

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

Caracterización de fotobiorreactores tipo air-lift para  
la producción de biomasa de un consorcio  
microbiano fotosintético

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA  
MODALIDAD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA:

**DULCE JAZMIN HERNANDEZ MELCHOR**

DIRECTOR EXTERNO: Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva  
DIRECTOR INTERNO: Dr. Sergio García Salas

México, D.F. Mayo 2007

## CONTENIDO

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Resumen  | 1      |
| 2. Introducción   | 2      |
| 2.1. Variación estructural  | 2      |
| 2.2. Ecología y evolución   | 3      |
| 2.3. Ciclo del nitrógeno  | 3      |
| 2.4. Fijación de nitrógeno  | 4      |
| 2.5. Consorcios microbianos   | 4      |
| 2.6. Consideraciones generales de los fotobiorreactores   | 6      |
| 2.7. Aplicaciones del cultivo de microalgas   | 9      |
| 2.7.1. Biofertilizantes   | 10     |
| 2.8. Repercusiones ambientales por el uso excesivo de fertilizantes químicos                        | 11     |
| 3. Justificación  | 12     |
| 4. Hipótesis  | 12     |
| 5. Objetivos generales  | 12     |
| 5.1. Objetivos específicos  | 12     |
| 6. Alcance  | 13     |
| 7. Materiales y Métodos   | 13     |
| 7.1. Microorganismos  | 13     |
| 7.2. Fotobiorreactor  | 13     |
| 7.2.1. Líquidos y medio de cultivo utilizados en el fotobiorreactor                                 | 14     |
| 7.2.2. Crecimiento de <i>Arthrospira</i> sp. en el fotobiorreactor                                  | 15     |
| 7.2.3.. Condiciones de operación del fotobiorreactor  | 15     |
| 7.2.4. Métodos para la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor | 16     |

|   |    |
|---|----|
| 7.2.5. Preparación del fotobiorreactor previo a su operación  | 17 |
| 7.3. Establecimiento, propagación y selección de consorcios microbianos en el laboratorio   | 17 |
| 7.3.1. Muestreo en un campo arrocero de Alpuyeca Morelos, México  | 17 |
| 7.3.2. Evaluación del desempeño biológico de los consorcios microbianos   | 18 |
| 8. Resultados y Discusión   | 19 |
| 8.1. Caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor   | 19 |
| 8.1.1. Tiempo de mezclado   | 23 |
| 8.1.2. Resultados del crecimiento de <i>Arthrospira</i> sp. en el fotobiorreactor   | 24 |
| 8.2. Establecimiento, propagación y selección de consorcios microbianos en laboratorio  | 26 |
| 8.2.1. Muestreo en un campo arrocero de Alpuyeca Morelos, México  | 26 |
| 8.2.2. Resultados globales y específicos del desempeño biológico de los cultivos  | 27 |
| 8.2.3. Observaciones al microscopio óptico como apoyo en la identificación de los géneros presentes en los consorcios microbianos | 32 |
| 9. Conclusiones   | 35 |
| 10. Cronograma de actividades   | 36 |
| 11. Referencias   | 37 |
| ANEXO I   | 40 |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Ciclo del nitrógeno  | <b>4</b>      |
| 2. Fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift  | <b>13</b>     |
| 3. Coeficiente de transferencia de masa ( $k_L a$ ) contra flujo de aire en un intervalo de 5 a 50 L/min                                    | <b>20</b>     |
| 4. Coeficiente de transferencia de masa referido a $CO_2$ ( $k_{LaCO_2}$ ) contra flujo de aire en un intervalo de 5 a 50 L/min             | <b>21</b>     |
| 5. Tiempo de mezclado contra flujo de aire  | <b>24</b>     |
| 6. Coeficiente de transferencia de masa ( $k_L a$ ) contra flujo de aire en un intervalo de 10 a 50 L/min utilizando <i>Arthrospira</i> sp. | <b>25</b>     |
| 7. Campo arrocero de Alpuyeca, Morelos  | <b>27</b>     |
| 8. Punto 1 de muestreo  | <b>27</b>     |
| 9. Punto 3 de muestreo  | <b>27</b>     |
| 10. Punto 4 de muestreo   | <b>27</b>     |
| 11. Punto 6 de muestreo   | <b>27</b>     |
| 12. Cultivo 6   | <b>30</b>     |
| 13. Cultivo 6 <sub>b</sub>  | <b>30</b>     |
| 14. Cultivo 6 <sub>b</sub> día 25 (400x)  | <b>34</b>     |

