

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura

Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano.

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias
Presenta:

Omar Guillermo Montes González

Ensenada, Baja California, México
2014

Resumen de la tesis de Omar Guillermo Montes González, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano.

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Resumen

El cultivo de microalgas es un eslabón importante en el cultivo de organismos acuáticos, debido a que son indispensables para la producción de alimento que consumen los primeros estadios de vida de los organismos acuáticos. La microalga *Nannochloropsis* sp. se ha utilizado como un alimento para el cultivo de organismos marinos ya que es rica en ácido eicosapentaenoico (EPA), de gran importancia en la nutrición de organismos marinos, especialmente en el crecimiento y desarrollo de las larvas de peces, moluscos y crustáceos. El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo por medio de biorreactores, en los cuales, la calidad e intensidad de la luz son los principales factores que controlan la productividad en estos sistemas de cultivo. El crecimiento y la concentración máxima de las microalgas se ve afectada por la geometría del biorreactor, la tasa de aireación y los patrones de irradiancia. En el presente trabajo se estudiará el efecto de la intensidad de luz y la tasa de inyección de aire sobre la tasa de crecimiento y la densidad de microalgas en un biorreactor plano.

Palabras clave: **Biorreactor plano, microalgas, *Nannochloropsis*.**

Abstract of the thesis presented by Omar Guillermo Montes González as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture

Effect of the Light intensity and the air injection rate on on the growth and productivity of the microalgae *Nannochloropsis* sp., cultivated in a flate plate biorreactor.

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Abstract

The cultivation of microalgae is an important link in the cultivation of aquatic organisms, because they are essential for the production of food consumed by the early stages of life of aquatic organisms. The microalgae *Nannochloropsis* sp. has been used as a food for the cultivation of marine organisms because it is rich in eicosapentaenoic acid (EPA), of great importance in nutrition of marine organisms, especially in the growth and development of the larvae of fish, molluscs and crustaceans. The cultivation of microalgae can be performed by means of bioreactors, in which the quality and intensity of the light are the main factors that control the productivity in these cropping systems. The growth and the maximum concentration of the microalgae is affected by the geometry of the bioreactor, the rate of aeration and the patterns of irradiance. In the present work will be studied the effect of the light intensity and the rate of injection of air on the growth rate and density of microalgae in a bioreactor plane.

Keywords: **Flat plate bioreactor, microalgae, *Nannochloropsis*.**

Dedicatoria

Con amor a toda mi familia

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Benjamín Barón Sevilla por transmitirme su valioso conocimiento.

A los integrantes del comité de tesis: Dra. Beatriz Cordero Esquivel, Dr. Luis Zavala Sansón y M.C. José G. Espinoza Ibarría por las sugerencias y recomendaciones durante todo el desarrollo de este trabajo.

A los técnicos del Departamento de Acuicultura, incluyendo a los becarios por el apoyo brindado. Al Tec. Francisco Valenzuela por su asesoría para la integración de los diagramas.

A todos los profesores del Departamento de Acuicultura por formar parte de mi formación profesional.

A mis compañeros de generación por las experiencias.

A mis amigos por todos sus consejos e invaluable conocimiento.

Al personal administrativo del departamento de Acuicultura: a todas las secretarías por su valioso apoyo incondicional.

A todas las personas de las que estuve rodeado y que formaron parte directa e indirectamente en el desarrollo de este trabajo.

A CICESE por los estudios brindados y a CONACYT por haber sido beneficiado con una beca durante los estudios de maestría.

A la Secretaría de Pesca y Acuicultura del Gobierno del Estado de Baja California y a la Fundación Produce para la Investigación Agropecuaria y Forestal del Estado de Baja California, A.C, por el apoyo financiero para el proyecto “Desarrollo de un sistema de producción de alimento vivo para el cultivo de larvas de jurel, con base en un biorreactor plano para la producción intensiva de microalgas” en el que se inscribe esta tesis.

Contenido

Resumen	ii
Abstract.....	iii
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xi
Capítulo 1	1
Introducción	1
1.1 Características básicas de las microalgas	1
1.2 Características biológicas de <i>Nannochloropsis</i> sp.....	1
1.3 Importancia de las microalgas para la acuicultura	2
1.4 Cinética del crecimiento de las microalgas	4
1.4.1 Tipos de cultivo	5
1.5 Fotobiorreactores.....	6
1.6 Efectos de la intensidad y calidad de la luz en el cultivo de las microalgas....	10
1.7 Oxígeno y dióxido de carbono	15
1.8 Turbulencia	16
1.9 Cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp. en biorreactores.....	19
1.10 Antecedentes.....	20
1.10.1 Cultivo en biorreactores	20
1.10.2 Efectos de la calidad e intensidad de la luz sobre el crecimiento de las microalgas	20
1.10.3 Efectos de la tasa de inyección de aire sobre el crecimiento de las microalgas	22
1.11 Objetivos.....	23
1.11.1 Objetivo General	23
1.11.2 Objetivos particulares	24
1.11.3 Hipótesis	24
Capítulo 2	25
Materiales y métodos.....	25
2.1 Cultivo de inóculos.....	25
2.2 Descripción del sistema de cultivo.	25
2.3 Preparación de los BRP.....	29
2.4 Efecto de la tasa de inyección de aire	30
2.5 Efecto de la intensidad de la luz	30
2.6 Registro de variables ambientales.....	31
2.7 Evaluación de la biomasa producida	31
2.8 Parámetros poblacionales	32
2.9 Análisis estadístico.	33
2.10 Análisis de producción.	33
Capítulo 3	34

Resultados.....	34
3.1 Efecto de la tasa de inyección de aire sobre el crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp.....	34
3.1.1 Temperatura	34
3.1.2 pH	35
3.1.3 Concentración de oxígeno disuelto.....	36
3.1.4 Crecimiento.....	37
3.1.5 Tasas de Crecimiento	37
3.1.6 Peso seco	39
3.2 Efecto de la intensidad de la luz sobre el crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp.	39
3.2.1 Temperatura	39
3.2.2 pH	41
3.2.3 Oxígeno	41
3.2.4 Densidad celular	42
3.2.5 Crecimiento.....	43
3.2.6 Producción de biomasa	43
Capítulo 4	46
Costos de inversión y producción	46
4.1 Productividad del sistema	46
Capítulo 5	49
Discusión	49
Conclusiones	55
Recomendaciones	55
Referencias bibliográficas	56

Lista de Figuras

- Figura 1. Fotomicrografía de *Nannochloropsis* sp. 2
- Figura 2. Curva de crecimiento típica para una población de microalgas, en la cual se indican las diferentes fases. In x indica el logaritmo natural (base e) de la cantidad de células de microalgas en el cultivo (modificada de Arredondo y Voltolina 2007). 5
- Figura 3. Representación esquemática de biorreactores planos: A, biorreactor plano con burbujeo desde la parte inferior. B, plano en forma de V y C) panel alvolar (Carvalho A. P. *et al.*, 2010). 10
- Figura 4 Espectro electromagnético, con detalle espectral en la luz visible (Carvalho *et al.*, 2011). 11
- Figura 5. Integración de los fotosistemas I y II en los cloroplastos de las microalgas (Nelson y Cox, 2005). 13
- Figura 6. Irradiancia espectral relativa en el espectro electromagnético visible para la luz de tres temperaturas, 4800°K, 5500°K y 6500°K. Las flechas indican los picos de absorción de las clorofilas a y b. Datos tomados de Wyszecski y Stiles, (1966). 15
- Figura 7. Generación de turbulencia por una fuerza tangencial. (a) El agua debajo de la horizontal se encuentra en reposo. (b) Una fuerza media aplicada en forma superficial arrastra las moléculas de agua en la dirección de la fuerza, en forma proporcional con respecto a la dirección vertical descendente. (c) La energía transferida de una fuerza intensificada, crea un caos promoviendo la turbulencia (Reynolds, 2006). 17
- Figura 8. Efecto de la intensidad de la luz (lux) en el crecimiento, peso seco g/l (circulo relleno) y contenido lipídico (circulo abierto) de *Nannochloropsis* sp. (Cheirsilp y Torpee, 2012). 22
- Figura 9. Esquema del sistema de cultivo de BRP para microalgas (A) Sistema de esterilización de agua de mar (B) Sistema de biorreactores (C) Controladores de pH y transformadores eléctricos para la iluminación. 26
- Figura 10. Sistema de filtración de agua de mar para el suministro hacia los BRP. (A) Depósito de agua de mar primario (B) Bomba para agua de mar (C) Biofiltro (D) Fraccionador de espuma (E) Depósito secundario de agua de mar (F) Generador de ozono y lámpara U.V. 27
- Figura 11. Red de suministro de aire para los BRP. (A) Turbina de aire (B) Cartuchos con filtro de aire (c) Fluómetros de aire. 28

- Figura 12. Sistema de control y suministro de CO₂ para los BRP. (A) Tanque de CO₂ (B) Sistema de control aquatronica (C) Válvulas solenoides. 29
- Figura 13. Diseño del experimento como variable tres flujos de aire Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹ y tres intensidades de luz Tratamiento 1= 282 μmol fotón m⁻² s⁻¹; Tratamiento 2= 116μmol fotón m⁻² s⁻¹; Tratamiento 3= 91 μmol fotón m⁻² s⁻¹. 30
- Figura 14. Disposición de las lámparas fluorescentes en los biorreactores planos, se indican los soportes cuadrangulares distribuidos entre las lámparas. 31
- Figura 15. Variación de la temperatura ambiental del laboratorio donde se alojó el sistema de cultivo, se muestra la temperatura registrada a las 8 a.m. (□) y 8 p.m. (●) 34
- Figura 16. Temperatura promedio de los cultivos de *Nannochloropsis* sp. con tres tasa de inyección de aire durante un periodo de 18 días. (●) Tratamiento 1=3 l h⁻¹; (■) Tratamiento 2=7 l h⁻¹; (o) Tratamiento 3=10 l h⁻¹. 35
- Figura 17. Promedio del pH para *Nannochloropsis* sp cultivada con tres tasa de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹. 36
- Figura 18. Concentración promedio del oxígeno disuelto (mg/l) en los cultivos de *Nannochloropsis* sp durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹. 36
- Figura 19. Curvas de crecimiento promedio de *Nannochloropsis* sp. cultivada en BRP con tres tasas de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹. 37
- Figura 20. Variaciones de la temperatura ambiental del laboratorio donde se alojó el sistema de cultivo, se muestra la temperatura registrada a las 8 a.m. (□) y 8 p.m. (●) 40
- Figura 21. Temperatura promedio de los cultivos de *Nannochloropsis* sp. expuestos a tres intensidades de luz durante un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 μmol fotón m⁻² s⁻¹; Tratamiento 2= 116μmol fotón m⁻² s⁻¹; Tratamiento 3= 91 μmol fotón m⁻² s⁻¹. 40
- Figura 22. Promedio del pH para *Nannochloropsis* sp. cultivada con tres intensidades de luz por un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 μmol fotón m⁻² s⁻¹; Tratamiento 2= 116μmol fotón m⁻² s⁻¹; Tratamiento 3= 91 μmol fotón m⁻² s⁻¹. 41

Figura 23. Concentración promedio del oxígeno disuelto (mg/l) en los cultivos de *Nannochloropsis* sp expuestos a tres intensidades de luz durante un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 42

Figura 24. Crecimiento poblacional de *Nannochloropsis* sp. cultivada en un sistema de BRP con con tres intensidades de luz por un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 43

Lista de Tablas

- Tabla 1. Cuadro comparativo de las características de los sistemas de cultivo de microalgas abiertos y cerrados (Carvalho A. P. *et al.*, 2010). 7
- Tabla 2. Tasa de crecimiento promedio (μ) para *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano con tres tasas de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹. 38
- Tabla 3. Producción promedio de biomasa de *Nannochloropsis* sp. cultivada en un biorreactor plano con tres tasas de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹. 39
- Tabla 4. Tasa de crecimiento promedio (μ) de *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano, con tres intensidades de luz por un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 44
- Tabla 5. Producción de biomasa promedio de *Nannochloropsis* sp., cultivada en BRP con tres intensidades de luz para los días seis, nueve y doce. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Letras indican diferencias significativas $P < 0.05$. 44
- Tabla 6. Costos de inversión en pesos para los nueve BRP, los costos se expresan en pesos mexicanos. 46
- Tabla 7. Estimación de costos de producción en pesos para los nueve BRP. 47

Tabla 8. Producción de biomasa seca total (g/l) (desviación estándar) con tres condiciones de turbulencia y tres intensidades de luz, nótese que la evaluación de la intensidad de luz se hizo con la turbulencia que produjo la mayor biomasa.*experimento turbulencia **experimento intensidad 47

Tabla 9. Rendimiento de *Nannochloropsis* sp. cultivada con tres intensidades de luz. 48

Capítulo 1

Introducción

1.1 Características básicas de las microalgas

Las microalgas son microorganismos que habitan prácticamente en todos los ambientes de la Tierra, ya sea en el suelo, como simbiontes, y en el ambiente acuático prácticamente en todas las salinidades. El término alga se refiere a un grupo polifilético de organismos fotosintéticos que sintetizan y almacenan una gran diversidad de compuestos orgánicos. En este sentido, las algas tienen una fuerte similitud con las plantas (Barsanti y Gualtieri, 2006).

1.2 Características biológicas de *Nannochloropsis* sp.

El Género *Nannochloropsis* pertenece al Reino Chromista y al Filo Heterokontophyta, se caracteriza por ser una microalga unicelular, con formas subesféricas o cilíndricas que van de los 2 a los 4 μm (μm), con cloroplastos que van del color amarillo al verde (Guiry *et al.*, 2013). Contiene clorofila a y otros pigmentos como astaxantina, zeaxantina y canthaxantina. Este Género de microalgas agrupa a las especies que contienen la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), de gran importancia en la nutrición de animales marinos, especialmente en el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos y crustáceos (Sánchez-Torres *et al.*, 2008).

La microalga *Nannochloropsis oculata* se ha utilizado ampliamente como alimento para el rotífero *Brachionus plicatilis* Mueller, el cual transfiere eficientemente los ácidos grasos poliinsaturados algales a las larvas de peces marinos (Sánchez-Torres *et al.* 2008). *Nannochloropsis* sp. se cultiva en forma común en los criaderos de peces con tres propósitos: (1) como alimento total o parcial para la producción de rotíferos; (2) para el enriquecimiento de rotíferos y (3) para crear el efecto de agua verde en los tanques de cultivo de larvas de peces. Esta especie ha sustituido exitosamente a *Isochrysis galbana* y

Monochrysis (Pavlova lutheri) sp. para la transferencia de ácidos grasos poliinsaturados, en particular de EPA, a las larvas de peces marinos, a través de la alimentación con rotíferos (Cheng-Wu *et al.*, 2001, Barsanti y Gualtieri, 2006).

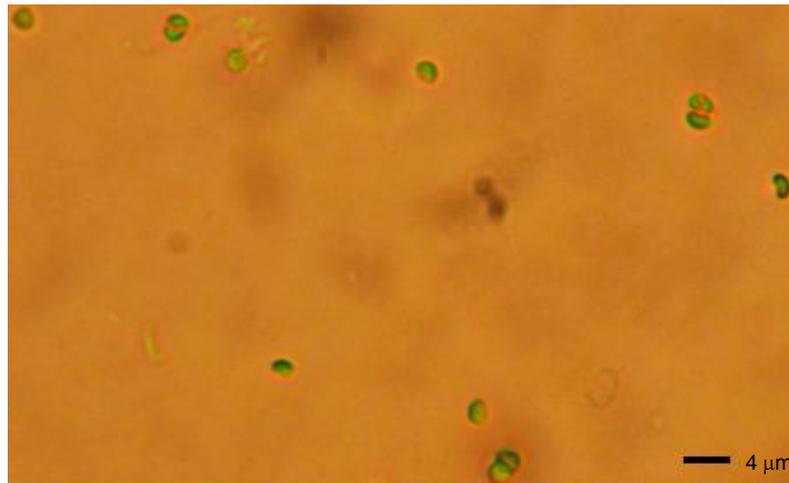


Figura 1. Fotomicrografía de *Nannochloropsis* sp.

