

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar “air-lift”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**I.B.I. LEON SANCHEZ GARCIA**

**DIRECTORA:**

**DRA. MARCIA GUADALUPE MORALES IBARRIA**

**ASESORES:**

**DR. SERGIO REVAH MOISEEV**

**DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES**

**NOVIEMBRE, 2013**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar "air-lift"**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**I.B.I. LEON SANCHEZ GARCIA**

**DIRECTORA:**

**DRA. MARCIA GUADALUPEMORALES IBARRIA**

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name of the director, Marcia Guadalupemoraes Ibarria.

**ASESORES:**

**DR. SERGIO REVAH MOISEEV**

**DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES**

**NOVIEMBRE, 2013**

**“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma  
Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de  
Posgrados de Calidad del CONACyT”**

México D.F. a 29 de Noviembre del 2013

EL jurado designado por la  
Division de Ciancias Biologicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa  
aprobó la tesis.

Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor  
solar “air-lift”  
que presentó

I.B.I. LEÓN SÁNCHEZ GARCÍA

Comité tutorial:

Directora: Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Asesor: Sergio Revah Moiseev

Asesor: Luis Carlos Fernandez Linares

Presidente: Dr. Juan Gabriel Vigueras Ramirez

Secretario: M. en B. Monica Cristina Rodriguez palacios

Vocal: Dr. Luis Carlos Fernandez Linares

Vocal: Dr. Raul Muñoz Torre

**Quisiera agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)  
por la beca de estudios otorgada para la realización de esta tesis y a la  
Universidad Autónoma Metropolitana.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi padre por haberme apoyado e impulsado a seguir siempre adelante, porque nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo.

A Nayely, no hay hechos ni palabras para decirte cuanto te amo.

A mi familia: mis hermanos, mis tios y mis primos, por su apoyo incondicional y motivación.

A la Dra. Marcia, por haberme dado la oportunidad y confianza. Por que cada una de sus observaciones me ayudo a ser mejor.

A los miembros del jurado por su revision y enriquecimiento de esta tesis con sus valiosos comentarios.

En especial a Juan Cabello y Alma Toledo por todas sus enseñanzas y el apoyo incondicional. Por sus criticas constrictivas y en especial por su amistad.

A mis amigos Nohemi, Nestor, Erick, Marcos, Tania y todos los que me han acompañado en este camino por su apoyo.

A los amigos de laboratorio W-107 PP-U4, Sergio Hernandez, Luis Arellano y Cristal Zuñiga por la convivencia y buenas recomendaciones.

Muhas gracias por todo.

## RESUMEN

En la actualidad existe gran interés por las microalgas debido al gran potencial que han mostrado para la generación de compuestos tales como carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos, que pueden ser utilizados como combustibles, alimentos, en la industria farmacéutica y cosmética, entre otros. La generación de estos productos a gran escala se hace operando los sistemas de cultivo a la intemperie, donde las variables físicas como la energía solar disponible y la temperatura ambiental usualmente no se controlan. En este trabajo se estudió a la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* por su potencial para la producción de biodiesel ya que acumula aceites. En específico se evaluó la influencia de dos factores relevantes que afectan la productividad de la biomasa en fotobiorreactores: 1) Intensidad luminosa y 2) la temperatura. Estos aspectos son críticos especialmente en sistemas operados a la intemperie donde el fotobiorreactor se expone a ciclos naturales de luz-oscuridad y variaciones de temperatura.

Para ello se realizó un estudio sobre la actividad fotosintética en condiciones controladas a través de mediciones de oxígeno producido variando la intensidad luminosa y temperatura en los rangos representativos de la operación a la intemperie. De estos experimentos se observó que la máxima actividad fotosintética se obtuvo a 35°C y 300-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Con estos experimentos se determinaron los parámetros  $K_s=75.7\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $K_i=4971 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $E_a=17.35 \text{ Kcal mol}^{-1}$  y  $K_A= 4.36 \times 10^{14} \text{ g}_{\text{O}_2} \text{ Kg}_{\text{bio}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Sin embargo, también se determinó que existe actividad fotosintética a temperaturas extremas.

En experimentos realizados en un reactor "air lift" de lazo extendido operado a la intemperie durante las cuatro estaciones del año se observó que en primavera se presenta la mayor concentración de biomasa siendo ésta de 5.2 g L<sup>-1</sup>. En esta época se presentó inhibición seguida por la adaptación de la cepa a las condiciones climáticas de alta intensidad luminosa (hasta 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y altas temperaturas (hasta 47°C). Durante la operación a lo largo del año se registraron temperaturas que fueron desde los 0°C registradas durante la época invierno hasta los 47°C en primavera, y la microalga soportó tales condiciones.

Por otro lado, se realizaron experimentos en condiciones de limitación de nitrógeno y *S. obtusiusculus* fue capaz de acumular hasta un 30 % de lípidos con un perfil de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el rango de C16 a C18.

Con lo anterior se comprobó que es posible cultivar a *S. obtusiusculus* para su uso en la generación de biomasa microalgal en condiciones a la intemperie y como una alternativa para la generación de lípidos para la producción de biodiesel.

## ABSTRACT

Nowadays, the microalgae have shown an enormous potential and interest for the generation of compounds such as proteins carbohydrates, lipids and pigments, which can be used as fuel, food, cosmetic and pharmaceuticals, among others. However, the production of these materials at large scale is made in cultivation systems at outdoors, where the physical variables such as the solar energy and the temperature are usually not controlled. In this work, the microalga *Scenedesmus obtusiuculus* was studied for its potential as an oleaginous strain. Specifically, the influence of two important factors such as: 1) Light intensity and 2) temperature that affect the productivity of biomass in photobioreactors was evaluated. These issues are especially critical in systems operated at outdoors, because they are exposed to natural light-dark cycles and temperature variations.

In order to achieve this, the photosynthetic activity was determined under controlled conditions through oxygen measurements produced at different light intensities and temperatures. From these experiments, it was observed that the highest photosynthetic activity was obtained at 35 °C and 300-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . But it was also found that photosynthetic activity remains even at extreme temperatures. The obtained kinetic parameters were  $K_s = 75.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $K_i = 4971 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $E_a = 17.35 \text{ kcal mol}^{-1}$  and  $K_A = 4.36 \times 10^{14} \text{ g}_{\text{O}_2} \text{ Kg}_{\text{bio}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

A reactor extended loop "air lift" was operated at outdoors during the four seasons of the year, the highest biomass concentration was 5.2  $\text{g L}^{-1}$  during spring season after overcome the inhibition phenomenon caused by the high light intensity (up to 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and temperatures (up to 47 °C). Although the seasonal variability, the microalgae grew well.

Moreover experiments under nitrogen limiting conditions were performed in spring and *S. obtusiuculus* was able to accumulate up to 30% of lipids with a profile of saturated and monounsaturated fatty acids in the range C16 to C18.

It would be possible to grow to *S. obtusiuculus* for use microalgal biomass and lipid generation in outdoor conditions for further biodiesel production.

## Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Naturaleza de la luz solar</i>	2
2.2 <i>Fotosíntesis</i>	4
2.3 <i>Microalgas</i>	8
2.4 <i>Metabolismo</i>	10
2.5 <i>Productos de interés</i>	13
2.6 <i>Sistemas de cultivo</i>	16
2.6.1 <i>Sistemas abiertos</i>	16
2.6.2 <i>Sistemas cerrados o fotobiorreactores</i>	17
2.7 <i>Comparación entre los sistemas de cultivo</i>	20
2.8 <i>Factores críticos para los sistemas de cultivo expuestos a la intemperie</i>	23
2.8.1 <i>Intensidad luminosa</i>	24
2.8.2 <i>Temperatura</i>	26
2.8.3 <i>Otros aspectos climáticos</i>	30
2.9 <i>Productividad</i>	30
2.10 <i>Eficiencia fotosintética</i>	34
2.11 <i>Lípidos para la producción de biodiesel</i>	36
2.12 <i>Antecedentes directos</i>	39
<b>3. JUSTIFICACION</b>	<b>40</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>5. HIPOTESIS</b>	<b>42</b>
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>43</b>
6.1 <i>Microorganismo</i>	43
6.2 <i>Propagación y medio de cultivo</i>	43
6.3 <i>Determinación de la actividad fotosintética</i>	44
6.4 <i>Sistema de cultivo a la intemperie</i>	46
6.4.1 <i>Monitoreo del pH</i>	47
6.4.2 <i>Monitoreo de humedad relativa, temperatura en el ambiente y temperatura en el medio</i>	48
6.4.3 <i>Monitoreo de la irradiación solar</i>	48
6.5 <i>Métodos analíticos</i>	50
6.5.1 <i>Determinación de biomasa por peso seco</i>	50
6.5.2 <i>Determinación de nitratos</i>	50
6.5.3 <i>Determinación del contenido de proteínas</i>	50
6.5.4 <i>Determinación del contenido de carbohidratos</i>	51
6.5.5 <i>Determinación del contenido de clorofilas</i>	51
6.5.6 <i>Cuantificación de lípidos</i>	52

6.5.7 Extracción y cuantificación de lípidos	52
6.5.8 Identificación de los ácidos grasos	52
6.6 <i>Determinación de los parámetros cinéticos de la biomasa</i>	53
6.7 <i>Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad fotosintética</i>	54
6.8 <i>Determinación de la eficiencia fotosintética</i>	55
<b>7. RESULTADOS y DISCUSION</b>	<b>56</b>
7.1 <i>Actividad fotosintética</i>	56
7.2 <i>Efecto de las diferentes estaciones del año sobre el crecimiento de la microalga</i>	63
7.2.2.3 <i>Efecto sobre la composición de clorofilas</i>	74
7.2.3 <i>Efecto en la eficiencia fotosintética</i>	75
7.3 <i>Operación en lote alimentado del FBR a la intemperie</i>	77
7.4 <i>Operación bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno</i>	80
<b>8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>89</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>91</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>106</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Producción anual y usos de microalgas	<b>14</b>
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas del cultivo en FBR y en estanques	<b>21</b>
<b>Tabla 3.</b> Parámetros del modelo de temperaturas cardinales ( $T_{min}$ , $T_{opt}$ y $T_{max}$ ). Los valores con negritas son valores los obtenidos a partir del modelo	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b> Productividad de la biomasa, contenido y la productividad de lípidos de diferentes cepas de microalgas	<b>37</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición del medio de cultivo	<b>43</b>
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de operación de FBRCB	<b>44</b>
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de operación del reactor enchaquetado para la medición de oxígeno.	<b>45</b>
<b>Tabla 8.</b> Diseño experimental para la actividad fotosintética	<b>45</b>
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de operación del fotobiorreactor airlift de lazo extendido	<b>47</b>
<b>Tabla 10.</b> Actividad fotosintética en función de la temperatura	<b>60</b>
<b>Tabla 11.</b> Temperaturas de desactivación y óptimas de crecimiento	<b>61</b>
<b>Tabla 12.</b> Resumen de la operación del FBR solar, en lotes en las cuatro estaciones del año	<b>64</b>
<b>Tabla 13.</b> Eficiencia fotosintética y productividad de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> cultivada en la intemperie	<b>75</b>
<b>Tabla 14.</b> Resumen de la operación de FBR en lote alimentado en las estaciones del año	<b>77</b>
<b>Tabla 15.</b> Resumen de la operación de FBR en continuo	<b>78</b>
<b>Tabla 16.</b> Productividad de la biomasa en sistemas de cultivo a la intemperie	<b>79</b>
<b>Tabla 17.</b> Experimentos con limitación de la fuente de N	<b>80</b>
<b>Tabla 18.</b> Perfil de ácidos grasos de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	<b>85</b>
<b>Tabla 19.</b> Contenido lipídico y productividades de diferentes microalgas bajo diferentes condiciones de cultivo	<b>87</b>

## Indice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Espectro de la radiación electromagnética y patrón espectral de la luz visible (PAR)	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Productos principales de las reacciones luminosa y oscura de la fotosíntesis	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema de los complejos principales de la membrana tilacoidal	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Curva de respuesta de la intensidad vs tasa de fotosíntesis	<b>7</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema Z del flujo del electrón de agua a NADPH <sub>2</sub>	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Pasos de la fijación fotosintética del CO <sub>2</sub> (el ciclo de Calvin Benson)	<b>12</b>
<b>Figura 7.</b> Estanque abierto tipo circuito	<b>17</b>
<b>Figura 8.</b> Arreglo de reactores con (a) bombeo y (b) mezclado neumático	<b>18</b>
<b>Figura 9.</b> Fotobiorreactor en condiciones ambiente, zona de captación de luz o lazo extendido (a) y desgasificador (b)	<b>19</b>
<b>Figura 10.</b> Zonas climáticas de la Tierra	<b>23</b>
<b>Figura 11.</b> Irradiancia global solar (Meteotest; base de datos Meteonorm)	<b>24</b>
<b>Figura 12.</b> (a) Temperatura promedio global (FAO-SDRN, 1997a) y (b) Número de meses con temperaturas superiores a 10 °C	<b>27</b>
<b>Figura 13.</b> Mapa mundial de la productividad de la biomasa de algas (ton ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> ) con una eficiencia fotosintética de 5%, considerando un contenido energético de 20 MJ kg <sup>-1</sup> de biomasa seca	<b>31</b>
<b>Figura 14.</b> Configuración del FBR operado a la intemperie	<b>49</b>
<b>Figura 15.</b> Actividad fotosintética vs intensidad luminosa en diferentes temperaturas	<b>56</b>
<b>Figura 16.</b> Influencia de la intensidad de luz y la temperatura sobre la actividad fotosintética	<b>57</b>
<b>Figura 17.</b> Concentración de biomasa en las diferentes estaciones del año. Invierno (naranja), primavera (rojo), verano (azul) y otoño (negro)	<b>63</b>
<b>Figura 18.</b> Inhibición en el cultivo de microalgas en primavera en el FBR operado en lotes y aclimatación en el cultivo de microalgas	<b>66</b>
<b>Figura 19.</b> Variables que afectan el medio de cultivo en las diferentes estaciones, intensidad de luz, temperatura en el medio de cultivo y temperatura ambiente. a) Primavera, b) Verano, c) Otoño y d) Invierno	<b>67</b>
<b>Figura 20.</b> Temperatura ambiente promedio a lo largo de los años 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013	<b>69</b>

<b>Figura 21.</b> Perfil bioquímico del cultivo a la intemperie en las diferentes estaciones a) Primavera, b) Verano, c) Otoño y d) Invierno	<b>72</b>
<b>Figura 22.</b> Inhibición en el periodo de invierno, en el reactor operado bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno	<b>80</b>
<b>Figura 23.</b> Experimentos en condiciones de limitación en otoño	<b>82</b>
<b>Figura 24.</b> Experimentos en condiciones de limitación en invierno	<b>83</b>
<b>Figura 25.</b> FBR en condiciones de limitación para la acumulación de lípidos en el periodo de otoño	<b>84</b>
<b>Figura 26.</b> FBR en condiciones de limitación para la acumulación de lípidos en el periodo de otoño	<b>86</b>

## 1. INTRODUCCION

Recientemente el cultivo de microalgas ha generado gran interés como alternativa promisorio en la producción de bioenergía, debido a que tiene un gran potencial en la generación fotosintética de biohidrógeno (Federov *et al.*, 2005), producción de metano mediante digestión anaerobia de la biomasa (Spolare *et al.*, 2006), producción de bioetanol por vía fermentativa (Chisti, 2008) de los carbohidratos, producción biodiesel derivado del aceite (Chisti, 2007) además de otros productos de alto valor agregado (Arredondo y Vázquez- Duhalt, 1991; Wijffels, 2008).

Debido a que las microalgas utilizan dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fuente de carbono para la síntesis de componentes orgánicos y a su alta velocidad de crecimiento, contribuyen a la reducción neta de las emisiones de CO<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2008), siendo éste uno de los gases causantes del efecto invernadero, cuya concentración se ha incrementado en un 70% entre los años 1970 y 2004 (Rogner *et al.*, 2007) situación que ha acentuado el cambio climático global.

Los sistemas de cultivo consisten de estanques abiertos o fotobiorreactores, en los que se busca la utilización de la luz solar, para lograr ahorro de energía. Sin embargo, la exposición a la intemperie de estos sistemas ocasiona que las microalgas estén expuestas a cambios de temperatura e intensidad luminosa que afectan la productividad de los sistemas. Asimismo, hace que las estimaciones teóricas de productividad disminuyan con respecto a los resultados obtenidos en laboratorio bajo condiciones ideales.

En este trabajo se plantea el estudio de los factores ambientales principalmente intensidad luminosa y temperatura sobre la productividad de biomasa de una microalga aislada en el laboratorio, la cual fue cultivada en un fotobiorreactor airlift tubular externo expuesto a la intemperie. Como parte del desarrollo de este trabajo se realizó un monitoreo de las condiciones ambientales. También se estudió la acumulación de lípidos bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno.

## 2. ANTECEDENTES

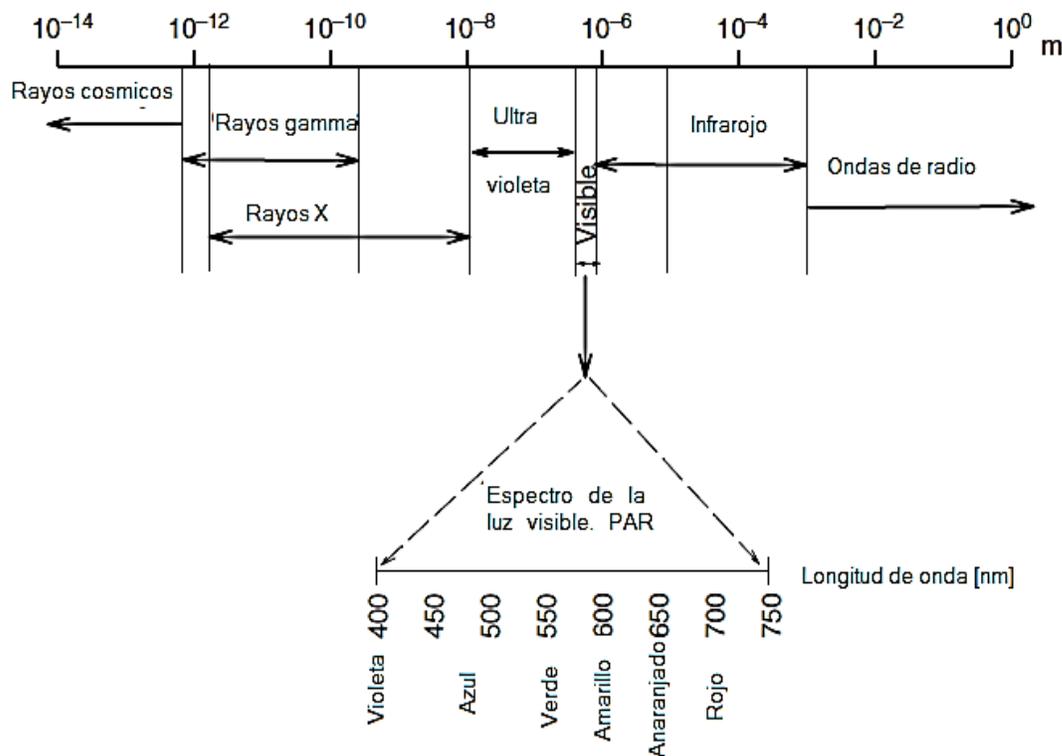
### 2.1 Naturaleza de la luz solar

La energía que irradia el sol constituye el espectro electromagnético, la energía solar que llega a la atmósfera de la Tierra cada año es equivalente a  $65 \times 10^{23}$  joules (J), pero la atmósfera solamente permite que atraviese una fracción correspondiente al rango de radiación infrarroja, ultravioleta y visible, esta energía equivale a  $15 \times 10^{23}$  J. (Richmond, 2004).

La luz es una forma de radiación electromagnética que viaja a una velocidad de  $\sim 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$  ( $c$ , velocidad de la luz), y tiene diferentes longitudes de onda que están entre  $10^{-3}$  y  $10^{-8}$  m. La longitud de onda se expresa en nanómetros ( $\text{nm} = 10^{-9}$  m). La porción de luz visible de este espectro se encuentra desde el violeta alrededor de los 380nm y el rojo a 750nm (**Figura 1**). La longitud de onda de la luz visible también se denomina PAR (por sus siglas en inglés “Photosynthetically Active Radiation”), que es la radiación utilizada para la fotosíntesis. En los días soleados la radiación que llega a la superficie de la Tierra es aproximadamente  $1000 \text{ W m}^{-2}$  (100,000 lux o aprox.  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), de los cuales sólo el 40-50% corresponde a la PAR (Richmond, 2004).

De acuerdo a la teoría cuántica, la energía de luz se distribuye en forma de paquetes separados llamados fotones. La energía de un quantum de luz o fotón es el producto de la frecuencia de la luz y la constante de Planck y se expresa como  $E = h\nu$ , donde  $E$  es la energía de un quantum de radiación,  $\nu$  es la frecuencia de la radiación (la frecuencia es el número de ondas transmitidas por unidad de tiempo), y  $h$  es la constante de Planck (la constante de Planck tiene unidades del producto de energía por tiempo, equivale a  $6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ). La energía está inversamente relacionada con la longitud de onda, un fotón de luz azul ( $\sim 400 \text{ nm}$ ) tiene más energía que la luz roja (alrededor de  $700 \text{ nm}$ ). La ley de la equivalencia fotoquímica de Einstein, establece que una molécula puede reaccionar únicamente después de haber absorbido la energía de un fotón, esto quiere decir que 1 mol de un compuesto debe absorber  $N$  fotones ( $N = 6.023 \times 10^{23}$ , número de Avogadro), para iniciar la reacción. La energía total absorbida de un fotón por un mol de un compuesto es llamado *Einstein*

(Einstein= $6.023 \times 10^{23}$  quanta). Un *Einstein* (*E*) quantum de luz también se refiere a un *mol* quantum. La energía de los fotones puede expresarse en términos de volts (V) y electrón volt (eV) que es la energía que adquiere un electrón cuando cae a través de un potencial de 1 volt que es igual a  $1.6 \times 10^{-19}$  J (Hall y Rao 1999).



**Figura 1.** Espectro de la radiación electromagnética y patrón espectral de la luz visible (PAR). (Adaptado de Hall y Rao 1999).

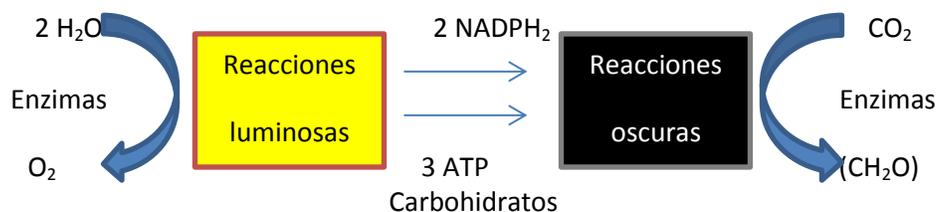
El flujo de luz se mide en “*lumens*” (lm) que se define como el flujo luminoso por unidad de área, en todos los puntos los cuales están a una distancia uniforme de una fuente puntual de luz; la intensidad luminosa se expresa en “*lux*” ( $\text{lm m}^{-2}$ ) o fotocandela ( $1 \text{ lm ft}^{-2}$ ). La energía de la luz que incide en la superficie es la densidad de la radiación de luz o irradiación (*Q*) y se mide en unidades energía como watts por metro cuadrado ( $\text{W m}^{-2}$ ). Las reacciones fotoquímicas en la fotosíntesis dependen de la cantidad de fotones que inciden en la superficie en vez del contenido de energía de los fotones, por lo que es lógico expresar *Q* en términos del número de quanta (fotones) sobre una unidad de área en un tiempo. La densidad del flujo de fotones puede expresarse en  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  o  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

## 2.2 Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso en que los compuestos inorgánicos y la energía de la luz se convierten en compuestos orgánicos por medio de organismos fotoautótrofos (algas, plantas y algunas bacterias), estos capturan la energía del sol y la utilizan para la síntesis de compuestos esenciales.

Existen dos tipos de fotosíntesis una anoxigénica, que es llevada a cabo por bacterias que utilizan la energía de la luz para extraer los protones y electrones de una gran variedad de moléculas donadoras, como el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) obtenido de aguas termales ricas en sulfuro, para reducir el  $CO_2$  para formar moléculas orgánicas. La segunda es la fotosíntesis oxigénica que es producida tanto por microorganismos procariotas (cianobacterias) y eucariotas (algas).

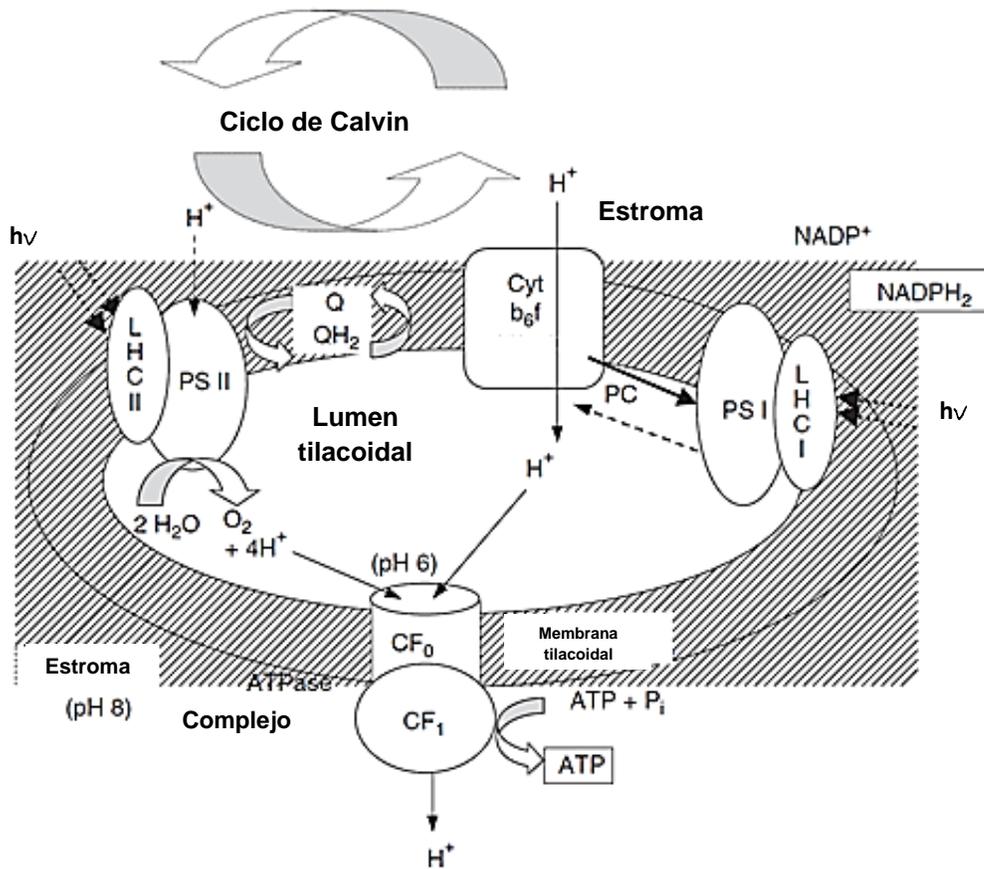
La fotosíntesis oxigénica se expresa como una reacción de óxido-reducción (redox) impulsada por la energía de la luz (por medio de las clorofilas en los cloroplastos), en la cual el  $CO_2$  y el agua ( $H_2O$ ) se transforman en carbohidratos y oxígeno ( $O_2$ ). La conversión se divide en dos tipos de reacciones llamadas luminosas y oscuras (**Figura 2**).



**Figura 2.** Productos principales de las reacciones luminosa y oscura de la fotosíntesis (Adaptado de Hall y Rao 1999).

Las reacciones luminosas están asociadas a una membrana fotosintética llamada tilacoide, que está formada por dos compuestos lipídicos principales mono- y digalactosil glicerol en forma de bicapa, donde las proteínas están incrustadas formando un mosaico líquido (Singer y Nicholson, 1972), y forman vesículas planas o cerradas alrededor del espacio intertilacoidal (lumen). La membrana tilacoide contiene cinco complejos principales: La antena captadora de luz, el fotosistema II (PS II) y el

fotosistema I (PSI) (ambos contienen un centro de reacción), el citocromo b6 / f y la ATP sintasa, que mantienen el transporte de electrones y fotofosforilación (**Figura 3**).



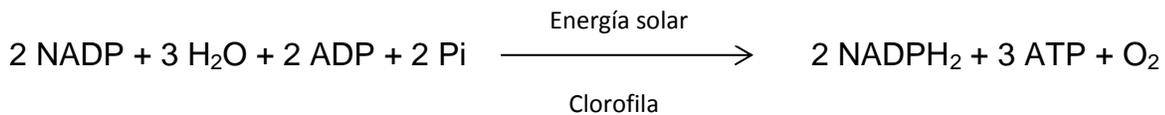
**Figura 3.** Esquema de los complejos principales de la membrana tilacoidal. Adaptado de Stryer 1988.

Todos los organismos fotosintéticos contienen pigmentos orgánicos para la recolección de energía de la luz. Hay tres clases principales de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobilinas. Las clorofilas (pigmentos verdes) y carotenoides (pigmentos de color amarillo o naranja) son lipofílicos y se asocian en los complejos de clorofila-proteína, mientras que ficobilinas son hidrófilicas.

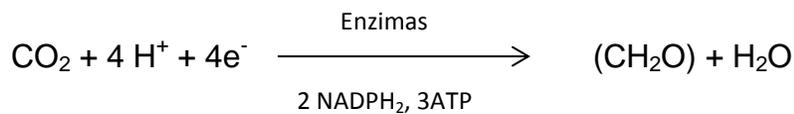
La energía luminosa lleva a cabo una reacción fotoquímica del  $\text{H}_2\text{O}$  de donde se extraen dos electrones formando  $\text{O}_2$  y se transfieren a través de una cadena portadora de electrones para producir una molécula de  $\text{NADPH}_2$ . Simultáneamente, los protones son transportados del espacio externo (estroma) al lumen produciendo un gradiente de pH, que promueve la síntesis de ATP que es catalizada por la ATP sintetasa. El PSI

lleva a cabo las reacciones fotoquímicas que generan un bajo potencial redox (alrededor de -1 V) necesario para reducir la ferredoxina y posteriormente producir NADPH<sub>2</sub>. El transporte de electrones entre el PSII y PSI está vinculado a través del complejo citocromo b<sub>6</sub> / f (**Figura 3**).

El papel principal de la reacción luminosa es convertir la energía de la luz en energía química, que provee de equivalentes reductores (NADPH<sub>2</sub>) y un compuesto de alta energía (ATP) para la asimilación de carbono inorgánico. Esta reacción se puede expresar como:



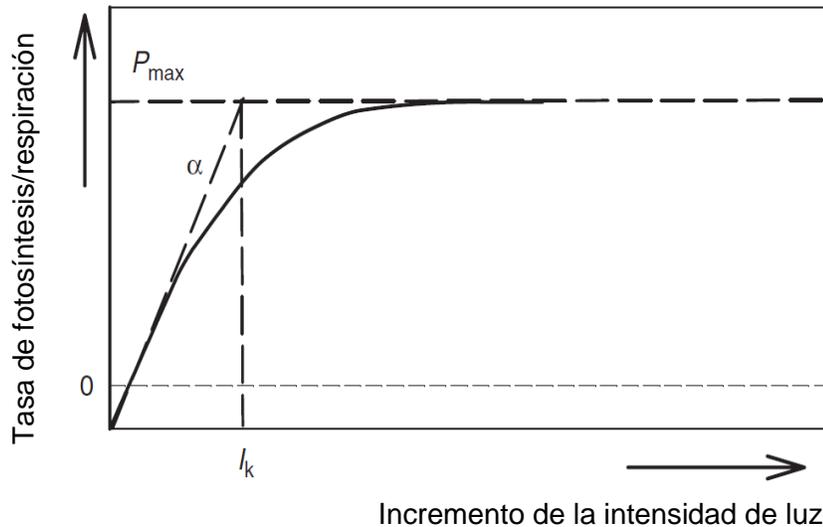
Las reacciones oscuras se llevan a cabo en el estroma, el NADPH<sub>2</sub> y el ATP que se formó en la reacción luminosa se utiliza para la fijación del CO<sub>2</sub>. La reacción en la fase oscura es:



Para fijar una molécula de CO<sub>2</sub> se requieren dos moléculas de NADPH<sub>2</sub> y tres de ATP. Para la fijación de una molécula CO<sub>2</sub> se requieren al menos diez fotones (Richmod, 2004). En esta fase no se requiere de la presencia de la luz, ya que consiste en la incorporación de CO<sub>2</sub> a un precursor de cinco átomos de carbono (ribulosa 1,5 difosfato), para la formación de glucosa y es un proceso endergónico. La regeneración de la ribulosa 1,5 difosfato pasa por un proceso llamado Ciclo de Calvin.

