

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada, Baja
California**



Maestría Ciencias en Acuicultura

**Modelo de la cinética de crecimiento de *Chaetoceros muelleri*
en un fotobiorreactor plano**

Presenta:

Patricio González Galena

Ensenada, Baja California,

México 2019

Tesis defendida por
Patricio González Galeana

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Directora de tesis

Miembros del comité
Dra. M. Pilar Sánchez Saavedra
Dr. Víctor Ruiz Cortes



Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Coordinadora del Posgrado

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Patricio González Galeana © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Patricio González Galeana** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Modelo de la cinética de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* en un fotobiorreactor plano

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Directora de tesis

Los principales factores que afectan la tasa de crecimiento, concentración máxima de células y composición proximal de las microalgas son la irradiancia, perfiles hidrodinámicos, composición del medio de cultivo y diseño del biorreactor. La diatomea *Chaetoceros muelleri* es ampliamente utilizada en el noroeste de México para desarrollo de cultivos de crustáceos y moluscos bivalvos. El propósito de esta tesis fue determinar un modelo cinético para el crecimiento de la microalga *C. muelleri* cultivada en un fotobiorreactor plano. Los tratamientos utilizados durante esta trabajo son T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED. La tasa de consumo de nutrientes, el crecimiento, la composición proximal y el contenido de pigmentos de *C. muelleri* cambian por efecto de la composición espectral, diseño del fotobiorreactor y etapa de crecimiento del cultivo. El mayor contenido proteína se encontró en el fotobiorreactor de 15 cm (Tratamiento 2; T2), la concentración de proteínas incrementó directamente proporcional con respecto al tiempo en todos los tratamientos. El mayor contenido de lípidos se encontró en el tratamiento control (Tratamiento 0), la concentración de lípidos se comportó inversamente proporcional al tiempo. El porcentaje de carbohidratos fue similar en todos los tratamientos (25%), y al igual que el porcentaje de cenizas (25%). La concentración de clorofila c fue mayor en los tratamientos irradiados con lámparas LEDs a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tratamiento 1, 2 y 3). La mayor tasa de consumo de N-NO₃ se presentó en el T2 ($\mu_{\text{NO}_3} = 19.72 \text{ mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$). La mayor tasa de consumo de fosfatos se observó en el fotobiorreactor de 10 cm (T1) ($\mu_{\text{PO}_4} = 0.4489 \text{ mg L}^{-1}\text{día}^{-1}$). Se utilizó un modelo logístico de tres parámetros (a, b y c). El modelo sigmoidal se modificó para que contuviera parámetros biológicamente relevantes (N_∞ , μ_{max} , μ_T y λ). El tratamiento 0 presentó la mayor tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{max}} = 0.8535$). El T2 presentó la mayor capacidad de carga del sistema $4.403; \ln(N_\infty/N_0)$. El tratamiento 0 presento un menor tiempo en la fase lag (1 día). El modelo propuesto presentó un coeficiente de determinación (r^2) superior al 0.96 en todos los tratamientos. Las microalgas cultivadas en el T2 y T3 presentaron mejor estado metabólico y se ve reflejado en el modelo siendo los T2 y T3 los que presentaron una mayor capacidad de carga. El modelo propuesto utilizado fue suficiente para describir los datos de crecimiento de *Chaetoceros muelleri*.

Palabras clave: *Chaetoceros muelleri*, fotobiorreactor plano, microalgas, cinética de crecimiento

Abstract of the thesis presented by **Patricio González Galeana** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Kinetics growth model of the microalgae *Chaetoceros muelleri* in a flat photobioreactor

Abstract approved by:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Thesis director

The main factors that affect the growth rate, maximum concentration and proximal composition of a microalgae are irradiance, hydrodynamic profiles, culture medium and bioreactor design. The diatom *Chaetoceros muelleri* is widely used in the northwestern of Mexico as food for crustacean and bivalve mollusk. The purpose of this thesis was to determine a kinetic growth model for the microalgae *C. muelleri* cultivated in a flat photobioreactor (FBP). The treatments used during this work are T0, glass jugs and fluorescent lamp; T1, 10 cm FBR and LED lamps; T2, 15 cm FBR and LED lamps; T3, FBR 20 cm and LED lamps. The nutrient intake rate, growth, proximal composition and the pigments content of *C. muelleri* changed due to spectral composition, photobioreactor design and culture growth stage. The highest protein content was found for microalgae cultured in the 15-cm photobioreactor (Treatment 2, T2), the concentration of proteins increased directly proportional with time of the culture in all treatments. The highest lipid content was found in control treatment (Treatment 0). The lipid concentration behaved inversely proportional to time. The percentage of carbohydrates was similar in all the treatments (25%) as well as the percentage of ashes (25%). The concentration of chlorophyll c was higher in irradiated treatments with LED at $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Treatment 1, 2 and 3). The highest rate of consumption of N-NO₃ was found in T2 (μ_{NO_3}) = 19.72 mg L⁻¹day⁻¹). The highest rate of phosphate consumption was observed in the 10 cm photobioreactor (T1) (μ_{PO_4} = 0.4489 mg L⁻¹day⁻¹). A logistic model with three parameters (a, b and c) was used. The sigmoidal model was modified to contain biologically relevant parameters (N_∞ , μ_{max} , μ_{T} y λ). Treatment 0 had the highest maximum growth rate (μ_{max} = 0.8535), T2 had the highest load capacity of system 4.403, $\ln(N_\infty / N_0)$ Treatment 0 showed a shorter time in the lag phase (1 day) The model showed a coefficient of determination (r^2) higher than 0.96 in all treatments. T2 and T3 had better metabolic status and were reflected in the model, highest load capacity. The model used in this thesis was sufficient to describe the *Chaetoceros muelleri* growth data and easy to use. This work would help in future research to predict the yield of microalgae produced in the FBP.

Key words: *Chaetoceros muelleri*, flat photobioreactor, microalgae, kinetic growth model

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi madre que siempre me a apoyado en todo y sobre todos de manera incondicional, a mi padre Sergio que sin sus consejos y su apoyo no sería la persona que soy ahora y a mis hermanos a quienes quiero mucho y extraño también.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de posgrado para realizar esta tesis.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), en especial al Departamento de Acuicultura, por darme la oportunidad de realizar mi posgrado en sus instalaciones.

A mi directora de Tesis la Dra. Carmen Paniagua Chávez, por apoyarme en todo momento, a pesar de la difícil situación por la que pasamos, agradecerle también el conocimiento que me brindo durante la realización de mi tesis y recordarle que no me alcanzan las palabras para agradecerle todo el apoyo que me brindo. Muchísimas gracias Dra. Carmen

Al Dr. Víctor Ruiz Cortes y Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, por aceptar formar parte de mi comité de tesis, por tomarse el tiempo para explicarme y ayudarme a entender nuevos conceptos, por sus observaciones, recomendaciones, e ideas para mejorar el proyecto de tesis.

A mi novia Sandra Valeria Arriola por ser un apoyo incondicional, motivarme, pasar tiempos muy agradables, sonriendo, platicando y a veces hasta peleando. A la ayuda brindada en la elaboración de mis experimentos, por quedarse conmigo hasta horas muy tardes, por acompañarme a hacer ejercicio y regalarme helado de su trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, M. en C. Salvador Villasuso Palomares por compartir parte de sus conocimientos, “tips”, apoyo en el armado de los sistemas y técnicas de calidad de agua y a el MVZ. Leonardo Daniel Mendoza González “perri” por el apoyo en la realización de mi tesis, por escucharme cuando estaba fastidiado, cansado y por ser un amigo incondicional. A la técnico del SUBNARGENA M. en

C. Constanza del Mar Ochoa Saloma por el apoyo y los regañones brindados durante la realización del experimento y a las técnicas del laboratorio de microalgas Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas a la M. en

C. Fátima Y. Castro Ochoa por todo el apoyo y los consejos brindados durante mis experimentos en el laboratorio de microalgas. Un agradecimiento a M. en C. Abelardo Campos por el apoyo brindado con el liofilizador y las técnicas de proximales.

A mi compañera de maestría Yira Diamanda Tapia Gallardo y Sandra Ivonne López Barrón mis compañeras de maestría que siempre me apoyaron y Edgardo Balderrama González compañero de maestría de óptica. Fue un gusto haberlos conocido y tenerlos de compañeros en los momentos alegres, tristes, aprendiendo siempre juntos un poco más sobre la vida. Les deseo lo mejor en su vida personal y profesional, espero que, así como yo me llevo un recuerdo inolvidable de ustedes, ustedes se lleven uno de mí.

Finalmente, también me gustaría agradecer al Dr. Manuel Segovia Quintero quien a pesar que no se encuentra ya con nosotros creyó en mi desde el principio y sentó las bases del proyecto.

D.E.P Dr.

Manuel espero que el proyecto este a la altura de lo que usted esperaba. Muchas Gracias por todo.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.2.1 Microalgas.....	2
1.2.1.1 <i>Chaetoceros muelleri</i>	3
1.2.2 Fotobiorreactor.....	4
1.2.3 Principales variables de cultivo.....	5
1.2.3.1 Luz.....	5
1.2.3.2 Temperatura.....	6
1.2.3.3 pH.....	7
1.2.3.4 CO ₂ , O ₂ y Rubisco.....	7
1.2.4 Tipos de cultivo.....	8
1.3 Justificación.....	9
1.4 Hipótesis.....	10
1.5 Objetivo general.....	10
1.6 Objetivos Específicos.....	10
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	11
2.1 Obtención de cepa y cultivo de pre-inoculo.....	11
2.2 Sistemas de cultivo.....	11
2.3 Preparación de los FBP.....	13
2.4 Medición de la luz.....	13
2.5 Fuente de iluminación.....	14
2.6 Procesamiento de imágenes.....	14
2.7 Condiciones de cultivo del FBP.....	16

2.8 Calidad de agua.....	16
2.9 Determinación de biomasa y análisis proximal.....	17
2.10 Cinética de crecimiento.....	18
2.11 Análisis estadístico.....	19
Capítulo 3. Resultados.....	21
3.1 Fuentes de iluminación.....	21
3.2 Perfil de velocidad y tamaño de burbujas.....	26
3.3 Calidad de agua.....	28
3.3.1 Temperatura.....	28
3.3.2 Salinidad.....	28
3.3.3 pH.....	28
3.3.4 Alcalinidad.....	29
3.3.5 CO ₂	30
3.3.6 Nitrógeno amoniacal total (NAT).....	30
3.3.7 Nitritos.....	31
3.3.8 Nitratos.....	31
3.3.9 Fosfatos.....	32
3.4 Análisis proximal.....	34
3.4.1 Proteínas.....	34
3.4.2 Carbohidratos.....	35
3.4.3 Lípidos.....	35
3.4.4 Tasa de producción de proteínas.....	36
3.4.5 Tasa de producción de carbohidratos.....	36
3.4.5 Tasa de producción de lípidos.....	37
3.5 Pigmentos (clorofila , clorofila c y carotenoides).....	38
3.6 Crecimiento celular de <i>C. muelleri</i> en FBP.....	39
Capítulo 4. Discusión.....	45
Capítulo 5. Conclusiones.....	52
5.1 Recomendaciones.....	53
Capítulo 6. Literatura citada.....	54
Anexo A.....	62

Lista de Figuras

Figura	Página
1 Fotografía <i>Chaetoceros muelleri</i> en microscopio 400x.....	3
2 Configuración del FBP de 20 cm de ancho. A) Corte lateral del fotobiorreactor plano medidas en cm. B) Vista fontral del fotobiorreactor plano distancias en cm. C) Descripción general del fotobiorreactor plano.....	12
3 Plantilla de circuito para el panel de iluminación. LEDs conectados en paralelo para lograr una distribución homogénea del amperaje. Las zonas con + o – indican la polaridad y evitar fundir los LEDs.....	15
4 Ajuste de la ley de cuadrado inverso para la fuente de iluminación (A) del fotobiorreactor plano; r representa la distancia de la fuente al fotodetector (B), a representa I_{max} (Irradiancia máxima), b representa coseno del ángulo de la fuente y c es la proporción a la cual disminuye la irradiancia.....	21
5 Potencia de dos LEDs a 15 cm de distancia entre el centro de los LEDs; A representa un LED; d la distancia entre los LEDs; los círculos sólidos representan los datos experimentales, la línea azul representa el modelo descrito ($E = 66.6 \cos^{5.217}\theta$); E representa la irradiancia, θ es el ángulo en radianes.....	22
6 Espectro de emisión de en unidades relativas (UR) a) lámpara fluorescente(PHILIPS, F40D/XPT. USA). b) lámpara LED de 350 a 750 nm.....	23
7 Espectro de lámpara fluorescente (PHILIPS, F40D/XPT. USA), 350 a 750 nm con regresión gaussiana (UR unidades relativas); x representa la longitud de onda en nm, a el punto más alto de la campana, b el punto medio de la campana y c el ancho a la mitad de la campana; los números entre paréntesis representan la gaussiana que describe la campana.....	24
8 Espectro de lámpara LED (sin marca/genérico), 350 a 750 nm con regresión gaussiana; x representa la longitud de onda en nm, a el punto más alto de la campana, b el punto medio de la campana y c el ancho a la mitad de la campana.....	24
9 Espectro de emisión de lámpara fluorescente (línea azul) y espectro de absorción de <i>Chaetoceros muelleri</i> (línea anaranjada) en unidades relativas (UR); extracción acetona 90%.....	25

10	Espectro de emisión de lámpara LED (sin marca/genérico, línea azul) y espectro de absorción de <i>Chaetoceros muelleri</i> (línea anaranjada) en unidades relativas (UR); extracción acetona 90%.....	26
11	Campo vectorial de velocidad del fluido dentro del fotobiorreactor plano (FBP). Las flechas representan el vector velocidad del fluido dentro del FBR. La magnitud del vector se representa de manera relativa a la velocidad máxima de FBP por la escala de colores.....	27
12	Imagen modelo para determinación del tamaño de burbuja en un fotobiorreactor de 10 cm en escala de grises (R1, región 1; R2, región 2; R3, región 3; R4, región 4; R5, región 5; R6, región 6).....	27
13	Registro del pH de los diferentes tratamientos de los cultivos de <i>Chaetoceros muelleri</i> . (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	29
14	Alcalinidad de los diferentes tratamientos a lo largo de los 10 días del cultivo de <i>Chaetoceros muelleri</i> . (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	29
15	Concentración de nitritos (mg L ⁻¹) de los diferentes tratamientos. (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado)..	31
16	Concentración de nitratos durante el cultivo de <i>C. muelleri</i> . bajo los distintos tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	32
17	Concentración de fosfatos durante el cultivo de <i>C. muelleri</i> . bajo los distintos tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	33

18	Porcentaje de proteínas de <i>C. muelleri</i> en los diferentes tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	34
19	Porcentaje de carbohidratos de <i>C. muelleri</i> en los diferentes tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	35
20	Porcentaje de lípidos de <i>C. muelleri</i> en los diferentes tratamientos. (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado)..	36
21	Concentración de pigmentos (mg L^{-1}) del cultivo de <i>C. muelleri</i> en los diferentes tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; Extracción con acetona al 90%; el color verde claro representa el contenido de clorofila a (mg L^{-1}), el color verde oscuro el contenido de clorofila c (mg L^{-1}) y color naranja el contenido de carotenoides (mg L^{-1}); letras diferentes indican diferencias significativas).....	38
22	Crecimiento de <i>C. muelleri</i> en los diferentes cultivos a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las barras verticales indican la desviación estándar (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).....	40
23	Biomasa de <i>Chaetoceros muelleri</i> en los diferentes tratamientos ($\text{Ln}(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a ,b y c; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función Tratamiento 0, (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea solida azul, Tasa de crecimiento línea solida anaranjado).....	41
24	Biomasa de <i>Chaetoceros muelleri</i> en los diferentes tratamientos ($\text{Ln}(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a ,b y c; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función. Tratamiento 1 (T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea solida azul, Tasa de crecimiento línea solida anaranjado).....	42

25	Biomasa de <i>Chaetoceros muelleri</i> en los diferentes tratamientos ($\ln(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a , b y c ; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función. Tratamiento 2 (T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea solida azul, Tasa de crecimiento línea solida anaranjado).....	42
26	Biomasa de <i>Chaetoceros muelleri</i> en los diferentes tratamientos ($\ln(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a , b y c ; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función. Tratamiento 3 (T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea solida azul, Tasa de crecimiento línea solida anaranjado).....	43
27	Esferas integradoras antes de lijar (izquierda), despues de lijar (derecha).....	62
28	Esferas integradoras utilizadas en el experimento.....	62
29	Distribución de las esferas integradoras dentro del fotobiorreactor.....	63
30	Diseño de la esfera integradora en Solid Works; R representa el radio, todas las medidas se encuentran en centímetros.....	63

Lista de tablas

Tabla	página
1 Condiciones de cultivo del <i>Chaetoceros muelleri</i> para el experimento en garrafón y fotobiorreactor plano (10 cm, 15 cm y 20 cm) en batch.....	18
2 Caracterización del LED (sin marca/genérico) rojo:azul 7:2 picos máximos de emisión 625 nm y 440 nm; E representa la irradiancia, θ es el ángulo en radianes.....	22
3 Ecuaciones de regresión de los espectros de emisión y parámetros integrativos de la lámpara fluorescente (PHILIPS, F40D/XPT. USA) y LED (sin marca/genérico); donde a el punto más alto de la campana, b el punto medio de la campana y c el ancho a la mitad de la campana y n el número de gaussiana.....	25
4 Parámetros integrativos de la concentración de dióxido de carbono (CO ₂) en los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; [CO ₂] representa la concentración de CO ₂ , [CO ₂] ₀ la concentración inicial de CO ₂ y las variables C ₁ , C ₂ y C ₃ son variables integrativas, no poseen un significado biológico.....	30
5 Ecuación y tasas de consumo de nitratos de los diferentes tratamientos del cultivo de <i>C. muelleri</i> (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; intervalo de confianza (IC); μ_{NO_3} representa la tasa de consumo de nitratos).....	32
6 Ecuación y tasas de consumo de fosfatos de los diferentes tratamientos del cultivo de <i>C. muelleri</i> (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED) media. Intervalo de confianza (IC). $-\mu_{\text{PO}_4}$ representa la tasa de consumo de fosfatos.....	33
7 Tabla 7. Ecuación y tasas de producción de proteínas, lípidos y carbohidratos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; MC, macromolecular; T, tratamiento; PI, parámetros integrativos; IC, intervalo de confianza; $[\pi]$ representa la concentración de proteína; $[\pi]_0$ representa la concentración de proteína inicial; [L] representa la concentración de lípidos; [L] ₀ representa la concentración inicial de lípidos; [C] representa la concentración de carbohidratos; [C] ₀ representa la concentración de carbohidratos inicial; α , β y γ son parámetros integrativos no poseen significado biológico).....	37

8	Diferentes pigmentos (ng célula-1) (media±desviación estándar) del cultivo de <i>C. muelleri</i> en los diferentes tratamientos (Letras diferentes indican diferencias significativas; T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED).....	39
9	Parámetros integrativos del modelo de regresión de <i>C. muelleri</i> (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; T, tratamiento; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función; IC, intervalo de confianza).....	41
10	Parámetros del modelo de cinética de crecimiento para la microalga <i>C. muelleri</i> (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; IC, intervalo de confianza; b se relaciona con el tiempo de la fase lag; c representa la tasa de crecimiento).....	43
11	Evaluación del modelo para <i>C. muelleri</i> utilizando los parámetros calculados experimentalmente (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; N representa la biomasa al tiempo t, N0 representa la biomasa al tiempo 0, a representa la capacidad de carga del sistema, μ_{max} , la tasa de crecimiento máxima (día-1), μ_T la tasa de crecimiento global (día-1), λ el tiempo de la fase lag (días) y t el tiempo (días)).....	44

Capítulo 1. Introducción

Las microalgas son una fuente o una potencial fuente de productos con alto valor comercial como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's por sus siglas en inglés) (Belarbi *et al.*, 2000), algunos pigmentos tales como carotenoides, fucoxantina o violaxantina (Lorenz y Cysewski, 2000), biopolímeros y una gran cantidad de productos de la industria farmacéutica (Borowitzka, 1999b). Aunado a esto, cantidades significativas de biomasa microalgal son producidas como alimento para etapas larvales de crustáceos y durante todo el ciclo de vida de moluscos (Sánchez-Mirón *et al.*, 2002). Los cultivos comerciales de microalgas a gran escala se realizan al exterior en sistemas abiertos (*e.g.* canales de flujo). Sin embargo, estos cultivos presentan bajas densidades de producción (Montes, 2014). Para producción de altas concentraciones de biomasa comúnmente se utilizan fotobiorreactores tubulares de flujo continuo con diámetro normalmente menor a 0.08 m (Molina, 1999; Sánchez *et al.*, 1999; Tredici, 1999). A pesar de esto, este tipo de fotobiorreactores ocupan grandes extensiones de terreno y su construcción es costosa al igual que su operación.

Una alternativa a los reactores tubulares son los fotobiorreactores planos (FBP), con columna de burbuja o "airlift" (Chisti, 1989; Chisti y Moo-Young, 1993). Los FBP son compactos, de bajo costo y fáciles de operar asépticamente (Chisti, 1989; Sánchez *et al.*, 1999). La configuración semi cerrada de un FBP permite un mayor control de contaminantes, evita la degradación o colapso del cultivo por otros microorganismos y permite incrementar la densidad de la biomasa del cultivo y reducir los costos económicos de producción. Además, los FBR permiten controlar variables como pH, oxígeno, dióxido de carbono (CO₂) y temperatura. En los sistemas FBR se reduce la pérdida de agua por evaporación, se tiene un uso más eficiente del agua, fomenta una mayor producción de biomasa microalgal con producciones de calidad constante (Carvalho *et al.*, 2011; Montes, 2014). La composición de la biomasa microalgal afecta su valor nutricional, el cual es muy importante en la acuicultura (Sánchez *et al.*, 2002). Los FBP son una excelente opción para la producción de grandes cantidades de biomasa microalgal (Sánchez *et al.*, 1999). Sin embargo, existe poca información sobre la caracterización, cinética de crecimiento y rendimientos de los cultivos de microalgas en FBP, el conocimiento de éstas variables, permitirá optimizar recurso como tiempo experimental, costos económicos y esfuerzo manteniendo cultivos.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Microalgas

Las microalgas son un amplio conjunto de organismos que incluyen organismos eucariotas y cianobacterias procariotas. Existe una gran diversidad de especies de microalgas, tanto dulceacuícolas como marinas en el medio natural. Las microalgas son cruciales en los ecosistemas del planeta ya que son la base de la cadena trófica (Pires *et al.*, 2017).

Desde hace más de un siglo, las microalgas se han estudiado en condiciones controladas de laboratorio, cultivos al exterior y en el medio natural, debido a que presentan características importantes tales como: altas tasas de crecimiento y capacidad de almacenamiento de productos con importancia biotecnológica, lo que despierta un interés económico por las microalgas. Además, los cultivos de microalgas están ligados a diversas aplicaciones ambientales tales como la captura de CO₂, producción de biomasa y absorción de nutrientes de agua residuales (Muñoz, 2006; Park *et al.*, 2011; Olguin, 2012; Pires *et al.*, 2012); industria cosmética, productos farmacéuticos y biocombustibles (Spolaore *et al.*, 2006); investigación básica en fotosíntesis, producción de lípidos, sustancias antimicrobianas, antioxidantes, nutrición humana y animal (debido a su composición bioquímica) (Pires *et al.*, 2017; Schreiber *et al.*, 2017).

Las microalgas se consideran la base de la cadena trófica, ya que son el alimento principal de los diferentes estadios de vida de moluscos, peces y crustáceos (Abalde y Herrero, 2004). El uso acuícola que tienen las microalgas principalmente es alimentar moluscos y otros organismos filtradores durante todo su ciclo de vida (Flores–Vergara *et al.*, 2004; Milke *et al.*, 2008 y Cerón-Ortíz *et al.*, 2009). De igual modo, son el alimento en los cultivos de zooplancton (rotíferos, copépodos y *Artemia* spp.) los cuales, a su vez, son utilizados para alimentar peces en sus etapas larvales (Treece y Davies 2000; Campa, 2002; Lora-Vilchis *et al.*, 2004; Puello-Cruz *et al.*, 2009 y Guevara *et al.*, 2011).

Una gran cantidad de estudios revelan que las especies de microalgas que presentan mayores propiedades nutricionales son *Chaetoceros muelleri*, *C. calcitrans*, *Isocrysis galbana* (T.ISO), *Tetraselmis suecica*, *T. pseudonana* y *Pavlova lutheri*. Estas microalgas son comúnmente utilizadas en dietas monoalgales o mixtas debido a su alto contenido proteico y su alto contenido en ácidos grasos esenciales (ácido docohexanoico; DHA, ácido eicosapentaenoico; EPA, ácido araquidónico; ARA) (Enright *et al.*, 1986; Thompson *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1997). La composición proximal de las microalgas es influenciada por diversos factores ambientales como la temperatura (Pires *et al.*, 2017), la fase de crecimiento en el que se

encuentra el cultivo (Trujillo-Valle y Voltolina, 1994), el medio de cultivo (Valenzuela-Espinoza, 1997), la calidad y la intensidad lumínica (Pires *et al.*, 2017), y el pH (Roncarati *et al.*, 2004).

1.2.1.1 *Chaetoceros muelleri*

La microalga *C. muelleri* (Lemmerman) pertenece a la clase Bacillariophyceae y se utiliza ampliamente en acuicultura para la alimentación de peces, crustáceos y moluscos bivalvos. En el Noroeste de México se utiliza en la producción de larvas de camarón, larvas de moluscos y en la producción de alimento vivo o intermediarios en la crianza de larvas de peces (López y Voltolina, 2004).