1.3 Importancia de las microalgas para la acuicultura

En los ecosistemas acuáticos naturales, las microalgas constituyen la base de la cadena alimenticia. De manera similar, en los cultivos controlados de peces, moluscos y crustáceos, las microalgas son la base de la producción de su alimento (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La producción controlada de alimento vivo (microalgas y zooplancton) a gran escala, es compleja, debido fundamentalmente a los diversos requerimientos ambientales y nutricionales que implica su producción, pues un sustrato pobre en nutrientes esenciales o una calidad ambiental deficiente puede causar el desarrollo anormal y la muerte masiva de las especies en cultivo (Sánchez-Torres *et al.*, 2008).

Las microalgas son un grupo muy diverso de microorganismos fotosintéticos, que entre sus características se destaca su capacidad para sintetizar diferentes compuestos orgánicos esenciales para los diferentes consumidores a lo largo de la cadena trófica, entre estos compuestos destacan los

ácidos grasos poliinsaturados (v.g. los ácidos linoleico, linolenico, araquidónico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) y docosaheptaenoico (DHA)) así como diferentes pigmentos (v.g. clorofilas y carotenoides, entre otros). Esta diversidad bioquímica, ha propiciado que las microalgas se utilicen con diferentes propósitos, por lo que la selección de la microalga adecuada depende de la aplicación particular. En el caso de la alimentación de organismos intermediarios utilizados en la alimentación de larvas de peces marinos, se requiere de aquellas que acumulan cantidades importantes de ácidos grasos esenciales (ARA, EPA y DHA) (Barsanti y Gualtieri, 2006).

En general se pueden distinguir 6 usos de los microalgas en la acuicultura; a) como alimento en forma de microalga seca para la formulación de alimentos balanceados, ya que mejoran la supervivencia, el desarrollo, productividad y fertilidad de los organismos cultivados; b) microalgas vivas para la nutrición y alimentación de larvas de invertebrados y larvas de vertebrados; c) para la formulación de alimentos ricos en metabolitos con efectos antioxidantes o con altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados, proteínas inducidas por calor o sustancias con actividad inmunológica; d) para la producción de pigmentos utilizados en la producción de alimentos (luteína, zeaxantina, cantaxantina y astaxantina, precursores de la vitamina A; e) para la producción de toxinas y otras sustancias con actividad biológica, esta es un área de investigación muy activa, que incluye moléculas con actividad citotóxica, antivirales, antimicrobiales, antifúngicas y antihelmínticas; y por último, f) para aplicaciones relacionadas con la fijación del CO₂ atmosférico y para la remoción de nutrientes en las aguas residuales (Pulz y Gross, 2004).

La selección de la especie de microalga depende de su calidad nutricional, que debe ser idónea para la alimentación de las larvas de los organismos cultivados, proporcionando los nutrientes esenciales (Pulz y Gross, 2004).

1.4 Cinética del crecimiento de las microalgas

De manera similar a las bacterias y levaduras, las microalgas se reproducen principalmente por división celular, que es binaria en la mayoría de los casos, por lo cual tienen un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones ambientales adecuadas (Arredondo y Voltolina, 2007).

En general, las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo (disponibilidad de nutrientes y de luz), por lo cual también se modifica la velocidad de crecimiento poblacional. En este sentido, se reconocen diferentes fases de crecimiento, que describen la forma en la cual cambian la concentración celular, la biomasa y la composición bioquímica de las microalgas. Para caracterizar el crecimiento de las microalgas se pueden utilizar parámetros poblacionales como la tasa de crecimiento. El crecimiento poblacional de las microalgas se puede dividir básicamente en seis fases: 1) de adaptación, 2) de aceleramiento, 3) de crecimiento exponencial, 4) de desaceleración o crecimiento lento, 5) de crecimiento estacionario y 6) de muerte (Figura 2A).

La duración de la fase de adaptación depende del estado de las células que conforman el inóculo, de las cuales también depende el éxito del cultivo, la tasa de crecimiento poblacional es cero. En la fase de aceleramiento se incrementa la síntesis de componentes celulares estructurales, que lleva al incremento del peso individual y a la división celular, por lo que la tasa de crecimiento aumenta. En la fase exponencial, la velocidad de crecimiento o de multiplicación celular es la máxima y, ante la ausencia de factores limitantes, la tasa de crecimiento se mantiene constante. En la fase de desaceleración se hace evidente el efecto de alguno de los factores que limitan el crecimiento y en consecuencia el número de divisiones celulares disminuye, por lo que la tasa de crecimiento decrece; en este punto, la composición bioquímica de las microalgas cambia con respecto a la fase de aceleración, es decir, decrece la síntesis de proteínas y se incrementa la síntesis de productos de reserva como carbohidratos y lípidos. Durante la fase estacionaria, las condiciones del cultivo son limitantes, las tasas de crecimiento y

de mortalidad se equilibran y el número de células, peso seco total y orgánico, así como la composición bioquímica, permanecen relativamente constantes. En la última fase, la fase de muerte, la limitación de nutrientes, sumada al incremento de desechos metabólicos y a la proliferación de bacterias, ocasiona la muerte o lisis celular, por lo que la mortalidad es superior al crecimiento, la concentración celular disminuye, se registra una disminución de la biomasa y la tasa de crecimiento es negativa. (Figura 2) (Arredondo y Voltolina, 2007).

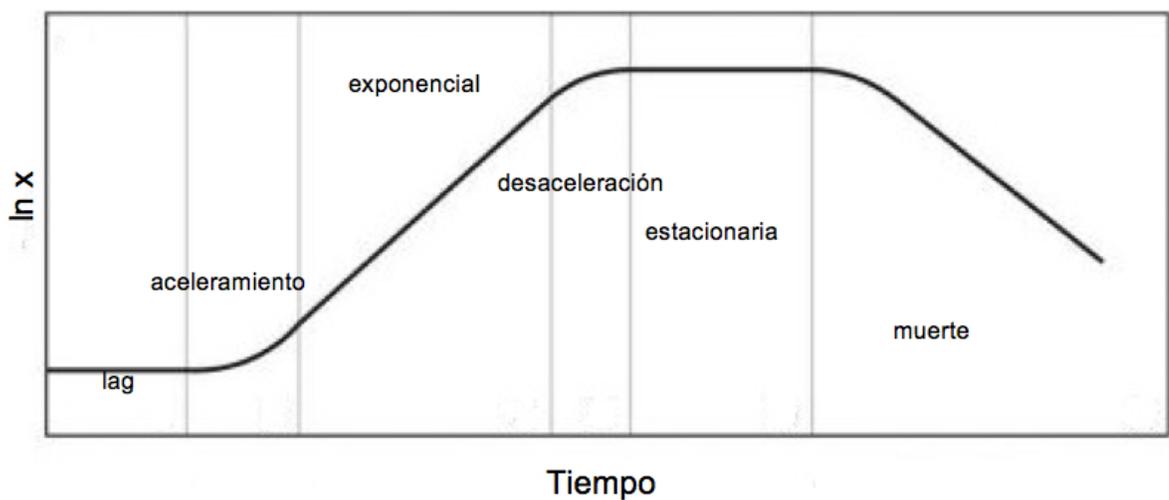


Figura 2. Curva de crecimiento típica para una población de microalgas, en la cual se indican las diferentes fases. $\ln x$ indica el logaritmo natural (base e) de la cantidad de células de microalgas en el cultivo (modificada de Arredondo y Voltolina 2007) p. 25.

1.4.1 Tipos de cultivo.

En función del tipo de cosecha, los cultivos se pueden clasificar como cultivos en lotes, cultivos continuos y cultivos semicontinuos.

En los cultivos en lote, la población algal se incrementa hasta que existe algún factor limitante, cualquier subproducto de las células durante su crecimiento estará presente en el medio de cultivo. Una vez que los recursos se hayan agotado, el cultivo muere (Barsanti y Gualtieri, 2006).

En los cultivos continuos el tamaño de la población se mantiene estable por la adición de medio nuevo, el volumen de medio nuevo es agregado

automáticamente a una tasa proporcional a la tasa de crecimiento de la microalga, mientras que el volumen equivalente es removido. Esta forma de cultivo permite mantener los cultivos en una condición cercana a la máxima tasa de crecimiento, debido a que no se agotan los nutrientes (Barsanti y Gualtieri, 2006).

El cultivo semicontinuo se define como aquel en que una fracción de la población se cosecha y se repone con medio nuevo, en un volumen equivalente al cosechado. Regularmente esta cosecha se hace cada 24 horas en la fase exponencial de crecimiento, por lo que es posible de esta manera prolongar la vida útil de los cultivos, ya que después de cada cosecha la población continúa creciendo a la misma velocidad, pues no se generan las condiciones limitantes propias de la etapa de crecimiento lento o estacionario. Aunque esta forma de cultivo prolonga la vida del cultivo, su duración es variable, ya que depende de múltiples factores, como competidores (otras microalgas y bacterias), depredadores (diferentes especies de ciliados, rotíferos y copépodos), y de la acumulación de contaminantes y metabolitos (Barsanti y Gualtieri, 2006).

1.5 Fotobiorreactores

Típicamente el cultivo de microalgas a gran escala se realiza en estanques abiertos, de gran volumen, pero a baja densidad. Una alternativa para la producción de grandes biomásas algales es el cultivo en fotobiorreactores. El término fotobiorreactor (FBR) se utiliza para denotar un sistema de cultivo semicerrado, que no permite intercambio directo de gases o contaminantes entre el cultivo algal y la atmósfera. Este sistema de cultivo promueve un ambiente protegido, relativamente a salvo de la contaminación de otros microorganismos y en el cual las variables como el pH, oxígeno, concentración de dióxido de carbono y temperatura pueden controlarse. Además previenen la evaporación, reducen el uso del agua, optimizan el uso de CO₂ y al fomentar una mayor concentración de células y mantener altas productividades, reducen los costos de producción (Barsanti y Gualtieri, 2006, Carvalho *et al.*, 2010).

Cuando el producto final del cultivo es susceptible a la degradación por microbios, la configuración semicerrada permite un mayor control de los contaminantes, permitiendo cultivos de altas densidades y reduciendo los costos de producción. Sin embargo, estos sistemas presentan algunas desventajas (Tabla 1), entre otras, se puede mencionar que la construcción y operación de estos sistemas es más costosa y técnicamente compleja, en comparación con los sistemas de cultivo convencionales en estanques. Algunos de los costos operativos más importantes de los FBR radican en la necesidad de enfriarlos, ya que la iluminación intensa, además de estimular la fotosíntesis transfiere energía calorífica; además, es necesario mantener un control estricto de la acumulación de oxígeno. Estas restricciones económicas y técnicas, han limitado el uso de los FBR para la producción de compuestos de alto valor (Barsanti y Gualtieri, 2006, Carvalho *et al.*, 2010).

Tabla 1. Cuadro comparativo de las características de los sistemas de cultivo de microalgas abiertos y cerrados (Carvalho A. P. *et al.*, 2011) p. 1280.

Característica	Sistemas abiertos	Sistemas cerrados
Relación área volumen	alta(4-10 veces mayor)	baja
Especies de algas	restringida	flexible
Criterio para selección de especie	competencia por crecimiento	resistencia al esfuerzo
Densidad de la población	baja	alta
Eficiencia de cosecha	baja	alta
Periodo de cultivo	limitado	extendido
Contaminación	posible	poco probable
Pérdidas de agua por evaporación	posible	prevenido
Eficiencia de utilización de la luz	pobre	excelente
Transferencia de gases	pobre	alta
Control de temperatura	ninguno	excelente
Variable más costosa	mezcla de agua	control oxígeno, temperatura
Capital de inversión	bajo	alto

Aunque existen diversos diseños de FBR, es difícil hacer una comparación directa de sus atributos, debido a que se utilizan distintas medidas y diseños. No

obstante, las variables importantes que se consideran en el diseño del FBR incluyen el volumen total de líquido y gas y su relación con la superficie total transparente que determina la cantidad de luz que puede entrar al FBR (Posten, 2009).

La cantidad de luz que penetra al FBR y que estimula la fotosíntesis en las microalgas depende de la razón superficie/volumen (S/V), la cual es importante cuando se quiere aumentar la productividad del FBR, procurando que todas las células reciban la mayor cantidad de luz posible (Carvalho *et al.*, 2010, Posten, 2009).

Para alcanzar una alta relación S/V, se pueden utilizar distintos tipos de FBR, de manera general se pueden clasificar en tres categorías: tubulares, planos y de tipo fermentador. Los primeros dos son reactores fotosintéticos, están especialmente diseñados para operarse bajo el sol o con alguna fuente de luz adecuada, deben propiciar una turbulencia adecuada y control en los niveles de dióxido de carbono. Deben incluir el equipamiento para la cosecha de la biomasa, pero previniendo los esfuerzos hidráulicos que puede romper las células. Además, para una producción industrial, deben ser de un volumen considerable, que ofrezca rentabilidad económica. El tipo fermentador es utilizado para realizar el crecimiento de microalgas en ausencia de luz, por lo que no es relevante la captación de luz en este sistema (Carvalho *et al.*, 2010, Posten, 2009).

La configuración de los biorreactores tubulares básicamente sigue tres criterios: a) Reactores verticales, en los que el agua se mueve con elevadores de aire; estos dispositivos se componen de un tubo vertical que es transparente, de tal manera que permita la penetración de la luz, el CO₂ se suministra mediante burbujas. Ejemplos de reactores tubulares verticales son el de "airlift" y de burbujas, regularmente contruidos con tubos de polietileno, que son suficientemente transparentes para permitir una buena penetración de la luz, pero son manufacturados con materiales comunes que los vuelvan económicos, también las bolsas de polietileno se utilizan frecuentemente en esta configuración, con la ventaja de su bajo costo, alta transparencia y que por el

proceso de fabricación se encuentran estériles. b) Reactores horizontales, que se componen de un tubo transparente, en el que usualmente se inyecta aire; y c) Reactores tubulares helicoidales, que están constituidos por tubos de plástico flexible sobre una estructura circular (Carvalho *et al.*, 2010, Posten, 2009).

Los biorreactores planos (BRP) se definen por su razón S/V; en tanto más grande es la razón mejor será la captación de luz y su distribución a las células fotosintéticas. Así, los BRP están conceptualmente diseñados para utilizar eficientemente la luz, ya sea artificial o natural. Los BRP puede tener distintos diseños (Figura 3), conservando la relación S/V. Las variables hidrodinámicas en los BRP son críticas, ya que las altas densidades de microalgas pueden propiciar una variación importante en algún factor ambiental en un plazo muy breve (de minutos a horas) ocasionando la muerte de las células y el colapso del cultivo. Por ejemplo, un exceso de aireación puede comprometer la integridad de las células, una deficiencia en el suministro de CO₂ puede ocasionar un incremento en el pH o una carencia de nutrientes puede ocasionar la muerte a las células (Carvalho *et al.*, 2010).

Otra característica de los BRP es la provisión de una zona aislada para la transferencia de gases (interfase agua-aire) que evita la contaminación y facilita la eliminación del oxígeno excedente. Los BRP se pueden disponer en un ángulo idóneo para la captación de los rayos provenientes del sol, permitiendo una mejor eficiencia, medida en términos de energía absorbida de la luz solar incidente y la biomasa producida (Carvalho *et al.*, 2010).

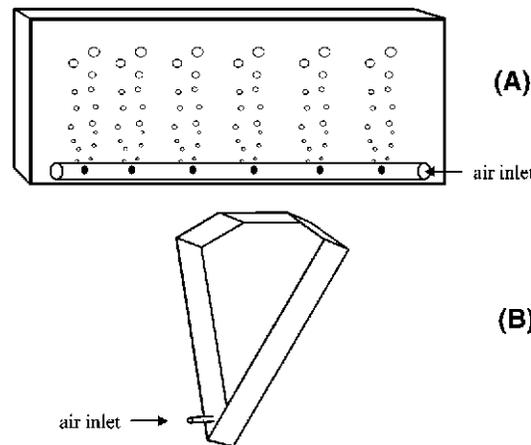


Figura 3. Representación esquemática de biorreactores planos: A, biorreactor plano con burbujeo desde la parte inferior. (Carvalho A. P. e al., 2010) p. 12.

1.6 Efectos de la intensidad y calidad de la luz en el cultivo de las microalgas

Para cultivar microalgas es importante contar con una fuente de luz con la calidad e intensidad necesarias para estimular la fotosíntesis (Carvalho *et al.*, 2011).