La biomasa de las microalgas contiene aproximadamente 50% en peso seco de carbono (Sánchez-Mirón *et al.*, 1999), el cual es obtenido del CO<sub>2</sub> fijado en la fotosíntesis. La producción de 100 ton de biomasa microalgal puede fijar alrededor de 183 ton de CO<sub>2</sub> (Chisti, 2007). Las microalgas llevan a cabo el proceso eficiente de la fotosíntesis y en determinadas condiciones ambientales, pueden aumentar a casi el doble de su masa celular en un periodo de 24 h, y en su fase exponencial hasta en un periodo de 3.5 h, en esta fase la fijación del CO<sub>2</sub> se incrementa.

La descripción de la actividad fotosintética se basa en mediciones de la evolución de oxígeno en proporción a la intensidad de la luz, la llamada curva de respuesta a la luz ( $P / I$ ) (**Figura. 4**). La pendiente inicial  $\alpha = P_{\max} / I_k$ , donde  $I_k$  representa la intensidad de luz de saturación y  $P_{\max}$  es la tasa máxima de fotosíntesis. En la oscuridad, hay un consumo neto de oxígeno como consecuencia de la respiración (la parte negativa de la curva en la **Figura 4**)



**Figura 4.** Curva de respuesta de la intensidad vs tasa de fotosíntesis.

(Adaptado de Richmond, 2004).

Por lo tanto, la fotosíntesis total o neta se considera como la suma neta del  $O_2$  producido y la respiración donde se consume  $O_2$ . A bajas intensidades de luz, la tasa de fotosíntesis depende linealmente de la intensidad luminosa. Al aumentar la intensidad de la luz, la fotosíntesis es cada vez menos eficiente. Finalmente, se llega a un valor constante (saturación de luz) donde las reacciones enzimáticas que utilizan la energía fijada se convierten en el paso limitante. Bajo un prolongado período de alta intensidad de luz, las tasas fotosintéticas suelen declinar a partir del valor de la intensidad de luz de saturación por un fenómeno llamado fotoinhibición que depende tanto de la intensidad de la luz y la duración de la exposición. Dado que en muchas microalgas de agua dulce y microalgas marinas, los rangos de intensidad de luz están entre  $100\text{-}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (menos de una décima parte de la plena luz del sol) se pueden saturar o incluso fotoinhibir la fotosíntesis (Masojídek *et al.*, 2004), la

saturación de la luz y la foto-inhibición son los obstáculos más serios para lograr alta eficiencia fotosintética (PE) cuando los sistemas operan bajo iluminación natural.

### 2.3 Microalgas

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares y multicelulares simples (Wang *et al.*, 2008), incluyendo las procariotas (Cianobacterias), y las eucariotas (Clorofitas y Diatomeas, Bacilarofitas) presentan ciclos de vida cortos que promueven la formación de esporas de resistencia o de células de reposo, que son útiles para sobrevivir en períodos poco favorables. Generalmente viven en cuerpos de agua (dulce o marina), y están a merced del movimiento de los mismos, por lo que desarrollaron características adaptativas que se relacionan con la resistencia al hundimiento, con la habilidad de absorber rápidamente nutrientes y acumularlos para sobrevivir en épocas de escasez. La nutrición es por absorción iónica de C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe, y Mg y de cantidades traza de Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo, y algunas especies requieren moléculas inorgánicas y orgánicas complejas, incluyendo la vitamina B<sub>12</sub> (Lara *et al.*, 1996).

Las microalgas se pueden clasificar como procariotas y eucariotas (mononucleada y multinucleada). En las procariotas (Cianobacterias y Proclorofitas), el DNA se encuentra libre en el citoplasma junto con las membranas fotosintéticas. Las eucariotas poseen una membrana que rodea el núcleo que contiene la mayor parte del genoma distribuido en un conjunto de cromosomas y el nucléolo, además de contar con el citoplasma dividido en organelos (aparato de Golgi, mitocondria, retículo endoplasmático, vacuolas, centriolos y cloroplastos).

Las procariotas tienen una pared celular con cuatro capas que se componen de mureína (peptidoglicano) y lipopolisacáridos. La pared también puede estar envuelta por paquetes mucilagenosos, además de tener pequeños poros y apéndices como fimbrias y pilli. Las cianobacterias tienen una alta digestibilidad debido a que no tienen celulosa a diferencia de la mayoría de las algas por lo cual se utiliza para el consumo humano; como ejemplo se puede mencionar a la *Spirulina* (Borowitzka, 1988). Debajo de la pared se encuentra la membrana plasmática o plasmalema. Los

tilacoides se encuentran libres en el citoplasma y contienen el aparato fotosintético, estos aparecen en forma de vesículas aplanadas, mostrando ficobilisomas en la superficie protoplasmática. Los ficobilisomas contienen ficobiliproteínas que se utilizan como etiquetas fluorescentes. Los tilacoides pueden estar en forma en anillos concéntricos, paralelos, dispersos, etc. Existen algunas inclusiones celulares y las más comunes son los gránulos de glucógeno (que representan material de reserva como: 1) cianoficina, 2) polímeros como arginina y ácido aspártico, 3) carboxisomas que contienen la enzima ribulosa 1,5 bifosfatocarboxilasa oxigenasa (Rubisco), 4) gránulos de polifosfato, 5) gotas de lípidos, 6) vacuolas de gas y 7) ribosomas.

Su división celular ocurre a través de fisión binaria por medio de la construcción de una pared que se desarrollan hacia adentro o bien por invaginación de la membrana plasmática y la capa de péptido glucano sin la partición de la membrana externa, también puede producirse por fisión múltiple. Sin embargo las cianobacterias no muestran evidencia de reproducción sexual.

En las eucariotas, la pared celular está compuesta por una capa microfilar de celulosa y es secretada por el aparato de Golgi. Puede ser silificada o calcificada y estar reforzada con placas y escamas. Algunas especies carecen de pared celular. La naturaleza de las capas exteriores promueve la producción de polisacáridos (alginatos, agar y carragenanos) a partir de diversas microalgas. El citoplasma está delimitado por la membrana celular o periplasma. El citoplasma contiene el núcleo, diferentes tipos de organelos y compartimentos formados por la invaginación de la membrana y el retículo endoplasmático. Entre los orgánulos se encuentran los cloroplastos, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, ribosomas, mitocondrias, vacuolas, plástidos, glóbulos lipídicos, flagelos y microtubulos. Los cloroplastos y los lípidos citoplasmáticos representan una importante fuente de ácidos grasos polinsaturados como el eicosapentatoico, docosahecanoico y ácidos araquidónico. El núcleo está delimitado por doble membrana nuclear, en las que se encuentra el nucléolo y varias moléculas del DNA distribuidas entre los cromosomas que se someten a división por mitosis. Los cloroplastos contienen una serie de vesículas aplanadas o tilacoides que contienen las clorofilas y están rodeados de la matriz o estroma. Estas membranas contienen los cinco complejos, anteriormente mencionados, para llevar a cabo la fotosíntesis y son la antena recolectora de luz, el fotosistema II (PSII), el fotosistema I

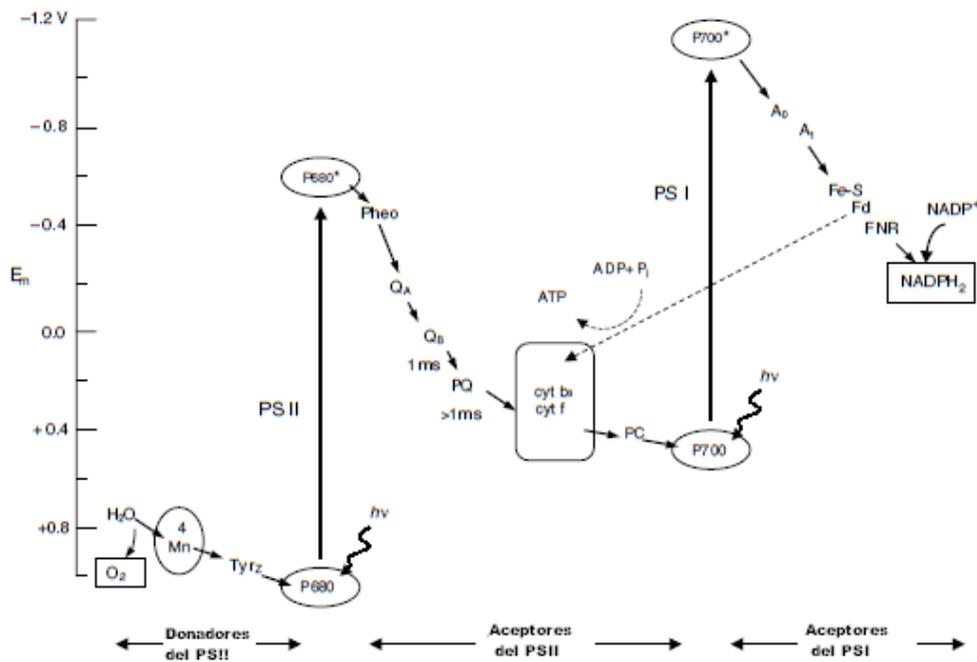
(PSI) (ambos contienen un centro de reacción), citocromo  $b_6/f$  y la ATP sintetasa, estos mantienen el transporte fotosintético de electrones y la fosforilación. Los tilacoides se ensamblan en grupos de tres (Heterophyta y Euglenophyta), cinco a nueve (Chlorophyta) o bien pueden estar aislados (Rhodophyta).

La reproducción vegetativa es común en la división celular de algas. Otros tipos de reproducción como la asexual es la que se produce por fragmentación y por producción de esporas conociéndose como zoosporas si son flageladas y aplanosporas o hipnosporas si no lo son. Las autoesporas y manoesporas son células no móviles y no tienen la capacidad de desarrollarse en zoosporas. Los procesos de reproducción asexual son muy variados, por bipartición (división celular longitudinal transversa), formación de acinetos (células vegetativas con una gruesa pared celular y alto contenidos de sustancias de reserva o estructura de resistencia). La reproducción sexual no es una característica universal en las algas, ya que se trata de la combinación de gametos, con diferente morfología y dimensión a partir de dos organismos de la misma especie (isogamia, anisogamia u oogamia).

## 2.4 Metabolismo

Como se mencionó anteriormente la fotosíntesis tiene un papel importante ya que provee un reductor bioquímico ( $NADPH_2$ ) y energía química (ATP) para la asimilación de  $CO_2$ . La energía de la luz se capta por medio de dos complejos proteína-pigmento, que son el PSI y el PSII. Los fotosistemas operan en serie conectados por una cadena de electrones que al visualizar se suele llamar esquema "Z", en el cual los componentes redox se caracterizan por su equilibrio potencial en el punto medio y las reacciones de transporte de electrones tienden a pasar de un potencial redox bajo (más negativo) a uno alto (más positivo) (**Figura 5**).

El PSII representa un complejo multimérico y se localiza en la membrana tilacoidal, con más de 20 subunidades y una masa molecular relativa de 300 kDa, está compuesto por el centro de reacción, el complejo de oxígeno y de la antena interna para recolección de luz. El centro de reacción del PSII, contiene las proteínas D1 y D2, y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del citocromo  $b_{559}$  (*cyt b<sub>559</sub>*).

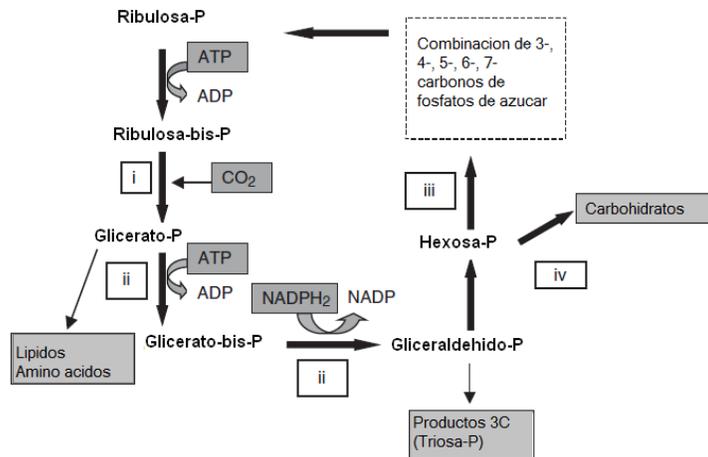


**Figura 5.** Esquema Z del flujo del electrón de agua a NADPH<sub>2</sub>. Adaptado de Hill y Bendall, 1960.

Los acarreadores de electrones se colocan en serie en una escala de potenciales de medios. La oxidación del donador primario P680 de electrones conduce a una separación de carga de alrededor de 1,2 V. El vacío de electrones en P680<sup>+</sup> es llenado por un electrón de tirosina (Tyr Z), que obtiene un electrón de la vía del agua a partir de cuatro iones Mn. En el lado aceptor de PS II, la feofitina (Feo) reduce el aceptor primario, Q<sub>A</sub>, que es una molécula plastoquinona unida a una proteína. Dos electrones se transfieren secuencialmente de Q<sub>A</sub> a un receptor secundario, Q<sub>B</sub>, la constante de tiempo depende del nivel de reducción de Q<sub>B</sub>. La plastoquinona reducida se oxida por el complejo cyt b<sub>6</sub>/f. La re-oxidación del plastoquinol PQH<sub>2</sub> es la reacción más lenta en la vía de transporte fotosintético de electrones. Plastocianina (PC) transporta un electrón al centro de reacción de la PSI, P700. En el lado aceptor de PSI, el electrón pasa a través de una serie de portadores a ferredoxina, lo que resulta finalmente en la reducción de NADP. La flecha recta punteada muestra la vía de la fotofosforilación cíclica, donde el ciclo de electrones en un sistema cerrado alrededor del PSI (de ferredoxina al complejo cyt b<sub>6</sub>/f) y el ATP es el único producto.

Los electrones se transportan entre el PSII y el PSI por medio de la vía del complejo citocromo  $b_6/f$  (cyt  $b_6/f$ ), y es ayudado por dos acarreadores. La plastoquinona (benzoquinona lipofílica con una cadena de isopreno) sirve como acarreador entre el PSII y el cyt  $b_6/f$ . En paralelo la plastoquinona transloca dos protones del estroma al lumen. La plastocianina (proteína con un enlace con cobre), opera en el lumen tilacoidal, transfiriendo electrones entre el cyt  $b_6/f$  y el PSI. **(Figura 5)**

El PSI es un complejo intermembranaral aproximadamente compuesto de diez proteínas, 100 clorofilas y con una masa molecular de aproximadamente 360 kDa. Transforma las reacciones fotoquímicas que se generan de un potencial redox bajo, necesario para reducir la ferredoxina para la producción del  $NADPH_2$ . Las proteínas PsA y PsB se encuentran en el centro del monómero y es un cofactor prostético del centro de reacción. Dentro de este complejo se encuentra el dímero P700 (donde se inicia la separación de la carga primaria) y los electrones acarreadores  $A_0$  (Chl a),  $A_1$  (piloquinona) y  $F_x$  (4Fe-4S). Los electrones generados son transportados a 4Fe-4S que son los aceptores de electrones  $F_A$  y  $F_B$  de la subunidad PsaC al electrón móvil terminal, que es la ferredoxina **(Figura 5)**.



**Figura 6.** Pasos de la fijación fotosintética del  $CO_2$  (el ciclo de Calvin Benson). (Adaptado de Richmond, 2004).

El mecanismo de la fijación de  $CO_2$  y síntesis de carbohidratos es por medio del ciclo de Calvin, el cual tiene cuatro fases **(Figura 6)**:

- i) **Carboxilación**, reacción mediante la cual el  $\text{CO}_2$  se incorpora a un azúcar de 5-carbonos, ribulosa bifosfato (Ribulosa-bis-P), para formar dos moléculas de fosfoglicerato (Glicerato-P). Esta reacción es catalizada por la enzima Rubisco.
- ii) **Reductiva**, tiene como finalidad el convertir el fosfoglicerato en productos de tres carbonos (Triosa-P) para ello se añade energía en forma de ATP y  $\text{NADPH}_2$  en dos pasos: fosforilación del fosfoglicerato para formar difosfoglicerato y ADP, y el segundo paso consiste en la reducción de difosfoglicerato (Glicerato-bis-P) a fosfogliceraldehído (Glicerldehído-P) por medio del  $\text{NADPH}_2$ .
- iii) **Regenerativa**, se regenera la ribulosa fosfato (Ribulosa-P) para posteriormente seguir fijando  $\text{CO}_2$ , en una serie compleja de reacciones que combinan fosfatos de azúcares de 3-, 4-, 5-, 6- y 7-carbonos. La generación de azúcares de 5-carbonos a partir de azúcares de 6-carbonos y 3- carbonos se lleva a cabo por la acción de las enzimas transcetolasa y la aldolasa.
- iv) **Producción**, los productos principales y finales de la fotosíntesis se consideran carbohidratos, pero también los ácidos grasos, aminoácidos y los ácidos orgánicos se sintetizan durante la fijación del  $\text{CO}_2$ . Varios productos se pueden formar durante la fijación del  $\text{CO}_2$ , bajo diferentes condiciones de intensidad de luz, concentraciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , y nutrición. Las plantas, bacterias y microalgas siguen la vía normal  $\text{C}_5 + \text{C}_1 = 2 \text{C}_3$ , sin embargo también hay plantas como el maíz, la caña de azúcar y algunas microalgas que también utilizan la ruta auxiliar  $\text{C}_3 + \text{C}_1 = \text{C}_4$  (Ciclo Hatch y Slack) en la que el  $\text{CO}_2$  se incorpora al fosfoenolpiruvato para dar oxalacetato, un compuesto de cuatro carbonos que se reduce a malato y aspartato.

## 2.5 Productos de interés

A partir de la biomasa microalgal se pueden generar muchos productos de interés, ya que tienen muchas aplicaciones comerciales. Se aplican en diversas áreas de la biotecnología, y juegan un papel crucial en la acuicultura, pueden utilizarse para incrementar el valor nutricional de los alimentos, o ser incorporadas en los cosméticos, y se cultivan industrialmente para obtener moléculas de alto valor agregado, como:

fármacos, ácidos grasos polinsaturados que se agregan a los alimentos infantiles, se usan también como suplementos nutricionales o como pigmentos en tintes naturales (Rosemberg *et al.*, 2008). Además, pueden utilizarse como materia prima para diferentes tipos de combustibles renovables, como el biodiesel, biometano, biohidrógeno, biopetróleo y bioetanol, estas alternativas energéticas promisorias han resultado muy atractivas en años recientes (Donohue y Codgell, 2006; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Producción anual y usos de microalgas (Wilkie *et al.*, 2011)

Microalga	División	Producción anual	Pais	Aplicación
<i>Spirulina</i>	<i>Cyanophyta</i>	3000 ton	China, India, EUA, Miramae, Japón	Nutrición humana y animal, Cosméticos, ficobiliproteínas
<i>Chlorella</i>	<i>Chlorophyta</i>	2000 ton	Taiwan, Alemania, Japón	Nutrición humana, acuicultura, cosmético
<i>Dunaliella salina</i>	<i>Chlorophyta</i>	1200 ton	Australia, Israel, EUA, China	Nutrición humana, cosméticos, caroteno
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Cyanophyta</i>	500 ton	EUA	Nutrición humana,
<i>Haematococcus pluvialis</i>	<i>Chlorophyta</i>	300 ton	EUA, India, Israel	Acuicultura, Astaxantina
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	<i>Pyrrophyta</i>	240 DHA	EUA	DHA
<i>Schizochytrium sp.</i>	<i>Labyrinthista</i>	10 ton DHA	EUA	DHA

En el sector salud y nutrición, la *Chlorella* es producida por más de 70 compañías, en Taiwán se manufactura y co-produce 400 ton de biomasa seca anualmente. Ésta se vende como nutracéutico o suplemento de la dieta diaria (Borowitzka y Hallegraef

2007). En Japón se tienen reportes que describen el potencial terapéutico que tiene la *Chlorella* y se recomienda para el tratamiento en úlceras gástricas heridas y estreñimiento, o para usarse como medida preventiva para la arterioesclerosis, la hipertensión y el colesterol. El principio activo más importante es  $\beta$  1,3 glucano. Otra microalga utilizada en la alimentación es la *Spirulina* debido a su alto contenido proteico y excelente valor nutritivo debido a que es una fuente de ácidos grasos que no pueden ser sintetizados por los seres humanos (Spolare *et al.*, 2006; Becker, 1994).

Las algas contienen carotenos (pigmentos amarillos, anaranjados o rojos), incluyendo  $\beta$  –caroteno, que es utilizado como colorante para alimentos o bien como suplemento en la alimentación humana y de animales (Spolare *et al.*, 2006). La *Dunaliella salina* se utiliza en la producción industrial de  $\beta$ –caroteno, que es una sustancia que en el cuerpo se transforma en vitaminas. La astaxantina es otro carotenoide derivado de las algas y es utilizada en la acuicultura como suplemento dietético o de antioxidante, y puede ser producida por *Haematococcus* (Borowitzka y Hallegraeff, 2007).

Algunas algas rojas o Rhodofitas, contienen ficocianina o ficoeritrina, estos pigmentos forman las ficobiliproteínas que son de color rojo o azul y son compuestos proteicos. Estos compuestos tienen potencial como colorantes naturales para alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. A partir de la *Spirulina* se produce un colorante azul llamado lina Spirulina azul y se le utiliza en la goma de mascar, dulces suaves, bebidas y productos lácteos. Las ficobiliproteínas se producen comercialmente con *Spirulina* y el alga roja *Porphyridium* y *Rhodella* y se emplean en la investigación clínica o inmunológica porque son muy potentes y tienen sensibilidad a las propiedades de fluorescencia (Spolare *et al.*, 2006; Raja *et al.*, 2008).

Los seres humanos y los animales carecen de las enzimas necesarias para sintetizar ácidos grasos polinsaturados (PUFA) y son conocidos como ácidos grasos esenciales. Dentro de ellos se encuentran los ácidos tipo omega tres. El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso omega 3 que es producido por una alga dinoflagelada, *Cryptocodinium cohnii* y en la actualidad es el único ácido graso producido comercialmente como suplemento en la dieta diaria de los niños. El proceso

de producción de otro ácido omega 3, el ácido eicosapentaenoico (EPA) se lleva a cabo por *Phaeodactylum tricornutum*.

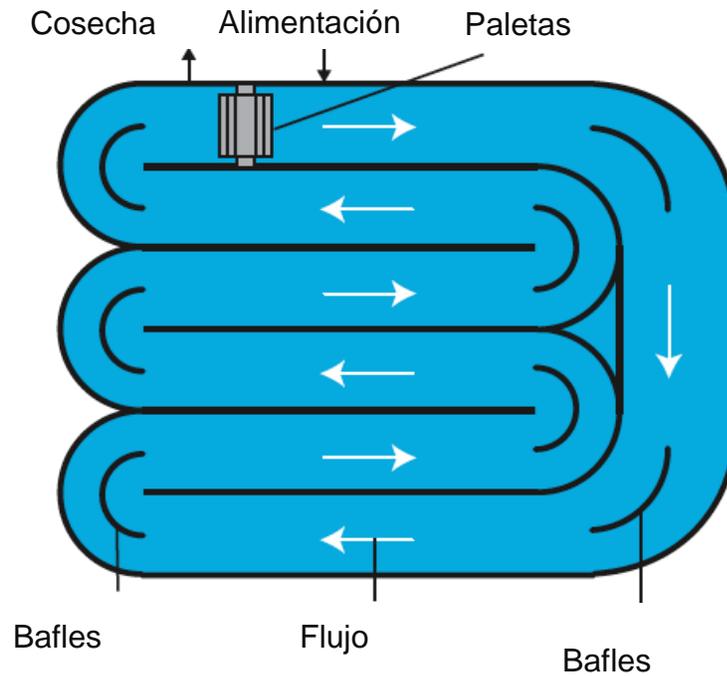
## 2.6 Sistemas de cultivo

Los sistemas de cultivo se clasifican en sistemas cerrados y abiertos; los sistemas abiertos incluyen estques poco profundos, canales abiertos, estanques circulares y tipo carrusel, por otra parte los sistemas cerrados o completamente hidráulicos se conocen como fotobiorreactores (Chaumont, 1993; Chisti, 2006), estos sistemas representan los únicos métodos de la producción de microalgas a gran escala (Terry y Raymond, 1985; Molina *et al.*, 1999). En todos los casos, el crecimiento óptimo es el objetivo biotecnológico y la clave del éxito son factores como la luz, temperatura, nutrientes y el grado de mezclado (Pulz, 2001).

### 2.6.1 Sistemas abiertos

Los cultivos abiertos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito (“raceway ponds”), estos últimos son los más utilizados (**Figura 7**). Los estanques de tipo “raceway” consisten en circuitos de 15 a 30 cm de profundidad, en los cuales rueda una paleta a un flujo constante del cultivo para promover un adecuado mezclado del sistema (Garibay, *et al.*, 2009; Borowitzka, 1999). Este tipo de sistemas presenta una baja productividad en la generación de biomasa ya que la concentración es de alrededor de  $1 \text{ g L}^{-1}$  con productividades de alrededor  $10\text{-}25 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Estos sistemas son utilizados para la producción de metabolitos y el tratamiento de aguas residuales (Pulz, 2001). Las ventajas que presentan estos sistemas son su sencillez estructural, bajo costo de construcción, facilidad de operación y mantenimiento, sin embargo presentan diversos inconvenientes como la pérdida de agua por evaporación, transferencia limitada de  $\text{CO}_2$  al cultivo por su baja concentración en el aire (0.035% v/v) y su difusión hacia la atmósfera, control limitado de las condiciones de cultivo, alta susceptibilidad a contaminarse, periodos amplios de producción (6 a 8 semanas), producciones

reducidas de biomasa y penetración limitada de la luz (Pulz y Scheinbenbogen, 1998; Pulz, 2001; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Estanque abierto tipo circuito.

### 2.6.2 Sistemas cerrados o fotobiorreactores

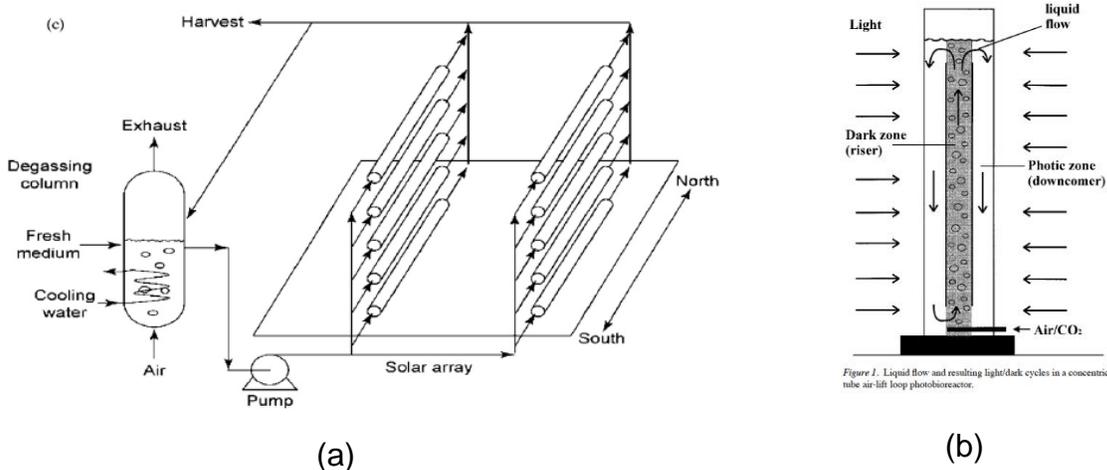
Los fotobiorreactores son los sistemas de cultivo donde una gran proporción de la luz no incide directamente sobre la superficie del cultivo sino que pasa a través de las paredes del reactor que contienen a las células del cultivo. Debido a lo anterior, los fotobiorreactores no permiten o limitan el intercambio de materiales contaminantes entre el cultivo y la atmósfera.

Los sistemas cerrados o fotobiorreactores tienen configuraciones diversas, tubulares: vertical, horizontal, helicoidal, conformación  $\alpha$ , paneles planos y columnas de burbujeo, con el propósito de captar energía. Los más usados son los reactores tubulares y los de panel plano y están formados por dos unidades, una para la captación de luz y otra de transferencia de gases. Estos sistemas ofrecen muchas ventajas como pérdidas mínimas de  $\text{CO}_2$ , riesgo reducido de contaminación, control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción (2 a 5h) y productividades altas. Las

desventajas en estos sistemas son los costos atribuidos a la energía invertida en la agitación mecánica de los cultivos con la finalidad de favorecer la transferencia de gases (Chisti, 2007; Chisti, 2008; Molina, 1999; Wijffels, 2008).

Estos sistemas posibilitan una mayor concentración de biomasa con menores requerimientos de superficie ya que tienen una mayor productividad por unidad de área  $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$  (Chisti, 2007; Janssen, 2003; Molina *et al.*, 1999; Sánchez-Mirón *et al.*, 1999) que los sistemas abiertos. Los fotobiorreactores tubulares consisten en una serie de arreglos de tubos de manera vertical u horizontal son transparentes y generalmente están hechos de plástico o vidrio. El arreglo tubular o colector solar captura la luz del sol para la fotosíntesis: los tubos son de diámetros menores a 0.1m para permitir que la luz solar penetre en un volumen significativo de la suspensión de células. El cultivo microalgal circula a partir de un reservorio que puede ser un degasificador, hacia el colector solar y de regreso al degasificador. Los fotobiorreactores se operan en continuo durante el día (Chisti, 2007). Una gran variedad de fotobiorreactores cerrados han sido propuestos para generación de biomasa microalgal.

En los fotobiorreactores el movimiento de líquido puede hacerse a través de bombeo, burbujeo del aire- $\text{CO}_2$  o por medios neumáticos (**Figura 8**).

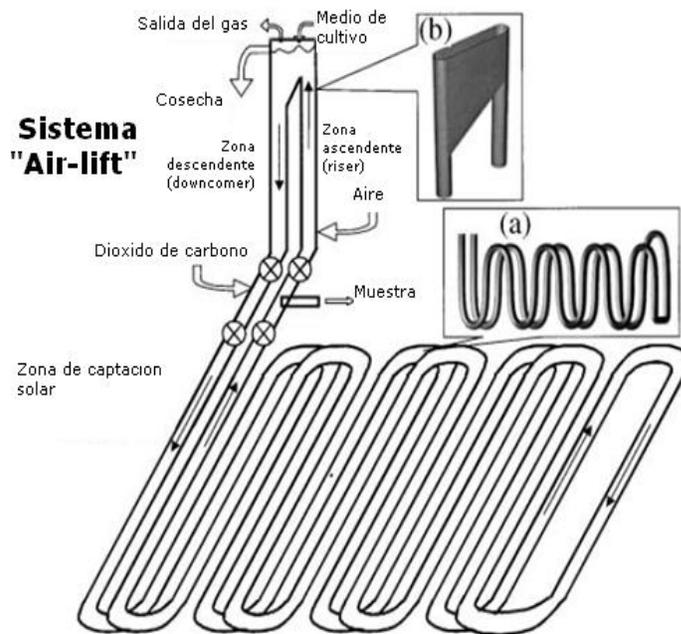


**Figura 8.** Arreglo de reactores con a) bombeo y b) mezclado neumático

En esta última clasificación se encuentran los reactores air-lift donde la fuerza motriz que produce el movimiento del líquido se genera por la diferencia de presión estática, entre una zona del flujo ascendente y la zona del flujo descendente, lo

anterior causa el movimiento de las fases a lo largo de la zona de captación de luz y el mezclado macroscópico de naturaleza neumática (Van Baten *et al.*, 2003) dentro del sistema. Las configuraciones de ese tipo de reactores son tubular interno y tubular externo o de lazo extendido. La primera está constituida por dos tubos concéntricos. En la zona interna se introduce la fase gaseosa y esta sección se comporta como una columna de burbujeo, debido a esto el líquido asciende hasta llegar a la zona del desgasificador donde se eliminan la fase gaseosa y la corriente líquida que ha ganado energía potencial que provoca un movimiento descendente.