## LISTA DE TABLAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Microorganismos fijadores de nitrógeno   | <b>5</b>      |
| 2. Ventajas y desventajas de los sistemas de reactores abiertos y cerrados  | <b>7</b>      |
| 3. Configuración geométrica del fotobiorreactor utilizado   | <b>14</b>     |
| 4. Composición del medio de cultivo Zarrouk   | <b>14</b>     |
| 5. Condiciones para el crecimiento de <i>Arthrospira</i> sp. en el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift  | <b>15</b>     |
| 6. Condiciones de operación del fotobiorreactor   | <b>16</b>     |
| 7. Parámetros y métodos para la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor  | <b>16</b>     |
| 8. Composición del medio de cultivo BG-11 <sub>0</sub> (Rippka <i>et al.</i> , 1979)  | <b>17</b>     |
| 9. Metodologías analíticas para la evaluación del desempeño biológico de los consorcios microbianos   | <b>18</b>     |
| 10. Cronograma de escalamiento de los cultivos  | <b>19</b>     |
| 11. Resultados globales de la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa en el fotobiorreactor con un sistema aire-agua   | <b>20</b>     |
| 12. Localización del punto de inflexión del coeficiente de transferencia de masa del fotobiorreactor mediante la comparación de las pendientes entre puntos subsecuentes de valores del $k_{L,a}$ | <b>21</b>     |
| 13. Comparación de los coeficientes de transferencia de masa ( $k_{L,a}$ ) de diferentes fotobiorreactores  | <b>22</b>     |
| 14. Tiempos de mezclado obtenidos a diferentes flujos de aire en el fotobiorreactor   | <b>23</b>     |
| 15. Resultados de la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa en el fotobiorreactor utilizando <i>Arthrospira</i> sp.   | <b>24</b>     |
| 16. Condiciones iniciales de los cultivos en 250 mL   | <b>26</b>     |

|  |           |
|--|-----------|
| 17. Resultados globales del desempeño biológico de los cultivos en los Periodos 1 y 2                      | <b>28</b> |
| 18. Resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en los Periodos 1 y 2                    | <b>28</b> |
| 19. Resultados globales del desempeño biológico de los cultivos en el Periodo 3                            | <b>29</b> |
| 20. Resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en el Periodo 3                          | <b>29</b> |
| 21. Resultados de la evaluación del coeficiente de transferencia de masa en las columnas de burbuja de 2 L | <b>31</b> |
| 22. Resultados globales del desempeño biológico de los cultivos en el Periodo 4                            | <b>31</b> |
| 23. Resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en el Periodo 4                          | <b>32</b> |
| 24. Géneros de microorganismos presentes en los cultivos en los diferentes periodos de estudio             | <b>33</b> |

## **LUGAR DE REALIZACIÓN**

CINVESTAV-IPN

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Laboratorio de Biotecnología de Microalgas

## **AGRADECIMIENTOS**

Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

Dr. Sergio García Salas

M. en C. Leobardo Ordaz Contreras

M. en C. Rodolfo Reyna Velarde

Pas. Biol. Maribel Vázquez Hernández

Por su apoyo y colaboración para la realización del presente trabajo.

## 1. Resumen

Las cianobacterias son un grupo grande y heterogéneo, de microorganismos de gran importancia ecológica y económica (Brock, 1993; Thajuddin y Subramanian, 2005), debido a que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica y además, un gran número de ellas son capaces de fijar nitrógeno en ambientes acuáticos y terrestres, principalmente en cultivares de arroz (Venkataraman, 1981). Los microorganismos fototróficos como las cianobacterias producen una gran variedad de compuestos útiles para el ser humano, tales como pigmentos, vitaminas, biofertilizantes, insumos para acuicultura, etc., además de reducir la cantidad de CO<sub>2</sub> en la atmósfera al utilizar este compuesto como principal fuente de carbono para sus procesos biológicos. Desafortunadamente en la actualidad son muy usados los fertilizantes químicos nitrogenados en los cultivos agrícolas, los cuales causan un impacto altamente negativo al ambiente, motivo por que se desarrolla la presente investigación que tiene como principal objetivo implementar la producción de biofertilizantes basados en la utilización de consorcios microbianos fotosintéticos en fotobiorreactores de cara plana tipo air-lift. Se realizó un muestreo en un campo arrocero de Alpuyecá Morelos, México, con la finalidad de establecer, propagar y seleccionar el consorcio más apto para la fijación de nitrógeno, mismo que posteriormente se cultivará en un fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift de 52 L de capacidad total. Previo al cultivo del consorcio se llevó a cabo la evaluación hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift y se determinaron las condiciones de cultivo más adecuadas para la producción de biomasa como biofertilizante.