La calidad e intensidad de la luz se puede caracterizar por el comportamiento de los fotones. La energía E de cada fotón está definida por la expresión:

$$E = h\nu \quad (1)$$

En donde:

h = Constante de Planck (6.626×10^{-34} J S)

ν =frecuencia de la onda.

La cual puede ser reescrita como:

$$E = hc/\lambda \quad (2)$$

En donde:

c = la velocidad de la luz en el vacío ($3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$)

λ = la longitud de onda de la luz

Por tanto la energía específica es inversamente proporcional a la longitud de onda, es decir, a longitudes de onda más cortas hay mayor energía y a longitudes de onda más largas hay menor energía por fotón (Carvalho *et al.*, 2011). La Figura 4 muestra el espectro electromagnético caracterizado por el tipo de luz y color, en función de su longitud de onda, el cual puede ser emitido por una fuente de luz artificial o natural (Carvalho *et al.*, 2011).

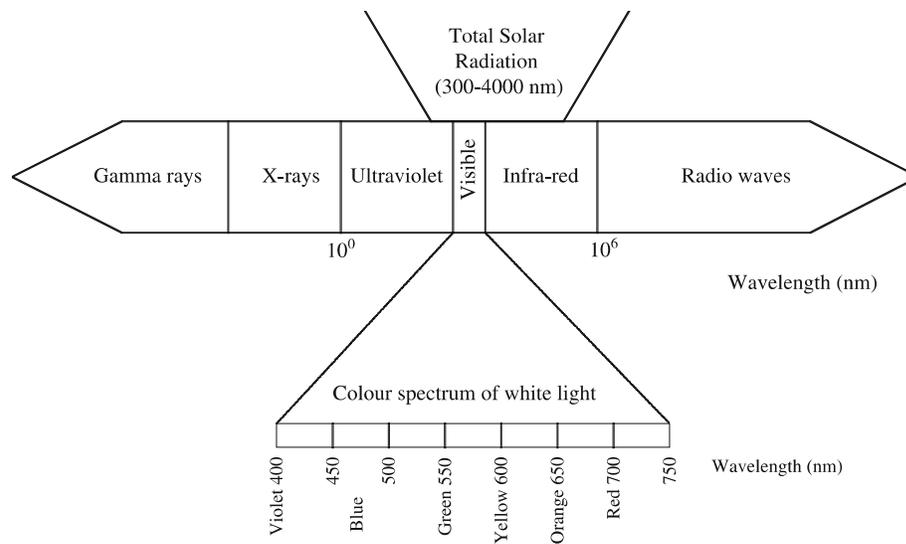


Figura 4 Espectro electromagnético, con detalle espectral en la luz visible (Carvalho *et al.*, 2011) p. 10.

La energía de la luz impulsa las reacciones fotosintéticas, en las que están involucrados los pigmentos que constituyen los fotosistemas y que se encuentran en los cloroplastos. La eficiencia fotosintética depende de la intensidad, la calidad espectral y del fotoperiodo (Carvalho *et al.*, 2011).

La intensidad de la luz es importante para la fotosíntesis, ya que la disponibilidad de la luz varía sustancialmente en función de la densidad algal, de la profundidad del cultivo y de la forma del recipiente de cultivo. En los cultivos industriales, a medida que se tienen mayores profundidades y mayores concentraciones celulares, se debe incrementar la intensidad de la luz. Sin embargo, una intensidad de luz muy alta, por ejemplo la luz solar directa o el uso de recipientes pequeños iluminados con luz artificial muy intensa, puede provocar fotoinhibición. Las intensidades que se utilizan en forma común van de los 100 a los 200 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que corresponden del 5 a 10% de la luz del día (2000 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Carvalho *et al.*, 2011).

La intensidad de la luz decrece en relación directa con respecto a la distancia de la fuente de emisión. Las células que se encuentran temporalmente más cerca de la fuente de emisión de luz, son sometidas a un alto flujo de fotones, que pueden causar fotoinhibición, mientras que las células más separadas de la fuente de luz, tienden a estar expuestas a flujos muy bajos de fotones (oscuridad) que causan fotolimitación. Por otro lado, cuando las células se mueven con una frecuencia adecuada entre las zonas que están óptimamente y pobremente iluminadas, pueden incrementar su productividad. En consecuencia, la productividad y desempeño de los biorreactores depende principalmente del movimiento de las células, así como de los parámetros de transporte, cinética fotosintética y de la irradiancia (magnitud utilizada para describir la potencia de todo tipo de radiación incidente por unidad de superficie) (Hu-Ping *et al.*, 2003).

La mayoría de los materiales absorben cierta longitud de onda de la energía radiante que reciben. Un pigmento es cualquier compuesto que absorbe la luz en longitudes de onda específicas y exhibe un color distintivo. En los organismos fotosintéticos, los pigmentos, como la clorofila, tienen la propiedad de absorber la energía de la luz en determinadas longitudes de onda y producir ATP y NADPH, que se utilizan para la síntesis de azúcares y otros compuestos orgánicos (Carvalho *et al.*, 2011).

En las microalgas, la biosíntesis de los compuestos orgánicos como carbohidratos, proteínas y lípidos, se lleva a cabo mediante la energía química del NADPH_2 y el ATP producidos durante la fase luminosa de la fotosíntesis, en la que la clorofila y otros pigmentos accesorios absorben la energía de la luz y la transfieren en forma sucesiva a los pigmentos P680 y P700 de los centros de reacción de los fotosistemas II y I respectivamente, esta energía se utiliza para reducir el NADP^+ a partir del agua (Figura 5) (Das *et al.*, 2011).

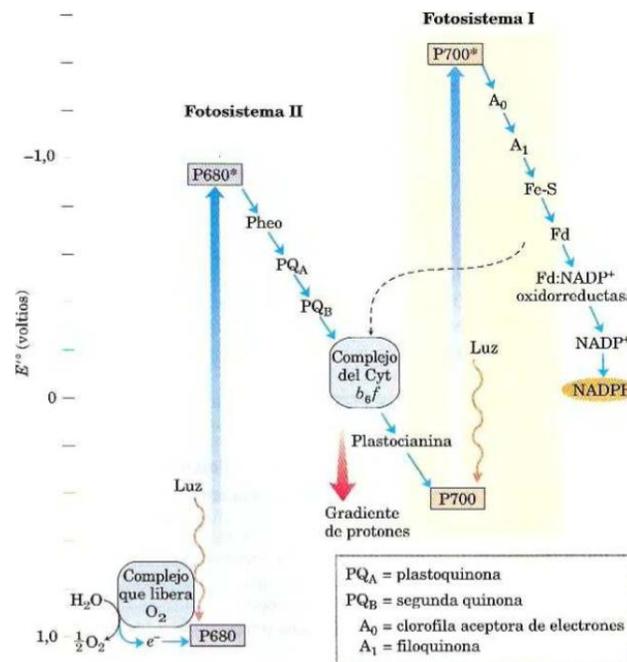


Figura 5. Integración de los fotosistemas I y II en los cloroplastos de las microalgas (Nelson y Cox, 2005) p. 652.

La posición de cada transportador de electrones es un reflejo de su potencial de reducción estándar. Para elevar la energía de los electrones provenientes del H_2O y generar el potencial para reducir el NADP^+ , cada electrón debe ser excitado dos veces mediante la energía de los fotones captados por los fotosistemas II y I. Se requiere un fotón por cada electrón elevado en cada fotosistema. Después de la excitación, los electrones fluyen cuesta abajo a través de la cadena de transportadores. Durante la reacción de escisión del agua y durante la transición de los electrones a través del complejo del citocromo b_6/f , en

forma acoplada se transportan protones a través de la membrana del tilacoide, produciendo el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de NADPH (Nelson y Cox 2005).

Si se considera la energía electromagnética que emana del sol, únicamente la fracción de 400 a 700 nm del espectro es utilizado para la fotosíntesis, donde 8 fotones de luz de una longitud de onda promedio de 550 nm (luz verde) tiene la energía mínima necesaria para la síntesis de carbohidratos. Un solo fotón de luz verde tiene 20% más energía que un fotón rojo (680 nm) y 15.5% menos energía que un fotón azul (470 nm). Por lo tanto para igualar la energía de la luz verde necesaria para sintetizar carbohidratos, se necesitan 10 fotones rojos y 7 fotones azules (Das *et al.*, 2011). La luz es necesaria para lo fotosíntesis, sin embargo un exceso o un déficit de luz compromete el desarrollo óptimo de las microalgas, reduciendo el incremento de su biomasa y la producción de metabolitos.

En la Figura 6 se muestra la irradiancia típica de tres tipos de luz y se indica la ubicación de los picos de absorción de las clorofilas a y b (Wyszecki y Stiles, 1966). En relación con el funcionamiento de los BRP y la forma en la que las microalgas aprovechan la luz, es importante mencionar que la actividad fotosintética cambia en función de la posición de las células dentro del BRP. Tomando como referencia la superficie expuesta a la luz, en la capa inmediatamente expuesta a la superficie iluminada pueden ocurrir procesos de fotoinhibición, mientras que en las capas adyacentes más profundas, a unos pocos centímetros de distancia de la superficie iluminada, el efecto del sombreado ocasionado por las propias microalgas puede ocasionar fotolimitación (Carvalho *et al.*, 2011).

Debido a que en su ambiente natural las microalgas están sujetas a cambios rápidos de intensidad de la luz con respecto al tiempo, tienen la capacidad de fotoaclimatarse (Carvalho *et al.*, 2011); este proceso consiste en una serie de cambios biofísicos, bioquímicos y fisiológicos que les permiten a las células algales optimizar el uso de la luz disponible. Una exposición a un exceso de luz puede causar daño, esto depende en cierto grado del estado de

fotoaclimatación en el momento previo a la exposición a altas intensidades de luz. Si la aclimatación no es suficiente, una radiación moderada puede ocasionar más daño que una radiación intensa en células aclimatadas en forma adecuada. Por esta razón, las microalgas se deben aclimatar en forma gradual a las condiciones de luz en las que van a ser cultivadas. Así, si el inóculo es muy pequeño (baja densidad celular), la radiación debe ser pequeña, en caso contrario, las células resultarán dañadas, lo que provocará el colapso de la población (Carvalho *et al.*, 2011).

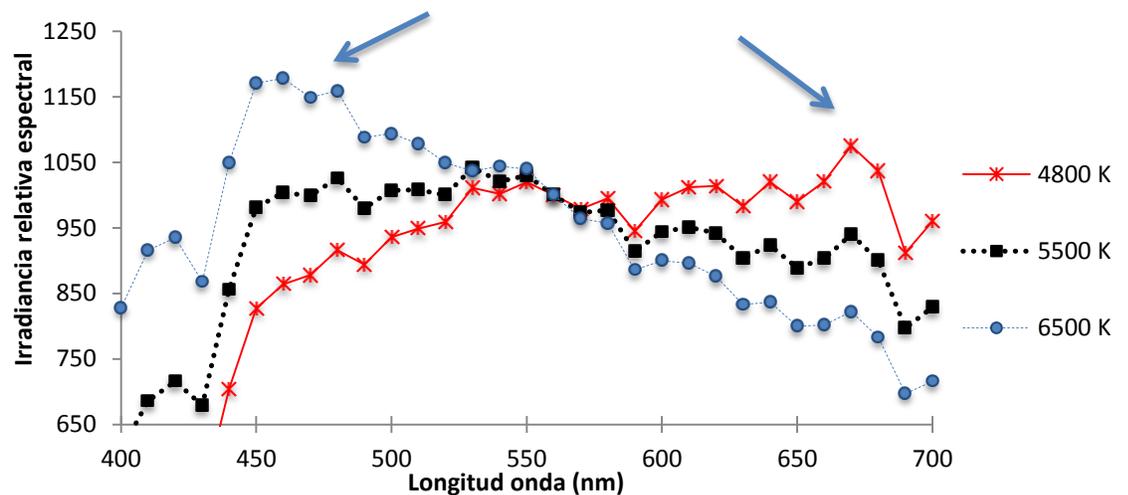


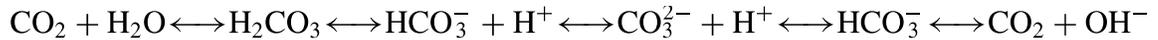
Figura 6. Irradiancia espectral relativa en el espectro electromagnético visible para la luz de tres temperaturas, 4800°K, 5500°K y 6500°K. Las flechas indican los picos de absorción de las clorofilas a y b. Datos tomados de Wysecki y Stiles, (1966).

1.7 Oxígeno y dióxido de carbono

Los ciclos del oxígeno y del dióxido de carbono están relacionados estrechamente, porque están directamente asociados a la fotosíntesis y a los procesos respiratorios. El ciclo del oxígeno está relacionado con la respiración aeróbica, que utiliza como sustratos a la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, como un aceptor de electrones y protones al oxígeno, para producir agua como residuo metabólico; a la par, se produce dióxido de carbono. En contraposición, la fotosíntesis utiliza el dióxido de carbono, agua y energía de la luz para producir

carbohidratos y oxígeno molecular como un subproducto (Barsanti y Gualtieri, 2006).

El dióxido de carbono atmosférico se disuelve en el océano y se combina con el agua y forma ácido carbónico, iones de bicarbonato y carbonato, en función de la siguiente ecuación (Barsanti y Gualtieri, 2006):



Estos iones son especies químicas del dióxido de carbono presentes en el agua, y especialmente el bicarbonato representa la mayor proporción del dióxido de carbono disuelto en el agua de mar.

Cuando el CO_2 es utilizado por las microalgas, la reacción en la ecuación transcurre hacia la generación de CO_2 , por lo que se consumen H^+ y se incrementa el pH. Cuando se agrega CO_2 , ya sea por la respiración o porque se agrega desde el exterior (de origen atmosférico), la reacción transcurre en el sentido opuesto y el número de H^+ se incrementa, disminuyendo el pH. Esta disponibilidad de CO_2 en el medio, beneficia la producción de biomasa algal (Barsanti y Gualtieri, 2006).

1.8 Turbulencia

La turbulencia es una medida de la falta de orden en el movimiento de un fluido, por efecto de la adición de energía mecánica (Reynolds, 2006). Si se considera una columna de agua totalmente estática (Figura 7a) en la que su superficie se somete a una fuerza en dirección horizontal con respecto a su superficie (Figura 7b), entonces las moléculas de agua en la interfase agua-aire serán empujadas en la dirección de la fuerza. Subsecuentemente, el movimiento será transmitido de la capa superior a las capas inferiores, que a su vez se comenzarán a mover, aunque a menor velocidad; este proceso continuará hasta llegar a un punto en el que se deslizan homogéneamente una debajo de la otra, en lo que se llama flujo laminar (Reynolds, 2006).

Si la fuerza aplicada se incrementa sustancialmente, entonces, las moléculas de la capa superficial se moverán con mayor velocidad adquiriendo mayor inercia, lo que ocasionará que el flujo ordenado se rompa (Figura 7c). El movimiento de las capas subyacentes se desordenará en una serie de giros y remolinos, lo que resultará en un flujo turbulento (Reynolds, 2006).

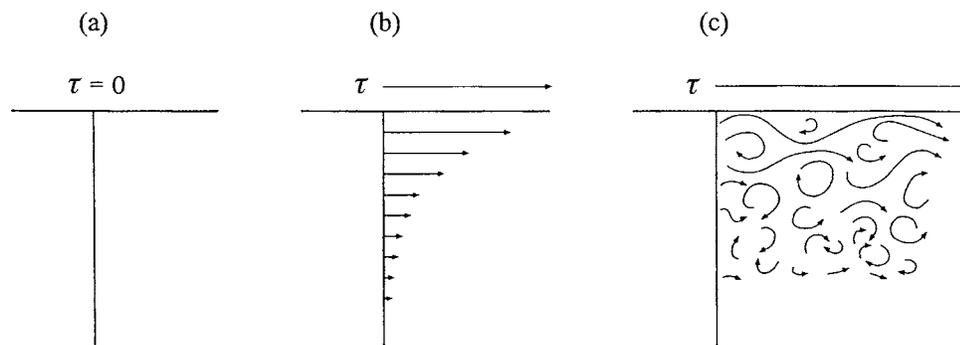


Figura 7. Generación de turbulencia por una fuerza tangencial. (a) El agua debajo de la horizontal se encuentra en reposo. (b) Una fuerza media aplicada en forma superficial arrastra las moléculas de agua en la dirección de la fuerza, en forma proporcional con respecto a la dirección vertical descendente. (c) La energía transferida de una fuerza intensificada, crea un caos promoviendo la turbulencia (Reynolds, 2006) p. 342.