Los fotobiorreactores con un receptor tubular continuo (lazo extendido), se dividen en dos partes, que son el “air-lift” y el lazo extendido o receptor solar (**Figura 9**) que se coloca en dirección norte-sur para permitir un máximo en la penetración de luz en las microalgas. La superficie sobre la que está colocado el receptor de luz, se procura que sea de color blanco ya sea pintada o con una cubierta con plástico para aumentar la intensidad de la luz que recibe la superficie del receptor solar.



**Figura 9.** Fotobiorreactor en condiciones ambiente, zona de captación de luz o lazo extendido (a) y desgasificador (b). (Adaptado de Molina *et al.*, 2001).

El fotobiorreactor “air-lift” sirve para recircular el medio de cultivo a través del receptor solar, un desgasificador en la parte superior del “air-lift” impide la recirculación de las burbujas a la zona de captación de luz. Debido a que la fotosíntesis se lleva

acabo en la zona de captación de luz, el oxígeno se acumula y es transportado hacia el exterior por medio del “air-lift” (**Figura 9**) (Molina *et al.*, 1999; Molina *et al.*, 2000).

Existen parámetros importantes a considerar en la producción de biomasa en este tipo de reactores como son el volumen del reactor, área de superficie del reactor, la hidrodinámica, las condiciones de operación, la productividad volumétrica, por área, la irradiación incidente y eficiencia de fotoconversión (Novakovic *et al.*, 2005).

Algunos otros aspectos que se deben considerar al momento de operar un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas (Woods, 2007; Molina *et al.*, 1999; Contreras *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2000) y son:

- La geometría del reactor debe promover la turbulencia e inducir un buen mezclado, para mejorar la distribución radial de irradiación de luz en la zona de captación de luz.
- La hidrodinámica del reactor afecta actividad fotosintética y la producción de biomasa, debido a que una alta intensidad en la turbulencia puede causar ruptura de la microalga por los esfuerzos de corte, además de que con ésta se controlan los ciclos luz-oscuridad.
- La transferencia de masa del CO<sub>2</sub> líquido-gas que estimula la captación de CO<sub>2</sub> para que se lleve acabo la fotosíntesis.
- La transferencia de calor para mantener un control en la temperatura.
- El sistema de alimentación de la fase gaseosa debe mantener en constante movimiento las fases dentro del reactor para que el alga complete su proceso de fotosíntesis. Por ello, el diseño de un distribuidor debe asegurar una dispersión uniforme de las burbujas gaseosas a través de la sección del flujo ascendente.

## **2.7 Comparación entre los sistemas de cultivo**

Existen varios tipos de fotobiorreactores (FBR) se han diseñado y ensayado desde finales de los años 1940. El cultivo a gran escala de microalgas generalmente se lleva acabo estanques abiertos y en fotobiorreactores. En la **Tabla 2** se presentan las

principales ventajas y desventajas de los sistemas utilizados en el cultivo a la intemperie.

Las ventajas principales de los FBR, es que permiten el cultivo de especies de algas que no pueden cultivarse en estanques abiertos y tienen una mayor productividad de biomasa por unidad de área. Los FBR verticales interceptan los rayos del sol en ángulos grandes y diluyen la luz en comparación con estanques. Además, su superficie trasera recibe la radiación difusa y reflejada sobre todo de baja intensidad. Por esta razón, los FBR verticales son más eficientes que los estanques en términos de utilización de la energía solar, pero no es fácil de diseñar estrategias para implementarlas de manera que esta ventaja se traduzca en un beneficio práctico: una mayor productividad por unidad de superficie de tierra ocupada.

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas del cultivo en FBR y en estanques.

Factor	Estanques abiertos	Fotobiorreactores
Espacio requerido	Alto	Bajo
Pérdida de agua	Muy alto	Bajo
Pérdida de CO <sub>2</sub>	Alto, dependiendo de la profundidad del estanque	Bajo
Concentración de oxígeno	Bajo, debido a una continua desgasificación espontánea	En la construcción puede requerir un intercambiador de gas
Temperatura	Altamente variable	Requiere enfriamiento
Limpieza	No	Requiere debido a la formación de biopelículas en las paredes
Contaminación	Alto	No
Evaporación	Alto	No
Calidad de la biomasa	Variable	Reproducibile
Costo de cosecha	Alto	Bajo
Seguridad microbiológica	No	UV
Sistema automático de enfriamiento	No	En la construcción
Sistema automático de calentamiento	No	En la construcción
Bombeo de aire	En la construcción	En la construcción
Requerimientos de energía (W)	4000	1800

Los FBR pueden ser más productivos que los estanques en términos de superficie ocupada, pero su productividad también depende, en gran medida, de los requerimientos de energía, luz y la temperatura, del diseño del reactor, de la ubicación y temporada (Chini *et al.*, 2006). Sin embargo, el mejor desempeño de los

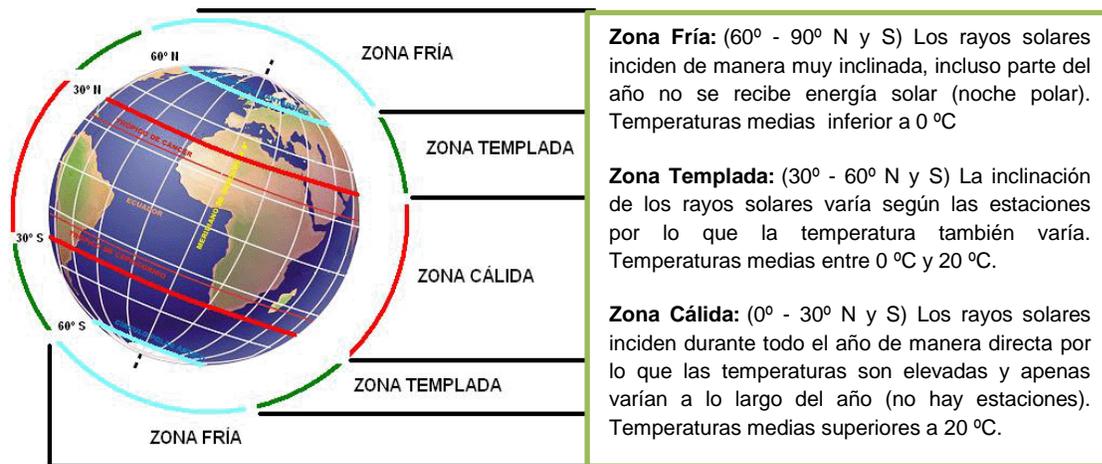
fotobiorreactores implica también un mayor costo. En general, la construcción de los FBR es mucho más cara que los estanques, pero también pueden diseñarse sistemas de bajo costo y simples. Un estanque bien diseñado realizado con un revestimiento durable no costará menos.

Aunque los costos de construcción de los FBR podrían ser similares a los de los estanques, sus costos de operación no lo son (Lehr y Posten 2009). El mezclado adecuado para proporcionar la transferencia de masa necesaria en los paneles de pared verticales burbujeados con aire y columnas anulares, requieren más de  $100 \text{ W m}^{-3}$  aproximadamente, esto es,  $2000 \text{ MJ ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$  o hasta el 50% de la energía almacenada en la biomasa. El mezclado en los reactores tubulares para lograr velocidades de fluido y números de Reynolds adecuados, puede requerir incluso mayores entradas de energía (Chini *et al.*, 2009). Además, existe la necesidad de enfriamiento, que es generalmente provista por el agua (incluso el agua de mar) o mediante la inserción de un serpentín en el medio de cultivo (Rodolfi *et al.*, 2009). El cultivo de microalgas en estanques abiertos es, en general, mucho más barato. La mezcla en estanques se puede lograr con una entrada de energía de aproximadamente  $200 \text{ MJ ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$  (Weissman *et al.*, 1988), lo que representa un gasto de 3-5% de la energía fijado en la biomasa y no hay necesidad de refrigeración, ya que en climas secos esto se logra por evaporación natural. Los estanques son más baratos de operar que los FBR, pero tienen varias limitaciones. La principal desventaja es que, al estar abiertos a la atmósfera, los estanques son mucho más susceptibles a contaminación. Algunas especies de algas no deseadas, los hongos e insectos entran inevitablemente en el cultivo y compiten con la cepa cultivada (Schenk *et al.*, 2008 y Richmond, 2004). Por otra parte, una de las ventajas de los estanques es que el enfriamiento por evaporación, puede convertirse en un inconveniente donde el agua dulce es escasa (Schenk *et al.*, 2008) o cuando el agua de mar no pueden utilizarse para compensar la evaporación. Es muy probable que una planta industrial para la producción de biocombustibles o de proteína a partir de microalgas requerirá una combinación de FBR (para la producción de inóculos) y estanques para el cultivo (generación del producto deseado) (Tredici, 2010). El diseño e ingeniería de FBR sigue siendo un campo de investigación muy activa, ya que los sistemas cerrados de cultivo son necesarios para cultivar microorganismos fotosintéticos y se prefieren en la industria como herramientas de investigación.

## 2.8 Factores críticos para los sistemas de cultivo expuestos a la intemperie.

En general, las condiciones climáticas, la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, otros nutrientes (nitrógeno y fósforo), y la calidad del agua afectan la productividad de los sistemas de cultivo de microalgas, además de la disponibilidad de espacio.

Dentro de los aspectos climáticos se deben considerar las condiciones como: a) la localización geográfica (latitud); b) la época de año (día del año, y horas de luz), y c) los factores ambientales (precipitaciones, vientos, etc.) (Molina *et al.*, 2000).



**Figura 10.** Zonas climáticas de la Tierra.

Como es sabido, la cantidad de energía solar que llega a la Tierra disminuye al aumentar la latitud. En las latitudes más altas, la luz solar incide en la superficie en un ángulo menor, teniendo que atravesar capas gruesas de atmósfera. Como resultado, la temperatura media anual del aire a nivel del mar se reduce en aproximadamente 0.4 °C por cada grado de latitud alejándose del ecuador la Tierra puede ser subdividida en franjas latitudinales más o menos homogéneas con un clima específico. Desde el ecuador hasta las regiones polares, se encuentran la zona intertropical (o ecuatorial), el clima subtropical, el clima templado y los climas polares (Sadava *et al.*, 2006) (**Figura 10**).

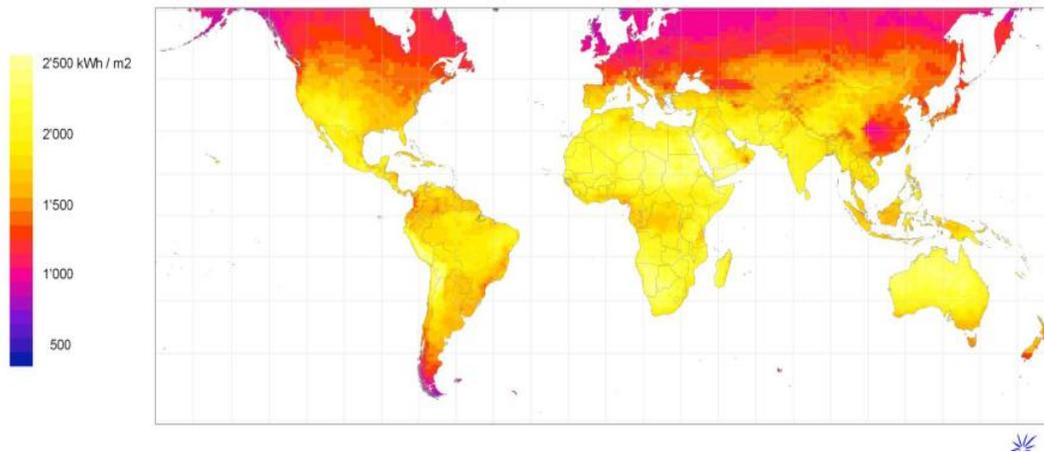
Los cultivos a la intemperie están sometidos a fluctuaciones diarias y estacionales de la intensidad de luz y de la temperatura (Chisti, 2007). Estos cambios toman lugar a tres diferentes escalas: la primera es el ciclo circadiano, el cual incluye la variación de la luz y la temperatura durante las 24 horas del día; la segunda es el ciclo estacional que cambia de acuerdo a las condiciones climáticas y a la localización geográfica del lugar donde se cultiven las microalgas; y la tercera que es a través del nivel de mezclado en el sistema de cultivo, que controla los ciclos de luz-oscuridad que pueden variar en fracciones de segundo en comparación con las escalas anteriores que son horas o meses (Richmond, 2004).

Además en condiciones ambiente la microalga necesita llevar a cabo un proceso de aclimatación, que es un balance entre las reacciones fotosintéticas de luz y oscuridad. (Molina *et al.*, 2000). Este balance está destinado a equilibrar eficazmente la absorción de la energía de excitación, la producción de NADH<sub>2</sub> y ATP para su crecimiento y mantenimiento (Richmond, 2004). A continuación se presentan los dos factores que se consideran más importantes para el cultivo de microalgas en sistemas localizados a la intemperie ya que afecta el crecimiento y las reacciones bioquímicas, y éstas son la intensidad luminosa y la temperatura.

### **2.8.1 Intensidad luminosa**

Las microalgas, como las plantas terrestres, dependen de la luz solar para crecer. Sin embargo, las algas han evolucionado para prosperar en un entorno con poca luz y han maximizado su aparato fotosintético. De esta manera, mientras que las plantas cultivadas crecen muy bien a plena luz del sol, una radiación solar alta puede inhibir el crecimiento de las algas e incluso causar muerte celular.

La **Figura 11** ilustra los promedios globales de irradiación solar en el mundo. Una radiación solar de aproximada de 1500 kWh m<sup>-2</sup> año<sup>-1</sup> se considera adecuada para la producción de microalgas, lo que significa que la mayor parte de la superficie terrestre de la Tierra parece ser potencialmente adecuada si se considera únicamente la irradiación (Darzins *et al.*, 2010)



**Figura 11.** Irradiancia global solar (Meteotest; base de datos Meteonorm).

Por otro lado, el espectro de emisión también afecta diversos procesos metabólicos en las algas, ya que influyen en los intermediarios del ciclo de Calvin que participan en la síntesis de metabolitos; de este modo la síntesis de proteínas es estimulada por la luz azul, mientras que la de carbohidratos es favorecida por la luz roja (Arredondo y Vazquez-Duhalt, 1991; Richmond, 1986). Cuando las microalgas se encuentran en una baja intensidad de luz se promueve el aumento de unidades fotosintéticas y por lo tanto el aumento de los pigmentos, por el contrario con una alta iluminación, los pigmentos disminuyen. Estos cambios en la pigmentación son una respuesta a la variación de la intensidad de luz a lo largo del día. Como se mencionó anteriormente la fotosíntesis produce  $O_2$ , que bajo condiciones de alta iluminación en fotobiorreactores tubulares puede llegar a tasas de producción de hasta  $10 \text{ gO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Valores de oxígeno disuelto mayores a la saturación del aire pueden provocar inhibición de la fotosíntesis (Molina *et al.*, 2001). La concentración de oxígeno disuelto varía con la hora del día y es un reflejo de la actividad fotosintética. Además una alta concentración de oxígeno disuelto, en combinación con una alta intensidad de luz, produce daño fotooxidativo en las células de las algas, para prevenir esto, la concentración máxima de oxígeno disuelto en el sistema no debe ser mayor al 400% de la saturación del aire (Chisti, 2007).

Un incremento en la intensidad de luz se puede llegar a un nivel de saturación que se manifiesta con una disminución en la fotosíntesis y se ve reflejado en una disminución de tasa de crecimiento en la biomasa, a este fenómeno se le conoce como fotoinhibición. Este fenómeno resulta de una forma general un daño reversible al aparato fotosintético como consecuencia de un exceso de luz (Camacho Rubio *et al.*, 2003). Un ejemplo de este fenómeno se observa en *Phaeodactylum tricomotum* y *Phosphorydium creuntum* que tienen una constante de saturación de  $180 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente (Mann y Myers, 1968; Molina *et al.*, 2000), en comparación con estos valores la intensidad luminosa típica en la interperie en regiones ecuatoriales es aproximadamente de  $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El incremento de la susceptibilidad a la fotoinhibición puede causarse por diferentes factores como son una baja temperatura como lo demuestran estudios hechos con *Spirulina* (Torzillo *et al.*, 1996) y *Monodus subterraneus* (Vonshak *et al.*, 2001). En ambos casos las microalgas se expusieron a una intensidad de luz y temperatura bajas y se observó una disminución en la mayoría de sus parámetros fotosintéticos.

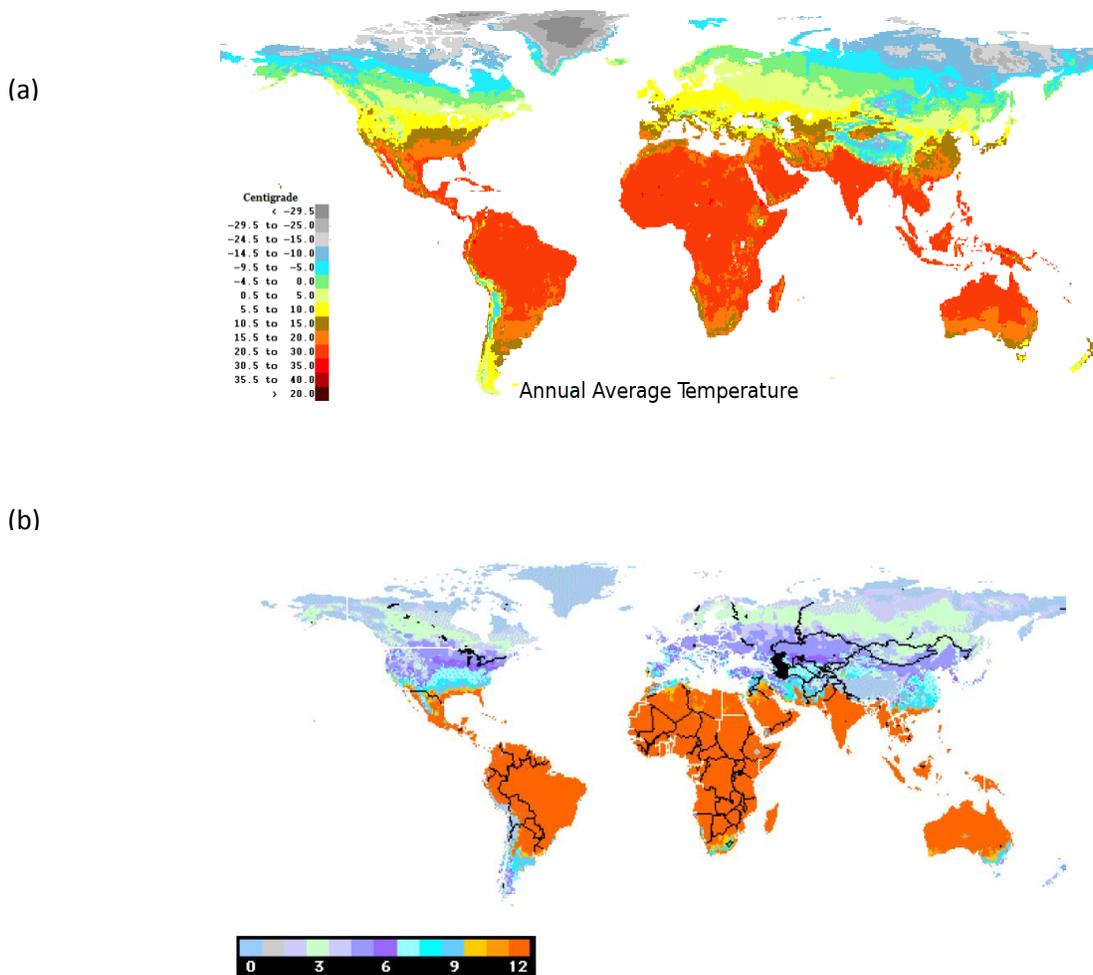
Además, la intensidad luminosa puede modificar la cantidad de lípidos totales y el perfil de lipídico. Una alta intensidad luminosa puede favorecer la producción de lípidos neutros de almacenamiento, principalmente los triacilglicéridos. Por el contrario. los lípidos polares se producen con bajas intensidad de luz.

### **2.8.2 Temperatura**

La temperatura es otro factor ambiental al que las microalgas reaccionan constantemente ya que influye en las velocidades de las reacciones, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa (Chisti, 2007; Richmond, 1986).

En general, todas las especies de plantas crecen bien cuando la temperatura se mantiene en un intervalo estrecho. Debido a las diferencias en la capacidad calorífica y la conductividad térmica del aire y del agua, las variaciones en la temperatura ambiente afectan de manera diferente a las algas y plantas terrestres. Las algas suspendidas en agua son menos sensibles a las fluctuaciones en la temperatura del

aire; ya que la temperatura del agua será una función del calentamiento por el sol, enfriamiento por evaporación, y otros factores de proceso en estanques abiertos ó acumulación de calor en el interior de los fotobiorreactores. En consecuencia, mientras que la temperatura tiene un efecto directo sobre la tasa de crecimiento, el rango de temperatura ambiente o el clima define la estación de crecimiento más adecuada para un sistema de producción de algas (Darzins *et al.*, 2010).



**Figura 12.** (a) Temperatura promedio global (FAO-SDRN, 1997a) y (b) Número de meses con temperaturas superiores a 10 °C (FAO-SDRN, 1997b).

La **Figura 12** muestra los patrones globales de temperatura. En la **figura 12a** se muestra la temperatura promedio anual y en la **figura 12b**, el número de meses con temperaturas por arriba de 10 °C. La temperatura ambiente está ligada a la factibilidad económica. En general, se considera que la producción es factible cuando las

temperaturas medias mensuales del mes más frío superan los 15 °C (Darzins *et al.*, 2010).

A medida que se aumenta la escala de producción, los costos y las dificultades técnicas pueden llegar a ser prohibitivos. Por consiguiente, los climas con temperaturas ambientales adecuadas para el cultivo durante todo el año y de manera continua tienen las ventajas de obtener mayores productividades anuales. Si bien los promedios irradiación solar indicarían que la mayor parte de la superficie terrestre de la Tierra es adecuada para la producción de algas, no toda la Tierra es apta para el cultivo durante todo el año.

El gran potencial para la obtención de bioproductos que han mostrado las microalgas, ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de cultivo con el objetivo aumentar la concentración del producto de interés, encontrar la temperatura óptima de crecimiento y disminuir los costos de producción. En este contexto la evaluación diferentes estrategias para aumentar la productividad es la clave para el cultivo de algunas especies en lugares específicos, algunas de ellas plantean el uso de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de la microalga, ó el cultivo a la intemperie entre otras.

La temperatura al igual que la intensidad de luz son factores que influyen directamente sobre el metabolismo, afectando las tasas de crecimiento de las microalgas, y en algunas de ellas, que son muy sensibles, puede llegar a ser letal (Bechet *et al.*, 2010). La temperatura depende de las condiciones del cultivo (geometría y dimensiones de los sistemas de cultivo) y el lugar donde se lleve a cabo (localización geografía del cultivo, tipo de clima, etc).

Algunos trabajos han propuesto diferentes formas de representación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento o la actividad fotosintética; así Bernard y Rémond (2012) propusieron un modelo para representar el efecto de la temperatura y la luz en el crecimiento de las microalgas con el que se podría predecir la productividad basada en procesos realizados en condiciones externas. Este modelo incluye tres temperaturas cardinales, mínima ( $T_{min}$ ), óptima ( $T_{opt}$ ) y máxima ( $T_{max}$ ). Y tres parámetros asociados a la respuesta de la luz, tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ), intensidad óptima ( $I_{opt}$ ) y la pendiente de la curva de la intensidad de luz ( $\alpha$ ). El modelo

puede representar satisfactoriamente el comportamiento de varias especies cultivadas en diferentes condiciones con un intervalo de confianza del 95%, en la tabla se presentan las temperaturas y tasas de crecimiento máximas obtenidas experimentalmente y los valores estimados por el modelo (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Parámetros del modelo de temperaturas cardinales ( $T_{\min}$ ,  $T_{\text{opt}}$  y  $T_{\max}$ ). Los valores con negritas son valores los obtenidos a partir del modelo.

Especie	Referencia	$T_{\min}$ (°C)		$T_{\text{opt}}$ (°C)		$T_{\max}$ (°C)		$T_{\text{opt}}$ (día <sup>-1</sup> )	
<b><i>Asterionella formosa</i></b>	Butterwick <i>et al.</i> (2005)	12	<b>7.3</b>	12.9	<b>20.1</b>	21.3	<b>29.8</b>	0	<b>1.6</b>
<b><i>Ceraium furca</i></b>	Baek <i>et al.</i> (2008)	1.3	<b>8.4</b>	21.8	<b>24.4</b>	18.4	<b>32.1</b>	0.5	<b>0.6</b>
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>	Xin <i>et al.</i> (2010)	3.1	<b>3.1</b>	26.3	<b>26.3</b>	32.7	<b>32.7</b>	0.8	<b>0.8</b>
<b><i>P. Tricornutum</i></b>	Kudo <i>et al.</i> (2000)	4.7	<b>7.7</b>	19.1	<b>22.5</b>	24.0	<b>25.3</b>	1.3	<b>1.8</b>

Para el cultivo de microalgas en condiciones a la intemperie en fotobiorreactores se debe considerar el uso de microalgas termo-tolerantes, puesto que la temperatura del medio puede alcanzar valores por encima de las 40 °C en zonas subtropicales, por lo que la microalga puede inhibirse si el fotobiorreactor no cuenta con un sistema de enfriamiento. Las microalgas termo-tolerantes pueden ayudar a disminuir los costos debido a que no requieren un control de temperatura. Ong *et al.*, 2010 caracterizaron dos cepas mutantes de *Chlorella sp.* MT-7 y MT-15 en columnas verticales (volumen del cultivo 4L), usadas en la acumulación de lípidos y encontraron que la cepa MT-15 creció a temperaturas promedio de  $41 \pm 1$  °C con una tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.24 d<sup>-1</sup> y con una productividad volumétrica máxima de 0.35 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

La microalgas *Desmodesmus sp.* F2 es otro ejemplo de microalga termo-tolerante. *Desmodesmus sp.* F2 se cultivó en varios fotobiorreactores de policarbonato con volúmenes de cultivo de 15 L (D=30 cm), con diferentes concentraciones de inyección de CO<sub>2</sub>, utilizando aguas residuales tratadas y operados a la intemperie. En ellos se encontró que la microalga puede crecer bajo temperaturas e intensidades de luz de 46°C y 2600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente; con una concentración de biomasa máxima de 1.27 g L<sup>-1</sup>. También observaron que al trabajar con una concentración de 2 % de CO<sub>2</sub> se acelera el crecimiento (Chai-Cheng *et al.*, 2012).

La temperatura tiene un efecto importante también sobre la composición de los ácidos grasos, una disminución en la temperatura provoca una tendencia hacia la insaturación de los ácidos grasos y un aumento en la temperatura provoca la saturación de ácidos grasos (Renaud *et al.*, 2002). El contenido lipídico en *Ochromonas dánica* (Boussiba *et al.*, 1987) y *Nannochloropsis salina* (Aaronson, 1973) aumenta cuando lo hace también la temperatura, pero en *Chlorella sorokiniana* el contenido lipídico aumenta en diferentes temperaturas (Patterson, 1970).

Una combinación de altas concentraciones de oxígeno con baja temperatura pueden provocar un gran estrés que se observa al disminuir la productividad de la biomasa hasta en un 60% como lo observó Torzillo *et al.* (1998) al estudiar la *Spirulina* en un fotobiorreactor en la intemperie. Otra consecuencia de las bajas temperaturas es que disminuye la tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, se inhibe la generación de especies de oxígeno activo que se sabe protegen el PSII de la fotoinhibición y se inhibe también el ciclo de reparación del PSII (Richmond, 2004).

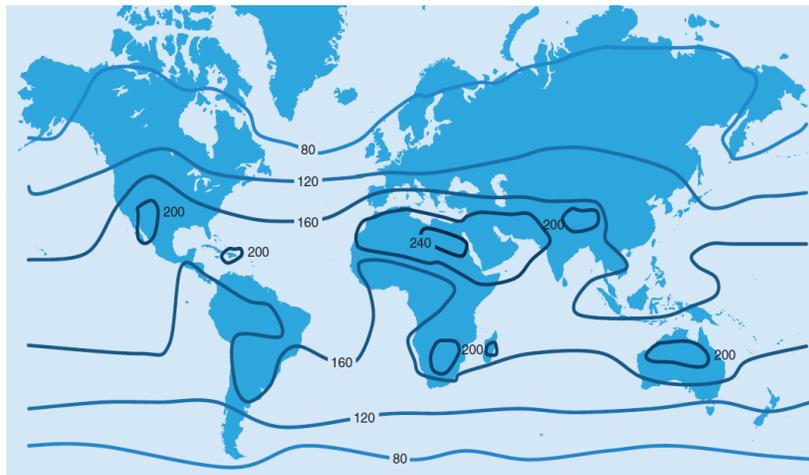
### **2.8.3 Otros aspectos climáticos**

Otros aspectos climáticos que afectan los sistemas de cultivo a escala industrial sobretodo en sistemas abiertos son la precipitación, la evaporación, y el clima severo. La lluvia constituye un reto importante para los sistemas de producción. En los trópicos se pueden alcanzar niveles de 30 mm·h<sup>-1</sup> que pueden sostenerse por días. Tal nivel precipitación pluvial en un estanque de 20-30 cm de profundidad reduce la salinidad, produce choque osmótico y la muerte del cultivo. Mientras que la evaporación aumenta los requerimientos de agua para el sistema de crecimiento de algas. Esta situación es menos crítica en los fotobiorreactores.

## **2.9 Productividad**

Los cultivos microalgales dependen de la luz y tienen una eficiencia fotosintética de 5% (ver sección 2.10) que es la energía de luz que es convertida en energía química

en forma de carbohidratos o biomasa, lo que permite en un día claro de verano ( $> 24 \text{ MJ m}^{-2}$ ), un almacenamiento de  $1200 \text{ kJ m}^{-2}$  en la biomasa de algas y, con un contenido de energía de  $20\text{-}23 \text{ kJ g}^{-1}$  de biomasa seca y un rendimiento de  $50\text{-}60 \text{ g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ . Como ya se ha mencionado, la magnitud de la irradiación solar depende de la localización geográfica y de las condiciones climatológicas de esta ubicación. Hay muchas zonas de la Tierra, que reciben un promedio anual de más de  $22 \text{ MJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  ( $\sim 80\,000 \text{ GJ}$  por hectárea por año) y por lo tanto tienen un potencial de productividad anual de 200 toneladas por hectárea (**Figura 13**) (Tredici, 2010). Como se puede observar México se encuentra en esa zona privilegiada.



**Figura 13.** Mapa mundial de la productividad de la biomasa de algas ( $\text{ton ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) con una eficiencia fotosintética de 5%, considerando un contenido energético de  $20 \text{ MJ kg}^{-1}$  de biomasa seca.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el cultivo de las microalgas a la intemperie se ve afectado por diversos factores siendo los más importantes, la intensidad de luz y la temperatura. Por lo que el crecimiento de las microalgas en los fotobiorreactores es un proceso complejo en donde se conjugan la dinámica de fluidos, la actividad fotosintética, y la distribución de la luz en el reactor (Luo y Al-Dahhan, 2004).

En este contexto se debe evaluar la productividad de la microalga simulando las condiciones externas para saber si es viable cultivarla. Existen diversas formas de estudiar la productividad de la microalga; las dos principales técnicas usadas son: a) midiendo la velocidad de crecimiento (Janssen *et al.*, 2001; Wu y Merchuk, 2001) y b)

medir la tasa de fotosíntesis (Nedbal *et al.*, 1996; Terry, 1986). La tasa de crecimiento combina el efecto de la fotosíntesis, la dinámica de fluidos en el reactor y la distribución de la irradiación de luz, todo esto dentro del reactor. La tasa de fotosíntesis generalmente es medida en sistemas controlados y depende únicamente de las condiciones de régimen de luz, temperatura y la respuesta es únicamente del estado del sistema fotosintético de la microalga (Bridley *et al.*, 2010). Las mediciones de la tasa de crecimiento tienen la ventaja de que estrechamente asemeja las condiciones de funcionamiento utilizadas en fotobiorreactores, pero los experimentos son largos y no permiten estudiar por separado los factores que afectan a las tasas de crecimiento además de la falta de precisión para simular regímenes de luz reales. Por otro lado, las mediciones de la tasa fotosintética son generalmente mucho más rápidas y esto permite que la planeación y realización de un gran conjunto experimental que provea de una mayor precisión y que puede realizarse en condiciones no estériles. La tasa de fotosíntesis es directamente proporcional a la productividad de la biomasa, y la estequiometría de las reacciones fotosintéticas establecen esta proporcionalidad. La actividad fotosintética en los sistemas acuáticos puede estimarse midiendo la evolución de O<sub>2</sub>, la cinética de PSII-fluorescencia, o por una asimilación del <sup>14</sup>C (Hancke *et al.*, 2008; Zevenboom *et al.*, 1983), aunque los métodos de la evolución de oxígeno se consideran los más precisos (Colijn *et al.*, 1983; Hancke *et al.*, 2008). Sin embargo, los métodos de la evolución del oxígeno descritos en la literatura son muy diversos (Dubinsky *et al.*, 1987; Janssen *et al.*, 2001; Nedbal *et al.*, 1996; Terry, 1986) y los datos que se obtienen en diferentes trabajos presentan discrepancias importantes, muy a menudo son insuficientes las descripciones inequívocas de la metodología y los cálculos. Algunos aspectos importantes a considerar en el desarrollo de métodos medición del oxígeno son: la atenuación de la luz dentro de la incubadora, la duración de los experimentos, el agotamiento de los nutrientes durante las mediciones; las fluctuaciones en la producción de todos los días, y la precisión de las mediciones.

