Figura 3.3: Diagrama de sistemas de cultivo cerrado. Recuperado de [6].

Materiales y métodos

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos fotosintéticos

En el presente trabajo se utilizó un cultivo mixto microalgal, el cual se mantuvo en el laboratorio de Bioenergía del IER-UNAM desde el 16 de junio de 2016. Por un lado en condiciones controladas de 19 °C, iluminación blanca con una intensidad de $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con periodos de luz:oscuridad 12:12 h con cambios regulares a medio de cultivo fresco y por otro lado, en condiciones ambientales.

4.2. Mantenimiento del cultivo mixto y medio de cultivo

4.2.1. Medio de cultivo comercial

Como medio de cultivo se utilizó Bayfolan ® Forte de Bayer, un fertilizante foliar líquido con una concentración de $1 \text{ ml L}^{-1}(\text{v/v})$ [50]. El análisis del fertilizante se encuentra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Formulación del medio de nutrición vegetal Bayfolan [®] Forte [51].

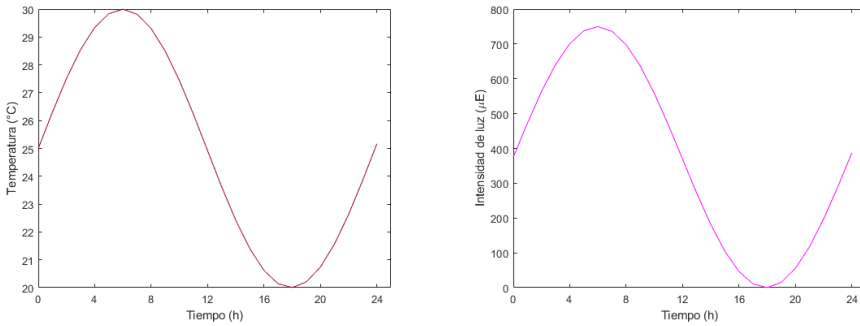
Composición química	Bayfolan [®] Forte	Cultivo
Nitrógeno (N)	110 g/L	0.11 mg/ml
Fósforo (P ₂ O ₅)	80 g/L	0.08 mg/ml
Potasio (K ₂ O)	60 g/L	0.06 mg/ml
Azufre (S)	1500 mg/L	1.5 μg/ml
Boro (B)	400 mg/L	0.4 μg/ml
Cobalto (Co)	20 mg/L	0.02 μg/ml
Zinc (Zn)	800 mg/L	0.8 μg/ml
Cobre (Cu)	400 mg/L	0.4 μg/ml
Molibdeno (Mo)	50 mg/L	0.05 μg/ml
Calcio (CaO)	250 mg/L	0.25 μg/ml
Manganeso (Mn)	400 mg/L	0.4 μg/ml
Hierro (Fe)	500 mg/L	0.5 μg/ml
Magnesio (MgO)	250 mg/L	0.25 μg/ml
Clohidrato de tiamina	40 mg/L	0.04 μg/ml
Ácido indolacético	30 mg/L	0.03 μg/ml

4.2.2. Preinóculo y mantenimiento de la cepa

El preinóculo del cultivo mixto en medio Bayfolan [®] Forte se creció en el fotobiorreactor de placa plana FMT 150 de Photon Systems Instruments (República Checa), con capacidad de 1000 mL, inoculado al 10 % (v/v) (figura 4.2). El cultivo fue incubado por un período de 264 h, con una agitación continua de 154 rpm, la temperatura sinusoidal con un máximo de 30 °C y mínimo de 20 °C (figura 4.1 a) e iluminación actínica con led blanco y led rojo con ciclo sinusoidal, cada uno con un máximo de 375 μmol m⁻² s⁻¹ y un mínimo de cero (figura 4.1 b), generando una iluminación total máxima de 750 μmol m⁻² s⁻¹.

Los cultivos de mantenimiento en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmayer de 500 ml, con tapón de gasa y algodón para favorecer el ingreso de aire. La condición de incubación fue a una temperatura constante de 19 °C, iluminación blanca con una intensidad de 31 μmol m⁻² s⁻¹, con periodos de luz:oscuridad 12:12 h y

agitación de 100 rpm. Cada 15 días el cultivo era renovado, agregando medio de cultivo fresco.



(a) Ciclo de temperatura.

(b) Condiciones de intensidad luminosa.

Figura 4.1: Condiciones experimentales durante la preparación del pre-inóculo.

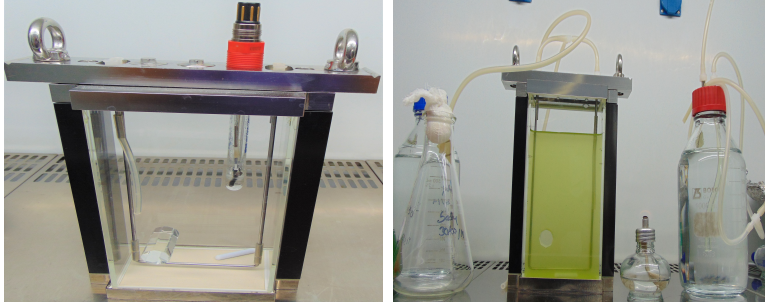
4.3. Cultivos experimentales

4.3.1. Inóculo

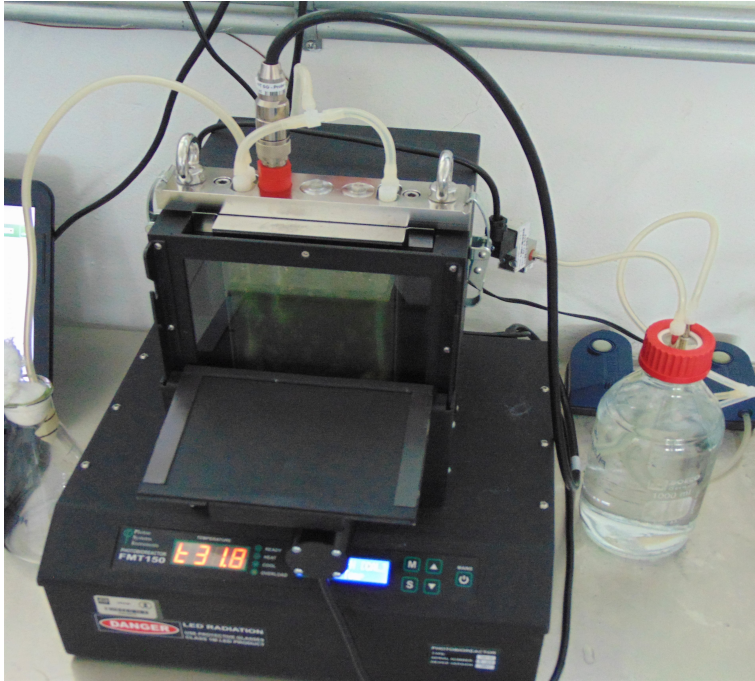
Los inóculos se prepararon en un fotobiorreactor cerrado de placa plana, modelo FMT 150 de Photon Systems Instruments (República Checa) con capacidad de 1000 mL, que permite ajustar la intensidad de la luz y la temperatura.

El recipiente de cultivo es plano y de forma rectangular de vidrio con un grosor de 3.3 mm. La base está hecha de acero inoxidable y contiene un puente térmico que facilita la transferencia de calor entre la base y el cultivo. La tapa del recipiente contiene conectores Luer para favorecer la entrada de aire húmedo, la recolección de muestras y el escape de residuos, además de contar con un puerto para alojar el sensor de pH. La matriz de diodos emisores de luz de alta potencia (LED) se encuentra detrás del recipiente de cultivo. En la esquina inferior de la parte frontal del recipiente hay un sensor de luz para medir la densidad óptica del cultivo por la atenuación de la luz emitida por los LED. Para el ingreso de aire húmedo se conectan dos

bombas a un humidificador (1000 ml con agua destilada estéril) al sensor de entrada de aire, posteriormente ingresa al sistema de cultivo en forma de U, manteniendo así un volumen constante. Y un agitador magnético a 770 rpm como velocidad máxima con un imán plano de 35 mm de largo y 6 mm de espesor ubicado en el fondo del reactor. Las dimensiones del recipiente de cultivo son 23.89 x 7.36 x 19.3 cm y un peso de 3.8 kg (ver figura 4.2).



(a) Fotobiorreactor sin medio de (b) Fotobiorreactor con cultivo.
cultivo.



(c) Fotobiorreactor.

Figura 4.2: Sistema de cultivo experimental.

4.3.2. Condiciones experimentales

Los cultivos experimentales fueron evaluados en sistemas fotobiológicos como el de la figura 4.2, consiste en un fotobiorreactor cerrado de placa plana, modelo FMT 150 de Photon Systems Instruments (República Checa). Consistieron en cultivos en medio líquido de 1 L de volumen en medio Bayfolan (®) Forte con una concentración de 1 ml L⁻¹, inóculados al 20 % (v/v) con una concentración celular del inóculo de aproximadamente 35x10⁶ células ml⁻¹.

Ya inóculados, los cultivos fueron incubados durante un período de 288 h bajo las siguientes condiciones: agitación constante al 30 % (231 rpm), lectura de pH cada veinte minutos, la temperatura se mantuvo constante por 12 h a 16 °C, posteriormente la temperatura fue sinusoidal con un máximo de 30 °C y un mínimo de 16 °C (figura 4.3 a). Se evaluaron tres diferentes condiciones de intensidad luminosa con led blanco y rojo, con un periodo de luz:oscuridad 12:12 h. Estas fueron 500, 750 y 1000 μmol m⁻² s⁻¹, reguladas de forma sinusoidal durante el período de luz programado (figura 4.3 b).

En un día soleado, el promedio de irradiancia solar directa en la superficie de la Tierra es de 1000 Wm⁻², de la cuál la radiación fotosintéticamente activa (entre los 400 nm a 700 nm) representa alrededor del 40 %, esto es, 400 Wm⁻² o 1800 μmol m⁻² s⁻¹. Se obtiene así el factor de equivalencia entre 1 Wm⁻² y 4.6 μmol m⁻² s⁻¹ [7].

Todos los cultivos experimentales evaluados se monitorearon cada 48 horas, durante un período total de doce días. Las variables analizadas fueron: pH, clorofila *a* y carotenoides. Asimismo, el peso seco se determinó al final de cada experimento.