El movimiento de las células en un biorreactor está controlado por la hidrodinámica y los patrones de flujo en su interior (Hu-Ping *et al.*, 2003). En los cultivos de microalgas, la turbulencia es necesaria para prevenir la sedimentación de las células, para asegurar que todas las células de la población estén igualmente expuestas a la luz y que los nutrientes se distribuyan homogéneamente entre todas las células, para evitar la estratificación de la temperatura y para incrementar el intercambio gaseoso entre el agua o medio de cultivo y el aire. También es de vital importancia considerar el balance de los gases disueltos, debido a que en los cultivos densos, la tasa de consumo usualmente supera la tasa de disolución de CO_2 atmosférico, limitando el crecimiento algal, entonces es necesario suministrar CO_2 , inyectándolo directamente en el medio de cultivo (Reynolds, 2006).

La forma en la que se genera la turbulencia depende del tipo de recipiente donde se hace el cultivo. Así, los recipientes pequeños se pueden agitar manualmente y lo mínimo que se necesita es la mezcla manual una vez por día. En el caso de los recipientes grandes, mayores a 5 litros, se puede generar turbulencia con la inyección de aire, o utilizando paletas de mezcla y bombas. Es importante considerar las características de la microalga que se desea cultivar cuando se utiliza un flujo turbulento, ya que no todas las especies toleran una mezcla vigorosa, debido a que las burbujas de aire o la fricción con dispositivos mecánicos, pueden ocasionar daño celular (Barsanti y Gualtieri, 2006).

En un cultivo de microalgas, la concentración de oxígeno disuelto, resultante de la fotosíntesis, se puede incrementar considerablemente hasta sobresaturar el medio. Esta condición provoca que el metabolismo de las microalgas cambie a fotorespiración, para utilizar el exceso de oxígeno en el medio. Los subproductos de las reacciones para generar energía se vuelven más costosos energéticamente, lo cual afecta directamente el crecimiento algal. La enzima RUBISCO, se encarga de las reacciones CO_2 -RuBP, es decir de catalizar las reacciones relacionadas con la concentración del CO_2 y O_2 en el medio. Esta enzima se ve inhibida por bajas concentraciones de CO_2 ($<10\mu\text{M}$) y altas concentraciones de O_2 ($>400\mu\text{M}$), iniciando una reacción alterna que provoca la formación de 3-fosfato glicerato(G3P). En estos casos actúa lo que se llama fotorespiración, modificando la fuente de energía, siendo esta mas costosa para las células y obteniendo como subproducto el G3P, para posteriormente transformarse en ácido glicólico y ser desechado al medio. (Reynolds, 2006).

Una forma de evitar el incremento en la concentración de oxígeno y sus efectos nocivos sobre la fotosíntesis, consiste en controlar la turbulencia y de esta manera aumentar la disipación de este gas en la interfase agua-aire. En los cultivos con altas densidades, es necesario un flujo turbulento (Brown, 2002).

1.9 Cultivos de *Nannochloropsis* sp. en biorreactores

Los cultivos de *Nannochloropsis* sp. se hacen en distintas formas: a) en bolsas de polietileno o columnas de fibra de vidrio de 400 a 800 l, ya sea en forma continua o semicontinua; b) en estanques redondos o rectangulares con volúmenes muy diversos, de 8000 a 300,000 l y a la intemperie; y c) en estanques de flujo rápido (Cheng-Wu *et al.*, 2001). Estas categorías de producción tienen diversas desventajas, una de las más notables se refiere a las concentraciones celulares relativamente bajas, lo que se traduce en altos costos de producción, ya que después de la cosecha, es necesario concentrar la biomasa, lo que requiere de la utilización de procesos costosos. Otra desventaja de este tipo de cultivos es el alto riesgo de contaminación por otras especies de microalgas y/o microorganismos, que se traducen en la disminución de la producción (Cheng-Wu *et al.*, 2001).

En los sistemas de cultivo abiertos, la variabilidad ambiental influye en gran medida impactando en forma negativa la dinámica poblacional de las microalgas, de forma que la cantidad de microalgas puede disminuir en forma sensible. Por último, pero no menos importante, se requieren grandes extensiones de terreno para igualar la producción de microalgas que se consigue con sistemas de producción de alta densidad celular (Cheng-Wu *et al.*, 2001).

En contraste con los cultivos a bajas densidades, los cultivos de *Nannochloropsis* sp. en altas densidades tienen claras ventajas que se traducen en: a) la eliminación de la etapa de concentración, ya sea que las microalgas se dediquen a la alimentación de rotíferos o a otros usos; b) los cultivos monoalgales en alta densidad se desarrollan mejor; c) la productividad es más estable que en los sistemas abiertos, ya que están menos expuestos a la variabilidad ambiental diaria y estacional de la temperatura; d) los costos de producción se reducen, ya que se requiere una menor cantidad de nutrientes, una menor superficie de cultivo y un menor volumen de agua, en consecuencia, se requieren reactores de menor tamaño y con un menor volumen de cultivo (Cheng-Wu *et al.*, 2001).

1.10 Antecedentes

1.10.1 Cultivo en biorreactores

Recientemente, los sistemas tubulares de cultivo que producen densidades relativamente altas están disponibles comercialmente, pero son relativamente costosos comparados con los estanques abiertos. En un intento para desarrollar una metodología menos costosa, Cheng-Wu *et al.*, (2001) desarrollaron un BRP de vidrio, que puede contener de 500 a 1000 l por unidad. Uno de los atributos de este biorreactor es que por su diseño plano, tienen prácticamente toda su superficie iluminada, lo cual se traduce en una alta productividad. Utilizando una tasa diaria de recambio del 10 al 20 %, pueden producir una biomasa de 0.15 a 0.27 g l⁻¹ día⁻¹ con una densidad de 155 a 691x10⁶ células ml⁻¹, dependiendo de la estación del año ya que utilizan la luz solar como fuente de iluminación. El costo de inversión para un BRP de 2000 l excluyendo la infraestructura fue de \$8130 dls y el costo de producción de un BRP de 200 l fue de \$72.82 dls/kg de peso seco.

1.10.2 Efectos de la calidad e intensidad de la luz sobre el crecimiento de las microalgas

La distribución espacial de la intensidad de la luz en el interior del biorreactor es influenciada por su geometría y por la atenuación de la luz ocasionada por el sombreado que producen las células en las capas más cercanas a la superficie iluminada, que a su vez es una consecuencia de la alta eficiencia con la que los pigmentos absorben la luz. A partir de modelos matemáticos se han calculado los gradientes de luz en un sistema de partículas sólidas (ausentes de transparencia) y se ha observado que la penetración de la luz se reduce exponencialmente en función de su densidad (Hu-Ping *et al.*, 2003). En un BRP la reducción la intensidad de la luz sigue un comportamiento exponencial negativo, que está en función de la biomasa. Si la penetración de la luz excede el grosor del biorreactor se puede observar un crecimiento exponencial de las microalgas, pero el exceso de luz puede ocasionar fotoinhibición. En cuanto

a los espacios oscuros, donde las microalgas no pueden crecer, una solución es reducirlos en forma drástica, incrementando la relación superficie/volumen. De esta forma, si se requieren altas densidades (mayores a 10 g/l) el BRP debe ser lo más estrecho posible (Posten, 2009).

Hu-Ping *et al.*, (2003) utilizaron el análisis de la dinámica de partículas radiactivas para caracterizar la turbulencia en un biorreactor cilíndrico, cuantificaron el campo de velocidades los perfiles de velocidad y la irradiancia. Observaron que la densidad algal afecta significativamente el flujo de fotones y que el periodo de luz-oscuridad para las microalgas puede ser modificado mediante la adición de separaciones dentro del BRP que contribuyen a estabilizar u orientar el flujo de partículas en un patrón particular, que puede propiciar una mejor distribución de la luz.

En la selección del tipo de luz es importante considerar tanto la intensidad como la calidad, en este sentido, Das *et al.* (2011) observaron que en *Nannochloropsis* sp., el crecimiento depende del color de la luz, en orden de mayor a menor crecimiento, obtuvieron mejores resultados con lámparas de tipo azul, blanca, verde y roja. Cheirsilp y Torpee (2012) evaluaron el efecto de diferentes intensidades de luz, entre 27 y 135 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y observaron que *Nannochloropsis* sp. incrementó gradualmente su crecimiento hasta un máximo de 35 g/l de peso seco (Figura 8) con una intensidad de luz de 135 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (10,000 lux). El análisis de la composición lipídica indicó que el incremento de la intensidad de la luz se correlaciona negativamente con el contenido de lípidos, por lo que con intensidades de luz bajas se acumulan una mayor cantidad de lípidos (Figura 8). Yamasaki e Hirata (1995) cultivaron *Nannochloropsis* sp. con una intensidad de luz de 195 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y mencionan que es indispensable una fuente suficiente de carbono para obtener altas densidades con altas intensidades de luz.

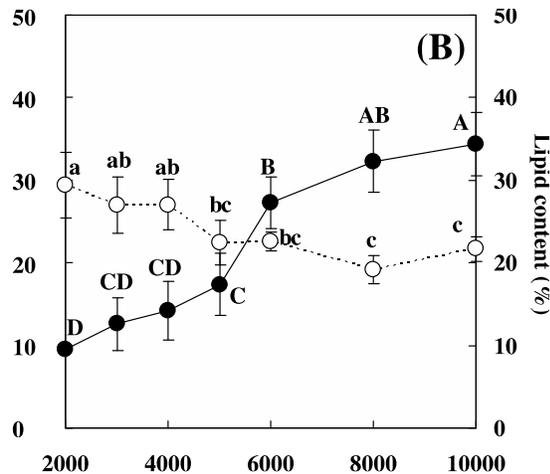


Figura 8. Efecto de la intensidad de la luz (lux) en el crecimiento, peso seco g/l (círculo relleno) y contenido lipídico (círculo abierto) de *Nannochloropsis* sp. (Cheirsiip y Torpee, 2012) p. 513.

1.10.3 Efectos de la tasa de inyección de aire sobre el crecimiento de las microalgas

La geometría del FBR determina el patrón de flujo en el interior y con esto la exposición de las células a la luz y por tanto condicionan el movimiento de las células y su crecimiento (Hu-Ping *et al.*, 2003). En los biorreactores tubulares de columna, el agua se mueve por el efecto del aire que se inyecta y por lo tanto la circulación es caótica, en contraste, en los biorreactores en los que se agrega una división, se genera un flujo ascendente y descendente en el que el movimiento de las partículas (células) es más ordenado, lo que se traduce en una exposición con una rápida alternancia entre la luz y la oscuridad. Un periodo prolongado de oscuridad puede afectar negativamente el crecimiento de las células, pero una regulación adecuada del tiempo que las células permanecen en oscuridad puede ser útil para incrementar la productividad, ya que excita a los fotosistemas adecuadamente (Hu-Ping *et al.*, 2003).

Hu-Ping *et al.* (2003) encontraron que algunos de los efectos que provoca la turbulencia (producto de la aireación) son la remoción del oxígeno y la disolución y distribución del CO₂ y los nutrientes, lo cual es indispensable en cultivos densos. En cualquier tipo de reactor, la tasa de aireación determina la fluctuación de la exposición a luz, pero también la mezcla y la turbulencia del

fluido. Sin embargo, altas tasas de aireación ocasionan esfuerzos cortantes que pueden dañar las microalgas, por esta razón, es necesario evaluar su efecto para cada especie de microalga.

El uso de altas tasas de aireación en los cultivos de microalgas, permite que cuando las células están expuestas a la luz, acumulen energía química (NADPH) y que la puedan utilizar posteriormente durante los periodos de oscuridad. Esta exposición alternante de las células se denomina efecto de destello (“flash”). Las tasas de aireación mayores pueden beneficiar el crecimiento, sin embargo, se debe evaluar el costo-beneficio, ya que una rápida mezcla involucra una mayor inversión de energía mecánica, y en consecuencia un aumento en los costos de producción.

Es importante considerar variables como la intensidad de la luz y la turbulencia, entre otras, en los cultivos de microalgas, ya que favorecen o perjudican directamente en el crecimiento de las poblaciones de microalgas en los cultivos en BRP.

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo General

Evaluar el crecimiento y productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp. cultivada en un fotobiorreactor plano, expuesto a diferentes intensidades de luz y a la turbulencia ocasionada por diferentes tasas de inyección de aire.

1.11.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la turbulencia ocasionada por tres tasas de inyección de aire (3, 7 y 10 L/min) en la tasa de crecimiento y la densidad del cultivo de *Nannochloropsis* sp.
2. Evaluar el efecto de tres intensidades de luz (282, 116 y 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la tasa de crecimiento y la densidad del cultivo de *Nannochloropsis* sp.
3. Evaluar la productividad la microalga *Nannochloropsis* sp. cultivada en un biorreactor plano, considerando la eficiencia de la utilización de la luz.
4. Evaluar los costos de producción de *Nannochloropsis* sp. en un biorreactor plano.

1.11.3 Hipótesis

El crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp. cultivada en un fotobiorreactor plano se ven afectados positivamente por la tasa de inyección de aire y por la intensidad de la luz.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Cultivo de inóculos

La cepa de *Nannochloropsis* sp. se obtuvo de la colección de microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Las cepas adquiridas se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 150 ml con medio "f" de Guillard y Ryther (1962) y en condiciones controladas de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), salinidad (35 ‰) y pH (8). Los cultivos se irradiaron con luz fluorescente a una intensidad de $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando lámparas de 32W y 6500°K.

Para obtener la biomasa de microalgas necesaria para los experimentos, se procedió a realizar el cultivo escalonado desde el matraz Erlenmeyer hasta botellones de vidrio de 19 L (con un volumen útil de 15 L). En cada etapa del proceso de escalamiento, los cultivos se inocularon a una densidad de 2.5×10^6 células ml^{-1} y se cultivaron hasta obtener 30×10^6 células ml^{-1} . A partir del primer botellón cultivado siguiendo este procedimiento, se inocularon nueve botellones y cuando los cultivos tuvieron la biomasa necesaria, se inocularon en los nueve BRP, también a una densidad inicial de 2.5×10^6 células ml^{-1} . Cabe aclarar que este procedimiento se repitió dos veces, una para el experimento de intensidad de luz y otra para el de turbulencia.

2.2 Descripción del sistema de cultivo.

Se diseñaron y construyeron nueve BRP de 110 cm de largo por 110 cm de alto y 10 cm de ancho, con un volumen útil de 110 L. Cada BRP estuvo provisto de una tapa, de esta forma se redujo la posibilidad de contaminación del cultivo.

El sistema de cultivo experimental constó de dos secciones, la de tratamiento de agua y los biorreactores (Figura 9).

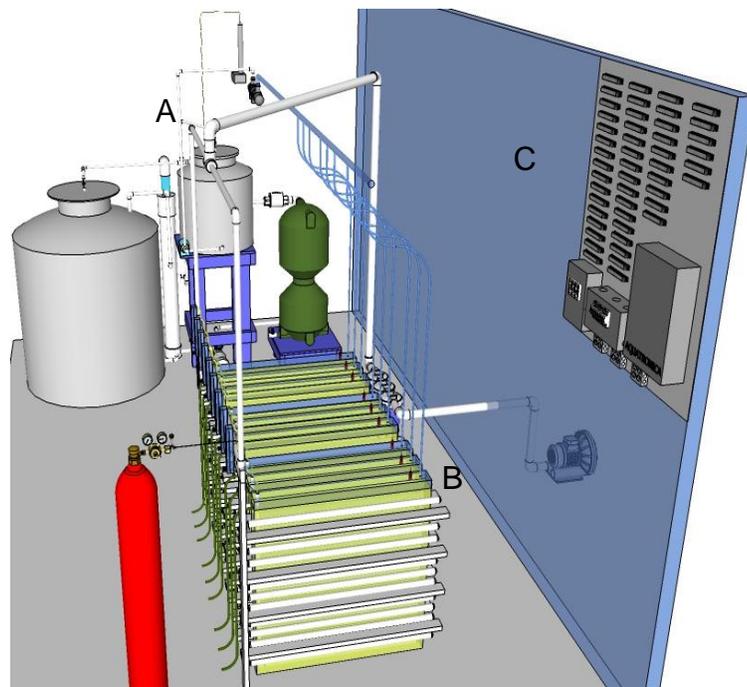


Figura 9. Esquema del sistema de cultivo de BRP para microalgas (A) Sistema de esterilización de agua de mar (B) Sistema de biorreactores (C) Controladores de pH y transformadores eléctricos para la iluminación.