Se obtuvo un valor del coeficiente de transferencia de masa ( $k_L a$ ) de 17.64 a 18 hr<sup>-1</sup> con un flujo de aire de 25 a 30 L/min, este intervalo nos permitirá obtener la mayor transferencia de masa sin la necesidad de someter al consorcio a un estrés innecesario que pueda afectar su crecimiento. En base a la relación establecida por Talbot *et al.* (1990) y Treybal (1987) que relaciona el  $k_L a$  y el  $k_L a_{CO_2}$  se obtuvo un valor del coeficiente de transferencia de masa referido a CO<sub>2</sub> ( $k_L a_{CO_2}$ ) de 14.482 a 14.778 hr<sup>-1</sup> en el intervalo de flujo antes mencionado; el valor del gas hold-up obtenido a 25 y 30 L/min corresponde a 0.020446 y 0.022263 respectivamente lo que nos da una referencia del tiempo de residencia del gas en el líquido. El valor del tiempo de mezclado osciló entre 12 y 6 s con flujos de aire de 20 y 30 L/min respectivamente, con lo que podemos predecir una distribución de nutrientes eficiente, logrando un 95% de homogeneidad dentro del reactor.

Para el establecimiento, selección y propagación de los cultivos, se muestreó en 6 puntos diferentes del campo arrocero antes mencionado, tomando muestras de suelo, tallo y agua de anegamiento. Las muestras fueron suspendidas en medio mineral BG-11<sub>0</sub>, se tomaron en cuenta solo 2 puntos de muestreo de acuerdo a las características observadas en campo (color, burbujeo, etc.). Los puntos elegidos fueron el 3 y 6 a partir de los cuales las suspensiones fueron colocadas inicialmente en matraces de 250 mL e incubadas a dos diferentes temperaturas (28 y 21°C) con un flujo de aire de 1.5 vvm por un periodo de 45 días (Periodo 1). Pasado este tiempo se hizo un escalamiento en matraces de 500 mL (Periodo 2) y 1 L (Periodo 3) con un tiempo de incubación de 60 días cada uno. Durante los experimentos se evaluaron parámetros como crecimiento, contenido de clorofilas, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> producido y a partir del periodo 3 se evaluó la actividad de nitrogenasa para lograr mayor esclarecimiento sobre el desempeño biológico de los cultivos en cuanto al proceso de fijación de nitrógeno; de acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que el cultivo 6 incubado a 21°C y 28 °C obtuvo los mejores resultados para los fines perseguidos, por lo que se procedió al escalamiento en 2 L (Periodo 4) tan sólo del punto 6 a ambas temperaturas en columnas de burbujas (Vega-Estrada *et al.*, 2005). Los resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en el Periodo 4 fueron: Cultivo 6 (Chla=13.4 x10<sup>3</sup> mg / mg peso seco, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>=1.4 µg / mg peso seco, Actividad de nitrogenasa= 8.6 µg Eteno/mg peso seco); Cultivo 6<sub>b</sub> (Chla= 8.7 x10<sup>3</sup> mg / mg peso seco, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>= 3.3 µg / mg peso seco, Actividad de nitrogenasa= 15.3 µg Eteno/mg peso seco). Para la identificación de las especies dentro del consorcio, se realizó un seguimiento microscópico de cada uno de ellos y con ayuda de claves taxonómicas se compararon las especies presentes para tratar de realizar la identificación; se encontró que a partir del día 67 existen al menos especies de 3 géneros que aparecen constantemente en las observaciones: *Nostoc*, *Anabaena*, *Planktothrix* además de bacterias.

Podemos concluir hasta el momento que es posible producir biomasa capaz de fijar nitrógeno en fotobiorreactores de hasta 2 L de capacidad, a partir de un consorcio fotosintético tomado de muestreos en campos arroceros, para su posterior utilización como biofertilizante.

## 2. Introducción

Las cianobacterias comprenden un grupo grande y heterogéneo de organismos fotótrofos oxigénicos de naturaleza procariótica (Brock, 1993).