Otro tema fundamental para conocer la actividad fotosintética dentro de un fotobiorreactor es la descripción del régimen de luz dentro del cultivo. Industrialmente fotobiorreactores viables deben funcionar a altas densidades de celulares, el movimiento del fluido entre las zonas iluminadas exteriores y las zonas oscuras

interiores provocan fluctuaciones de la luz que llega a la célula y que se pueden expresar en varias combinaciones, de acuerdo a Richmond (2000), una de las razones para el limitado progreso en la comprensión de la fisiología de la producción de cultivos al aire libre es la complejidad de los fenómenos que ocurren en los sistemas de cultivo. De hecho, la luz recibida por las células en cultivos densos se atenúa gradualmente y se asemeja a las fluctuaciones oscilatorias que pueden ser más o menos pronunciadas. En el cultivo de microalgas a gran escala, la actividad fotosintética se ve influenciada por diversos factores como son: la dinámica de fluidos, la distribución de la irradiación de luz, temperatura, disponibilidad de nutrientes y fuente de carbono. Por lo que es difícil desligar los fenómenos biológicos debido a todos los factores presentes y se buscan alternativas para tener una caracterización únicamente de la respuesta biológica. Brindley *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo experimental para determinar las tasas de generación de oxígeno y obtener la velocidad de fotosíntesis en regímenes definidos de intensidad de luz en el que consideran dentro de su metodología los factores que pueden afectar la generación de oxígeno como son la limitación de nutrientes y la precisión al momento de medir el oxígeno generado. La metodología está basada en los ciclos circadianos que se presentan en el lugar donde se llevará el cultivo a la intemperie para establecer las variables experimentales como son la intensidad de luz y el tiempo de exposición. Al utilizar la microalga *Phaedolactinum tricornitum* lograron construir una curva de fotosíntesis vs Intensidad de luz obteniendo los parámetros de saturación de luz ( $\alpha$ ) =  $210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la tasa máxima de fotosíntesis ( $P_{\text{max}}$ ) =  $190 \text{fmol O}_2 \text{ célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La obtención de estos parámetros es importante porque se pueden utilizar integrándolos a modelos matemáticos y como parámetros para el diseño y control de fotobiorreactores.

- La productividad de la biomasa, que es función de la velocidad de crecimiento y de la concentración de la biomasa, bajo ciertas condiciones de regímenes de flujo, época del año, localización geográfica.
- Una concentración alta de biomasa provoca un sombreado entre células y afecta la penetración de luz en el fotobiorreactor.

- Sin embargo, los sistemas a la intemperie de cultivo de microalgas están sometidos a fluctuaciones diarias y estacionales de la intensidad de luz y de la temperatura (Chisti, 2007).
- Estos cambios se realizan a tres diferentes escalas: la primera es el ciclo circadiano, el cual incluye la variación de la luz y la temperatura durante las 24 horas del día; la segunda es el ciclo estacional que cambia de acuerdo a las condiciones climáticas y a la localización geográfica del lugar donde se cultiven las microalgas; y la tercera que es a través del nivel de mezclado en el sistema de cultivo, que controla los ciclos de luz-oscuridad que pueden variar en fracciones de segundo en comparación con las escalas anteriores que son horas o meses (Richmond, 2004):
- En condiciones ambiente la microalga necesita llevar a cabo un proceso de aclimatación, que es un balance entre las reacciones fotosintéticas de luz y oscuridad. (Molina *et al.*, 2000). Este balance está destinado a equilibrar eficazmente la absorción de la energía de excitación, la producción de NADH<sub>2</sub> y ATP para su crecimiento y mantenimiento (Richmond, 2004).

## 2.10 Eficiencia fotosintética

Las algas convierten la energía solar en biomasa por fotosíntesis oxigénica con una eficiencia entre 4-6% (Richmond, 2004). No toda la energía del sol es adecuada para la fotosíntesis. Las algas absorben la luz del sol en el rango de 400 - 700 nm para la fotosíntesis, lo cual representa aproximadamente el 47% de la energía total del sol. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) varía con la latitud, estación del año y geografía. Las dos limitaciones para convertir la luz solar en energía recaen en el mecanismo de la fotosíntesis y la PAR.

Los organismos fotosintéticos usan 8 fotones para capturar o fijar una molécula de CO<sub>2</sub> como carbohidratos (CH<sub>2</sub>O), el valor calorífico de un mol de CH<sub>2</sub>O es de 468 kJ, la energía media de un mol de fotones en el PAR es de 217 kJ y la eficiencia de conversión teórica máxima a carbohidratos es 468 kJ entonces al multiplicar 8 por 217.4 kJ tenemos que el valor es de 27% (Falkowsky y Raven, 2007).

La energía en forma de biomasa se puede obtener vía la fotosíntesis que depende del nivel del PAR, de la eficiencia fotosintética y otras pérdidas como se muestran a continuación.

$$PE_{\text{microalga}} = \text{PAR} \times \eta_{\text{fotosíntesis}} \times \eta_{\text{transmisión}}$$

Como se mencionó anteriormente, la utilización máxima es de sólo 27% del PAR absorbido por el sistema fotosintético. Un 10% adicional puede perderse por la transmisión de fotones. Sobre la base de estas limitaciones, la máxima eficiencia solar teórica es de aproximadamente 11.42%. Sin embargo, la eficiencia fotosintética observada en estudios en campo disminuye por factores tales como una pobre absorción, transmisión, reflexión, respiración o fotoinhibición. De esta manera, debe evaluarse para cada caso esta eficiencia fotosintética (Sudhakar y Premalatha, 2012)

Para cultivos de algas, la Eficiencia Fotosintética (PE) puede calcularse como la relación entre la energía química almacenada en la biomasa (es decir, el calor de combustión de la biomasa producida por unidad de superficie por unidad de tiempo) y la intensidad de luz (en términos de energía) en la superficie de cultivo (Bechet *et al.*, 2013).

$$PE = 100 \times \frac{P_{\text{alga}} AHVE_N}{\Sigma(Q_D + Q_d + Q_r)}$$

donde  $P_{\text{alga}}$  ( $\text{g}_{\text{DW}}/\text{m}^2$  área iluminada) es la productividad promedio del alga por unidad de área iluminada por el periodo de tiempo considerado,  $A$  ( $\text{m}^2$ ) es el área superficial iluminada,  $HV$  es el valor calorífico de la biomasa ( $\text{J}/\text{g}_{\text{DW}}$ ),  $E_N(-)$  es un coeficiente usado para considerar la cantidad de energía solar necesaria por la célula para asimilar el nitrato a material celular (Williams y Laurens, 2010), y es la irradiación diaria total solar ( $\text{J}/\text{d}$ ) que capta el alga sobre el período de tiempo considerado .

Un calor de combustión de 20 a 23  $\text{kJ g}^{-1}$  (peso seco) es típico de las algas que crecen bajo condiciones de suficiencia de nutrientes y con un contenido medio de lípidos de aproximadamente un 20% (Tredici y Zittelli, 1998; Goldman, 1979).

Existen algunos estudios que intentan representar la energía del sistema en forma de calor por medio de modelos mecánicos (Bechet *et al.*, 2010). En ellos se describen la temperatura en el medio como una función de parámetros estáticos (localización y geometría del reactor) y dinámicos (irradiación de luz, temperatura del aire, velocidad del viento). Se basan en un balance de calor en la fase líquida, y se puede predecir la temperatura dentro del sistema. Este tipo de análisis estima la cantidad de calor que debe removerse del sistema para mantener una temperatura óptima, ya que el control de la temperatura se debe considerar cuando se desea evaluar la sustentabilidad de la producción a gran escala. Bechet *et al.* (2010), estudiaron un fotobiorreactor de 50 L operado en condiciones ambiente y el balance de energía planteado permitió la predicción temperaturas que en algunos casos llegaron a ser superiores a los 40°C en el sistema durante el verano, estimando que una cantidad de 18,000 GJ año<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup> de energía en forma de calor debe removerse del sistema para mantener la temperatura del medio de cultivo entre 25 y 35 °C.

## **2.11 Lípidos para la producción de biodiesel**

El biodiesel consiste en monoalquilésteres obtenidos a partir de la reacción de alcoholes de cadena corta, usualmente etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de biomasa renovable, en este caso de los lípidos de las microalgas. La composición de estos lípidos en las microalgas varía pero los principales componentes de la fracción lipídica son triacilglicéridos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, fosfolípidos, glucolípidos y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas). Sin embargo, no todos los lípidos provenientes de las microalgas son útiles para la producción de biodiesel (Cohen, 1986). Recientemente, se ha planteado que el biodiesel producido a partir de aceites de microalgas es capaz de sustituir al diesel derivado de petróleo como combustible (Garibay *et al.*, 2009).

Estimaciones sobre la potencialidad de las microalgas sugieren que sería posible producir entre 20,000 a 80,000 litros de lípidos por hectárea por año (Chisti 2007); sin embargo, de acuerdo al estado actual de la tecnología, la productividad no es mayor de 20,000 litros por hectárea por año. Y solo cuando se alcance un nivel de desarrollo

mayor, se podrá llegar a 80,000 litros por hectárea por año. Aún así, estos volúmenes son considerablemente superiores a la producción de aceite a partir de plantas oleaginosas como: palma y colza que producen entre 6,000 y 1,500 litros por hectárea por año, respectivamente (Wijffels *et al.*, 2010).

La producción de biodiesel a partir de los aceites de microalgas con lleva cuatro pasos básicos que son: 1) Cultivo de la biomasa, 2) Separación de la biomasa del medio de cultivo, 3) Extracción de lípidos, 4) Transesterificación de los lípidos.

Las características que se requieren de una cepa para tal fin es que tenga una alta productividad lipídica, que sea resistente a las condiciones ambiente y que sea predominante en el medio de cultivo, para reducir los costos de producción y los riesgos de contaminación. Existe un gran número de especies que han sido estudiadas para la producción de biodiesel en la **Tabla 4** se muestran algunas.

**Tabla 4.** Productividad de la biomasa, contenido y la productividad de lípidos de diferentes cepas de microalgas. (Adaptado de Rodolfi *et al.*, 2009 y Mata *et al.*, 2010)

Microalga	Productividad de biomasa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Lípidos %	Productividad lipídica (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	-	24.0–31.0	-
<i>Botryococcus braunii</i>	20	25.0–75.0	-
<i>Chaetoceros muelleri</i>	70	33.6	21.8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	40	14.6–39.8	17
<i>Chlorella emersonii</i>	36-41	25-63	10.3-50
<i>Chlorella protothecoides</i>	2,000-7,700	14.6–57.8	1214
<i>Chlorella sorokiniana</i>	230–1470	19-22	44.7
<i>Chlorella vulgaris</i>	20-200	5–58	11.2–40
<i>Chlorella</i> sp.	20-250	10-48	42.1
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	290-3640	2	-
<i>Chlorella</i>	-	18-57	18.7
<i>Chlorococcum</i> sp.	280	19.3	53.7
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	10,000	20.0–51.1	-
<i>Dunaliella salina</i>	220-340	6-25	116
<i>Dunaliella primolecta</i>	90	23	-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	120	16.7–71.0	-
<i>Dunaliella</i> sp.	-	17.5–67.0	33.5
<i>Ellipsoidion</i> sp.	170	27.4	47.3
<i>Euglena gracilis</i>	7,700	14-20	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	50-60	25	-
<i>Isochrysis galbana</i>	320-1600	7-40	-
<i>Isochrysis</i> sp	80-170	7-33	37.8
<i>Monodus subterraneus</i>	190	16	30.4

<i>Monallanthus salina</i>	80-170	20-22	-
<i>Nannochloris sp</i>	170-510	20-56	60.9-76.5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	370-480	22.7-29.7	84-142
<i>Nannochloropsis sp.</i>	210	29.6	61
<i>Neochloris oleoabundans</i>	-	29-65	90-134
<i>Nitzschia sp.</i>	-	16-47	-
<i>Oocystis pusilla</i>	-	10.5	-
<i>Pavlova salina</i>	160	30.9	49.4
<i>Pavlova lutheri</i>	140	35.5	40.2
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	240	18.7	44.8
<i>Porphyridium cruentum</i>	370	9.5	34.8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4-740	11-55	-
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	190	1.9-18.4	35.1
<i>Scenedesmus sp.</i>	30-260	19.6-21.1	40.8-53.9
<i>Skeletonema sp.</i>	90	13.3-31.8	27.3
<i>Skeletonema costatum</i>	80	13.5-51.3	17.4
<i>Spirulina platensis</i>	60-4300	4.0-16.6	-
<i>Spirulina maxima</i>	210-250	4-9	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	80	20.6	17.4
<i>Tetraselmis suecica</i>	120-320	8.5-23	27-36.4
<i>Tetraselmis sp</i>	300	12.6-14.7	43.4

Se han estudiado diversas estrategias para aumentar la productividad lipídica, seleccionando las mejores especies, en términos de contenido de lípidos, adaptando cepas a condiciones ambientales extremas y estableciendo estrategias de cultivo adecuadas que permitan lograr la máxima productividad de lípidos y de biomasa. Algunas de ellas son: a) la aplicación de diferentes niveles de salinidad, que también se ve reflejado en diferentes composiciones de lípidos intracelulares, b) la limitación de nitrógeno durante el crecimiento (Khozin-Goldberg, 2002; Spolaore *et al.*, 2006; Solovchenko *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008), esta estrategia presenta una desventaja ya que al aumentar la productividad lipídica limita el aumento de la biomasa, c) La limitación de fósforo, que causa cambios en perfil de ácidos grasos y contenido total de lípidos (Khozin-Goldberg y Cohen, 2006), y d) la aplicación de ciclos de luz/oscuridad, que también favorece el metabolismo heterotrófico de ciertas microalgas.

## 2.12 Antecedentes directos

Dentro del grupo de la UAM-C se trabajó con un consorcio de microalgas obtenidas de Cuatro Ciénegas, del cual se aisló e identificó una microalga como *Scenedesmus obtusiusculus*. Esta microalga se caracterizó en cuanto a la fijación de CO<sub>2</sub> utilizando columnas de burbujeo presentando una tasa de fijación de CO<sub>2</sub> de 0.95 Kg CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Toledo-Cervantes, 2010). Otra característica interesante es que *Scenedesmus obtusiusculus* no se inhibe por concentraciones relativamente altas de CO<sub>2</sub> (10%). Los parámetros cinéticos de *Scenedesmus obtusiusculus* son superiores a una de las principales microalgas reportadas como almacenadoras de aceites que es *Neochloris oleoabundans* (Chisti, 2007) y tiene una tasa de fijación que se encuentra dentro de lo aceptable según Wang *et al.* (2008). Además se obtuvo una productividad de 0.5 Kg<sub>biomasa</sub> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, y se alcanzaron valores de biomasa de alrededor de 6 Kg m<sup>-3</sup> (Toledo-Cervantes, 2010).

En otro estudio se probó la capacidad de acumulación de lípidos bajo diferentes condiciones de cultivo y bajo diferentes concentraciones de la fuente de nitrógeno y se realizó una caracterización del perfil de ácidos grasos. En ese caso, *S. obtusiusculus* pudo acumular el 55.7% de lípidos no polares con respecto a su peso seco, cuando fue cultivada con una alimentación de 5% de CO<sub>2</sub> y una intensidad de luminosa de 54.7 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, bajo condiciones de limitación de nitrógeno. También se obtuvo un perfil de ácidos grasos que incluye C16:0, C18:0, C18:1n9t, C18:1n9c, C18:3n6, con una productividad de 200 g lípidos m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Por lo que esta microalga tiene potencial para la producción de lípidos (Toledo-Cervantes *et al.*, 2013).

### 3. JUSTIFICACION

En la actualidad la humanidad demanda fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables, amigables con el medio ambiente. Las microalgas constituyen una alternativa para la producción de diferentes tipos de biocombustibles o de algunos productos de interés biotecnológico.

Dentro de los sistemas de cultivo, un reto es operar exitosamente los reactores bajo condiciones a la intemperie, donde las variables físicas como la energía solar disponible y la temperatura ambiental usualmente no se controlan. Por lo tanto, estudiar la respuesta de la microalgas a temperaturas extremas (bajas y altas) ayudará a comprender la respuesta fisiológica y su tolerancia en respuesta a cambios drásticos de temperatura. Esto es valioso para el escalamiento, la producción masiva en una aplicación real y uso óptimo de las fuentes de energía.

Se han realizado estudios para la producción de biomasa microalgal en condiciones ambiente, en los que se demuestra que la intensidad de luz, la temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> son factores que afectan la productividad ya que están relacionados con la fotosíntesis y por lo tanto pueden inhibir el crecimiento. Aún así el conocimiento sobre el cultivo a la intemperie es escaso.

El estudio de la producción de biomasa microalgas en fotobiorreactores tipo “*air lift*” solares por una *Scenedesmus obtusiusculus* obtenidas de un ecosistema natural mexicano, representa una nueva alternativa para la generación de conocimientos y la evaluación de la producción de biomasa en condiciones ambientales así como del efecto de éstas sobre su composición bioquímica. Los resultados obtenidos proporcionarán información relativa a la fisiología de la microalga bajo distintas condiciones de cultivo (estaciones del año), cuyo conocimiento mejorará los parámetros en la producción de cultivos microalgales.

En este trabajo se evaluaron dos factores, el uso de luz natural y las variaciones de temperatura ya que cobran especial relevancia en sistemas que operan a la intemperie, debido a que afectan la productividad de la biomasa en fotobiorreactores. Los resultados pueden ser utilizados en el diseño y optimización de los fotobiorreactores para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus*.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERAL

Estudiar el efecto de las variaciones climáticas en un fotobiorreactor “air-lift” operado a la intemperie sobre la productividad de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la actividad fotosintética de la microalga ante diferentes temperaturas e intensidades luminosas
- Cuantificar la productividad del biomasa del sistema operado a la intemperie (en diferentes estaciones del año)
- Cuantificar las variaciones en los ciclos diarios de temperatura e intensidad luminosa y en las diferentes estaciones del año
- Obtener los perfiles bioquímicos de la microalga expuesta a la intemperie.
- Caracterizar la acumulación lipídica bajo limitación de la fuente de N
- Determinar la eficiencia fotosintética del sistema.

## 5. HIPOTESIS

El cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* se puede realizar en condiciones a la intemperie y obtener altas productividades de biomasa además será capaz de acumular lípidos bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Microorganismo

En el presente estudio se utilizó la cepa de *Scenedesmus obtusiusculus*, que se aisló en la UAM-Cuajimalpa (Toledo-Cervantes, 2010) y que fue cosechada de la laguna de Churinche (26°50'25" N; 102°08'02" O) localizada a 19.5 Km al sur-oeste de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Souza *et al.*, 2004). Cuatro Ciénegas es un valle localizado en el centro del desierto de Chihuahua que constituye un oasis, ya que conforma una serie de pozas y ríos, en las que una característica importante es la presencia de diferentes comunidades microbianas incluyendo estromatolitos vivos que forman parte de la cadena trófica que sostiene a diversos invertebrados (Falcón *et al.*, 2007).

### 6.2 Propagación y medio de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* fue el BG-11, estéril y a pH 7.5. Las concentraciones de los compuestos requeridas para la preparación del medio se indican en la **Tabla 5**.

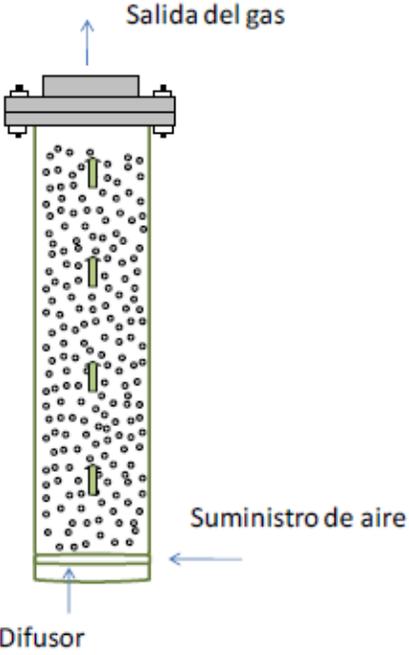
**Tabla 5.** Composición del medio de cultivo

Medio de cultivo BG-11			
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	1.5 g L <sup>-1</sup>	<b>Metales traza A5+Co</b>	
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.04 g L <sup>-1</sup>	<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	2.86 g
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.075 g L <sup>-1</sup>	<b>MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O</b>	1.81 g
<b>EDTA disódico de magnesio</b>	0.001 g L <sup>-1</sup>	<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.222 g
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.036 g L <sup>-1</sup>	<b>NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.39 g
<b>Acido cítrico</b>	0.006 g L <sup>-1</sup>	<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	0.079 g
<b>Citrato de amonio férrico</b>	0.006 g L <sup>-1</sup>	<b>Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	49.4 mg
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	0.02 g L <sup>-1</sup>	<b>Agua destilada</b>	1.0 L
<b>Metales traza A5+Co</b>	1 mL		

Los inóculos se propagaron en un fotobiorreactor de columna de burbujeo (FRCB) de vidrio, con un volumen de operación de 2.5 L, colocado dentro una cámara que cuenta con 16 lámparas de luz de día de 40 W, a una temperatura de incubación de 30°C, con iluminación constante de 8000 lx. Las condiciones de operación indicadas en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones de operación de FBRCB

Parámetros de operación de FBRCB	
Diámetro	0.105 m
Volumen de operación	0.0025 m <sup>3</sup>
Intensidad de luz	148 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
Altura	0.705 m
K <sub>La</sub>	0.0065 s <sup>-1</sup>
Velocidad superficial (U <sub>G</sub> )	0.00384 m s <sup>-1</sup>
Flujo	0.8 vvm
Área iluminada	0.232 m <sup>2</sup>
Temperatura	30°C
Flujo de CO <sub>2</sub>	0.04 vvm

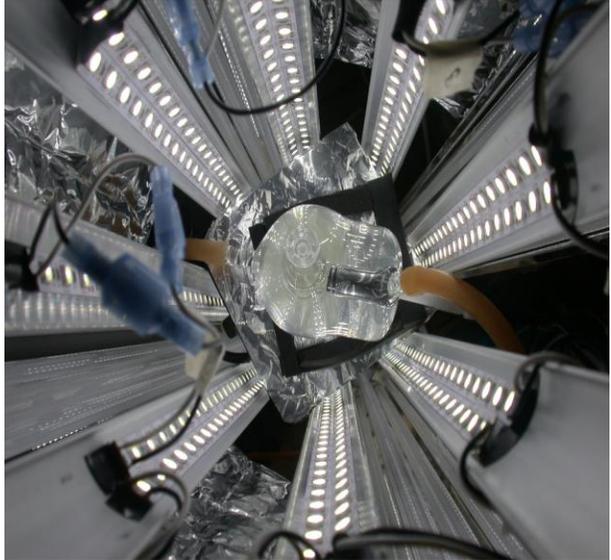


### 6.3 Determinación de la actividad fotosintética

La actividad fotosintética se determinó midiendo el oxígeno que se produjo durante la fotosíntesis, usando un pequeño reactor encaquetado de 2.75 mL. En la **Tabla 7** se muestran las principales características del sistema. El reactor se colocó en una cámara de luz equipada con lámparas led y lámparas fluorescentes donde la intensidad luminosa podría regularse con un dimer. El sistema contó con un baño de agua con recirculación (PolySiensce) para control de temperatura. La medición del oxígeno se realizó con un sensor polarográfico con un tiempo de respuesta de 60 segundos, cuya señal fue adquirida mediante una tarjeta de adquisición de datos

“Data DAQ mx” conectada a un software “Labview”, donde se almacenaron los registros cada segundo durante los 20 minutos que duraron los ensayos.

**Tabla 7.** Condiciones de operación del reactor enchaquetado para la medición de oxígeno.

<b>Parámetros de operación.</b>	
<p><b>Volumen del reactor:</b> 2.75 mL</p> <p><b>Control de temperatura:</b> 5-40 °C</p> <p><b>pH:</b> 7.5 ± 0.5</p> <p><b>Intensidad de luz:</b> 8 a 2500 <math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math></p> <p><b>Operación:</b> lote</p>	

Los experimentos de la actividad fotosintética se realizaron en condiciones controladas de luz y temperatura, se realizaron en total 70 experimentos (**Tabla 8**), probando diferentes temperatura siendo éstas 5, 10, 20, 30, 35, 38 y 40 °C y diferentes intensidades de luz (8, 40, 80, 169, 347, 614, 793, 971, 1737 y 2361  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

**Tabla 8.** Diseño experimental para la actividad fotosintética.

Int lum ( $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Temperatura (°C)	5	10	20	30	35	38	40
8		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
40		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
80		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
169		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
347		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
614		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
793		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
971		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1737		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2361		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

La biomasa que se utilizó en este experimento se obtuvo del reactor descrito en la sección 6.2 que fue operado en lote alimentado para garantizar que *Scenedesmus obtusiusculus* se mantuviera en fase exponencia de crecimiento. La concentración inicial de biomasa en todos los experimentos fue de  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  con un pH de 7.5 (pH del medio BG-11 2x). El pH de midio al inicio y al final de cada experimento para comprobar que no hubiera cambios.

#### 6.4 Sistema de cultivo a la intemperie

El fotobiorreactor “air-lift” solar (FBR) operado se basó en el diseño de Molina *et al.*, (2001), en la **Tabla 9** se muestran las condiciones de operación del FBR. Éste se alimentó con aire proveniente de un compresor y con una corriente de  $\text{CO}_2$  puro.

El cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* fue evaluado en tres formas de operación del reactor: a) lote, b) lote alimentado y c) en continuo. Además de esto el reactor se operó en condiciones de limitación de la fuente de N en un régimen en lote.

Para la operación en lotes el reactor fue inoculado con una cantidad microalga suficiente para tener una concentración inicial de  $0.1 \text{ g L}^{-1}$ , el tiempo de operación del FBR fue de 18 días por cada experimento durante las cuatro épocas del año.

La operación en lote alimentado se llevó a cabo inicialmente de la misma forma que la operación en lotes pero al estar la microalga en fase exponencial se retiraban  $8 \text{ L d}^{-1}$  y se monitoreaba la biomasa y el consumo de nitratos durante cinco días por cada estación.

La operación en continuo se llevó a cabo cuando la concentración de biomasa alcanzaba los  $2 \text{ g L}^{-1}$  esto debido a los problemas que se presentan cuando se tiene una mayor concentración de biomasa como son la limitación por la luz y por nutrientes. Se alimentó un flujo de  $15 \text{ ml min}^{-1}$  durante las horas de luz (10 horas) durante 5 días por cada estación.

El estudio de la limitación de la fuente de N se relizó en dos épocas del año que fueron otoño e invierno la condiciones iniciales del cultivo se basaron en los

experimentos reportados por Toledo-Cervantes *et al.* (2013) los cuales utilizan un medio BG-11 2x sin NaNO<sub>3</sub>. Además en estos experimentos la cantidad de CO<sub>2</sub> alimentada fue del 2% con un periodo de operación del reactor hasta por 16 días.

El FBR se ubicó en la azotea del edificio W dentro de la UAM-Iztapalapa localizada en 19°21'41 "N99 ° 04'22" y se operó durante las cuatro estaciones del año, además de que se le colocaron sensores de temperatura en el medio de cultivo, en el ambiente, humedad relativa y sensores para captar la intensidad de luz que llegaba al sistema.

**Tabla 9.** Condiciones de operación y diseño del fotobiorreactor airlift de lazo extendido.

Condiciones de operación de FBR	
Diámetro	0.045 m
Volumen de operación	0.035 m <sup>3</sup>
Intensidad de luz	Ciclo circadiano
Altura	2.2 m
Longitud	19.9 m
Flujo	5 Lmin <sup>-1</sup>
Área iluminada	2.89 m <sup>2</sup>
Temperatura	Ambiente
Flujo de CO <sub>2</sub>	1 %

En la **Figura 14** se muestra la configuración del reactor y en el sistema se hizo el seguimiento de las siguientes variables:

#### 6.4.1 Monitoreo del pH

El monitoreo del pH se realizó por medio de un potenciómetro "CONDUCTRONIC PC45", que se calibra con solución buffer estándar de pH 4 y 7.

#### **6.4.2 Monitoreo de humedad relativa, temperatura en el ambiente y temperatura en el medio**

La adquisición de datos se llevó a cabo utilizando un data logger “EXTECH RH10” para la humedad relativa y la temperatura en el ambiente. En el monitoreo de la temperatura del medio se usó un data logger “Measurement computing USB-501-TC-LCD”. Ambos sensores se programaron para adquirir datos cada 5 minutos.

#### **6.4.3 Monitoreo de la irradiación solar.**

El monitoreo de la irradiación solar o escala cuántica de radiación se hizo por medio de un data logger “Dataloggin light meter SPER SCIENTIFIC 850008” el cual cuantifica la irradiación de luz PAR y se programó para adquirir datos cada 5 minutos.

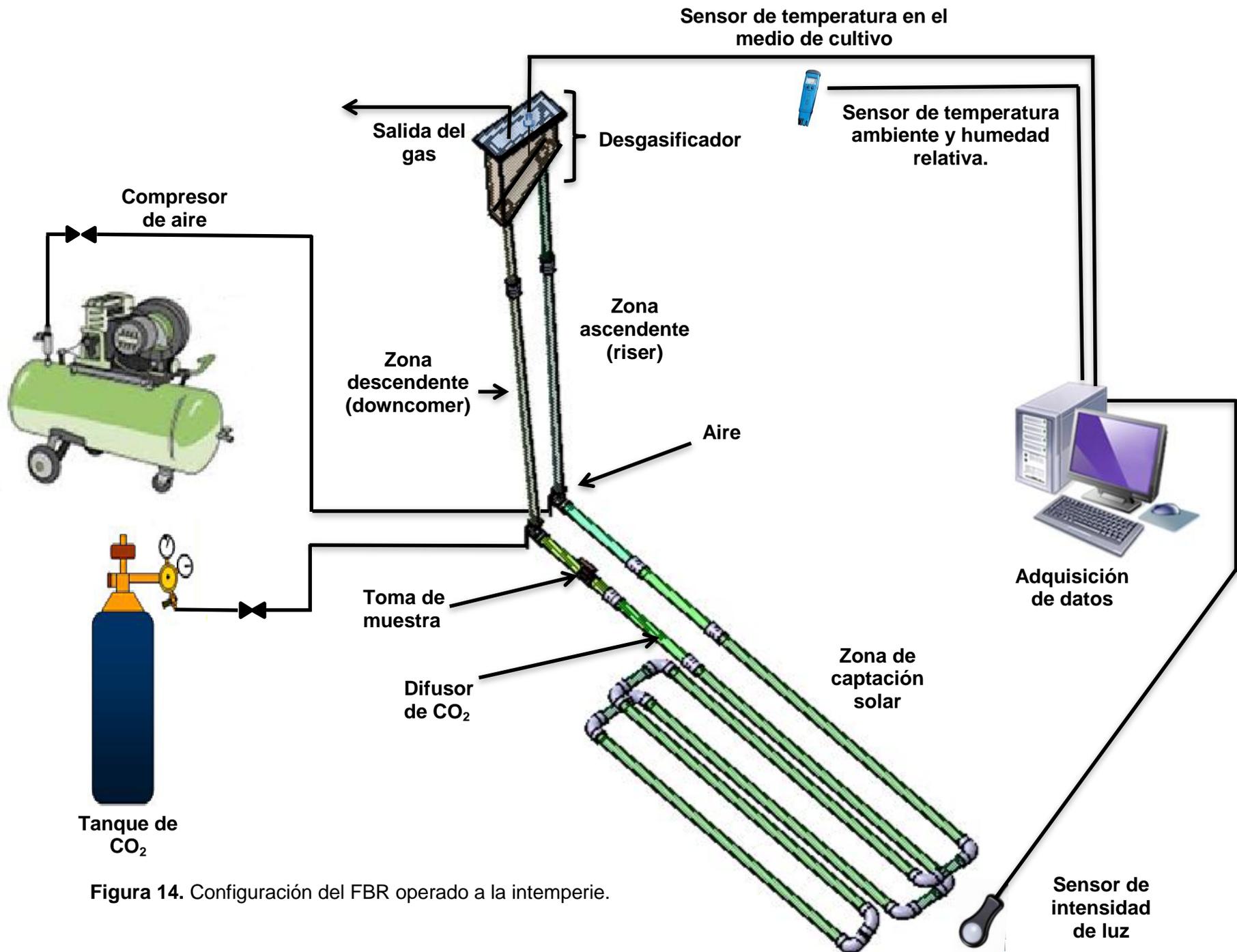


Figura 14. Configuración del FBR operado a la intemperie.

