

REPORTE FINAL DE RESIDENCIA PROFESIONAL AGO-DIC 2018

# **DETERMINACIÓN DE CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS PARA SU ESCALAMIENTO A BIORREACTOR.**

Jesús Lorenzana Roque

Número de control: 14270235

Ingeniería Bioquímica

Asesor Interno: Dr. Arnulfo Rosales Quintero

Revisores:

MC. Lucia María Cristina Ventura Canseco

Dra. Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 18 de Enero del 2019

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>2. DESCRIPCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN</b>	<b>6</b>
2.1 Nombre de la organización	6
2.2 Ubicación de la organización	6
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>7</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
4.1 Objetivo general:	8
4.2 Objetivos particulares.	8
<b>5. PROBLEMAS A RESOLVER</b>	<b>9</b>
<b>6. MARCO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
6.1. Biorreactores	9
6.1.1. Fotobiorreactor	9
6.1.2 Columna de burbujeo	10
6.1.3. Tanque de agitado	10
6.2. Hidrodinámica	11
6.2.1. Tiempo de mezclado	11
6.2.2. Diámetro de burbuja (Dbms)	11
6.2.3. Coeficiente de retención de gas (EG)	12
6.2.4. Área interfacial de contacto gas-líquido (a')	12
6.2.5. Coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa)	12
6.3 Microalgas	12
6.3.1. <i>Limnothrix Planctónica</i>	13
6.3.1.1. Descripción morfológica.	13
Figura 1. Filamento visto con objetivo de 100X	14
6.3.2. <i>Pectinodesmus pectinatus</i>	14
6.3.2.1. Descripción morfológica.	15
Figura 2. <i>Pectinodesmus pectinatus</i> con objetivo 100X.	15
6.4 Medios de cultivo	15
6.5 Determinación de Biomasa	17
6.5.1. Biomasa microalgal	17
6.5.2. Técnicas directas para la cuantificación de biomasa	17

Métodos directos _____	17
Métodos indirectos _____	18
6.6. Tasa de crecimiento _____	19
<b>Capítulo VII. Metodología _____</b>	<b>19</b>
7. Determinación de parámetros hidrodinámicos _____	19
7.1. TIEMPO DE MEZCLADO _____	19
7.2. DIAMETRO DE BURBUJA _____	20
7.3. COEFICIENTE DE RETENCIÓN DE GAS (EG) _____	20
7.4. DETERMINACIÓN DEL ÁREA INTERFACIAL DE CONTACTO GAS-LÍQUIDO (a') _____	21
7.5 DETERMINACIÓN TEÓRICA DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO (KLa) _____	21
7.6. Determinación de biomasa: cámara de Neubauer _____	22
7.7. Determinación de biomasa: peso seco _____	23
7.8.1 Tiempo de duplicación _____	24
7.9. Resiembra de placas _____	24
<b>VIII. RESULTADOS _____</b>	<b>24</b>
<b>8.1. Tiempo de Mezclado _____</b>	<b>24</b>
Figura 3. Tiempo de mezclado en difusor cilíndrico, flujo mínimo. _____	25
Figura 4. Tiempo de mezclado en difusor cilíndrico, flujo máximo. _____	25
Figura 5. Tiempo de mezclado en difusor esférico, flujo mínimo. _____	26
Figura 6. Tiempo de mezclado en difusor esférico, flujo máximo. _____	26
Figura 7. Tiempo de mezclado en difusor rectangular, flujo mínimo. _____	27
Figura 8. Tiempo de mezclado en difusor rectangular, flujo máximo. _____	27
Grafica 1. Tiempo de mezclado en función de Wsg. _____	28
<b>8.2. Tamaño de burbuja _____</b>	<b>28</b>
Figura 9. Tamaños de burbujas en difusor cilíndrico flujo mínimo (A), flujo máximo (B). _____	28
Figura 10. Tamaños de burbujas en difusor esférico flujo mínimo (A), flujo máximo (B). _____	29
Figura 11. Tamaños de burbujas en difusor rectangular flujo mínimo (A), flujo máximo (B). _____	30
Grafica 2. Diámetro de la burbuja en función de Wsg. _____	30
<b>8.3 Coeficiente de retención de gas (Eg) _____</b>	<b>31</b>
Grafica 3. Coeficiente de retención de gas (Eg) en función de Wsg. _____	31
<b>8.4 Área interfacial de contacto gas-liquido (a') _____</b>	<b>32</b>
Grafica 4. Área interfacial de contacto gas-liquido (a') en función de Wsg. _____	32
<b>8.5 Coeficiente teórico de transferencia de oxígeno (KLa) _____</b>	<b>32</b>
Grafica 5. Coeficiente teórico de transferencia de oxígeno (KLa) en función de Wsg. _____	32
<b>8.6 Cálculo de biomasa microalgal _____</b>	<b>33</b>
<b>8.6.1. <i>Limnothrix planctónica</i> _____</b>	<b>33</b>
Figura 12. Cinética de <i>Limnothrix planctónica</i> _____	33

<b>8.6.1.2 <i>Pectinodesmus pectinatus</i></b>	<b>33</b>
Figura 13. Cinética de <i>Pectinodesmus pectinatus</i>	33
<b>8.6.2. Cámara de Neubauer y peso seco</b>	<b>34</b>
Grafica 6. Cinética y peso seco de <i>Limnothrix planctónica</i> .	34
Grafica 7. Cinética y peso seco de <i>Pectinodesmus pectinatus</i>	35
<b>8.6.3. Resiembra</b>	<b>36</b>
Figura 14. Resiembra de a) <i>Limnothrix planctónica</i> y b) <i>Pectinodesmus pectinatus</i>	36
<b>IX. CONCLUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>37</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>38</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>42</b>
<b>INDICE DE IMAGENES Y GRÁFICAS</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas y las cianobacterias son microorganismos unicelulares que asumen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Es decir, son capaces de formar biomasa orgánica a partir de CO<sub>2</sub> y luz, usando al agua como donador de electrones, oxidándola a O<sub>2</sub>. Las Microalgas y cianobacterias difieren en muchos aspectos, especialmente en que las primeras son eucariotas y las segundas son procariotas, pero desde el punto de vista de la ingeniería de procesos, lo relevante es que crecen usando luz como energía y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Por supuesto, tienen requerimientos nutricionales distintas, especialmente teniendo en cuenta que muchas cianobacterias pueden fijar N<sub>2</sub> atmosférico, mientras que las microalgas necesitan compuestos nitrogenados como nitrato, amonio o aminoácidos (Fernández, 2014).

Los cultivos de microalgas son considerados una tecnología de mediana complejidad, con desarrollo en escala piloto (Flotats *et al.*, 2011). Al tratarse de organismos vivos involucran una serie de parámetros (nutrientes, luz) que debe ser considerados, evaluados, determinados y medidos para realizar con éxito un cultivo.

Dada la necesidad de llevar estas microalgas a cultivos masivos es necesario usar fotobiorreactores, estos son equipos donde los cultivos crecen bajo condiciones controladas de iluminación, nutrientes, temperatura, pH. Por lo que en este proyecto se llevó a cabo la caracterización hidrodinámica de un biorreactor del tipo de columna de burbujeo.

Un biorreactor es un equipo en el que se pueden realizar reacciones bioquímicas para convertir cualquier sustrato en un producto de utilidad por la acción de biocatalizadores (enzimas, células o estructuras subcelulares) (Chisti y Moo-Young, 2002). Los biorreactores se emplean en la manufactura de productos comerciales como metabolitos primarios (ácido acético, acetona, alcohol, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y polisacáridos); metabolitos secundarios (antibióticos); enzimas industriales; cultivo de células (biomasa) y tratamiento de aguas residuales (Chisti, 1989; Smith, 1996).

## **2. DESCRIPCIÓN DE LA ORGANIZACIÓN**

### **2.1 Nombre de la organización**

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

### **2.2 Ubicación de la organización**

Carretera Panamericana Km. 1080 s/n

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

C.P: 29050

Apartado Postal: 599

Fax: (961)61 5 16 87

Teléfono: (961)61 5 04 61

RFC: TNM140723GFA

Contacto: <http://www.ittg.edu.mx>

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, existe una alta demanda de microalgas para la producción de alimentos, productos farmacéuticos e industria química. Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos 50 años han demostrado que las microalgas son capaces de producir una amplia cantidad de intermediarios químicos e hidrocarburos que ofrecen la posibilidad de sustituir los productos derivados del petróleo o del gas natural (Moya, 2011).

Algunos metabolitos principales que pueden ser extraídos de la biomasa microalgal son; lípidos, carbohidratos y proteínas, entre otros. Por tanto, la bioconversión de estos productos en alcoholes, metano, hidrógeno, etc., hacen de la explotación de microalgas una verdadera industria de biorrefinería.

Es por ello por lo que esté presente trabajo busca conocer el crecimiento de dos cepas microalgales aisladas del lago Bosque Azul, de la reserva ecológica lagos de Montebello, Chiapas teniendo como objetivo el estudio de las cinéticas de crecimiento.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general:**

- Desarrollar cinéticas de crecimiento de microalgas a nivel biorreactor y matraz.

### **4.2 Objetivos particulares.**

- Caracterizar hidrodinámicamente un biorreactor de columna de burbujeo
- Resembrar las microalgas aisladas del lago Bosque azul
- Cuantificar el crecimiento microalgal en nivel matraz por conteo en cámara de Neubauer y peso seco.
- Determinar la tasa de crecimiento microalgal.



## **5. PROBLEMAS A RESOLVER**

El crecimiento de microalgas está condicionado a una variedad de factores como el pH, la temperatura, fotoperiodo, intensidad de luz, entre otros. El manejo adecuado de tales factores puede inducir diferentes respuestas metabólicas en las microalgas, lo cual ha sido aprovechado para manipular la composición bioquímica de estos microorganismos y conferirles de esta forma, mayor interés biotecnológico en diversas industrias.

## **6. MARCO TEÓRICO**

### **6.1. Biorreactores**

Un biorreactor es un sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo, igualmente se le puede llamar así, a un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos, en los biorreactores se busca mantener las condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, CO<sub>2</sub>, etc.) para el óptimo desarrollo del metabolito de interés (Noverón, 2009).