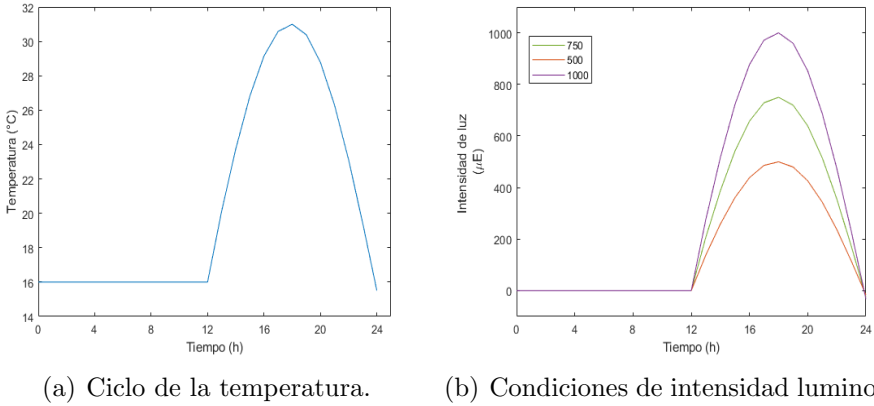


Figura 4.3: Condiciones experimentales.

4.4. Determinaciones físicas

4.4.1. Conteo celular

La densidad celular (células ml^{-1}) de los cultivos se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Arredondo y Voltolina [52]. Cada 48 h se tomó una muestra de 1 ml. El conteo se realizó con un hematocitómetro (Cámara de Neubauer) con microscopio de luz (Amscope T360B) utilizando el objetivo 10X. La cámara de Neubauer consiste en una reglilla con una profundidad de 0.1 mm, dividida en nueve cuadrados grandes de 1 mm por lado, que corresponde a un volumen de 0.1 μl , el conteo se realiza con las células presentes en los cuatro cuadrados grandes ubicados en las esquinas de la cámara [53]. El conteo se realizó por duplicado. Se realizó con la aplicación Cell Culture - Learn, experiment, and calculate, desarrollada por Thermo Fisher Scientific.

Crecimiento neto

Para reconocer las diferentes fases de crecimiento se utilizan los parámetros poblacionales definidos como *velocidad específica de crecimiento*, o *tasa de crecimiento* (μ) y el tiempo de duplicación (t_d).

La ecuación 4.1 define la tasa de crecimiento (μ) fue propuesta por Guillard [54].

$$\mu = dx / dt \cdot 1/x \quad (4.1)$$

En donde:

μ = tasa de crecimiento (horas⁻¹)

x = concentración de la biomasa (número de células ml⁻¹)

t = tiempo (horas)

Al ser una variable dependiente, los cambios en la concentración celular se puede reescribir la ecuación 4.1, utilizando logaritmos naturales, se obtiene la ecuación 4.2.

$$\mu_e = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1) \quad (4.2)$$

En donde:

X_2 y X_1 = concentración determinada en los tiempos t_2 y t_1 .

El tiempo de duplicación se refiere al periodo necesario para que la población se duplique, se obtiene con la ecuación 4.3.

$$t_d = 0.0693/\mu_e \quad (4.3)$$

4.4.2. Morfología celular

Para determinar las diferencias en la morfología celular se llevó a cabo la toma de muestra de 1 ml a las 0 h, 144 h y 288 h. Se agitó la muestra y se realizó una dilución 1:10. Posteriormente la muestra fijada con lugol se llevó al hematocitómetro (Cámara de Neubauer) con microscopio de luz (Amscope T360B) utilizando el objetivo 40X, se tomó la captura de pantalla de cada recuadro grande del hematocitómetro. Finalmente con ayuda del software de la cámara (MU USB2.0 Camara) se tomaron las medidas de cada célula y se subdividieron por tamaños y forma. Las medidas se realizaron por duplicado.

4.4.3. Peso seco

Para la determinación de peso seco de biomasa se tomó como referencia la técnica "Determinación de sólidos totales en biomasa microalgal" del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de Estados Unidos, NREL, por sus siglas en inglés. Las células se recuperaron por centrifugación, procedimiento que se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se tomaron 250 ml del cultivo cosechado y se centrifugaron en una centrífuga modelo J2-21 (BECKMAM, EUA) durante 20 min a 20 °C y 5000 rpm, se retiró el sobrenadante y se volvió a aforar con cultivo de cosecha para repetir el procedimiento hasta agotar el litro de cultivo.

El pellet de células se resuspendió con agua destilada y se dividió en dos tubos cónicos de 15 ml cada uno, que fueron centrifugados durante 10 min a 5000 rpm utilizando una centrífuga clínica modelo Roto-Uni II (BHG, México). Se retiró el sobrenadante de cada tubo y se registró el peso de la biomasa húmeda.

Finalmente, los tubos se dejaron en estufa (Riossa digital HB35) a 60 °C hasta alcanzar un peso constante. Se registró el peso de la biomasa seca.

4.5. Determinaciones analíticas

4.5.1. Determinación de pigmentos

La determinación de pigmentos se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Strickland y Parsons [55], mediante la extracción con acetona al 90% de la biomasa durante 48 h. La muestra se midió en un espectrofotómetro (SHIMADZU UV-1800) utilizando las ecuaciones 4.4 propuestas. La determinación de pigmentos se realizó por triplicado y cada 48 h durante las 288 h de incubación.

Se tomaron 1.5 ml de muestra de cultivo en un tubo Eppendorf. La muestra se centrifugó (Eppendorf Mini Spin plus) por 5 minutos a 12500 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 1.5 ml de acetona al 90 %. Se llevó a un baño de sonicación durante 7 minutos y después se llevó al vortex Genie 2 (Scientific Industries G560) durante 1 minuto para terminar de homogeneizar la muestra. Se cubrió con papel aluminio y se refrigeró a 4 °C por 48 h para sedimentar la biomasa. El sobrenadante se retiró y se colocó en las cubetas de cuarzo para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm para carotenoides y 630, 645 y 665 nm para clorofila *a*.

$$\begin{aligned}
 \text{Clorofila } a \text{ } [\mu\text{g L}^{-1}] &: 11.6Abs_{665} - 1.31Abs_{645} - 0.14Abs_{630} \\
 \text{Carotenoides } [\mu\text{g L}^{-1}] &: 4 Abs_{480}
 \end{aligned}
 \tag{4.4}$$

Resultados y discusión

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de las condiciones generales de cultivo

Las condiciones de luz en el cultivo mixto de microorganismos fotosintéticos se establecieron debido a la similitud con la irradiancia solar promedio diaria, la cuál tiene un punto máximo al medio día solar. Se propusieron tres diferentes magnitudes, las cuáles tienen una similitud con las condiciones de irradiación mensual promedio en Temixco, Morelos. Éstas condiciones resultan un primer acercamiento para evaluar si las condiciones meteorológicas promedio en el lugar son adecuadas para el crecimiento del cultivo mixto en un sistema de cultivo abierto. Las condiciones de irradiación e irradiancia a las que se sometió el cultivo se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Condiciones de irradiancia máxima e irradiación diaria en el cultivo mixto.

Irradiancia máxima $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	500	750	1000
Irradiación diaria mmol m^{-2}	512.36	768.54	1024.72

El establecimiento de los parámetros experimentales adicionales del cultivo mixto (aireación y agitación) requirió pruebas experimentales previas. El ciclo de temperatura se definió de acuerdo a los datos meteorológicos registrados en Temixco, Morelos, en un año típico, mostrados en la tabla 5.2, a través del promedio anual.

Tabla 5.2: Temperaturas mensuales promedio mínimas y máximas registradas en Temixco, Morelos.

Mes	en.	feb.	mar.	abr.	may.	jun.
T_{max} (°C)	29.2	30.7	33	34.3	33.8	30.9
T_{min} (°C)	12.4	13.6	15.8	17.7	18.6	18.2
Mes	jul.	agto.	sept.	oct.	nov.	dic.
T_{max} (°C)	29.6	29.6	28.8	29.4	29.6	28.9
T_{min} (°C)	17	17	16.9	15.7	14	12.8

El medio de cultivo líquido utilizado, Bayfolan [®] Forte de Bayer, se eligió debido a la accesibilidad, al ser un fertilizante vegetal foliar comercial, además de contar con ventajas en su almacenamiento. Adicionalmente se llevaron estudios previos con medio de cultivo F/2 y Bayfolan [®] Forte, demostrando, que el segundo acelera el crecimiento microalgal.

De tal forma, para realizar los estudios del efecto en las condiciones de crecimiento con diferentes intensidades de luz, se determinó usar las siguientes condiciones: volumen de cultivo 1 L, 1 mL de Bayfolan [®] Forte concentrado, inóculo al 20% (v/v) con aproximadamente 35×10^6 células ml^{-1} de concentración celular, aireación y agitación continua y finalmente, ciclos de temperatura y luz sinusoidales 12h:12 h, la temperatura sinusoidal con un máximo de 30°C y mínimo de 20 °C e iluminación actínica con led blanco y led rojo con mínimo de $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y máximos en 500, 750 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El tiempo de almacenamiento del inóculo en la incubadora se muestra en la tabla 5.3, el cuál tiene relación directa con la etapa de adaptación. Un mayor tiempo de almacenamiento aumenta el tiempo de duración en la etapa de adaptación, ya que las células del inóculo están adaptadas a las condiciones y al medio de cultivo pre-

vios, también las células probablemente no se encuentran en la fase exponencial, por lo tanto, no se consideran células jóvenes capaces de adaptarse rápidamente a nuevas condiciones [45]. Es uno de los factores clave para poder comprender los resultados obtenidos.

Tabla 5.3: Tiempo de almacenamiento del inóculo en la incubadora.

Irradiancia	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	500	750	1000
Almacenamiento	(días)	67	36	52

5.2. Influencia de la intensidad de luz en la morfología del cultivo mixto

El estímulo con diferentes intensidades de luz provocó diferencias de crecimiento en el cultivo mixto, propiciando el aumento en el tamaño de las células, o la duplicación celular favorable de ciertos microorganismos, éstos resultados son comprobables en las figuras 5.1, 5.2 y 5.3, donde se muestra la evolución celular del cultivo mixto a través del tiempo. Las fotos fueron tomadas a las 0 h, 144 h y 288 h, con un microscopio de luz (Amscope T360B) utilizando el objetivo 40X y realizando una dilución 1:10 de las muestras.

Todos los cultivos iniciaron con una densidad celular similar, dónde existía una diversidad de microorganismos, las más frecuentes y visibles tenían las siguientes características: grupos mayoritariamente de 4 células, con forma ovalada y alargada, con un tamaño aproximado de $3.18 \pm 0.389 \mu\text{m}$, células agrupadas pequeñas y redondas, aproximadamente de $1.58 \pm 0.29 \mu\text{m}$ y células dispersas redondas menores a $1 \mu\text{m}$.