## **6.5 Métodos analíticos**

### **6.5.1 Determinación de biomasa por peso seco**

La biomasa de *Scenedesmus obtusiusculus* se cuantificó por un método gravimétrico (Solovchenko *et al.*, 2008). Para ello se filtraron 10 mL de medio de cultivo, a través de una membrana Millipore 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, previamente llevada a peso constante. La membrana junto con la muestra se secó por un periodo de 24 horas en una estufa con una temperatura de 60 ° C, posteriormente se colocó en un desecador durante 1 hora y se pesó nuevamente. El peso seco de la muestra se determinó por diferencia de peso. El filtrado se guardó para el análisis posterior de nitratos.

### **6.5.2 Determinación de nitratos**

El filtrado reservado para la cuantificación de biomasa fue utilizado para la cuantificación de nitratos. Se filtraron 5 mL a través de una membrana de acetato-celulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se tomarón 2 mL de la muestra posteriormente se adiciono 1 mL de HCl 1N y se agitó con el fin de remover los carbonatos. La muestra se midió por espectrofotometría UV a 220 nm con una celda de cuarzo. Las concentraciones fueron calculadas a través de una curva estándar (ANEXO 1)

### **6.5.3 Determinación del contenido de proteínas**

La cantidad de proteínas totales se determinó por medio de método espectrofotométrico para lo que se utilizó 1 ml del medio de cultivo al cual se le adicionaron 5 mL de NaOH 0.5 M y se colocó en un baño ultrasónico durante 20 minutos. Posteriormente se sometió a un proceso de hidrólisis alcalina a 100°C durante 20 minutos. Las muestras hidrolizadas fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 20 minutos. La cuantificación del contenido proteico en las muestras

hidrolizadas, se realizó con el método de Lowry *et al.*, 1951. Se determinó la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750nm. Las concentraciones fueron calculadas por medio de una curva estándar de albumina bovina (Bio-Rad) (ver Anexo 2).

#### **6.5.4 Determinación del contenido de carbohidratos**

La determinación de carbohidratos se hizo sobre 1 mL de medio de cultivo a la cual se le agregaron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se puso en un baño ultrasónico durante 20 minutos, posteriormente se colocó en un baño a 100°C durante 1 hora, donde se llevó a cabo una hidrólisis ácida. Al terminar esto se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos. La determinación del contenido de carbohidratos, a partir de estos hidrolizados, se realizó por el método de Fenol-Ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 485 nm. Las concentraciones se calcularon mediante una curva estándar hecha con glucosa. (Anexo 3)

#### **6.5.5 Determinación del contenido de clorofilas**

La determinación del contenido de clorofila se realizó utilizando 1 mL de medio de cultivo al cual se le agregaron 5 mL de metanol al 90%, la mezcla se colocó en un baño ultrasónico durante 20 minutos donde se llevó a cabo el rompimiento celular. Después se colocó en un baño a 60°C durante 20 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se leyó a 650, 665 y 750 nm. El contenido de clorofilas en las células se cuantificó usando la ecuación: Clorofila ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) =  $16.5(A_{665}) - 8.3(A_{650})$  (Becker, 1994). Las lecturas a 650 y 665 nm se corrigieron por la turbidez por medio de la lectura a una longitud de onda a 750nm.

### **6.5.6 Cuantificación de lípidos**

Los lípidos se cuantificaron a través de fluorimetría utilizando tinciones con Rojo de Nilo (Chen *et al.*, 2011). A 20  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de Dimetil sulfóxido (DMSO). La solución se mezcló durante 1 minuto y se calentó en el microondas durante otro minuto. Después se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de una solución en acetona de Rojo de Nilo ( $250\text{mg L}^{-1}$ ) y se aforó a 1 mL con agua destilada y se repitió el paso anterior. Se dejó reposar en la oscuridad por 10 minutos y se aforó a 2 ml con agua destilada. La cuantificación se realizó en un Fluorómetro (Turner Desings Instrument, modelo 7200-000, Sunnyvale CA, USA) que tiene una banda de excitación a 485 nm y de emisión a 525 nm. Para la obtener la concentración de lípidos se utilizó una curva estándar que se obtuvo de extracciones por Soxhlet vs URF de la biomasa (Anexo 4).

### **6.5.7 Extracción y cuantificación de lípidos**

La cuantificación de lípidos totales se realizó por el método de Soxhlet utilizando hexano. La biomasa de 1L de medio de cultivo se recuperó por centrifugación y se secó en la estufa por 3 días a una temperatura de 50 °C. La biomasa seca se trituró y se extrajeron los lípidos neutros con hexano durante 8 hrs. Los lípidos extraídos se cuantificaron por diferencia de peso.

### **6.5.8 Identificación de los ácidos grasos**

Para determinar el perfil de ácidos grasos se realizó una derivatización analítica de los lípidos. La trasmetilación del extracto se realizó mediante una cosecha de las células contenidas en 3mL de biomasa con una concentración de  $1.5\text{ g L}^{-1}$  mediante centrifugación a 4000 rpm. Posteriormente se resuspendió en 2 mL de DCM:BTH (0.05%), después se le agregó 2.5 mL de una mezcla de MetOH:HCl (4:1, v/v) y se calentó a 110°C durante 6 h en un digestor. Posteriormente se le agregó 1 mL de H<sub>2</sub>O desionizada para separar las fases. con lo que se obtuvieron dos fases la fase orgánica donde estaban contenido los lípidos en DCM y la fase acuosa MetOH-agua.

La identificación del perfil de ácidos grasos, se determinó por cromatografía de gases en un equipo HP-Agilent 6890, bajo las siguientes condiciones: volumen de inyección: 2  $\mu\text{L}$ , gas acarreador: Helio 20  $\text{cm s}^{-1}$ , temperatura del inyector: 250°C, split 100:1, temperatura del detector: 250°C, rampa de temperatura: temperatura inicial del horno: 140°C durante 5 min, incrementos de 1.5°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 240°C, mantener esa temperatura por 10 min. Para La cuantificación de los FAME (Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos por sus siglas en inglés) presentes en la mezcla se utilizó un estándar constituido de una mezcla de 36 compuestos en el rango de C4-C24 “Supelco™ 37 Component FAME Mix Catalog No. 47885-U” (Anexo 5).

## 6.6 Determinación de los parámetros cinéticos de la biomasa

Los valores de biomasa medidos se usaron para construir curvas de crecimiento de biomasa *versus* tiempo, y para calcular la tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) con la siguiente ecuación:

$$\mu_{max} = \frac{\text{Ln}X_t - \text{Ln}X_0}{t - t_0}$$

La productividad de biomasa se determinó como productividad máxima ( $P_{max}$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{max} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0}$$

Donde  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) al tiempo  $t_0$  (d) y  $X_t$  es la concentración de biomasa en  $\text{g L}^{-1}$  en cualquier tiempo  $t$  (de Morais y Costa, 2007).

La tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  ( $P_{CO_2}$ ) se evaluó como la relación entre el contenido de carbono en las células y la productividad de biomasa de las microalgas, de acuerdo con la siguiente ecuación.

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

Donde  $M_{CO_2}$  es el peso molecular del  $CO_2$ ,  $M_C$  es el peso molecular del carbono y  $C_C$  es la cantidad de carbono en las células de *Scenedesmus obtusiusculus* (51.57% C) (Toledo-Cervantes *et al.*, 2013).

La velocidad de dilución (D) se calculó usando la ecuación:

$$D = \frac{f}{V}$$

Donde  $f$  es la velocidad del flujo ( $L\ d^{-1}$ ) y  $V$  (L) es el volumen del reactor.

### 6.7 Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad fotosintética.

Las constantes de saturación de luz ( $K_s$ ) y la constante de inhibición ( $K_i$ ) se obtuvieron a partir del ajuste de una curva de fotosíntesis (Aiba, 1982).

$$P_{O_2} = \frac{P_{O_2, \max} I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_i}}$$

Donde  $I$  es la intensidad de luz ( $\mu\text{mol}\ m^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a la que se realizan los experimentos,  $P_{O_2}$  representa la actividad fotosintética en función de la intensidad de luz,  $P_{O_2, \max}$  ( $g_{O_2}\ kg_b\ h^{-1}$ ) es la máxima concentración de oxígeno producido por la fotosíntesis durante los experimentos.

Para determinar los parámetros de la actividad fotosintética en función de la temperatura, se utilizó la ecuación de Arrhenius para calcular la energía de activación ( $E_a$ ) y la constante de Arrhenius ( $K_0$ ).

$$P_{O_2} = K_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

Donde  $R$  es la constante de los gases ideales igual a  $1.98\ \text{cal}\ \text{mol}^{-1}\ \text{K}^{-1}$  y  $T$  (K) es la temperatura a la que se realizaron los experimentos (Anexo 5).

## 6.8 Determinación de la eficiencia fotosintética

La determinación de la actividad fotosintética se basa en un modelo planteado por Béchet *et al.*, 2013, en donde la eficiencia fotosintética (PE) se calcula en base a la cantidad total de irradiación solar que llega al FBR como:

$$PE = 100 \times \frac{P_{alga} AHVE_N}{I_{FBR}}$$

Donde  $P_{alga}$  es el promedio de la productividad en un periodo de tiempo determinado,  $A$  es el área iluminada del reactor ( $m^2$ ),  $HV$  es el calor de combustión de la microalga ( $KJ g_b^{-1}$ ),  $E_N$  es un coeficiente que se usa para considerar la cantidad de energía solar que requiere la microalga para la asimilación de nitratos en el material celular (-) (Williams y Laurens, 2010),  $I_{FBR}$  es la irradiación solar que llega al sistema en un periodo determinado ( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ). Los valores de  $PE$  que se encuentran en la literatura están basados en intensidades de irradiación solar expresadas en  $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ , en este trabajo se considera que la PAR tiene una longitud de onda promedio de 550 nm.

El rango y la base de cálculo considerado para cada parámetro y el razonamiento para su selección se consideró como se describe a continuación:

El calor de combustión ( $HV$ ) en el caso de las microalgas se considera en un rango entre 19.7-24.2  $KJ g_b^{-1}$  (caso base 21.0  $KJ g_b^{-1}$ ), Williams y Laurens (2010) proponen un rango de  $HV$  23.5-28.5  $KJ g_b^{-1}$  de biomasa seca libre de cenizas (caso base 24.7  $KJ g_b^{-1}$ ) basado en un contenido lipídico de 15 -50 % (caso base 25%). Con esa información el contenido lipídico fue convertido a gramos de biomasa seca y se asumiendo un contenido de cenizas de 15%. Los valores de  $HV$  coinciden con valores reportados en la literatura para especies *Scenedesmus* sp. 24.36 y 25.8  $KJ g_b^{-1}$  (Matsunaga *et al.*, 2009).

El coeficiente de asimilación de nitratos ( $E_N$ ) se considera en un rango de 1.2-1.3 (caso base 1.25). La asimilación de nitratos requiere una demanda de energía

adicional de 20-30 % en comparación de la asimilación de amonio como fuente de nitrógeno (Williams y Laurens, 2010).

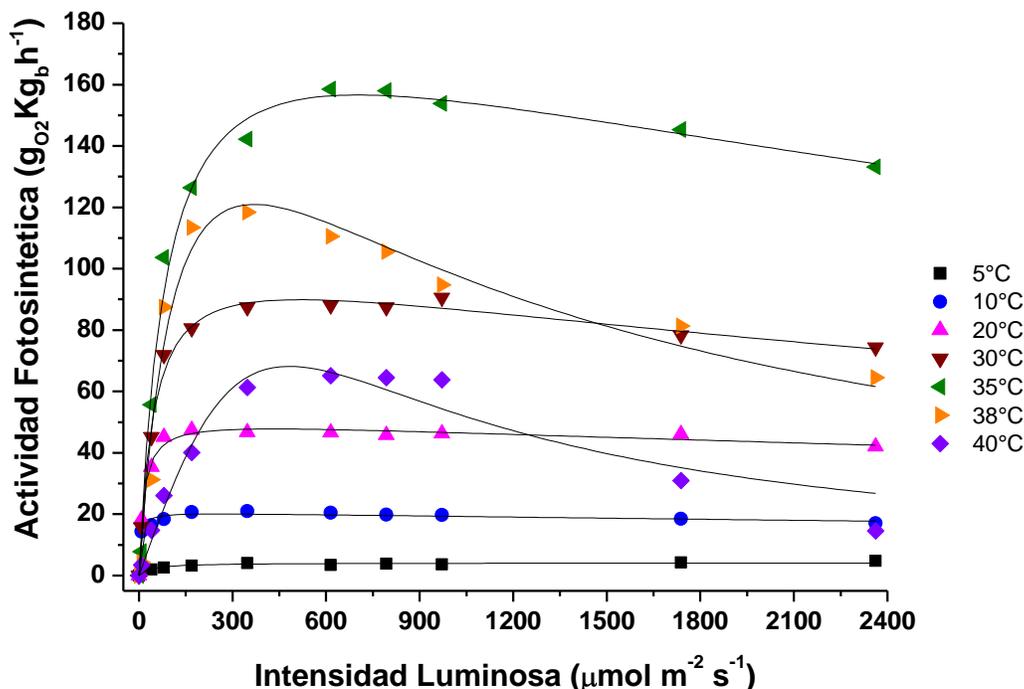
## 7. RESULTADOS y DISCUSION

A continuación se presentan los resultados de los experimentos realizados para determinar la actividad fotosintética de la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* con la finalidad de conocer los rangos en los cuales la microalga puede desarrollarse y establecer el potencial para su cultivo a la intemperie. Posteriormente se muestran los resultados de la operación a la intemperie del fotobiorreactor en las cuatro estaciones del año, invierno, primavera, verano, otoño; en cada una de ellas el fotobiorreactor se operó bajo diferentes regímenes de alimentación, como son: lote, lote alimentado y continuo. Finalmente se presentan los resultados del cultivo bajo limitación de la fuente de nitrógeno para lograr la acumulación aceites y caracterizar los metil ésteres derivados de ellos.

### 7.1 Actividad fotosintética

En esta sección se presentan los resultados de los experimentos de la actividad fotosintética. Los experimentos se corrieron en períodos cortos de tiempo para evitar la adaptación de la microalga a las condiciones experimentales, además se realizaron usando medio BG-11 2x para asegurar la suficiencia de nutrientes. De igual manera, para asegurar condiciones como un buen mezclado, todos los experimentos se sometieron a agitación magnética y para no tener atenuación de la luz debido al autosombreado de las células, se realizaron ensayos preliminares a diferentes concentraciones iniciales de biomasa que permitieron determinar que a una concentración de  $0.1 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ L}^{-1}$  la atenuación fue mínima. De esta manera, se garantizó que la intensidad de luz y la temperatura fueran los únicos factores que influyeran sobre la actividad fotosintética obteniéndose la respuesta intrínseca de *Scenedesmus obtusiusculus*. Los experimentos se realizaron como se describió en la **sección 6.3**.

Tomando en cuenta los experimentos en los que se modificó la intensidad de luz se observa una respuesta lineal de la actividad fotosintética en los rangos de 8-347  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en todas las temperaturas (**Figura 15**), pasando este intervalo la actividad se mantiene constante hasta una intensidad de 971  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , finalmente se observa una disminución en las altas intensidades de luz (1737 y 2361  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Figura 15.** Actividad fotosintética vs intensidad luminosa en diferentes temperaturas.

Con respecto a la influencia de la temperatura, el comportamiento que se observa en la **Figura 15**, es la disminución de la actividad fotosintética cuando sobrepasa la temperatura óptima (35 °C), esto ha sido reportado en otras cepas como *Astorionella formosa* (Butterwick *et al.*, 2005), *Scenedesmus almeriensis* (Sánchez *et al.*, 2008; Costache *et al.*, 2013) y *Phaedolactylum tricornutum* (Bitaubé *et al.*, 2008).

Los datos de los experimentos se utilizaron para construir una gráfica en función de la intensidad de luz y la temperatura, usando como respuesta la actividad fotosintética. En la **Figura 16** se observa una zona de operación en la cual la

actividad fotosintética es mayor (rojo) ésta es la zona en la cual las condiciones de cultivo son óptimas, en donde la temperatura debe ser de 30-35 °C y la intensidad de luz debe estar en un rango de 300 a 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

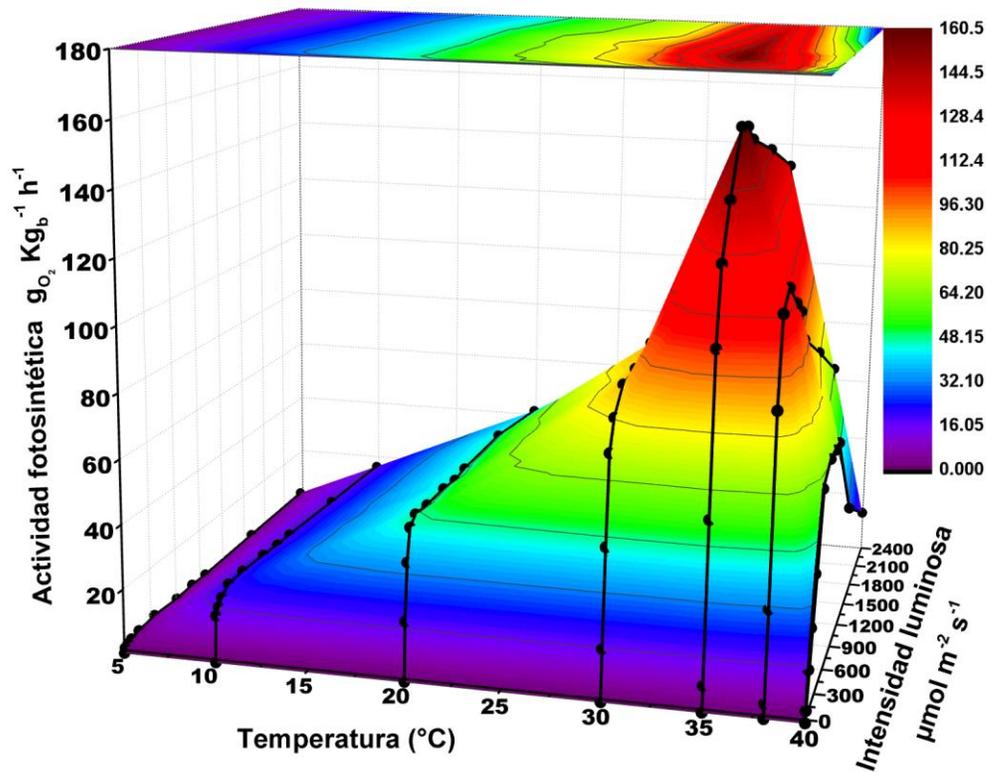


Figura 16. Influencia de la intensidad de luz y la temperatura sobre la actividad fotosintética.

Los resultados aquí reportados demuestran que *Scenedesmus obtusiusculus* presenta una disminución en la actividad fotosintética cuando la intensidad de luz sobrepasa los 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y con temperaturas por arriba de 35  $^{\circ}\text{C}$ . Esta disminución nos permitió relacionar con una inactivación enzimática debida a las altas temperaturas o al fenómeno de fotoinhibición debido a las altas intensidades de luz. El fenómeno de fotoinhibición ha sido reportado para diferentes microalgas entre ellas *Synechococcus*, *Haematococcus*, *Chlorella* y *Phaedolactinum* que se fotoinhiben bajo intensidades por arriba de los 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (MacIntyre *et al.*, 2002; Yun y Park, 2003; Jeon *et al.*, 2006; Brindley *et al.*, 2010), estos resultados pueden modificarse debido a la fuente de luz utilizada o a flujos instantáneos de luz

(Gordon y Polle 2007). Se ha reportado que para la microalga *Scenedesmus almeriensis* la fotoinhibición se presenta a una intensidad luminosa mayor a  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Como ya se ha mencionado anteriormente, la respuesta de la actividad fotosintética puede modificarse debido a la aclimatación o a la adaptación del metabolismo de la celular (MacIntyre *et al.*, 2002). Sin embargo, se sabe que la irradiación de la luz solar cuando se operan los reactores a la intemperie puede llegar a valores por encima de los  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante el día, en cultivos con altas concentraciones de microalga, la irradiación promedio es mucho menor y se encuentra en el rango de  $100$  a  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Acién *et al.*, 1998, 1999). Esto confirma que, bajo condiciones reales, los cultivos pueden estar fotolimitados. Por otro lado, incluso en los cultivos concentrados, las células que se encuentran cercanas de la superficie del reactor pueden estar expuestas a altas intensidades de luz y sufrir fotoinhibición, esto depende del diseño de los reactores y el régimen de luz al que las microalgas estarán expuestas. Con respecto a la temperatura en la **Figura 16** observamos que la actividad fotosintética se ve afectada cuando se alcanzan los  $35^{\circ}\text{C}$  esto nos permite decir que la temperatura juega un papel importante en la inactivación o en la disminución de la actividad. Se comprobó que en temperaturas por debajo de los  $35^{\circ}\text{C}$  la intensidad de luz no es un factor que disminuya la actividad fotosintética, puesto que en estas temperaturas se mantiene constante en el estado de saturación y al aumentar la temperatura el efecto de esta se va haciendo más visible. Estos datos pueden ser comparados con los que han obtenido otros autores que observan que un incremento en la temperatura permite el aumento de las actividades enzimáticas y en especial para el ciclo de Calvin (Falkowsky y Raven, 2007). En la **Figura 16** se puede observar como al sobrepasar la temperatura óptima ( $35^{\circ}\text{C}$ ), la actividad fotosintética decae. Esto se ha atribuido en algunos estudios al desbalance entre la demanda de energía y la producción de ATP además del alto grado de desactivación o desnaturalización de las proteínas que realizan la fotosíntesis (Raven y Gaidner, 1988). El efecto de la temperatura es muy relevante en cultivos que se llevan a cabo en la intemperie ya que están expuestos a variaciones de las condiciones ambientales, en especial la temperatura.

En los experimentos realizados la actividad fotosintética máxima que alcanzó *Scenedesmus obtusiusculus* fue 162.18 g<sub>O2</sub> kg<sub>b</sub> h<sup>-1</sup> a una temperatura de 35 °C y una intensidad de luz de 614 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y está por arriba de valores reportados para otras microalgas como *Scenedesmus almeriensis*, reporta 88.32 g<sub>O2</sub> kg<sub>b</sub> h<sup>-1</sup> cuando es cultivada a una temperatura de 25 °C con un pH de 8 y una intensidad de luz de 200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Costache *et al.*, 2013). Otras microalgas reportan valores similares, así para *Haematococcus* se determinó una P<sub>O2max</sub> de 36.48 g<sub>O2</sub>kg<sub>b</sub> h<sup>-1</sup>(Jeon *et al.*, 2006), para *Chlorella* 149.76 g<sub>O2</sub>kg<sub>b</sub> h<sup>-1</sup> (Yun y Park 2003), estos valores fueron adquiridos con células adaptadas a bajas intensidades de intensidad de luz, sin embargo la actividad fotosintética a altas intensidades de luz puede mejorarse con microalgas adaptadas a estas condiciones.

Con los datos obtenidos se pueden utilizar modelos para estimar algunos parámetros que incluyen los fenómenos de fotolimitación y la fotoinhibición. Basados en reportes de modelos, en este estudio se utilizó la siguiente ecuación: (Aiba 1982)

$$P_{o_2} = \frac{P_{O_2 \max} I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_i}}$$

En la ecuación la actividad fotosintética (P<sub>O2</sub>) es una función de la máxima actividad fotosintética (P<sub>O2max</sub>) y la irradiación (I) (**Figura 15 y 16**). Al graficar los datos experimentales usando esta ecuación se pueden determinar los parámetros experimentales: constante de saturación (K<sub>s</sub>) que fue de 75.7 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, la constante de inhibición (K<sub>i</sub>) de 4971 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y P<sub>O2max</sub> de 162.18 g<sub>O2</sub> kg<sub>b</sub> h<sup>-1</sup>. Estos parámetros fueron calculados para 35°C que fue la temperatura en la que *Scenedesmus obtusiusculus* presentó la mayor actividad fotosintética. Utilizando la ecuación de Arrhenius se graficó la actividad fotosintética vs la temperatura (**Anexo 6**), de donde se obtuvo la energía de activación (E<sub>a</sub>) igual a 72.55 KJ mol<sup>-1</sup> y la constante de Arrhenius (K<sub>0</sub>) de 4.36x10<sup>14</sup> g<sub>O2</sub> Kg<sub>bio</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Los valores de la energía de activación que se obtuvieron son mayores que en los reportados por otras microalgas, el valor de E<sub>a</sub> para *Scenedesmus obtusiusculus* fue de 72.55 KJ mol<sup>-1</sup> que sobrepasa el valor reportado para *Scenedesmus almeriensis* E<sub>a</sub>=42.7 KJ mol<sup>-1</sup>

(Costache *et al.*, 2013) y  $E_a=37.4 \text{ KJ mol}^{-1}$  (Sánchez *et al.*, 2008), para *Scenedesmus* sp.  $E_a=49.3 \text{ KJ mol}^{-1}$  (Xin *et al.*, 2010). Esta comparación con otras microalgas nos indica que *S. obtusiusculus* requiere menos energía para realizar la fotosíntesis.

Otra de las variables que influye sobre la actividad fotosintética es la temperatura, como se mencionó anteriormente, 35 °C es la temperatura en la que se obtiene una mayor actividad fotosintética, en estos experimentos se observó que al disminuir la temperatura a 10 °C la actividad fotosintética disminuye alrededor de ocho veces en comparación con los 35 °C (**Tabla 10**), por otro lado a temperaturas por debajo de 10 °C *Scenedesmus obtusiusculus* aún tiene actividad fotosintética, aunque muy baja.

**Tabla 10.** Actividad fotosintética en función de la temperatura.

Temperatura (°C)	$P_{O_2max}$ ( $g_{O_2} \text{ kg}_{bio}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
5	4.12
10	19.44
20	46.98
30	87.90
35	162.18
38	98.19
40	49.49

En el caso de temperaturas por arriba de los 35°C también se observa un decremento en la actividad fotosintética. Es importante mencionar que los experimentos se realizaron por periodos de 20 minutos para obtener una respuesta dinámica de la microalga a variaciones en las condiciones de cultivo, por lo que se podría observar un comportamiento distinto en *S. obtusiusculus* si fuera expuesta a estas temperaturas por periodos de tiempo más largos.

Bernard y Rémond (2012) crearon un modelo el cual puede representar el efecto de la intensidad de luz y la temperatura sobre el crecimiento y predecir la productividad en microalgas que se encuentran a la intemperie. Cuando las predicciones de este modelo se compararon con temperaturas reales tomadas de experimentos a la intemperie en sistemas abiertos y cerrados indican un decremento en la productividad debido al sobrecalentamiento en la mayoría de las especies de microalgas. En la **Tabla 11** se encuentran representadas las temperaturas óptimas y de desactivación máximas y mínimas que fueron evaluadas por el modelo de Bernard y Rémond (2012) en donde podemos observar que *Scenedesmus obtusiusculus* está por encima de todas microalgas presentadas.

**Tabla 11.** Temperaturas de desactivación y óptimas de crecimiento.  
(Adaptado de Bernard *et al.*, 2012)

<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>	<b>T<sub>min</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>opt</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>max</sub>(°C)</b>
<b><i>Asterionella Formosa</i></b>	Butterwick <i>et. al</i> (2005)	7.3	20.1	29.8
<b><i>Ceratium furca</i></b>	Baek <i>et al.</i> (2008)	8.4	24.4	32.1
<b><i>Ceratium furcoides</i></b>	Butterwick <i>et. al</i> (2005)	6.9	22.3	30
<b><i>Cryptomonas marssonii</i></b>	Butterwick <i>et. al</i> (2005)	2.4	15.9	30.3
<b><i>Phorphyridium crenatum</i></b>	Dermoun <i>et al.</i> (1992)	5.8	19.1	30
<b><i>Scenedesmus sp.</i></b>	Xin <i>et al.</i> (2010)	3.1	26.3	32.7
<b><i>Tychonema bourrelyi</i></b>	Butterwick <i>et. al</i> (2005)	0.4	21.8	30
<b><i>Scenedesmus obtusiusculus</i></b>	Este estudio	<5	35*	>40

Las variables estudiadas cobran gran relevancia cuando se desea realizar el cultivo de microalgas a la intemperie, debido a que presentan fluctuaciones de la intensidad y de la temperatura, estas variables pueden ser desfavorables para el cultivo (Jiménez *et al.*, 2003).

Se ha reportado ampliamente que la productividad de la microalgas es una función de las condiciones de cultivo, que incluyen la composición del medio de cultivo, la geometría del sistema, además de las condiciones ambientales como son la temperatura e intensidad de luz (Costache *et al.*, 2013). Cada cepa tiene condiciones de cultivo óptimas que deben determinarse para asegurar su

productividad y el diseño apropiado del reactor para su cultivo. La mejor manera de determinar estas condiciones es mediante la realización de experimentos en continuo bajo diferentes condiciones de cultivo, sin embargo este método requiere de largos periodos de tiempo y no considera las variaciones de las condiciones de cultivo en tiempos cortos a lo largo del día, por lo que no se puede utilizar para la prevención de daños que pueden ocurrir en periodos cortos, especialmente en el cultivo a la intemperie debido a la variación de los ciclos circadianos. Por estas razones la obtención de parámetros para la generación de modelos cinéticos de la fotosíntesis en la microalgas tiene gran importancia para el diseño eficiente de fotobiorreactores, para predecir el rendimiento del proceso y para optimizar las condiciones de operación (Costache *et al.*, 2013, Brindley *et al.*, 2010).

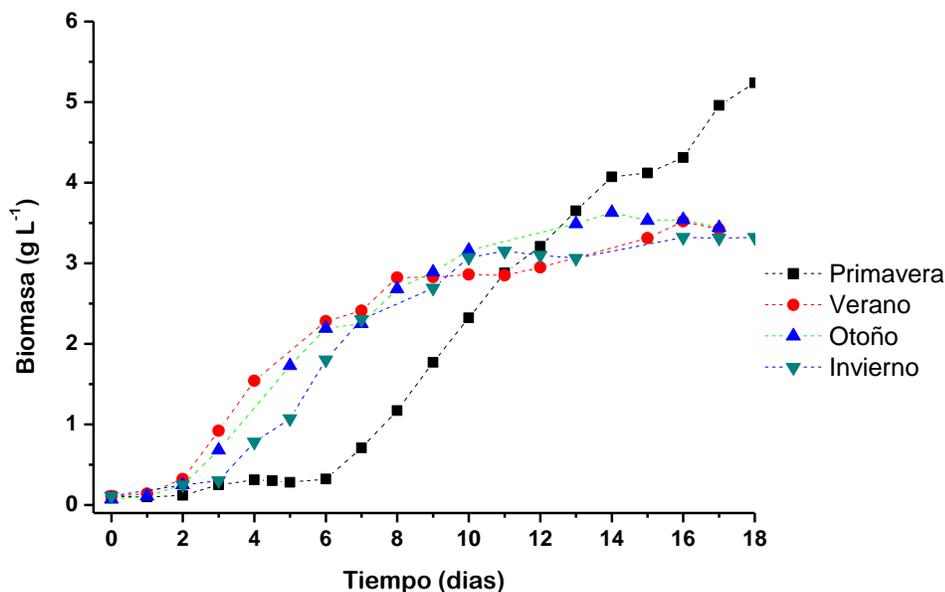
## **7.2 Efecto de las diferentes estaciones del año sobre el crecimiento de la microalga.**

La escalabilidad, la sostenibilidad y la economía del cultivo de algas a gran escala para la producción de energía no han sido comprobadas y son controversiales (Walker, 2009). Por lo que el efecto de la irradiación solar sobre la temperatura del medio de cultivo durante la operación en la intemperie es un reto importante en el escalamiento que no se ha investigado extensivamente a pesar del impacto de la temperatura sobre la productividad de algas. Por ejemplo, Zhang *et al.* (1999) reportaron una caída del 50% en la productividad durante el cultivo de *Synechocystis aquatilis* en la intemperie cuando no se controló la temperatura, mientras que Richmond *et al.* (1990) demostraron que el calentamiento del medio de cultivo por la mañana aumentó la productividad de la *Spirulina* en un 20% cuando fue cultivada en un estanque abierto. Sin embargo, el control de temperatura tiene un costo. Por ejemplo, Bechet *et al.* (2010), predijo que necesitaría eliminar 18000 GJ ha<sup>-1</sup> al año de energía térmica de un fotobiorreactor de columna si se encuentra operando en Merced, California (un reactor por metro cuadrado) con el fin de mantener la temperatura del medio en o por debajo de 25°C, un valor próximo a la temperatura óptima de muchas algas comerciales (Mata *et al.*, 2009).