La diversidad morfológica de las cianobacterias es considerable, ya que los estudios taxonómicos recientes las dividen en los siguientes grupos: unicelulares que se dividen por fisión binaria; unicelulares, que se dividen por fisión múltiple; filamentosas, que contienen células denominadas heterocitos que resultan esenciales para llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

Las dimensiones de las células cianobacterianas fluctúan desde 0.5 a 1  $\mu$  m de diámetro (tamaño característico de las bacterias), hasta 60  $\mu$  m de diámetro en la especie *Oscillatoria princeps* que son las células más grandes que se conocen entre los procariotes (Brock, 1993).

Las cianobacterias difieren de los procariotes en la composición de sus ácidos grasos, ya que con frecuencia poseen ácidos grasos no saturados con dos o más dobles enlaces.

La fina estructura de la pared celular de algunas cianobacterias es semejante a la de las bacterias Gram (-). La membrana lamelar fotosintética es a menudo compleja y multilaminada, aunque en algunas de las cianobacterias más simples, las lamelas se ordenan de manera regular en círculos concéntricos alrededor de la periferia del citoplasma. Las cianobacterias tienen sólo una forma de clorofila, la clorofila *a*, y todas tienen también pigmentos biliproteínicos característicos: las ficobilinas, que funcionan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis. Una clase de ficobilinas, las ficocianinas, son azules y su absorción máxima de luz se ubica entre los 625 y los 630 nm y junto con la clorofila *a*, son responsables del color verde-azul de las cianobacterias. Sin embargo, algunas cianobacterias producen ficoeritrina, una ficobilina roja que absorbe la máxima intensidad de luz entre 570 y 580 nm, las bacterias que poseen este pigmento son de color rojo o café (Brock, 1993).

### 2.1. Variación estructural

Algunas cianobacterias forman heterocitos, que son células redondas y por lo general se encuentran distribuidas de manera individual a lo largo de un filamento o en el extremo del mismo; los heterocitos son los sitios principales de fijación de nitrógeno (Brock, 1993).

Los heterocitos tienen conexiones intracelulares con las células vegetativas adyacentes y existe un intercambio entre estas células de materiales producto de la fotosíntesis, los cuales se mueven de las células vegetativas hacia los heterocitos y los productos de fijación del nitrógeno formados en ellos, pasan a las células vegetativas. Los heterocitos tienen baja concentración de ficobilina y carecen de fotosistema II, que es el que produce oxígeno. Debido a la naturaleza

reductiva de la fijación de nitrógeno y a la sensibilidad de la enzima nitrogenasa al oxígeno, parece probable que el heterocito, al mantener un ambiente anaerobio, haga posible la estabilización del sistema fijador de nitrógeno, en organismos que no son solo aerobios, sino también productores de oxígeno. También es posible que algunas cianobacterias filamentosas no heterocíticas, produzcan nitrogenasa y fijen nitrógeno en las células vegetativas normales, si crecen en forma anaerobia (Brock, 1993).

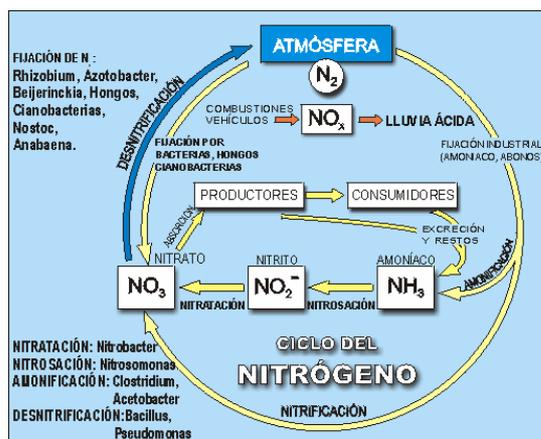
## **2.2. Ecología y evolución**

Las cianobacterias tienen una distribución muy extensa en la naturaleza, en la tierra y en el hábitat marino. En general, son más tolerantes a los extremos ambientales que las algas eucarióticas y a menudo son los únicos organismos fotosintéticos de los manantiales de agua caliente, lagos salinos y otros entornos extremos. Se encuentran en la superficie de las rocas, o en el suelo; en los desiertos permanecen en estado latente durante la mayor parte del año y crecen en el invierno (Brock, 1993).

Las cianobacterias son un grupo grande y heterogéneo, de microorganismos de gran importancia ecológica y económica (Brock, 1993; Thajuddin y Subramanian, 2005), debido a que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica y además, un gran número de ellas son capaces fijar nitrógeno en ambientes acuáticos y terrestres, principalmente en cultivos de arroz (Venkataraman, 1981). También son importantes, ya que constituyen un valioso recurso para aplicaciones en las industrias de alimentos, médica, de los energéticos, agrícola y para combatir la contaminación. En los últimos años han habido grandes avances en la biotecnología de cianobacterias (Thajuddin y Subramanian, 2005).