El sistema de esterilización del agua consistió de un filtro biológico, un fraccionador de espuma, un generador de ozono y mediante luz UV (Figura 10). El agua esterilizada por este método se inyectó a cada uno de los BRP y posteriormente se adicionó una solución concentrada de nutrientes (ProLine® F/2 Algae Feed), en un volumen suficiente para que al diluirse en el volumen de agua de mar, se obtuviera una concentración correspondiente al medio “f” de Guillard y Ryther (1962).

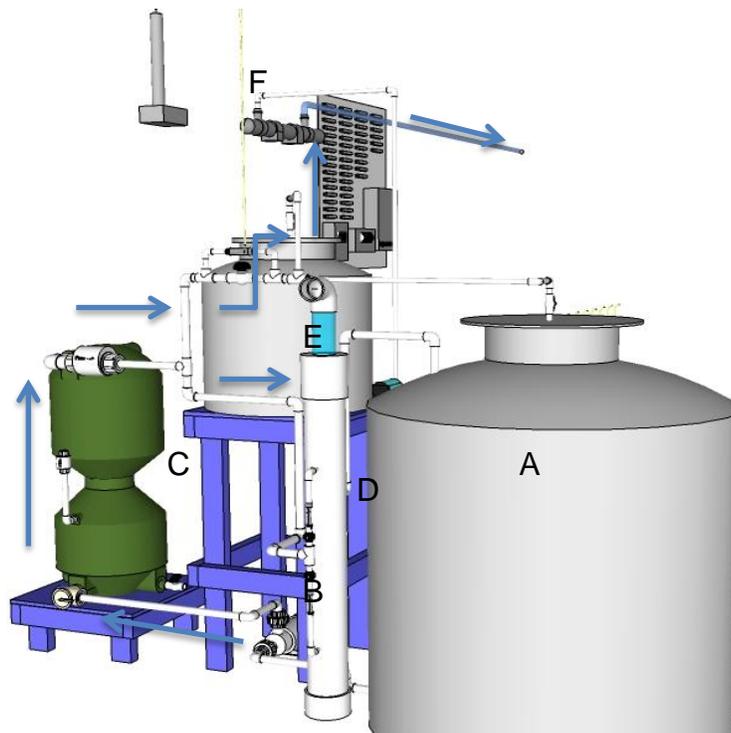


Figura 10. Sistema de filtración de agua de mar para el suministro hacia los BRP. (A) Depósito de agua de mar primario (B) Bomba para agua de mar (C) Biofiltro (D) Fraccionador de espuma (E) Depósito secundario de agua de mar (F) Generador de ozono y lámpara U.V.

El aire para los BRP se generó con una turbina de baja presión de 1 hp. Para evitar contaminación del cultivo a través del aire, antes de inyectarlo a los BRP se filtró mediante cartuchos de 10, 5 y 1 μm . Para regular el flujo de aire hacia cada BRP, se utilizó un medidor de flujo (± 1 LPH) (Figura 11). El aire se introdujo a través de un tubo de cpvc de 1.27 cm de diámetro y se inyectó a través de diez perforaciones de 1 mm de diámetro, distribuidas cada 10 cm a lo largo del tubo, que se dispuso en forma horizontal a 3 cm del fondo de cada BRP.

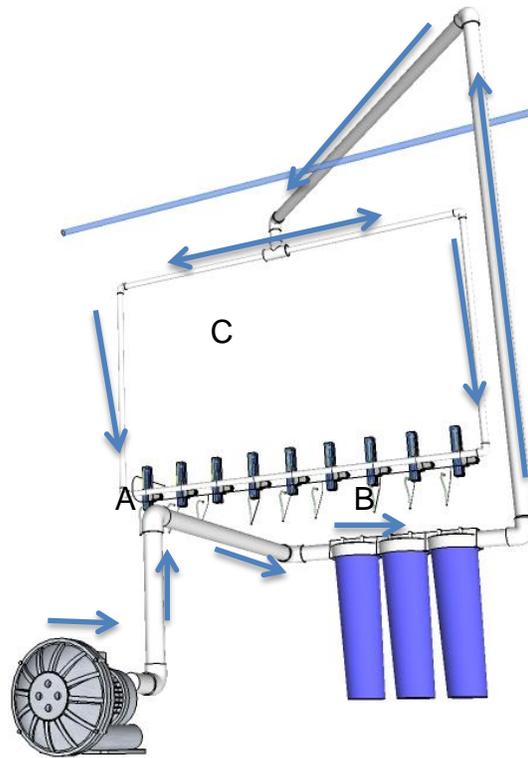


Figura 11. Red de suministro de aire para los BRP. (A) Turbina de aire (B) Cartuchos con filtro de aire (c) Flujómetros de aire.

La fuente de carbono para el crecimiento celular es el bicarbonato (HCO_3), cuya concentración en el agua de mar depende de la inyección de CO_2 y que a su vez modifica el pH, de tal forma que un déficit o un exceso de CO_2 provocan un aumento o una disminución del pH respectivamente. Para controlar la concentración de bicarbonato, la inyección de CO_2 a cada biorreactor se controló con un sistema automático (Aquatronica, modelo ACQ110). El CO_2 se inyectó a través de un difusor de cerámica, el flujo del gas se controló con una válvula solenoide conectada al sistema de control, cuya apertura y cierre dependía de un sensor de pH colocado en el interior de cada biorreactor (Figura 12). El cultivo se mantuvo a un pH estable de 7.5.

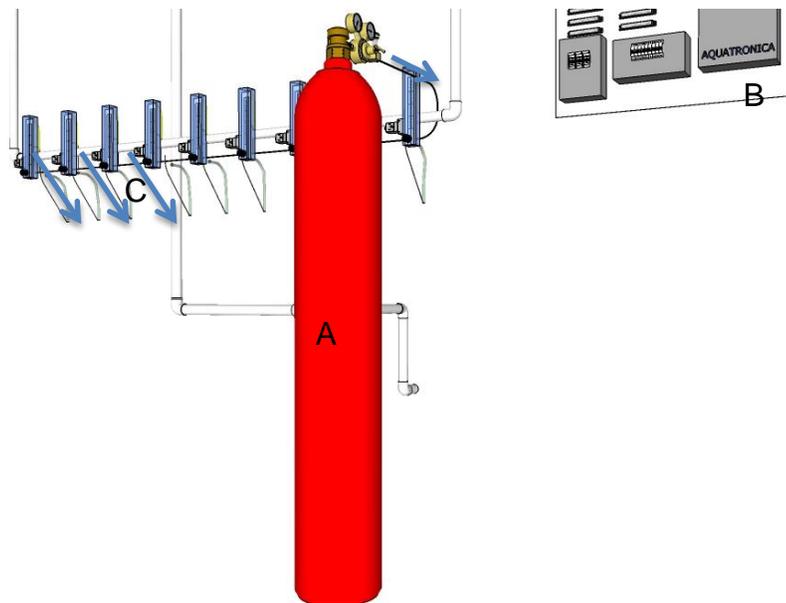


Figura 12. Sistema de control y suministro de CO₂ para los BRP. (A) Tanque de CO₂ (B) Sistema de control aquatronica (C) Válvulas solenoides.

2.3 Preparación de los BRP

Antes de iniciar los cultivos de *Nannochloropsis* sp., los BRP y todos sus accesorios (mangueras, tubos de aireación, difusor de CO₂) se lavaron con jabón para laboratorio (Alconox) y se enjuagaron con agua corriente. A continuación, cada BRP se llenó totalmente con agua de mar del sistema de tratamiento antes descrito y se procedió a su desinfección con una solución comercial de hipoclorito de sodio a una concentración de 3 ml l⁻¹ de agua de mar durante 24 horas. Al día siguiente, el cloro residual se neutralizó con 150 mg de tiosulfato de sodio por litro de agua durante 24 horas (Paniagua *et al.*, 1989). Entonces, se eliminó un volumen de agua ajustándolo a 90 l, lo que permitió la incorporación del inoculo de microalgas, que se agregó a través de la tubería que se colocó para la cosecha, de esta forma la concentración inicial fue de 2.5x10⁶ células ml⁻¹.

A partir del momento en que el cultivo alcanzó la etapa final de la fase de crecimiento exponencial, cada día se cosechó un volumen equivalente al 11% del volumen total del cultivo. El volumen removido se repuso con agua de mar esterilizada y enriquecida con nutrientes a una concentración equivalente al medio "f".

2.4 Efecto de la tasa de inyección de aire

Para evaluar el efecto de la turbulencia sobre la tasa de crecimiento (μ) la densidad celular (cél/ml), el peso seco total y peso orgánico y el contenido de cenizas de *Nannochloropsis* sp., se evaluaron tres tasas de inyección de aire, 3, 7 y 10 l h⁻¹ (Figura 13), cada una por triplicado. La tasa de inyección de aire que promovió un mayor crecimiento de la población de microalgas se utilizó para el siguiente experimento, en el que se evaluó el efecto de la intensidad de la luz.

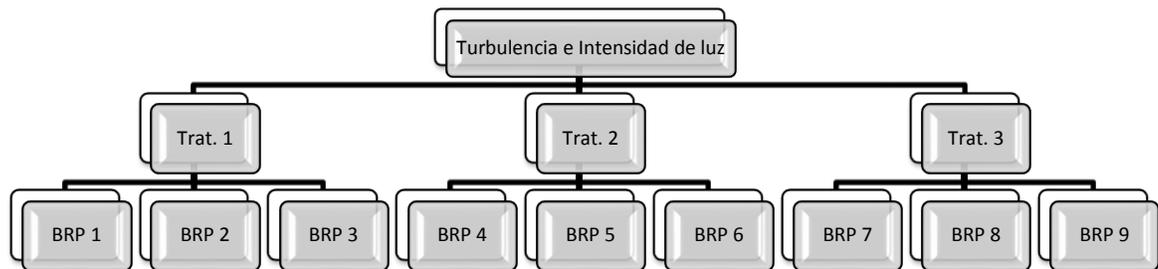


Figura 13. Diseño del experimento como variable tres flujos de aire Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹ y tres intensidades de luz Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.5 Efecto de la intensidad de la luz

Para evaluar el efecto de la intensidad de la luz sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp., se hizo un experimento con tres niveles de radiación (Figura 13), utilizando conjuntos de 6, 8 y 10 lámparas fluorescentes de 32 vatios y 6500°K (Figura 14). Cada biorreactor se irradió por cada una de sus caras de forma continua durante el periodo de 30 días que duró el experimento. Para caracterizar las condiciones de cada tratamiento, en cada biorreactor se midieron las intensidades de luz, mediante un radiómetro marca Biospherical Instruments modelo QSL 100 y se expresaron en $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, las medidas se hicieron en el interior del BRP lleno de agua de mar, a 10 cm de la superficie del agua dentro del biorreactor y a cinco cm de las paredes, de esta manera se cuantificó la cantidad de luz que recibieron las microalgas en un mismo punto para cada tratamiento. Las irradiancias para cada tratamiento fueron 282 (tratamiento 1), 116 (tratamiento 2) y 91 (tratamiento 3) $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para describir el efecto de

la luz sobre las microalgas se evaluaron la densidad celular (cél/ml), el peso seco total y orgánico y el contenido de cenizas.

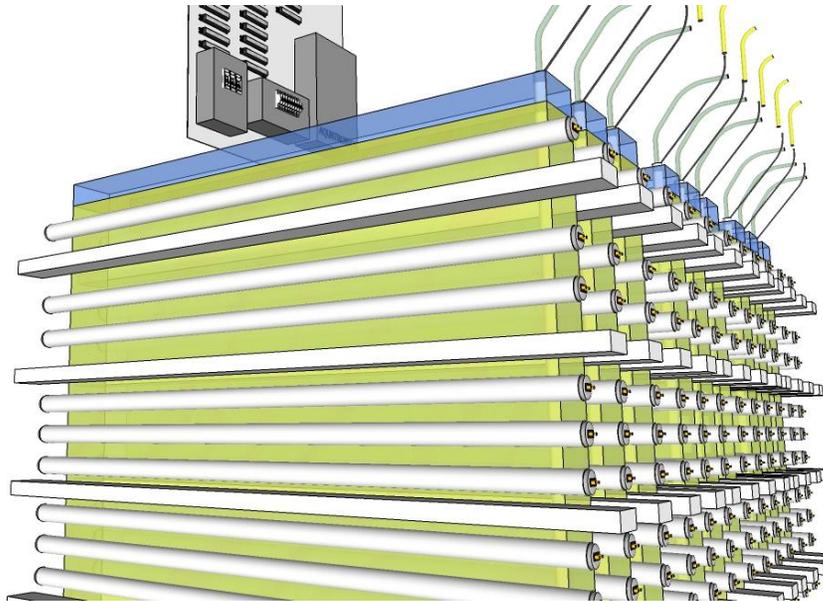


Figura 14. Disposición de las lámparas fluorescentes en los biorreactores planos, se indican los soportes cuadrangulares distribuidos entre las lámparas.

2.6 Registro de variables ambientales

Durante el desarrollo de los experimentos de turbulencia e intensidad de la luz, se hizo un registro continuo del pH y la temperatura ambiental con el sistema Aquatronica, modelo ACQ110. Cada día se tomó una muestra del cultivo e inmediatamente se midieron el oxígeno disuelto y la temperatura con un analizador YSI (Modelo 85).

2.7 Evaluación de la biomasa producida

Para evaluar la productividad de los biorreactores se cuantificó la densidad celular y el peso seco. Para cuantificar el número de células, diariamente se tomó una alícuota de cada uno de los nueve biorreactores, se utilizó una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad marca Hausset Scientific y con la ayuda de un microscopio se contaron las células utilizando una dilución adecuada.

La cantidad de células se calculó con la siguiente fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil \quad (4)$$

En donde:

C = cél/ml

N= promedio de células presentes en 1 mm³

dil=factor de dilución

10⁴ =Factor de conversión mm³ a ml

Con el propósito de cuantificar el peso seco en la etapa de cosechas diarias, cuando el cultivo se mantuvo en una densidad estable, se tomaron alícuotas cada 2 días, se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio de 0.7 µm de retención de partículas y de 47 mm de diámetro (previamente lavados e incinerados en una mufla a 490°C y pesados), y se lavaron con formiato de amonio al 3% para eliminar las sales. Los filtros con la muestra se colocaron en una estufa a 60°C por 24 horas para obtener el peso seco constante. Los filtros se incineraron en una mufla a 490°C y por diferencia entre el peso entre el filtro vacío y el filtro con cenizas, se calculó el peso inorgánico o peso de las cenizas y la diferencia entre estas y el peso seco total correspondió al peso seco orgánico.

2.8 Parámetros poblacionales

Para calcular la tasa de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. se utilizó la ecuación descrita por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\log_2\left(\frac{N_1}{N_0}\right)}{t_1 - t_0} \quad (2)$$

En donde:

μ=tasa de crecimiento

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

t_i = tiempo en días

2.9 Análisis estadístico.

Para identificar las diferencias de la biomasa producida y el la tasa de crecimiento entre los tratamientos de luz (tres intensidades) y de turbulencia (tres tasas de inyección de aire), a los resultados de densidad celular y peso seco total así como a los valores del tasa de crecimiento se les hizo un análisis de varianza, mediante el programa de computo Statistica y un análisis a posteriori Student-Newman-Keuls para identificar las diferencias entre los tratamientos.

2.10 Análisis de producción.

En primera instancia se cuantificaron los costos de inversión incluyendo todo el módulo de producción, es decir, los nueve BRP con sus respectivos equipos. Para evaluar los costos de producción, se consideró la operación de los nueve BRP, se utilizó el valor de la máxima densidad algal alcanzada y una cosecha total equivalente al 11% del volumen total de los nueve BRP.

El costo de inversión total se obtuvo al sumar los costos de cada una de las facturas de la compra de los materiales y equipos correspondientes a la fabricación de los BRP y los sistemas auxiliares.