Esta microalga tiene una forma rectangular, elíptica, color café tiene un tamaño entre 4 y 9 μm , sus setas son 2 veces más largas que el cuerpo y son delgadas (Figura 1), se divide a salinidades de 35 ppm, su rango de temperaturas varía entre los 15 a 30°C. Tiene una cantidad importante de energía, proteínas y PUFA's incluso mayor que otras diatomeas, tienen un bajo contenido de carbohidratos (Allen y Nelson, 1910; Velasco, 2016).

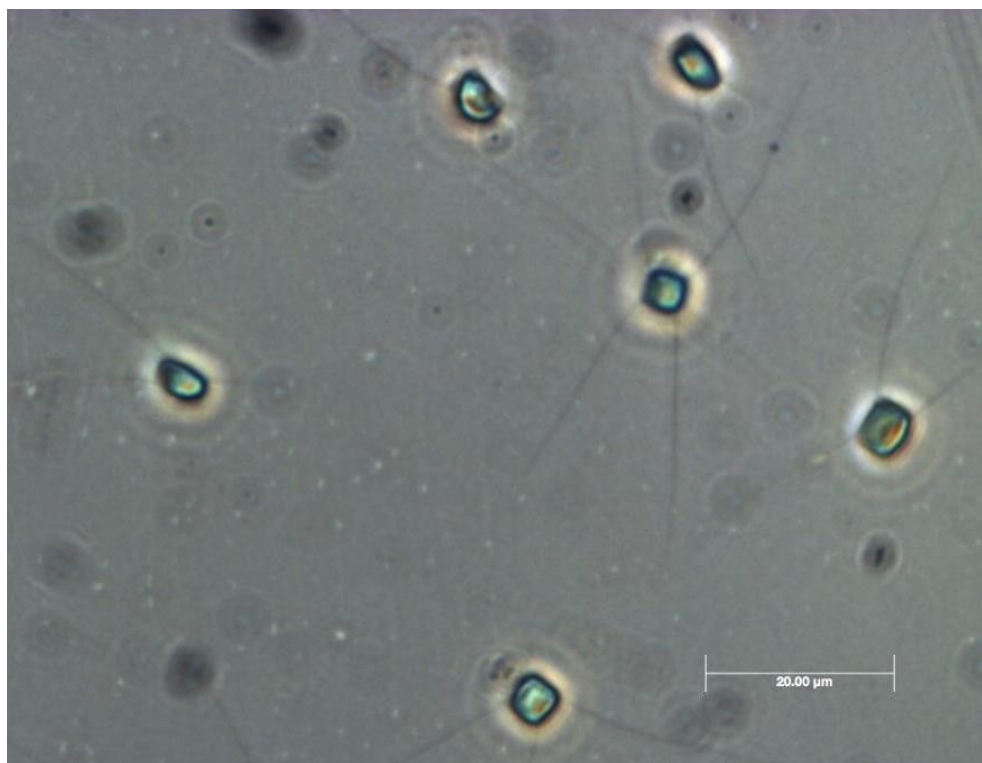


Figura 1. Fotografía *Chaetoceros muelleri* en microscopio 400x

Los juveniles y las larvas de los organismos marinos necesitan PUFA's para satisfacer sus necesidades alimentarias y dependiendo de la etapa de crecimiento, se alimentan con zooplancton o microalgas que contengan un alto contenido de PUFA's (Allen y Nelson, 1910).

1.2.2 Fotobiorreactor

Las microalgas son cultivadas de forma tradicional en sistemas abiertos o cerrados (Borowitzka, 1999a; Pulz, 2001; Chisti, 2007; Pires *et al.*, 2012; de Vree *et al.*, 2015). Los canales de flujo son los sistemas de cultivo más utilizados en cultivos a escala comercial, debido a que presentan bajos costos de inversión y operación. A pesar de esto, los rendimientos de producción de biomasa son menores a los logrados por los sistemas cerrados debido a que dependen del clima local y son contaminados fácilmente por depredadores ya que son sistemas abiertos al ambiente. Por otra parte, los sistemas cerrados tienen un mejor control de las variables de cultivo (Pulz, 2001; Chisti, 2007). Los fotobiorreactores (FBR) son sistemas cerrados que entre sus características tienen el que pierden menos agua por evaporación y CO₂ a la atmósfera respecto a los sistemas abiertos. Los FBR pueden tener diferentes configuraciones: reactores en columnas verticales (airlift o columna de burbuja), reactores tubulares y reactores planos (Brennan y Owende, 2010; Singh y Sharma, 2012; Wang y Horsman, 2012; Bahadar y Khan, 2013). Los reactores por levantamiento de agua por aire ("airlift") tiene un gran potencial en la industria debido a sus bajos volúmenes y a su homogénea hidrodinámica la cual no es lograda en un cultivo abierto (Pires *et al.*, 2017).

El diseño tubular de los reactores es el más apropiado para los cultivos al aire libre, debido a su gran superficie de iluminación creada por los tubos (Cuellar-Bermúdez *et al.*, 2015). Los reactores pueden colocarse en plano vertical, horizontal o inclinado. Los reactores tubulares verticales incrementan el tiempo de contacto de la fase gaseosa y líquida, maximizando la transferencia de CO₂. Sin embargo, esta configuración presenta la desventaja de tener altos costos de bombeo (Pires *et al.*, 2017).

Finalmente, los fotobiorreactores planos permiten alcanzar densidades superiores a lo de otras configuraciones (en más de un orden de magnitud) (Slegers *et al.*, 2011). Aunado a esto, un FBP presenta un menor consumo de energía, mayor capacidad de transferencia de masa, no presenta volúmenes oscuros y tiene alta eficiencia fotosintética (Pires *et al.*, 2017).

Actualmente se cuenta con una gran variedad de diseños de fotobiorreactores. A pesar de esto, la relación superficial total transparente, tanto el volumen líquido así como el volumen gaseoso son variables a considerar en todos los tipos de fotobiorreactores, ya que determinan la cantidad de luz que logra entrar al sistema (Posten, 2009). La cantidad de luz que entra al FBR depende de la razón superficie/volumen (S/V), ya que la luz que entra estimula la fotosíntesis de las microalgas. La relación óptima debe ser determinada para incrementar el rendimiento del fotobiorreactor, asegurando que la biomasa reciba la mayor cantidad de luz posible (Posten, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Montes, 2014).

Los FBRs se caracterizan por tener una eficiente relación superficie/volumen (S/V). Entre mayor sea la superficie transparente, mayor será la luz que penetra al FBR (Montes, 2014). Un FBR está diseñado para optimizar la penetración de la luz, independientemente de ser natural o artificial. Existe un sin número de diseños para los FBR siempre conservando la relación S/V, variables hidrodinámicas y transferencia de gases, logrando un mejor rendimiento de luz absorbida y producción de biomasa (Carvalho *et al.*, 2011). Un ambiente protegido de contaminantes, variables controladas como pH, oxígeno, dióxido de carbono y temperatura; son características de los sistemas de cultivo cerrados. Aunado a esto, los FBR mantiene producciones de calidad constante (Carvalho *et al.*, 2011; Montes, 2014).

1.2.3 Principales variables de cultivo

Los cultivos de microalgas están fuertemente influenciados por la distribución de la luz, temperatura, pH, oxígeno disuelto, concentración de CO₂, calidad y cantidad de nutrientes, la presencia o ausencia de otros microorganismos y finalmente la presencia de elementos tóxicos (metales pesados) (Pires *et al.*, 2017). A continuación, se dará una descripción del efecto y la importancia de las variables a evaluar durante este trabajo.

1.2.3.1 Luz

La luz solar se considera la principal fuente de energía para las microalgas. Tanto las plantas terrestres como las microalgas autótrofas son capaces de transformar la energía lumínica en energía química a través de la fotosíntesis. Debido a esto, la luz es considerada como un parámetro clave en el

cultivo de microalgas (Zijffers *et al.*, 2010; Slegers *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2014). A pesar del amplio rango de longitud de onda que tiene la radiación solar, solo la fracción correspondiente a la luz visible (400 a 700 nm) es utilizada para fotosíntesis. A esta fracción se le conoce como radiación activa fotosintética (PAR por sus siglas en inglés) (Janssen *et al.*, 2003). Sin embargo, altas intensidades de luz producen un efecto conocido como saturación lumínica (fotoinhibición). La fotoinhibición puede darse en las células que crecen en las zonas con mayor exposición durante las horas de mayor irradiación; y en células ubicadas en las capas inferiores (aclimatadas a menor intensidad) bruscamente expuestas a mayores irradiaciones (Grima *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2000). Otro fenómeno importante es el auto sombreado, éste fenómeno ocurre principalmente en cultivos de alta densidad. Sin el diseño correcto, un FBP puede presentar regiones con iluminación extrema y regiones oscuras (Pires, 2017).

La ley Lambert-Beer indica, que la intensidad de la luz disminuye exponencialmente a través del paso de la luz por el medio. Debido a esto, existirán células expuestas a mayores intensidades de luz y otra sin acceso a ella (Blanken *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2017). Estudios han demostrado que la mejor forma de optimizar la eficiencia fotosintética de los cultivos es utilizar fotoperiodos, alternancia entre periodos luz y oscuridad, estos han demostrado incrementar exponencialmente la productividad de biomasa (Sastre *et al.*, 2007; Posten, 2009), aun utilizado intensidades superiores a la de saturación (Grobbelaar *et al.*, 1996; Pires *et al.*, 2017). En términos de diseño del FBP, mejorar el proceso de mezclado permitirá alternar la biomasa entre las regiones iluminadas y con diferentes intensidades lumínicas dentro del FBP, promoviendo cortos periodos luz/oscuridad (Pires *et al.*, 2017). Existen pocos trabajos sobre el modelado de crecimiento celular limitado por luz en FBP. La luz se atenúa por absorción y dispersión a medida que penetra en el cultivo que contiene biomasa y otras moléculas (nutrientes) (Kroon *et al.*, 1989; Cornet *et al.*, 1992; Grima *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1998; Benson y Rusch, 2006; Benson *et al.*, 2007; Huesemann *et al.*, 2013). A pesar algunos modelos no contemplan la dispersión de la luz o la absorción de luz por el agua y los componentes del medio de cultivo, se puede considerar como una primera aproximación al régimen lumínico de cultivos microalgales de alta densidad (Huesmann *et al.* 2013; Pires *et al.*, 2015; Schreiber *et al.*, 2017).

1.2.3.2 Temperatura

La temperatura es una variable importante en los cultivos de microalgas, debido a que influye en actividades metabólicas, enzimáticas y formación de estructuras vitales (Renaud *et al.*, 2002; Butterwick

et al., 2005; Goncalves *et al.*, 2016). Basándose en la tolerancia de las microalgas a la temperatura se pueden clasificar en 3 grupos: psicofílica (16 a 20°C), mesófila (20 a 25°C) y termófila (25 a 35°C) (Chen y Berns, 1980). Cultivos a temperaturas por debajo de los 16°C las tasas de crecimiento disminuyen considerablemente. Debido a que actividades metabólicas se ven severamente reducidas, mientras que temperaturas superiores a los 35°C son letales para algunas especies. Aunado a esto, la solubilidad de los gases es menor en altas temperaturas (CO_2 y O_2) (Pires *et al.*, 2017).

1.2.3.3 pH

La disponibilidad y asimilación de nutrientes disueltos en el medio son fuertemente influenciados por el pH. Además, influye en la precipitación de fosfatos, la volatilización del amoníaco, la solubilidad de los metales traza y el equilibrio químico entre las especies de carbono (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) (Sayre, 2010; Pires *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015). Algunas especies de microalgas son sensibles a bruscos cambios en el pH. El rango promedio de pH en los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, siendo entre 8.2 y 8.7 los valores óptimos generalmente (Bitog *et al.*, 2011; Barsanti y Gualteri, 2014). Durante los cultivos de alta densidad es común que los valores de pH se incrementen. Sin embargo, los valores de pH no adecuados para un cultivo, pueden ser corregidos mediante la adición de CO_2 (Comunicación personal Cordero-Esquivel, 2017) o agregar gotas de algún ácido moderado/fuerte (Ácido Fosfórico) (Barsanti y Gualteri, 2014). El uso de Tris como tampón (buffer) también es utilizado para mantener el pH entre 8 y 9 (Fábregas *et al.*, 1993).

1.2.3.4 CO_2 , O_2 y Rubisco

El carbono es uno de los nutrientes más importantes para el cultivo de microalgas, siendo casi el 50% de su peso seco en biomasa. La fuente de carbono más común para los cultivos de microalgas es el CO_2 (disuelto en corrientes de aire), HCO_3^- y CO_3^{2-} (disuelto en medio de cultivo). Al disolverse el CO_2 en solución acuosa permite la formación de ácido carbónico, este compuesto es utilizado por las microalgas durante la fotosíntesis. De igual manera, como se mencionó anteriormente, juega un papel importante en la regulación del pH. La transferencia de CO_2 del medio gaseoso al líquido se encuentra restringido por el coeficiente de transferencia de masa (Carvalho *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2013). De acuerdo a la ley de

Frick, una forma de mejorar la transferencia de masa es reduciendo el tamaño de burbuja, mejorando la relación área-volumen, ascenso más lento de la burbuja lo que lleva a una disolución más eficiente (Zimmerman *et al.*, 2011; AL-Mashhadani *et al.*, 2015).

El oxígeno producido por fotosíntesis puede acumularse en el medio de cultivo, concentraciones por encima de 400% de saturación del aire (valores superiores 30 mg L⁻¹, suponiendo que la solubilidad en el equilibrio de O₂ es de 7.5 mg L⁻¹ a 30°C) (Molina *et al.*, 2001; Chisti, 2007; Kunjapur y Eldridge, 2010) pueden producir daño fotooxidativo (Molina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015).

La ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) carboxilasa/oxidasa es una enzima altamente conservada en organismos fotosintéticos. Cuando hay disponibilidad de CO₂, la enzima rubisco cataliza carboxilación de la RuBP. Sin embargo, el O₂ es un inhibidor competitivo, ya que compite por el sitio activo produciendo fotorrespiración (produce una molécula de 3 fosfoglicerato y fosfoglicolato) (Plastino y Mansilla, 2004). Durante este proceso no se realiza la fijación de carbono. El fosfoglicolato no es útil para la célula, ya que requiere un fuerte gasto metabólico para recuperar esos átomos de carbono (Plastino y Mansilla, 2004). Para evitar este proceso, se debe agregar corrientes de aire con una concentración de O₂/CO₂ adecuada, una turbulencia adecuada permite la liberación del oxígeno y una mejor transferencia del CO₂ (de Godos *et al.*, 2014; Posadas *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2017).

1.2.4 Tipos de cultivo

Existen diferentes formas de cosechar un cultivo. En función de esto, los cultivos se clasifican en cultivos por lote (batch), cultivos semicontinuos y cultivos continuos. En los cultivos por batch, únicamente existe entrada de nutrientes al inicio del cultivo y la población de microalgas se incrementa hasta que algún nutriente, factor externo o metabolito de desecho se convierta en un factor limitante, esto conlleva a la muerte del cultivo (Barsanti y Gualteri, 2006).

Un cultivo semicontinuo es aquel donde una parte del cultivo es cosechado y repuesto con medio de cultivo fresco. Normalmente se cosecha y se le adiciona medio nuevo. Esto se realiza cada 24 horas con el fin de mantener al cultivo en fase de crecimiento exponencial durante más largo de tiempo. A pesar de que los nutrientes dejan de ser un factor limitante, existen otros factores como acumulación de

metabolitos de desecho o aumento en la concentración de bacterias en el cultivo. Debido a esto, el tiempo que se puede mantener un cultivo es variable (Barsanti y Gualteri, 2006).

Un cultivo continuo es aquel en donde la población de microalgas se mantiene constante por un tiempo indefinido, esto se logra mediante la adición constante de medio fresco y la remoción de biomasa equivalente al volumen agregado. De esta manera se mantienen condiciones constantes de nutrientes y densidad celular (Barsanti y Gualteri, 2006).

El equilibrio de un cultivo continuo y semicontinuo dependerá, además del equilibrio del volumen cosechado y del volumen adicionado, de la tasa de crecimiento que permita lograr un balance en la cantidad de biomasa producida.

1.3 Justificación

Actualmente el interés por la producción de microalgas en diferentes industrias ha incrementado debido a que las microalgas tienen alta capacidad para ser productora de compuestos con alto valor comercial. Sin embargo, el mayor reto al que deben enfrentarse los biotecnólogos de microalgas, es la obtención de rendimientos en cultivos masivos en valores inferiores a los obtenidos a nivel laboratorio, lo anterior es derivado de la gran cantidad de variables que deben ser consideradas y estandarizadas.

Los diferentes tipos de FBRs que existen a nivel comercial, entre ellos los FBP aún no son totalmente eficientes y a pesar de que se han realizado diferentes diseños para maximizar los cultivos de microalgas, es necesario continuar en el desarrollo de nuevos FBPs y así obtener mayores densidades y reducir los costos de producción. Pese a las ventajas asociadas con producción de microalgas, es necesario estudiar varios fenómenos antes de la aplicación de fotobiorreactores a escala planta piloto o industrial. Como se ha mencionado, el diseño y optimización de un fotobiorreactor son factores importantes en la producción de microalgas, por lo que el modelado de un fotobiorreactor contribuye a avances rápidos evitando realizar experimentos repetidos y reduciendo así recursos valiosos asociados a tiempo experimental, costo y esfuerzo mantenido cultivos experimentales.

1.4 Hipótesis

El rendimiento de la producción de microalgas cultivados en batch será similar cuando se cultive en fotobiorreactores con diferentes dimensiones (10, 15 o 20 cm de ancho) y mayor que la producción de microalgas en sistemas tradicionales (garrafón) de cultivo.

1.5 Objetivo general

Determinar el modelo de cinética de crecimiento para la microalga *Chaetoceros muelleri* cultivada en un fotobiorreactor plano.

1.6 Objetivos Específicos

1. Determinar la dimensión óptima del fotorreactor para el cultivo de *Chaetoceros muelleri*.
2. Determinar y proveer la fuente de iluminación que permita irradiar uniformemente el fotobiorreactor.
3. Evaluar la calidad del agua durante el cultivo de *Chaetoceros muelleri* en el fotobiorreactor plano.
4. Realizar un balance de materia para los nutrientes tanto en la entrada como en la salida del fotobiorreactor.
5. Determinar el modelo cinético de crecimiento para la microalga *Chaetoceros muelleri* en cultivo tipo batch.
6. Caracterizar el perfil nutricional (proteínas, lípidos y carbohidratos) de la microalga *Chaetoceros muelleri* durante el cultivo.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de cepa y cultivo de pre-inoculo.

La cepa de la microalga *Chaetoceros muelleri* fue donada por el cepario del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La cepa se cultivó en medio de cultivo f/2 preparado de acuerdo a la metodología descrito por Guillar y Ryther en 1962. El medio de cultivo fue esterilizado en autoclave (Modelo 18-A-16L Biomega, USA) por 30 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.05 kg cm⁻². El cultivo de microalgas se incrementó comenzando con un matraz Erlenmeyer de 12 mL con 100 mL de medio hasta cultivos en garrafón (20 L) y fotobioreactor de distintos volúmenes. Al encontrarse el cultivo en fase exponencial, fue utilizado como inóculo para iniciar el cultivo en un matraz de 1 L con 800 mL de medio. Posteriormente, se utilizó el cultivo de 800 mL para inocular garrafones de vidrio de 20 L con un volumen de 15L. El cultivo del pre-inóculo se mantuvo a una condición de luz constante entre 120-160 μmol m⁻² s⁻¹ con lámparas de halógeno de luz blanca (PHILIPS, F40D/XPT. USA). Para comenzar los cultivos todos los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 1x10⁵ células mL⁻¹.

2.2 Sistemas de cultivo

El sistema experimental estuvo formado por los FBPs, el sistema de tratamiento de agua y el panel de control para la luz. Para esto, se diseñaron y construyeron nueve FBPs. Tres con capacidad de 7.3 L (10 cm de ancho y 30.48 cm de radio) (tratamiento 1, T1), tres con capacidad de 11 L (15 cm de ancho y 30.48 cm de radio) (tratamiento 2, T2) y otros tres con capacidad de 14.6 L (20 cm de ancho y 30.48 cm de radio) (tratamiento 3, T3) (Figura 2). El sistema de pasteurización de agua consistió en un filtro mecánico compuesto de filtros con un tamaño de poro de 25, 10, 5 y 1 μm y el uso de una lámpara de luz UV. Una vez filtrada el agua, ésta fue pasteurizada a 60°C durante 15 minutos. El agua pasteurizada fue agregada a los FBP mediante tubería de PVC de 1.27 cm diámetro, cédula 40 de tipo sanitario. Luego, se agregó el doble de los nutrientes (ProLine® F/2) recomendada por el fabricante para conseguir medio “f”. Como tratamiento control se utilizaron garrafones de vidrio con capacidad de 20 L (tratamiento control, T0).

El suministro de aire para los FBPs fue proporcionado por un soplador de 1.25 hp, el aire se inyectó de manera continua a un flujo constante, a través de tubería de PVC de 1.905 cm de diámetro, cédula 40 de tipo sanitario y manguera plástica de 0.635 cm de diámetro. Debido a las limitaciones del equipo que cuenta el laboratorio, no se midió el flujo de aire. Sin embargo, se ajustó de manera visual. Como tratamiento preventivo y para evitar contaminación proveniente del sistema de aireación, el sistema de aire se filtró con filtros de 10, 5 y 1 μm . El cultivo en FBP se mantuvo a una condición de luz constante entre 120 y 125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con lámparas LEDs de luz roja azul proporción 7:2, fotoperiodo 24:0 (luz:oscuridad) y temperatura $17\pm 1^\circ\text{C}$. No se suministró bicarbonato y las microalgas utilizaron el CO_2 presente en el aire.

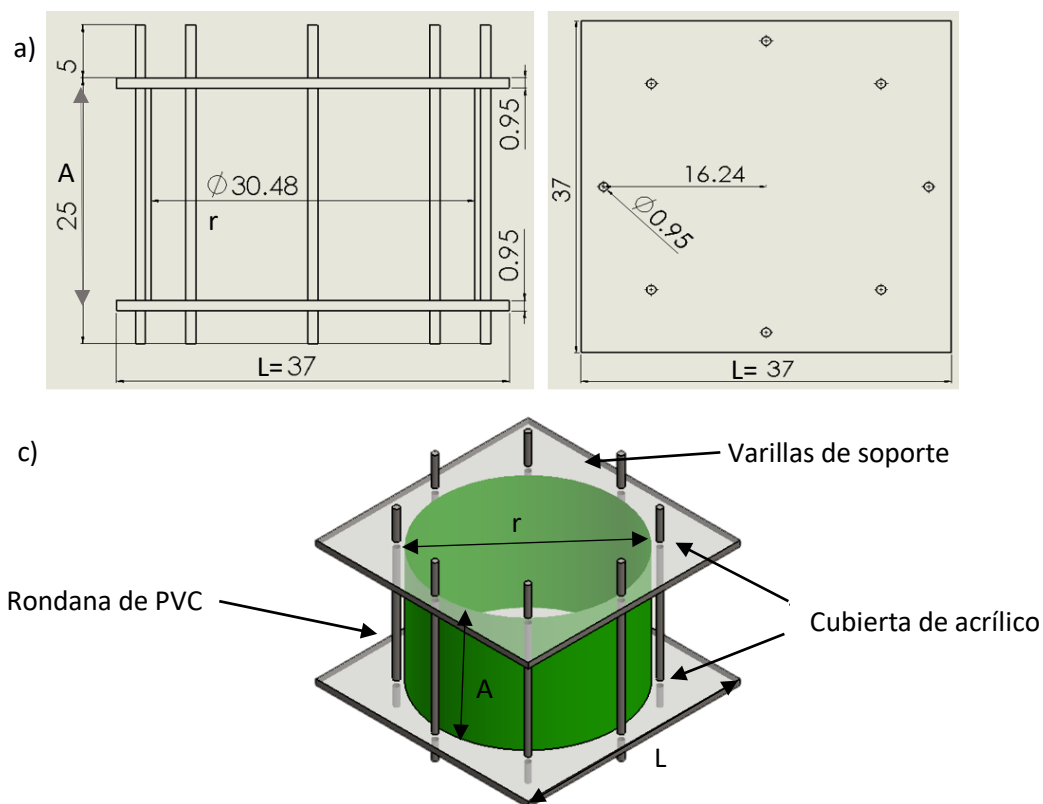


Figura 2. Configuración del FBP de 20 cm de ancho; A representa el ancho del fotobiorreactor; r representa el radio del fotobiorreactor; L representa el largo del acrílico que cubre al fotobiorreactor. A) Corte lateral del fotobiorreactor plano medidas en cm. B) Vista frontal del fotobiorreactor plano distancias en cm. C) Descripción general del fotobiorreactor plano.

2.3 Preparación de los FBP

Antes de iniciar los experimentos, los FBP y todos los componentes del sistema (manguera, tubos, válvulas, etc.) fueron lavados con jabón para uso de laboratorio (Alconox) y enjuagados con agua corriente. Al finalizar el protocolo de profilaxis, el sistema se llenó con agua de mar filtrada y pasteurizada. Una vez que el agua del FBR alcanzó la temperatura ambiente se agregaron los nutrientes en las concentraciones anteriormente especificadas.