En la figura 5.1 se puede observar al inicio del experimento la concentración y diversidad celular, descrita anteriormente, en el cultivo sometido a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, transcurridas 144 horas, se presenta una notable disminución en la concentración celular, en tamaño, mayormente se encuentran entre los 2.01 a $2.79 \mu\text{m}$, es común observarlas agrupadas en pequeñas cantidades, de 2 a 4 células, también se distinguen células redondas dispersas menores a $1 \mu\text{m}$. Al término del período de crecimiento, las células presentes, en su mayoría eran alargadas y con un tamaño entre los 2.63 y $3.28 \mu\text{m}$, se encuentran dispersas y solo una pequeña cantidad de células redondas menores a $1 \mu\text{m}$. Por lo que se puede concluir que las células que presentaron una mejor adaptación a una irradiancia de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, son las células con forma ligeramente alargada y que su tamaño al finalizar el experimento fue en promedio de $2.84 \pm 0.29 \mu\text{m}$.

En cambio, el cultivo al ser sometido a una irradiancia de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, como se muestra en la figura 5.2, especialmente al inicio del periodo de incubación pueden apreciarse tres tamaños y

formas en las células, las más pequeñas, con un diámetro menor a $1 \mu\text{m}$ dispersas y las más frecuentes, seguidas de las células alargadas aproximadamente de $3 \mu\text{m}$, agrupadas cada 3 o 4 células. Transcurridas 144 h, las células predominantes continúan siendo las de menor tamaño, seguidas por las células redondas que no superan los $2 \mu\text{m}$, en este tiempo del experimento las células alargadas de mayor tamaño es difícil encontrarlas en las muestras. Al finalizar, las células que muestran una mayor concentración, por lo tanto mejor adaptación, son las células redondas con un diámetro menor a $1 \mu\text{m}$, en una relación 50:1, aproximadamente, comparado con las células redondas que oscilan en tamaño entre los 1.21 y los $1.86 \mu\text{m}$.

Finalmente en la figura 5.3, se muestra el comportamiento del cultivo mixto sometido a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, al inicio del cultivo se observa la misma tendencia en la densidad y morfología celular, que en los estudios previamente descritos, sin embargo, transcurridas 144 h, las células agrupadas redondas de tamaño intermedio y las células dispersas de menor tamaño son las que prevalecen. Al concluir el experimento las células que presentaron una mejor adaptabilidad son las redondas muy pequeñas y dispersas y las células redondas con un tamaño variable promedio comprendido entre los 1.28 a $1.62 \mu\text{m}$, con agrupamientos mayores a 4.

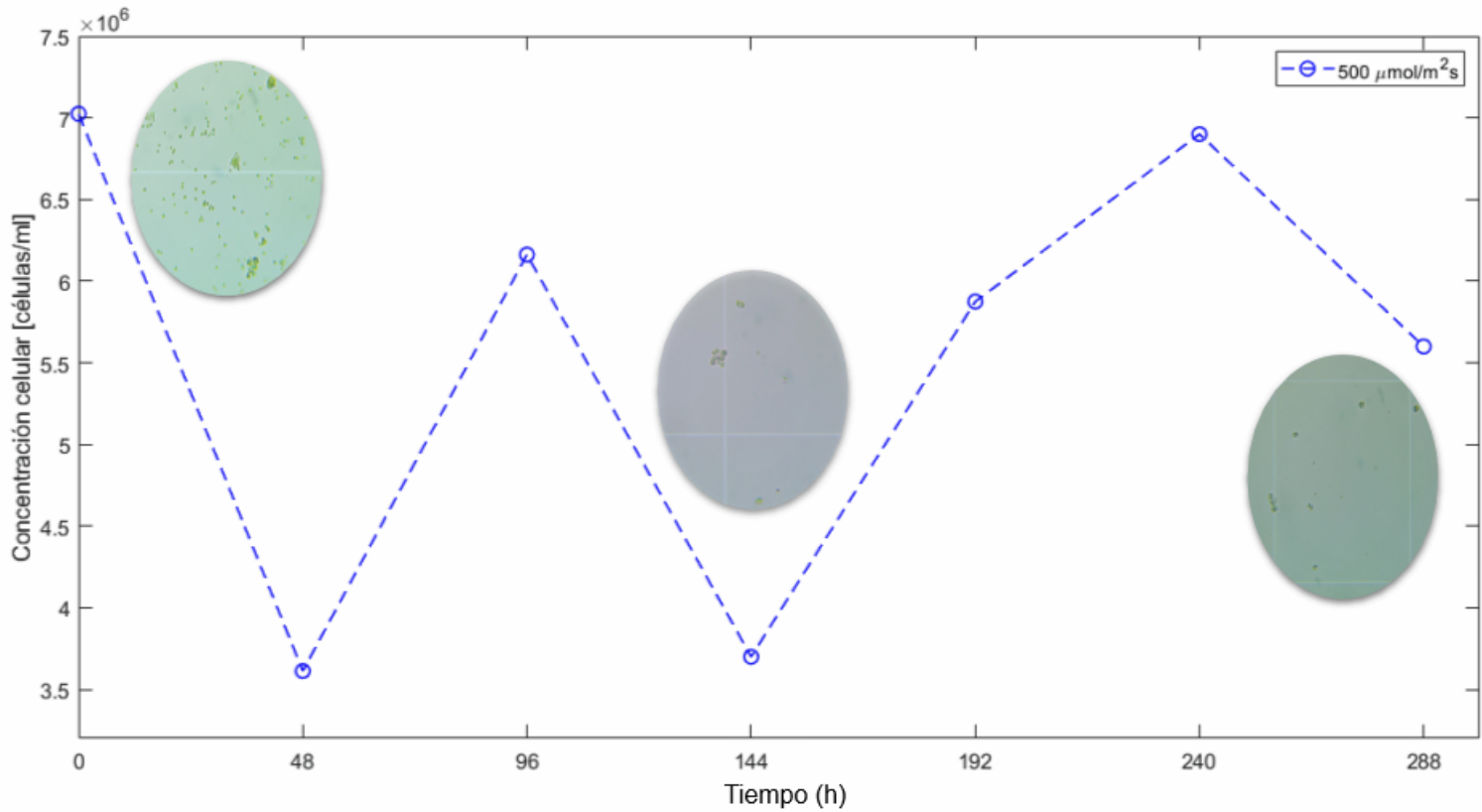


Figura 5.1: Evolución celular del cultivo mixto sometido a una intensidad lumínica de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

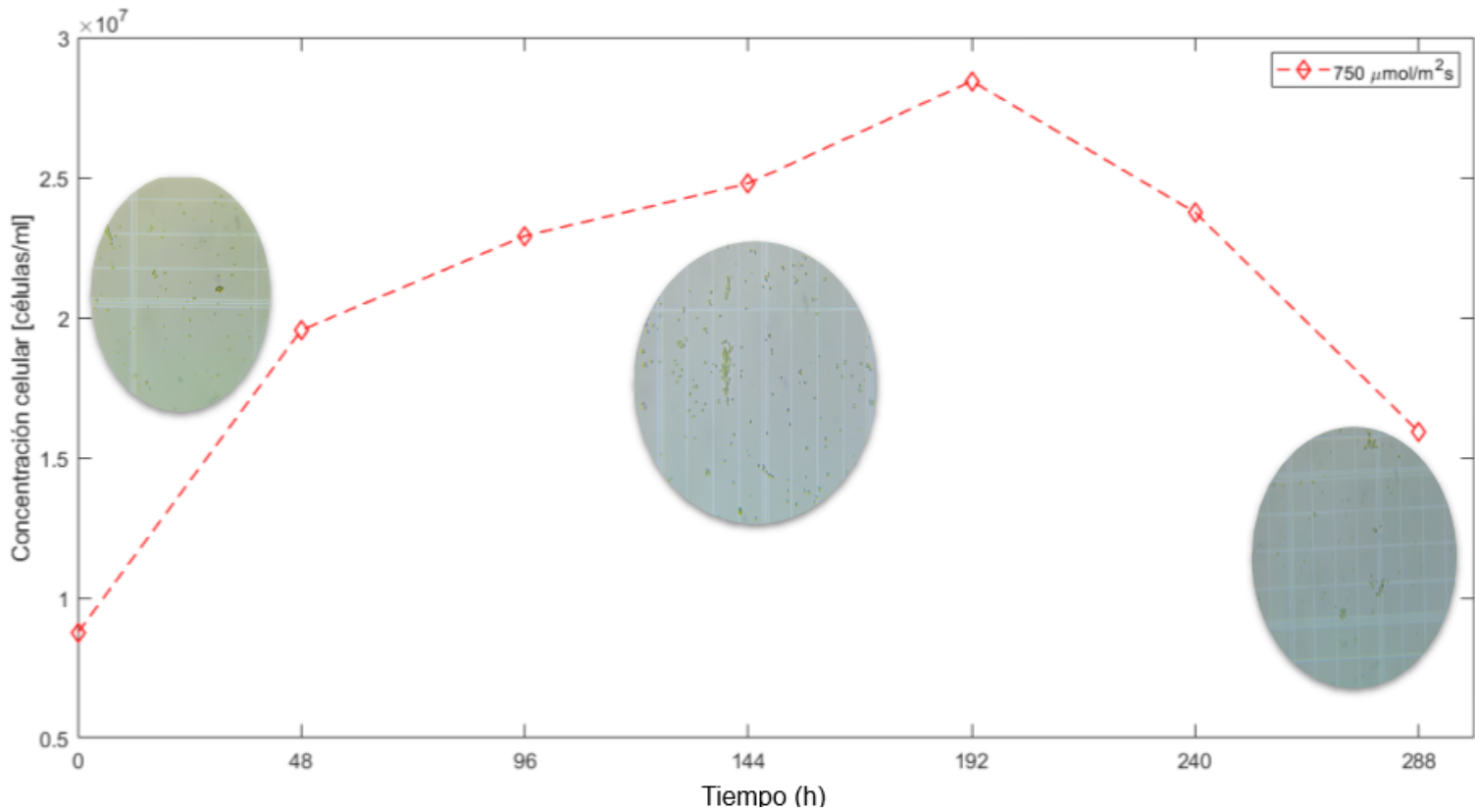


Figura 5.2: Evolución celular del cultivo mixto sometido a una intensidad lumínica de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