#### **6.1.1. Fotobiorreactor**

Un fotobiorreactor se centra en equipos que permiten cultivos libres de contaminación y con la capacidad de proveer las condiciones básicas ideales para microorganismos fotótrofos como microalgas (Molina et al, 1999;). Además se pueden definir los fotobiorreactores (FBR) como contenedores o recipientes transparentes que tienen como ventajas operativas la capacidad de monitoreo de las condiciones de los cultivos y en algunos casos el control riguroso de las variables que intervienen en el proceso de producción, la disminución de la probabilidad de contaminación de los cultivos, el potencial de uso en procesos

ambientales como la filtración de aguas, la captura de CO<sub>2</sub>, acoplados con la obtención de biomasa y de compuestos de alto interés industrial.

### **6.1.2 Columna de burbujeo**

Una alternativa al reactor agitado la constituyen aquellos reactores sin agitación mecánica. El fermentador de columna o de torre de burbujeo es el fermentador más sencillo. Está formado por un recipiente cilíndrico generalmente con alturas superiores al doble del diámetro, provisto de un mecanismo de aspersion de gas en el fondo como única estructura interna, el cual provee al sistema de la aireación y la mezcla deseada con menos consumo de energía que la agitación mecánica. Las burbujas de aire o de oxígeno a medida que ascienden mezclan el contenido del reactor y satisfacen la demanda de oxígeno de las células (Bailey, 1986).

Como lo dijo (Bailey, 1986) las columnas de burbujas se utilizan industrialmente para la producción de ácido cítrico, ácido láctico, enzimas, esteroides, cerveza y vinagre y levadura para panificación. En este último caso, es normal utilizar una relación altura – diámetro de 3:1, mientras que en otras aplicaciones pueden utilizarse torres con relaciones de 6:1. Algunas veces, en los reactores de columna muy altos se instalan placas horizontales perforadas para evitar la coalescencia de las burbujas y lograr una mejor redistribución del aire.

### **6.1.3. Tanque de agitado**

Son tanques cilíndricos con un motor que mueve una flecha central, la cual soporta uno o más agitadores. Generalmente, se le colocan cuatro baffles a la misma distancia del centro alrededor de la periferia del tanque (Chisti y Moo-Young, 2002). Es el fermentador más generalmente utilizado, su diseño data de los años 40's, durante la segunda guerra mundial. Tiene gran aplicación en la industria farmacéutica por ser económico (Crueger y Crueger, 1989; Scragg, 1997).

La relación altura/diámetro es entre tres y cinco, excepto en el cultivo de células animales donde, normalmente, no excede de dos y se utilizan reactores sin baffles (Chisti y Moo-Young, 2002). El agitador puede ser introducido por arriba o por el fondo del tanque siempre que se cuente con un sello hermético.

## **6.2. Hidrodinámica**

La caracterización hidrodinámica involucra el tiempo de mezclado, diámetro de burbuja, coeficiente de retención de gas, área interfacial de contacto gas-liquido, coeficiente de transferencia de oxígeno y velocidad superficial del gas (López *et al.* 2007).

### **6.2.1. Tiempo de mezclado**

El tiempo terminal de mezclado se define como el tiempo necesario para que una gota de azul de colorante ingrese en un contenedor lleno de fluidos sea completamente mezclada hasta niveles moleculares (López *et al.* 2007).

Como lo indicaron (Pérez, S. *et al.* 2014) el tiempo de mezclado de un biorreactor dependerá de su diseño (geometría, formas de las hélices etc.), de la viscosidad del medio que se esté utilizando y por supuesto de las RPM con que se trabaje.

### **6.2.2. Diámetro de burbuja (Dbms)**

Una burbuja puede ser definida como un cuerpo autocontenido de un gas o mezcla de gases, separado del medio que la rodea por una interfase reconocible. La medición del diámetro de burbuja favorece a la caracterización de la capacidad de transferencia de oxígeno de biorreactores. El número de burbujas y el volumen de aire retirado del biorreactor permiten determinar un diámetro promedio de burbuja (Vital, V. 2006).

### **6.2.3. Coeficiente de retención de gas (EG)**

Es la fracción de gas retenida en la mezcla gas líquido, y se determina como la relación del incremento entre los volúmenes del líquido cuando se airea, y la mezcla gas-líquido (López *et al.* 2007).

### **6.2.4. Área interfacial de contacto gas-líquido (a')**

El área interfacial,  $a'$ , depende de las propiedades hidrodinámicas del reactor, es decir, del coeficiente de retención del gas en el líquido, y del diámetro de burbuja. Ambas propiedades dependen a su vez de las propiedades físicas y de la geometría del sistema (Calderbank, 1958).

### **6.2.5. Coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa)**

El  $kLa$  es un parámetro que determina la transferencia de oxígeno en biorreactores y su magnitud depende del diseño del biorreactor, de las propiedades físicas del líquido y de las condiciones de operación (Vital, V. 2006).

## **6.3 Microalgas**

El término microalga, incluye células tanto procariontas como eucariotas microscópicas, coloniales o filamentosas, pueden encontrarse en aguas marinas y dulces, suelos y otros ambientes; la mayoría realiza fotosíntesis oxigénica. Por tanto, los usos y aplicaciones de las microalgas son diversos, y en la mayoría de los casos se requiere contar con la cepa de interés, esto es tenerla aislada y limpia, además de ofrecerle las condiciones más adecuadas para su crecimiento en forma similar a su medio natural (Félix y Lora, 2017).

Según Khan *et al.*, (2009) la clasificación de microalgas se realiza en cuatro grupos debido a su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules y algas doradas. Esta diversidad muestra un gran potencial de explotación de estos

microorganismos para la producción de productos de alto valor agregado y biocombustibles (Chisti, 2007).

### **6.3.1. *Limnothrix Planctónica***

Taxonomía

**Dominio** *Prokarya*

**Reino** *Eubacteria*

**Filo** *Cyanobacteria*

**Clase** *Cyanophyceae*

**Orden** *Synechococcales*

**Familia** *Pseudanabaenaceae*

**Subfamilia** *Pseudanabaenoideae*

**Género** *Limnothrix*

**Especie** *planctónica*

#### **6.3.1.1. Descripción morfológica.**

Filamentos o tricomas solitarios, de flotación libre en línea recta o ligeramente curvados, azul-verde pálido, de 1.5-2.5 (3  $\mu\text{m}$ ) de ancho, no comprimidos en las paredes transversales indistintamente visibles, sin vainas. Células isodiamétricas tan largas como anchas o 2-3 veces más largas que anchas (6-10  $\mu\text{m}$ ), principalmente de color verde azulado, regularmente con un aerotopo localizados en los extremos de las células. Células apicales cilíndricas, redondeadas. Capaces de producir vesículas de gas facultativas, tilacoides localizados paralelamente a lo largo de las paredes celulares. Composición de ficobilina variable (con relación de ficoeritrina / ficocianina inestable). Células de involución conocidas. Sin tensiones tóxicas. Heterocitos y akinatos ausentes.

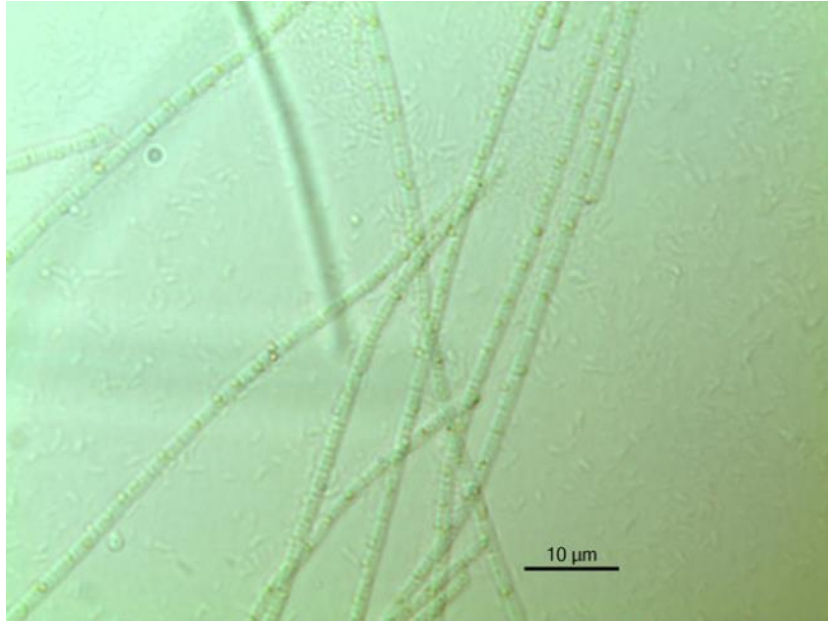


Figura 1. Filamento visto con objetivo de 100X

### **6.3.2. *Pectinodesmus pectinatus***

Taxonomía

**Dominio** *Eukaryota*

**Reino** *Plantae*

**Filo** *Chlorophyta*

**Clase** *Chlorophyceae*

**Orden** *Sphaeropleales*

**Familia** *Scenedesmaceae*

**Subfamilia** *Scenedesmoidea*

**Género** *Pectinodesmus*

**Especie** *pectinatus*

### 6.3.2.1. Descripción morfológica.

Sinonimia: *Scenedesmus pectinatus* Meyen 1829

*Scenedesmus obliquus* var. *Dimorphus* (Turpin) Hansgirg 1888

*Acutudesmus pectinatus* (Hegewald) Tsarenko 2001

Células fusiformes a veces elipsoidales; las células externas están arqueadas y las internas son rectas. Hay un cloroplasto parietal con un pirenoide por célula. Longitud y anchura de las células: 14.5 – 25.0 x 2.6 – 6.6  $\mu\text{m}$ .

Según Komárek y Fott (1983), ésta es una especie de amplia distribución, común en el plancton donde hay plantas acuáticas. De acuerdo con la base de datos Taxfish, ha sido reportada en México en Lago de Chapala, Michoacán; en los Canales de Xochimilco, Distrito Federal; así como en los estados de Tabasco, Morelos, Veracruz y el Estado de México (Adrián, 2014).