2.4 Medición de la luz

La luz se midió dentro y fuera del FBP utilizando sensores similares a los diseñados por Ricklet *et al.* (2016), los cuales se ubicaron en diferentes puntos del FBR (Anexo A) y permitieron monitorear la intensidad de luz durante todo el cultivo. La irradiancia se consideró como una integral por día (24 h), para poder tener una buena aproximación de la irradiancia real dentro del FBP en función del tiempo. Las unidades utilizadas para esta medición fue $\mu\text{mol m}^{-2} \text{día}^{-1}$.

El modelo propuesto por Huesemann (2013) (Ec. 1) no contempla absorción por el medio de cultivo, el material del FBP o ángulo de incidencia por lo que se realizaron mediciones *in situ* para determinar una constante o un factor de atenuación y obtener una aproximación mayor a la realidad.

$$I(z) = I_0 * e^{-k_a X z} \quad (1)$$

Donde $I(z)$ es la irradiancia a una distancia z , I_0 representa la irradiancia inicial, k_a representa el coeficiente de absorción de la biomasa, X representa la concentración de biomasa y finalmente z representa la distancia a la fuente de iluminación.

2.5 Fuente de iluminación

Para lograr una iluminación uniforme para los cultivos, se diseñaron fuentes de iluminación utilizando lámparas LED (sin marca/genérico) las cuales se caracterizaron para conocer la distancia óptima entre LEDs de acuerdo a la metodología descrita por Moreno *et al.* (2006).

El diseño del circuito impreso del panel de iluminación se realizó utilizando el software Corel Draw 10 (Figura 3). La plantilla impresa se utilizó como molde para trazar las pistas del circuito en una placa de cobre y se removió el cobre restante utilizando la técnica de agua fuerte, la cual consiste en ácido clorhídrico 1 M y peróxido de hidrógeno (30% w/w) como catalizador.

Se realizó un análisis espectral de la lámpara LED así como de la lámpara fluorescente utilizando un espectrofotómetro OceanOptics USB650 con resolución 1nm.

Para determinar los picos máximos de emisión de la lámpara fluorescente y la lámpara LED se realizó un ajuste no lineal para los diferentes espectros de luz, en el caso de la lámpara fluorescente se realizó un ajuste de 7 gaussianas con el fin de tomar en cuenta la mayor cantidad de picos. La lámpara LED un ajuste no lineal de 2 gaussianas debido a que solo posee dos picos de emisión.

2.6 Procesamiento de imágenes

En esta sección se explica cómo se midió la dirección de flujo dentro del FBR. Para trazar el campo vectorial de velocidad dentro del FBR se agregó un colorante vegetal al FBR y se grabó utilizando una cámara de alta resolución a una velocidad de 120 cuadros por segundo (fps, por sus siglas en inglés), utilizando el software MatLab R2017b se realizó un procesamiento del video utilizando la función “quiver” para seguir el frente del colorante, de esta manera se obtuvo la velocidad relativa del fluido.

Para determinar el tamaño de burbujas se utilizaron los mismos videos y utilizando la función “ginput” se seleccionaron puntos para determinar el radio de las burbujas.

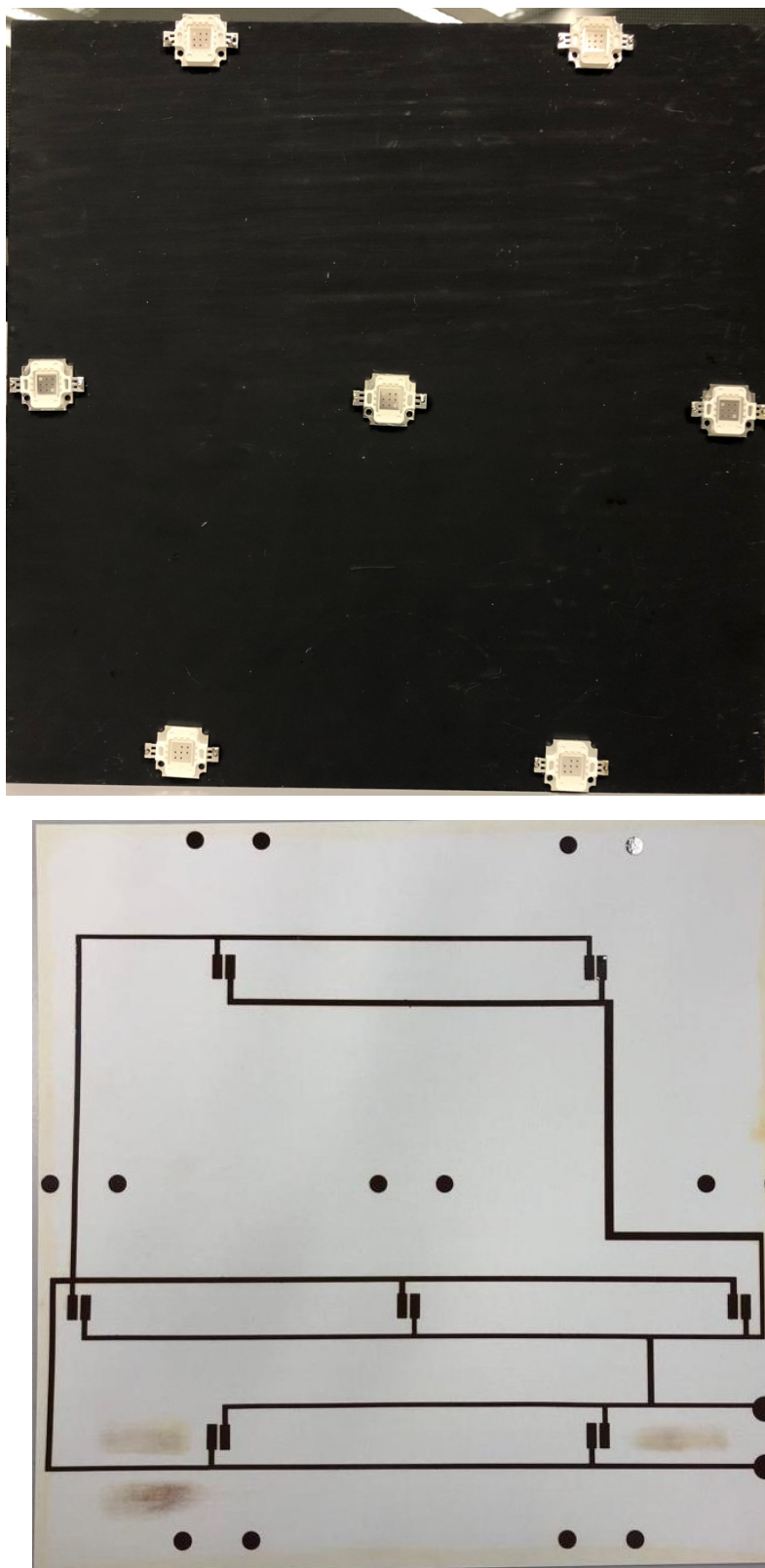


Figura 3. Plantilla de circuito para el panel de iluminación. LEDs conectados en paralelo para lograr una distribución homogénea del amperaje. Las zonas con + o - indican la polaridad.

2.7 Condiciones de cultivo de FBP

El experimento consistió en evaluar el rendimiento del FBP (cél mL⁻¹) utilizando los diferentes anchos (10, 15 y 20 cm), los tratamientos se realizaron por triplicado bajo las condiciones descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de cultivo del *Chaetoceros muelleri* para el experimento en garrafón y fotobiorreactor plano (10 cm, 15 cm y 20 cm) en batch.

Parámetros	Condiciones de cultivo
Intensidad lumínica	120-125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Temperatura	21°C
Medio de cultivo	ProLine® f+silicatos
Inóculo inicial	100,000 células mL ⁻¹
Fotoperiodo (luz:oscuridad)	24:0
Tipo de agua	Agua de mar pasteurizada
Tiempo de cultivo	10 días

2.8 Calidad de agua

Para determinar la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹), se tomaron alícuotas de 5 mL de agua de mar en 3 puntos del sistema (tanque de reserva, después del filtro y la lámpara UV y dentro del FBP posterior a la pasteurización) y agua de mar esterilizada en autoclave a condiciones estándar como control negativo, para observar la reducción de la carga bacteriana. Se realizaron diluciones con suero fisiológico hasta 10⁻³ donde fue necesario. Se tomó 0.1 mL de cada muestra y se inoculó en cajas Petri con 20 mL de medio Zobell. Se incubaron en una mini incubadora VWR a 31°C durante 48 horas. Finalmente se realizó el conteo de las colonias (Murray *et al.*, 1981). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Se tomaron alícuotas del medio de cultivo (15 mL) de todos los FBPs para las pruebas de calidad de agua. Las variables que se midieron diariamente durante toda la parte experimental fueron: Nitrógeno Amoniacal Total (NAT), nitratos (N-NO₃), nitritos (N-NO₂), fosfatos (P-PO₄), CO₂, salinidad, alcalinidad, pH

y temperatura. Las pruebas de NAT, N-NO₃, N-NO₂ y P-PO₄ se realizaron por quintuplicado. El CO₂, salinidad, alcalinidad y pH se realizaron por triplicado.

El NAT se determinó mediante el método de Solorzano (1969), método azul indofenol descrito en Adams (1989) y la longitud de onda para la lectura de la muestra fue 640 nm. La determinación de nitratos (NO₃) por el método descrito por Adams en 1989; esta técnica se realizó utilizando una microplaca de cuarzo y se leyó la muestra a 275 y 220 nm. Los nitritos (NO₂) se analizaron por la técnica "Griess-Ilosvay" la muestra fue incubada por aproximadamente 5 min para que ocurriera la reacción antes de leerla en espectrofotómetro (435 nm). Los fosfatos se analizaron por la espectrofotométrica de Tetrafenilborato de sodio descrita en APHA (1998). La reacción se dejó correr por al menos 30 minutos y posteriormente se leyó a 863 nm. El CO₂ se determinó de manera indirecta como describe Piedrahita y Seland (1995) utilizando el software "CO₂ analysis" y la salinidad se midió utilizando un refractómetro. La alcalinidad se determinó por el método descrito en Adams (1989) utilizando una solución de ácido sulfúrico 0.02M, el pH se midió con la ayuda de un potenciómetro AE150 (Fisher Scientific) y la temperatura con un termómetro digital.

2.9 Determinación de biomasa y análisis proximal

Para evaluar la cantidad de la biomasa celular de los cultivos en cada condición experimental, se realizaron conteos con una cámara de Neubauer o hematocitómetro siguiendo el protocolo descrito por (Arredondo y Voltolina, 2007). En caso de ser necesaria una dilución, esta se realizó con agua de mar pasteurizada.

Para determinar la composición proximal de las microalgas cultivadas en cada uno de los FBP se tomaron alícuotas de 15 mL de cada FBP diariamente. Para determinar el peso seco total, cenizas y análisis proximales, primeramente, las alícuotas fueron lavadas con formiato de amonio al 0.5 M para evitar interferencia por sales (Zhu y Lee, 1997). El lavado consistió en agregar 10 mL de la solución de formiato de amonio a la alícuota del cultivo y se dejó reposando durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5500 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, se enjuagó con un máximo de 2 mL de agua destilada y se volvió a centrifugar a 5500 rpm por 5 min para nuevamente eliminar el sobrenadante antes

de ser liofilizadas (-89°C, 0.1 mBar durante 24 horas). El peso orgánico se determinó a partir de restar el peso de cenizas al peso total (Arredondo y Voltolina, 2007).

La extracción de proteínas se llevó a cabo realizando la lisis celular a través de 3 baños de ultrasonido de 15 min (marca: Cole Parmer; modelo: 08895-21 cole parmer) (Arredondo y Voltolina, 2007). La concentración proteica se determinó por el método de Lowry. La extracción de carbohidratos se midió mediante la técnica de Whyte, 1987 y la cuantificación por la técnica de Dubois *et al.* (1965). La recuperación de lípidos se realizó utilizando la mezcla cloroformo/metanol (Bligh y Dyer, 1959) y la cuantificación se realizó por el método descrito por Pande *et al.* (1963). La extracción y cuantificación de pigmentos (clorofila: a, b y c, carotenos) se realizó con la metodología descrita por Sánchez-Mirón *et al.* (2002). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Se determinaron las tasa de producción de proteínas, lípidos y carbohidratos normalizando la cantidad de dichos macroelementos por célula (ng número de célula⁻¹) utilizando el algoritmo Levenberg-Marquardt se realizaron ajustes polinomiales que describieron la tendencia de los macroelementos en el tiempo.

2.10 Cinética de crecimiento

En esta sección se presentan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la biomasa, se utilizó un modelo propuesto a partir de los datos obtenidos de calidad de agua. Este modelo no considera el efecto de auto sombreado, pH, flujo de aire, fuerzas de corte (sheer strees) y otras fuerzas hidrodinámicas.

Se utilizó como modelo matemático, uno logístico para modelar el crecimiento de *C. muelleri* debido a que las microalgas se caracterizan por tener un crecimiento lento al inicio y al final del cultivo. De igual manera presentan velocidad a la cual las células se puede dividir y existe una relación entre el número de células y la cantidad de nutrientes que existen en el medio (2).

$$\frac{dX}{dt} = cN \ln \left(\frac{k}{\bar{X}} \right) \quad (2)$$

Integrando la ecuación 1 se obtiene la ecuación utilizada en este estudio (3).

$$X = ae^{-be^{(-ct)}} \quad (3)$$

Donde X es la concentración de biomasa, a, b y c son constantes integrativas.

Para calcular la tasa de crecimiento se recalculó la tasa de crecimiento con los parámetros integrativos a, b y c, dando como resultado la ecuación 4.

$$\frac{dX}{dt} = \mu(t) = abce^{-be^{-ct}-ct} \quad (4)$$

Para calcular μ_{max} fue necesario calcular el punto de inflexión, para esto se calcula la tercera derivada (5,6,7).

$$\frac{d^2X}{dt^2} = -abc^2e^{-be^{-ct}-2ct}(e^{cX} - b) \quad (5)$$

$$\frac{d^2X}{dt^2} = 0 \rightarrow t_{max} = \frac{\ln(b)}{c} \quad (6)$$

$$\mu(t_{max}) = \mu_{max} = \frac{a}{e} \quad (7)$$

$$a = Ln \left(\frac{N_{\infty}}{N_0} \right) \quad (8)$$

Utilizando el algoritmo Levenberg-Marquardt se realizó el ajuste de los datos de crecimiento al modelo propuesto (Ec. 3).

2.11 Análisis estadístico

Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los residuales a través de las pruebas estadísticas de Shapiro-Wilk (normalidad) y la prueba de Levene's (homocedasticidad) (Zar, 1984).

Se utilizó una ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas entre el ancho de los FBR respecto a producción y composición proximal (proteínas, lípidos y carbohidratos) de la biomasa. Un

análisis de covarianza (ANCOVA) fue utilizado para determinar diferencias significativas de la calidad de agua (NAT, nitritos, nitratos, fosfatos y pH) entre los anchos de los FBR. El tiempo fue considerado como covariable. Una prueba *a posteriori* Tukey fue utilizada para determinar diferencias específicas. Un alfa de 0.05 fue utilizado como nivel de significancia (Zar, 1984). Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Minitab 17.

Capítulo 3. Resultados

En este capítulo se describen los principales resultados obtenidos en el presente trabajo, comenzando con la caracterización de la fuente de iluminación.

3.1 Fuentes de iluminación

La ecuación que describe la relación que existe entre la potencia (μW) de la lámpara y la distancia del fotodetector a la fuente “ r ” (cm) fue $E = 0.05*(r+0.4)^{-1.104}$ (coeficiente de determinación $R^2 = 0.996$; $P = 0.001$, $P(a) = 0.001$, $P(b) = 0.001$, $P(c) = 0.001$) (Figura 4).

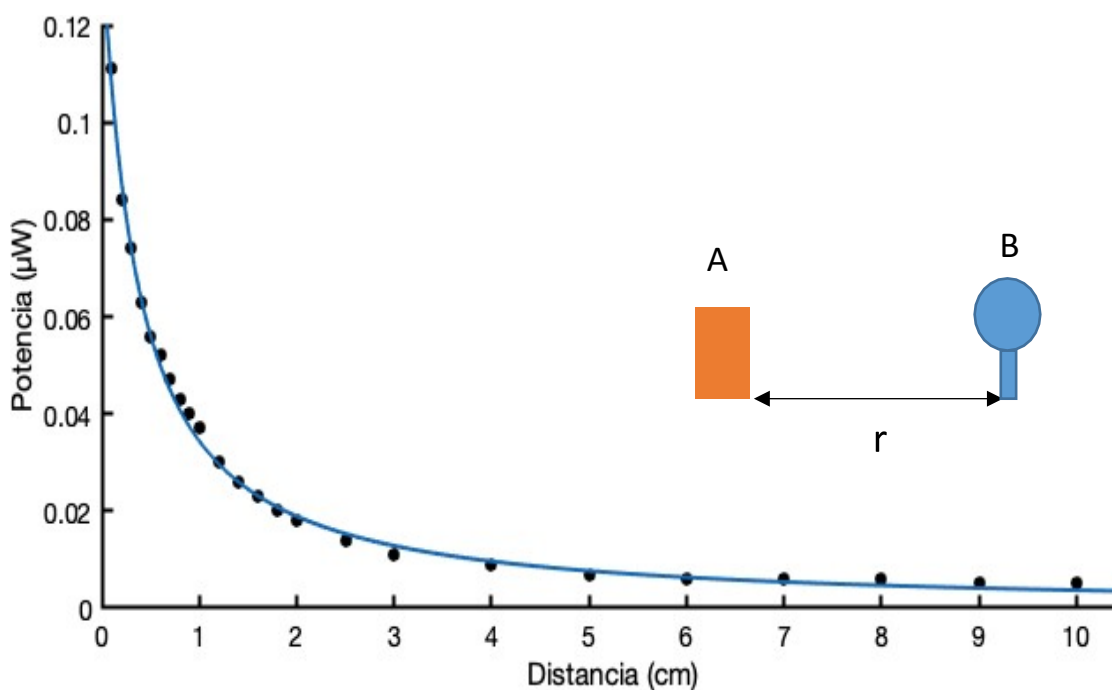


Figura 4. Ajuste de la ley de cuadrado inverso para la fuente de iluminación (A) del fotobiorreactor plano; r representa la distancia de la fuente al fotodetector (B), a representa I_{max} (Irradiancia máxima), b representa coseno del ángulo de la fuente y c es la proporción a la cual disminuye la irradiancia.

La distancia máxima entre los LEDs de la fuente de iluminación de los FBP fue de aproximadamente 80 cm (Tabla 2). La prueba confirmativa para una distancia de 15 cm entre LEDs indicó que no hubo diferencias significativas en la potencia emitida por la lámpara LED a 15 cm con la distancia calculada de 80 cm ($\mu = 43 \mu\text{W}$; $P = 0.071$; Figura 5). No existieron diferencias significativas en la potencia emitida por la lámpara LED en 15 cm de separación.

Tabla 2. Caracterización del LED (sin marca/genérico) rojo:azul 7:2 picos máximos de emisión 625 nm y 440 nm; E representa la irradiancia, θ es el ángulo en radianes.

	Teórico	Experimental
m	5.335	5.217
Ecuación $E(r, \theta) = E_0 \cos^m \theta$	$E = 67.65 \cos^{5.335} \theta$	$E = 66.6 \cos^{5.217} \theta$
Distancia máxima entre LEDs	79.27 cm	78.54 cm

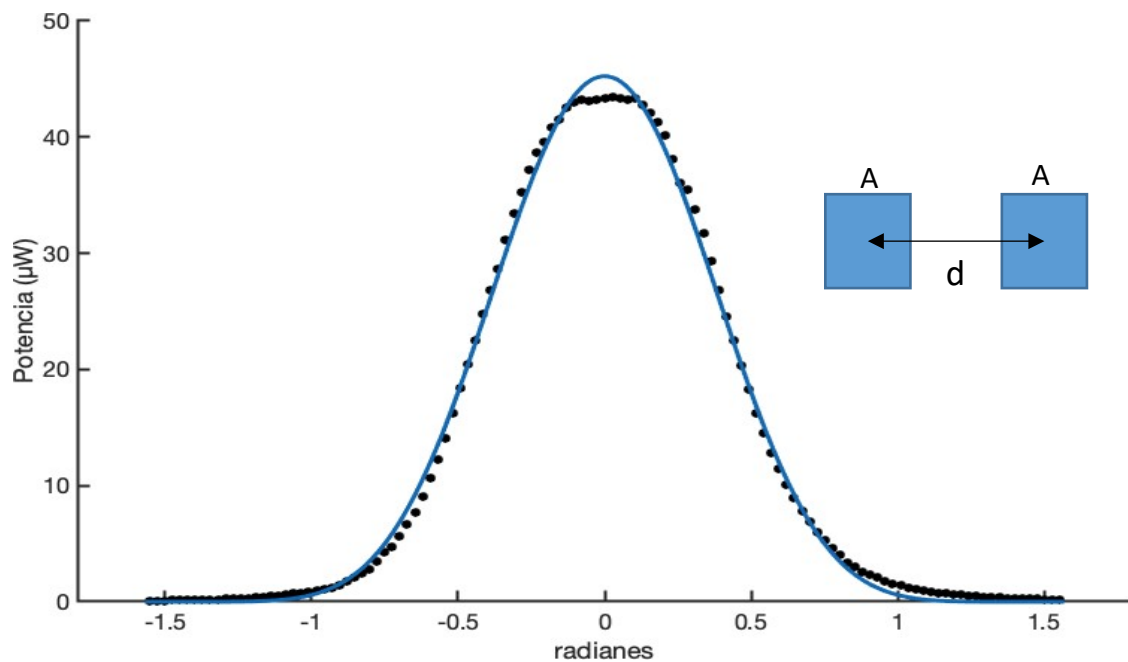


Figura 5. Potencia de dos LEDs a 15 cm de distancia entre el centro de los LEDs; A representa un LED; d la distancia entre los LEDs; los círculos sólidos representan los datos experimentales, la línea azul representa el modelo descrito ($E = 66.6 \cos^{5.217} \theta$); E representa la irradiancia, θ es el ángulo en radianes.

La emisión espectral de la lámpara de LED mostró picos de emisión diferentes a los de la lámpara fluorescente (Figura 6a). Los picos de emisión para la lámpara (PHILIPS, F40D/XPT. USA) fueron en 435 nm, 610 nm, 545 nm, 553 nm, 612 nm 514 nm y 536 nm ($R^2 = 0.9889$; $P = 0.001$ Tabla 5) y para la lámpara de LED 626 nm y 446 nm (Figura 6b, $R^2 = 0.9806$, $P = 0.001$, Tabla 5).

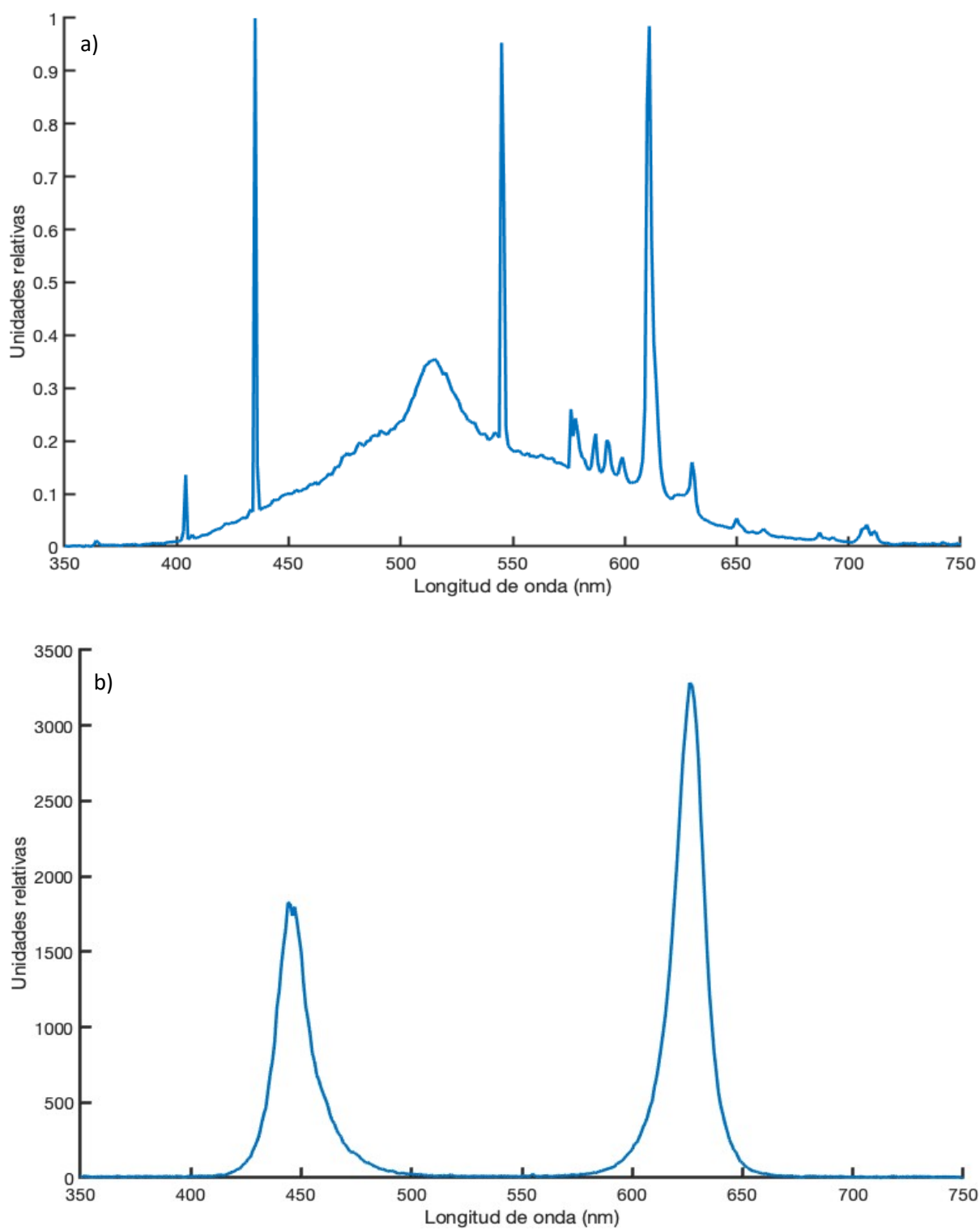


Figura 6. Espectro de emisión de en unidades relativas (UR) a) lámpara fluorescente(PHILIPS, F40D/XPT. USA). b) lámpara LED de 350 a 750 nm.