El costo de producción de la microalga se calculó por kilogramo de microalga seca. La tarifa considerada para el uso de energía eléctrica fue estandarizada al costo de kWh de la CFE para el uso agrícola en el 2012. Para el costo por hora de mano de obra se utilizó el tabulador de salarios del CICESE para un técnico auxiliar en el 2012.

Adicionalmente se calcularon los rendimientos obtenidos a partir de las tres intensidades de luz probadas, es decir la producción en kilogramos de peso seco de microalgas por vatio de iluminación suministrado al sistema de BRP, de esta manera se identificó la relación entre la producción de microalgas y el costo energético.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Efecto de la tasa de inyección de aire sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

3.1.1 Temperatura

El registro de las variables fue a partir del día seis de cultivo. La temperatura ambiental fluctuó entre los 26.5 y los 31°C, sin ningún patrón en especial, reflejando la magnitud de la variabilidad de la temperatura en el laboratorio. Las temperaturas más altas se registraron a las 8 a.m. con un promedio de $29.70 \pm 0.89^\circ\text{C}$ en comparación con las de las 8 p.m. con un promedio de $27.70 \pm 0.83^\circ\text{C}$ (Figura 15).

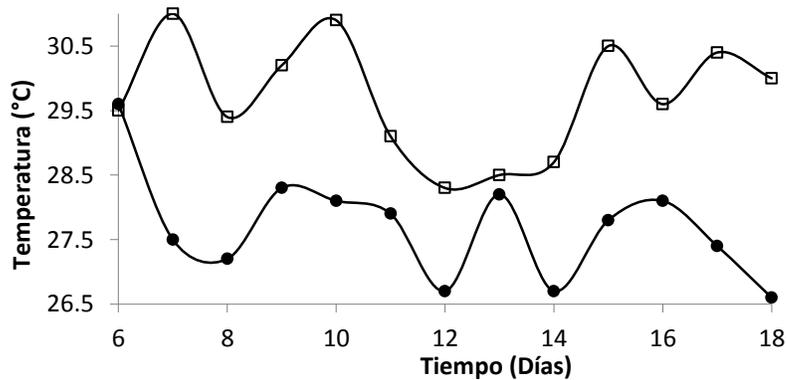


Figura 15. Variación de la temperatura ambiental del laboratorio donde se alojó el sistema de cultivo, se muestra la temperatura registrada a las 8 a.m. (□) y 8 p.m. (●)

La temperatura del agua en los biorreactores fluctuó de 24°C hasta alcanzar los 30°C en el día 18 de cultivo, y siguió el mismo patrón de comportamiento en los tres tratamientos. El tratamiento 3 se mantuvo con una diferencia mínima de 1°C más bajo comparado con los otros tratamientos. Se registró una baja de temperatura el día 14, pero en general, el comportamiento fue relativamente similar a la temperatura ambiental (Figura 16).

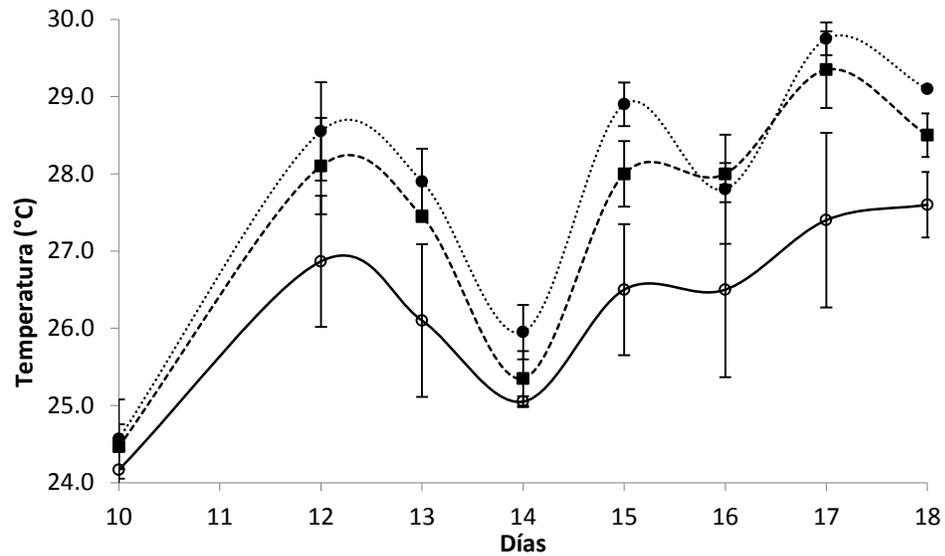


Figura 16. Temperatura promedio de los cultivos de *Nannochloropsis* sp. con tres tasa de inyección de aire durante un periodo de 18 días. (●) Tratamiento 1=3 l h⁻¹; (■) Tratamiento 2=7 l h⁻¹; (○) Tratamiento 3=10 l h⁻¹.

3.1.2 pH

El pH en los biorreactores se mantuvo cambiante durante los primeros doce días del cultivo fluctuando de 7.4 a 9, lo que reflejó la inestabilidad del sistema de inyección de CO₂, debido a una falla en el suministro continuo del gas. A partir del día trece el pH se mantuvo estable en un valor promedio de 7.55 +/- 0.14 (Figura 17).

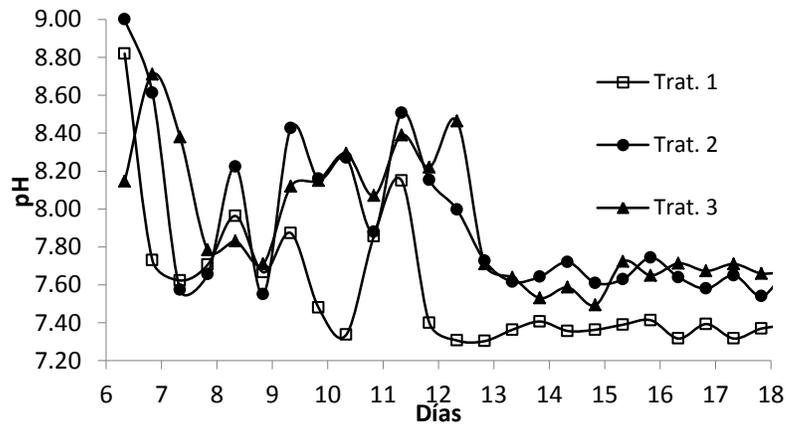


Figura 17. Promedio del pH para *Nannochloropsis* sp cultivada con tres tasa de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹.

3.1.3 Concentración de oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto tuvo un comportamiento similar con las tres tasas de inyección de aire, con un máximo de 10.4 mg/l en el día 13 y un mínimo de 6.9 mg/l para el día 16. La concentración promedio para la tasa de inyección de 3 l h⁻¹ se mantuvo por encima de los otros tratamientos (Figura 18).

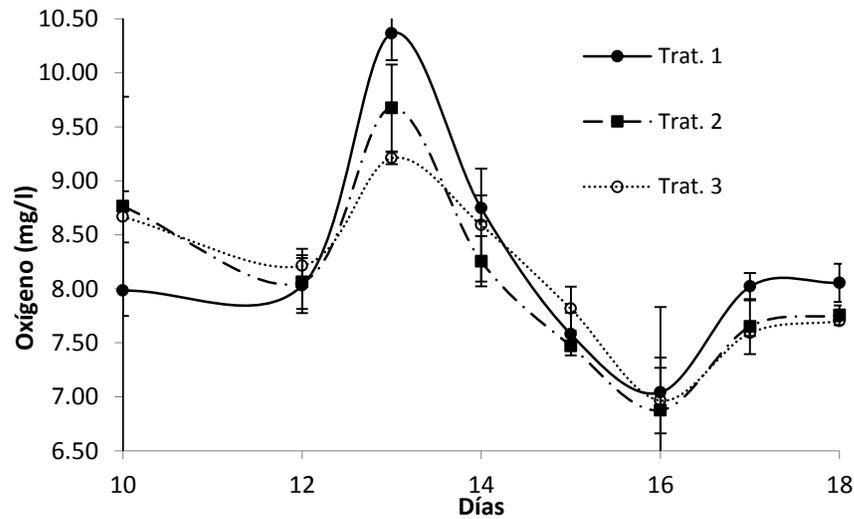


Figura 18. Concentración promedio del oxígeno disuelto (mg/l) en los cultivos de *Nannochloropsis* sp durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹.

3.1.4 Crecimiento

El crecimiento de *Nannochloropsis* sp. fue afectado en forma significativa por la tasa de aireación (Figura 19). En general el crecimiento máximo se observó durante los días 11 y 14. La fase de aclimatación se registró del día cero al día dos, la fase de aceleramiento del día dos al cinco, a partir de este momento y hasta el día 11, la población creció, posteriormente se registró un crecimiento irregular y desde el día 11 con la tasa de inyección de 2.8 l h^{-1} y el día 14 con las tasas de inyección de 6.6 y 10.3 l h^{-1} comenzó el declive de la población. El crecimiento fue diferente y tuvo relación directa con respecto a las tres tasas de inyección de aire ($p < 0.05$).

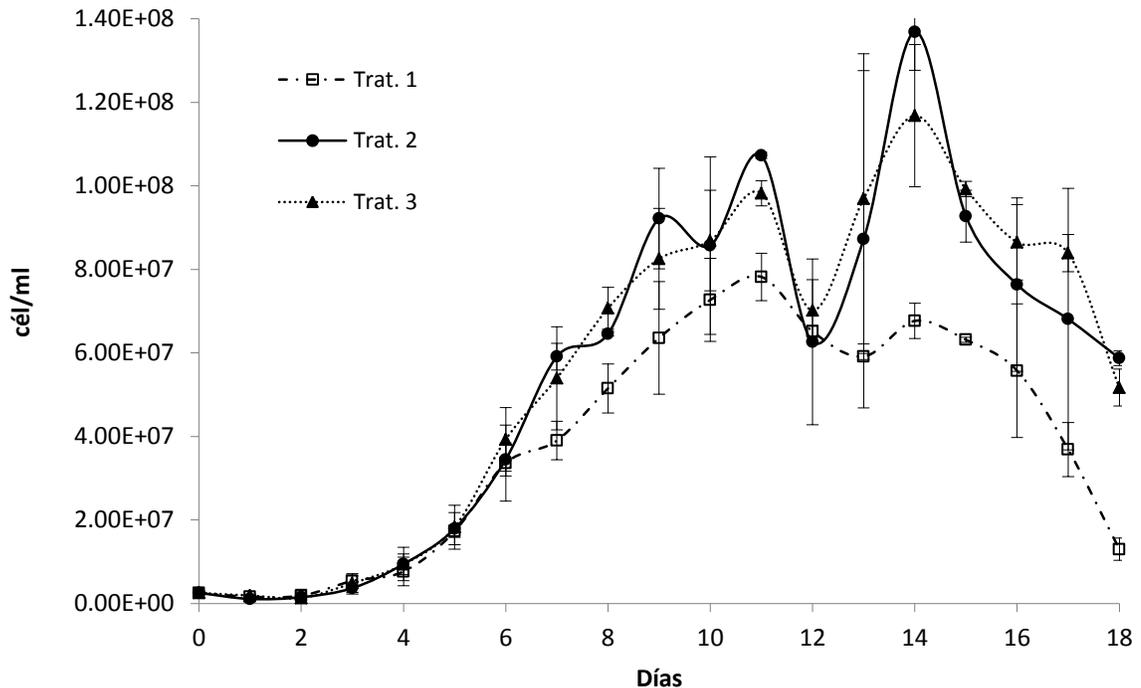


Figura 19. Curvas de crecimiento promedio de *Nannochloropsis* sp. cultivada en BRP con tres tasas de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1= 3 l h^{-1} ; Tratamiento 2= 7 l h^{-1} ; Tratamiento 3= 10 l h^{-1} .

3.1.5 Tasas de Crecimiento

En términos generales las tasas de crecimiento siguieron una tendencia similar para las tres tasas de inyección de aire, las tasas máximas de crecimiento

se observaron en el día tres y la mayor correspondió al tratamiento 3, con 1.86 días^{-1} , es decir, el aumento de la población fue de 186% en un periodo de 24 horas. La fase de crecimiento exponencial tuvo una duración del día tres al día siete. El día 10 se observó un declive en la tasa de crecimiento, seguido de una breve fase estacionaria de cinco días, que terminó el día quince con el declive de las poblaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de crecimiento promedio (μ) para *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano con tres tasas de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1= 3 l h^{-1} ; Tratamiento 2= 7 l h^{-1} ; Tratamiento 3= 10 l h^{-1} .

	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
Tiempo (días)	$\mu(\text{días}^{-1})$	$\mu(\text{días}^{-1})$	$\mu(\text{días}^{-1})$
1	-0.63	-1.20	-0.41
2	0.20	0.46	-0.51
3	1.52	1.28	1.86
4	0.50	1.36	0.94
5	1.17	0.92	0.96
6	0.96	0.94	1.10
7	0.21	0.78	0.46
8	0.40	0.13	0.39
9	0.30	0.51	0.22
10	0.19	-0.10	0.07
11	0.11	0.32	0.18
12	-0.26	-0.78	-0.49
13	-0.14	0.48	0.47
14	0.19	0.65	0.27
15	-0.10	-0.56	-0.23
16	-0.18	-0.28	-0.20
17	-0.60	-0.17	-0.04
18	-1.50	-0.21	-0.70
19	0.33	-1.12	0.04

3.1.6 Peso seco

Al comparar la biomasa producida por *Nannochloropsis* sp. en los biorreactores planos con lastres tasas de inyección de aire, no se registraron diferencias significativas entre el peso seco total, peso seco orgánico ni el contenido de cenizas ($p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Producción promedio de biomasa de *Nannochloropsis* sp. cultivada en un biorreactor plano con tres tasas de inyección de aire durante un periodo de 18 días. Tratamiento 1=3 l h⁻¹; Tratamiento 2=7 l h⁻¹; Tratamiento 3=10 l h⁻¹.

	Trat.1	Trat. 2	Trat. 3
Peso seco total (g/l)	0.32(0.19)	0.64(0.25)	0.75(0.32)
Peso seco inorgánico (g/l)	0.06(0.03)	0.11(0.04)	0.01(0.05)
Peso seco orgánico (g/l)	0.27(0.16)	0.53(0.28)	0.65(0.07)

3.2 Efecto de la intensidad de la luz sobre el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

Las intensidades promedio de luz para cada uno de los biorreactores equipados con 6, 8 y 10 lámparas de 32W y 6500^oK fueron 282 (tratamiento 1), 116 (tratamiento 2) y 91 (tratamiento 3) $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.1 Temperatura

La temperatura ambiental registrada durante el experimento de evaluación de la intensidad de la luz fluctuó entre los 21 y los 26^oC, dos grados más con respecto al experimento anterior. Se agregaron 5 ventiladores externos al sistema de cultivo para provocar que disminuyera la temperatura del agua al interior de los BRP. La diferencia de temperatura entre el día y la noche fue de un grado, sin embargo el comportamiento general a lo largo del experimento fue similar (Figura 20).

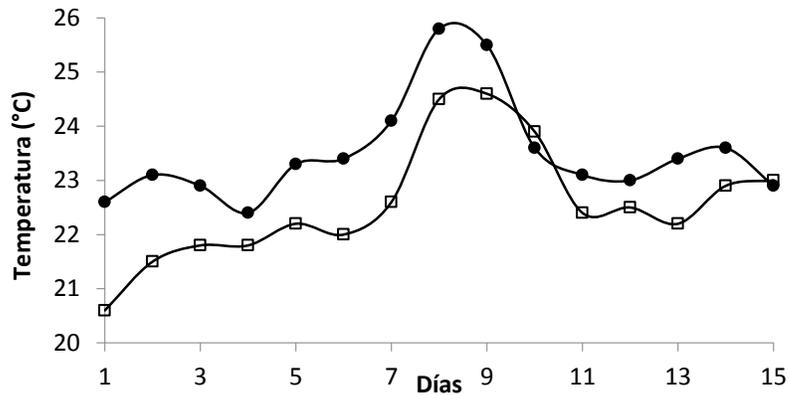


Figura 20. Variaciones de la temperatura ambiental del laboratorio donde se alojó el sistema de cultivo, se muestra la temperatura registrada a las 8 a.m. (□) y 8 p.m. (●)

Las temperaturas en el interior de los BRP fluctuaron entre 21 y 26°C, el valor máximo se registró el día 8 del cultivo. El comportamiento que siguieron las temperaturas fue el mismo para todos los tratamientos y reflejaron la influencia de la temperatura ambiental (Figura 21).