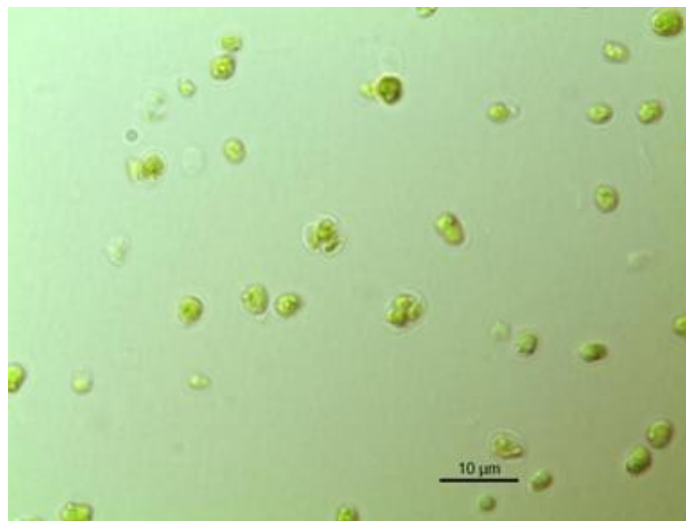


Figura 2. *Pectinodesmus pectinatus* con objetivo 100X.

### 6.4 Medios de cultivo

Cada organismo requiere encontrar en su medio todas las sustancias necesarias para la generación de energía y biosíntesis celular. Los elementos de ese medioambiente que son requeridos para el crecimiento celular se refieren como nutriente (Todar, 2002). Los requerimientos nutricionales de una célula bacteriana son revelados por su composición elemental, la cual se compone de C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn y trazas de Zn, Co, Cu y Mo. Estos elementos se encuentran

en forma acuosa, iones inorgánicos, pequeñas moléculas y macromoléculas, las cuales desempeñan un papel estructural o funcional en la célula. Los medios de cultivo ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, forman el micro mundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo (Herrera, 1985). El diseño de un medio de cultivo responderá entonces a las exigencias del microorganismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación.

#### **6.4.1. Fotoperiodo**

El fotoperiodo (tiempo de exposición a la luz y oscuridad) tiene efecto sobre los ciclos de vida y actividades metabólicas de las microalgas tanto en cultivo como en la naturaleza (Humprey, 1979). En condiciones naturales, la mayoría de las algas se forman en periodos alternos de luz: oscuridad, sin embargo, en la mayoría de los laboratorios de microalgas se mantiene constante la iluminación en los cultivos al interior, debido a que se favorece la división celular en ciertas microalgas como las diatomeas; cuando se llega a utilizar los ciclos luz: oscuridad, es con el fin de simular las condiciones naturales o la de sincronizar los cultivos (Humprey, 1979).

#### **6.4.2. Temperatura**

La productividad de las algas se acelera cuando la temperatura del medio en el que se encuentran aumenta, por lo tanto, es recomendable llegar a una temperatura óptima, ya que, por encima de esta, la producción celular disminuye debido al incremento de la respiración y fotorrespiración de las algas (Park *et al.*, 2010). El rango de temperaturas en el que las microalgas pueden desarrollarse es muy amplio, además difiere entre las distintas especies, la *Chlorella* por ejemplo puede crecer en un rango de 5 y 42°C (Ruiz, 2011). Las bajas temperaturas inducen a la acumulación celular de polioles y aminoácidos o derivados de aminoácidos que podrían contribuir a la sensibilidad o tolerancia de microalgas a la refrigeración (Richmond, 2004).



## **6.5 Determinación de Biomasa**

### **6.5.1. Biomasa microalgal**

Según (Gómez 2007, Brennan & Owende 2010, Flotats et al. 2011) la biomasa algal tiene un amplio manejo que va desde biofertilizante a producción de biocombustibles, igualmente para alimentación animal y humana, y para la obtención de productos biotecnológicos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética.

Gómez (2007) explica los beneficios de los cultivos de microalgas en 3 puntos: a) el cultivo de microalgas es un sistema biológico eficaz de utilización de la energía solar para producir materia orgánica. Las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y es posible alcanzar mayores rendimientos anuales de biomasa; b) la composición bioquímica puede modificarse fácilmente variando las condiciones ambientales y/o la composición del medio de cultivo; y c) bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas logran acumular en altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros.

### **6.5.2. Técnicas directas para la cuantificación de biomasa**

Métodos de determinación de la biomasa (Arnaíz *et al*, 2000).

#### **Métodos directos**

- Métodos gravimétricos: SST: se definen como la porción de sólidos retenidos por un filtro de fibra de vidrio que posteriormente se seca a 103-105°C hasta peso constante, y SSV: Representan la fracción de sólidos suspendidos que se volatiliza a 600°C.
- Métodos espectrofotométricos: en este método se determina la turbidez de la suspensión celular mediante espectrofotometría.
- Métodos microscópicos de recuento celular en cámaras: el recuento de microorganismos se realiza en la cuadrícula central de la cámara y se

multiplica por la profundidad, obteniéndose el número de microorganismos por unidad de volumen (No. Células. mL<sup>-1</sup>).

- Microscopía de epifluorescencia: *Naranja de acridina*: El naranja de acridina colorea tanto el ADN como el ARN de las células emitiendo a una longitud de onda aproximada de 470 nm., *DAPI*: es un colorante específico del ADN y su pico de excitación se encuentra próximo a la región ultravioleta (365 nm)., *quelato de europio*: es un colorante específico de ácidos nucleicos., *Mg-ANS*: tiñen principalmente componentes celulares como proteínas, lípidos o membranas celulares., *CTC* y *SFDA*: Ambos fluorocromos, a diferencia con los anteriores, distinguen bacterias metabólicamente activas de las que no lo son mediante la observación microscópica del producto fluorescente resultado de la actividad metabólica para la que son específicos. En el caso del CTC la actividad metabólica es la respiratoria y en el del SFDA es la actividad esterasa.
- Métodos de siembra: *UFC*: en este método para que el recuento sea estadísticamente significativo, el número de colonias deberá estar comprendido entre 30 y 300 colonias., *NMP*: El recuento de microorganismos viables se fundamenta en el desarrollo de una colonia visible a partir de cada organismo viable.

### **Métodos indirectos**

- Métodos fisicoquímicos indirectos: COT, DQO
- Componentes celulares: Ácidos nucleicos, Proteínas, Polisacáridos, Lípidos, ATP.
- Métodos bioquímicos: Actividad esterasa, Actividad deshidrogenasa.
- Métodos cinéticos: Adaptaciones del Respirómetro de Warburg, Tasa de respiración, Tasa de desaparición de sustrato, Potencial bioquímico de producción de metano.

## **6.6. Tasa de crecimiento**

El crecimiento de microalgas depende del factor limitante del crecimiento, este es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para estos microorganismos. Debido a esto es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de las microalgas para todos o el mayor número de parámetros. No obstante, estas condiciones o límites para un parámetro generalmente cambian cuando un segundo parámetro fluctúa, por lo que la influencia de un conjunto de parámetros crea una determinada respuesta en el crecimiento de las microalgas (Romo Piñera, 2002).

Teóricamente la máxima tasa de crecimiento de un cultivo de microalgas debe ser igual a la tasa máxima de fotosíntesis. A pesar de que, la productividad de microalgas se ve limitada por factores como: la concentración de nutrientes, intensidad de luz, pH y temperatura (Richmond, 2004).

# **PROCESO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS**

## **Capítulo VII. Metodología**

### **7. Determinación de parámetros hidrodinámicos**

#### **7.1. TIEMPO DE MEZCLADO**

Para el cálculo de este parámetro, se trabajará con un volumen de operación del 80%, con un equipo de aireación con difusor conectado al biorreactor. El flujo de aire se medirá con un rotámetro. Posteriormente se añadirá 1 ml de colorante amarillo huevo y de manera visual, realizando una videograbación, se determinará el tiempo en el que el colorante se mezcle completamente en el fluido. Las unidades de este parámetro se reportarán en segundos.

## 7.2. DIAMETRO DE BURBUJA

Para determinar el diámetro de las burbujas, se tomarán fotografías digitales del reactor, con una cámara digital, operando a dos velocidades de aireación de 2 L/min y 5 L/min, utilizando 3 difusores diferentes. Las fotografías serán ampliadas y analizadas midiendo el diámetro de 15 burbujas en las zonas donde no se presente coalescencia, cercana a los difusores. El diámetro real de las burbujas se calculará teniendo en cuenta el diámetro interno del reactor. Este parámetro se reportará en cm y se calculará de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$D_{ms} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2}$$

Dónde

$D_{ms}$  = diámetro medio de burbuja en cm.

$n_i$  = número de veces que se presenta un diámetro determinado.

$d_{bi}$  = valor del diámetro de las burbujas.

## 7.3. COEFICIENTE DE RETENCIÓN DE GAS (EG)

Este parámetro determinará la relación del incremento entre los volúmenes del líquido cuando se airea, y la mezcla gas-líquido. La retención de gas se determinará usando las siguientes fórmulas. Este parámetro es adimensional.

$$E_G = \frac{V_G}{V_L + V_G}$$

Donde

$E_G$  = Fracción volumétrica de gas en el sistema gas-líquido.

$V_G$  = volumen de la fase gas.

$V_L$  = volumen de la fase líquida.

$V_G$  se calcula como sigue:

$$VG=VF-VL$$

VF=volumen ocupado por el sistema gas-liquido.

VL=volumen ocupado por el líquido sin aireación.

#### **7.4. DETERMINACIÓN DEL ÁREA INTERFACIAL DE CONTACTO GAS-LÍQUIDO (a')**

Este parámetro dependerá del coeficiente de retención y del diámetro medio de Sauter y se calculará mediante la expresión de Calderbank, este parámetro se reportará en  $\text{cm}^{-1}$ .

##### **Cálculos**

$$a' = \frac{6 E_G}{d_{ms}}$$

Donde

a'= área específica de contacto gas-liquido ( $\text{cm}^{-1}$ ).

EG=fracción volumétrica de gas en el sistema gas-liquido.

D<sub>ms</sub>= diámetro medio de burbuja.