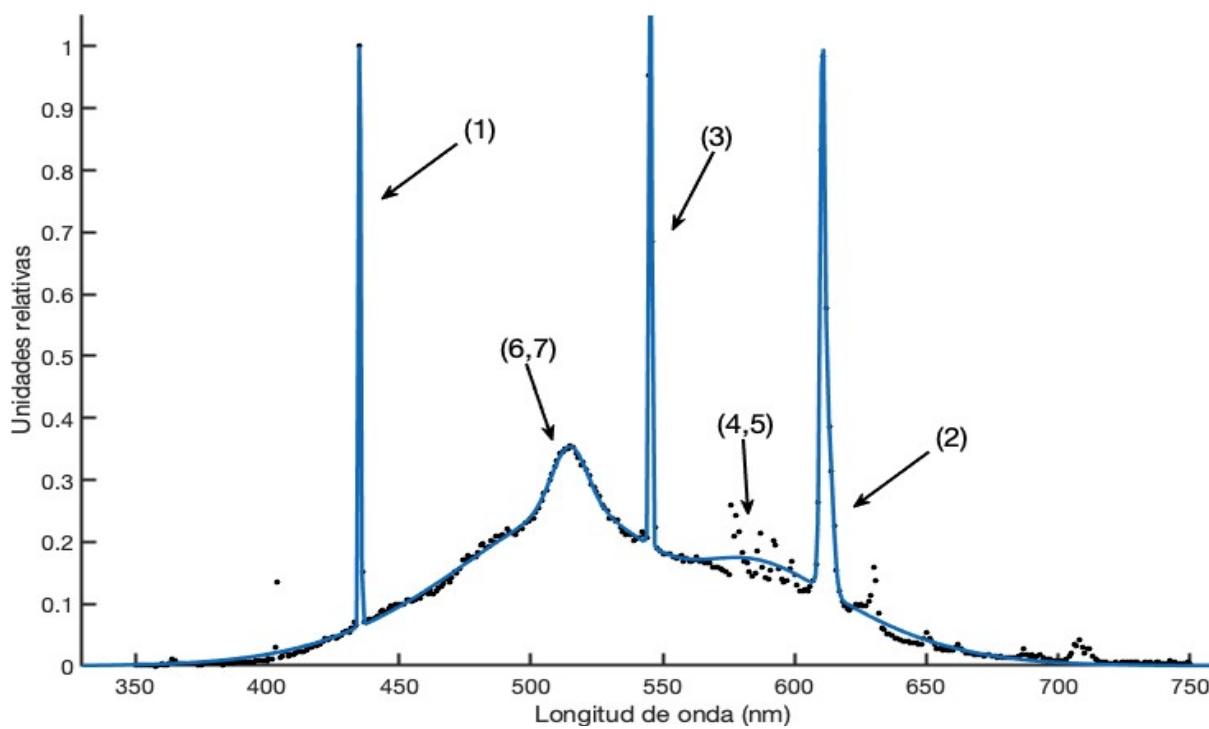


Figura 7. Espectro de lámpara fluorescente (PHILIPS, F40D/XPT. USA; círculos negros), 350 a 750 nm con regresión gaussiana (UR unidades relativas; línea azul) en unidades relativas.

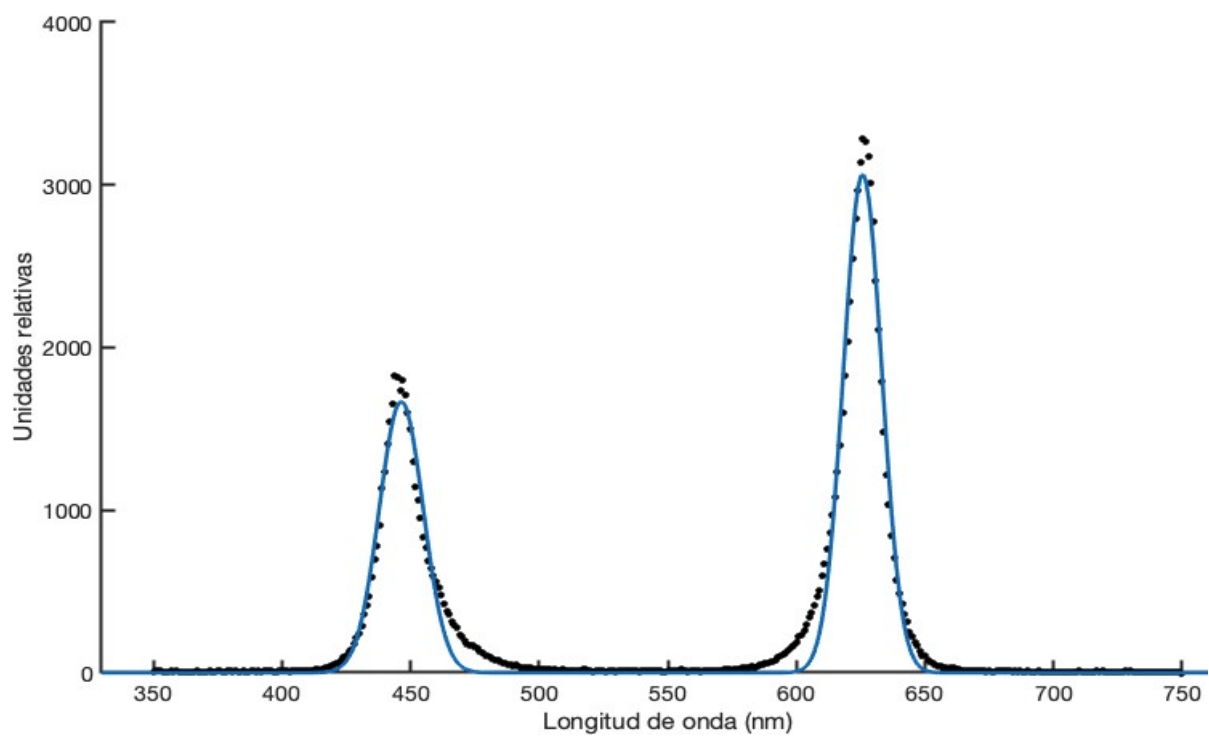


Figura 8. Espectro de lámpara LED (sin marca/genérico; círculos negros), 350 a 750 nm con regresión gaussiana (línea azul) en unidades relativas.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión de los espectros de emisión y parámetros integrativos de la lámpara fluorescente (PHILIPS, F40D/XPT. USA) y LED (sin marca/genérico); donde a el punto más alto de la campana, b el punto medio de la campana y c el ancho a la mitad de la campana y n el número de gaussiana.

Tipo de lámpara	Ecuación de ajuste	n	a(n)	b(n)	c(n)
Lámpara fluorescente	$f(x) = a1 * \exp(-((x-b1)/c1)^2) + a2 * \exp(-((x-b2)/c2)^2) + a3 * \exp(-((x-b3)/c3)^2) + a4 * \exp(-((x-b4)/c4)^2) + a5 * \exp(-((x-b5)/c5)^2) + a6 * \exp(-((x-b6)/c6)^2) + a7 * \exp(-((x-b7)/c7)^2)$	1	1.084	435.2	0.508
		2	0.766	610.5	1.158
		3	1.066	545.4	0.684
		4	-0.0936	553.3	28.38
		5	0.2803	612.5	2.553
		6	0.1028	514.7	9.382
		7	0.2845	536	82.21
Lámpara LED	$f(x) = a1 * \exp(-((x-b1)/c1)^2) + a2 * \exp(-((x-b2)/c2)^2)$	1	0.933	625.8	10.56
		2	0.507	446.4	12.06

Con el espectro de emisión de la lámpara fluorescente y la lámpara LED y el espectro de absorción de los pigmentos se superpusieron los espectros (Figura 9, Figura 10) donde se observa que la emisión del LED tiene su emisión en la zona de absorción de la clorofila a y c.

La emisión de la lámpara de fluorescente también entra en el espectro de absorción de la clorofila; sin embargo, el porcentaje de emisión en la región azul (400-500 nm) es menor comparada con la del LED y de la misma manera en la región roja (600-700 nm).

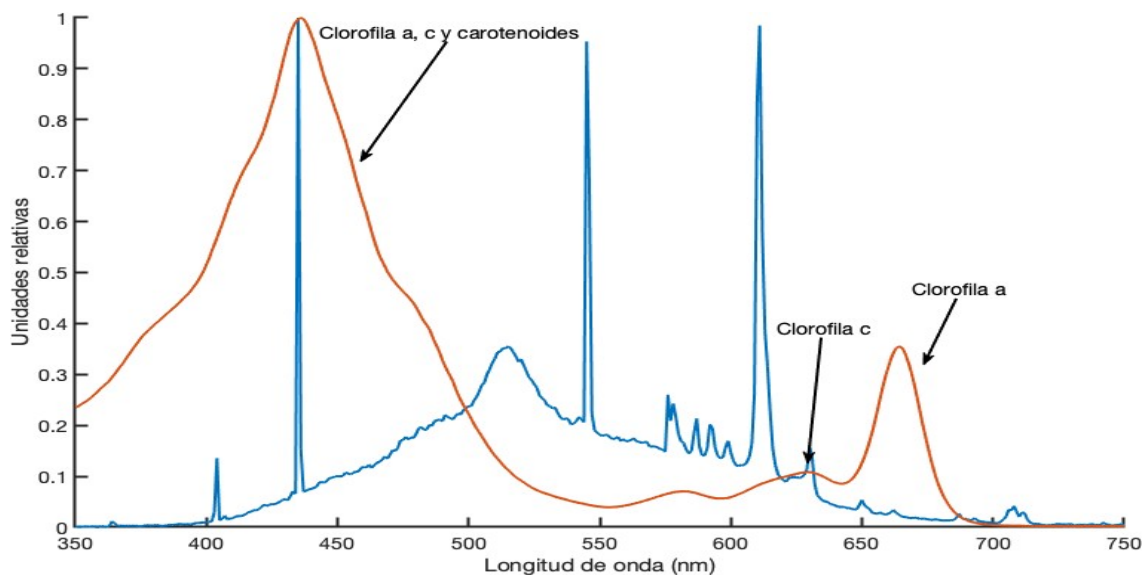


Figura 9. Espectro de emisión de lámpara fluorescente (línea azul) y espectro de absorción de *Chaetoceros muelleri* (línea anaranjado) en unidades relativas; extracción acetona 90%.

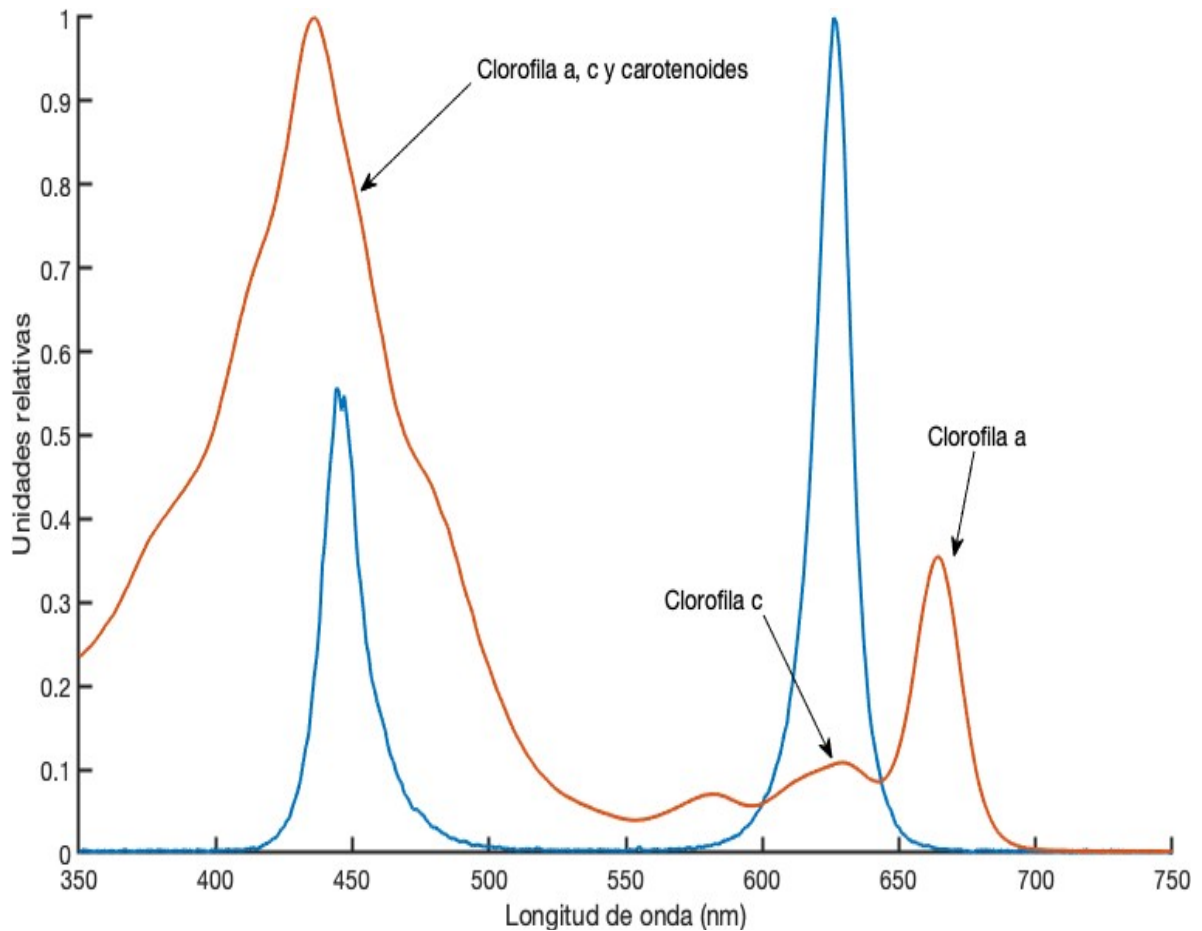


Figura 10. Espectro de emisión de lámpara LED (sin marca/genérico; línea azul) y espectro de absorción de *Chaetoceros muelleri* (línea anaranjada) en unidades relativas; extracción acetona 90%.

3.2 Perfil de velocidad y tamaño de burbujas

La mayor velocidad del fluido se encontró arriba de la piedra de aireación, mientras que la menor velocidad del fluido se encuentra localizada por debajo de la piedra de aireación. El sesgo de la varilla de aire permite que la corriente pase por debajo y no se forme un vórtice por debajo de la piedra. Hubo una formación de dos vórtices a la derecha y a la izquierda de la piedra de aireación (Figura 11).

El tamaño de las burbujas fue distinto en las diferentes en las 6 regiones trazadas en el FBP (Figura 12), los tamaños de burbuja obtenidos fueron en la región: 1 (R1) $145.8070 \pm 18.031 \mu\text{m}$, 2 (R2) $56.3552 \pm 12.7970 \mu\text{m}$, 3 (R3) $12.9210 \pm 3.5481 \mu\text{m}$, 4 (R4) $59.5301 \pm 13.9773 \mu\text{m}$, 5 (R5) $110.125 \pm 2.9496 \text{ nm}$ y 6 (R6) no se pudieron observar ni detectar burbujas.

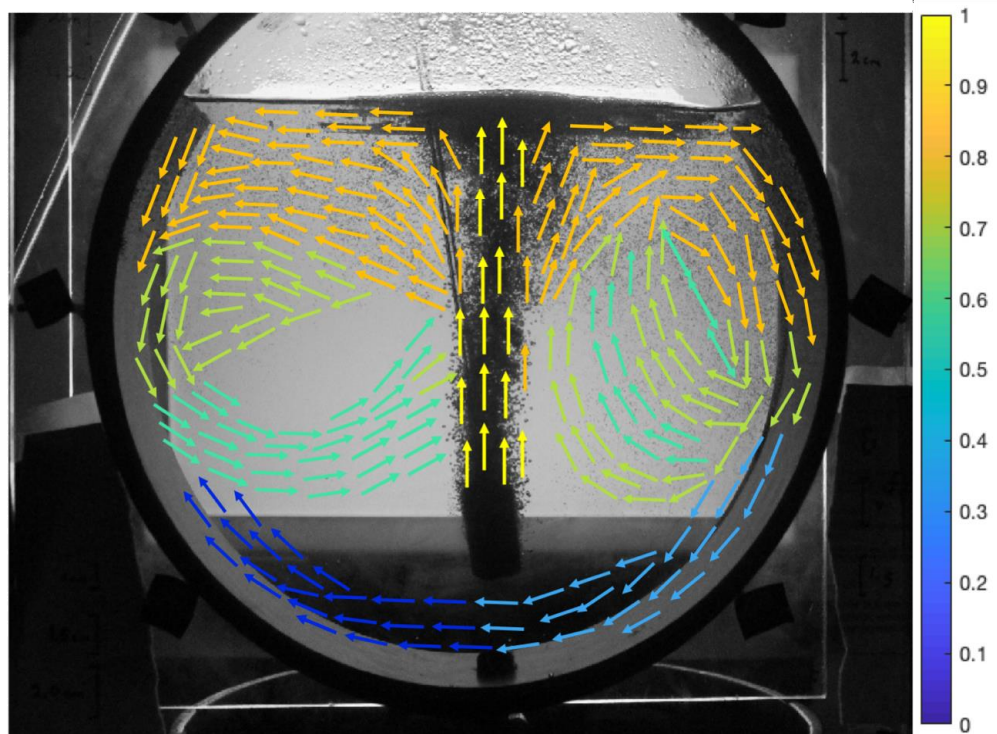


Figura 11. Campo vectorial de velocidad del fluido dentro del fotobiorreactor plano (FBP). Las flechas representan el vector velocidad del fluido dentro del FBR. La magnitud del vector se representa de manera relativa a la velocidad máxima de FBP por la escala de colores.

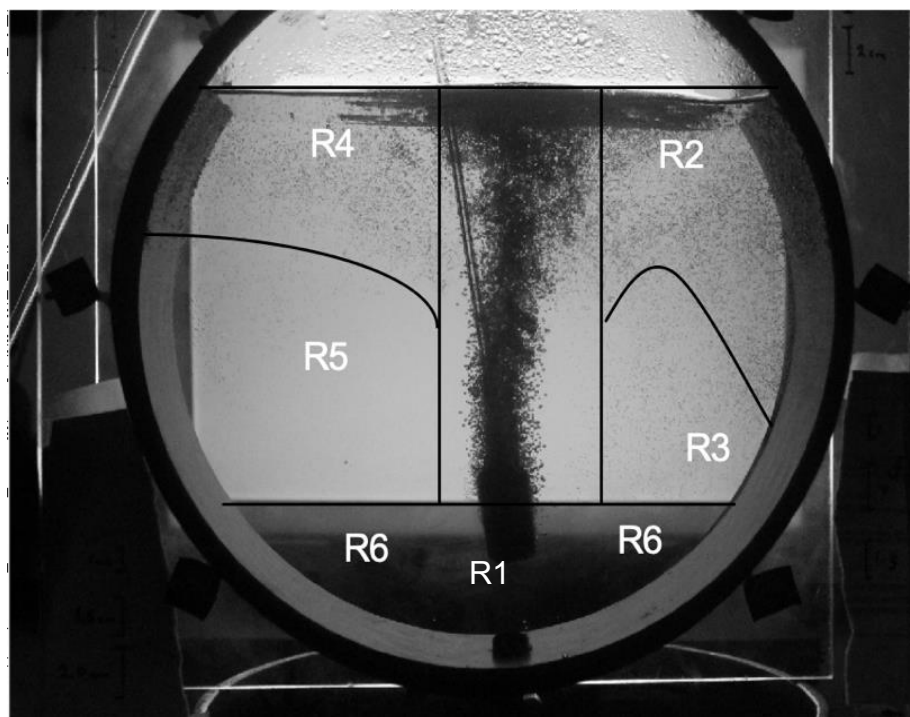


Figura 12. Imagen modelo para determinación del tamaño de burbuja en un fotobiorreactor de 10 cm en escala de grises (R1, región 1; R2, región 2; R3, región 3; R4, región 4; R5, región 5; R6, región 6).

3.3 Calidad de agua

A continuación se presentan los resultados obtenidos de monitorear la calidad de agua comenzando con la concentración de UFC en el agua de mar utilizada para llenar los FBP. No se encontró crecimiento bacteriano (0 UFC mL^{-1}) en el agua pasteurizada. No existieron diferencias entre el agua esterilizada en autoclave a condiciones estándar y el agua pasteurizada. Sin embargo, el agua filtrada y pasada por UV obtuvo una concentración bacteriana de $78,500 \pm 9,120 \text{ UFC mL}^{-1}$ y el agua del tanque de reserva de $163,500 \pm 16,260 \text{ UFC mL}^{-1}$.

3.3.1. Temperatura

La temperatura del laboratorio se mantuvo constante a $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ($P = 0.604$) durante los 10 días del experimento.

3.3.2. Salinidad

No se encontraron diferencias significativas de la salinidad entre los tratamientos ($P = 0.4566$). La media global fue $34.9 \pm 0.28 \text{ ppm}$.

3.3.3. pH

La tendencia general del pH fue a incrementar conforme pasó el tiempo. El valor más alto fue al día 5 en todos los tratamientos ($T0 = 9.3$, $T1 = 9.01$, $T2 = 9$, $T3 = 9$). La desviación tan grande observada en t_0 al día 5 es debido a que por error técnico a una unidad experimental no se le suministro aireación durante 8 horas. No se encontraron diferencias significativas en el pH (9.0 ± 0.153) entre los tratamientos ($P = 0.375$) al día 10 (Figura 13).

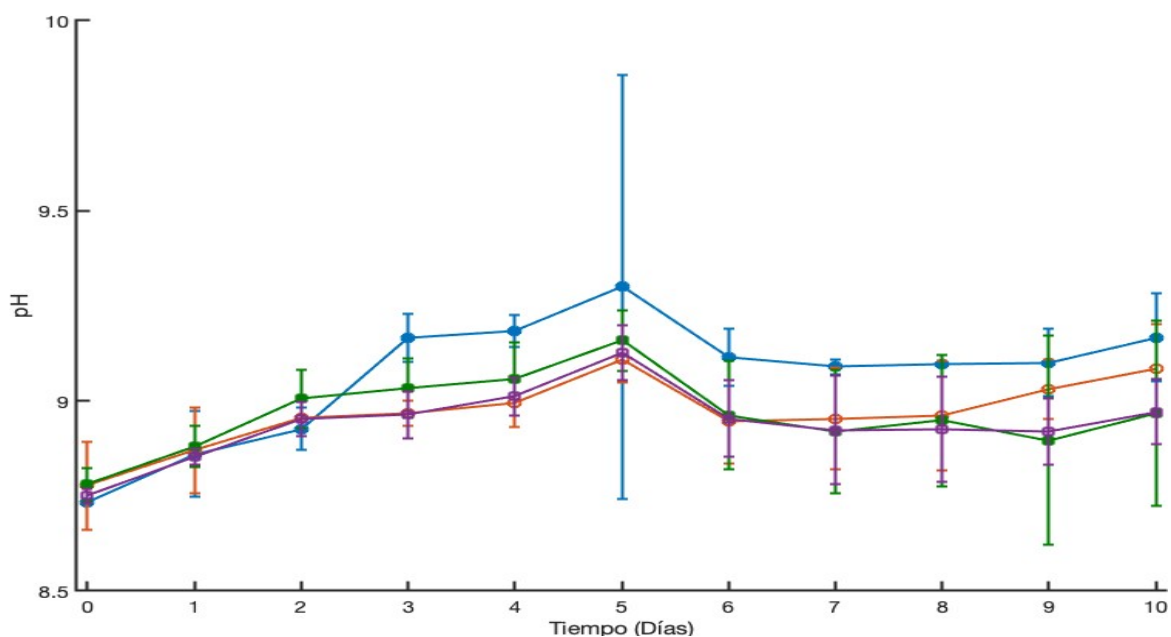


Figura 13. Registro del pH de los diferentes tratamientos de los cultivos de *Chaetoceros muelleri*. (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

3.3.4 Alcalinidad

Al igual que el pH, la alcalinidad tuvo una tendencia a incrementar (Figura 14). No existieron diferencias significativas en la alcalinidad durante el cultivo de *C. muelleri* ($P = 0.441$).