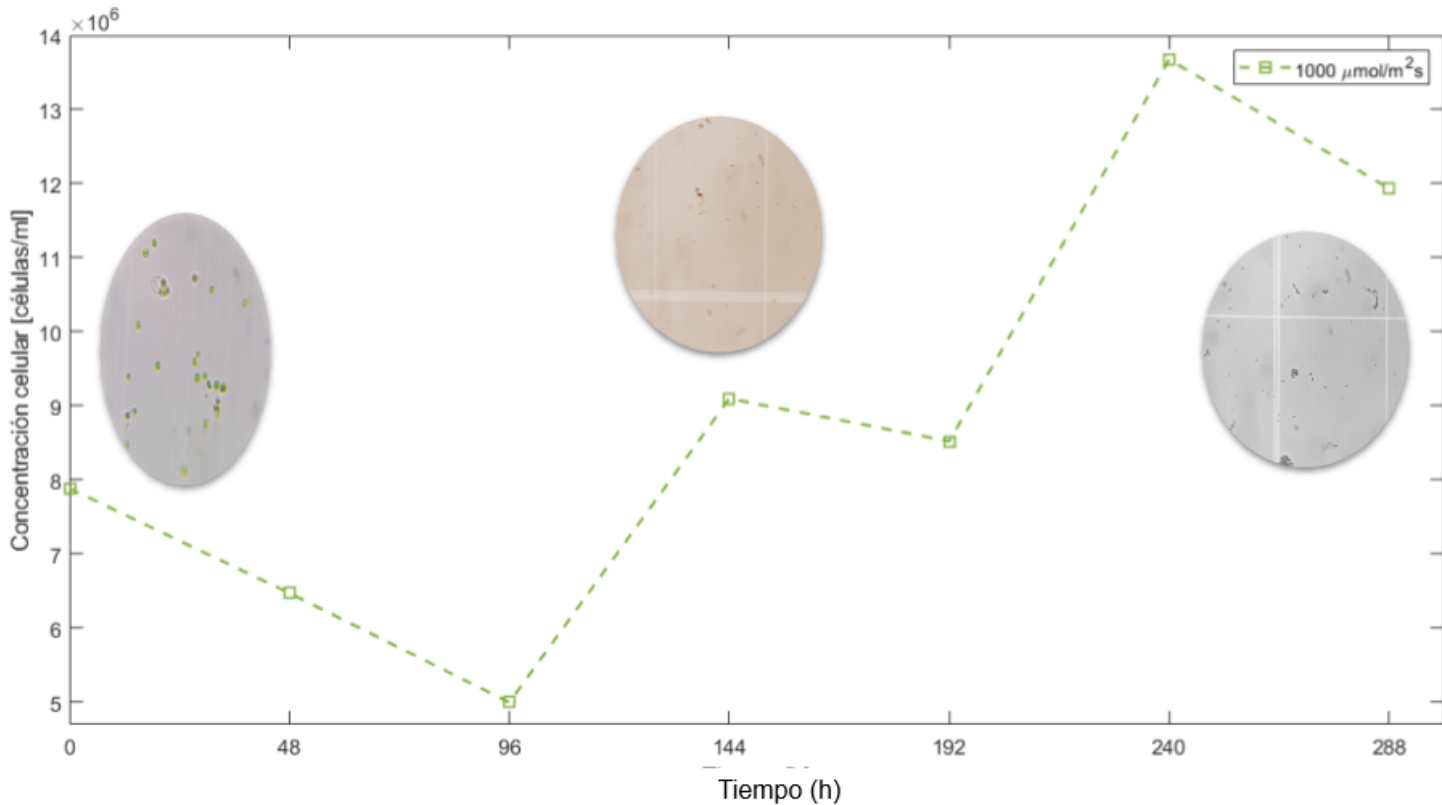


Figura 5.3: Evolución celular del cultivo mixto sometido a una intensidad lumínica de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5.3. Efecto de la intensidad de luz en las diferentes etapas del crecimiento microbiano

Durante el periodo de incubación de 288 h, en los diferentes entornos de iluminación se obtuvieron las concentraciones celulares mostradas en la tabla 5.4. En estas pruebas no se tiene un sustrato limitante, por lo que se espera que se tenga un crecimiento balanceado.

Tabla 5.4: Concentración celular a diferentes intensidades de luz.

Tiempo h	500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 10^6 cél. ml^{-1}	750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 10^6 cél. ml^{-1}	1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 10^6 cél. ml^{-1}
0.00	7.03	8.75	7.89
48.00	3.61	19.6	6.48
96.00	6.16	22.9	5.00
144.00	3.70	24.8	9.10
192.00	5.88	28.4	8.53
240.00	6.90	23.8	13.7
288.00	5.60	15.9	11.9

La comparación de las etapas de crecimiento microbiano del cultivo mixto a diferentes condiciones de luz en un cultivo Batch, se muestran en la figura 5.4.

La concentración celular inicial fue similar en los diferentes casos de estudio. Sin embargo, el cultivo a 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, presenta dos etapas de caída en el conteo celular, la primera hasta las 48 h y la segunda de las 96 h a las 144 h. No es claro qué provocó éste fenómeno, sin embargo, luego de las 144 h la cuenta de células aumentó y se mantuvo hasta las 288 h que terminó el cultivo. Un factor que explica la no adaptación del cultivo a las condiciones de luz, es la edad del inóculo, al tener un tiempo de almacenamiento de 67 días, las células ya se encontraban en un periodo celular maduro, es decir, en la cinética de crecimiento ya se encontraban en la etapa de decaimiento, además de estar fotoaclimatadas a las condiciones pre-existentes.

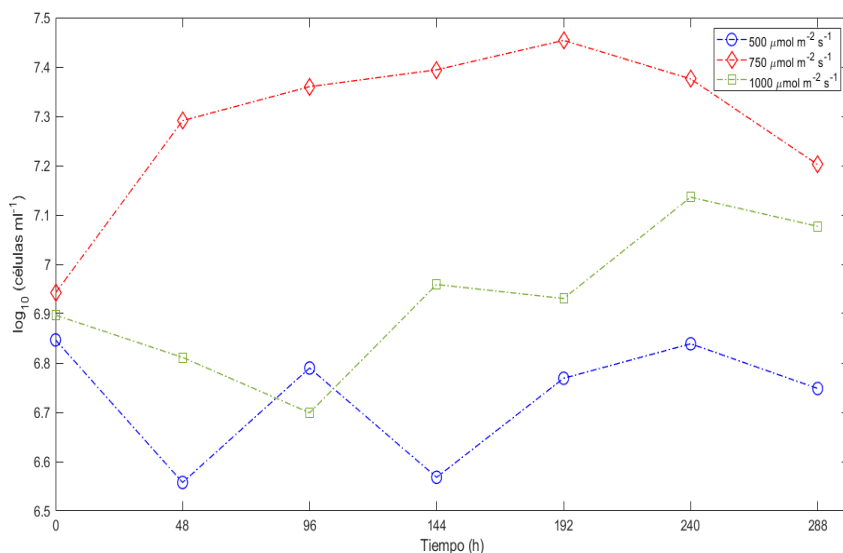


Figura 5.4: Comparación de las etapas de crecimiento microbiano en el cultivo mixto.

Por otro lado, el cultivo a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no presenta una etapa de adaptación, al ser el cultivo que tuvo un tiempo de almacenamiento menor, las células del inóculo estaban en la etapa de crecimiento exponencial, favoreciendo la viabilidad del nuevo cultivo. En un lapso de 48 h se tiene un crecimiento exponencial, seguido de un crecimiento lineal casi imperceptible indicando la etapa estacionaria, alcanzando una densidad celular máxima con $7.45 \log_{10}(\text{células ml}^{-1})$ a las 192 h, las 48 h posteriores comienza la etapa de muerte del cultivo, si se continúa el cultivo con las mismas condiciones, la tendencia indica un ambiente hostil para el crecimiento celular, probablemente por el agotamiento de algún nutriente, por ejemplo el nitrógeno, ya que repercute en el crecimiento celular y es un factor limitante para la composición celular.

Finalmente, la fase de adaptación del cultivo a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se extiende hasta las 96 h, el crecimiento máximo se presenta de las 96 h a las 144 h, con una pequeña etapa estacionaria, probablemente atribuible al estrés lumínico, las células al superar esta condición, continúan con un crecimiento exponencial, alcanzando una generación celular máxima a las 240 h, con un valor de $7.13 \log_{10}(\text{células}$

ml^{-1}). La tendencia de crecimiento indica que si se alargara el tiempo del cultivo probablemente seguiría aumentando la duplicación celular, proponiendo una probable fase de crecimiento exponencial. El cultivo no alcanza la irradiancia de saturación, ya que las células no presentaron fotoinhibición al prevalecer en las condiciones fijadas de luz, aunque presentaron una mayor fase de adaptación, sigue existiendo una relación directa entre la irradiancia y la tasa de fotosíntesis.

Al ser la intensidad lumínica el factor principal para la obtención de biomasa microalgal, es esencial analizar que importancia y efecto tiene sobre otros parámetros. Al contar con un cultivo mixto microalgal, la adaptabilidad a condiciones estresantes es mayor, para poder favorecer alguna condición, como lo sería la acumulación de pigmentos. Otra ventaja que presenta es el aumento en el intervalo de aplicación en luz, temperatura y pH.

5.3.1. Crecimiento neto

La tasa de crecimiento neto, al ser una medida de aumento de la población referida a la población inicial en un periodo de observación, ofrece la posibilidad de conocer la viabilidad de las condiciones para el crecimiento de un cultivo, la figura 5.5 muestra la comparación de la evolución de la tasa de crecimiento neto del cultivo mixto.

La tasa de crecimiento, en esta ocasión se refiere a la muestra anterior. En el cultivo *A* ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), las primeras 48 h la tasa de crecimiento es negativa, ya que el cultivo se encuentra en etapa de adaptación, hablando de densidad celular es menor que la inicial resultando en el valor negativo. El valor máximo de duplicación se encuentra de las 48 a 96 h, con un valor de crecimiento máximo de 0.011 h^{-1} , en este período de tiempo el tiempo de duplicación es de 2.59 días. Los valores alternan en positivos y negativos por que el cultivo no termina de adaptarse a las condiciones de cultivo, esto se comprueba con la sumatoria progresiva de divisiones celulares, al finalizar el cultivo es -0.004 h^{-1} , reforzando el análisis anterior.

Por otro lado, el cultivo B ($750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no presenta una etapa de adaptación, inicia con un crecimiento exponencial, obteniendo su máxima duplicación celular en las primeras 48 h, alcanzando una tasa de crecimiento máxima de 0.016 h^{-1} con un tiempo de duplicación de 1.72 días, posteriormente la duplicación celular es menor, reforzando la idea de una etapa estacionaria, después de las 192 h, el cultivo entra en una etapa de decaimiento, obteniendo valores negativos. Las condiciones del entorno en el cultivo fueron favorables, obteniendo un total de divisiones celulares de 0.012 h^{-1} .

El cultivo C ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), su etapa de adaptación y por lo tanto la razón de crecimiento es negativa, abarca 96 h, la duplicación celular máxima se alcanza a las 144 h con un valor de 0.012 h^{-1} , teniendo así un tiempo de duplicación de 2.31 días, posteriormente las células tratan de adaptarse a las condiciones, oscilando, pero no mantienen un comportamiento lineal, pudiendo no haber terminado su etapa de crecimiento. Las condiciones de cultivo también son viables, ya que se tiene una sumatoria de divisiones celulares al finalizar el cultivo de 0.008 h^{-1} . El cultivo B cuenta con el menor tiempo de duplicación y con una mayor velocidad de crecimiento teniendo 1.72 días y 0.016 h^{-1} , respectivamente, implicando una mejor adaptación a las condiciones establecidas.