Proporcionar energía para refrigeración de esta magnitud impondría un impacto medioambiental significativo (por ejemplo,  $8000 \text{ m}^3_{\text{agua}} \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  serían consumidos como enfriamiento evaporativo en el ejemplo anterior). Sin embargo, existe poca información acerca del cultivo de microalgas en la intemperie y los estudios que se han realizado son con control de temperatura (Bechet *et al.*, 2013). Con el fin de reducir los costos y los impactos ambientales del cultivo de microalgas, en este trabajo se desea probar que el potencial de *S. obtusiusculus* para el cultivo en la intemperie en un fotobiorreactor air lift de lazo extendido sin control de temperatura.

El cultivo de microalgas en sistemas operados a la intemperie presentan algunas problemáticas por la variación en las condiciones ambientales diarias o asociadas a las diferentes estaciones del año, sin embargo en el cultivo a la intemperie la fuente de energía necesaria para estos sistemas, la luz solar, es gratuita (Walker, 2009).

La evaluación del cultivo de microalgas a la intemperie se realizó con la finalidad de observar diferencias cuantitativas en el crecimiento en las diferentes estaciones del año relacionadas con los periodos de exposición a la luz y temperatura principalmente.



**Figura 17.** Concentración de biomasa en las diferentes estaciones del año. Invierno, primavera, verano y otoño

Estas pruebas de operación se realizaron en lote y en la **Figura 17** se puede observar la concentración de biomasa alcanzada en las diferentes estaciones del año, invierno, primavera, verano y otoño. De este modo se observa que en

primavera se ve favorecido el crecimiento de *S. obtusiusculus*, en contraste con las demás estaciones.

Algunos de los factores a los que se les puede atribuir estas diferencias en el crecimiento de la *S. obtusiusculus* son la temperatura y la irradiación de luz. En la **Tabla 12** se presenta la información resumida de la operación del FBR durante las cuatro estaciones del año, como se puede observar la cantidad de energía luminosa que llega a la superficie del FBR fue en promedio de 98.8 fotones que incidieron en el FBR en la época de primavera, siendo en esta época en donde se tuvo la mayor incidencia de estos, asociado a esto también se obtuvo la mayor concentración de biomasa al operar el reactor en lote. De esta manera, se observa que la cantidad de luz que llega al sistema, juega un papel muy importante en el cultivo de microalgas, por lo que su uso eficiente tiene un impacto sobre la productividad.

**Tabla 12.** Resumen de la operación del FBR, en lote en las cuatro estaciones del año.

Época	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Fotones	I <sub>max</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Rango de temperatura ambiente (°C)	Rango de temperatura en el medio (°C)	Productividad de la biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Invierno	3.3	92.9	1536	5-35	5-31	0.19
Primavera	<b>5.2</b>	<b>98.8</b>	<b>2035</b>	<b>12-38</b>	<b>11-47</b>	<b>0.29</b>
Verano	3.5	71.2	2055	13-35	5-26	0.21
Otoño	3.6	88.5	2100	8-35	7-45	0.22

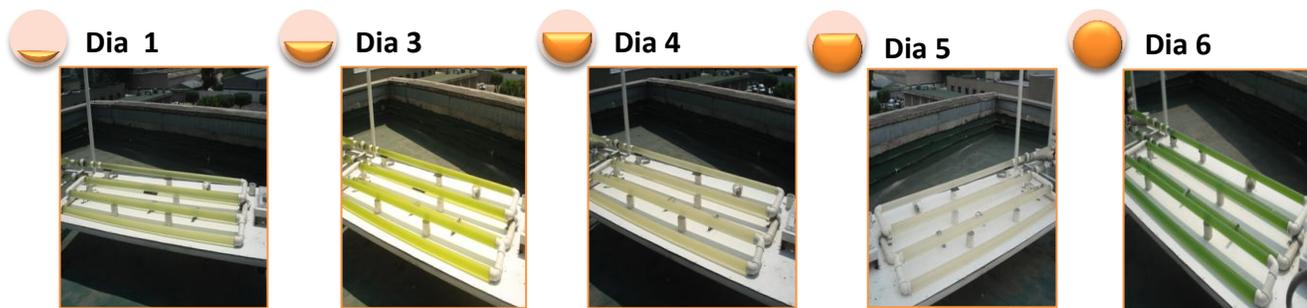
En los experimentos el pH se mantuvo constante adicionando una cantidad de 0.5% CO<sub>2</sub> en mezcla con el aire por lo que el pH se mantuvo en un rango de 7.5 ± 0.5. Las tasas de crecimiento (μ) obtenidas en los diferentes periodos fueron 0.24, 0.21, 0.22 y 0.23 d<sup>-1</sup>, en los periodos de primavera, verano, otoño e invierno respectivamente, nuevamente en primavera se observa la μ más alta con lo que se demostró que el factor de estrés que genera la inhibición y su posterior aclimatación favorece el aumento en la concentración de biomasa por lo que este fenómeno debe ser estudiado. Estos valores son menores al obtenido por Toledo-Cervates 2010 que operó un FRCB de 2.5 L con una mezcla de CO<sub>2</sub> aire al 5% a un flujo de

0.8vvm con una irradiación constante de luz de  $158 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  inoculado con *Scenedesmus obtusiusculus* y se obtuvo un  $\mu$  de  $0.37 \text{ d}^{-1}$  y una productividad ( $P_{\text{max}}$ ), de  $0.50 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Esto coincide con lo reportado por Jacob Lopes *et al.* (2008), encontraron que los valores máximos de biomasa se obtienen bajo regímenes de iluminación continua; en el presente estudio el cultivo de la microalga se realizó sin control de temperatura y se encuentra sujeta a los ciclos naturales de luz, además de que la cantidad de luz a lo largo del día varía de acuerdo a la hora del día y a las condiciones climáticas (**véase Figura 19**). Asimismo comparando los resultados obtenidos de concentración de biomasa máxima (periodo primavera) con los reportados por Toledo-Cervantes *et al.*, 2013 en un FCB (6 g L<sup>-1</sup>) con iluminación continua y control de temperatura, se puede ver que son muy próximos a pesar de que en este estudio se trabajó a la intemperie

### 7.2.1 Efecto de la intensidad de luz y la temperatura

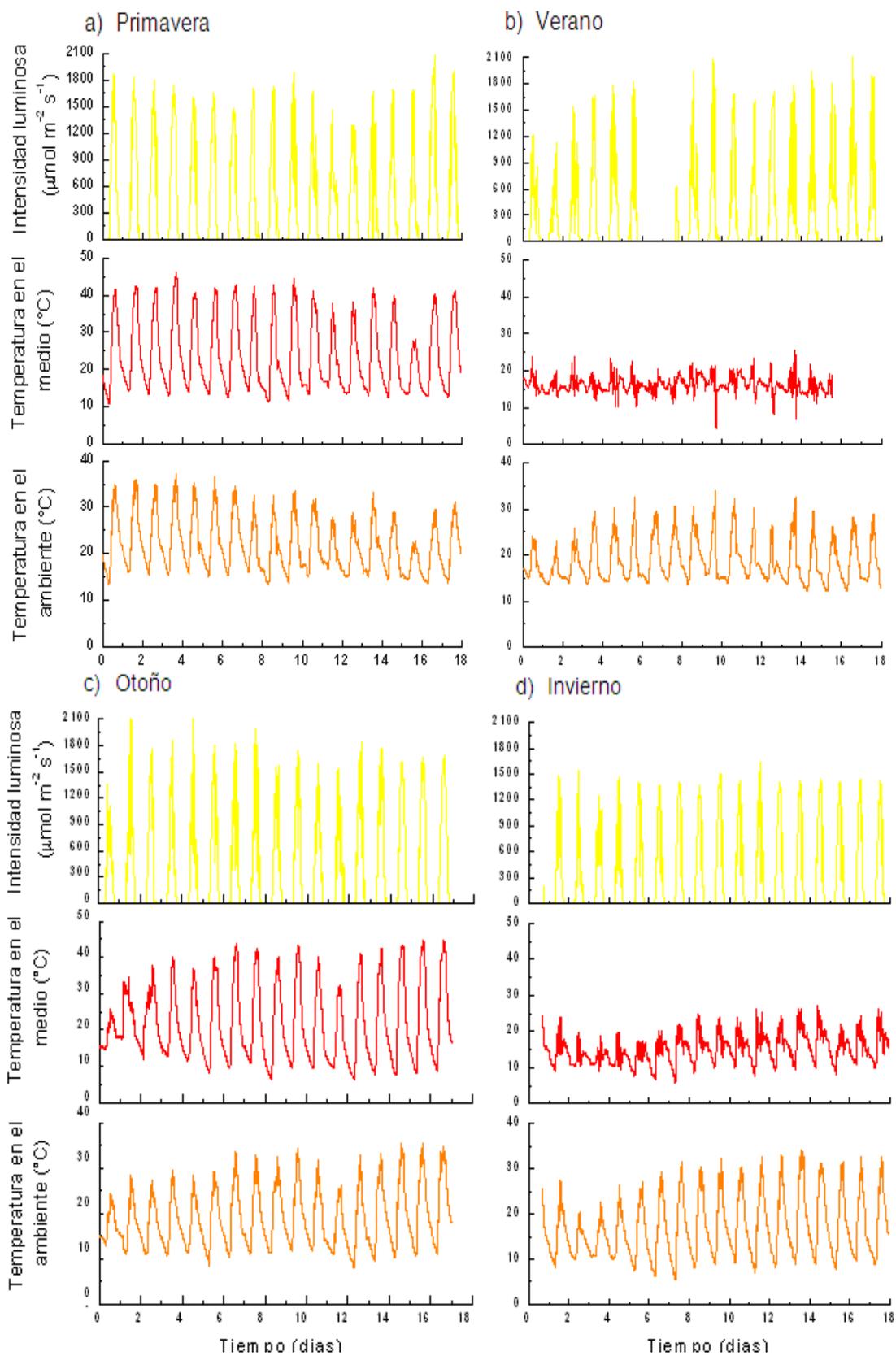
La intensidad de luz es un factor muy importante dentro del estudio de las condiciones del cultivo ya que de ella depende la cantidad de energía que puede ser captada por la microalgas para la generación de productos como carbohidratos lípidos y proteínas; la temperatura es otro factor ambiental al que las microalgas reaccionan constantemente ya que influye en las velocidades de las reacciones, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa. Estos dos factores tienen una dependencia de la localización geográfica y del tipo de clima en donde se lleve a cabo el cultivo. En este estudio la evaluación del efecto de la intensidad de luz y temperatura se realizó midiendo las variaciones en la intensidad de luz y la temperatura en el ambiente y en reactor durante los periodos en que se realizó la experimentación. En el periodo de primavera se observó un fenómeno de inhibición, como consecuencia de las altas intensidades de luz de hasta  $2035 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y de las altas temperaturas que llegaron hasta los  $47.5 \text{ }^\circ\text{C}$  (**Figura 19a**) esto ocasionó la presencia de una fase lag que se prolongó durante este periodo 6 días (**Figura 17**). El efecto de los dos factores aunados a una concentración de biomasa baja ( $0.14 \text{ g L}^{-1}$ ), durante el periodo de arranque, dieron como resultado un daño en el PSII y reducción de las clorofilas como se observa en la **Figura 18**, donde se aprecia que la microalga está despigmentada.

Este fenómeno, fue estudiado por Hu *et al.* (1996) y Acien-Fernández *et al.* (1998) y mencionan que la alta cantidad de energía asociada a una alta irradiación de luz solar a lo largo del día, puede llegar a saturar las unidades fotosintéticas en las células de diferentes especies de microalgas y causar daños, otro de los factores que participa es la concentración de biomasa ya que una alta concentración de células ayuda a disminuir el efecto de la irradiación pues se genera un efecto de sombreado que permite la disminución en la dosis de luz disponible en la célula (Hu *et al.*,1996).



**Figura 18.** Inhibición en el cultivo de microalgas en primavera en el FBR operado en lotes y aclimatación en el cultivo de microalgas.

Debido a este fenómeno, la fase lag durante este periodo fue de 6 días, a diferencia de las otras estaciones del año en la que la fase lag únicamente duró 2 días, por lo que la escala de tiempo según la cual las células tienen que responder a esos cambios varía de segundos a días. Después de la inhibición, como se observa en la **Figura 18**. Se observó otro fenómeno que se presentó en la primavera, fue la aclimatación. Este fenómeno se presenta en las células de algas que desarrollan un mecanismo de respuesta que les permita soportar el exceso de energía. El estado de transición, y los mecanismos no fotoquímicos, operan para ajustar la cantidad de energía de la luz entregada a PSII en una escala de tiempo de segundos a minutos e incluso días. Otros procesos que reflejan cambios en la calidad o la intensidad de la luz pueden tomar más tiempo y requieren de modificaciones estructurales y bioquímicas. La aclimatación a la irradiación a largo plazo es denominada fotoaclimatación. Este proceso implica cambios en óptica, biofísicos, bioquímicos, ultraestructurales, en los niveles fisiológicos y moleculares (Falkowski *et al.*, 1980; Richardson *et al.*, 1983; Escoubas *et al.*, 1995; Fisher *et al.*,



**Figura 19.** Variables que afectan el medio de cultivo en las diferentes estaciones, intensidad de luz, temperatura en el medio de cultivo y temperatura ambiente. a) Primavera, b) Verano, c) Otoño y d) Invierno.

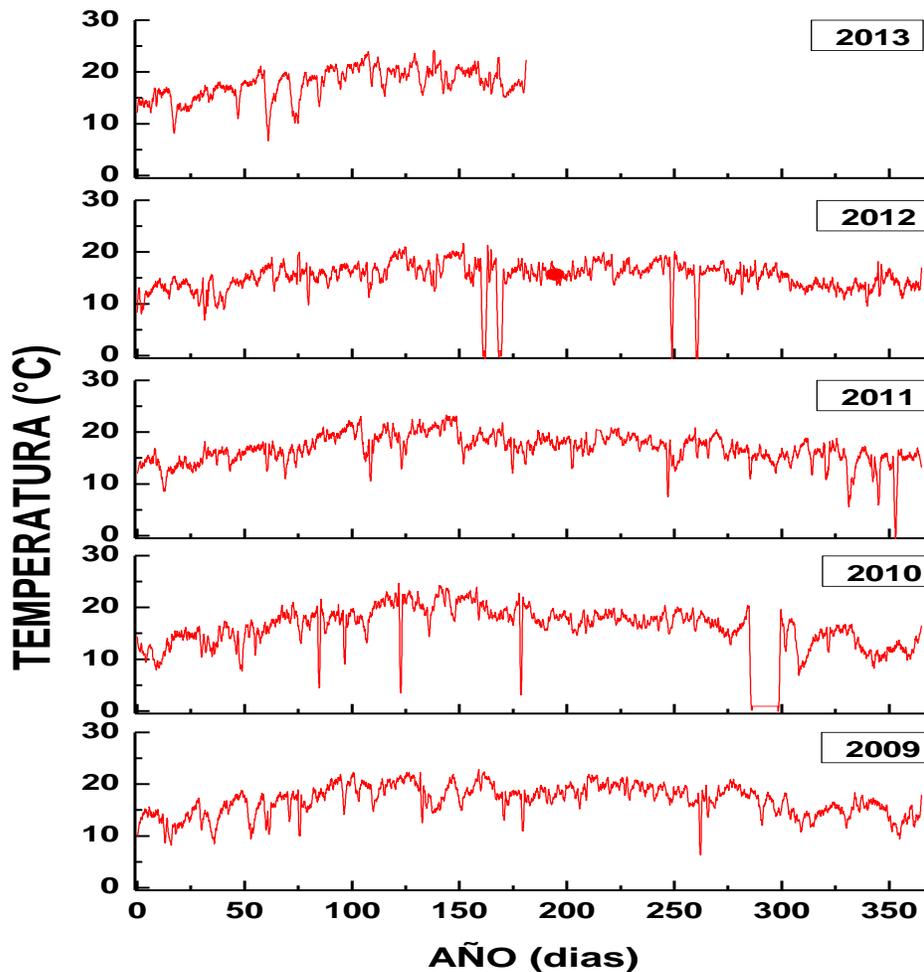
1996, 1998). Una tendencia común que caracteriza el mecanismo de fotoaclimatación, es un aumento de la clorofila a, y en otra en la captación de luz en los pigmentos, a medida que disminuye la irradiación. Una estrategia que se puede utilizar para evitar el fenómeno de inhibición y controlar la composición bioquímica dentro del cultivo, es manipular la cantidad de luz que llega al sistema ajustando la concentración inicial de microalga en el medio de cultivo (Wang *et al.*, 2013).

Una vez que la microalga se adaptó a las condiciones de alta irradiación de luz y altas temperaturas, se observó que se desarrolló la fase de crecimiento exponencial, obteniéndose la concentración de biomasa más alta registrada a lo largo de los experimentos (**Tabla 12**). Por lo que, bajo ciertas condiciones de estrés por intensidad de luz y temperatura *Scenedemus obtusiusculus* puede promover una alta concentración de biomasa.

Esto se puede corroborar haciendo una comparación con el invierno en donde se obtiene la concentración menor de biomasa ( $3.32 \text{ g L}^{-1}$ ) y se observó que las temperaturas a lo largo del experimento se encuentran por debajo de los  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en el medio líquido durante la noche (**Figura 19d**), además se observó que la intensidad luminosa es en promedio menor a otras estaciones del año, por lo que la baja concentración de biomasa se le puede atribuir a la combinación de estos dos factores. En comparación con el verano la irradiación promedio es parecida a las demás estaciones, pero este caso nuevamente la temperatura juega un papel importante, pues se mantuvo en un intervalo de  $5$  a  $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en promedio en el medio líquido (**Figura 19b**).

La temperatura en el medio líquido a lo largo de todos los experimentos durante el día se mantuvo entre  $5$  y  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura ambiente y puede ser consecuencia de la acumulación de calor en el sistema debido a la transformación de una fracción de la luz (infrarroja) en forma de calor. Este fenómeno no se observa en los estanques abiertos operados a la intemperie debido a que tiene un sistema de enfriamiento natural que es la evaporación (Tredici, 2010). En particular el efecto de la intensidad de luz sobre la temperatura del medio no ha sido muy estudiado a pesar de su gran impacto sobre la productividad del cultivo. Zhang *et al.*, en 1999 reportaron que la productividad de *Synechocystis*

*aqualitilis* cae un 50% cuando fue cultivada a la intemperie y no se controló la temperatura. Por otro lado, Richmond *et al.*, en 1990 mostraron que al calentar el medio de *Spirulina* cultivada en un estanque tipo raceway por las mañanas cuando se opera en la intemperie aumenta en un 20% la productividad. Sin embargo, el control de temperatura tiene un alto costo (Bechet *et al.*, 2010). La alta concentración de biomasa que alcanzó en el cultivo es un reflejo de la robustez de *Scenedesmus obtusiusculus* para adaptarse a las condiciones climáticas en donde fue cultivada. México se encuentra en una zona privilegiada, Darzins *et al.*, en el 2010 y Tredici, 2010 lo ubican en una zona de alta intensidad de luz donde el promedio anual de radiación solar es de 15-22 MJ m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> (~ 80 000 GJ por hectárea por año) y por lo tanto tienen un gran potencial para la generación de biomasa y puede alcanzar una productividad anual de 200 toneladas por hectárea.



**Figura 20.** Temperatura ambiente promedio a lo largo de los años 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013.

Por otro lado, México se ubica en una zona donde las temperaturas en gran parte del año se encuentran por arriba de los 10 °C. La temperatura ambiente está ligada a la factibilidad económica y en general se considera que la producción es factible cuando las temperaturas medias mensuales del mes más frío superan los 15 °C (Darzins *et al.*, 2010). La **Figura 20** confirma que en los últimos cuatro años el promedio de temperatura mínima se encuentra por arriba de los 15 °C por lo que el cultivo de *Scenedesmus obtusiusculus* tiene un gran potencial para la generación de biomasa microalgal.

## 7.2.2 Perfil bioquímico

El perfil bioquímico que se obtuvo cuando se cultivó *Scenedesmus obtusiusculus* en la intemperie en los cuatro periodos estacionales se puede observar en la **Figura 21**. En ninguna etapa de los experimentos realizados el FBR contó con control de temperatura.

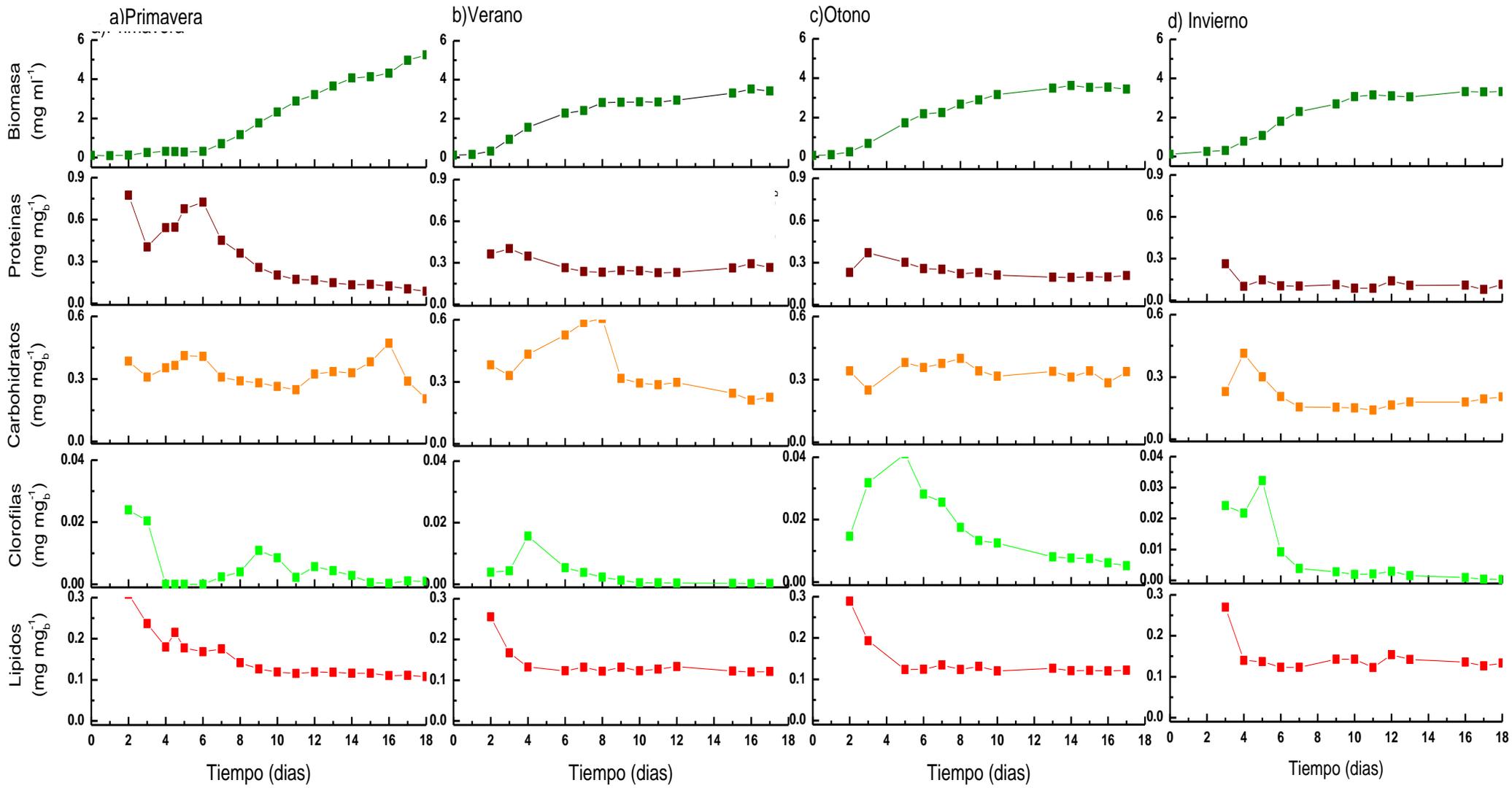
### 7.2.2.1 Efecto en la composición proteica.

El contenido proteico de *Scenedesmus obtusiusculus* en las pruebas que se realizaron, muestra una tendencia a permanecer constante, después del quinto día de cultivo a lo largo de los cuatro experimentos. En primavera se observó una caída en la concentración que coincide con el fenómeno de inhibición y ésta puede ser atribuida a la desnaturalización de las proteínas, por las altas temperaturas alcanzada en esa época (**Figura 21a**). Sin embargo, en el periodo de primavera se observó (**Figura 21a**) un aumento en el contenido proteico que coincide con el periodo en que se presentó el fenómeno de aclimatación, donde la concentración de proteínas alcanzó una concentración de 800 g<sub>p</sub> Kg<sup>-1</sup><sub>bio</sub> siendo este el valor máximo que se alcanzó durante todos los experimentos. Asimismo, se puede observar en la **Figura 21a** que la concentración de proteína durante los primeros 5 días de cultivo alcanza su máximo y va disminuyendo hasta alcanzar un estado constante. Este comportamiento se puede atribuir a que durante los primeros días del cultivo la concentración de nitrógeno es alta (247 µgN mL<sup>-1</sup>) y a lo largo del

tiempo se va consumiendo el  $\text{N-NO}_3^-$ , por lo que la microalga minimiza la síntesis de proteína para favorecer la acumulación de los compuestos de reserva (lípidos y carbohidratos) a expensas de los compuestos nitrogenados este comportamiento ha sido observado en otras microalgas (Utting, 1990, Rodolfi *et al.*, 2009, Ho *et al.*, 2012). La importancia de estudiar el contenido de proteínas radica en que es un producto de alto valor agregado y las microalgas tienen un gran potencial para su producción, existen reportes donde se ha encontrado que la proteína de las algas es de gran calidad y comparable con las proteínas vegetales convencionales. Sin embargo, debido a los altos costos de producción y a la dificultad para incorporarla en preparaciones que sean agradables para la población. Las microalgas con alto contenido proteico se venden como suplemento alimenticio y/o alimento para animales (Wang *et al.*, 2013; Wijffels *et al.*, 2010; Cohen, 1986; Ho *et al.*, 2012). Por lo que la producción de proteínas podría complementar los procesos de producción de biomasa.

#### **7.2.2.2 Efecto en la composición de carbohidratos.**

La concentración máxima de carbohidratos se observó en el periodo de verano (**Figura 21 b**) siendo de  $600 \text{ g}_{\text{CHO}} \text{ Kg}^{-1}_{\text{biomasa}}$ . Sin embargo, al igual que con las proteínas, el contenido de carbohidratos tiende a ser constante y se mantiene en un valor promedio de  $300\text{-}600 \text{ g}_{\text{CHO}} \text{ Kg}^{-1}_{\text{biomasa}}$ . Utting en 1985 propuso que la reducción en la disponibilidad de la fuente de nitrógeno promueve la acumulación de carbohidratos como reserva parcial de carbono y energía que posibilita el mantenimiento de las células durante el periodo de producción de compuestos encargados de la síntesis de la reserva lipídica. Sin embargo, en este experimento no se observó este fenómeno, debido a que no se mantuvo a *Scenedesmus obtusiusculus* en un periodo de estrés una vez que se terminó la fuente de nitrógeno. La biomasa de algunas microalgas es rica en carbohidratos y su acumulación es promovida por la limitación de la fuente de nitrógeno por lo que la biomasa o biomasa residual (después de la extracción de un producto de interés p.e. lípidos) puede utilizarse en la generación de biohidrógeno o biogás con alto contenido de metano mediante la fermentación oscura (Wang *et al.*, 2013, Donohue y Codgell, 2006; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009).



**Figura 21.** Perfil bioquímico del cultivo a la intemperie en las diferentes estaciones. a) Primavera, b) Verano, c) Otoño y d) Invierno.

### 7.2.2.3 Efecto sobre la composición de clorofilas

Las clorofilas son las moléculas encargadas de dar inicio a la fotosíntesis, mediante la cosecha de la energía solar donde el CO<sub>2</sub> y el agua son transformados en carbohidratos y oxígeno. Teóricamente la tasa de fotosíntesis es directamente proporcional a la productividad de la biomasa (Hancke *et al.*, 2008, Brindley *et al.*, 2010). Sin embargo, el cultivo de microalgas a la intemperie representa condiciones especiales en donde la microalga está sujeta a cambios climáticos y estos afectan directamente la concentración de clorofila. Un ejemplo de esto es la cantidad de luz que llega al sistema y que afecta la eficiencia de la fotosíntesis (Brindley *et al.*, 2010), del mismo modo altas temperaturas y concentraciones de nitrógeno pueden estimular la acumulación de clorofila en el cultivo (Chen *et al.*, 2011). En los resultados que se muestran en la **Figura 21a** se observa que en el tercer día de cultivo la concentración de clorofila es tan baja que no pudo ser cuantificada, este fenómeno es conocido como inhibición y es una respuesta a las condiciones que se presentaron en la época de primavera. Los cultivos en la intemperie enfrentan cambios en la intensidad en un rango de uno a dos órdenes de magnitud. En la **Figura 18** se puede observar la evolución de este fenómeno y en la **Figura 21a** podemos ver las condiciones climáticas en las que se expuso el medio de cultivo. La inhibición puede verse como un proceso de aclimatación de emergencia que es provocado por una alta intensidad de luz donde se inactivan las funciones del PSII reduciendo su número de unidades. La energía de la luz provoca una modificación en los centros de reacción del PSII. El daño inducido por la intensidad de luz es provocado de forma rápida pero la regeneración bioquímica del PSII es lenta y puede llevar desde horas hasta días dependiendo de la capacidad del microorganismo (Hancke *et al.*, 2008). Una estrategia que utilizan las microalgas es la reducción de la pigmentación y este proceso puede presentarse en una escala de tiempo de días (Falkowsky y Raven 1997). Una vez que la *Scenedesmus obtusiusculus* se aclimató a las condiciones ambientales la cantidad de clorofilas aumentó hasta llegar a una concentración de 2 g<sub>Chl</sub> Kg<sup>-1</sup><sub>bio</sub> en el periodo de primavera. La máxima concentración se alcanzó en el verano con una concentración de 4 g<sub>Chl</sub> Kg<sup>-1</sup><sub>bio</sub>. Sin embargo, en todos los periodos se observó un pico máximo cuando comienza la etapa de crecimiento

exponencial en los primeros tres días de cultivo (**Figura 17**) seguido por un decremento en la cantidad de clorofila, que se puede atribuir a la aclimatación de *Scenedesmus obtusiusculus* a las condiciones de alta intensidad y a la disminución de la concentración de nitratos.

#### **7.2.2.4 Efecto sobre la composición lipídica.**

En la **Figura 21** se aprecia que la concentración de lípidos durante los periodos estacionales en que se evaluó su cultivo, se mantuvo en una concentración promedio de  $12 \text{ g}_{\text{lip}} \text{ Kg}^{-1}_{\text{b}}$ . Como se describió en la **sección 7.2** el cultivo se realizó con una concentración de  $\text{NaNO}_3$  ( $1.5 \text{ g L}^{-1}$ ) suficiente para que el cultivo no tuviera limitación por la fuente de nitrógeno y no se contó con un periodo en el que la microalga pudiera estresarse por la limitación de nitrógeno que estimulara la acumulación de lípidos. La acumulación de lípidos se presenta cuando *Scenedesmus obtusiusculus* se encuentra en condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno, como consecuencia de la desviación del metabolismo hacia la síntesis de compuestos de reserva (Chisti, 2007; Rodolfi *et al.*, 2009; Toledo-Cervates *et al.*, 2013). Este tema se aborda con mayor profundidad en la **sección 7.4**.