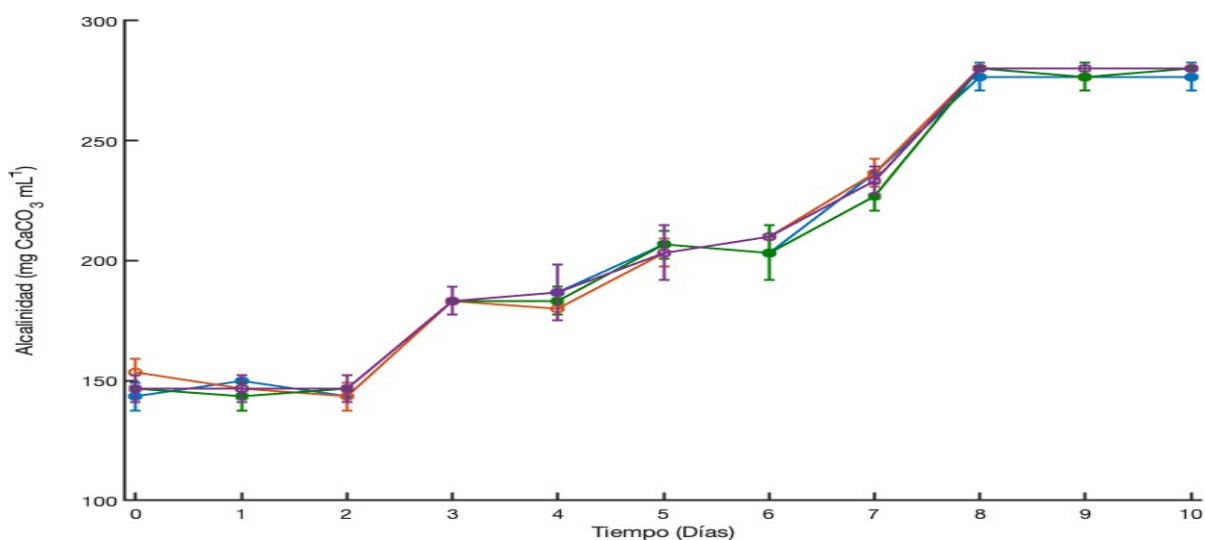


Figura 14. Alcalinidad de los diferentes tratamientos a lo largo de los 10 días del cultivo de *Chaetoceros muelleri*. (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

3.3.5 CO₂

El comportamiento del consumo de CO₂ fue ajustado a un polinomio de tercer orden en todos los tratamientos (Tabla. 5). Se encontraron diferencias significativas en los valores de CO₂ disuelto al día 10 ($P = 0.0001$, Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros integrativos de la concentración de dióxido de carbono (CO₂) en los diferentes tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; [CO₂] representa la concentración de CO₂, [CO₂]₀ la concentración inicial de CO₂ y las variables C₁, C₂ y C₃ son variables integrativas, no poseen un significado biológico.

	T0		T1		T2		T3	
Concentración de CO ₂ disuelto al día 10 (mg L ⁻¹)	0.064 ± 0.002 ^B		0.031 ± 0.001 ^D		0.073 ± 0.005 ^A		0.049 ± 0.002 ^C	
Ecuación	$[CO_2] = [CO_2]_0 + C_3 * t + C_2 * t^2 + C_1 * t^3$							
Parámetros integrativos	C ₁	-0.0007549	C ₁	-0.0026792	C ₁	-0.0017	C ₁	-0.00219
	C ₂	0.01431	C ₂	0.044025	C ₂	0.030133	C ₂	0.03943
	C ₃	-0.07763	C ₃	-0.18765	C ₃	-0.129613	C ₃	-0.1768
	R ²	0.9620	R ²	0.8692	R ²	0.8982	R ²	0.8951

La concentración inicial de CO₂ ([CO₂]₀) presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($P = 0.001$) con un promedio de 0.1684 ± 0.002 mg L⁻¹ para el tratamiento 0, 0.0495 ± 0.002 mg L⁻¹ para el tratamiento 1, 0.07 ± 0.006 mg L⁻¹ para el tratamiento 2 y 0.0526 ± 0.003 mg L⁻¹ para el tratamiento 3.

3.3.6 Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)

En esta sección se muestran los resultados de las tres de las formas de la fuente de nitrógeno (NAT, nitritos, nitratos) utilizables por la microalga *C. muelleri*. Durante todo el experimento los valores de NAT se mantuvieron por debajo de 0.01 mg L⁻¹ en todos los tratamientos.

3.3.7 Nitritos

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitritos entre los tratamientos ($P = 0.001$). La mayor concentración de nitritos estuvo presente en el tratamiento 0, mientras que en los tratamientos 1, 2 y 3 no existió diferencia significativa durante los 10 días (Figura 15).

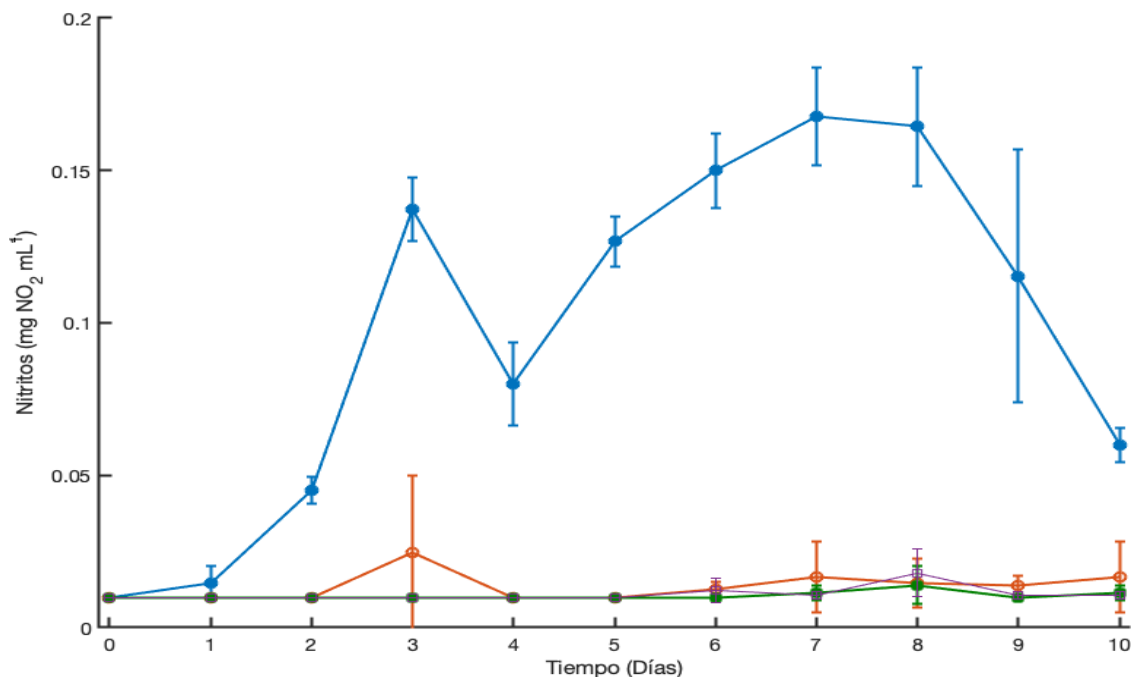


Figura 15. Concentración de nitritos (mg L^{-1}) de los diferentes tratamientos. (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

3.3.8 Nitratos

La concentración de nitratos descendió en todos los tratamientos con respecto al tiempo. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de nitratos en el día 0 entre los tratamientos ($P = 0.532$) ni en el día 10 del experimento ($P = 0.321$) (Figura 16).

No se encontraron diferencias significativas en las tasas de consumo de nitratos ($P = 0.236$). Sin embargo, el tratamiento 2 presentó la mayor tasa de consumo ($19.72 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$). La menor tasa de consumo de nitratos se encontró en el tratamiento 3 ($16.42 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$). La concentración de nitratos decreció linealmente con el tiempo de cultivo ($R^2 > 0.95$) (Tabla 5).

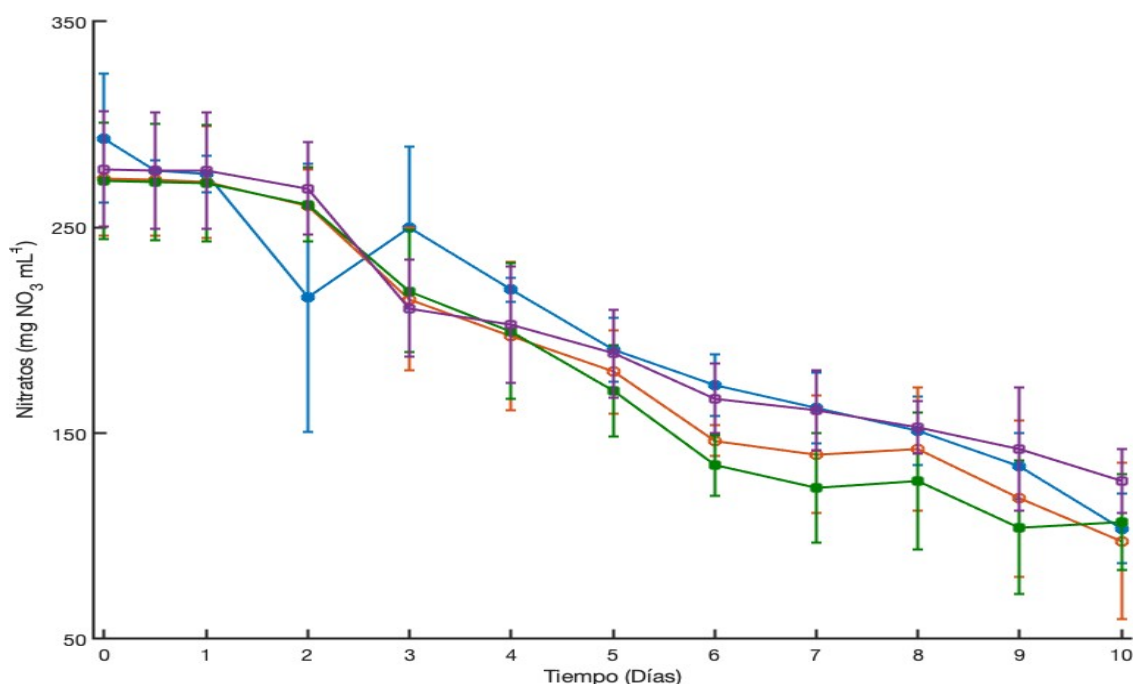


Figura 16. Concentración de nitratos durante el cultivo de *C. muelleri* bajo los distintos tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

Tabla 5. Ecuación y tasas de consumo de nitratos de los diferentes tratamientos del cultivo de *C. muelleri* (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; intervalo de confianza (IC); μ_{NO_3} representa la tasa de consumo de nitratos).

Ecuación	Tratamiento	Tasa de consumo (mg L ⁻¹ día ⁻¹)	(IC 95%)	R ²
$[NO_3] = [NO_3]_0 + \mu_{NO_3} * t$ $\frac{d[NO_3]}{dt} = \mu_{NO_3}$	T0	-17.61	(-20.27, -14.94)	0.9559
	T1	-18.76	(-21.12, -16.41)	0.9693
	T2	-19.72	(-22.78, -16.65)	0.9536
	T3	-16.42	(-19.05, -13.78)	0.9507

3.3.9 Fosfatos

En la figura 17 se muestra el comportamiento de la concentración de fosfatos a lo largo del tiempo. A partir del día 5, la concentración de fosfatos comenzó a tender a cero en todos los tratamientos. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.142$) en la concentración inicial de fosfatos 2.94 ± 0.211 mg L⁻¹.

¹. Al final del experimento la concentración de fosfatos ($0.05 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$) tampoco fue diferente entre los tratamientos ($P = 0.394$).

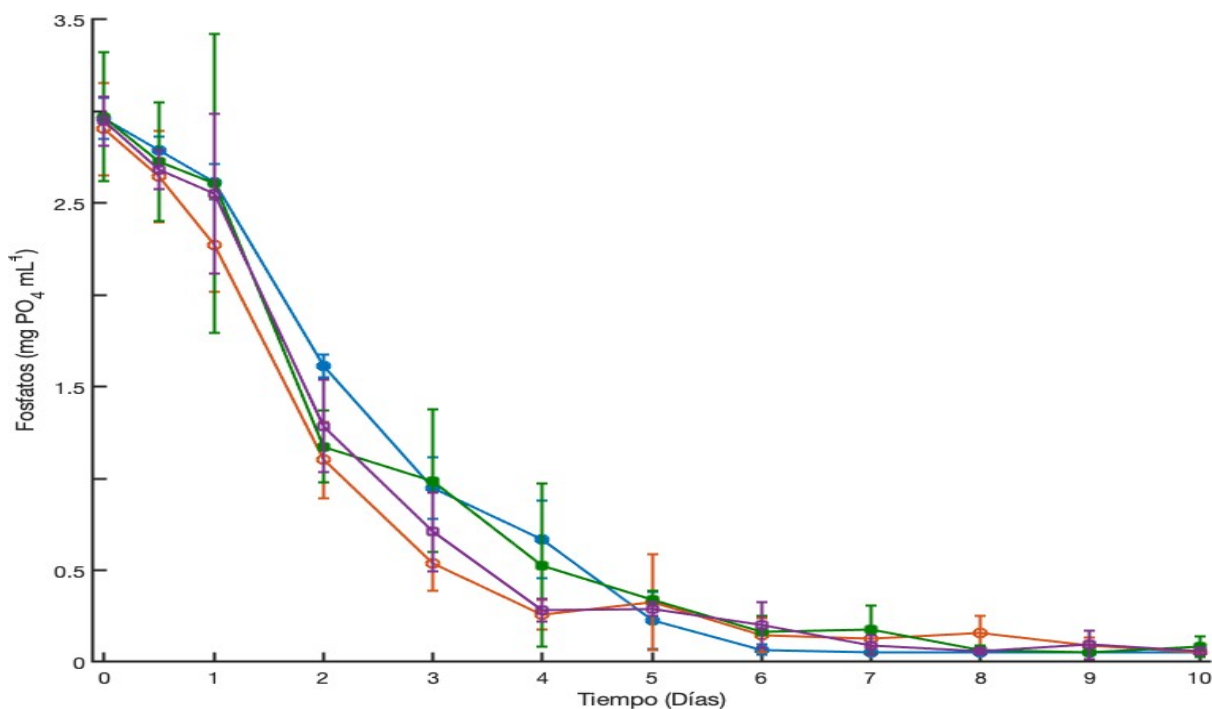


Figura 17. Concentración de fosfatos durante el cultivo de *C. muelleri* bajo los distintos tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de consumo de fosfatos ($P = 0.256$). La mayor tasa de consumo de fosfatos ($0.4854 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) se encontró en el tratamiento 1 y la menor tasa de consumo de fosfatos para el tratamiento 0 ($0.3983 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$) (Tabla 6).

Tabla 6. Ecuación y tasas de consumo de fosfatos de los diferentes tratamientos del cultivo de *C. muelleri* (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED) media. Intervalo de confianza (IC). $-\mu_{PO_4}$ representa la tasa de consumo de fosfatos.

Ecuación	Tratamiento	Tasa de consumo ($\text{mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$)	(IC 95%)	R ²
$[PO_4] = [PO_4]_0 e^{-\mu_{PO_4} t}$ $-\frac{d[PO_4]}{dt} = -\mu_{PO_4} [PO_4]$	T0	0.3983	(0.3127, 0.4839)	0.9713
	T1	0.4854	(0.3877, 0.583)	0.9768
	T2	0.4134	(0.3269, 0.4999)	0.9725
	T3	0.4489	(0.3486, 0.5492)	0.9707

3.4 Análisis proximal

A continuación, se presenta el análisis proximal para evaluar el rendimiento del cultivo desde un punto de vista biológico. No se encontraron diferencias significativas ($P = 0.420$) del peso seco total ($0.018 \pm 0.0015 \text{ g mL}^{-1}$) entre los tratamientos obtenidos al día 0. Sin embargo, al día 10 hubo un incremento en el peso seco ($P = 0.001$). De igual manera en el peso orgánico y peso de cenizas se encontraron diferencias significativas ($P = 0.001$; $P = 0.001$) en ambos casos. Sin embargo, en los porcentajes de cenizas y peso orgánico no se encontraron diferencias significativas ($P = 0.561$).

3.4.1. Proteínas

Al día 10 se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas de los diferentes tratamientos ($P = 0.001$). La mayor concentración de proteínas (58.4%) se encontró en el tratamiento 2. La concentración más baja de proteínas (50%) en el tratamiento 0. El porcentaje de proteínas incrementó con respecto al tiempo en todos los tratamientos (Figura 18).

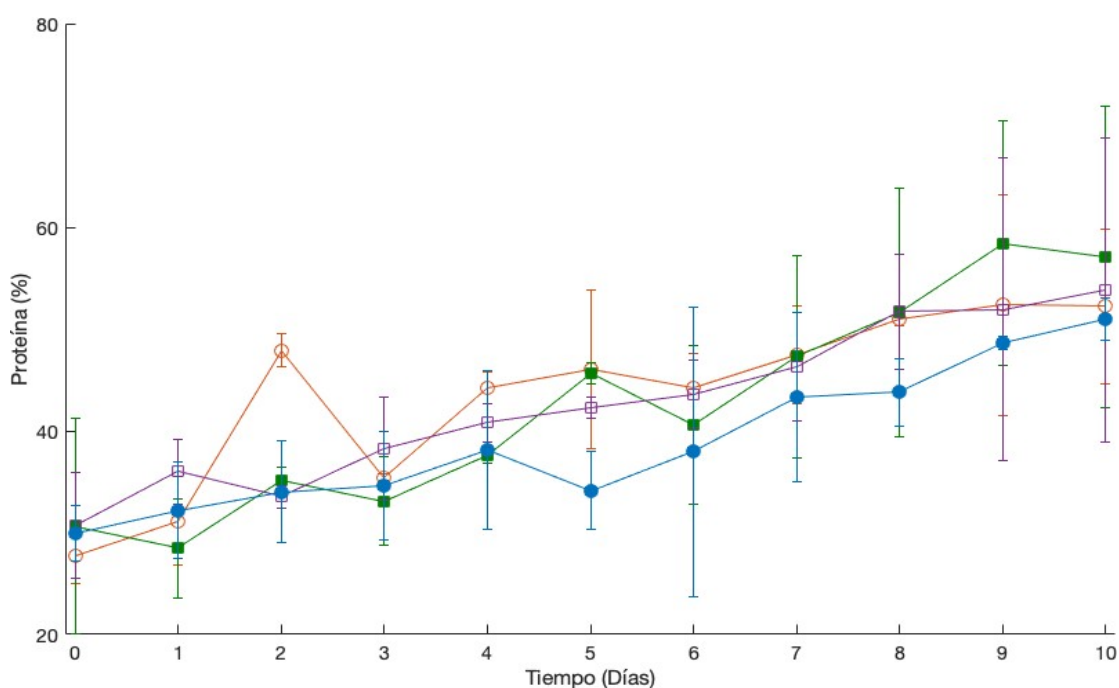


Figura 18. Porcentaje de proteínas de *C. muelleri* en los diferentes tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

3.4.2. Carbohidratos

La concentración de carbohidratos se mantuvo oscilando alrededor del 25% en todos los tratamientos (Figura 19) existe un valor atípico en el tratamiento 1 al día 9. Al día 0 no existe diferencia significativa ($P = 0.350$) entre los tratamientos. No existe una tendencia clara en el porcentaje de carbohidratos y se comporta de manera errática en todos los tratamientos a lo largo del tiempo.

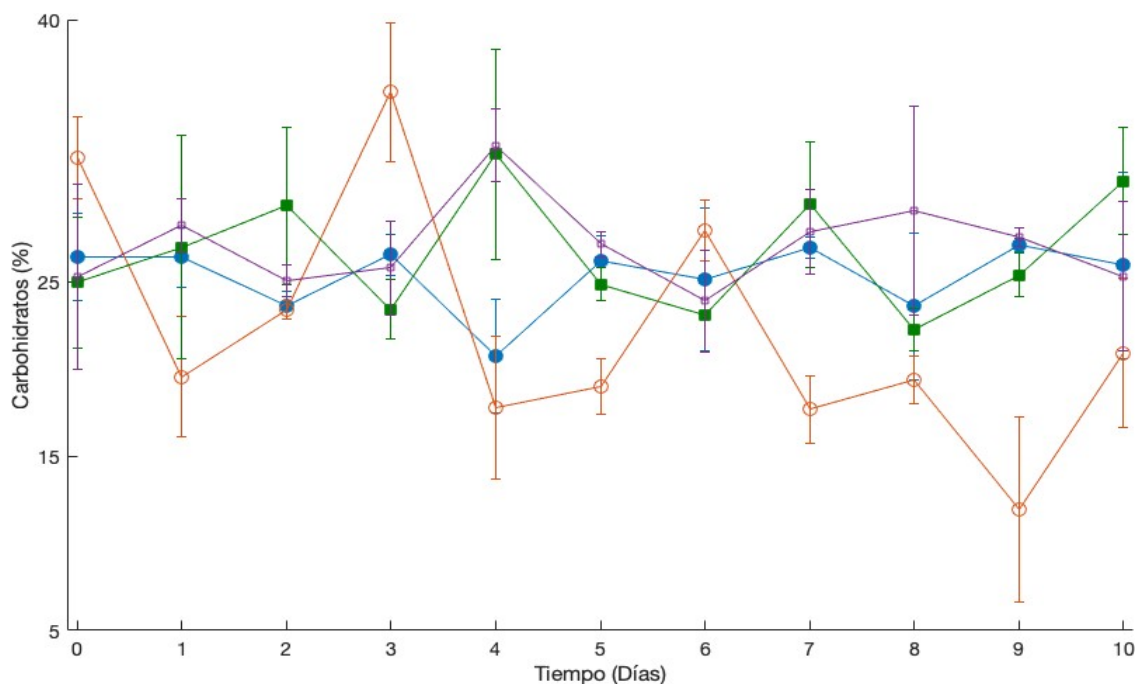


Figura 19. Porcentaje de carbohidratos de *C. muelleri* en los diferentes tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

3.4.3. Lípidos

Al día 10 se encontraron diferencias significativas en la concentración de lípidos de los diferentes tratamientos ($P = 0.001$). La mayor concentración de lípidos se encontró en el tratamiento 0 y 1. El tratamiento 2 presentó un menor porcentaje de lípidos (12%) al día 10, el tratamiento 0 fue 25.4%, 1 fue 27.4% y 3 fue 21.14% (Figura 20). El porcentaje de lípidos fue disminuyendo a lo largo del experimento (Figura 20). Al inicio del experimento no se observaron diferencias significativas en el contenido de lípidos ($P = 0.496$).

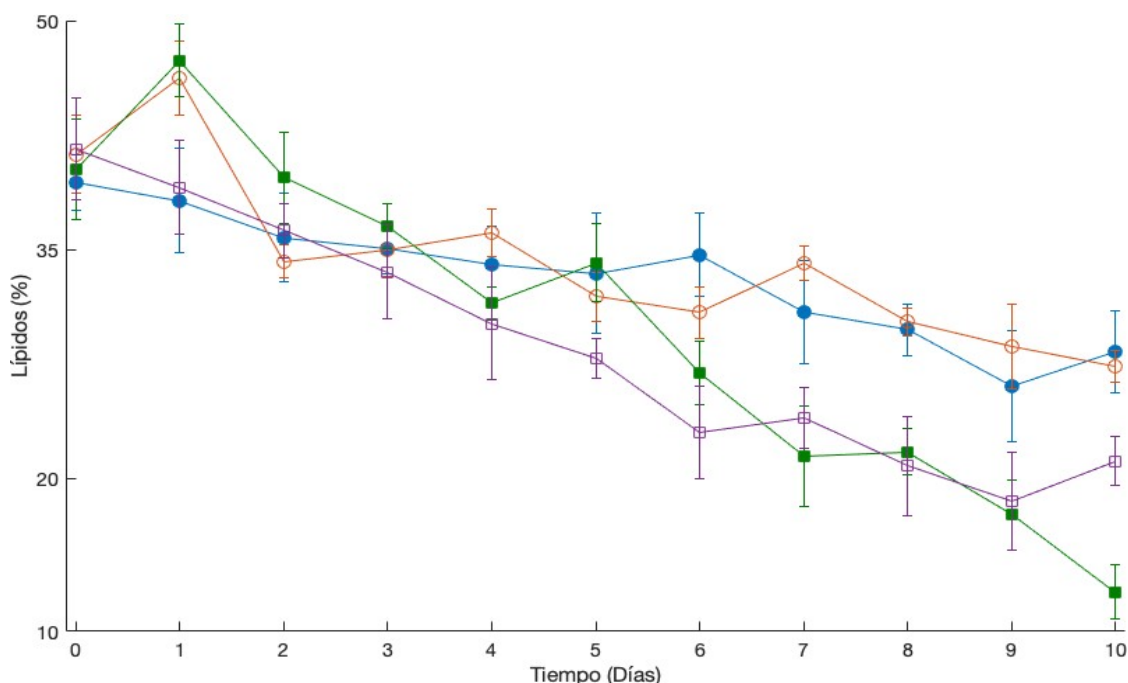


Figura 20. Porcentaje de lípidos de *C. muelleri* en los diferentes tratamientos. (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

3.4.4. Tasa de producción de proteínas

La concentración de proteína al día 0 no presentó diferencias significativas ($P = 0.278$); sin embargo, al día 10 existe diferencia significativa entre los tratamientos ($P = 0.011$) teniendo el tratamiento 2 y 3 la mayor cantidad de proteína (937.59 ± 147.73 , $911.79 \pm 149.53 \mu\text{g mL}^{-1}$). El tratamiento 1 presentó un promedio de $710.49 \pm 75.988 \mu\text{g mL}^{-1}$ y el tratamiento que presentó la menor cantidad de proteína fue el tratamiento 0 ($566.13 \pm 27.22 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabla 7.1).

3.4.5. Tasa de producción de carbohidratos

Los carbohidratos no presentaron diferencia significativa al día 0 ($P = 0.301$). Al día 10 no existe diferencia significativa en el contenido de carbohidratos entre los tratamientos ($P = 0.074$) (Tabla 7.1).