## **2.3. Ciclo del nitrógeno**

En contraste con el carbono, otros elementos tales como el nitrógeno y el azufre, son tomados por los seres vivos en forma de sales minerales y después son reciclados oxidoreductivamente. El mejor estudiado de dichos ciclos y quizás el más complejo es el *Ciclo del Nitrógeno*, cuyo interés estriba en que el nitrógeno es el nutriente mineral de mayor demanda por los microorganismos y plantas. Este elemento conforma aproximadamente el 12% del peso seco total de la célula y su ciclo incluye varios procesos catalizados por microorganismos, como la oxidación del amonio, la reducción del nitrato, la amonificación y la fijación del nitrógeno. El proceso general del ciclo del nitrógeno se muestra en la figura 1.



Fuente: Brock, 1993

Figura. 1. Ciclo del nitrógeno

## 2.4. Fijación de nitrógeno

La utilización de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) como fuente de este elemento, se denomina “fijación de nitrógeno” y es una propiedad que poseen sólo algunas bacterias y cianobacterias. Además, existen algunas bacterias llamadas simbióticas, que fijan este gas sólo cuando están presentes en los nódulos o en las raíces de algunas plantas huéspedes específicas (Brock, 1993).

En el proceso de fijación de  $N_2$ , éste es reducido a amonio que posteriormente es convertido a forma orgánica. El proceso de reducción es catalizado por la enzima nitrogenasa, que consta de dos componentes proteicos separados que se llaman dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa.

La fijación de nitrógeno es un proceso sumamente reductor en la naturaleza y es inhibido porque la dinitrogenasa reductasa se inactiva rápida e irreversiblemente en presencia de  $O_2$  (Brock, 1993).

La fijación de nitrógeno también puede llevarse a cabo químicamente en la atmósfera, mediante las descargas eléctricas, aunque en un grado muy pequeño, y también tiene lugar una cantidad limitada de fijación de nitrógeno, durante la producción industrial de fertilizantes nitrogenados. Aproximadamente el 85 % de la fijación de nitrógeno sobre la Tierra es de origen biológico (Brock, 1993).

## 2.5. Consorcios microbianos

Se denomina *consorcio* a un sistema de dos o más miembros en el cual cada organismo hace algo en beneficio de otro (Brock *et al.*, 2003).

La fijación de nitrógeno es una propiedad exclusiva de algunos procariotes, hasta la fecha no se conoce ningún organismo eucarionte capaz de realizar esta función. En la Tabla 1 se presenta una lista de microorganismos fijadores de nitrógeno.

Tabla 1. Microorganismos fijadores de nitrógeno

| Aerobios libres  |   |                           |
|--|---|---------------------------|
| Quimioorganótrofos   | Fotótrofos  | Quimiolitótrofos          |
| <b>Bacterias:</b>  | <b>Cianobacterias:</b>  | <i>Alcaligenes</i> sp.    |
| <i>Azotobacter</i> sp.   | <i>Anabaena</i> sp.   | <i>Thiobacillus</i> sp.   |
| <i>Klebsiella</i> sp.  | <i>Nostoc</i> sp.   |                           |
| <i>Beijerinckia</i> sp.  | <i>Fischerella</i> sp.  |                           |
| <i>Bacillus polymixa</i>   | (otras)   |                           |
| <i>Mycobacterium flavum</i>  |   |                           |
| <i>Azospirillum lipoferum</i>  |   |                           |
| <i>Citrobacter freundii</i>  |   |                           |
| <i>Acetobacter diazotrophicus</i>  |   |                           |
| <i>Methylomonas</i> sp.  |   |                           |
| <i>Methylococcus</i> sp.   |   |                           |
| Anaerobios libres  |   |                           |
| Quimioorganótrofos   | Fotótrofos  | Quimiolitótrofos          |
| <b>Bacterias:</b>  | <b>Bacterias:</b>   | <b>Archaea:</b>           |
| <i>Clostridium</i> sp.   | <i>Chromatium</i> sp.   | <i>Methanosarcina</i> sp. |
| <i>Desulfovibrio</i> sp.   | <i>Thiocapsa</i> sp.  | <i>Methanococcus</i> sp.  |
| <i>Desulfomaculum</i> sp.  | <i>Chlorobium</i> sp.   |                           |
|  | <i>Rhodospirillum</i> sp.   |                           |
|  | <i>Rhodopseudomonas</i> sp.   |                           |
|  | <i>Rhodomicrobium</i> sp.   |                           |
|  | <i>Rhodophila</i> sp.   |                           |
|  | <i>Rhodobacter</i> sp.  |                           |
|  | <i>Heliobacterium</i> sp.   |                           |
|  | <i>Heliobacillus</i> sp.  |                           |
|  | <i>Heliophilum</i> sp.  |                           |
| Simbióticos  |   |                           |
| Plantas leguminosas  | Plantas no leguminosas  |                           |
| Soya, chícharo, trébol, etc., en asociación con una bacteria del género <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , o <i>Azorhizobium</i> | <i>Alnus</i> , <i>Myrica</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Casuarina</i> , en asociación con actinomicetos del género <i>Frankia</i> |                           |