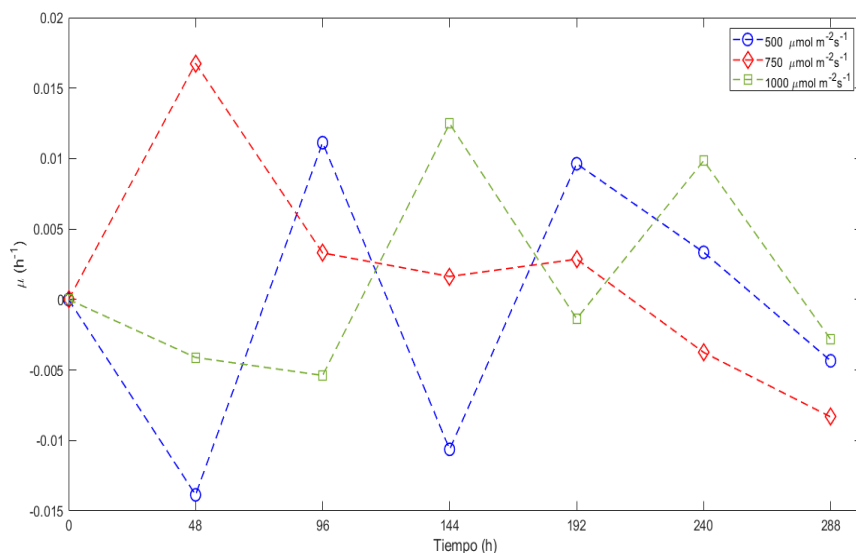


Figura 5.5: Comparación de la evolución del crecimiento neto diario del cultivo mixto sometido a diferentes intensidades de luz.

5.4. Efecto en el pH

En el cultivo de microalgas, el pH es un parámetro importante, determina la solubilidad y disponibilidad de CO_2 , ya que las células lo utilizan como fuente de carbón inorgánico, necesario para llevar la fotosíntesis, limita los nutrientes del medio [56, 57].

En la figura 5.6 se observan los valores del pH, en los diferentes entornos de iluminación a través del tiempo. Los valores del pH, en todos los cultivos abarcan de 5.7 a 8.3.

En las condiciones de mayor iluminación, cultivo *C*, se presentó un ambiente ligeramente básico, este fenómeno ocurre debido al aumento en el consumo de carbón inorgánico por las microalgas para realizar la fotosíntesis, pero también limita el crecimiento celular, debido a la limitación en la disponibilidad de CO_2 [57, 58, 59]. El promedio de pH fue de 7.16 ± 0.83 . Con un máximo de 8.3 al finalizar y con un mínimo de 6.2 a las 96 h.

En el cultivo *A* y *B*, presentaron un cultivo ligeramente ácido, con un promedio de pH de 6.79 ± 0.40 , 6.51 ± 0.58 , respectivamente. Los valores máximos se obtuvieron al inicio, con 7.5 y 7.4, respectivamente. Los valores mínimos se presentaron transcurridas 144 h, con 6.4 y 5.7, respectivamente. Durante los periodos de oscuridad el pH se mantiene casi constante [56, 59, 60], en este estudio ocurrió lo mismo, por lo que no fue objeto de debate.

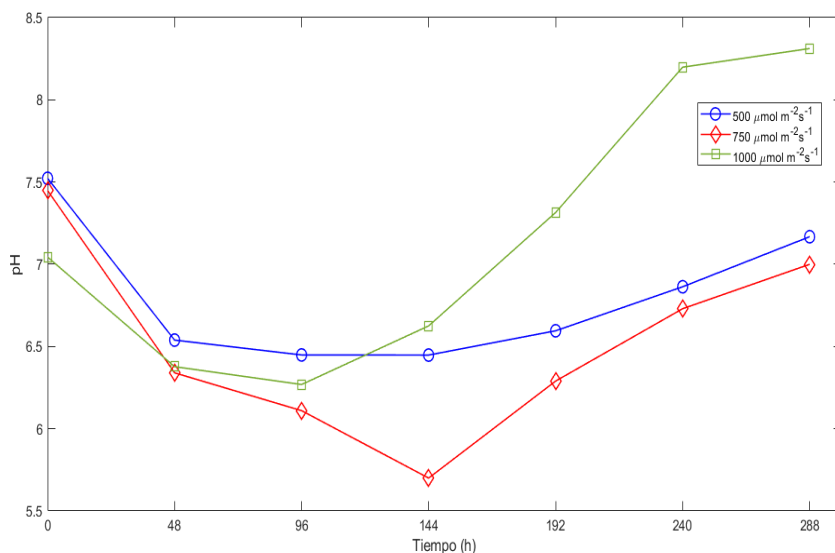


Figura 5.6: Comparación del pH en un cultivo mixto sometido a diferentes intensidades de luz.

El aumento de la biomasa microalgal, densidad celular, incrementa el consumo de carbón, es decir, se agota más rápido el CO_2 , ocasionando que el pH disminuya [29, 56, 57, 60].

Debido a la correlación entre el pH y la densidad celular, en la figura 5.7 se realiza la comparación entre el pH y la tasa de crecimiento diario, μ , en el eje derecho.

En esta gráfica es apreciable esta correlación, ya que el cultivo *B*, el que presentó una mayor densidad celular, también presenta valores de pH ligeramente más acidificados, comparado con el cultivo *A*.

Los cultivos deben contar con condiciones óptimas, cuando el cultivo presenta la mayor tasa de crecimiento diaria, el pH se considera óptimo. Estos valores podrían establecerse por medios externos. El cultivo *A*, tiene un crecimiento máximo de 0.011 h^{-1} , con un pH de 6.4 a las 96 h. En el cultivo *B*, el máximo es a las 48 h con 0.016 h^{-1} y un pH de 6.3. El cultivo *C*, presentó el máximo a las 144 h con 0.012 h^{-1} y un pH de 6.6.

Los valores de pH donde el crecimiento celular fue mayor, son muy similares en las tres condiciones, concluyendo que en este estudio el pH no depende de la intensidad de luz, para tener un crecimiento máximo, sería preferible mantener un pH entre 6.3 y 6.6.

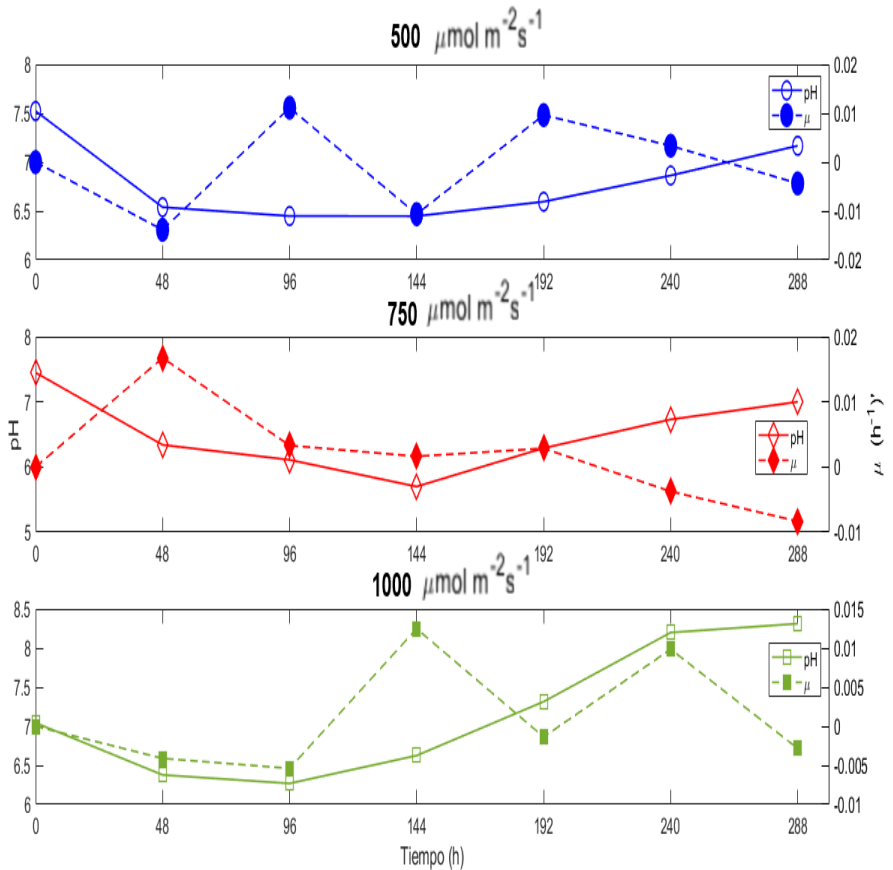


Figura 5.7: Comparación entre el pH y la tasa de crecimiento diario en diferentes condiciones de luz.

5.5. Efecto en la concentración de clorofila *a*

En la conversión de energía lumínica a química, durante la fotosíntesis, el principal pigmento involucrado es la clorofila, esta relación con la fotosíntesis ocasiona que se asuma que el máximo contenido de clorofila sea la condición óptima de la tasa fotosintética. Entre sus funciones destacan la fotoinducción de electrones y la respuesta a los procesos de fotoinhibición y fotolimitación [19, 61]. De acuerdo a la importancia, la concentración volumétrica de clorofila *a*, en diferentes condiciones de luz se muestra en la figura 5.8.

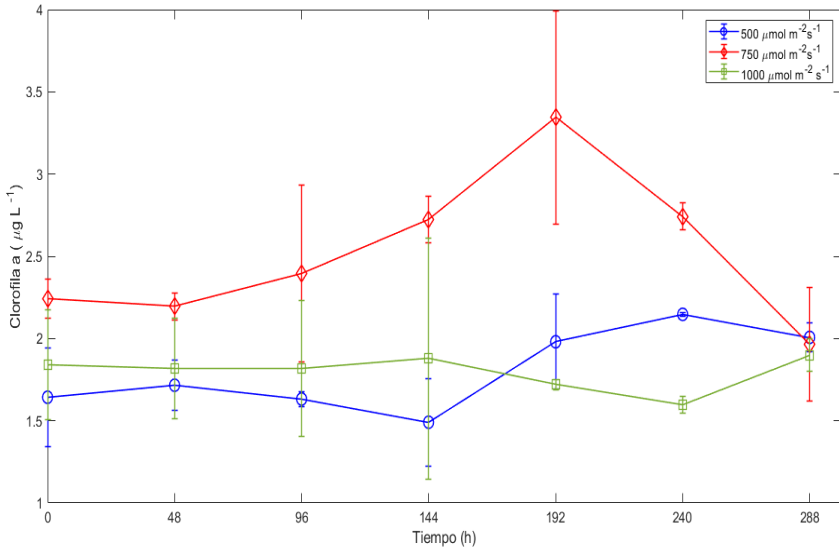


Figura 5.8: Comparación de la concentración volumétrica de clorofila *a*.