#### **7.5 DETERMINACIÓN TEÓRICA DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO (KLA)**

Para determinar este parámetro, se calculará el coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida (KL). Enseguida se multiplicará el área específica interfacial por unidad de volumen de la columna (a'). El KL se calculará mediante la relación de Akita y Yoshida, con dos velocidades de aireación: alto de 5 L/min y bajo de 2 L/min. Para calcular las Wsg se dividirán los flujos de aire a utilizar entre el área del difusor. Este parámetro se reportará en  $\text{S}^{-1}$ .

$$K_L = \left[ \frac{D}{d_{bs}} \right] S_c^{0.5} Bo^{0.25} Ga^{0.375}$$

Dónde:

$S_c = \text{Número de Schmidt} = \frac{V_c}{D}$  (adimensional).

$$Bo = \frac{g \rho_l D r^2}{\Gamma}$$

$$Ga = \frac{g D r^3}{V_c^2}$$

D=difusividad del oxígeno en agua (cm<sup>2</sup>/s)

V<sub>c</sub>=viscosidad cinemática del líquido (cm<sup>2</sup>/s).

g= aceleración gravitacional (cm/s<sup>2</sup>)

ρ<sub>l</sub>=densidad del líquido (g/cm<sup>3</sup>)

D<sub>r</sub>= diámetro del reactor (cm)

Γ=tensión superficial (g/s<sup>2</sup>)

Para agua a 20°C

D= 2.10X10<sup>-5</sup> (cm<sup>2</sup>/s) (Geankoplis, 1993)

G= 980.665 cm/s<sup>2</sup> (Geankoplis, 1993)

ρ<sub>l</sub>= 0.99823 g/cm<sup>3</sup> (Geankoplis, 1993)

Γ= 72.8 g/s<sup>2</sup>

## 7.6. Determinación de biomasa: cámara de Neubauer

Para el conteo celular, se depositará 1 ml de muestra en la cámara de Neubauer modelo BL-0010 con una profundidad de 0.1 mm. Se tomarán en cuenta los cuadrantes A, B, C, D; calculando el número de células con la siguiente fórmula (Arredondo, 2017):

$$C = N \cdot 10^4 \cdot \text{dil}$$

Donde:

**C** = cel/mL

**N** = promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL).

**dil** = factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra. Es importante aclarar que, si se usó 1 mL de muestra y 9 mL de agua sin células, el volumen total es 10 mL y el factor de dilución es = 10. Esta dilución se define como uno en diez 1:10.

### **7.7. Determinación de biomasa: peso seco**

Se tararán filtros marca Milipore con un tamaño de poro 47 mm, en un horno a 80 °C por 24 hrs. Se dejarán enfriar en el desecador por lo menos 1 h 30 min. Pesará hasta obtener un peso constante. Utilizando una bomba de vacío, se filtrarán 10 mL de cultivo. Posteriormente, el papel filtro con biomasa se trasladará a un horno a 80 °C por 24 hrs. Pesará el papel filtro con biomasa seca hasta obtener peso constante.

$$\text{PST } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{\text{PSFM}-\text{PSM}}{\text{VF}}$$

Donde:

PST= peso seco total

PSFM = peso del filtro con muestra

PSF=peso seco del filtro sin muestra

VF=volumen de muestra filtrado (mL)

### **7.8 Tasa de crecimiento microalgal**

La tasa de crecimiento específico se calculó en la fase exponencial durante un periodo de 7 y 14 días usando la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\mu = \frac{\ln (N_t)-\ln (N_0)}{(t-t_0)}$$

Dónde

Nt= número de células al tiempo final

N0= Número de células al tiempo inicial

t = tiempo final

t0= Tiempo inicial

### **7.8.1 Tiempo de duplicación**

El tiempo de duplicación y/o generación se calculó como:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde

$\mu$ = tasa de crecimiento

### **7.9. Resiembra de placas**

La resiembra se realizará con medio sólido y se hará cada 15 días con el método de estría cruzada.

## **VIII. RESULTADOS**

### **8.1. Tiempo de Mezclado**

El tiempo de mezclado presento resultados de la inyección del pulso de amarillo huevo desde la parte superior del biorreactor.





Figura 3. Tiempo de mezclado en difusor cilíndrico, flujo mínimo.

En la figura 3 se puede observar que el tiempo terminal de mezclado a una velocidad de 2 L/min fue de 4 s.

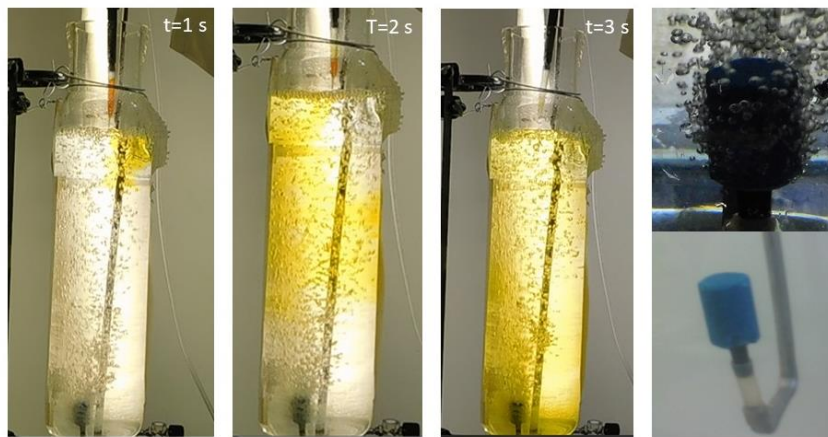


Figura 4. Tiempo de mezclado en difusor cilíndrico, flujo máximo.

En la figura 4 se puede observar que el tiempo terminal de mezclado a una velocidad de 5 L/min fue de 3 s.

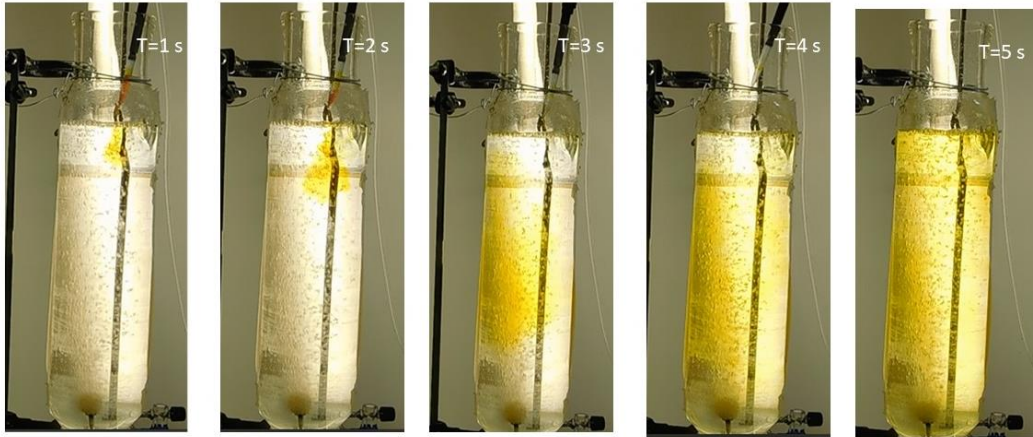


Figura 5. Tiempo de mezclado en difusor esférico, flujo mínimo.

En la figura 5 se puede observar que el tiempo terminal de mezclado a una velocidad de 2 L/min fue de 5 s.

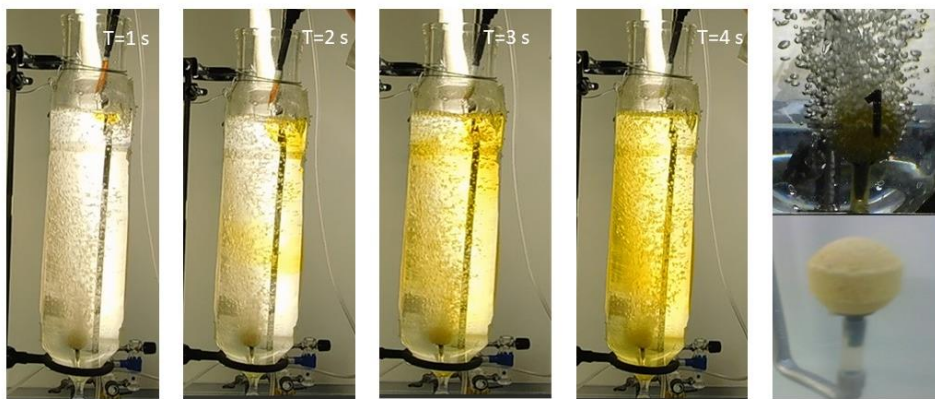


Figura 6. Tiempo de mezclado en difusor esférico, flujo máximo.

En la figura 6 se puede observar que el tiempo terminal de mezclado a una velocidad de 5 L/min fue de 4 s.

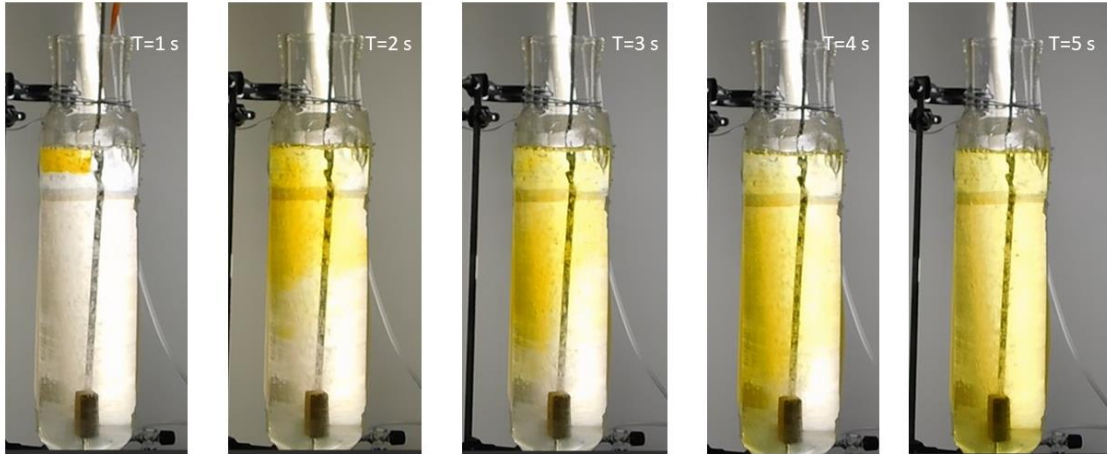


Figura 7. Tiempo de mezclado en difusor rectangular, flujo mínimo.

En la figura 7 se puede observar que el tiempo terminal de mezclado a una velocidad de 2 L/min fue de 5 s.