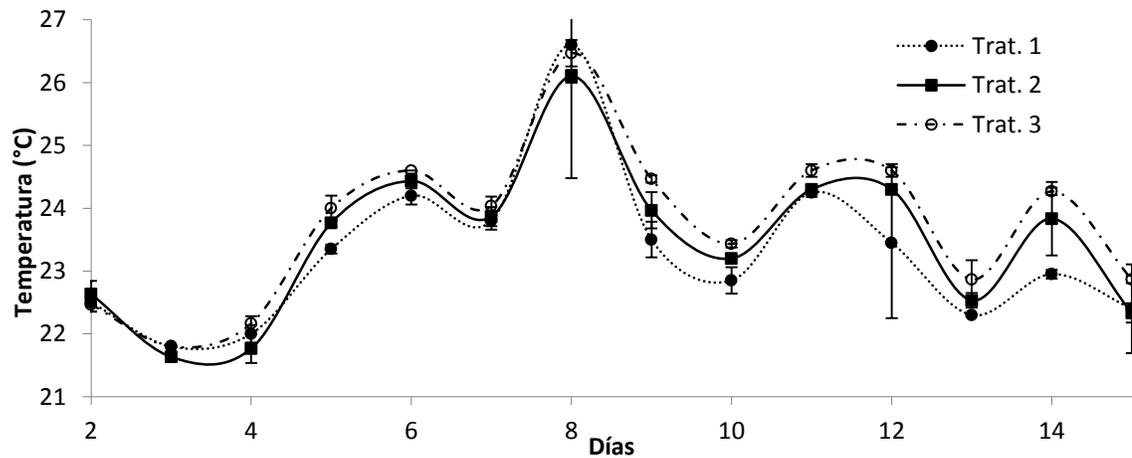


Figura 21. Temperatura promedio de los cultivos de *Nannochloropsis* sp. expuestos a tres intensidades de luz durante un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.2 pH

Los pH de los cultivos se mantuvo estables en los tres tratamientos, con un promedio de 7.5, a excepción del día 9, que se incrementó debido a que no se suministró CO₂ a los cultivos (Figura 22).

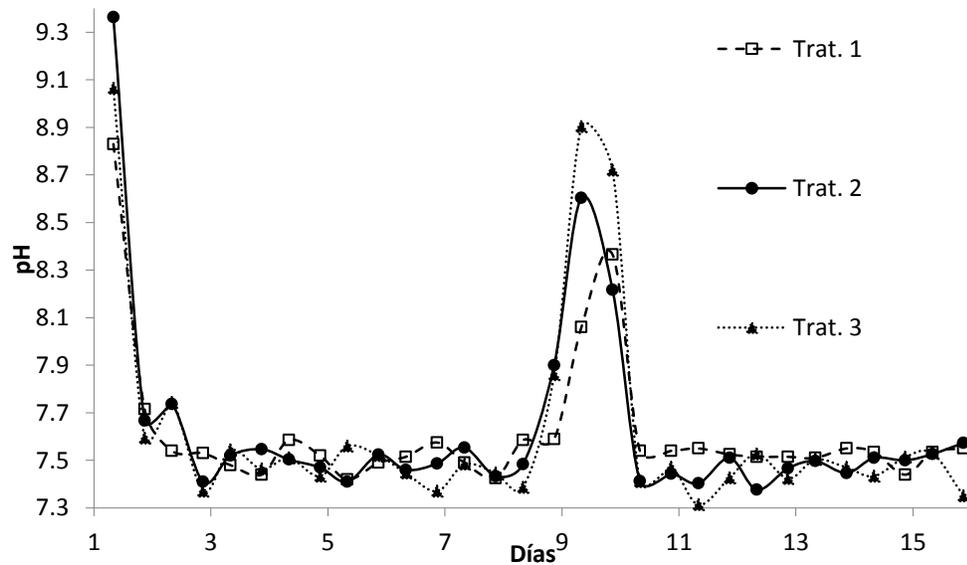


Figura 22. Promedio del pH para *Nannochloropsis* sp cultivada con tres intensidades de luz por un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.3 Oxígeno

Los concentración del oxígeno disuelto se mantuvo entre los 8.5 y 13 mg/l, siguiendo el mismo comportamiento para todos los tratamientos, con un máximo el día 8. El tratamiento 1 mantuvo su concentración de oxígeno superior a la de los tratamientos 2 y 3 (Figura 23).

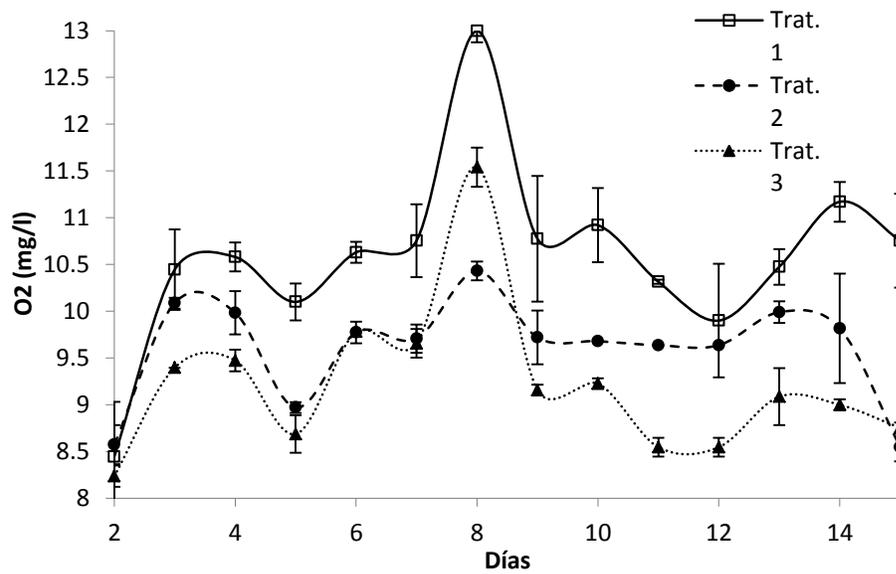


Figura 23. Concentración promedio del oxígeno disuelto (mg/l) en los cultivos de *Nannochloropsis* sp expuestos a tres intensidades de luz durante un periodo de 15 días. Tratamiento 1= $282 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= $116 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= $91 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.4 Densidad celular

Los cultivos iniciaron con inóculos de 2.5×10^6 células/ml, la etapa de aclimatación de las células tuvo una duración de 24 horas y a partir del día dos y hasta el día seis se registró la etapa de crecimiento exponencial. Al día seis se registró la mayor densidad celular en el tratamiento 1, con un valor promedio de 2×10^8 cél/ml, que es significativamente mayor que las de los tratamientos 2 y 3. A partir del día 7, diariamente se cosecharon 12.1 l (11% del volumen total del cultivo) y se repuso el mismo volumen de agua de mar con la cantidad de nutrientes equivalentes al medio "f" de Guillard y Ryther (1962). A partir del día 15 se registró la etapa de muerte celular en las poblaciones. Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 contra el tratamiento 3, mientras que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 ($p > 0.05$) (Figura 24).

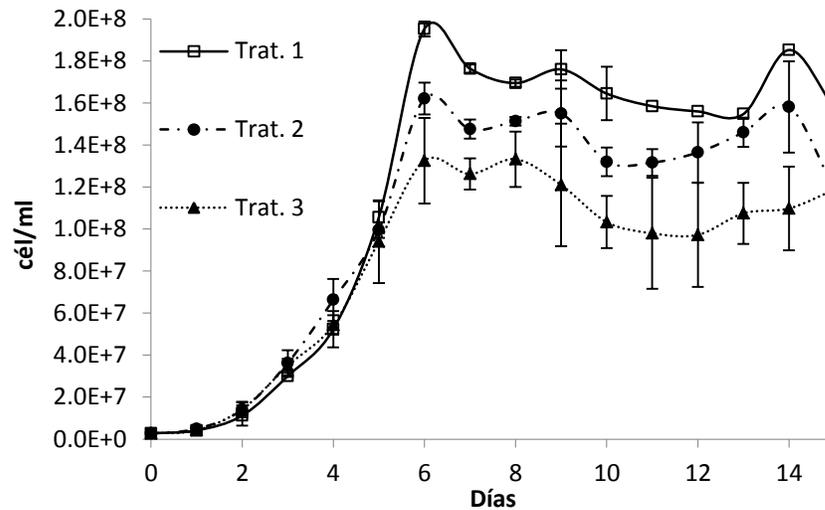


Figura 24. Crecimiento poblacional de *Nannochloropsis* sp. cultivada en un sistema de BRP con con tres intensidades de luz por un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.5 Crecimiento

La mayor tasa de crecimiento de *Nannochloropsis* sp. (1.75) se registró el día 2 del cultivo con la menor intensidad de luz (Tratamiento 3, 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a partir del día 3 y hasta el día 6, las tasas de crecimiento para el tratamiento de mayor intensidad son mayores con respecto a los otros tratamientos, por lo que alcanzó las mayores densidades. A partir del día siete que iniciaron las cosechas, la población se mantuvo relativamente constante en los tres tratamientos, para finalmente disminuir al día 15 en los tratamientos 1, 2 y 3 (Tabla 4).

3.2.6 Producción de biomasa

La mayor producción de biomasa de *Nannochloropsis* sp., expresada como unidad de masa seca algal por unidad de volumen cultivado (g/l), se obtuvo el día doce. Al comparar los tres tratamientos en el día doce, no hubo diferencias entre los tratamientos. El contenido de cenizas del tratamiento 1 (expresado en forma porcentual) a los seis días fue mayor con respecto a los tratamientos de menor intensidad de luz; en contraste, en los días nueve y doce, el contenido de cenizas es similar entre los tres tratamientos.

Tabla 4. Tasa de crecimiento promedio (μ) de *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano, con tres intensidades de luz por un periodo de 15 días. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
Tiempo(días)	$\mu(\text{días}^{-1})$	$\mu(\text{días}^{-1})$	$\mu(\text{días}^{-1})$
1	0.59	0.88	0.63
2	1.44	1.52	1.75
3	1.42	1.37	1.29
4	0.80	0.87	0.64
5	1.01	0.58	0.79
6	0.89	0.70	0.50
7	-0.15	-0.14	-0.07
8	0.05	0.15	0.19
9	0.16	0.14	-0.03
10	0.01	-0.12	-0.12
11	0.06	0.11	0.03
12	0.09	0.16	0.10
13	0.10	0.21	0.25
14	0.37	0.22	0.14
15	-0.12	-0.30	0.22

Tabla 5. Producción de biomasa promedio de *Nannochloropsis* sp., cultivada en BRP con tres intensidades de luz para los días seis, nueve y doce. Tratamiento 1= 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 2= 116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Tratamiento 3= 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Letras indican diferencias significativas $P < 0.05$.

Día 6	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
Peso seco total (g/l)	0.8318(0.2130)a	0.6054(0.0572)a	0.6362(0.0438)a
Peso seco cenizas (g/l)	0.1874(0.1980)a	0.0583(0.0306)b	0.0799(0.0250)b
Peso seco orgánico (g/l)	0.6443(0.0150)a	0.5470(0.0827)a	0.5563(0.0599)a
Día 9	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
Peso seco total (g/l)	1.4807(0.0986)a	1.3300(0.0642)a	1.3218(0.1076)a
Peso seco cenizas (g/l)	0.4179(0.0403)a	0.4394(0.0446)a	0.5075(0.1013)a
Peso seco orgánico (g/l)	1.0627(0.0583)a	0.8905(0.0195)b	0.8143(0.0452)b
Día 12	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3
Peso seco total (g/l)	3.2648(0.1008)a	3.1280(0.0980)a	3.0517(0.1683)a
Peso seco cenizas (g/l)	2.1285(0.1082)a	2.1708(0.0990)a	2.2108(0.0580)a
Peso seco organico (g/l)	1.1363(0.0074)a	0.9572(0.0479)ab	0.8408(0.1499)b

El día nueve se detectaron diferencias significativas en el peso orgánico entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2 y 3 (Tabla 5). En el día doce se

detectaron diferencias significativas los tratamientos 1 y 3, no se encontraron diferencias entre los tratamientos 1 y 2 ni entre el tratamiento 2 y 3 (Tabla 5).

Capítulo 4

Costos de inversión y producción

Los costos de inversión para la producción de microalgas para nueve BRP se presentan en la Tabla 6. El mayor costo de inversión de los BRP fue de \$91,923.00 pesos, donde se incluyen el material y la mano de obra, el sistema de CO₂ y el suministro de aire y el menor costo de inversión fue para el sistema de iluminación, con \$38,630.00. El costo total de inversión fue de \$189,966.00.

Tabla 6. Costos de inversión en pesos para los nueve BRP, los costos se expresan en pesos mexicanos.

Componentes de los BRP	Costo
Biorreactores: Material y mano de obra	\$59,413
Sistema de CO ₂ y suministro aire	\$91,923
Sistema de iluminación	\$38,630
Costo total de inversión	\$189,966

Se estimaron los costos de producción de las microalgas, considerando la mano de obra, la energía consumida por el sistema, demanda de nutrientes de los nueve BRP en operación (

Tabla 7); el rubro mas costoso fue en la mano de obra con \$106,799.00. El costo total por kilogramo de biomasa seca fue de \$1,249.00.

4.1 Productividad del sistema

La combinación de una tasa de inyección de aire de 10 l h⁻¹ con una intensidad de 282 μmol fotón m⁻² s⁻¹ resulta en la mayor productividad del sistema con 3.05 g/l. En la condición de experimental de 91 μmol fotón m⁻² s⁻¹ y 10 l h⁻¹ no hay una consistencia en las biomásas registradas, debido a que existieron inconsistencias en el suministro de CO₂, que resultó en menos crecimiento y producción de biomasa en el experimento 1 (Tabla 8), por lo que las repeticiones del experimento resultaron en un valor promedio de 0.75 g/l, muy inferior al del segundo experimento, con 3.05 g/l.

Tabla 7. Estimación de costos de producción en pesos para los nueve BRP.

Producción	Consideraciones	Costo
a) Mano de obra		
Operación BRP: preparar medios y nutrientes, cosecha, limpieza de reactores, mantenimiento diario 3 h	\$73.15 por hora	\$80,099
Trabajo de laboratorio, conteo celular 1 h		\$26,700
Subtotal	1460 hr/año	\$106,799
b) Energía KWh / año	costo .44/kWh	
Sistema de filtración	1 Kwh*24hr*365 días	\$3,854
Iluminación	1.6 Kwh*24hr*365 días	\$6,167
Sistema de CO2	.5 Kwh*24hr*365 días	\$1,927
Subtotal		\$11,949
c) Insumos		
CO2	\$413/cilindro*5*12meses	\$24,780
Nutrientes	\$4000*2	\$8,000
Subtotal		\$32,780
Costo anual total		\$151,528
Costo por kilogramo de peso seco		\$1,249

Tabla 8. Producción de biomasa seca total (g/l) (desviación estándar) con tres condiciones de turbulencia y tres intensidades de luz, nótese que la evaluación de la intensidad de luz se hizo con la turbulencia que produjo la mayor biomasa.*experimento turbulencia **experimento intensidad

Tratamiento	Intensidad de la luz	10 l h ⁻¹	7 l h ⁻¹	3 l h ⁻¹
1	282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	**3.27 (0.10)		
2	116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	**3.13 (0.10)		
3	91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	*0.75 (0.32) **3.05 (0.17)	*0.64(0.25)	*0.32(0.19)

Al considerar el rendimiento de biomasa en peso seco total de *Nannochloropsis* sp. con respecto al consumo de energía eléctrica (Vatios, W) asociada a las diferentes intensidades de luz fluorescente, el mayor rendimiento se obtiene con una irradiancia de 91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (

Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento de *Nannochloropsis* sp. cultivada con tres intensidades de luz.

Tratamiento	Intensidad de la luz	Rendimiento Kg/W
1	282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.23E-04
2	116 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.48E-04
3	91 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$	1.92E-04

Capítulo 5

Discusión

Los BRP presentan diversas ventajas sobre otros diseños, como la capacidad de utilizar la luz de manera más eficiente, ya que su diseño se traduce en una mejor razón S/V. Esto es porque el espesor del cultivo y por lo tanto su volumen es muy pequeño en relación con la superficie para la captación de la luz, lo que permite que la mayoría de las células recibían su cuota de energía radiante.