Una estrategia para aumentar la producción de pigmentos es establecer ambientes de cultivo estresantes, por intensidad y duración de luz, por salinidad y por nutrientes [62, 63, 64, 65, 66]. En este estudio se reportó un ambiente estresante por intensidad lumínica.

La literatura asevera un comportamiento inversamente proporcional entre la cantidad de luz y la concentración de clorofila [17, 61, 62, 64, 67, 68]. Como mecanismo de protección, las células en presencia de grandes cantidades de luz disminuyen el tamaño de sus antenas receptoras, disminuyendo la absorción de fotones, con el objetivo de reducir la fotoinhibición [17, 61].

Al inicio de los cultivos, *A*, *B* y *C*, si se asume que todas las células presentes en el cultivo mixto, se comportan de manera homogénea, la concentración de clorofila *a* por célula es similar, con $2.34 \times 10^{-10} \pm 3.51 \times 10^{-11}$, $2.56 \times 10^{-10} \pm 1.11 \times 10^{-11}$ y $2.33 \times 10^{-10} \pm 3 \times 10^{-11} \mu\text{g célula}^{-1}$, respectivamente. Finalizan con una concentración por célula de $3.58 \times 10^{-10} \pm 1.31 \times 10^{-11}$, $1.23 \times 10^{-10} \pm 1.78 \times 10^{-11}$ y $1.59 \times 10^{-10} \pm 0.6 \times 10^{-11} \mu\text{g célula}^{-1}$, respectivamente. Sin tomar en cuenta otro parámetro, se reafirma que existe una relación entre la cantidad de luz y de clorofila *a*, teniendo una mayor acumulación de pigmentos primarios, en el cultivo sometido a la menor irradiancia.

Con la concentración volumétrica de clorofila *a*, el cultivo *A*, inicia con $1.643 \pm 0.247 \mu\text{g L}^{-1}$, al transcurrir el tiempo de crecimiento, la concentración de clorofila *a* aumenta lentamente, debido a la menor cantidad de luz disponible para realizar fotosíntesis. Alcanza una acumulación máxima a las 240 h con $2.147 \pm 0.011 \mu\text{g L}^{-1}$ y finaliza con $2.007 \pm 0.074 \mu\text{g L}^{-1}$, si se continúa con el periodo de incubación, probablemente no habría más concentración de pigmentos, debido a la no adaptación a las condiciones impuestas.

El cultivo *B*, al inicio como consecuencia del cambio en la intensidad de la luz, del inóculo en la incubadora al fotobioreactor, deriva en un pequeño lapso de fotoinhibición [17], teniendo una ligera disminución en la concentración inicial de $2.24 \pm 0.097 \mu\text{g L}^{-1}$ a $2.195 \pm 0.069 \mu\text{g L}^{-1}$, alcanza su máxima generación de clorofila *a*, transcurridas 192 h, con $3.345 \pm 0.529 \mu\text{g L}^{-1}$, también corresponde a la máxima densidad celular reportada, finaliza con $1.963 \pm 0.283 \mu\text{g L}^{-1}$, una concentración menor al cultivo *A*.

Otro factor que afecta en la concentración de pigmentos, es la densidad celular, en este caso debido a la alta densidad celular, la mezcla fue insuficiente, ocasionado ligeros sedimentos, conllevando a un mutuo sombreado entre células, provocando que dentro del cul-

tivo, la intensidad lumínica no sea homogénea, generando una respuesta de las células para aumentar la fotosíntesis y por lo tanto, la concentración de clorofila a [67].

La concentración de clorofila a en el cultivo C se mantiene casi constante, no presenta un régimen de saturación de luz. Las células se fotoaclimataron, al contar con la cantidad de luz adecuada, no presentan un mecanismo de supervivencia, o de defensa. El cultivo inicia con una concentración $1.840 \pm 0.237 \mu\text{g L}^{-1}$ y finaliza con una concentración máxima de $1.9 \pm 0.081 \mu\text{g L}^{-1}$, la menor de todos los cultivos.

5.6. Efecto en la concentración de carotenoides

Después de las clorofilas, los pigmentos más frecuentes son los carotenoides. En los organismos fotosintéticos mejoran la eficiencia fotosintética a través de la absorción de longitudes de onda entre los 400-500 nm, el rango del espectro visible donde la clorofila no absorbe eficientemente [16, 20, 63].

Se clasifican en dos tipos, primarios y secundarios, de acuerdo a sus funciones en las microalgas. Los primarios, son componentes estructurales y funcionales del aparato fotosintético. Funcionan como pigmentos captadores de luz, capaces de transferir energía a las clorofilas. Los secundarios, se producen como una respuesta de diferentes estímulos en las microalgas. Previenen el daño fotooxidativo en el aparato fotosintético, bloqueando la radiación excesiva. Protegen a la clorofila de una exposición intensa a la luz [18, 21, 22, 63, 67, 69, 70, 71]. También participan en el fototropismo y la fototaxia de las células [18, 20].

Debido a la importancia en sus funciones, la comparación de la concentración volumétrica de carotenoides como respuesta a diferentes intensidades de luz se muestra en la figura 5.9.

Para aumentar la producción de carotenoides se establecen ambientes estresantes, como la limitación de nitrógeno, altas temperaturas, salinidad y mayores intensidades de luz [16, 63, 70, 71]. El efecto de la cantidad de luz, es el parámetro con mayor influencia en la concentración de pigmentos, porque influye en la densidad celular. Existe una correlación directa con los carotenoides, al aumentar la irradiación las células generan más carotenoides [67, 71]. Algunos carotenoides primarios, en condiciones de estrés pueden actuar como metabolitos secundarios [69].

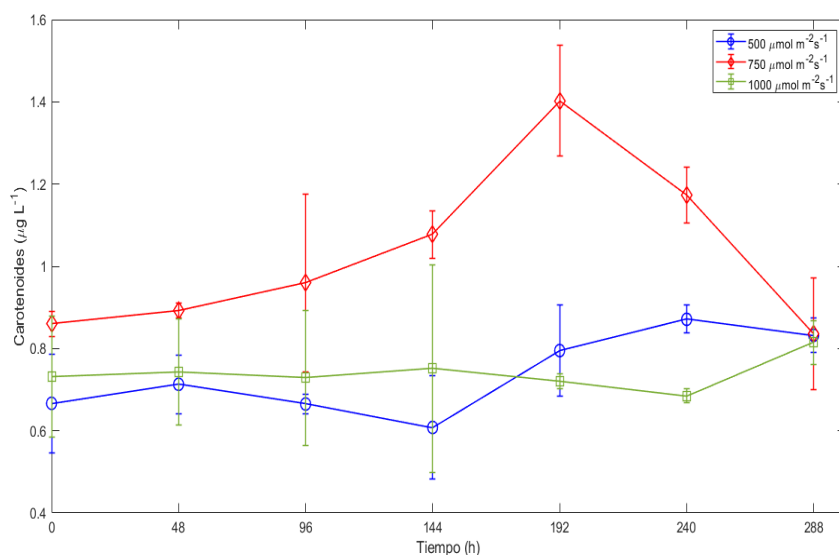


Figura 5.9: Comparación de la concentración volumétrica de carotenoides.

El factor estresante que se analizó, fue la intensidad de la luz. Si se supone que se tiene un cultivo mixto con comportamiento homogéneo, las células al inicio del periodo de incubación, en los cultivos *A*, *B* y *C*, presentan una concentración similar de carotenoides con $9.49 \times 10^{-11} \pm 1.4 \times 10^{-11}$, $9.83 \times 10^{-11} \pm 0.29 \times 10^{-11}$ y $9.28 \times 10^{-11} \pm 1.32 \times 10^{-11} \mu\text{g célula}^{-1}$, respectivamente. Concluyen con una concentración de $1.49 \times 10^{-10} \pm 0.61 \times 10^{-11}$, $5.25 \times 10^{-11} \pm 0.69 \times 10^{-11}$ y $6.82 \times 10^{-11} \pm 0.37 \times 10^{-11} \mu\text{g célula}^{-1}$, respectivamente.

Sin tomar otro parámetro para analizar, la concentración de carotenoides no es mayor al aumentar la irradiancia, debido a que la irradiancia del cultivo *C*, no fue suficiente para originar una respuesta de fotoprotección.

En la figura 5.9, se muestra el contenido volumétrico de carotenoides, el cultivo *A*, presenta una concentración inicial de $0.667 \pm 0.098 \mu\text{g L}^{-1}$, el mínimo y el máximo coinciden con los respectivos valores en densidad celular, con $0.608 \pm 0.088 \mu\text{g L}^{-1}$ transcurridas 144 h y $0.871 \pm 0.028 \mu\text{g L}^{-1}$ con 240 h, respectivamente. Finaliza con $0.832 \pm 0.034 \mu\text{g L}^{-1}$.

El cultivo *B* presenta una concentración inicial $0.860 \pm 0.026 \mu\text{g L}^{-1}$, transcurridas 192 h se tiene una concentración máxima de $1.403 \pm 0.11 \mu\text{g L}^{-1}$, al finalizar se reporta la menor concentración con $0.836 \pm 0.11 \mu\text{g L}^{-1}$.

Los valores mínimos de pigmentos se observan durante un cultivo temprano y tardío, mientras que los máximos se encuentran cerca de la fase exponencial [16].

El cultivo *C* no presentó este comportamiento, la concentración de carotenoides se mantiene casi constante, comportándose similar a la concentración de clorofila *a*. Inicia con una concentración de $0.732 \pm 0.104 \mu\text{g L}^{-1}$, la concentración mínima es a las 192 h con $0.721 \pm 0.015 \mu\text{g L}^{-1}$, finalizando con la concentración máxima de $0.815 \pm 0.043 \mu\text{g L}^{-1}$.

Todos los cultivos finalizan con una concentración volumétrica de carotenoides similar, lo que indica, que si se extiende el periodo de incubación no habrá una mayor acumulación, sin importar las condiciones de intensidad lumínica.

En este estudio, los pigmentos fotosintéticos, clorofila *a* y carotenoides, presentaron un comportamiento similar, debido a que ambos, se comportaron como accesorios captadores de luz, para eficientar la fotosíntesis. Justificando así que la mayor cantidad de pigmentos se presenta en el cultivo *B* a las 192 h con $1.403 \pm 0.11 \mu\text{g L}^{-1}$, cuando se tiene la mayor densidad celular. La máxima concentración volumétrica de carotenoides en el cultivo *B* fue 1.72 veces mayor que

en el cultivo *C* y 1.61 mayor que el cultivo *A*.

Para poder generar una respuesta fotoprotectiva de las células, es necesario aumentar la irradiancia, o mantener constante la iluminación para aumentar la irradiación, la desventaja que presenta esta técnica, es la disminución de la tasa de crecimiento.