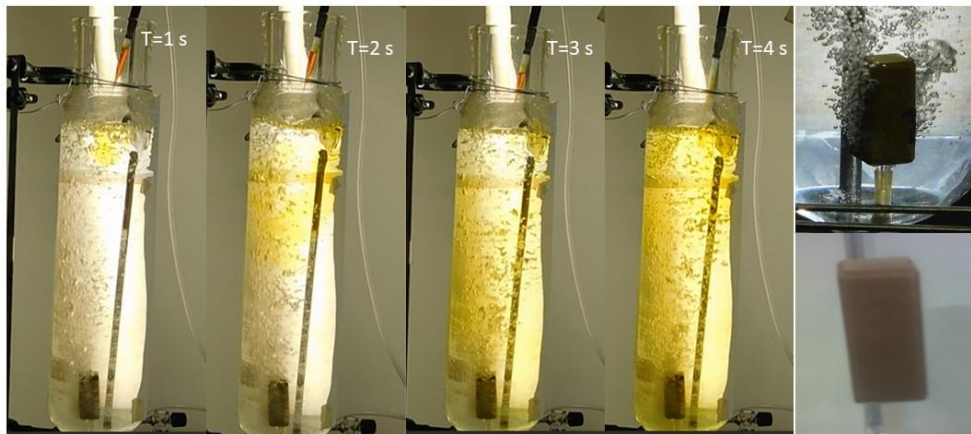
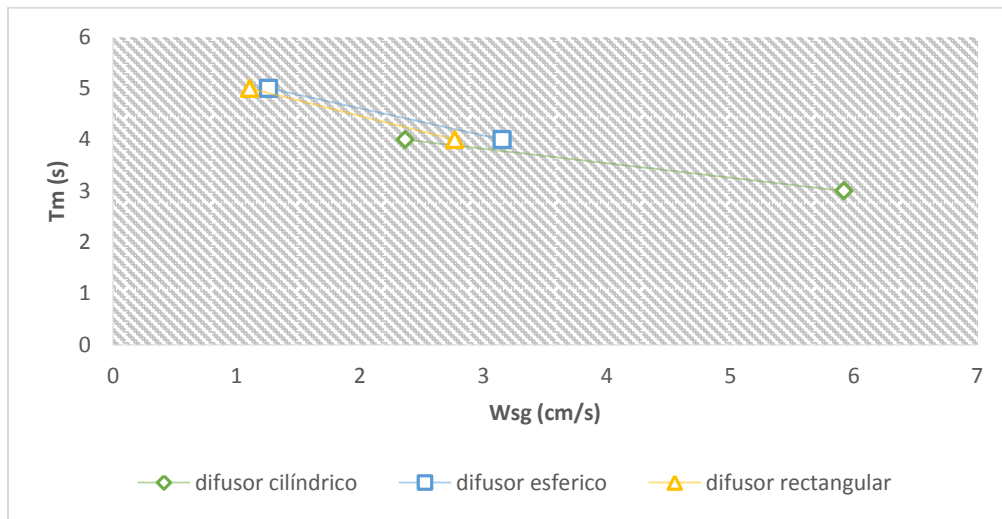


Figura 8. Tiempo de mezclado en difusor rectangular, flujo máximo.

En la figura 8 se puede observar que el tiempo terminal de mezclado a una velocidad de 5 L/min fue de 4 s.

En cada figura se puede observar la dinámica del mezclado, en la cual el fluido asciende por el centro y desciende por las paredes de la columna; el tiempo de mezclado para las dos velocidades no presento diferencias, esto posiblemente

debido a las limitaciones de nuestro equipo para poder determinar valores más precisos y cortos de tiempo.



Gráfica 1. Tiempo de mezclado en función de Wsg.

Como puede observarse en la gráfica 1 a mayor Wsg, menor es el tiempo de mezclado. También puede decirse que el mejor difusor para el tiempo de mezclado es el cilíndrico ya que lo hace en menor tiempo que los otros difusores.

## 8.2. Tamaño de burbuja

El tamaño de burbuja presento resultados midiendo el diámetro de 15 burbujas, esto se realizó con los dos flujos de aire.

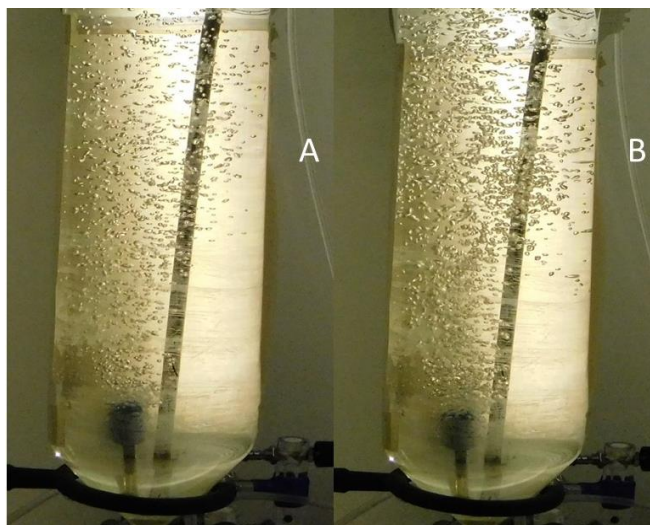


Figura 9. Tamaños de burbujas en difusor cilíndrico flujo mínimo (A), flujo máximo (B).

En la figura 9(A) se puede observar el diámetro de la burbuja con un valor de 0.193 cm, en función de la velocidad superficial del gas ( $W_{sg}$ ) con un valor de 2.3683 cm/s. En la figura 9(B) se puede observar el diámetro de la burbuja con un valor de 0.266 cm, en función de la velocidad superficial del gas ( $W_{sg}$ ) con un valor de 5.9209 cm/s. En este caso se utilizó un difusor de poro fino con un área de 14.0743 cm<sup>2</sup>.

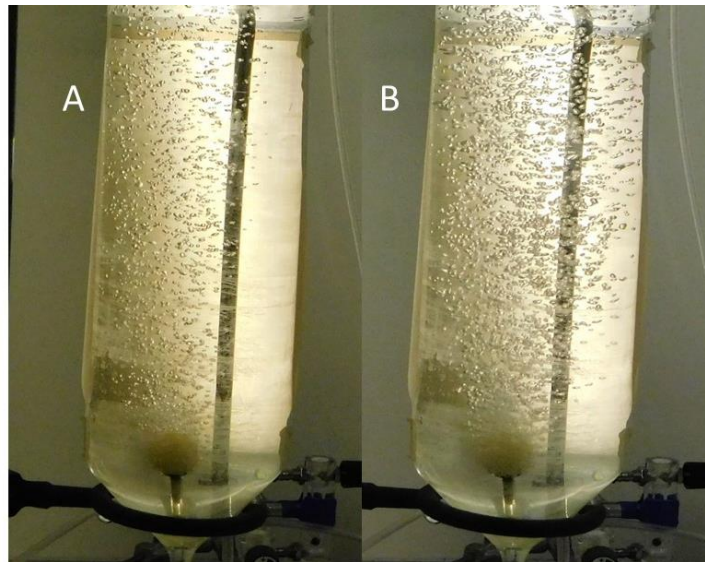


Figura 10. Tamaños de burbujas en difusor esférico flujo mínimo (A), flujo máximo (B).

En la figura 10(A) se puede observar el diámetro de la burbuja con un valor de 0.14 cm, en función de la velocidad superficial del gas ( $W_{sg}$ ) con un valor de 1.2616 cm/s. En la figura 10(B) se puede observar el diámetro de la burbuja con un valor de 0.213 cm, en función de la velocidad superficial del gas ( $W_{sg}$ ) con un valor de 3.1540 cm/s. En este caso se utilizó un difusor de poro fino con un área de 26.4207 cm<sup>2</sup>.

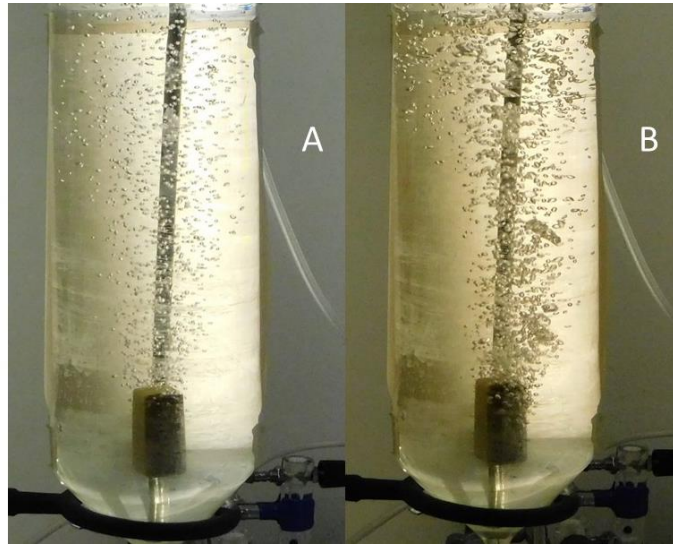
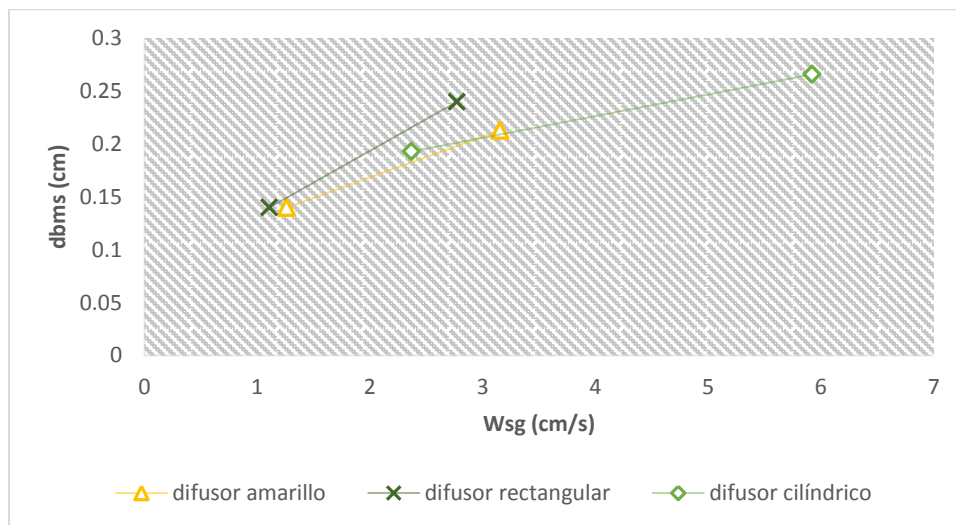


Figura 11. Tamaños de burbujas en difusor rectangular flujo mínimo (A), flujo máximo (B).