#### **7.2.3 Efecto en la eficiencia fosintética**

Como ya se ha mencionado, algunos de los aspectos más importantes a considerar durante el escalamiento para producción de microalgas son la intensidad de luz y la temperatura. Sin embargo, es importante conocer la capacidad de la microalga para transformar la energía luminosa absorbida en energía química durante su crecimiento mediante la eficiencia fosintética (PE) (Béchet *et al.*, 2013). La energía que es transformada por la microalga puede ser medida mediante determinaciones del calor de combustión. La información es importante cuando se desea realizar un balance energético con respecto a la cantidad de energía que se introduce al sistema (p.e. en el mezclado) y la energía que se obtiene del cultivo (Lehr y Posten, 2009, Williams y Laurens, 2010). La *PE*

se calculó como se describe en la **sección 6.3**. La determinación de la *PE* se basó en los experimentos que se realizaron en lote durante las cuatro épocas del año descritos en la **sección 7.2**, tomando en cuenta únicamente los días en que *Scenedesmus obtusiusculus* se encontraba en fase exponencial (crecimiento constante, sin limitación de nutrientes) en verano, otoño e invierno, se tomaron los días 4 al 8 y para primavera del día 8 al 12 y se consideró la cantidad de luz que llegó al sistema tomando en cuenta el día y la noche de dicho periodo (Béchet *et al.*, 2013). Los resultados se describen en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Eficiencia fotosintética y productividad de *Scenedesmus obtusiusculus* cultivada en la intemperie.

Estacion	PE (%)	Productividad de la biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Intensidad de luz solar maxima (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Primavera</b>	5.34	0.29	2035
<b>Verano</b>	4.13	0.21	2055
<b>Otoño</b>	4.21	0.22	2100
<b>Invierno</b>	4.11	0.19	1536

La *PE* más alta que se obtuvo fue de 5.34 % en primavera y se encuentra por encima de los valores reportados para microalgas cultivadas en la intemperie como *Chlorella sorokiniana* que fue cultivada en un FBCB con volumen de 51 L y una área iluminada de 1.1m<sup>2</sup>, sin control de temperatura donde obtuvieron valores de 4.8% (Béchet *et al.*, 2013); otras microalgas reportan valores similares como *Spirulina* que fue cultivada en un fotobiorreactor de lazo extendido de tubos de plexiglás y contaba con un control de temperatura (28°C), reportando una *PE* de 3.1% (Torzillo *et al.*, 1993), *Chlorella* sp. fue cultivada en un fotobiorreactor de capa delgada sin control de temperatura y como fuente de nitrógeno se utilizó urea y se reportó un valor de *PE* de 3.3 % (Doucha y Livansky 2009).

Los resultados mostraron que *Scenedesmus obtusiusculus* tiene una alta *PE* que nos indica que tiene un gran capacidad de aprovechar la energía luminosa cuando es cultivada en la intemperie y sin control de temperatura. Sin embargo, es necesario realizar un balance de energía del sistema de cultivo, además de

estudiar la cantidad de energía que se introduce durante el mezclado con el objetivo de minimizar la cantidad de energía que se introduce durante el cultivo.

### 7.3 Operación en lote alimentado del FBR a la intemperie

Uno de los aspectos importantes que se deben estudiar para aumentar la productividad del sistema es el régimen de alimentación. El cultivo puede mantenerse de forma intermitente (lote alimentado) mediante la cosecha periódica de la microalga y agregando medio fresco. En el presente trabajo se realizó la operación en un régimen de lote alimentado. El FBR fue inoculado con una biomasa inicial de  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  con medio mineral BG-11 y se inició la operación en lote alimentado cuando la concentración de la biomasa se encontraba entre  $2-3 \text{ g L}^{-1}$ . La concentración del cultivo tiene gran importancia cuando se desea evaluar los diferentes regímenes de operación, debido a que una alta concentración genera mayores zonas de oscuridad dentro del sistema por lo tanto las microalgas se encontrarán limitadas de la fuente de luz. Una vez que el cultivo se encontró dentro del intervalo de concentración de biomasa mencionado anteriormente, se retiraron 8 L del FBR y se agregaron 8 L de medio fresco. Se realizaron ensayos para elegir un volumen que permitiera a la microalga crecer hasta llegar a la concentración deseada y se determinó que esto ocurría al retirar 8L de medio con biomasa. La operación en este régimen se realizó durante 5 días en cada estación del año. En la **Tabla 14** se presenta el resumen de los ensayos hechos en la operación del sistema operado en lote alimentado.

Con relación a la velocidad máxima de crecimiento fue de  $0.12\text{d}^{-1}$  en primavera y en verano el valor fue de  $0.11\text{d}^{-1}$ , estas velocidades de crecimiento son un promedio de los días en que se operó el reactor en lote alimentado. Otro parámetro que se obtuvo fue la productividad siendo nuevamente en primavera cuando se obtiene valor más alto ( $0.42 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) por las condiciones ambientales que promueven el crecimiento de la biomasa.

**Tabla 14.** Resumen de la operación de FBR en lote alimentado en las estaciones del año.

Estación	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Productividad de la biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Fijación de CO <sub>2</sub> en la biomasa* (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Primavera	0.12	0.42	0.77
Verano	0.11	0.39	0.71
Otoño	0.10	0.36	0.66
Invierno	0.10	0.36	0.66

### 7.3.1 Operación en continuo del FBR en la intemperie

Se han estudiado diversos métodos para el cultivo de microalgas para aumentar la productividad de la biomasa, algunos la han cultivado por lote (Liu *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2007) y otros estudian la operación en lote para investigar el crecimiento de las microalgas en estas condiciones. (Tang *et al.*, 2012). Sobczuk y Chisti en el 2010 estudiaron el cultivo de microalgas para la producción de biomasa y biocombustibles usando la operación en estado estacionario, donde el efecto de la tasa de dilución o la temperatura se evalúa sobre el contenido de lípidos y el perfil de ácidos grasos. Sin embargo, la intensidad de luz y la cantidad de nutrientes no pueden mantenerse constantes durante la operación en lote debido a los cambios continuos en la densidad celular y el autosombreado (Tang *et al.*, 2011). Por otro lado, se requiere un mayor entendimiento del estado estacionario y conocer los parámetros de crecimiento. En operación en continuo las condiciones de densidad celular pueden ser controladas y mantenidas variando la tasa de dilución, de tal manera que la cantidad de luz que llega al sistema sea constante (Tang *et al.*, 2012). En este trabajo de tesis las pruebas se llevaron a cabo de un modo similar al descrito en el lote alimentado (**sección 7.3**) con una tasa de dilución de 0.28 d<sup>-1</sup>. En este experimento el FBR se equipó con una bomba peristáltica con dos cabezales que introdujeron el medio fresco al mismo tiempo que retiraba medio con biomasa con un flujo de 15 ml min<sup>-1</sup>.

En la **Tabla 15** también se pueden observar otras diferencias con respecto a las estaciones del año como son la variación de las temperaturas y la incidencia de los fotones en el sistema, estos factores son nuevamente los que determinan la velocidad de crecimiento.

La capacidad máxima de captura de CO<sub>2</sub> que se observó a lo largo de estos experimentos fue en primavera. La **Tabla 15** permite observar que las productividades y la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> son altas en comparación con las reportadas por Toledo-Cervates *et al.*, en el 2013 cuando se cultivó *Scenedesmus obtusiusculus* en un FBRCB a 0.8 vvm con una concentración de 5% de CO<sub>2</sub> con una intensidad de luz continua en la superficie de 154 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y se reporta una fijación de 0.95 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, los datos que se obtuvieron con un régimen de operación en continuo en los cuatro periodos estacionales están por encima de los reportados para *Scenedesmus obtusiusculus*.

**Tabla 15.** Resumen de la operación de FBR en continuo.

Estación	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Dilución (d <sup>-1</sup> )*	Productividad de la biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Fijación de CO <sub>2</sub> en la biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Invierno	2.41	0.28	0.67	1.22
Primavera	2.63	0.28	0.73	1.33
Verano	2.17	0.28	0.60	1.10
Otoño	1.98	0.28	0.55	1.00

En la **Tabla 16** también se muestra la productividad de diferentes configuraciones de reactores operados en diversas partes del mundo, donde podemos ubicar al fotobiorreactor inoculado con *Scenedesmus obtusiusculus* con una alta productividad cuando se opera en un régimen en continuo.

**Tabla 16.** Productividad de la biomasa en sistemas de cultivo a la intemperie.

Adaptado de Lee, 2001

Bioreactor	Orientación	DI	Localización	Alga	Productividad (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Tubular	Horizontal	12.3	Italia	<i>Spirulina maxima</i>	0.25
		2.6	Italia	<i>Spirulina sp.</i>	-
		2.5	Israel	<i>Spirulina platensis</i>	1.60
		2.6	España	<i>Isochrysis galbana</i>	0.32
		6.0	España	<i>Phaeodactylum</i>	2.02
		3.0	España	<i>Phaeodactylum</i>	2.76
		6.0	Francia	<i>Porphyridium cruentum</i>	0.36
Columna	Vertical	20.0	España	<i>Phaeodactylum</i>	0.69
		2.6	Israel	<i>Isochrysis galbana</i>	1.60
<b>Air-lift lazo extendido</b>	<b>Horizontal</b>	<b>0.44</b>	<b>México</b>	<b><i>Scenedesmus obtusiusculus</i></b>	<b>0.73</b>

Como se ha visto, los resultados más altos de productividad y fijación de CO<sub>2</sub> se obtuvieron cuando el reactor fue operado en un régimen en continuo. Estos parámetros son importantes cuando se desea evaluar la capacidad de remoción de CO<sub>2</sub> por lo que *Scenedesmus obtusiusculus* tiene una gran potencial para la captura de CO<sub>2</sub> de una corriente gaseosa y para la producción de biomasa.

#### 7.4 Operación bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno.

Una de las razones por la que se cultivan las microalgas, es porque se pueden obtener lípidos para la producción de biodiesel, en el caso de *S. obtusiusculus* presenta un gran potencial en la acumulación de lípidos (Toledo-Cervates *et al.*, 2013). Por esta razón se realizaron experimentos en condiciones de limitación de la fuente de N. Los experimentos se realizaron en dos épocas del año en otoño e invierno, con una concentración inicial de biomasa de 0.1 g L<sup>-1</sup>. Estos estudios se realizaron en el FBR de lazo extendido operado en la intemperie por lo cual el cultivo carecía de control de temperatura y estaba expuesto a las variaciones diarias. El medio utilizado fue BG-11 2x que contenía únicamente 20 gN m<sup>-3</sup> que corresponde al 10 % de nitrógeno que tiene el medio mineral en condiciones normales. Para algunas microalgas se reportó que la máxima acumulación de

lípidos se encuentra en periodos de 2 a 20 días (Solovchenko *et al.*, 2008; Recht *et al.*, 2012) por lo que el periodo de los experimentos fue de 8 a 16 días. En la **Tabla 17** se resumen los principales resultados.

**Tabla 17.** Experimentos con limitación de la fuente de N.

Época	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	I <sub>max</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Rango de temperatura ambiente (°C)	Rango de temperatura en el medio (°C)	Productividad de lipídica (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Invierno	0.28	1957	0-36	1-44.5	5.62
Otoño	1.45	1988	10-33	17-35	53.12

Comparando la producción de biomasa en dos periodos, se encontró que en otoño se obtuvo una mayor concentración de biomasa con respecto a la producida en invierno (**Tabla 17**), debido a que en el periodo de invierno se presentó el fenómeno de inhibición ya que las microalgas no tuvieron una fuente de nitrógeno para recuperar sus clorofilas como se observó en el periodo de primavera, por lo tanto vieron limitada su recuperación y crecimiento (**Figura 22**).



**Figura 22.** Inhibición en el periodo de invierno, en el reactor operado bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno.

La inhibición se atribuye a las altas temperaturas alcanzadas en esta época en la **Figura 24** se puede observar los cambios de la temperatura durante el invierno, donde las temperaturas fueron de 0°C durante la noche y 44.5 °C durante el día.

Esto es algo interesante ya que las microalgas durante este periodo aún seguían activas y acumularon un 26% de su peso seco sin embargo su crecimiento fue limitado. Este fenómeno no se observó en otoño, asimismo las temperaturas durante otoño (**Figura 23**) no alcanzaron los 40 °C y la acumulación de lípidos en este periodo fue del 30%. Estos datos indican que el fenómeno de inhibición se puede presentar en cualquier estación del año ya que las condiciones de cultivo están sujetas a las variaciones de los ciclos diarios. El fenómeno de inhibición ha sido observado por Wang *et al.* (2013), al cultivar *Scenedesmus dimorphus* en un fotobiorreactor de panel plano operado en el exterior y bajo condiciones de limitación de la fuente de nitrógeno donde se observó una disminución de la actividad fotosintética debida a la exposición continua a la luz que llegó hasta 1600  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  combinado con el efecto de la temperatura que alcanzó los 32 °C nuevamente la temperatura y la cantidad de luz juega un papel importante como factor de estrés no sólo para el crecimiento de la microalga, sino también para establecer mejores estrategias para la acumulación de lípidos.

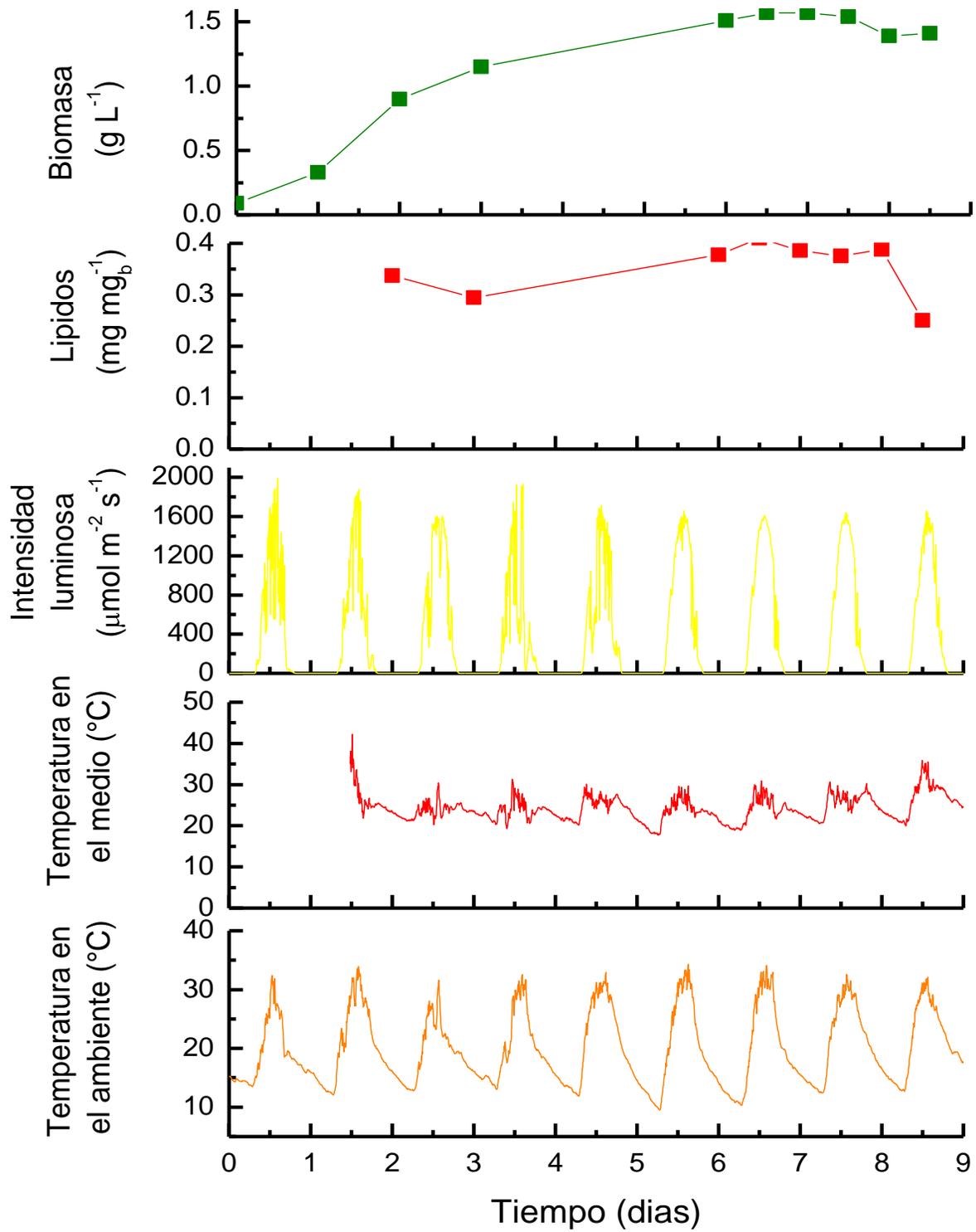


Figura 23. Experimentos en condiciones de limitación en Otoño.

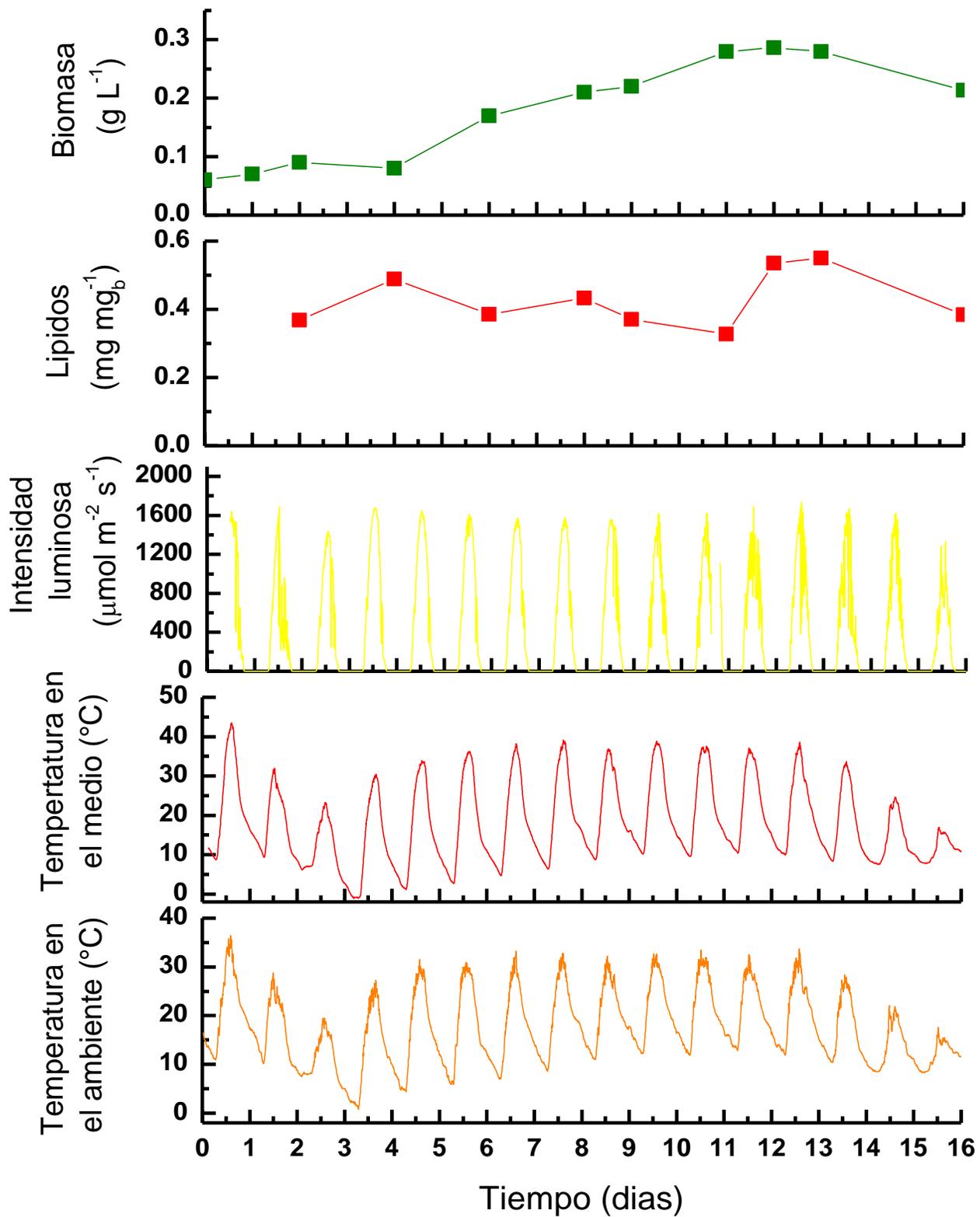


Figura 24. Experimentos en condiciones de limitación en invierno.

Cuando las microalgas se encuentran en condiciones de limitación de nitrógeno estimulan la acumulación de lípidos para la producción de biodiesel además de estos también se generan algunos pigmentos como son esteroides glicol y fosfolípidos que tiene un valor comercial. (Ho *et al.*, 2012, Wijffels *et al.*, 2010)

En este estudio se observó una disminución en la clorofila que es el pigmento que da el color verde a las microalgas (**Figura 25**), este comportamiento es típico en las microalgas debido a la disminución de la división celular por la deficiencia de nitrógeno (Toledo-Cervantes *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2012). Se ha reportado que en estas condiciones se promueve la acumulación de algunos pigmentos como lo son carotenoides principalmente utilizados como un mecanismo de fotoprotección además este aumento está acompañado por la disminución en la cantidad de clorofila (Ho *et al.*, 2012).



**Figura 25.** FBR en condiciones de limitación para la acumulación de lípidos en el periodo de otoño.

Al limitar a la microalga de la fuente de nitrógeno, ésta busca una fuente alterna que pueda utilizar para continuar con su crecimiento, tal como se observó en el experimento de otoño en el cual *Scenedesmus obtusiusculus* alcanzó una concentración de  $1.45 \text{ g L}^{-1}$ , este fenómeno también se observó en otras microalgas y podría deberse a que algunos compuestos nitrogenados intracelulares son liberados por enzimas hidrolíticas, actividad que puede ser inducida por la ausencia del nitrógeno (Toledo-Cervantes *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). La clorofila al poseer cuatro átomos de nitrógeno por molécula es el compuesto que puede proveer de nitrógeno a la microalga, ya que es donde se tendría la reserva de nitrógeno intracelular y como mencionó anteriormente la

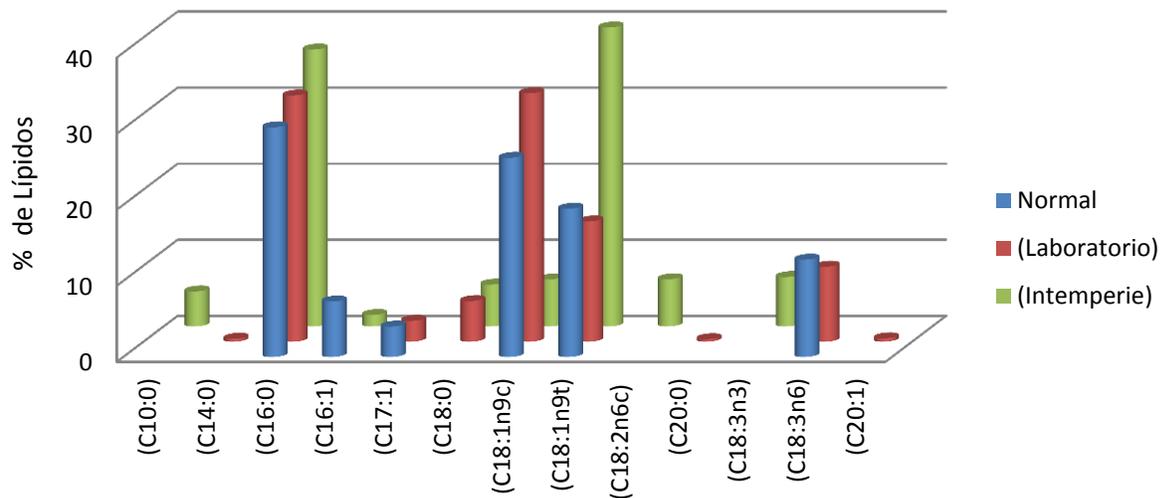
cantidad de este pigmento disminuye bajo estas condiciones (Li *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2012). Se han planteado diferentes explicaciones para ello, una indica que la disminución de clorofilas es con el propósito de reducir la cantidad de energía colectada y así disminuir la saturación del sistema de transporte eléctrico en la fotosíntesis (Raven y Geider 1988). Cuando la microalga se encuentra en un estado de suficiencia de nutrientes el alto contenido de clorofilas posibilita una alta absorción de luz. En este caso el sistema se encuentra bajo condiciones de estrés tanto nutricional como por temperatura y luz. Sin embargo, una alta cantidad de clorofila bajo una elevada cantidad de luz genera una cantidad de energía superior a la que es posible asimilar por el aparato fotosintético, la cantidad extra de energía se vuelve desfavorable en estas condiciones. Esto se debe a que la cantidad de luz absorbida debe ser disipada y por tanto desaprovechada, en forma de calor y fluorescencia además de que un alto flujo de fotones puede causar daño en el aparato fotosintético y provocar la fotoinhibición. Por lo que la estrategia que realiza *Scenedesmus obtusiusculus* al disminuir la cantidad de clorofilas le permite atenuar la cantidad de energía absorbida, también permite el paso del flujo luminoso a través del reactor ya que la atenuación es menor de tal modo que la luz puede ser aprovechada por todas la microalgas. (Rodolfi *et al.*, 2008).

Como se mencionó anteriormente, en otoño la acumulación de lípidos fue de 30% de su peso seco y presentó el siguiente perfil de lípidos (**Tabla 18**)

**Tabla 18.** Perfil de ácidos grasos de *Scenedesmus obtusiusculus*.

	% Total	Ácido graso
C10:0	4.6	Cáprico
C16:0	36.4	Palmítico
C18:1n9t	39.3	Elaidico
C18:2n6c	6.2	Linoleico
C18:0	5.5	Esteárico
C16:1	1.5	Palmitoleico
C18:3n3	6.5	$\alpha$ -Linolenico

Este perfil de lípidos es similar con el perfil de lípidos reportado por Toledo-Cervantes *et al.*, 2013 (**Figura 26**) donde la concentración de los ácidos grasos saturados y monosaturados C16 y C18 constituyen un 30% y 64% respectivamente del total. En nuestros datos se observó que las concentraciones de ácidos grasos no son similares y esto debe a la variación del régimen de luz y la temperatura que modifican el perfil (Renaud *et al.*, 2002, Boussiba *et al.*, 1987 y Aaronson, 1973).



**Figura 26.** Perfil de lípidos de *S. obtusiusculus* en condiciones de limitación. (Adaptado de Toledo Cervantes *et al.*, 2013)

Los estudios sobre acumulación de lípidos en microalgas generalmente se realizan en condiciones controladas debido a que las variaciones en el régimen de luz y temperatura afectan directamente el perfil de ácidos grasos. Xin *et al.* (2010) reportó que *Scenedesmus* sp. LX1 puede acumular lípidos por arriba de 53%. Yeh *et al.* (2011) reportan que *Chlorella vulgaris* acumula hasta 55.9% de lípidos, estos estudios se realizaron en condiciones controladas. Toledo-Cervantes *et al.*, 2013 reporta que *Scenedesmus obtusiusculus* puede acumular hasta un 55.7% de lípidos con respecto a su peso seco en condiciones de limitación y alcanzado una productividad lipídica de  $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , al comparar con los datos con los presentados en este estudio, se puede ver que están por debajo de los que se

obtuvieron en condiciones controladas. Sin embargo, Ho *et al.*, 2012, reportó que para diferentes especies de *Scenedesmus* las productividades se encuentran el rango de 22-140 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. En la **Tabla 19** se presentan las productividades de microalgas tipo *Scenedesmus*.

**Tabla 19.** Contenido lipídico y productividades de diferentes microalgas bajo diferentes condiciones de cultivo (Cultivadas en laboratorio).

Microalga	Condición de cultivo	Productividad de biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Contenido lipídico (% p. seco)	Productividad de lipídica (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Referencia
<i>Scenedesmus obliquus</i> FCTU Coimbra	Fototrófico	0.09	17.7	7.14	Mandal y Mallick, 2009
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fototrófico	0.06	12.7	35.1	Mandal y Mallick, 2009
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Mixototrófico	0.10-0.051	6.6-11.8	11.6-58.6	Rodolfi et al., 2009
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Fototrófico	0.19	18.4	20.7	Rodolfi et al., 2009
<i>Scenedesmus</i> sp. KCTC AG20831	Fototrófico	0.22	9.5	53.9	Yoo <i>et al.</i> , 2010
<i>Scenedesmus</i> sp. DM	Fototrófico	0.26	21.1	40.8	Rodolfi et al., 2009
<i>Scenedesmus</i> sp. F&M-M19	Fototrófico	0.21	31.8	17.4	Rodolfi et al., 2009
<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	Fototrófico	0.21	30	<b>53.12</b>	En este estudio

En el caso de *S. obtusiusculus* cuando es cultivada en la intemperie se observó que tiene una menor acumulación de lípidos con respecto a las cultivadas en el laboratorio. Sin embargo en la **Tabla 19** se puede observar que se encuentran entre los valores más altos de productividad lipídica en comparación con otras microalgas de la misma especie, esto significaría un menor costo energético en la obtención de lípidos para la producción de biodiesel. Por lo que es importante estudiar nuevas estrategias para aumentar la productividad lipídica.

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La caracterización de la actividad fotosintética de *Scenedesmus obtusiusculus* nos indica que es una microalga termotolerante y que su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C; asimismo resiste amplios rangos de temperatura e intensidad de luz. Los resultados demostraron que la temperatura tiene una mayor influencia sobre la actividad fotosintética.

*S. obtusiusculus* es capaz de crecer en condiciones externas con variaciones de temperatura entre 0-47 °C e intensidad de luz que pueden llegar hasta 2100  $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  y tener una alta concentración de biomasa de hasta 5.2 g L<sup>-1</sup>. Esta cepa también demostró tener capacidad de aclimatación a las condiciones ambientales. Los factores de estrés como la intensidad de luz y la temperatura que provocaron la inhibición permitieron aumentar la productividad, la tasa de crecimiento y la concentración máxima, cuando *S. obtusiusculus* se encuentra en condiciones de suficiencia de nutrientes. Aunado a esto presenta una alta eficiencia fotosintética en todas las temporadas del año en que fue cultivada.

La operación en continuo del FBR de lazo extendido mostró las más altas productividades para la generación de biomasa y ésta se puede mantener estable durante casi todas las estaciones del año, con la excepción de primavera donde la productividad se eleva debido a las condiciones climáticas, por lo que *S. obtusiusculus* tiene un gran potencial biotecnológico para su uso en la generación de biomasa para su posterior limitación para la acumulación de lípidos. Por lo que *S. obtusiusculus* tiene un gran potencial para ser cultivada en condiciones externas en zonas sub tropicales sin necesidad de un control de temperatura lo cual reduce los costos de operación.

La limitación por la fuente de nitrógeno afectó el crecimiento de *Scenedesmus obtusiusculus* y promovió altas productividades en la acumulación de lípidos siendo de 52 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, sin embargo la limitación nitrógeno provoca problemas cuando se presenta la inhibición porque la microalga no puede recuperarse por lo que se deben estudiar nuevas estrategias para evitar este fenómeno.

## PERSPECTIVAS

Actualmente el campo de investigación de las microalgas es de gran interés debido a su plasticidad metabólica, su alta velocidad de crecimiento y como una fuente para la obtención de lípidos para la producción de biodiesel. Sin embargo la producción a gran escala de biocombustibles a partir de microalgas no es económicamente viable, por lo que se busca reducir los costos de producción. Para poder hacer viable la producción de biodiesel, ésta debe estar relacionada con la generación de otros metabolitos de interés y de alto valor agregado que justifiquen el consumo de energía usado en su extracción (Wijffels *et al.*, 2010).