3.4.6. Tasa de producción de lípidos

La cuantificación de lípidos no demostró al día 0 diferencia significativa ($P = 0.627$). Al día 10 si se encontró diferencia significativa en el contenido de lípidos entre los tratamientos ($P = 0.005$), siendo el tratamiento 2 el que presenta una menor cantidad de lípidos ($206.81 \pm 80.379 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entre el tratamiento 1 y 3 no existe diferencia significativa (372.459 ± 21.35 , $358.202 \pm 5.6 \mu\text{g mL}^{-1}$) y de la misma manera, el tratamiento 1 y 0 no presentaron diferencia significativa (372.459 ± 21.35 , $471.53 \pm 90.252 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabla 7.1).

Tabla 7. Ecuación y tasas de producción de proteínas, lípidos y carbohidratos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; MC, macromolecular; T, tratamiento; PI, parámetros integrativos; IC, intervalo de confianza; $[\pi]$ representa la concentración de proteína; $[\pi]_0$ representa la concentración de proteína inicial; $[L]$ representa la concentración de lípidos; $[L]_0$ representa la concentración inicial de lípidos; $[C]$ representa la concentración de carbohidratos; $[C]_0$ representa la concentración de carbohidratos inicial; α , β y γ son parámetros integrativos no poseen significado biológico).

MC	T	Ecuación	PI	IC 95%	R ²
Proteínas	0	$[\pi] = \alpha * t + [\pi]_0$ $\frac{d[\pi]}{dt} = \alpha$	0.4086 3.909	(0.3008, 0.5164) (3.271, 4.546)	0.8909
	1		-0.03135 0.5763 -2.225 3.192	(-0.046, -0.016) (0.3528, 0.7998) (-3.159, -1.292) (2.167, 4.217)	0.9776
	2	$[\pi] = \alpha * t^3 + \beta * t^2 + \gamma * t + [\pi]_0$ $\frac{d[\pi]}{dt} = 3\alpha * t^2 + 2\beta * t + \gamma$	-0.03582 0.7287 -3.144 4.394	(-0.060, -0.011) (0.3576, 1.1) (-4.694, -1.595) (2.693, 6.096)	0.9611
	3		-0.03105 0.6412 -2.748 3.967	(-0.054, -0.007) (0.2776, 1.005) (-4.266, -1.229) (2.299, 5.634)	0.9578
	0	$[L] = \alpha * t + [L]_0$ $\frac{d[L]}{dt} = \alpha$	-0.08893 5.451	(-0.146, -0.030) (5.108, 5.794)	0.5723
	1		-0.03694 0.6471 -2.878 4.533	(-0.05, -0.024) (0.4544, 0.8398) (-3.683, -2.074) (3.649, 5.416)	0.9284
Lípidos	2	$[L] = \alpha * t^3 + \beta * t^2 + \gamma * t + [L]_0$ $\frac{d[L]}{dt} = 3\alpha * t^2 + 2\beta * t + \gamma$	-0.0415 0.7349 5.571	(-0.056, -0.027) (0.489, 0.9396) (-4.29, -2.409) (4.538, 6.604)	0.9611
	3		-0.031 0.5809 -2.863	(-0.048, -0.015) (0.3295, 0.8323) (-3.913, -1.813)	0.8953

		$[C] = \alpha * t + [C]_0$	4.85	(3.697, 6.002)	
	0	$\frac{d[C]}{dt}$	0.07752	(0.012, 0.144)	0.4386
Carbohidratos			3.449	(3.058, 3.84)	
	1	$+ [C]_0$	-0.0226	(-0.044, -0.001)	
		$\frac{d[C]}{dt}$	0.4074	(0.08122, 0.734)	0.6824
			-1.897	(-3.259, -0.535)	
			3.173	(1.678, 4.669)	
	2	$[C] = \alpha * t^3 + \beta * t^2 + \gamma * t$	-0.0195	(-0.029, -0.0094)	
Carbohidratos			0.4054	(0.2512, 0.5596)	0.9663
		$+ [C]_0$	-1.946	(-2.59, -1.302)	
		$\frac{d[C]}{dt}$	3.368	(2.661, 4.075)	
			-0.0261	(-0.042, -0.0105)	
	3		0.4859	(0.2491, 0.7226)	0.9265
			-2.113	(-3.102, -1.125)	
			3.168	(2.082, 4.254)	

3.5 Pigmentos (Clorofila a, clorofila c y carotenoides)

En esta sección se mostraron las concentraciones de pigmentos totales y clorofila a, clorofila c y carotenoides. Al día 0, no se observaron diferencias significativas ($P = 0.436$) de la concentración de pigmentos entre los tratamientos. Se encontraron diferencias significativas en la concentración total de pigmentos al día 6 ($P = 0.001$) y día 10 ($P = 0.025$). La concentración total de pigmentos (clorofila a, clorofila c y carotenoides) del tratamiento 1 fue diferente a los demás tratamientos el día 10 (Figura 21).

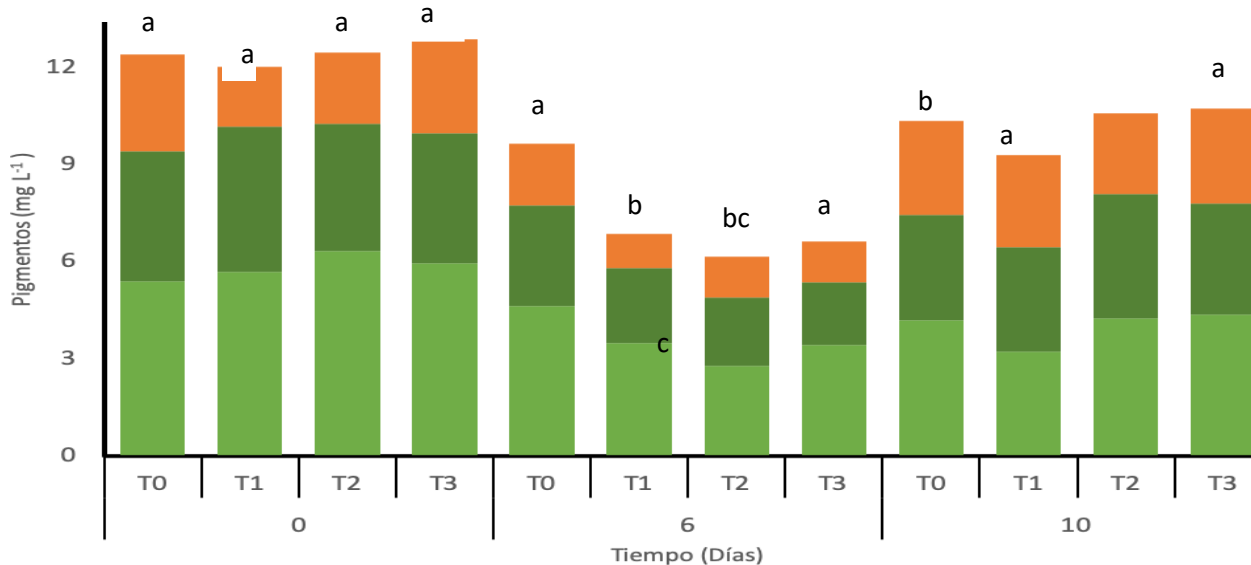


Figura 21. Concentración de pigmentos (mg L^{-1}) del cultivo de *C. muelleri* en los diferentes tratamientos (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; Extracción con acetona al 90%; el color verde claro representa el contenido de clorofila a (mg L^{-1}), el color verde oscuro el contenido de clorofila c (mg L^{-1}) y color naranja el contenido de carotenoides (mg L^{-1}); letras diferentes indican diferencias significativas).

Al obtener la cantidad de pigmento por célula, la tendencia general fue a disminuir la cantidad de pigmentos por célula hasta el día 6, posteriormente la concentración de carotenoides y clorofila c incrementó (día 10). La clorofila a fue el pigmento de mayor concentración durante los 10 días de experimentación, mientras que los carotenoides siempre se encontraron por debajo de la cantidad de clorofila c (Tabla 8).

Tabla 8. Diferentes pigmentos (ng célula⁻¹) (media±desviación estándar) del cultivo de *C. muelleri* en los diferentes tratamientos (Letras diferentes indican diferencias significativas; T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED).

Día	Tratamiento	Clorofila a (ng célula ⁻¹)	Clorofila c (ng célula ⁻¹)	Carotenoides (ng célula ⁻¹)
U	0	46.299± 0.9783 ^b	34.508± 0.1792 ^d	25.694± 0.1693 ^a
	1	59.102± 4.205 ^a	46.428± 0.3324 ^a	19.332± 0.1359 ^c
	2	60.787± 12.968 ^a	37.621± 0.2225 ^b	21.1872± 0.1558 ^b
	3	52.177± 8.16623 ^a	35.360± 0.5043 ^c	25.6689± 0.1324 ^a
O	0	1.4304± 0.15466 ^b	0.967± 0.39843 ^c	0.5946± 0.1337 ^b
	1	2.1478± 0.3456 ^a	1.9255± 0.0532 ^a	0.6372± 0.0255 ^b
	2	1.7064± 0.2877 ^a	1.6152± 0.1415 ^{ab}	0.782792± 0.056 ^a
	3	2.08076± 0.1844 ^a	1.9837± 0.1444 ^{ab}	0.771± 0.0637 ^a
LU	0	0.7832± 0.07016 ^a	0.611± 0.2216 ^{ab}	0.5447± 0.1101 ^a
	1	0.7488± 0.05462 ^a	0.7572± 0.2622 ^{ab}	0.66445± 0.1273 ^a
	2	0.8225± 0.04984 ^a	0.7419± 0.0176 ^a	0.4866± 0.04072 ^a
	3	0.821± 0.20105 ^a	0.6461± 0.0298 ^b	0.55017± 0.0598 ^a

3.6 Crecimiento celular de *C. muelleri* en FBP

En el tratamiento 0 se observa que desde las primeras horas de cultivo hay crecimiento a diferencia de los otros tratamientos. Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de biomasa final ($P = 0.001$), donde el tratamiento 1 tuvo el menor rendimiento ($427.91 \pm 23.103 \times 10^4$ cél mL⁻¹). Los tratamientos 0 ($533.75 \pm 23.103 \times 10^4$ cél mL⁻¹), 2 ($515.83 \pm 22.712 \times 10^4$ cél mL⁻¹) y 3 ($530.83 \pm 23.04 \times 10^4$ cél mL⁻¹) no presentaron diferencias entre ellos. El tiempo de la fase lag en el tratamiento 1 fue de

aproximadamente 2.5 días, el del tratamiento 2 de aproximadamente 3 días y el del tratamiento 3 de aproximadamente 3.25 días. Se observó que se entra a la fase de crecimiento lento alrededor del día 8 o día 9. El tratamiento 1 es el único que entró a la fase estacionaria del día 9 al día 10 (Figura 22).

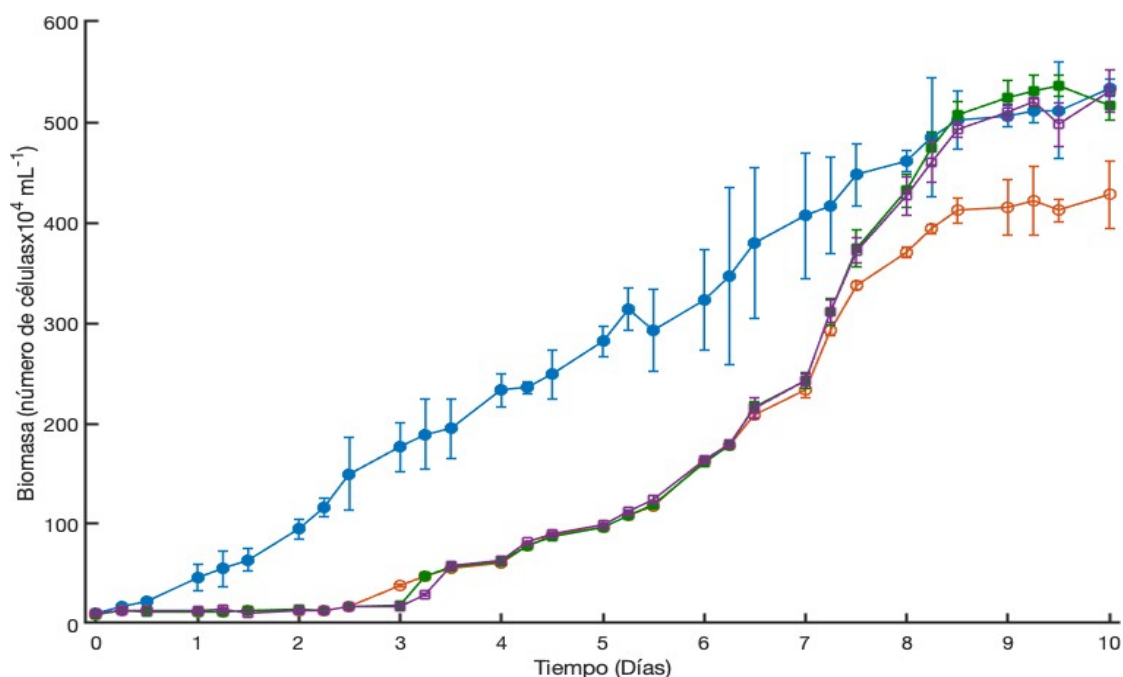


Figura 22. Crecimiento de *C. muelleri* en los diferentes cultivos a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las barras verticales indican la desviación estándar (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente, círculo sólido en azul; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED, círculo sin relleno en anaranjado; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED, cuadrado sólido en verde; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED, cuadrado sin relleno en morado).

El tratamiento 0 presentó la mayor tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{max}} = 0.8535$), seguido por el tratamiento 3 ($\mu_{\text{max}} = 0.665$), el 1 ($\mu_{\text{max}} = 0.6578$) y finalmente el tratamiento 2 ($\mu_{\text{max}} = 0.6391$) (Figuras 23 a 26). Las tasas de crecimiento máximas se presentaron en diferentes tiempos, el tratamiento 0 alcanzó su máximo crecimiento al día 1.2, el tratamiento 1 al día 3.530, el 2 al día 3.847 y finalmente el tratamiento 3 al día 3.850. El parámetro a, b y c se encuentran descritas en la tabla 9. Los parámetros a, b y c los cuales representan matemáticamente: a, la asíntota superior; b y c están relacionados con la inclinación de la función.

Tabla 9. Parámetros integrativos del modelo de regresión de *C. muelleri* (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; T, tratamiento; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función; IC, intervalo de confianza).

Ecuación	T	a	(IC) 95%	b	(IC) 95%	c	(IC) 95%	R ²
$X = ae^{-be^{(-ct)}}$	0	3.67	(3.561, 3.78)	2.136	(1.816, 2.455)	0.632	(0.5411, 0.7232)	0.979
	1	4.11	(3.832, 4.38)	4.659	(3.669, 5.648)	0.435	(0.3633, 0.5075)	0.986
	2	4.403	(4.066, 4.74)	4.564	(3.687, 5.44)	0.395	(0.3293, 0.4598)	0.987
	3	4.166	(3.843, 4.49)	5.316	(3.985, 6.646)	0.434	(0.3545, 0.5134)	0.985

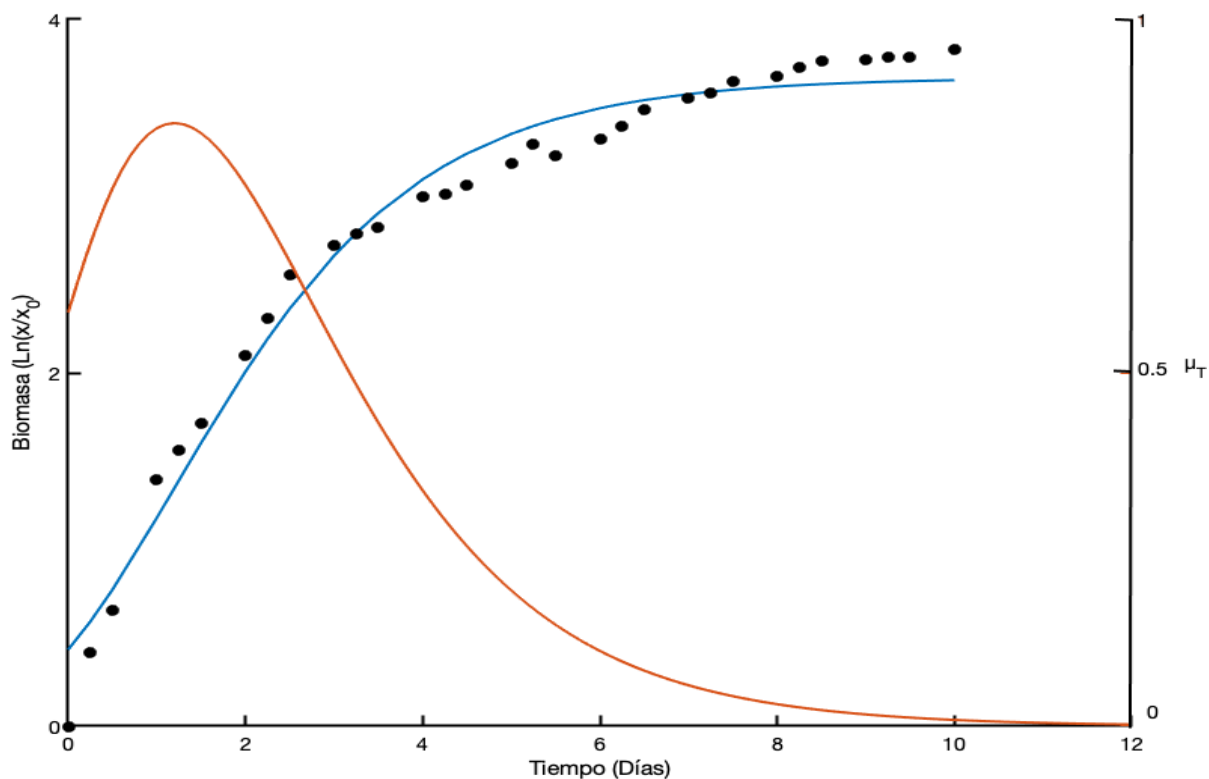


Figura 23. Biomasa de *Chaetoceros muelleri* en los diferentes tratamientos ($\ln(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a ,b y c; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función . Tratamiento 0, (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea sólida azul, Tasa de crecimiento línea sólida anaranjado).

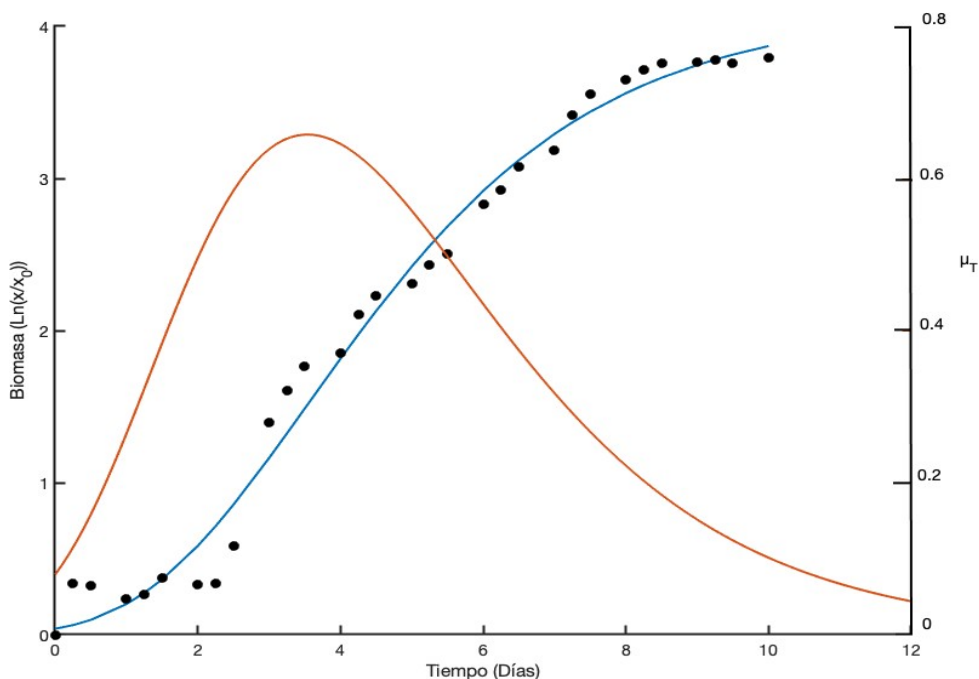


Figura 24. Biomasa de *Chaetoceros muelleri* en los diferentes tratamientos ($\ln(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a , b y c ; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función. Tratamiento 1 (T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea sólida azul, Tasa de crecimiento línea sólida anaranjado).

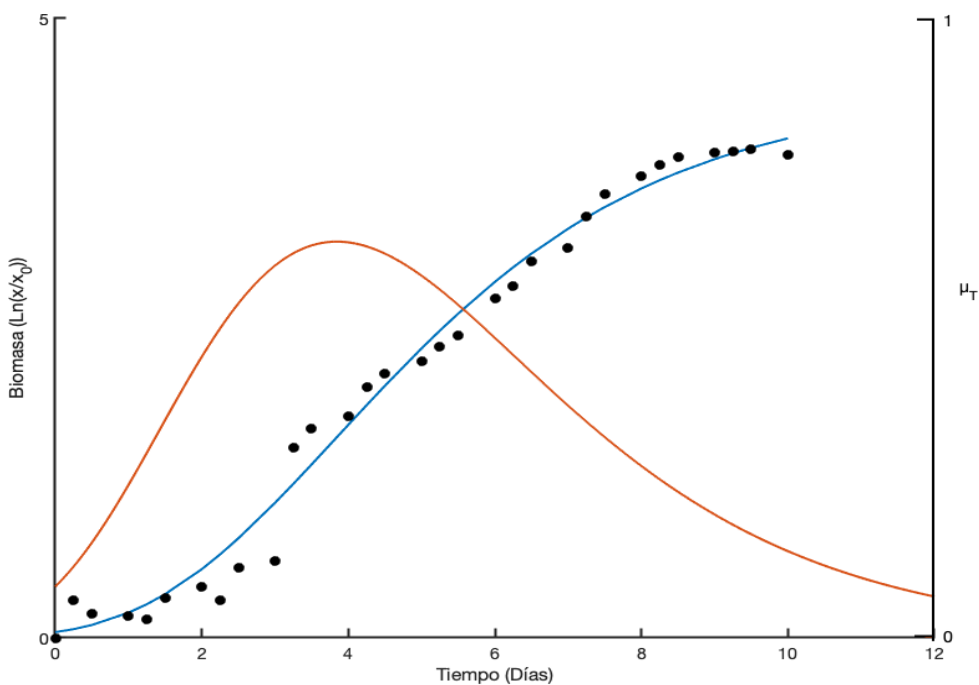


Figura 25. Biomasa de *Chaetoceros muelleri* en los diferentes tratamientos ($\ln(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a , b y c ; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función. Tratamiento 2 (T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea sólida azul, Tasa de crecimiento línea sólida anaranjado).

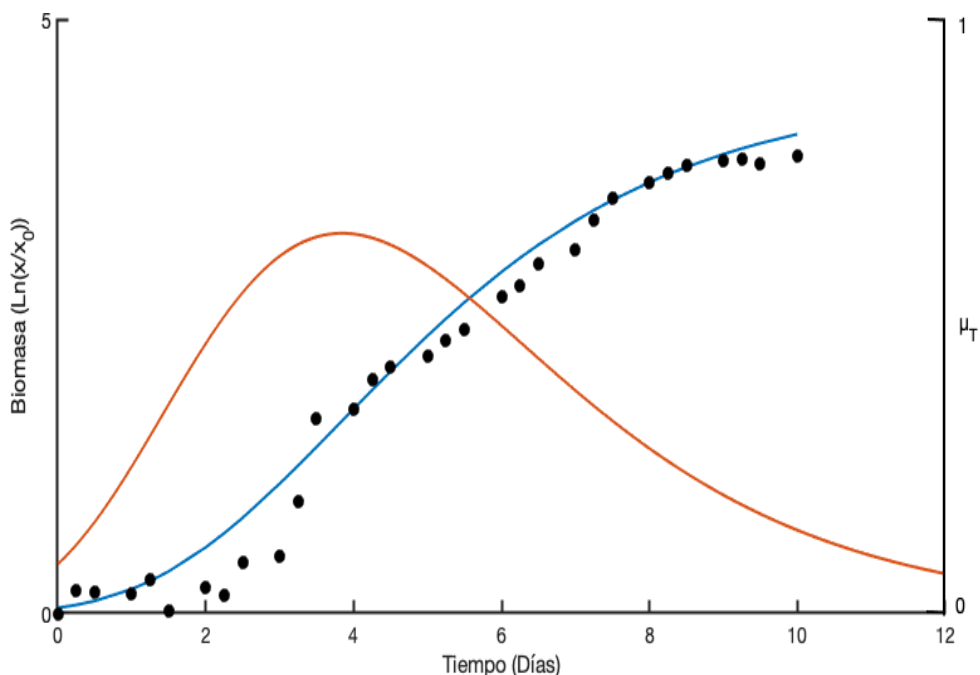


Figura 26. Biomasa de *Chaetoceros muelleri* en los diferentes tratamientos ($\ln(N/N_0)$) y la función de tasa de crecimiento, utilizando los parámetros a , b y c ; a representa la asíntota superior, b y c están relacionadas con la curvatura de la función. Tratamiento 3 (T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; biomasa círculo sólido negro, modelo cinético línea sólida azul, Tasa de crecimiento línea sólida anaranjado).