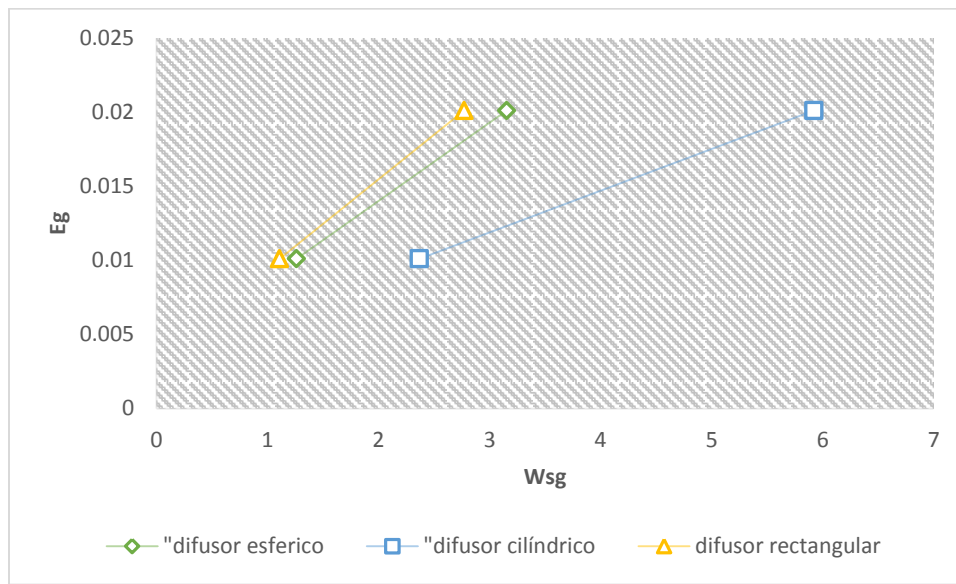
En la figura 11(A) se puede observar el diámetro de la burbuja con un valor de 0.14 cm, en función de la velocidad superficial del gas ( $W_{sg}$ ) con un valor de 1.1081 cm/s. En la figura 11(B) se puede observar el diámetro de la burbuja con un valor de 0.24 cm, en función de la velocidad superficial del gas ( $W_{sg}$ ) con un valor de 2.7703 cm/s. En este caso se utilizó un difusor de poro fino con un área de 30.08 cm<sup>2</sup>.



Grafica 2. Diámetro de la burbuja en función de  $W_{sg}$ .

En la gráfica 2 se puede observar que los diámetros de la burbuja promedio aumentan a medida que la velocidad incrementa esto podría deberse a la coalescencia. En el difusor cilíndrico obtuvimos un mayor diámetro de burbuja ya que su ( $W_{sg}$ ) era mayor a los otros difusores, esto también se debe a que él difusor tenía menor área por lo tanto tenía mayor velocidad.

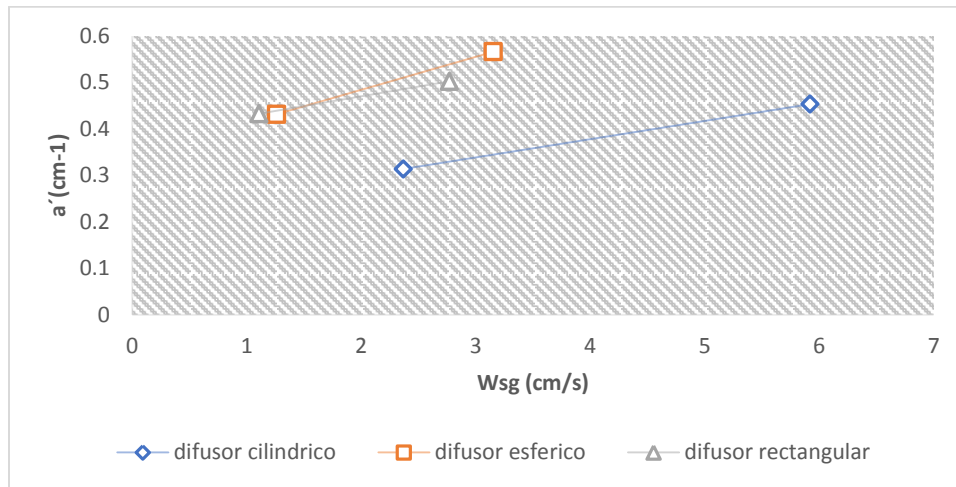
### 8.3 Coeficiente de retención de gas ( $E_g$ )



Grafica 3. Coeficiente de retención de gas ( $E_g$ ) en función de  $W_{sg}$ .

En la gráfica 3 se observa que el Coeficiente de retención de gas ( $E_g$ ) aumentó con el incremento de la  $W_{sg}$ ; los valores se encontraron en 0.0101 para el flujo mínimo y 0.0201 para el flujo máximo.

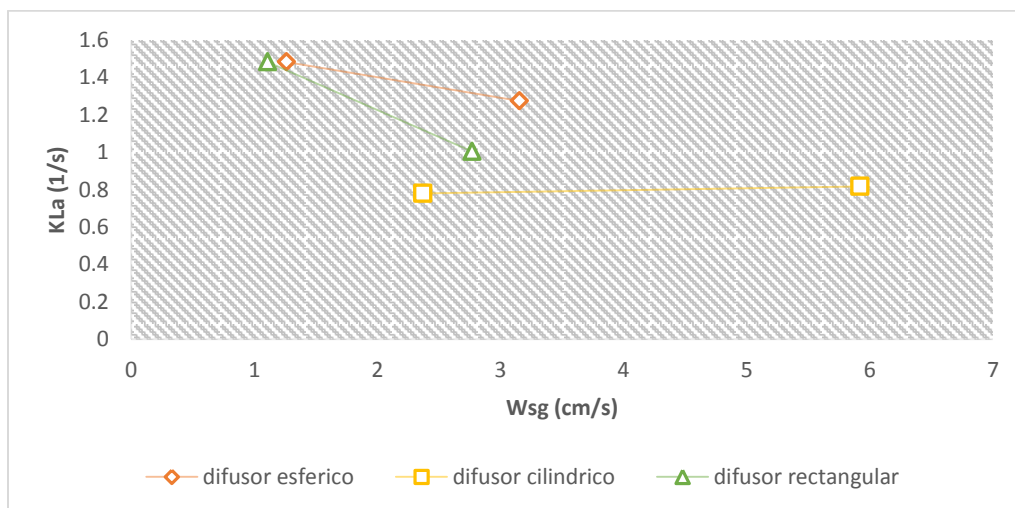
## 8.4 Área interfacial de contacto gas-liquido ( $a'$ )



Gráfica 4. Área interfacial de contacto gas-liquido ( $a'$ ) en función de  $W_{sg}$ .

En la gráfica 4 se observan los valores de ( $a'$ ) con respecto a  $W_{sg}$ ; encontrando que para el difusor cilíndrico el flujo mínimo es de  $0.3139 \text{ cm}^{-1}$  y el flujo máximo de  $0.4528 \text{ cm}^{-1}$ ;  $0.4328 \text{ cm}^{-1}$  y  $0.5661 \text{ cm}^{-1}$  en el difusor esférico,  $0.4328 \text{ cm}^{-1}$  y  $0.5025 \text{ cm}^{-1}$  en el difusor rectangular. De igual forma se observa que ( $a'$ ) aumenta con el incremento de la  $W_{sg}$ , y que el difusor esférico es el que tiene mayor área interfacial con respecto a los otros difusores.

## 8.5 Coeficiente teórico de transferencia de oxígeno (KLa)



Gráfica 5. Coeficiente teórico de transferencia de oxígeno (KLa) en función de  $W_{sg}$ .



En la gráfica 5 se observan los valores de (KLa) que se encontraba en  $0.7802 \text{ s}^{-1}$  y  $0.8175 \text{ s}^{-1}$  en el difusor cilíndrico,  $1.4831 \text{ s}^{-1}$  y  $1.2750 \text{ s}^{-1}$  en el difusor esférico,  $1.4831 \text{ s}^{-1}$  y  $1.0044 \text{ s}^{-1}$  en el difusor rectangular.

## 8.6 Cálculo de biomasa microalgal

### 8.6.1. *Limnothrix planctónica*

La tasa de crecimiento fue de  $8.22 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , y el tiempo de duplicación fue de 84.30 h, esto se vio reflejado a partir del día 3 (figura 12).



Figura 12. Cinética de *Limnothrix planctónica*

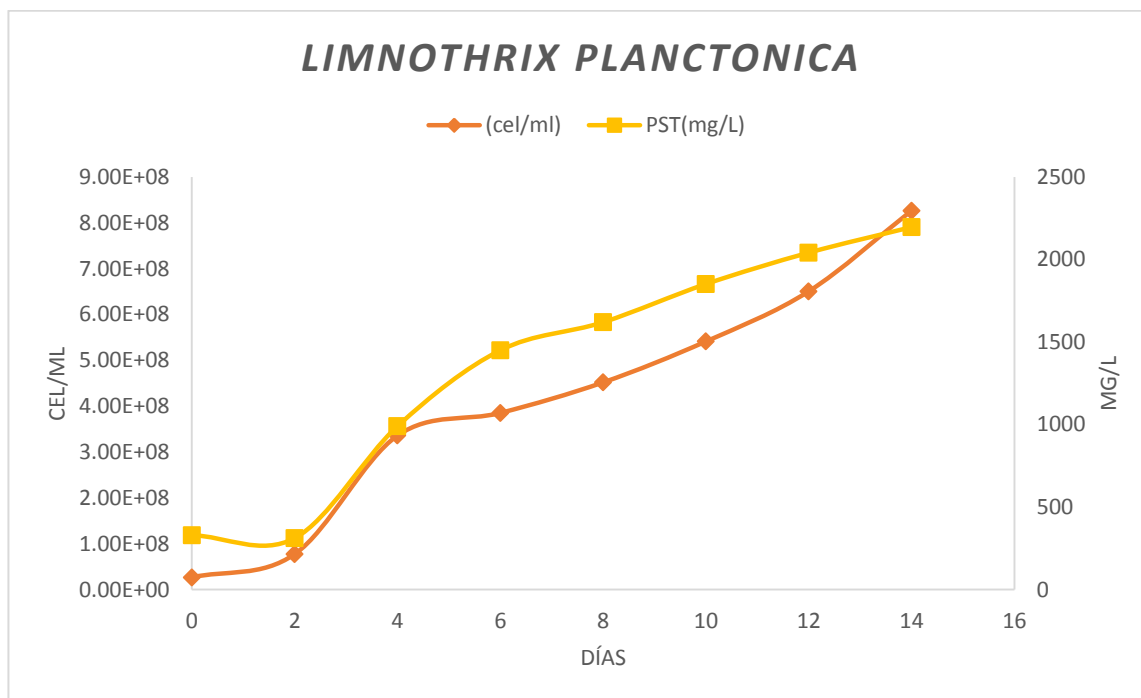
### 8.6.1.2 *Pectinodesmus pectinatus*

La tasa de crecimiento fue de  $8.82 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , y el tiempo de duplicación fue de 78.57 h, esto se vio reflejado a partir del día 3 (figura 13).