En la última década se han estudiado numerosos tipos de biorreactores y la tendencia indica que la optimización del diseño se centra en la reducción del espesor, sin importar de qué tipo de biorreactor se trate, ya sea plano (Cheng-Wu *et al.*, 2001) o tubular (Hu-Ping *et al.*, 2003). Cheng-Wu *et al.*, (2001) desarrollaron un BRP con una razón S/V de 10, ese diseño sirvió de base para el BRP que se evaluó en esta tesis, por lo que su relación S/V es la misma. En contraste, Hu. *et al.*, (1998) utilizaron un diseño similar pero con una mayor razón S/V (16.7). Se debe considerar la productividad y el volumen de cultivo, ya que la disminución del espesor del biorreactor también se traduce en una disminución considerable del volumen del cultivo.

Cuando se cultivan microalgas es importante mantener condiciones ambientales estables, para evitar estresar a las células. En este sentido, es necesario mantener la temperatura idónea para la especie de microalga. En este trabajo no se controló la temperatura de los biorreactores, por lo que siguió un patrón similar al de la temperatura ambiental, con una variación máxima de 6°C por día y una temperatura máxima de 31°C.

Pérsico *et al.*, (2011) mencionan que las altas temperaturas para *Nannochloropsis* sp., combinadas con altos valores del pH y altos niveles de

irradiancia constituyen los principales factores de estrés, ya que disminuyen la capacidad fotosintética y por ende el crecimiento, de tal forma que una combinación de 30°C en verano (altos niveles de irradiancia), resultaron en una densidad celular máxima de 53×10^6 cél/ml, en comparación con los 93×10^6 cél/ml obtenidos en primavera con temperaturas medias de entre 10 y 15°C. En esta tesis, las temperaturas promedio para los experimentos de turbulencia y de intensidad de luz fueron de 31 y 26°C respectivamente. Es posible que estas altas temperaturas y la marcada variación térmica tuvieran un efecto negativo sobre el crecimiento. Richmond y Zou (1999) mantuvieron cultivos de *Nannochloropsis* sp. en BRP a una temperatura de 29°C, la variación fue de 2°C diaria, por lo que es posible que el efecto estresante fuera menor, como lo indica el crecimiento poblacional, que llegó a los $1,440 \times 10^6$ cél/ml comparado con los 185×10^6 cél/ml obtenidos en este trabajo.

Los nutrientes son un factor fundamental para el cultivo de microalgas. Los resultados con un análisis que no forma parte de este estudio pero que se realizó en forma paralela, indicó que a partir del día 10 de cultivo los nutrientes en los BRP se agotaron. La reposición de nutrientes asociada con el proceso de cosechas parciales resultó insuficiente para sostener el consumo de las microalgas, lo que determinó una reducción en la duración del cultivo a solo 15 días. Esta situación no permitió que se pudiera evaluar el máximo rendimiento en los biorreactores bajo las condiciones de flujo de aire o de intensidad de luz.

Yamasaki y Hirata (1994) mencionan que durante el periodo inicial de cultivo hay suficiente CO₂ disponible (CO₂ atmosférico disuelto en el medio de cultivo) para el crecimiento de *Nannochloropsis* sp., ya que la demanda total es muy pequeña y basta con el que aporta el aire atmosférico que se inyecta al sistema, pero se vuelve deficiente cuando la densidad del cultivo se incrementa, por lo que es indispensable una fuente adicional de CO₂. Es imprescindible mantener estable el pH del medio de cultivo en un intervalo de valores entre 7 y 8.5. En el experimento de turbulencia (Figura 17) se registró una mayor

fluctuación del pH, provocada por un control inadecuado del suministro de CO₂; sin embargo, en el experimento de intensidad de luz, se eliminaron los problemas de suministro del dióxido de carbono, por lo que el pH y la fuente de carbono se mantuvieron estables.

La concentración de oxígeno fue afectada positivamente por el incremento en la intensidad de la luz; con la máxima intensidad (tratamiento 1) la concentración de oxígeno fue de 1 mg/l superior a los otros tratamientos. El tratamiento 1 (282 $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) tuvo una concentración máxima de 13.0 mg/l, en tanto que los tratamientos 2 y 3, con 91 y 116 $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente, tuvieron una concentración máxima de 10.43 y 11.54 mg/l respectivamente.

Kitaya *et al.* (2005), en un trabajo con la microalga *Euglena gracilis*, evaluaron tres niveles de saturación de oxígeno disuelto (10, 20 y 30%), y observaron que el mayor crecimiento se obtuvo con una saturación del 20%. De acuerdo con Sánchez *et al.* (1999) y Acien-Fernández *et al.* (2013) las concentraciones de oxígeno disuelto superiores al 100% de saturación inhiben la fotosíntesis, aunque según Posten (2009), en algunas especie de microalgas la fotosíntesis se inhibe con concentraciones de 120 y hasta de 200%, lo que indica que la tolerancia al oxígeno es especie específica.

En esta tesis, el mayor valor de saturación (165%, 13 mg/l) se registró el día ocho en el tratamiento 1 (Figura 23), sin embargo, no se observa una reducción en la tasa de crecimiento. La exposición de *Nannochloropsis* sp. a concentraciones de oxígeno en el intervalo de 20 a 250% de saturación ocasionan una disminución del crecimiento, a partir del 75% de saturación hay un efecto negativo en la microalga por lo que la tasa de crecimiento disminuye linealmente de 0.48 en 75% a 0.18 en 250% de saturación (Raso, 2012). El efecto del oxígeno sobre el crecimiento se relaciona con una disminución lineal de la fijación de CO₂ con respecto al incremento en la concentración de oxígeno del medio, este efecto es una consecuencia de una disminución en la actividad de la enzima RUBISCO (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La turbulencia provocada por la tasa de inyección de aire es importante para el crecimiento celular, ya que determina el movimiento de las células y por consiguiente las fluctuaciones en la cantidad de luz que reciben. En este sentido, para cualquier tipo de FBR, una mayor tasa de aireación, favorece la distribución de la luz y de los nutrientes entre las células. Sin embargo, es importante considerar la tolerancia de cada especie a los esfuerzos de cizalla (cizalla es el esfuerzo que actúa paralelamente a un plano sobre el que se ha aplicado una fuerza), que ocasiona el movimiento del agua (Hu-Ping *et al.*, 2003).

En los estudios realizados previamente con biorreactores planos se ha utilizado luz natural y se han desarrollado al exterior, es decir sin el uso de un invernadero y/o al interior de construcciones para tal fin (Cheng-Wu *et al.*, 2001, Hu *et al.*, 1998, Zou y Richmond, 1999). En esta tesis se evaluó el efecto de la luz artificial en intensidades de 282 (tratamiento 1), 116 (tratamiento 2) y 91 (tratamiento 3) $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la cual es más de 10 veces menor a la luz natural del sol, que ronda los 2000 $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Powles *et al.*, 1980). Cuando se compara el mejor crecimiento registrado en esta tesis se puede inferir que 282 $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ resultan insuficientes para lograr los resultados obtenidos por Cheng-Wu *et al.* (2001). Comparativamente, Zou y Richmond (1998) obtuvieron mayores crecimientos ($1,440 \times 10^6$ cél/ml) en BRP expuestos a irradiancias de 1800 a 2100 $\mu\text{mol fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Es posible que una mayor iluminación en los BRP utilizados en esta tesis resulte en un crecimiento de la población aun mayor que el registrado con 282 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ya que con biorreactores helicoidales expuestos a la luz solar se han obtenido densidades máximas de 596×10^6 cél/ml (Briassoulis *et al.*, 2010). En el mismo sentido, Cheng-Hu *et al.*, (2001) cultivaron *Nannochloropsis* sp. y registraron un promedio máximo de 691×10^6 cél/ml en un biorreactor plano expuesto a la luz solar, por lo que, si bien en nuestro experimentos alcanzamos altas densidades algales (185×10^6 de cél/ml), se observa que un factor clave es la intensidad de la luz.

Zou y Richmond (1999) cultivaron *Nannochloropsis* sp. en biorreactores planos de 10.4 y 17 cm de espesor y obtuvieron concentraciones superiores a los 10 g/l (6.6×10^8 cél/ml), 7 g/l superiores a las obtenidas en esta tesis. Es posible que la diferencia sea el resultado de una turbulencia e intensidad de la luz muy superiores, ya que se inyectó aire en una razón de $50.4 \text{ l h}^{-1} \text{ l}^{-1}$, esto es, $50.31 \text{ l h}^{-1} \text{ l}^{-1}$ mayor que en este trabajo y la luz incidente fue de $1800\text{-}2100 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $1,518 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ superior a la de esta tesis.

Cheng-Wu *et al.*, (2001) estimaron un costo de inversión de \$107,244 pesos (\$13.1912 pesos = 1 dólar al tipo de cambio publicado por el Banco de México en el Diario Oficial de la Federación 08/09/2013) para un biorreactor de 2000 l, excluyendo la infraestructura (estructuras básicas físicas y organizacionales i.e. construcciones, caminos, redes eléctricas) necesarias para la operación de una empresa. En comparación, los BRP que en conjunto suman 990 l, utilizado en esta tesis tuvo un costo de \$189,966, 56% superior. La principal diferencia en el costo radica en los instrumentos de control automático del pH. Es posible que si se incrementa la densidad celular, evitando la limitación asociada a la disponibilidad de nutrientes, o se incrementa el volumen del cultivo, el costo de inversión se amortice en un tiempo razonable y los costos de operación resulten atractivos para recomendar la utilización de este BRP para la producción masiva de *Nannochloropsis* sp.

El costo de producción de *Nannochloropsis* sp. en el BRP de 2000 l desarrollado por Cheng-Wu *et al.* (2001) fue de \$960 pesos/kg de peso seco. En comparación, el costo de producción en este estudio fue de \$1249 pesos/ /kg que resulta un 30% más caro. Aunque la diferencia es considerable, es posible reducir los costos al utilizar al máximo la energía radiante de las lámparas, evitando el efecto de limitación asociado con los nutrientes, haciendo más eficientes los procesos que requieren de mano de obra y economizando los principales insumos como el CO_2 y los nutrientes.

El mayor rendimiento de *Nannochloropsis* sp. expresado en Kg/vatio se encuentra al suministrar $91 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esto significa que no siempre es necesaria una mayor cantidad de luz para obtener la mayor productividad, por lo que si se considera que es más eficiente el tratamiento de $91 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, es posible reducir los costos de producción al reducir la utilización de lámparas, sin importar que el cultivo de microalgas tendrá una menor concentración.

Conclusiones

La mayor producción de biomasa de la microalga *Nannochloropsis* sp. se obtuvo al cultivarla con un flujo de aire de $10 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$ y una intensidad de luz de $282 \mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La eficiencia de la utilización de la electricidad para los biorreactores es de 227.48 kW por kilogramo de biomasa seca producida.

La mayor eficiencia de utilización de luz, considerando únicamente la luz utilizada por las lámparas fue de $1.92\text{E}-04$ kW por kilogramo de biomasa seca producida.

El costo de producción de la microalga *Nannochloropsis* sp. bajo el esquema de producción de biorreactor plano, es de \$1249 pesos por kilogramo de peso seco.

Recomendaciones

Se recomienda realizar nuevos estudios de cultivos de microalgas en BRP considerando el consumo de nutrientes, y así eliminar la probable limitación por nutrientes.

Se sugieren mayores estudios, evaluando un mayor flujo de aire, evaluar la productividad que genera la radiación que producen las lámparas, eliminando el efecto de la limitación por nutrientes.

Se recomienda realizar adecuaciones en los cultivos de microalgas en los BRP, donde se controle la fluctuación de temperatura.

Referencias bibliográficas

- Acién-Fernandez, F. G. Fernández-Sevilla, J. M y Molina-Grima. 2013. Photobioreactors for the production of microalgae. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12:131-151 p.
- Arredondo-Vega, B. O. y Voltolina, D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIBNOR. 81 p.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. 2006. *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press. 301 p..
- Briassoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., Berberidis, K. y Jacobsen, A., 2010. An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol.* 101(17):6768-6777 p.
- Brown, M.R. 2002. Nutritional value of microalga for aquaculture. En: *Avances en Nutrición Acuícola VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún Quintana Roo, México 281-292 p.
- Carvalho, A., P., Meireles, L. A., y Malcata, F. X. 2006. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnol. Prog.* 22:1490-1506 p.
- Carvalho, A. P., Silva S. O., Baptista J. M. y Malcata, F. X. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 5:1275-1288 p.
- Cheirsilp, B. y Torpee, S. 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Biores Technol.* 110:510-516 p.
- Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel ,R. y Richmond, A. 2001. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. *Eustigmatophyceae*. *Aquacult* 195:35 – 49 p.
- Das, P., Lei, W., Aziz ,S., Obbard J. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresour Technol* 102:3883-3887 p.
- Edward, R., 2008. *Phycology*. Colorado State University. 543 p.
- Guillard, R., y Ryther, J., 1962. Studies of Marine Planktonic Diatoms. *Canadian Journal of Microbiol.* 8:229-239 p.
- Guiry, M.D. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44568; Recuperado en 04 Noviembre 2013.

- Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., Miyachi, S. 1998. Ultrahigh-cell-density culture of a marine Green alga *Chlorococcum litorale* in a flat-plate photobioreactor. *Appl Microbiol* 49:655-662 p.
- Hu-Ping, L., Kemoun, A., Al-Dahhan, M., Fernández, J., García, J., García, F., Molina, E. 2003. Analysis of photobioreactors for culturing high-value microalgae and cyanobacteria via an advanced diagnostic technique: CARPT. *Chemical Engineering Science* 58:2519 – 2527 p.
- Kitaya, Y., Azuma, H., Kiyota, M., 2005. Effects of temperatura, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on celular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research* 35:1584-1588 p.
- Massey B., 2001. *Mechanics of Fluids*. Thaylor and Francis. 696 p.
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=33123; Recuperado en 04 Noviembre 2013.
- Nelson, D. L. Cox M.M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. W. H. Freeman. 1342 p.
- Paniagua, J., Buckle, L. F., Granados, C., Loya, D. H. 1989. Manual de metodologias y alternativas para el cultivo de microalgas. Circulación restringida CICESE. 61 p.
- Pérsico, M. M., Moris, M., Tranier, E. D., Zanazzi, A. N., Saubidet, A. A., Beligni, M. V. 2011. Evaluacion de un sistema exterior de cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis oculata*, en una zona templada oceánica de Argentina. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algas* 2(1):30-48 p.
- Posten, C. 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life. Sci.* 9:165-177 p.
- Powles, S., Berry, J., Bjorkman O., .1998 Interaction between light intensity and chilling temperatures of inhibition of photosynthesis in chilling-sensitive plants. Annual report of the director, Department of Plant Biology, Carnegie Institution 157-160 p.
- Pulz, O., y Gross, W., 2004 Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 635-648 p.
- Raso, S., Genugten, B., Vermuë, M., Wijffels, R., 2012. Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity *Appl Phycol* 24:863-871 p.
- Reynolds, C. S. 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press. 524 p.

- Sánchez, A., Contreras, A., Garcia, F., Molina, E., Chisti, Y. 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnol* 70:249-270 p.
- Sánchez-Torres, H., Juscamaita-Morales, J., Vargas-Cárdenas, J. Oliveros-Ramos, R. 2008. Producción de la microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd en medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. *Ecología Aplicada*, 7(1-2): 149-158 p.
- Sukenik, A. Beardall, J. Kromkamp, J. Kopecky, J. Masojidek, J. Bergeijk, S. Gabai, S. Shaham, E. Yamshon, A. 2009. Photosynthetic performance of outdoor *Nannochloropsis* mass cultures under a wide range of environmental conditions. Pre-print *Aquat Microb Ecol* 12 p.
- Warren, A. 2002. Unravelling the algae the past, present, and future of algal systematics. CRC Press. 375 p.
- Wyszecki, G. Stiles, W.S. 1966. *Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulas*. Wiley 613 p.
- Yamasaki, S., Hirata, H., 1995. CO₂ concentration change in *Nannochloropsis* sp. culture medium. *Aquacult*. 4:357-395 p.
- Zou, N. Richmond, A. 1999. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactor on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biotechnol*. 70:351-356 p.