Se obtuvieron los parámetros a , b y c los cuales representan biológicamente: a , la población máxima del sistema; b , no posee explicación biológica y c , la tasa de crecimiento promedio. Los parámetros fueron calculados a partir de los datos obtenidos de la calidad de agua y se utilizaron en el modelo propuesto (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros del modelo de cinética de crecimiento para la microalga *C. muelleri* (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; IC, intervalo de confianza; b se relaciona con el tiempo de la fase lag; c representa la tasa de crecimiento).

Ecuación	Tratamiento	C _{experimental}	C _{teórico}	IC (95%)
$c = \mu_T = \mu_{NO_3} \mu_{PO_4} \mu_{CO_2max}$	0	0.6339	0.632	(0.5411, 0.7232)
	1	0.4873	0.435	(0.3633, 0.5075)
	2	0.3936	0.395	(0.3293, 0.4598)
	3	0.4339	0.434	(0.3545, 0.5134)
$b = \frac{(a^2 \mu_T^2)}{e} + \lambda$		$b_{experimental}$	$b_{teórico}$	IC (95%)
	0	2.2356	2.136	(1.816, 2.455)
	1	3.8170	4.659	(3.669, 5.648)
	2	4.1105	4.564	(3.687, 5.44)
	3	4.4521	5.316	(3.985, 6.646)

Tanto el parámetro b y c se encuentran dentro del intervalo de confianza. Sin embargo, se realizó nuevamente la regresión para observar la diferencia entre el modelo teórico y el modelo experimental (Tabla 11). El parámetro a se calculó utilizando la ecuación 7.

Tabla 11. Evaluación del modelo para *C. muelleri* utilizando los parámetros calculados experimentalmente (T0, garrafones de cristal y lámpara fluorescente; T1, FBR de 10 cm y lámparas LED; T2, FBR de 15 cm y lámparas LED; T3, FBR de 20 cm y lámparas LED; N representa la biomasa al tiempo t, N_0 representa la biomasa al tiempo 0, a representa la capacidad de carga del sistema, μ_{max} , la tasa de crecimiento máxima (día^{-1}), μ_T la tasa de crecimiento global (día^{-1}), λ el tiempo de la fase lag (días) y t el tiempo (días)).

Ecuación	Tratamiento	R ²
$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = ae^{-(\mu_{max} * a * \mu_T + \lambda)e^{-\mu_T * t}}$	0	0.9764
	1	0.9685
	2	0.9844
	3	0.9852

A partir de las tasas de consumo de nutrientes (Nitratos y Fosfatos) y el parámetro de población máxima del sistema (Tabla 9) se puede concluir que los tratamientos con mejor desempeño son el 2 y el 3 ya que presentan una mayor tasa de consumo de nutrientes que el tratamiento 0 y una mayor cantidad de biomasa que el tratamiento 1, demostrando un estado fisiológico superior al del tratamiento 0 y 1. A pesar de que no existió diferencias significativas en la concentración de biomasa al día 10 entre los tratamientos 0, 2 y 3. El modelo no contempla producción de proteínas o lípidos debido a que se requieren otro tipo de estudios para realizar estas predicciones.

Capítulo 4. Discusión

En el presente trabajo se realizó un modelo cinético de *C. muelleri* basado en el consumo de nutrientes del medio “f” en un FBR plano con iluminación de luz LED. *Chaetoceros muelleri* es una microalga de alta importancia acuícola, debido a su alto contenido proteico y a sus altos contenidos de PUFA's (Allen y Nelson, 1910; Velasco, 2016). Sin embargo, existe poca o nula información sobre el cultivo de esta microalga en escalas mayores a las de laboratorio.

En este trabajo se determinó la extensión óptima de la longitud del FBR para incrementar la producción de la microalga *Chaetoceros muelleri* y se encontró de entre las longitudes utilizadas, la dimensión mejor del FBR fue entre 15 y 20 cm de ancho. Debido a que la intensidad de las lámparas diseñadas para esta tesis se rige por la ley de inverso cuadrado, la intensidad lumínica decrece rápidamente con la distancia (Marín, 2009) (Figura 4), una extensión mayor a 20 cm reduce de manera drástica la intensidad lumínica y una extensión menor a 15 cm podría producir fotoinhibición. En otros trabajos sobre FBR para microalgas se ha reportado que el óptimo de ancho de un FBR es de 17 cm de paso óptico (Carvalho *et al.*, 2010). Montes (2014) utilizó un FBR de 20 cm de ancho argumentando que su relación S/V fue la óptima. El diseño de las lámparas permitió iluminar de manera uniforme el FBR. La distribución de luz es esencial en el diseño de un FBR, debido a que las microalgas necesitan transformar la energía lumínica en energía química a través del proceso conocido como fotosíntesis (Grima *et al.*, 1994; Hussman *et al.*, 2012; Blanken *et al.*, 2016 y Schreiber *et al.*, 2017).

El uso de lámparas LED permite seleccionar longitudes de onda específicas. En esta tesis se utilizaron lámparas LEDs con picos de emisión en 442 nm y un ancho medio de pico de 12 nm y en 625 nm con un ancho medio de 10.5 nm los cuales cubren la absorción de clorofila c_1 y de la xantofila (Aiba 1982, Roy *et al.*, 2011). Debido a las longitudes de onda seleccionadas se observa un contenido similar de entre la clorofila a y c_1 en los tratamientos que utilizaron luz LED (T1, T2 y T3). Otro parámetro importante es la proporción de luz rojo:azul. Aiba (1982) reporta que de forma general la conversión de energía lumínica a energía química para luz azul es del 46%, mientras que para luz roja 69%. Debido a lo anterior, al momento de diseñar las lámparas LEDs se utilizó una proporción de 2 diodos rojos por cada diodo azul (Fig. 4b) esto fue con el propósito de buscar mejorar la conversión de energía lumínica a química.

La microalga *Chaetoceros muelleri* es una microalga sensible a las fuerzas de corte, las cuales se definen como una fuerza externa que actúa sobre un objeto o superficie paralela a la pendiente o plano

en el que se encuentra; las fuerzas de corte producen deformación lateral (cizallamiento) (Michels *et al.* 2015). Para esta microalga se reporta un umbral entre 1 y 1.3 Pa y por encima de estos valores existe pérdida en la viabilidad de *C. muelleri*. En la Figura 8 se muestra el perfil de velocidad del biorreactor, se observa la formación de los vórtices en a la izquierda y derecha de la piedra de aireación y el paso de agua por debajo de ella que evita la precipitación de las microalgas. Sin embargo, debido a las limitaciones de equipo en el laboratorio no fue posible medir la velocidad del fluido, el cual permite calcular el número de Reynolds y así determinar las fuerzas de corte en el FBR; sin embargo, al momento de revisar el cultivo al microscopio no se observaron células rotas o sin zetas, lo que de manera indirecta podría sugerir que las fuerzas de corte no estaban afectando al cultivo. El coeficiente de transferencia de masa ($K_L a$) es un parámetro importante que permite conocer la difusión de la interfase gas-líquido (Fernández *et al.*, 2013, Decostere 2016 y Muharam 2017). Este parámetro está en función del gas y la superficie líquida de contacto, esto quiere decir que depende del flujo de gas, el tamaño de burbuja y la agitación del FBR. Este parámetro es indispensable, ya que nos permite conocer con que eficiencia el CO_2 se difunde de las burbujas de aire al agua para poder ser asimilado por las microalgas.

Al inicio del cultivo, el CO_2 no fue un factor limitante. El CO_2 atmosférico es suficiente para el cultivo de *C. muelleri*, ya que no se observó una limitación en el crecimiento hasta el día 10. Sin embargo, conforme la densidad celular incrementa, la demanda de CO_2 también incrementa, pudiendo ser este el factor limitante en la producción de biomasa en un tiempo mayor a 10 días. El CO_2 no sólo funciona como fuente de carbono. La disminución de CO_2 trae consigo otros problemas como son el incremento de pH y el cambio de alcalinidad en el agua. En esta tesis se observó que la tasa de consumo de CO_2 es dependiente del tiempo, tendiendo a incrementar y posteriormente disminuye con el paso del tiempo hasta llegar a un consumo basal en fase estacionaria.

En el presente estudio no se detectó NAT en ninguno de los tratamientos. Esto pudo ser debido a que *C. muelleri* fue cultivada con medio comercial f Proline®, el cual tiene como fuente de nitrógeno nitrato de sodio. En estudios anteriores, se encontró que se obtuvo un mejor crecimiento en 10 diferentes especies de microalgas utilizando nitratos como fuente de nitrógeno sobre amonio (Lourenço *et al.*, 2002). En *Chlorella sorokiniana* se encontró que el consumo de amonio fue 2.5 veces mayor al de nitratos (Kim *et al.* 2013). Suponiendo una tendencia similar en *C. muelleri* explicaría el por qué no se detectó NAT en ningún momento del cultivo. Aunado a esto, no espera que la concentración de NAT sea alta en un cultivo de microalgas debido a que la principal fuente de nitrógeno son los nitratos. La producción de NAT por bacterias heterotróficas no es mayor a la tasa de consumo.

La fuente de fosfatos fue el macronutriente que se consumió primero en todos los tratamientos. En este trabajo se utilizó fosfato monosódico. El consumo de fosfatos fue de manera exponencial en todos los tratamientos. Entre el día 5 y 6 la concentración de fosfatos fue de 0.05 mg L^{-1} . A pesar de esto, se continuó observando crecimiento celular. Esto pudo ser debido a un mecanismo conocido como “overshoot” (Singh *et al.*, 2018) el cual consiste en una acumulación excesiva de fosfato inorgánico soluble (FIS) en cadenas de polifosfato (poly-P). Este mecanismo no está restringido a células con limitación de fosfato. Células cultivadas en un medio rico en fosfato también almacenan fosfato en grupos poly-P y grupos FIS. Singh *et al.* (2018) generó un modelo de consumo de fosfatos llamado Modelo Extendido de la Interacción de Fosfatos (ExpPIM, por sus siglas en inglés). Su simulación es de aproximadamente 80 horas hasta que la biomasa se vio limitada por luz. Hasta ese punto descrito en la simulación, la tendencia de consumo de fosfato fue similar a la observada en este estudio (Fig. 15).

Para modelar el crecimiento de *C. muelleri* se utilizó un modelo logístico (Ec. 2). El modelo corresponde a modificaciones basadas en la ley de mortalidad de Gompertz, el cual es un modelo matemático ampliamente utilizado en el área de biología, ya que nos permite describir un crecimiento lento con una fase final estacionaria. En este modelo, la fase final estacionaria está relacionada con la disponibilidad de nutrientes y otros factores limitantes como luz, metabolitos de desecho y concentración de nutrientes.

En la industria biotecnológica y acuícola, es necesario modelar curvas de crecimiento. Para obtener parámetros importantes como tasas de crecimiento o de consumo de nutrientes. Es preferible utilizar modelos a simples regresiones lineales sobre un conjunto de datos. Al utilizar modelos simples, se utilizan menos variables y es más sencillo dar una explicación biológica a cada una de las variables. Existen trabajos como el de Zwietering *et al.* (1990) donde compara el uso de diferentes modelos matemáticos (lineales, cuadráticos, exponenciales y logísticos de 3 y 4 parámetros) en la bacteria *Lactobacillus plantarum*. No solo se han realizado este tipo de modelos de crecimiento en bacterias, sino también para microalgas como *Scenedesmus obliquus*, con un coeficiente de determinación superior al 0.90 y para *Spirulina platensis*, con un coeficiente de determinación superior a 0.96 (Çelekli *et al.*, 2008 y Çelekli *et al.*, 2009). *Dunaliella tertiolecta* es otro ejemplo de microalga que se ha logrado modelar con éxito utilizando el modelo de Gumpertz con coeficiente de determinación superiores a 0.98 (Halmi *et al.*, 2014). El modelo sigmoidal empleado en este trabajo es de tres parámetros (a, b y c). A pesar que en esta tesis no se encontraron diferencias significativas en la concentración celular entre los tratamientos, el modelo nos indica que el

tratamiento 2 tiene una mayor capacidad de biomasa, seguido por el tratamiento 3, el tratamiento 1 y finalmente el tratamiento 0.

A pesar que el parámetro μ_{max} obtuvo su valor mayor en el tratamiento 0 (Ec. 7). Sin embargo, se observa la función de la tasa de crecimiento (Ec. 4) del tratamiento 0 (Figura 23) como al día 10 la tasa de crecimiento tiende a 0, representado el inicio de la fase estacionaria indicando la cantidad máxima de biomasa que generó el sistema. Por el contrario, en los tratamientos 1, 2 y 3 se observa que aún después del día 10 la tasa de crecimiento no tiende a 0 (Figuras 24 a 26), indicando que estos sistemas aún no alcanzan la fase estacionaria. En el caso del tratamiento 2 y 3 que al día 10 presentan la misma concentración de biomasa que el tratamiento 0 en un tiempo mayor a 10 días superaran al tratamiento control (T0). Se puede concluir que la eficiencia en el aprovechamiento de nutrientes y producción de biomasa es superior en los tratamientos irradiados con luz LED (T1, T2 Y T3) que al tratamiento control.

La composición espectral de la luz es capaz de modificar el metabolismo microalgal. Debido a esto, existen cambios en el perfil nutricional (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996). La fase de cultivo, también afecta el perfil nutricional de las microalgas (Arredondo y Voltolina, 2007). La composición proximal de *C. muelleri* presentó diferencias significativas debido a la composición espectral y el paso del tiempo. El mayor porcentaje de proteína se observó en el tratamiento 2 al día 9. El porcentaje de proteínas obtenido en este trabajo es similar a los reportados por Lora-Vilchis *et al.* (2004), Milke *et al.* (2008), Liang *et al.* (2006), Cruz-Cruz *et al.* (2019) y Lovio-Fragos *et al.* (2019) para *C. muelleri* y en estudios similares con *Chaetoceros calcitrans* (Banerjee *et al.* 2011). Autores como Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996), Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra (2009), Wang *et al.* (2014) y Jannah *et al.* (2019) reportan porcentajes de proteína mayores a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, algunos de estos autores no utilizan medio "f", utilizan alguna modificación de medio "f/2" o fertilizantes agrícolas. Diferentes medios de cultivo pueden modificar el contenido de proteína y a su vez el porcentaje de proteína en la célula (Pires *et al.*, 2017).

En el caso específico de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) el porcentaje de proteína obtenido en este estudio es similar al que reportan en sus tratamientos por encima de $498 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz verde-azul. De acuerdo a lo reportado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) el contenido de proteína incrementó con luz azul; esto concuerda con lo observado en el presente trabajo. Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) obtienen un aumento en el porcentaje de proteína en *Chaetoceros* sp. concordando con la tendencia obtenida con *C. muelleri*, siendo el tratamiento 2 el que obtuvo un mayor porcentaje de

proteínas y el tratamiento 0 el que obtuvo un menor porcentaje de proteínas. Confirmando que la microalga *C. muelleri* incrementa su contenido proteico con luz azul y roja.

El porcentaje de lípidos fue disminuyendo con el paso del tiempo, siendo al inicio del cultivo cuando se presentó el mayor porcentaje, debido a que el inóculo fue tomado en la fase exponencial tardía. Al final del experimento no se alcanzó la fase estacionaria tardía, debido a esto no se observaron gotas de aceite en las células, ni un aumento de tamaño significativo en *C. muelleri*. El porcentaje de lípidos es similar a los reportados por Milke *et al.* (2008), Liang *et al.* (2006), Wang *et al.* (2014), Cruz-Cruz *et al.* (2019) Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996), en sus tratamientos de luz verde-azul en altas intensidades (Irradiancia > 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sin embargo, los resultados de porcentaje de lípidos difieren con los reportados por Lora-Vilchis *et al.* (2004), Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra (2009) y Jannah *et al.* (2019). En este trabajo observó que por efecto de la luz azul disminuye el porcentaje de lípidos. Esto podría deberse a que a que las células no utilizan los lípidos como almacenamiento de energía debido a que se encuentran en fase de crecimiento exponencial.

El porcentaje de carbohidratos se mantuvo oscilando en valores cercanos a 25% y no observando diferencia significativa entre los tratamientos. El porcentaje de carbohidratos reportado en este trabajo es similar a los reportado por Liang *et al.* (2006), Milke *et al.* (2008), Banerjee *et al.* (2011), Wang *et al.* (2014), y Salas-Leiva *et al.* (2016). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo difieren con los reportados por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996), Pacheco-Vega y Sánchez-Saavedra (2009). Los resultados no concuerdan con lo reportado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) donde se asevera que el espectro de luz puede modificar el porcentaje de carbohidratos. Sin embargo, en el trabajo de Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) se trabajan diferentes irradiancias y el espectro de luz es diferente al utilizado en el presente trabajo.

En esta tesis se cuantificó diariamente la cantidad de concentración de carbohidratos y se observó que oscila en 25% (Figura 20). Sin embargo, no se encontró algún trabajo similar donde se cuantifique de manera diaria la cantidad de carbohidratos, normalmente se realizan mediciones al inicio al final de los experimentos. Nuestra hipótesis se basa en que los carbohidratos al tener una función estructural, existe algún porcentaje fijo dentro de la célula (20%) y las variaciones que se observan pueden deberse a que las muestras se tomaron en momentos de producción o consumo de carbohidratos. Los carbohidratos no son una reserva de energía a largo plazo y en todo momento la célula está produciendo y consumiendo glucosa para obtener energía.

A partir de la extracción y cuantificación de pigmentos se pudo observar que la concentración de clorofila a fue similar en los tratamientos, la cantidad de pigmentos por célula fue mayor en los primeros días, cercanos al momento de μ_{\max} , posteriormente disminuyeron y volviendo a un nivel similar al del día 0. Otros autores concuerdan en que el mayor contenido de clorofila se encuentra cercano al día de máximo crecimiento (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996, Milke *et al.*, 2008, Fernández-Robledo, 2013). Los altos contenidos de pigmentos durante la fase de crecimiento exponencial se deben a la necesidad de captar una mayor cantidad de energía para crecimiento (Fernández-Robledo, 2013).

Un gran número de trabajos ha demostrado que el espectro de luz induce a un cambio en el contenido de clorofila a. A pesar de que algunos autores aun consideran el cambio en concentración de pigmentos especie específico. El cambio en el contenido de pigmentos por efecto del espectro de luz se ha observado en *Isochrysis sp.*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros sp.*, entre otras especies (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002 y Vásquez-Suarez *et al.*, 2013). A pesar de lo reportado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (2002) no se observó diferencia significativa en la cantidad de clorofila a por célula utilizando la luz LED y la lámpara fluorescente. Sin embargo, se ha reportado que tanto la clorofila a como la clorofila c incrementaron en *T. pseudonana* cuando se cultivó a diferentes intensidades lumínicas (Vásquez-Suarez *et al.* 2013). Esta tendencia se observa en el cultivo de *Chaetoceros muelleri* que mantuvo una proporción de clorofila a y c cercana a 1 en los tratamientos con luz LED, mientras que en el tratamiento control la proporción se encontró alrededor de 0.7. La emisión espectral utilizada en estos experimentos favoreció la absorción de la clorofila c y de esta manera se mejora la eficiencia de la conversión de energía lumínica a energía química.

Los pigmentos accesorios como los carotenoides medidos en *Chaetoceros muelleri* en este trabajo siguen una tendencia similar a la descrita para las clorofilas. Existe una tendencia de incrementar al inicio de la fase exponencial cuando no existe efecto de autosombreado y el riesgo de fotooxidación es mayor. De la misma manera, cuando se acerca el estado estacionario se incrementa la cantidad de carotenoides como protección, debido a la baja fotosíntesis que se realiza por limitación por nutrientes (Graham, 2017). Sin embargo, la concentración de carotenoides por célula no cambió durante el cultivo y esto puede deberse a que $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ *C. muelleri* trata de estar protegida ante la fotooxidación. Este comportamiento es similar al reportado por Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) para *Chaetoceros sp.* a altas irradiancias (Irradiancias mayores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Debido al cambio en el porcentaje de proteínas y lípidos, es normal esperar cambio en el peso o tamaño celular (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 1996). Sin embargo, en ese trabajo, no se observó diferencias significativas en el porcentaje de peso orgánico. En general éste se mantuvo alrededor del 74%. No se observaron cambios en el porcentaje de peso orgánico debido a que *C. muelleri* no acumulo sílice o alguna otra sal inorgánica durante el cultivo. Otro factor que podría modificar el peso seco son las fases de crecimiento; sin embargo, no se llegó a una fase estacionaria tardía. En el caso del tratamiento 0, no existió fase lag y en el caso de los tratamientos 1 al 3 la fase lag fue corta sin observar diferencia significativa y nunca llegó a una fase estacionaria mayor a 1 día. El porcentaje de cenizas se mantuvo constante alrededor del 25% coincidiendo con Sánchez-Saavedra y Voltolina (1996) Lora-Vilchis *et al.* (2004), Milke *et al.* (2008), Liang *et al.* (2006), Cruz-Cruz *et al.* (2019) y Lovio-Fragos *et al.* (2019). Algunos autores reportan un porcentaje de cenizas mayor, esto puede deberse a un mal lavado de las células antes de la realización del análisis proximal y a la presencia de sales inorgánicas.

En resumen, la geometría del biorreactor, velocidades en el flujo de los fluidos (agua y aire), tamaño de burbujas, composición espectral de la luz, intensidad lumínica y concentración de nutrientes permiten optimizar parámetros como fuerzas de corte, K_{La} , fotosíntesis y las tasas de consumo de nutrientes. A partir de estos parámetros fue posible modelar y optimizar el rendimiento de biomasa en los FBR. El porcentaje de proteínas, lípidos, carbohidratos y concentración de pigmentos son otras variables de respuesta que permiten evaluar el rendimiento de los FBR ya que son macroelementos asociados al crecimiento y son de una gran importancia en la industria acuícola.

Capítulo 5. Conclusiones

1. La dimensión adecuada del fotobiorreactor plano estuvo entre 15 y 20 cm de ancho para el cultivo de *C. muelleri* a $120\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz LED roja y azul en proporción 2:1, temperatura constante ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$).
2. El uso de lámparas LED permitió generar un espectro adecuado para incrementar la producción de biomasa y proteína en *C. muelleri* a $120\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz LED roja y azul en proporción 2:1, temperatura constante ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$).
3. Una fuente de iluminación uniforme optimiza la relación superficie/volumen iluminada del fotobiorreactor plano.
4. El análisis de calidad de agua permitió determinar las tasas de consumo de nitratos, nitritos y CO_2 de la microalga *C. muelleri* a $120\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con luz LED roja y azul en proporción 2:1, temperatura constante ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$).
5. Un modelo matemático logístico permitió modelar el crecimiento de *C. muelleri* utilizando como parámetros las tasas de consumo de nitritos, nitratos y CO_2 , el tiempo de la fase lag y la capacidad de carga del sistema, con lo anterior permite predecir parámetros productivos como capacidad máxima del sistema, μ , μ_{max} y λ (tiempo fase lag en días).
6. El porcentaje de proteína en *C. muelleri* incrementó en todos los tratamientos irradiados con luz LED roja y azul en proporción 2:1 en cultivo en batch de la microalga *C. muelleri* a $120\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura constante ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$).
7. El porcentaje de lípidos en *C. muelleri* disminuyó en todos los tratamientos irradiados con luz LED roja y azul en proporción 2:1 en cultivo en batch de la microalga *C. muelleri* a $120\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura constante ($17\text{ }^{\circ}\text{C}$).

5.1 Recomendaciones

- Incrementar el número de días del experimento de 10 días a 20, para poder observar la fase estacionaria.
- Se recomienda modificar el circuito de las lámparas LED para evitar que se quemen las lámparas LED.
- Se recomienda agregar más focos LEDs con distintas longitudes de onda para clorofila a.
- Se requieren estudios adicionales que permitan determinar la velocidad de flujo de aire y caracterizar las propiedades hidrodinámicas del FBP.
- Se recomienda continuar este trabajo utilizando aire con suministro de CO₂ para determinar el porcentaje de CO₂ ideal para *C. muelleri*.
- Se recomienda incluir en el modelo el consumo de silicatos.
- Se requiere continuar el estudio utilizando diferentes temperaturas para determinar la temperatura ideal del cultivo *C. muelleri*.
- Se recomienda obtener parámetros fotosintéticos utilizando el método de Winkler y agregar estos parámetros al modelo.