Figura 13. Cinética de *Pectinodesmus pectinatus*

### 8.6.2. Cámara de Neubauer y peso seco



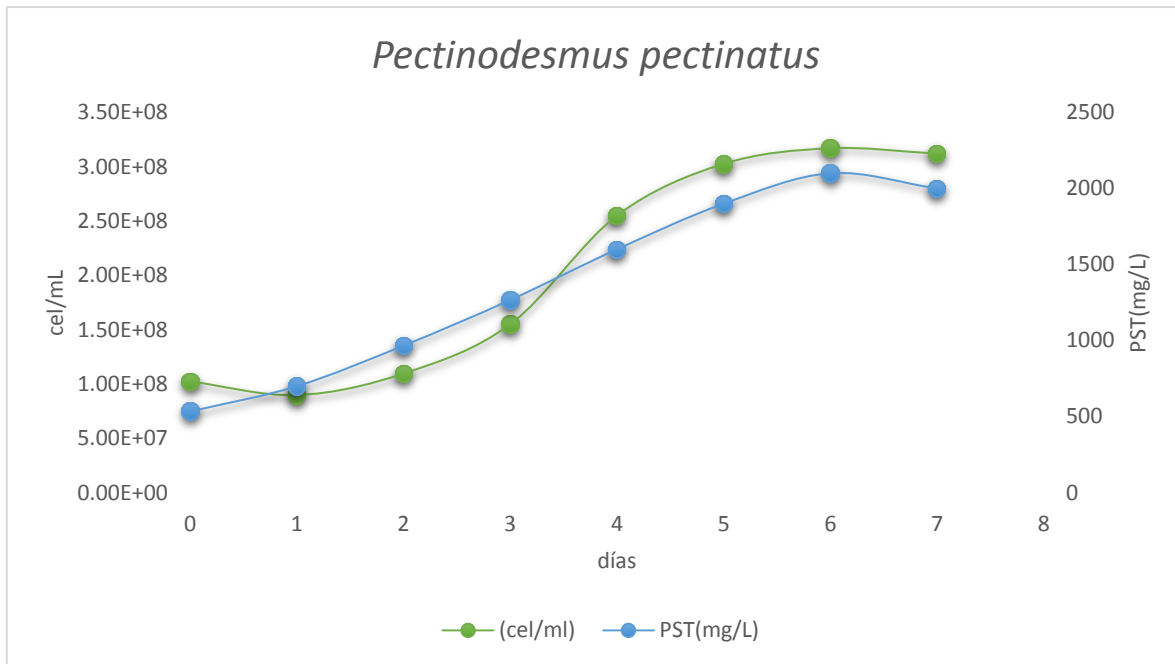
Grafica 6. Cinética y peso seco de *Limnothrix planctónica*.

En la gráfica 6 se presenta el crecimiento de la biomasa de la cepa *Limnothrix planctónica*, en la cual se puede observar una fase de adaptación o lag en los primeros dos días; también se observa una fase exponencial a partir del día dos. La concentración máxima se alcanza en el día 14 con un valor de  $8.27 \times 10^8$  cel/ml.

En esta misma gráfica se observan los valores del peso seco de *Limnothrix planctónica*. La mayor concentración de biomasa se alcanzó el día 14, con un valor de 2.1966 mg mL<sup>-1</sup>. Analizando la composición del medio F/2, se observa que la concentración de la fuente de nitrógeno, (NaNO<sub>3</sub>) fue de 75 g/L, y al ser *Limnothrix planctónica* una cianobacteria, tiene mejor fijación con el N (Debowska & Jozefowioz, 2015).

Lemus et al. (2013) reportan una concentración de peso seco de 6.3 mg mL<sup>-1</sup>, cultivada durante 20 días a 25°C, y fotoperiodo 12:12, demostrando que la salinidad y la concentración de nitrato modulan el crecimiento y la composición bioquímica de *Limnothrix sp.* Estudios realizados por Economou et al. (2015)

reportan un crecimiento de biomasa de 141 mg/L a los siete días de cultivo; siendo menor por lo reportado por Chen et al. (1996) para *Spirulina platensis* con 266 mg/L de biomasa a una velocidad específica de crecimiento de 0.62 d<sup>-1</sup> a 30°C.



Grafica 7. Cinética y peso seco de *Pectinodesmus pectinatus*

En la gráfica 7 se presenta el crecimiento de la biomasa de la cepa *Pectinodesmus pectinatus*, en la cual se puede observar una fase de adaptación o lag en los primeros dos días; se observa que la fase exponencial comienza a partir del día 2. La concentración máxima se alcanza en el día 7 con un valor de  $3.17 \times 10^8$  cel/mL. En esta gráfica también se observan los valores del peso seco de *Pectinodesmus pectinatus*. La mayor concentración de biomasa se alcanzó el día 7, con un valor de 2100 mg/L.

Para esta cepa aún no hay reportes con la cual se pueda referir resultados similares. (Hernández, E, et al. 2009) reportan una fase logarítmica a partir del día cuatro con las cepas *Scenedesmus incrassatulus* y *Scenedesmus* sp., las cinéticas se llevaron a cabo por 14 días con un fotoperiodo de 12:12, y obtuvieron valores de 0.41 g/L para *Scenedesmus incrassatulus* y 0.25 g/L para

*Scenedesmus* sp, demostrando que los valores de *Scenedesmus incrassatulus* tienen mayor potencial para la obtención de biodiesel.

(González y Terán, 2013) reportaron una fase de crecimiento a partir del día cinco con 3 concentraciones diferentes de Nitrofoska Verde utilizando la cepa *Scenedesmus spp*, las cinéticas se llevaron por 30 días con un fotoperiodo 12:12 a 20°C, con agitación constante y aireación de 300 mL/min de aire estéril, y obtuvieron un valor promedio de 0.165 g/L demostrando que se puede obtener biodiesel a partir de *Scenedesmus spp*.

### 8.6.3. Resiembra

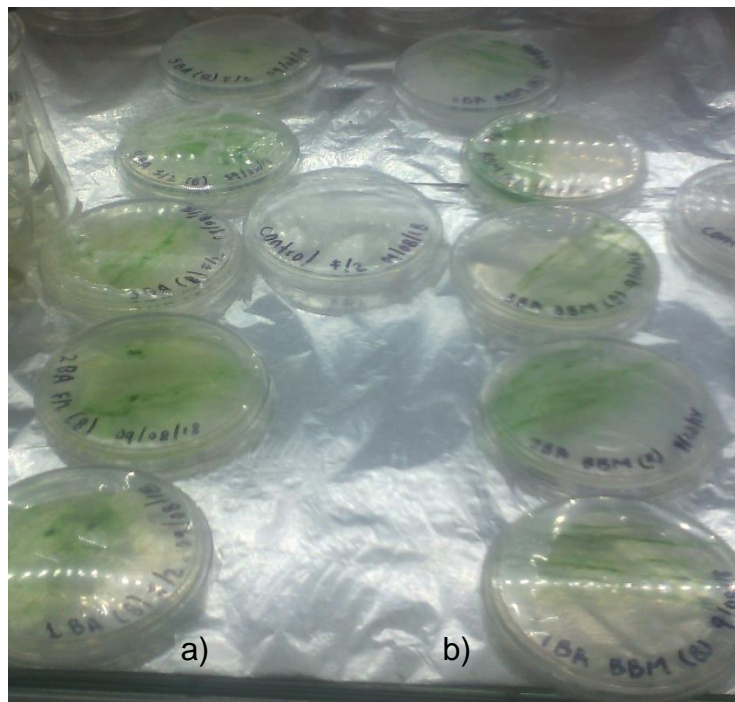


Figura 14. Resiembra de a) *Limnothrix planctónica* y b) *Pectinodesmus pectinatus*

## **IX. CONCLUSIÓN**

Se concluye que el difusor cilíndrico fue el mejor en tiempo de mezclado, tamaño de burbuja, coeficiente de retención de gas ( $E_g$ ) y Coeficiente teórico de transferencia de oxígeno ( $KLa$ ), ya que tuvo los mejores resultados a comparación de los otros difusores.

Con respecto a las cinéticas, se notó un crecimiento óptimo a partir del día 3 en las dos cepas, los valores de crecimiento demuestran su potencial para extraer metabolitos a futuro.

## **10. RECOMENDACIONES**

Se recomienda hacer la caracterización hidrodinámica con otros tipos de difusores, para obtener mejores resultados.

Se debería probar las cinéticas con diferentes medios de cultivo y diferentes combinaciones de variables, pensando a futuro en un escalamiento, optimizando la producción de metabolitos.

Se recomienda que estén todos los materiales y equipos necesarios para realizar una cinética en el laboratorio.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrian, J. S. (2014). *Estudio de la biodiversidad fitoplanctónica del Canal Japón, Xochimilco. Tesis para de licenciatura en Biología.; Facultad de Ciencias, UNAM.* México.

Arnaíz, C., Isac, L., y Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnología del agua. Vol. 205, 45-52.*

Bailey, J., Ollis, D. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals.* Segunda edición. McGraw Hill.

Brennan, L., y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 557-577.*

Cabrera, M., & Pulla, M. (2014). *Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual.* Tesis de pregrado. Universidad de Cuenca, Ecuador.

Calderbank, P. H. (1958). Physical rate processes in industrial fermentation. Part 1. The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Transactions of IChemE 36, 443-463.*

Cfr. Educar Chile, “Flora y Fauna Marina”, 2005, <http://www.educarchile.cl/>

Cfr. Gonzales, B., (2009) “Centro de investigación experimental para desarrollar biocombustibles de microalgas”, Memoria de título, Prof. Guía Leopoldo Prat, Facultad de Arquitectura y Urbanismo, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Chen F., Zhang Y. & Siyuan G. (1996). GROWTH AND PHYCOCYANIN FORMATION OF SPZRULINA PLATENSZS IN PHOTOHETEROTROPHIC CULTURE. *BIOTECHNOLOGY LETTERS.* Pp.18: 603-608

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25(3): 294-306.