5.7. Perspectivas de uso

Al término de los distintos cultivos, posterior al centrifugado y secado, se obtuvieron las cantidades totales de biomasa que se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5: Biomasa total obtenida.

Intensidad de luz	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	500	750	1000
Biomasa húmeda total	(g L^{-1})	1.09	2.07	2.75
Biomasa seca total	(g L^{-1})	0.1068	0.1384	0.2399

El cultivo *A* presentó un menor rendimiento, estos datos concluyen la discusión presentada anteriormente. La irradiancia de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el cultivo mixto microalgal no fue apta para tener una proliferación celular.

Por otro lado, los cultivos *B* y *C*, registraron 1.89 y 2.52 veces mayor concentración de biomasa total húmeda, respectivamente, que el cultivo *A*. Y el cultivo *C*, ofrece una concentración 1.32 veces mayor que el cultivo *B*.

El cultivo *B*, al término del periodo del cultivo ya se encontraba en la etapa de muerte celular, explicando los resultados del peso seco. Pero por los resultados anteriormente desarrollados, la irradiancia de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aunado a un inóculo fresco, presenta condiciones favorables para la duplicación celular del cultivo mixto microalgal.

Finalmente, el cultivo *C* presenta una mayor cantidad de biomasa. Esto se comprende por varias razones, la primera es que el cultivo todavía se encontraba en etapa de crecimiento, contrario al cultivo *B*. El crecimiento máximo se tiene a las 240 h, la tasa de crecimiento diaria al finalizar es mayor, comparadas con las dos restantes, se propone que alargando el periodo de incubación, habrá una mayor concentración celular. Además, las células que se adaptaron mejor son de tamaños menores, provocando que exista un error humano en el conteo con el hematocitómetro, derivando en una menor concentración celular registrada. La irradiancia de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un tiempo de incubación mayor, se prevé que registre una mayor cantidad de biomasa, asimismo el cultivo mixto se adaptó a esta condición de luz.

Por otra parte, en el cultivo sometido a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvo un rendimiento en biomasa seca de 0.1068 g L^{-1} y finalizó con una concentración de pigmentos por célula mayor, debido a la intensidad de luz, los pigmentos actuaron como accesorios captadores de luz para eficientar el proceso de fotosíntesis. Al término del cultivo presentó una concentración volumétrica de clorofila *a* de $2.007 \pm 0.074 \mu\text{g L}^{-1}$ y de carotenoides $0.832 \pm 0.034 \mu\text{g L}^{-1}$.

Al ser sometido a $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el cultivo tuvo un rendimiento de biomasa de 0.1384 g L^{-1} , con una concentración volumétrica final de clorofila *a* de $1.963 \pm 0.283 \mu\text{g L}^{-1}$ y de carotenoides $0.836 \pm 0.110 \mu\text{g L}^{-1}$, es el cultivo donde se alcanza una mayor concentración volumétrica de carotenoides con $1.403 \pm 0.11 \mu\text{g L}^{-1}$. Al analizar el contenido de pigmentos por célula de todos los cultivos, en esta condición transcurridas 96 h se presentan los valores mínimos, debido a la etapa estacionaria del cultivo, o en etapa tardía.

Al tener una exposición de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvo la mayor acumulación de biomasa con 0.2399 g L^{-1} pero la menor cantidad volumétrica de pigmentos, clorofila *a* con $1.9 \pm 0.081 \mu\text{g L}^{-1}$ y carotenoides $0.815 \pm 0.043 \mu\text{g L}^{-1}$ debido a que el cultivo se encontraba en una etapa temprana.

La biomasa microalgal obtenida en estos procesos de cultivo en fotobiorreactor se puede utilizar con fines de caracterización y cuantificación, tanto de los carotenoides presentes, como de la composición de la biomasa en términos de lípidos, carbohidratos y proteínas para determinar su utilidad en la producción de bioenergéticos.

El cultivo en fotobiorreactor debe intentar reproducir las condiciones ambientales y obtener las condiciones óptimas de crecimiento en ese entorno, para una primera aproximación para la producción comercial de algas en condiciones de crecimiento al aire libre [5]. Generalmente, la luz solar es el factor limitante, debido a los ciclos diurnos y las variaciones estacionales. En Temixco, Morelos, un lugar que cuenta con suficiente radiación solar y las variaciones estacionales no son tan marcadas, este parámetro no será limitante mientras que el cultivo mixto ha demostrado su adaptabilidad a un régimen intenso de luz.

CONCLUSIONES

El objetivo principal del estudio era evaluar el efecto de la intensidad de luz en el cultivo mixto microalgal en un fotobiorreactor de placa plana FMT 150 de Photon Systems Instruments (República Checa), con capacidad de 1000 mL, con fertilizante agrícola foliar Bayfolan ® Forte como medio de cultivo. A través de tres diferentes intensidades de luz, se estableció el límite inferior de irradiancia necesaria para la duplicación celular.

El fotobiorreactor instrumentado, en el cultivo de microalgas posibilita tener reproducibilidad en las condiciones ambientales pre-seleccionadas como intensidad luminosa y temperatura.

La mezcla automática en el fotobiorreactor FMT 150 de Photon Systems Instruments (República Checa), es insuficiente con una densidad celular mayor a 10^7 células ml^{-1} , originando sedimentación celular. Como consecuencia de la sedimentación celular, el cultivo no presenta condiciones homogéneas de luz, aumentando la posibilidad de células suspendidas fotoinhibidas.

La edad de la cepa es un factor crucial, que se tomó en cuenta posterior a la etapa experimental. Es necesario contar con un cultivo fresco, preferentemente en etapa de crecimiento exponencial a fin de aumentar la adaptabilidad a diferentes condiciones de crecimiento.

Acoplando la temperatura y la irradiancia en periodos iguales de luz:oscuridad se determinó que el cultivo mixto microalgal fue capaz de tolerar condiciones de temperatura hasta 30°C, sirviendo como una primera aproximación para conocer la viabilidad en las condiciones ambientales promedio de Temixco, Morelos.

El cultivo que presentó una mayor tasa de crecimiento con 0.016 h⁻¹ y un menor tiempo de duplicación celular con 1.72 días fue el sometido a una irradiancia de 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por lo que en este estudio, esta condición de luz generó un ambiente óptimo para la producción de biomasa microalgal.

Durante las 288 horas de cultivo se logró una acumulación de pigmentos, como clorofila *a* y carotenoides, resultado de sus funciones como accesorios captadores de luz, dado que en ninguna condición presentaron mecanismos de protección.

Las máximas concentraciones volumétricas de pigmentos se alcanzaron en el cultivo sometido a una irradiancia de 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, junto con la máxima concentración celular, por lo que en este estudio, existe una correlación entre la acumulación de pigmentos y la densidad celular.

El cultivo mixto microalgal sometido a una irradiancia de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostró 1.7 veces más concentración de biomasa seca, al final de la etapa experimental, comparado con la irradiancia de 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La tasa de crecimiento máxima se obtuvo en un rango de pH entre 6.3 y 6.6, de modo que el pH en el cultivo mixto microalgal no dependió en gran medida de la intensidad de luz.

RECOMENDACIONES

Al contar con un cultivo mixto microalgal, en especie y proporciones iniciales desconocidas, el análisis de la intensidad de luz se vuelve complejo al desconocer que especies hacen viable la adaptabilidad a la condición estresante. Por lo anterior, se sugiere purificar el cultivo para así analizar en que relación de mezcla, el cultivo es más adaptable ante condiciones adversas de luz, temperatura y pH, haciendo una investigación más precisa y reproducible.

Otro aspecto a resaltar es el estudio del agotamiento de nutrientes, como nitrógeno y fósforo, con el fin de mejorar el entendimiento del crecimiento microalgal y la acumulación de pigmentos, principalmente de carotenoides, ya que se sabe que un ambiente limitado de nitrógeno favorece su acumulación.

También se propone verificar el crecimiento celular del inóculo, logrando conocer la etapa de inoculación más favorable, asegurando células jóvenes, obteniendo una disminución en la duración de la etapa de adaptación al nuevo sistema de cultivo.

Finalmente, se plantea hacer la extracción y caracterización de carotenoides, generando un mejor entendimiento de su comportamiento como accesorios captadores de luz y compuestos de alto valor. Y la caracterización de la biomasa para evaluar la factibilidad de su uso en la producción de bioenergéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Kasturi Dutta, Achlesh Daverey, and Jih Gaw Lin. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69:114–122, 2014.
- [2] Bala Kiran, Ritunesh Kumar, and Devendra Deshmukh. Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*, 88:1228–1244, dec 2014.
- [3] Alison Mohr and Sujatha Raman. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, 63:114–122, 2013.
- [4] Sohrab Haghghi Mood, Amir Hossein Golfeshan, Meisam Tabatabaei, Gholamreza Salehi Jouzani, Gholam Hassan Najafi, Mehdi Gholami, and Mehdi Ardjmand. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27:77–93, 2013.
- [5] Liam Brennan and Philip Owende. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:557–577, 2010.
- [6] P. Geada, V. Vasconcelos, A. Vicente, and B. Fernandes. Mi-

- croalgal Biomass Cultivation. In *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, pages 257–284. 2017.
- [7] Amos Richmond and Qiang Hu. *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*. 2013.
- [8] Jasvinder Singh and Rakesh Chandra Saxena. An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 2015.
- [9] Shijie Liu. An Overview of Biological Basics. In *Bioprocess Engineering*. 2017.
- [10] Kirsten Heimann and Roger Huerlimann. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. In *Handbook of Marine Microalgae*, pages 25–41. Academic Press, jan 2015.
- [11] Michael A. Borowitzka. Biology of Microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*, pages 23–72. Academic Press, jan 2018.
- [12] Luveshan Ramanna, Ismail Rawat, and Faizal Bux. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80:765–773, dec 2017.
- [13] Park Nobel. Photochemistry of Photosynthesis. In *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 2009.
- [14] J.Ptasinski Krzysztof. *Efficiency of biomass energy*. 2016.
- [15] Jiří Masojídek, Giuseppe Torzillo, and Michal Koblížek. Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*. 2013.
- [16] Juan Cristóbal García-Cañedo, Eliseo Cristiani-Urbina, Cesar M Flores-Ortiz, Teresa Ponce-Noyola, Fernando Esparza-García, and Rosa Olivia Cañizares-Villanueva. Batch and fed-batch culture of *Scenedesmus incrassatulus*: Effect over biomass, carotenoid profile and concentration, photosynthetic efficiency and non-photochemical quenching. *Algal Research*, 13:41–52, 2016.