Literatura citada

- Adams, V. D. (1989) *Water and wastewater examination manual*. CRC Press. pp. 247.
- Aiba, S. (1982) *Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganisms*. Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering.
- AL-Mashhadani MKH, Wilkinson SJ, Zimmerman WB. (2015) *Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes*. *Chemical Engineering Science* 137:243–53.
- Allen, E. J., and Nelson, E. W. (1910) *On the artificial culture of marine plankton organisms*. *Journal of Marine Biology Association U.K.* 8:421–74
- APHA (American Public Health Association). (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, (20th Ed), Washington, DC. 1496 pp.
- Arredondo B, Voltolina D. (2007) *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México. pag. 1-29.
- Bahadar A, Khan MB. (2013) *Progress in energy from microalgae: a review*. *Renewable Sustainable Energy Review* 27:128–48.
- Banerjee S, Hew WE, Khatoon H, Shariff M, Yusoffi F.Md. (2011) *Growth and proximate composition of tropical marine Chaetoceros calcitrans and Nannochloropsis oculata cultured outdoors and under laboratory conditions* *African Journal of Biotechnology* Vol. 10, pp. 1375-1383.
- Barsanti L, Gualtieri P. (2014) *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, Second edition. CRC Press - Taylor & Francis Group, pp. 275-297.
- Belarbi EH, Molina E, Chisti Y. (2000) *A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil*. *Enzyme Microbiology Technology*; 26:516 29.
- Belay, A. (1997) *Mass culture of Spirulina outdoors – the earthrise experience*. En: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor & Francis, London, pp. 131–158.
- Ben-Amotz, A. (2004) *Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species*. En: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell, Oxford, pp. 273–280.
- Benson BC, Gutierrez-Wing MT, Rusch KA. (2007) *The development of a mechanistic model to investigate the impacts of the light dynamics on algal productivity in a hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR)*. *Aquaculture Engineering* 36:198–211.
- Benson BC, Rusch KA. (2006) *Investigation of the light dynamics and their impact on algal growth rate in a hydraulically integrated serial turbidostat algal reactor (HISTAR)*. *Aquaculture Engineering* 35:122–134.
- Bitog JP, Lee IB, Lee CG, Kim KS, Hwang HS, Hong SW, et al. (2011) *Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: a review*. *Computation Electron Agriculture* 76:131–47

- Blanken, W., Postma R. P., deWinter L., Wijffels R.H., Janssen M. (2015) *Predicting microalgae growth* Algal Reserch Vol. 4 (2016) 28–38
- Bligh, E.G. y W.J Dyer. (1959) *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Biochemistry Phycology. 37: 911-917.
- Borowitzka MA. (1999a) *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters*. Journal of Biotechnology 70:313–21.
- Borowitzka MA. (1999b) *Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae*. En: Cohen Z, editor. Chemicals from Microalgae. London: Taylor & Francis, p. 313–52.
- Brennan L, Owende P. (2010) *Biofuels from microalgae A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renewable Sustainable Energy Review 14:557–77.
- Brown MR. (2002) *Nutritional value of microalgae for aquaculture*. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Cancún, Quintana Roo, México.
- Brown MR, Jeffrey, SW, Volkman, JK, Dunstan, G.A. (1997) *Nutritional properties of microalgae for mariculture*. Aquaculture. 151: 315-331 Cambridge, UK. 64 p.
- Butterwick C, Heaney SI, Talling JF. (2005) *Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance*. Freshwater Biology 50:291–300.
- Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. (2006) *Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances*. Biotechnology Prog 22:1490–506.
- Carvalho, A. P., Silva S. O., Baptista J. M. y Malcata, F. X. (2011) *Light requirements in microalgal photobioreactors an overview of biophotonic aspects*. Applied Microbiology Biotechnology. 5:1275-1288 p.
- Çelekli A. Balc M. M. Bozkurt (2008) *Modelling of Scenedesmus obliquus; function of nutrients with modified Gompertz model*. Bioresource Technology 99 (2008) 8742–8747
- Çelekli A. Yavuztmaca M. Bozkurt (2009) *Modeling of biomass production by Spirulina platensis as function of phosphate concentrations and pH regimes* Bioresource Technology 100 (2009) 3625–3629
- Cerón-Ortiz A. N., Cordero-Esquivel, B., Arredondo-Vega, B.O. y Voltolina, D. (2009). *Effect of algal diet and temperature on survival, growth and biochemical composition of spat of the lion's paw scallop Nodipecten subnodosus*. Aquaculture. 298: 64-69 p.
- Chen CH, Berns DS. (1980) *Thermotropic properties of thermophilic, mesophilic, and psychrophilic blue-green-algae*. Plant Physiol 66:596–9.
- Chisti Y, Moo-Young M. (1993) *Improve the performance of airlift reactors*. Chemical Engineering Progress; 89(6):38–45.
- Chisti Y. (1989) *Airlift bioreactors*. New York: Elsevier; p. 355.
- Chisti Y. (2007) *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Adv 25:294–306.

- Cornet JF, Dussap CG, Dubertret G. (1992) *A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium Spirulina platensis in photobioreactors: I. Coupling between light transfer and growth kinetics*. Biotechnology Bioengineering 40:817–825.
- Cruz-Cruz I. Maldonado-García M. Rebollar-Prudente R. Estrada-Godínez J.A. Pacheco-Vega J.M. Cadena-Roa M. (2019) *Nutritional value and population growth of Brachionus plicatilis fed with endemic microalgae from North Pacific*, Latin American Journal of Aquatic Research, 47(1): 42-51, 2019
- Cuellar-Bermudez SP, Garcia-Perez JS, Rittmann BE, Parra-Saldivar R. (2015) *Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels*. Journal Clean Products 98:53–65.
- de Godos I, Mendoza JL, Acien FG, Molina E, Banks CJ, Heaven S, et al. (2014) *Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases*. Bioresource Technology 153:307–14.
- de Vree JH, Bosma R, Janssen M, Barbosa MJ, Wijffels RH. (2015) *Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors*. Biotechnol Biofuels. Journal Clean Products 98:53–65.
- Decostere B. Alvarado A. Sanchez E.M. Pauta G. Rousseau D.P.L. Nopens I. Van Huelle S. (2016) *Model based analysis of the growth kinetics of microalgal species residing in a waste stabilization pond* DOI 10.1002/jctb.5131
- Dubois M, Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, P, Smith F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical chemistry, 28(3): 350-356.
- Enright CT, Newkirk GF, Craigie JS, Castell JD. (1986). *Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile Ostrea edulis*. Journal Marine Biology and Ecology 96:1-13
- Fábregas J. Vázquez V. Cabezas B. y Otero A. (1993) *Tris not only controls the pH in microalgal cultures, but also feeds bacteria* Journal Applied Phycology
- Fernandes TV, Shrestha R, Sui YX, Papini G, Zeeman G, Vet LEM, et al. (2015) *Closing domestic nutrient cycles using microalgae*. Environmental Science and Technology 49:12450–6.
- Fernández FGA Fernandez-Sevilla JM, Grima-Molina E. (2013) *Photobioreactors for the production of microalgae* Review Environmental Science Biotechnology (2013) 12:131–151
- Fernández FGA, Camacho FG, Sánchez Pérez JA, Sevilla JMF, Grima EM. (1998) *Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance*. Biotechnology and Bioengineering 58(6):605–616.
- Fernández FGA, Sevilla JMF, Grima EM. (2013) *Photobioreactors for the production of microalgae*. Review Environmental Science and Biotechnology 12:131–51.
- Flores-Vergara, C., Cordero-Esquivel, B., Cerón- Ortiz, A. N. y Arredondo-Vega, B.O. (2004). *Combined effects of temperature and diets on growth and biochemical composition of the Pacific oyster Crassostrea gigas (Thunberg) spat*. Aquaculture Research. 35:1131-1140 p.
- Goncalves AL, Pires JCM, Simoes M. (2016) *The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach*. Research Advance 6:22896–907.

- Goncalves AL, Simoes M, Pires JCM. (2014) *The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater*. *Energy Conversion and Management* 85:530–6.
- Grima EM, Pérez JAS, Camacho FG, Sevilla JMF, Fernández FGA. (1996) *Productivity analysis of outdoor chemostat culture in tubular air-lift photobioreactors*. *Journal Applied Phycology* 8:369–380.
- Grima EM, Sevilla JMF, Perez JAS, Camacho FG. (1996) *A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances*. *Journal Biotechnology* 45:59–69.
- Grobbelaar JU, Nedbal L, Tichy V. (1996) *Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation*. *Journal Applied Phycology* 8:335–43.
- Guevara M, Bastardo L, Cortez R, Arredondo-Vega BO, Romero L, Gómez P. (2011) *Pastas de Rhodomonas salina como alimento para Brachionus plicatilis (Rotifera)*. *Review Biology Tropper*. 59 (4):1503-1515 p.
- Guillard RR, Ryther JH. (1962) *Studies of marine planktonic diatoms: I. cyclotella nana hustedt, and detonula confervacea (cleve) gran*. *Canadian journal of microbiology*, 8(2), 229-239.
- Halmi MIE, Shukor MS, Johari WLW, Shukor MY. (2014) *Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae Dunaliella tertiolecta* *Asian Journal of Plant Biotechnology*, 2014, Vol 2, No 1, 1-6
- Han BP, Virtanen M, Koponen J, Straskraba M. (2000) *Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model*. *Journal Plankton Research* 22:865–85.
- Huesemann M. H., Van Wagenen J., Miller T., Chavis A., Hobbs S., Crowe B. (2013) *A Screening Model to Predict Microalgae Biomass Growth in Photobioreactors and Raceway Ponds*. *Biotechnology and Bioengineering*
- Jannah M, Ulkhaq M.F, Azhar M.H, Suciyo, Soemarjati W. (2019) *Growth performance of laboratory-scale Chaetoceros calcitrans in different containers*. *Earth and Environmental Science* 236 (2019) 012031
- Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. (2003) *Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects*. *Biotechnology Bioengineering* 81:193–210.
- Kroon BMA, Ketelaars HAM, Fallowfield HJ, Mur LR. (1989) *Modeling microalgal productivity in a high rate algal pond based on wavelength dependent optical properties*. *Journal Applied Phycology* 1:247–256.
- Kunjapur AM, Eldridge RB. (2010) *Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae*. *Industrial Engineering Chemistry Res* 49:3516–26.
- Liang Y, Beardall J, Heraud P. (2006) *Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of Phaeodactylum tricorutum and Chaetoceros muelleri (Bacillariophyceae)*. *Journal of Photochemical and Photobiology: Biology* Vol. 82, Issue 3, Pages 161-172
- López, J. Votolina, D. (2004) *Producción y composición de microalgas en laboratorios comerciales del noroeste de México*. *Simposium Internacional de Nutrición, Acuicola*. 16-19 noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México

- Lora-Vilchis, M.C., Cordero-Esquivel, B. y Voltolina, D. (2004). *Growth of Artemia franciscana fed Isochrysis sp. and Chaetoceros muelleri during its early life stages*. Aquaculture Research. 35:1086-1091
- Lorenz RT, Cysewski GR. (2000) *Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin*. Trends Biotechnology; 18:160–7.
- Lourenço SO, Barbarino E, Mancini-Filho J, Schenke KP, Adar E. (2002) *Effects of diferente nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture*. Phycologia (2002) Vol. 41 (2), 158-168.
- Lovio-Fragoso JP, Hayano-Kanashiro C, López-Elías JA. (2019) *Effect of different phosphorus concentrations on growth and biochemical composition of Chaetoceros muelleri* Latino American Journal of Aquaculture Research, 47(2): 361-366.
- Marin LD. (2009) *Análisis de la ley de cuadrado inverso para medición práctica de iluminancia*. Ingeniería 19(1):87-96.
- Michiel HA, Michels, Atze Jan van der Goot, Marian H, Vermuë, René H Wijffels. (2015) *Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump* Journal Applied Phycology DOI 10.1007/s10811-015-0559-8
- Milke LM, Bricelj MV, Parrish CC. (2008). *Biochemical characterization and nutritional value of three Pavlova spp. in unialgal and mixed diets with Chaetoceros muelleri for postlarval sea scallops, Placopecten magellanicus*. Aquaculture. 276:130-142 p.
- Molina E, Fernandez J, Acien FG, Chisti Y. (2001) *Tubular photobioreactor design for algal cultures*. Journal Biotechnology 92:113–31.
- Molina G.E., Fernández FG, García-Camacho F, Chisti Y. (1999) *Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup*. Journal Biotechnology, 70:231–47.
- Montes OG. (2014) *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 de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Estudios Superior de Ensenada (CICESE). Baja California, México.
- Moreno I, Avendaño-Alejo M, Tzonchev RI. (2006) *Designing light-emitting diode arrays for uniform near-field irradiance*. Applied Optics DOI: 10.1364/AO.45.002265 · Source: PubMed
- Muhuram Y, Dianursanti Pramadana AB, Wirya AS. (2017) *Modelling and Simulation of a Bubble Column Photobioreactor for the Cultivation of Microalgae Nannochloropsis Salina* Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Indonesia, Depok 16424, Indonesia
- Muñoz R, Guieysse B. (2006) *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review*. Water Reseach 40:2799–815.
- Olguin EJ. (2012) *Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery*. Biotechnology Advance 30:1031–46. panel photobioreactors. Applied Engineering 88:3342–53.
- Pacheco-Vega JM, Sánchez-Saavedra MP. (2009) *The Biochemical Composition of Chaetoceros muelleri (Lemmermann Grown) with an Agricultural Fertilizer* Journal of the world aquaculture society Vol. 40, No. 4

- Pande SV, RP Khan, TA Venikitasubramanian. (1963). *Microdetermination of lipids and serum total fatty acid*. Analytical Biochemical. 6:415-423.
- Paniagua J, Bückle LF, Granados C, Loya DH. (1989). *Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas*. CICESE. 61 p.
- Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN. (2011) *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. Bioresour Technol 102:35–42.
- Pires J, Alvim-Ferraz M, Martins F, Simoes M. (2013) *Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture*. Environmental Science Pollution Research 20:5096–105.
- Pires JCM, Alvim-Ferraz MCM, Martins FG, Simoes M. (2012) *Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept*. Renewable Sustainable Energy Review 16:3043–53.
- Pires JCM, Alvim-Ferraz MCM, Martins FG. (2017) *Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review*. Renewable and Sustainable Energy Review 79: 248–254
- Plastino EM, Mansilla A. (2004) *Biología marina y oceanografía conceptos y procesos*. Tomo I. Capítulo 12 p. 229-242.
- Posadas E, Morales MD, Gomez C, Acien FG, Munoz R. (2015) *Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways*. Chemical Engineering Journal 265:239–48.
- Posten C. (2009) *Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae*. Engineering Life Science 9:165–77.
- Puello-Cruz AC, Mezo-Villalobos S, González-Rodríguez B, Voltolina D. (2009) *Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson, 1939) with different microalgal diets*. Aquaculture 290: 317–319
- Pulz O. (2001) *Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms*. Applied Microbiology Biotechnology 57:287–93.
- Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. (2002) *Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures*. Aquaculture 211:195–214.
- Richmond A. (1996) *Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: a survey*. Journal Applied Phycology 8, 381–387.
- Rickelt LF, Lichtenberg M, Christian E, Trampe L, Keuhl M. (2016) *Fiber-Optic Probes for Small-Scale Measurements of Scalar Irradiance Photochemical and Photobiology*, 2016, 92: 331–342
- Roncarati A, Meluzzi A, Ciarri A, Tallarico N, Meloti P. (2004) *Fatty acid composition of different microalgae strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) according to the culture phase and the carbon dioxide concentration*. J. World Aquaculture Society. 35 (3): 401-411 p.
- Roy S, Llewellyn C, Skarstad E, Johnsen G. (2011) *Phytoplankton pigments* Cambridge University Press: 586

- Salas-Leiva J, Dupré E, Salas-Leiva D. (2015) *Análisis de la composición proximal de Chaetoceros calcitrans posterior a su criopreservación* Rev.MVZ Córdoba 21(1):5258-5264, 2016.
- Sánchez Mirón A, Cerón-García M, García Camacho F, Molina Grima E, Chisti Y (2002) *Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture*. Journal Biotechnology, 70:229–70.
- Sánchez Mirón A, Gómez AC, Camacho FG, Grima EM, Chisti Y. (1999) *Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae*. Journal Biotechnology, 70:249–70.
- Sánchez-Saavedra MP, Voltolina D. (1996) *Effect of different photon fluence rates of blue-green light on the biomass quality of a coastal diatom in pilot scale semicontinuous cultures*. Ciencias Marina, 60 (Supl. 1): 267-272.
- Sánchez-Saavedra MP, Voltolina D. (2002) *Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures*. Ciencias Marinas, 28(3):273-279.
- Sastre RR, Coesgoer Z, Perner-Nochta I, Fleck-Schneider P, Posten C. (2007) *Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors - A conceptual approach*. Journal Biotechnology 132:127–33.
- Sayre R. (2010) *Microalgae: the potential for carbon capture*. Bioscience 60:722–7.
- Schreiber C, Behrendt D, Huber G, Pfaff C, Widzowski J, Ackermann B, Müller A, Zachleder V, Moudříková S, Mojzeš P, Schurr U, Grobbelaar J, Nedbal L. (2017) *Growth of algal biomass in laboratory and in large-scale algal photobioreactors in the temperate climate of western Germany*. Bioresource Technology 234, 140–149
- Silva NFP, Goncalves AL, Moreira FC, Silva TFCV, Martins FG, Alvim-Ferraz MCM, et al. (2015) *Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: a kinetic study*. Algal Research 11:350–8.
- Singh D, Nedbal L, Ebenhöf O. (2018) *Modelling phosphorus uptake in microalgae* Biochemical Society Transactions 46 483–490
- Singh P, Gupta SK, Guldhe A, Rawat I, Bux F. (2015) *Microalgae isolation and basic culturing techniques A2. en: Kim Se-Kwon, editor. Handbook of marine microalgae*. Boston: Academic Press, p. 43–54.
- Singh RN, Sharma S. (2012) *Development of suitable photobioreactor for algae production- A review*. Renewable Sustainable Energy Review 16:2347–53.
- Slegers PM, Wijffels RH, van Straten G, van Boxtel AJB. (2011) *Design scenarios for flat panel photobioreactors*. Applied Energy 88:3342–53.
- Slegers PM, Wijffels RH, van Straten G, van Boxtel AJB. (2011) *Design scenarios for flat*. Applied Energy 88:3542–53.
- Sorokin, C. (1973) *Dry weight, packed cell volume and optical density*. Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements, 321-343. Cambridge University Press: 488 p.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. (2006) *Commercial applications of microalgae*. Journal Bioscience Bioengineering 101:87–96.

- Thompson PA, Gua M, Harrison PJ, Whyte JNC. (1993) *Effects of variation in temperature.II. on the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton*. Journal Phycology. 28: 488-197.
- Tredici MR. (1999) *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation, vol. 1*. New York: Wiley; p. 395-419.
- Treece GD, Davies AD. (2000) *Culture of small zooplankters for the feeding of larval fish*. Southern Regional Aquaculture Center. Publication 701.
- Trujillo- Valle , Voltolina D. (1994) *Cultivo de microalgas para la acuicultura*. Serie Científica, UBCS 2(1): 7-85 p.
- Valenzuela-Espinoza E. (1997) *Uso de un medio alternativo al f/2 para el cultivo de Isochrysis aff galbana (CLONE T-ISO)*. Tesis de Maestría, UABC. Ensenada, Baja California.51 p.
- Vásquez-Suárez A, Guevara M, González M, Cortez R, Arredondo-Vega B. (2013) *Crecimiento y composición bioquímica de Thalassiosira pseudonana (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias* Review Biology Tropper Vol 61 (3): 1003-1013.
- Vasumathi KK, Premalatha M, Subramanian P. (2012) *Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae*. Renewable Sustainable Energy Review 16:5443–50.
- Velasco LA. (2016) *Isolation, culture and evaluation of Chaetoceros muelleri from the Caribbean as food for the native scallops, Argopecten nucleus and Nodipecten nodosus*. Ciencias Marina, 60 (Suppl. 1): 267-273.
- Wang B, Lan CQ, Horsman M. (2012) *Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses*. Biotechnology Advance 30:904–12.
- Wang XW, Liang JR, Luo CS, Chen CP, Gao YH. (2014) *Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom Chaetoceros muelleri in response to different CO2 levels* Bioresearch Technology 161 (2014) 124–130
- White JNC. (1987). *Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves*. Aquaculture 60:231-241.
- Zar JH. (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 660 pp.
- Zhu CJ, Lee YK. (1997) *Determination of biomass dry weight of marine microalgae*. Journal Applied Phycology 9: 189-19
- Zijffers JWF, Schippers KJ, Zheng K, Janssen M, Tramper J, Wijffels RH. (2010) *Maximum photosynthetic yield of green microalgae in photobioreactors*. Marine Biotechnology 12:708–18.
- Zimmerman WB, Zandi M, Tesar V, Gilmour DJ, Ying KZ. (2011) *Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae Dunaliella salina*. Applied Energy 88:3357–69.
- Zwietering M.H. Jongenburger L. Rombouts F.M. Van Triet K. (1990) *Modeling of the Bacterial Growth curve applied and environmental microbiology*. June 1990, p. 1875-1881

Anexos

Anexo A. Impresión de esferas integradoras

Se diseñó el modelo de la esfera utilizando el programa Solid Works. La esfera se encontraba hueca con un radio de 1 cm, y un grosor de 0.2 cm. La esfera contenía en la parte superior un cilindro para la entrada de la fibra óptica, variaba el diámetro del cilindro dependiendo del tamaño del recubrimiento de la fibra óptica.

Se realizó la impresión en una impresora 3D marca FormLabs modelo 1+ con resina CLEAR, posteriormente a la impresión se realizó un lavado con alcohol isopropílico concentrado durante 5 minutos y posteriormente se dejó secar en luz ultravioleta durante 30 min. Finalmente se lijaron para mejorar el esparcimiento de la luz. Se introdujo la fibra óptica y se selló con silicón para evitar que el agua entre dentro de la esfera.

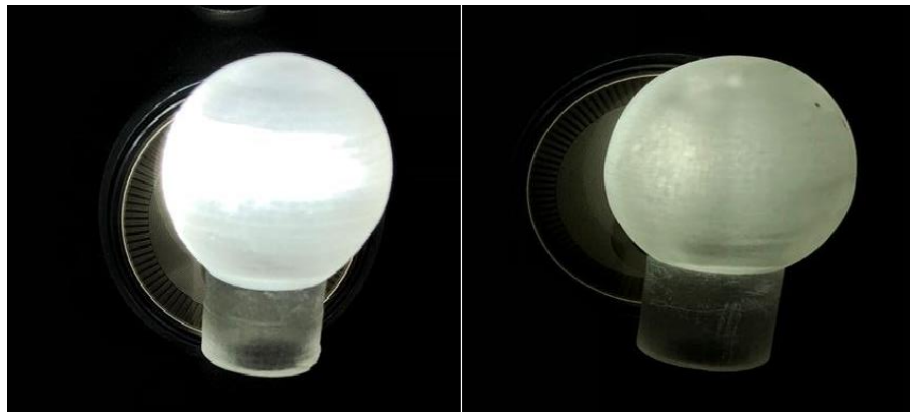


Figura 27. Esferas integradoras antes de lijar (izquierda), después de lijar (derecha).



Figura 28. Esferas integradoras utilizadas en el experimento.

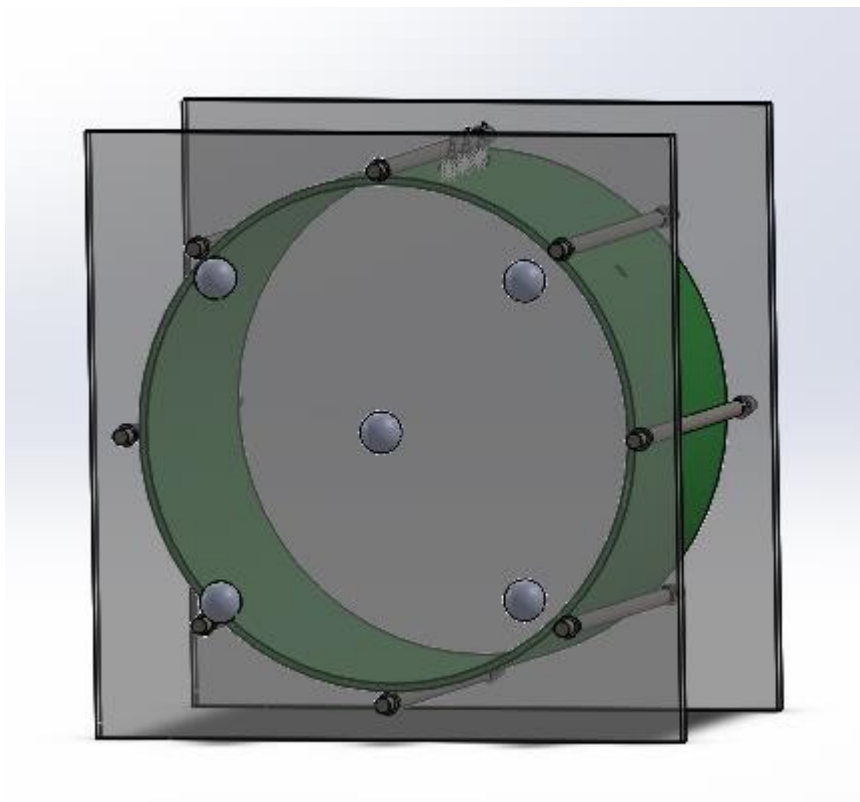


Figura 29. Distribución de las esferas integradoras dentro del fotobiorreactor.

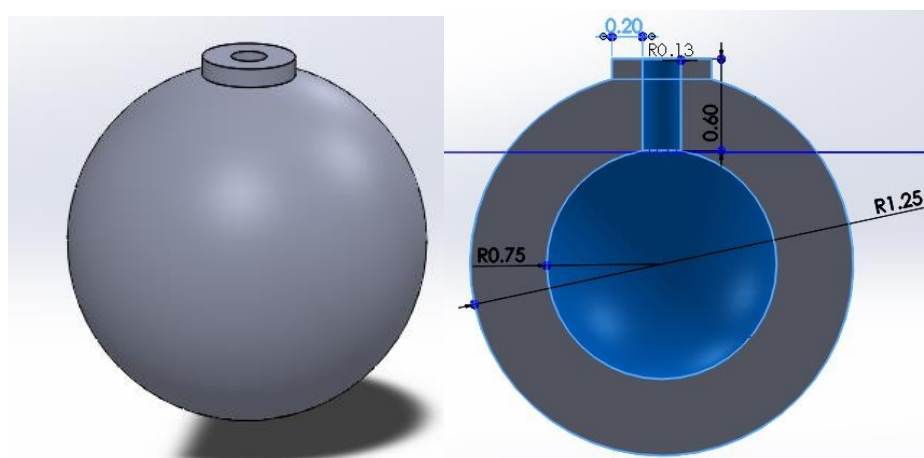


Figura 30. Diseño de la esfera integradora en Solid Works; R representa el radio, todas las medidas se encuentran en centímetros.