Chisti, M.Y., Halard, B., & Moo-Young, M. (1987). Liquid circulation in airlift bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 43, 451-457.

Chisti, M.Y. (1989). Airlift bioreactors: Current Technology. In Airlift bioreactors. New york: *Elsevier Applied science*.

Debowska E.A., Jozefowioz S., (2015). Seasonal changes in phytoplankton and bioindices in the southern part of lake Jeziorak. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 48:2-9.

Determinación de tiempo de mezclado en biorreactores. <http://bioprocesos.unq.edu.ar/Biopro%20II/TP%20Mezclado%20Bioprocesos%20II.pdf>. (S.f) (n/a).

Economu C. N., Marinakis N., Moustaka-Gouni M., Kehayias G., Aggelis G., Vayenas D.V. (2015). Lipid production by the filamentous cyanobacterium *Limnothrix* sp. growing in synthetic wastewater in suspended- and attached-growth photobioreactor systems. *Ann Microbiol*.

Félix, M., & Lora, M. (2017). Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas. Centro de investigaciones Biológicas del noroeste, s.c. La paz, Baja California Sur, México. *Cap. 4, 33-43 pp.*

Fernández S., J. M. (2014). Cultivo de microalgas. En *Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas* (pags. 1-2). Sevilla: Universidad de Almería.

Flotats, X., Foged, HL., Blasi, AB., Palatsi, J., Magri, A., & Schelde, KM. (2011). Manure Processing Activities in Europe Project reference: ENV.B.1/ETU/2010/0007 Manure Processing Technologies. Technical Report 2, European Commission, Directorate-General Environment, 184 pp. <[http://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates/pdf/manure\\_processing.zip](http://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates/pdf/manure_processing.zip)>

González, J., Terán, A. (2013). producción de biodiesel a partir de microalgas *scenedesmus spp.* en fotobiorreactor tanque agitado. *Revista pueblo continente*. Vol 24, (2): 379-391.

Gómez, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química* 19(2): 3-20.

Guzmán, D., Segura, M. (2003). *Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo.* (tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, Colombia.

Hernández, E., Martínez, A., Cañizares, R. (junio 2009). (Contenido de lípidos de dos especies diferentes del género *Scenedesmus* para la eventual producción de bioenergéticos). En M. Villareal (presidencia), VII simposio internacional de producción de alcoholes y levaduras. Congreso llevado a cabo en Acapulco, Guerrero, México.

Hernández Pérez, A. y Labbe J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. Vol. 49, No. 2: 157-173.

Herrera, A. (1985) *Manual de medios de cultivo*. Editorial Científico-Técnica. Ministerio de Cultura. C. Habana.

Humphrey, G. F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light-dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 40: 63-70.

Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S. y Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Review. Sust. Energ.* 13 (9): 2361–2372.

Komárek, J., & Fott, B. (1983). *Das Phytoplankton des Süßwassers: Chlorophyceae*. Zürich, Alemania: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.

Lemus, N., Guevara, M., Lodeiros, C., Vasquez, A., Freites, L., Licet, B. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Limnothrix sp.* A diferentes salinidades y concentraciones de nitrato. *Revista Colombiana Biotecnología*. Vol XV. (159-164).



López, O., Morales, J., Ventura, C., Miceli, F., Castañón, J. (2007). Caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional. *Que hacer científico.*, 4, 19-28.

Molina, E., F. Acién, F. García, Y. Chisti. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.* 70: 231-247.

Moya, J. (2011). Centro de investigación y desarrollo tecnológico en algas. Tesis de pregrado. Universidad de Chile, Santiago de Chile.

Nápoles, M. C., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G., Somers, E. (2006). Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Revista cultivos tropicales.* Vol. 27: 35-38.

Noverón, G. (2009). *Diseño de un fotobiorreactor para microalgas.* (Tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional, D.F, México.

Park, J.B.K., Craggs, R.J. and Shilton, A.N. (2010) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* (102), 35-42

Pérez, S., Pérez, J., Rodríguez, A, Sandoval, C. (marzo 2014). Diseño y caracterización hidrodinámica teórica y práctica de una columna de burbujeo simple a nivel laboratorio. *Átomo biotecnología.*, 22, 1-5.

Richmond, A. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd.

Romo Piñera, A.K. (2002) *Manual para el cultivo de microalgas*, Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Rubio, D., Sierra. J., Ruiz, S., Sandoval, J. (2014). Diseño de un fotobiorreactor Airlif a escala banco. *Revista elementos.* Vol. 4: 123-143.

Ruiz Martínez, A. (2011) *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.* Master, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.

Scragg, A. (1996). *Biología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos.* Limusa-Noriega Editores, México, DF.

Todar, K. Nutrition and growth of bacteria. [Consultado 82002]. Disponible en: <<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth>>.

Villa, A., D. Herazo y A. C. Torregroza. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (Clon C-Cal) en cultivos estáticos. *Revista Intropica 9*: 111 - 117

Vital, V. (2006). *Medición del diámetro de burbujas en un biorreactor de columna de burbujas*. (Tesis de pregrado). Instituto politécnico nacional, D.F, México.

## 12. ANEXOS

### F/2 Medium

Stocks	por litro	Medium	por litro
<b>(1) NaNO<sub>3</sub></b>	75g	NaNO <sub>3</sub>	1.0 ml
<b>(2) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	5.65g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 ml
<b>(3) Trace elements (chelated)</b>		Trace elements stock solution	1.0 ml
NA <sub>2</sub> EDTA	4.16 g	Vitamin mix stock solution	1.0 ml
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15 g		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01 g		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.022 g		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01 g		

MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.18 g		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.006 g		
<b>(4) Vitamin mix</b>			
Cyanocobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )	0.0005 g		
Thiamine HCl (Vitamin B <sub>1</sub> )	0.1 g		
Biotin	0.0005 g		

#### BBM

Stock Solution (SL)	Volume (mL)	Component	Concentration in SL	Conc. in final Medium
1	10	NaNO <sub>3</sub>	2.50 g. 100 mL <sup>-1</sup>	2.94 x10 <sup>-3</sup> M
2	10	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.75 g. 100 mL <sup>-1</sup>	3.04 x10 <sup>-4</sup> M
3	10	NaCl	0.25 g. 100 mL <sup>-1</sup>	4.28 x10 <sup>-4</sup> M
4	10	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75 g. 100 mL <sup>-1</sup>	4.31 x10 <sup>-4</sup> M
5	10	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.75 g. 100 mL <sup>-1</sup>	1.29 x10 <sup>-3</sup> M
6	10	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25 g. 100 mL <sup>-1</sup>	1.70 x10 <sup>-4</sup> M

<b>7 trace elements solutions</b>	1	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82 g. L <sup>-1</sup>	3.07x10 <sup>-5</sup> M
	1	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1.44 g. L <sup>-1</sup>	7.28 x10 <sup>-6</sup> M
	1	MoO <sub>3</sub>	0.71 g. L <sup>-1</sup>	4.93 x10 <sup>-6</sup> M
	1	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	1.57 g. L <sup>-1</sup>	6.29 x10 <sup>-6</sup> M
	1	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.49 g. L <sup>-1</sup>	1.68 x10 <sup>-6</sup> M
<b>8</b>	1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.14 g. 100 mL <sup>-1</sup>	1.85 x10 <sup>-4</sup> M
<b>9 EDTA-KOH solution</b>	1	EDTA. Na <sub>2</sub>	5.0 g. 100 mL <sup>-1</sup>	1.71 x10 <sup>-4</sup> M
	1	KOH	3.1 g. 100 mL <sup>-1</sup>	5.53 x10 <sup>-4</sup> M
<b>10 Ferric solution</b>	1	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.98 g. 1 L <sup>-1</sup>	1.79 x10 <sup>-5</sup> M
	1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	1 mL (to acidify)	
<b>11</b>	50	Soil extract		
<b>12 vitamin mix</b>	1	Vit. B <sub>1</sub> (Thiamine HCl)	0.1 g. 100 mL <sup>-1</sup>	2,97 x10 <sup>-6</sup> M
	1	Vit. H (Biotin)	0.025 mg. 100 mL <sup>-1</sup>	1,02 x10 <sup>-9</sup> M
	1	Vit. B12 (Cyanocobalamin)	0.015 mg. 100 mL <sup>-1</sup>	1,11x10 <sup>-10</sup> M

## INDICE DE IMAGENES Y GRÁFICAS

Figura 1. Filamento visto con objetivo de 100X _____	14
Figura 2. <i>Pectinodesmus pectinatus</i> con objetivo 100X. _____	15
Figura 3. Tiempo de mezclado en difusor cilíndrico, flujo mínimo. _____	25
Figura 4. Tiempo de mezclado en difusor cilíndrico, flujo máximo. _____	25
Figura 5. Tiempo de mezclado en difusor esférico, flujo mínimo. _____	26
Figura 6. Tiempo de mezclado en difusor esférico, flujo máximo. _____	26
Figura 7. Tiempo de mezclado en difusor rectangular, flujo mínimo. _____	27
Figura 8. Tiempo de mezclado en difusor rectangular, flujo máximo. _____	27
Grafica 1. Tiempo de mezclado en función de $W_{sg}$ . _____	28
Figura 9. Tamaños de burbujas en difusor cilíndrico flujo mínimo (A), flujo máximo (B). _____	28
Figura 10. Tamaños de burbujas en difusor esférico flujo mínimo (A), flujo máximo (B). _____	29
Figura 11. Tamaños de burbujas en difusor rectangular flujo mínimo (A), flujo máximo (B). _____	30
Grafica 2. Diámetro de la burbuja en función de $W_{sg}$ . _____	30
Grafica 3. Coeficiente de retención de gas ( $E_g$ ) en función de $W_{sg}$ . _____	31
Grafica 4. Área interfacial de contacto gas-liquido ( $a'$ ) en función de $W_{sg}$ . _____	32
Grafica 5. Coeficiente teórico de transferencia de oxígeno ( $KLa$ ) en función de $W_{sg}$ . _____	32
Figura 12. Cinética de <i>Limnothrix planctónica</i> _____	33
Figura 13. Cinética de <i>Pectinodesmus pectinatus</i> _____	33
Grafica 6. Cinética y peso seco de <i>Limnothrix planctónica</i> . _____	34
Grafica 7. Cinética y peso seco de <i>Pectinodesmus pectinatus</i> _____	35
Figura 14. Resiembra de a) <i>Limnothrix planctónica</i> y b) <i>Pectinodesmus pectinatus</i> _____	36