-
- [17] Dorottya S. Wágner, Borja Valverde-Pérez, and Benedek Gy Plósz. Light attenuation in photobioreactors and algal pigmentation under different growth conditions – Model identification and complexity assessment. *Algal Research*, 2018.
- [18] H. Chakdar and S. Pabbi. Algal Pigments for Human Health and Cosmeceuticals. In *Algal Green Chemistry*, pages 171–188. Elsevier, jan 2017.
- [19] M. Roca, K. Chen, and A. Pérez-Gálvez. Chlorophylls. In *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, pages 125–158. Woodhead Publishing, jan 2016.
- [20] João C. Varela, Hugo Pereira, Marta Vila, and Rosa León. Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3):423–436, sep 2015.
- [21] Ramaraj Sathasivam and Jang Seu Ki. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries, 2018.
- [22] Mengyue Gong and Amarjeet Bassi. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8):1396–1412, dec 2016.
- [23] K. Rajesh, M.V. V Rohit, and S. Venkata Mohan. Microalgae-Based Carotenoids Production. In *Algal Green Chemistry*, pages 139–147. Elsevier, jan 2017.
- [24] Poonam Singh, Sanjay Kumar Gupta, Abhishek Guldhe, Ismail Rawat, and Faizal Bux. Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 2015.
- [25] Manoj Kumar Enamala, Swapnika Enamala, Murthy Chavali, Jagadish Donepudi, Rajasri Yadavalli, Bhulakshmi Kolapalli, Tirumala Vasu Aradhyula, Jeevitha Velpuri, and Chandrasekhar Kuppam. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018.
-

- [26] A Vertés, N Qureshi, H P Blaschek, and H Yukawa. *Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries*. 2010.
- [27] Jayachandran Venkatesan, Panchanathan Manivasagan, and Se Kwon Kim. Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. Present Trends and Future Advances. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. 2015.
- [28] Shir Reen Chia, Hwai Chyuan Ong, Kit Wayne Chew, Pau Loke Show, Siew Moi Phang, Tau Chuan Ling, Dillirani Nagarajan, Duu Jong Lee, and Jo Shu Chang. Sustainable approaches for algae utilisation in bioenergy production. *Renewable Energy*, 129:838–852, 2018.
- [29] Diagnora Brito, Arturo Castro, Miguel Guevara, Ely Gómez, Ana Ramos-Villarreal, and Nicoleta Maftei Aron. Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology*, 37(1):85–97, 2013.
- [30] Muhammad Rizwan, Ghulam Mujtaba, Sheraz Ahmed Memon, Kisay Lee, and Naim Rashid. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92:394–404, 2018.
- [31] Graziella C Zittelli, Natascia Biondi, Liliana Rodolfi, and Mario R Tredici. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*. 2013.
- [32] José C.M. M Pires. Mass Production of Microalgae. In *Handbook of Marine Microalgae*, pages 55–68. Academic Press, jan 2015.
- [33] Bei Wang, Christopher Q Lan, and Mark Horsman. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30:904–912, 2012.

- [34] L. Durso and R. Hutkins. Starter cultures. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pages 5583–5593. Academic Press, jan 2003.
- [35] F. G. Acién, E. Molina, A. Reis, G. Torzillo, G. C. Zittelli, C. Sepúlveda, and J. Masojídek. Photobioreactors for the production of microalgae. In *Microalgae-Based Biofuels and Bio-products: From Feedstock Cultivation to End-Products*. 2017.
- [36] E Molina Grima, J M Femtidez Sevilla, J A Ssinchez P6rez, and F Garcia. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45:59–69, 1996.
- [37] Giuseppe Torzillo and Avigad Vonshak. Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures. In *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*. 2013.
- [38] Quentin Béchet, Andy Shilton, and Benoit Guieysse. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, 31(8):1648–1663, 2013.
- [39] Walter Hill. Effects of Light. In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, pages 121–148. 1996.
- [40] Emeka G. Nwoba, David A. Parlevliet, Damian W. Laird, Kamal Alameh, and Navid R. Moheimani. Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. *Algal Research*, 39:101433, may 2019.
- [41] Lin Lan Zhuang, Dawei Yu, Jian Zhang, Fei fei Liu, Yin Hu Wu, Tian Yuan Zhang, Guo Hua Dao, and Hong Ying Hu. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94:1110–1119, 2018.
- [42] Kit Wayne Chew, Shir Reen Chia, Pau Loke Show, Yee Jiun Yap, Tau Chuan Ling, and Jo-Shu Chang. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae

- cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91:332–344, 2018.
- [43] Ankita Juneja, Ruben Ceballos, and Ganti Murthy. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*, 6(9), sep 2013.
- [44] Shijie Liu and Shijie Liu. How Cells Grow. In *Bioprocess Engineering*, chapter 11, pages 629–697. Elsevier, jan 2017.
- [45] Shijie Liu. Cell Cultivation. In *Bioprocess Engineering*, pages 700–769. 2017.
- [46] Michael A Borowitzka and Navid R Moheimani. *Algae for Biofuels and Energy*. 2013.
- [47] B.ŠETLÍK, I., KOMÁREK, J. PROKEŠ@. Short account of the activities from 1960 to 1965 and some future prospects. *Annual report of the Laboratory of Experimental Algology and Department of Applied Algology for the year 1966*, pages 5–36, 1967.
- [48] Alexis Hernández-Pérez and José I. Labbé. *Microalgas, cultivo y beneficios*, 2014.
- [49] C.U. U Ugwu, H. Aoyagi, and H. Uchiyama. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10):4021–4028, jul 2008.
- [50] Domenico Voltolina, Mario Nieves, Guadalupe Navarro, Teresa Oliva, and Dulce Peraza. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacultural Engineering*, 19(1):7–15, 1998.
- [51] Bayer de México. Bayfolan Líquido.
- [52] Bertha Arredondo and Domenico Voltolina. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 2007.

- [53] Adriana Garibay-Hernández. *Evaluación de las condiciones de crecimiento de la microalga Neochloris oleobundans para su uso potencial como biodiesel*. PhD thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- [54] Robert R.L. Guillard, Peter Kilham, and Togwell A. Jackson. KINETICS OF SILICON-LIMITED GROWTH IN THE MARINE DIATOM THALASSIOSIRA PSEUDONANA HASLE AND HEIMDAL (=CYCLOTELLA NANA HUSTEDT). *Journal of Phycology*, 9(3), 1973.
- [55] J. D. H Strickland and T. R Parsons. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Second Edition., 1972.
- [56] Pooya Darvehei, Parisa A. Bahri, and Navid R. Moheimani. Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018.
- [57] Renhe Qiu, Song Gao, Paola A. Lopez, and Kimberly L. Ogden. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28(November):192–199, 2017.
- [58] Sunjin Kim, Jeong-eun Park, Yong-Beom Cho, and Sun-Jin Hwang. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 144:8–13, sep 2013.
- [59] Yanyan Su, Artur Mennerich, and Brigitte Urban. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. *Bioresource Technology*, 118:469–476, 2012.
- [60] Liliana Delgadillo-Mirquez, Filipa Lopes, Behnam Taidi, and Dominique Pareau. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11:18–26, 2016.
- [61] Xue Chen, Qianru Yvonne Goh, Weifeng Tan, Iqbal Hossain, Wei Ning Chen, and Raymond Lau. Lumostatic strategy

- for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource Technology*, 102(10):6005–6012, 2011.
- [62] Juan Roberto Benavente-Valdés, Cristóbal Aguilar, Juan Carlos Contreras-Esquivel, Alejandro Méndez-Zavala, and Julio Montañez. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, 10:112–125, 2016.
- [63] Emmanuel B. D’Alessandro and Nelson R. Antoniosi Filho. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58:832–841, 2016.
- [64] Wendie Levasseur, Behnam Taidi, Robin Lacombe, Patrick Perré, and Victor Pozzobon. Impact of seconds to minutes photoperiods on *Chlorella vulgaris* growth rate and chlorophyll a and b content. *Algal Research*, 2018.
- [65] Kim J.M. Mulders, Packo P. Lamers, Dirk E. Martens, and René H. Wijffels. Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *Journal of Phycology*, 50(2):229–242, apr 2014.
- [66] S. Sedjati, G. W. Santosa, E. Yudiati, E. Supriyantini, A. Ridlo, and F. D. Kimberly. Chlorophyll and Carotenoid Content of *Dunaliella salina* at Various Salinity Stress and Harvesting Time. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, volume 246. Institute of Physics Publishing, 2019.
- [67] Hasina Begum, Fatimah M.D. D Yusoff, Sanjoy Banerjee, Helena Khatoon, and Mohamed Shariff. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13):2209–2222, 2016.
- [68] Veronica da Silva Ferreira, Celso Sant’Anna, and Celso Sant’Anna. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 2017.
- [69] Amritpreet K. Minhas, Peter Hodgson, Colin J. Barrow, and Alok Adholeya. A review on the assessment of stress conditions

-
- for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 2016.
- [70] Manuel Rodriguez-Concepcion, Javier Avalos, M. Luisa Bonet, Albert Boronat, Lourdes Gomez-Gomez, Damaso Hornero-Mendez, M. Carmen Limon, Antonio J. Meléndez-Martínez, Begoña Olmedilla-Alonso, Andreu Palou, Joan Ribot, Maria J. Rodrigo, Lorenzo Zacarias, and Changfu Zhu. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70(February):62–93, apr 2018.
- [71] Alexei Solovchenko and Konstantin Chekanov. Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors. In *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*, chapter 4. 2014.
- [72] Robert A. Anderson. *Algal Culturing Techniques, 1st Edition*, volume 53. 2005.
- [73] DL Nelson and MM Cox. Lenhinger. *Principles of Biochemistry. Wroth, New York*, 2000.
- [74] Shuichi Aiba. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Microalgae Reactions.*, 23:85–156, 1982.
- [75] Jianjun Hu, Dillirani Nagarajan, Quanguo Zhang, Jo-Shu Shu Chang, and Duu-Jong Jong Lee. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1):54–67, jan 2018.
- [76] Omatoyo K. Dalrymple, Trina Halfhide, Innocent Udom, Benjamin Gilles, John Wolan, Qiong Zhang, and Sarina Ergas. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: A review and preliminary results. *Aquatic Biosystems*, 9(1):1–11, 2013.
- [77] Ana Catarina Guedes, Helena M. Amaro, and Francisco Xavier Malcata. Microalgae as sources of carotenoids, 2011.
- [78] Kifayat Ullah, Mushtaq Ahmad, Sofia, Vinod Kumar Sharma, Pengmei Lu, Adam Harvey, Muhammad Zafar, Shazia Sultana,
-

- and C. N. Anyanwu. Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2014.
- [79] Ewelina Jankowska, Ashish K. Sahu, and Piotr Oleskowicz-Popiel. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75:692–709, 2017.
- [80] Suzana Wahidin, Ani Idris, and Sitti Raehanah Muhamad Shaleh. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bio-resource Technology*, 129:7–11, 2013.