Por lo anteriormente mencionado se debe contar con una microalga que sea rica en productos de interés, predominante en el medio de cultivo, resistente a altas intensidades de luz y temperatura. También se deben estudiar los métodos para la separación de los diferentes bioproductos ya que ésta representa la mayor parte de los costos de producción (Yen *et al.*, 2012). *Scenedesmus obtusiusculus* ha presentado una alta resistencia a los amplios rangos de intensidad de luz y temperatura, además su alta productividad de biomasa y lipídica cuando se encuentra bajo condiciones de limitación. Debido a esto se debe estudiar otras alternativas en función de los productos que se obtienen de *S. obtusiusculus* como son las proteínas, los carbohidratos y los pigmentos. Posteriormente, llevar a cabo un estudio de los procesos de separación de los diferentes compuestos. Para finalmente acoplar estos procesos bajo el concepto de biorefinería. El desarrollo de este tipo de procesos integrados permite incrementar la viabilidad de los proyectos basados en microalgas como materia prima para la obtención de biocombustibles y compuestos de interés en general. En este contexto dentro de las del género *Scenedesmus* se han reportado la obtención de diversos productos como son luteína (*S. almeriensis*) (Ceron *et al.*, 2008), L- aminoácidos y aminoácidos (*S. almeriensis* y *S. Obliquus* (Mohamed *et al.*, 2008)), polisacáridos (*S. quadricauda*), carbohidratos (*S. obliquus* CNW-N), lípidos (*S. obtusiusculus* (Toledo *et al.*, 2013) y *Scenedesmus* sp. (Santos *et al.*, 2012).

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Acien FG, García F, Sánchez JA, Fernández JM, Molina E. (1998). Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures. Effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol Bioeng.* 58: 605-616.
- Acien FG, García F, Chisti Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Prog Ind Microbiol.* 35:231-247.
- Acien FG, Fernández JM, Molina E. (2013) Photobioreactors for the production of microalgae. *Rev Env Sci Biotechnol.* 1-21.
- Aiba S. (1982). Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv Biochem Eng.* 23: 85-156.
- Arredondo BO, Vázquez-Duhalt R. (1991). Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 99-111.
- Aaronson S. (1973). Effect of incubation temperature on the macromolecular and lipid content of the phytoflagellate *Ochromonas danica*. *J Phycol.* 9: 111-113.
- Baek SH, Shimode S, Han M-S, Kikuchi T. (2008). Growth of dinoflagellates, *Ceratium furca* and *Ceratium fusus* in Sagami Bay. Japan: the role of nutrients. *Harmful Algae* 7: 729-739.
- Béchet Q, Shilton A, Fringer OB, Muñoz R, Guieysse B. (2010). Mechanistic modeling of broth temperature in outdoor photobioreactors. *Environ Sci Technol* 44: 2197-2203.
- Béchet Q, Muñoz R, Shilton A, Guieysse B. (2013). Outdoor Cultivation of Temperature-Tolerant *Chlorella sorokiniana* in a Column Photobioreactor Under Low Power-Input. *Biotechnol Bioeng* 110: 118-126.
- Becker EW. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Bernard O, Rémond B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature affect on microalgal growth. *Bioresour Technol.* 123 520-527.
- Bitaubé E, Caro I, Pérez L. (2008). Kinetic model for growth of *Phaedolactynum tricornitum* in intensive culture photobioreactor. *Biochem Eng J.* 40: 520-525.
- Borowitzka MA (1988). Vitamins and fine Chemicals from MicroAlgae, in Micro-Algal Biotechnology, Borowitzka, M.A. & Borowitzka (1988), L.J. (eds.). Cambridge Univ. Press. Cambridge, pp: 153-196.
- Borowitzka MA (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol.* 70: 313-321.
- Borowitzka M A, Hallegraeff G. (2007). Economic Importance of Algae, In: Algae of Australia. *Australian Bio Resources.* 594-622.
- Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, Avissar Y, Richmond A (1987). Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nanochloropsis salina*. *Biomass* 12: 37-47.
- Brindley C, Acién FG, Fernández-Sevilla JM. (2010). The Oxygen Evolution Methodology Affects Photosynthetic Rate Measurements of Microalgae in Well-Defined Light Regimes. *Biotechnol. Bioeng.* 106: 228-237.
- 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.
- Camacho Rubio F, García Camacho F, Fernández Sevilla JM, Chisti Y, Molina Grima E. (2003). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol Bioeng.* 81: 459-473.
- Clément C, Lonchamp D, Rebeller M, Van Landeghem H. (1980).The development of spirulina algae cultivation. *Chem Eng Sci.* 35 (1–2): 119-126.
- Cohen Z. (1986). Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture.* Richmond A. Press, 421-454.

- Colijn F, Gieskes WWC, Zevenboom W. (1983). The measurement of primary production: Problems and recommendations. *Aquat. Biol.* 17: 29–51.
- Contreras FC, Peña CJ, Flores CL, Cañizares VR (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia.* 28: 450-456.
- Costache TA, Acien FG, Morales MM, Fernández-Sevilla JM, Stamatini I, Molina E. (2013). Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(17): 7627-7637.
- Chai-Cheng H, Jia-Jang H, Shao-Hung P, Ching-Nen N. (2012). Cultivation of a thermo-tolerant microalga in an outdoor photobioreactor: Influences of CO<sub>2</sub> and nitrogen sources on the accelerated growth. *Bioresour Technol.* 112: 228-233.
- Chaumont D. (1993) Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *J Appl Phycol.* 5: 593-604.
- Chen W, Sommerfeld M, Hu Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour Technol.* 102:135-41.
- Chini ZG, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR. (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture.* 261(3), 932-943.
- Chisti, Y. (2006) Microalgae as sustainable cell factories. *Environ Eng Manag J.* 5: 261-271.
- Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 25: 294-306.
- Chisti Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
- Dave RV, Meyer LA. (Eds.). Climate Change 2007. Cambridge University Press, U.K. & U.S.A.

- Darzins A, Pienkos P, Edey L. (2010). Current Status and Potential for Algal Biofuels Production. A REPORT TO IEA BIOENERGY TASK 39.
- de Morais MG, Costa JAV. (2007). Carbon dioxide fixation by *Clorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flask and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett.* 29:1349-1352.
- Dermoun, D., Chaumont, D., Thebault, J.M., Dauta, A.(1992). Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature. *Bioresour Technol.* 42 (2), 113-117.
- Donohoe J, Cogdell JR. (2006). Microorganisms and clean energy. *Nat Rev. Microbiol.* 4: 800-805.
- Doucha J, Livansky K. (2009). Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. *J Appl Phycol.* 21: 111-117.
- Dubinsky Z, Falkowski PG, Post AF, Van-Hes UM. (1987). A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *J Plankton Res.* 9: 607-612.
- Dubois M, Gilles DA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG. (1995). Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the PQ pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10237–41.
- Falkowski PG. (1980) Light shade adaptation in marine phytoplankton. In: Primary Productivity in the Sea (ed. P.G. Falkowski), p. 106. Plenum Press, New York.
- Falkowski PJ, Wyman K, Ley AC, Mauzerall DC. (1986). Relationship of steady-state photosynthesis to fluorescence in eukaryotic algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 849: 183-192.
- Falkowsky PJ, Raven JA. (2007). Aquatic photosynthesis, Princeton. Prienceton University Press. New Jersey.

- FAO-SDRN. (1997a). Number of Months with Average Temperature Exceeding 10C. <http://www.fao.org/nr/climpag/climate/img/3temnum.gif>
- FAO-SDRN. (1997b). Global Climate – Average Monthly Temperature of Coldest Month in °C. <http://www.fao.org/nr/climpag/climate/img/3temmin.gif>
- Fedorov AS, Kosourov S, Ghirardi ML, Seibert M (2005). Continuous H<sub>2</sub> photo-production by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel twostage, sulfate-limited chemostat system. *Appl Biochem Biotechnol.* 24: 403-412.
- Fisher T, Minnaard J, Dubinsky Z. (1996). Photoacclimation in the marine alga *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyte), kinetics study. *J Plankton Res.*18(10),1797-1818.
- Fisher T, Minnaard J, Iluz D, Dubinsky Z. (1998) The kinetics of the photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyte): A study of changes in ultrastructure and PSU density. *J Phycol.* 34, 818-824.
- Garibay HA, Vázquez-Duhalt R, Sánchez SM, Serrano CL, Martínez JA (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología* 13: 38-66.
- Gao KS, Wu YP, Li G, Wu HY, Villafane VE, Helbling EW (2007). Solar UV radiation drives CO<sub>2</sub> fixation in marine phytoplankton: a double edged sword. *Plant Physiol*,144: 54–59.
- Goldman JC. (1979) Outdoor algal mass cultures II. Photosynthetic yield limitations. *Water Res.* 13: 119–160.
- Gordon JM, Polle JEW. (2007). Ultrahigh bioproductivity from algae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 969-975.
- Hancke K, Hancke TB, Olsen LM, Johnsen G, Glud RN. (2008). Temperature effects on microalgal photosynthesis–light responses measured by O<sub>2</sub> production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and <sup>14</sup>C assimilation. *J. Phycol.* 44:501–514.
- Hall DO, Rao KK. (1999) Photosynthesis, 6th edition, Cambridge University Press, U.K. *Plant Physiol.* 144: 54-59.

- Hill R., Bendall R. (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature*, 186: 136-137.
- Ho SH, Chen WM, Chang JS (2010). *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101, 8725-8730.
- Ho SH, Chen CY, Chang JS, (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalgae *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour Technol.* 11: 244-252.
- Hu Q, Guterman H, Richmond A. (1996). A flat inclined modular photobioreactor for outdoor cultivation of photoautotrophs. *Biotechnol Bioeng.* 51: 51-60.
- Jacob-Lopes E, Lacerda LMCF, Franco TT (2008). Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nageli* in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng. J.* 40: 27-34.
- Jakob T, Wagner H, Stehfest K, Wilhelm C. (2007). A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light and nutrient-dependent variability in the metabolic cost of carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 58: 2101-2112.
- Janssen M, Slenders P, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. (2001). Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 298-305.
- Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. (2003) Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol Bioeng.* 81: 193-210.
- Jeon YC, Cho CW, Yun Y. (2006). Oxygen evolution rate of photosintetic microlagea *Haematococcus pluvialis* depending on light intensity and quality. *Stud. Surf. Sci. Catal.* 213: 121-127.
- Jiménez C, Cossio BR, Niel FX. (2003) Relationship between physicochemical variables and productivity in open pond for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture.* 221: 331-345.

- Khozin-Goldberg I. (2002). Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incise* (Trebuxiophyceae). *J. Phycol.* 38: 991-994.
- Khozin-Goldberg I, Cohen Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67: 696-701.
- Kudo I, Miyamoto M, Noiri Y, Maita Y. (2000). Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae). *J. Phycol.* 36: 1096-1102.
- Lara MA, Moreno JL, Amaro EJ. (1996). Fitoplancton: Conceptos básicos y técnicas de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- Lee YK. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J Appl Phycol*, 13 (4): 307-315.
- Lee JS, Kim DK, Lee JP, Park SC, Koh JH, Cho HS, Kim SW (2002). Effects of SO<sub>2</sub> and NO on growth of *Chlorella* species KR-1. *Bioresour Biotechnol.* 82: 1-4.
- Lehr F, Posten C. (2009). Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Curr Opin Biotech.* 20: 280-285.
- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N (2008) Biofuels from microalgae. *Biotechnol Prog* 24(4): 815-820.
- Li X, Hu H, Zhang Y. (2011) Growth and lipid accumulation properties of fresh microalga *Scenedesmus* sp under different cultivation temperature. *Bioresour Technol* 102(3): 3098-3102.
- Liu J, Huang JC, Sun Z, Zhong YJ, Jiang Y, Chen F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 102: 106-110.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Luo H, Al-Dahhan MH. (2004). Analyzing and modeling of photobioreactors by combining first principles of physiology and hydrodynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 382-393.
- MacIntyre HL, Kana T, Anning T, Geider RJ. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol.* 38: 17-38.
- Mann JE, Myers J. (1968) On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum*. *J Phycol.* 4: 349-355.
- Mandal S, Mallick N. (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 84: 281-291.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energy Rev.* 14, 217-232.
- Masojídek J, Koblížek M, Torzillo G. (2004) Photosynthesis in Microalgae. *In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* Richmond A (Ed.). Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 20–39.
- Matsunaga T, Matsumoto M, Maeda Y, Sugiyama H, Sato R, Tanaka T. (2009). Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCC GA0024. *Biotechnol Lett.* 31(9): 1367-1372.
- MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol.* 38 (1): 17-38.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy.* 34:1-5.
- Meteotest; database Meteonorm. [www.meteonorm.com](http://www.meteonorm.com)
- Miao X, Wu Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J Biotechnol.* 110: 85–93.

- Molina E, Ación Fernández FG, García Camacho F, Chisti Y. (1999) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.* 70: 231-247.
- Molina EM, Ación FG, Cmacho FG, Rubio FC, Chisti Y. (2000). Scale –up of tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12: 355-368.
- Molina Grima E, Fernández J, Ación Fernández FG, Chisti Y.(2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J Biotechnol.* 92: 113-131.
- Mohamed ZA. (2008). Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology.* 17, 504-516.
- Nedbal L, Tichy V, Xiong F, Grobbelaar JU. (1996). Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *J Appl Phycol.* 8:325–333.
- Novakovic DV, Kim Y, Wu X, Berzin I, Merchuk JC. (2005). Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant. *Chem Eng Sci* 59(14): 2899-2912.
- Ong S-Ch, Kao Ch-Y , Chiu Sh-Y, Tsai M-T, Lin Ch-Sh. (2010). Characterization of the thermal-tolerant mutants of *Chlorella* sp. with high growth rate and application in outdoor photobioreactor cultivation. *Bioresour Technol.* 101 (8): 2880–2883.
- Patterson G. (1970). Effect of temperature on fatty acid composition of *Chlorella sorokiniana*. *Lipids* 5: 597-600.
- Piorreck J, Van-Vooren G, Cogne G, Legrand J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleabundans* in photobioreactor. *Bioresour Technol.* 100: 5988-5995.
- Pulz O, Scheeibenbogen K. (1998). Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. In Scheper T., Editor. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. Vol 59: 123-152.

- Pulz O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 287-293.
- Raja R, Hemaiswarya S, Ashok Kumar N, Sridhar S, Rengasamy R. (2008) A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Crit Rev Microbiol* 34(2): 77-88.
- Raven JA, Geider RJ. (1988). Temperature and algal growth. *New Phytologist* 110: 441-461.
- 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.
- Recht L, Zarka A, Boussiba S. (2012). Patterns of carbohydrates and fatty acids changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94: 1495-1503.
- Richmond A. (1986). Cell response to environmental factors, In: Handbook of microalgal mass culture. Richmond A. *CPR Press*, pp 69-116.
- Richmond A, Lichtenberg E, Stahl B, Vonshak A. (1990). Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *J Appl. Phycol.* 2: 195–206.
- Richmond A. (2000). Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *J. Appl. Phycol.* 12: 441-451.
- Richmond A. (2004). Photosynthesis in microalgae, In: Handbook of microalgal culture. Richmond A. *CPR Press*, pp 20-40.
- Rodolfi L, Chini-Zitelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Rogner HH, Zhou D, Bradley R, Crabbé P, Edenhofer O, Hare B, Kuijpers L, Yamaguchi M. (2007). Introduction. Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment.

- Rosemberg JN, Oyler GA, Wilkinson L, Betenbaugh MJ. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin Chem Biol.* 19: 430-436.
- Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *In:* Metz B., Davidson O.R., Bosch.
- Sadava DE; Heller H, Craig O, Gordon H. (2006). Life, the *Science of Biology* (8th edición). MacMillan. p. 1114.
- Sánchez-Mirón A, Camacho FG, Gomez AC, Molina GE, Chisti Y. (1999) Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J Biotechnol.* 70: 249–270.
- Sánchez-Mirón A, Ceron-García MC, Garcia-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. *Enzyme Microbiol Technol.*31: 1015-1023.
- Sánchez JF, Fernández- Sevilla JM, Acien FG, Cerón MC, Pérez –Parra J, Molina-Grima E. (2008) Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Appl Microbiol Technol* 79: 719-729.
- Santos AM, Janssen M, Lamers PP, Ever W, Wijffels RH. (2012) Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresour Technol.* 104: 593-599.
- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussnug JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
- Sedory PE, Strenstrom MK. (1995). Dynamic prediction of wastewater aeration basin temperature. *J. Environ. Eng.* 121: 609-616.
- Singer SJ, Nicholson GL. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.

- Sobczuk TM, Chisti Y. (2010). Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85(1): 100-108.
- Solovchenko AE, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak MN (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. *J Appl Phycol.* 20: 245-251.
- Souza V, Escalante A, Espinoza L, Valera A. (2004). CUATRO CIÉNEGAS: Un laboratorio natural de astrobiología. *CIENCIAS* 67. Julio-septiembre 2004.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87-96.
- Stryer L. (1988) Biochemistry, 3rd edition, W.H. Freeman & company, New York.
- Sudhakar K, Premalatha M. (2012). Theoretical assessment of algal biomass potential for carbon mitigation and biofuel production. *Iranica J. Energy & Environ.* 3: 232-240.
- Tang HY, Abunasser N, Garcia MED, Chen M, Ng K Y S, Salley S. O. (2011). Potential resource of microalgae oil for biofuels feedstock production: *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Energy.* 88: 3324-3330.
- Tang H, Chen M, Ng S, Salley SO. (2012). Cotinuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 109: 2468-2474.
- Terry KL. (1986). Photosynthesis in modulated light: Quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol Bioeng.* 28: 988-995.
- Terry KL, Raymond LP (1985) System design for the auto-trophic production of microalgae. *Enzyme Microb Technol.* 7: 474-487.
- Toledo-Cervantes A. (2010). Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano. Tesis de Maestría, Universidad Autonoma Metropolitana- Iztapalapa.

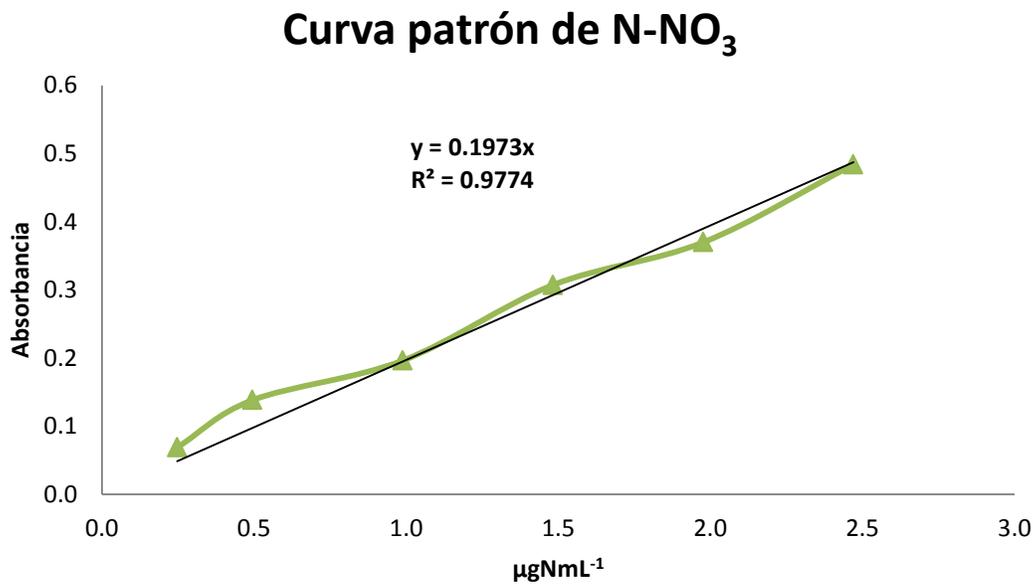
- Toledo-Cervantes A, Morales M, Novelo N, Revah S. (2013). Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130: 652-658.
- Torzillo G, Accolla P, Pinzani E, Masojidek, J. (1996) In situ monitoring of chlorophyll fluorescence to assess the synergistic effect of low temperature and high irradiance stresses in *Spirulina* cultures grown outdoors in photobioreactors. *J Appl Phycol.* 8: 283-291.
- Torzillo G, Carlozzi P, Pesspajaraj B, Montaini E, Materassi R. (1993). A Two-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 891-898.
- Tredici MR, Zittelli G. (1998) Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 57: 187-197.
- Tredici M. R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tilos for the next green revolution. *Biofuels.* 1: 143-162.
- Utting SD. (1985). Influence if nitrogen availability on the biochemical composition of three inucelular marine algae of commercial importance. *Aquacultural Eng.* 4: 175-190.
- Van Baten JM, Ellenberger J, Krishna R. (2003). Using CFD to describe the hydrodynamics of internal air lif reactors. *The Canadian J. Chem Eng.* 81: 660-668.
- Vonshak A, Torzillo G, Masojidek J, Boussiba, S. (2001) Sub-optimal morning temperature induces photoihibition in dense outdoor cultures of the alga *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta). *Plant Cell Environ*, 24: 1113-1118.
- Xin L, Hong-ying H, Ke G, Ying-xue S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresourc Technology.* 101: 5494-5500.

- Yeh KL, Chang JS. (2011). Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid production of a newly isolated microalga, *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. *Biotechnol J*. 6: 1358-1366.
- Yen, HW, Hu IC, Chen CY, Ho SY, Le DJ, Chang JS. (2012). Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresour. Technol*. 135: 166 - 174.
- Yoo C, Jun SY, Lee JY, Ahn CY, Oh HM (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour Technol*. 101: 71-74.
- Yun YS, Lee SB, Park JM, Lee CI, Yang JW (1997). Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 69: 451-455.
- Yun Y, Park JM. (2003). Kinetic modeling of the light- dependent photosynthetic activity of the green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Bioeng*. 83: 303-311.
- Walker DA (2009), Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *J. Appl. Phycol*. 21 (5), 509-517; DOI 10.1007/s10911-009-9446-5.
- Wang B, Li Y, Wu N, Lan Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*. 79: 707-718.
- Wang CY, Fu CC, Liu YC. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem Eng J*. 37: 21-25.
- Wang L, Li Y, Sommerfeld M, Hu Q. (2013). A flexible process for production of the green microalgae *Scenedesmus dimorphus* rich in protein or lipid. *Bioresour Technol*. 129: 289-295.
- Weissman JC, Goebel RP, Benemann JR. (1988). Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng*. 31: 336-344.
- Wijffels RH. (2008). Potential of sponges and microalgae for marine Biotechnology. *Trends Biotechnol*. 26: 26-31.

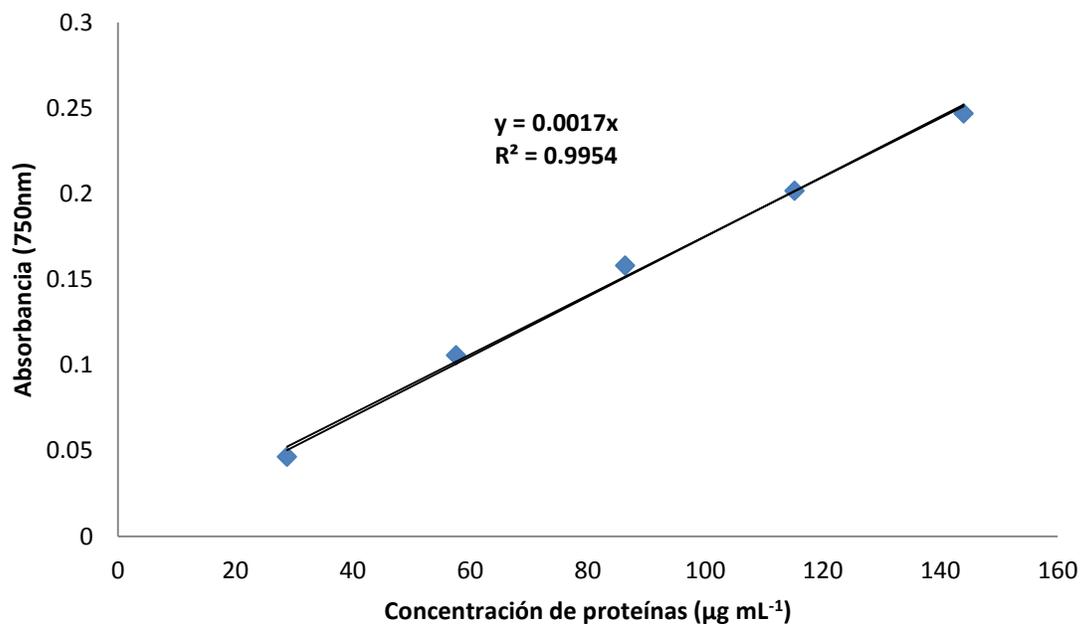
- Wijffels RH, Brabosa MJ, Eppink MH. (2010). Microalgae for the production of bulk chemical and biofuels. *Biofuels Bioprod Bioref.* 4: 287-295.
- Wilkie AC, Edmundson SJ, Duncan DJ. (2011). Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development* 15 (4): 365-371.
- Williams P. J. B., Laurens L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: Review and analysis of the biochemistry, energetics, and economics. *Energy Environ. Sci.* 3: 554-590.
- Woods DR. (2007). Rules of Thumb in Engineering Practice. *WILEY-VCH Verlag GmbH And CO. KGaA. Weinheim.*
- Wu X, Merchuk JC. (2001). A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chem Eng Sci.* 56:3527–3538.
- Wu YH, Yu Y, Xin L, Hu H-Y, Su ZF. (2012). Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorus starvation cultivation condition. *Bioresour. Technol.* 112: 193-198.
- Wu Ch, Wang W, Yue L, Yang Z, Fu Q, Ye Q. (2013). Enhancement effect of ethanol on lipid and fatty acid accumulation and composition of *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 140: 120-125.
- Zhang K, Kurano N, Miyachi S. (1999). Outdoor culture of a *cyanobacterium* with a vertical flat-plate photobioreactor: Effects on productivity of the reactor orientation, distance setting between the plates, and culture temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:781-786.
- Zevenboom W, Post AF, Van Hes UM, Mur LR. (1983). A new incubator for measuring photosynthetic activity of phototrophic microorganisms, using the amperometric oxygen method. *Limnol. Oceanogr.* 28: 787-791.

## 10. ANEXOS

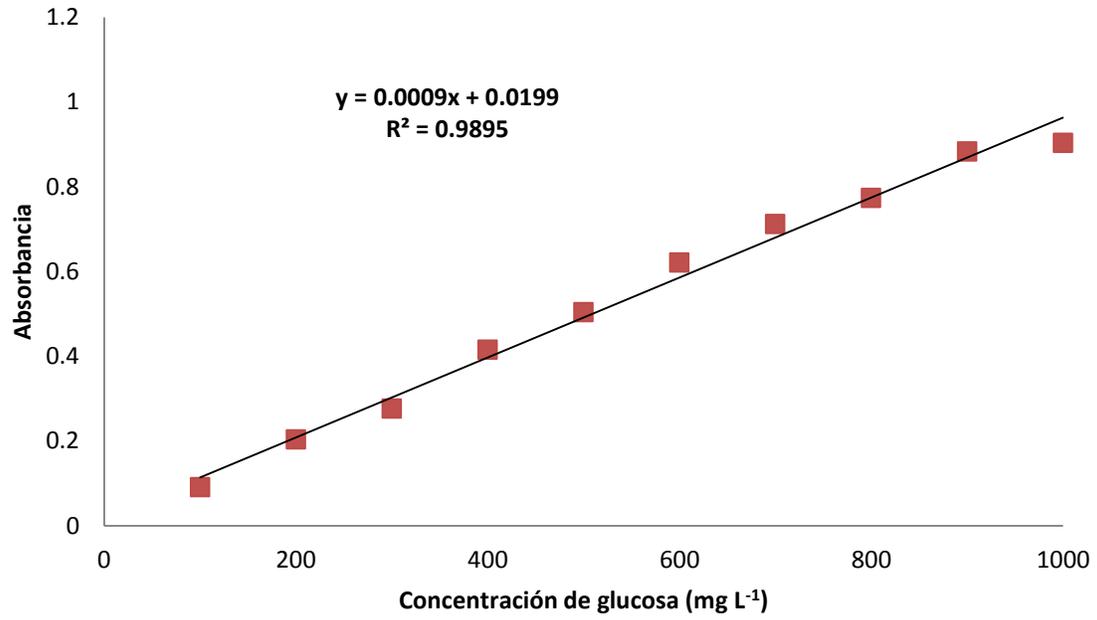
### ANEXO 1. Curva patrón de Nitratos



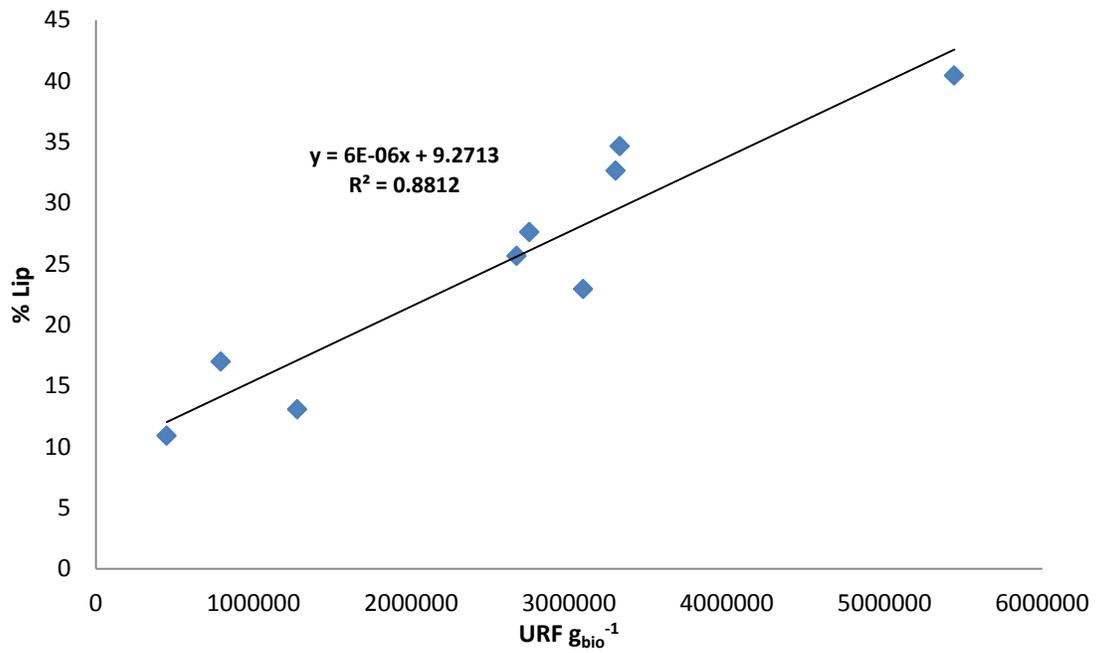
### Anexo 2. Curva patrón de proteínas (Lowry)



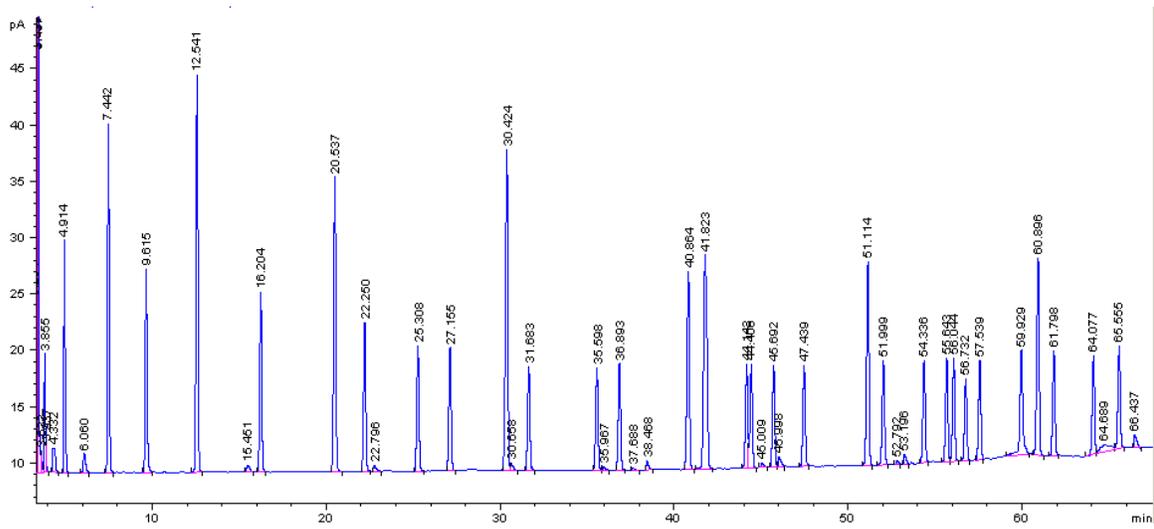
### Anexo 3. Curva de patrón de Carbohidratos (Glucosa).



### Anexo 4. Curva patrón de Lípidos.



## Anexo 5. Curva estándar de FAMES



## Anexo 6. Cua de Arrhenius