(Brock et al., 2003)

## 2.6. Consideraciones generales de los fotobiorreactores

La biotecnología de microalgas ha progresado a un ritmo relativamente lento, a pesar de su reconocida utilidad como fuente de compuestos de alto valor agregado para las industrias alimentaria y farmacéutica (Barbosa *et al.*, 2003). Un factor limitante en dicho progreso ha sido la poca eficiencia de las técnicas de cultivo de microalgas a gran escala. Los requerimientos de las microalgas han llevado a poner énfasis en el desarrollo de fotobiorreactores, sin embargo para poder desarrollar sistemas eficientes, a gran escala y de bajo costo, se deben resolver aún muchos problemas ingenieriles (Tredici *et al.*, 1991; Barbosa *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2003).

Existen dos sistemas básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos (Grobbelar, 2000), los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera, entre los que podemos citar a las lagunas abiertas, los sistemas inclinados, lagunas circulares y de carrusel (Tredici, 2004); y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera. Estos sistemas han sido evaluados en sus diversas configuraciones con respecto a su potencial de productividad y factibilidad económica.

Los fotobiorreactores son construidos con materiales transparentes como vidrio y policarbonato, entre otros. Algunas investigaciones sobre fotobiorreactores han sido llevadas a cabo por Pirt *et al.*, (1983), Gudín y Chaumont (1983) y Torzillo *et al.*, (1986).

En la última década los fotobiorreactores tubulares y de placas planas, han recibido entre otros, mucha atención, ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular (3 o más veces) en comparación con los sistemas convencionales de carrusel. Entre las ventajas más importantes de los fotobiorreactores están:

- 1) Facilidad para cosechar la biomasa
- 2) Mantenimiento del cultivo libre de contaminación
- 3) Mejor control de las condiciones de cultivo
- 4) Menor inversión de capital en el fotobiorreactor

Al parecer no existen actualmente de manera comercial, sistemas de fotobiorreactores tipo columna de burbujas ó tipo air-lift, excepto para propósitos de investigación, sin embargo, debido a sus ventajas potenciales en relación a los sistemas tubulares convencionales, es necesario desarrollar a nivel industrial sistemas en configuración de columna de burbujas ó air-lift, que ya han demostrado un desempeño prometedor en cultivos a la intemperie de microalgas a nivel laboratorio (Sanchez-Mirón *et al.*, 2000).

En la Tabla 2 se muestran las principales ventajas y desventajas de cada sistema.

**Tabla 2. Ventajas y desventajas de los sistemas de reactores abiertos y cerrados**

| <b>Parámetro</b>   | <b>Sistemas Abiertos</b>                                  | <b>Sistemas Cerrados</b>                            |
|--|---|---|
| Riesgo de contaminación  | Extremadamente alto                                       | Bajo  |
| Espacio requerido  | Alto  | Bajo  |
| Pérdidas por evaporación   | Extremadamente alto                                       | Casi ninguno  |
| Pérdidas de CO <sub>2</sub>  | Alto  | Casi ninguno  |
| Calidad de Biomasa   | No susceptible a control                                  | Susceptible a control                               |
| Variabilidad entre especies cultivables  | Las posibilidades se restringen a unas cuantas variedades | Casi cualquier variedad                             |
| Flexibilidad de producción   | Cambios de productividad entre especies es casi imposible | Cambios de producción sin problemas                 |
| Reproducibilidad de parámetros de producción   | Dependiente de condiciones exteriores                     | Posible, con cierta tolerancia                      |
| Control de procesos  | No susceptible  | Susceptible   |
| Estandarización  | Imposible   | Posible   |
| Dependencia de condiciones climáticas  | Absoluta, producción imposible en temporada de lluvias    | Insignificante, producción posible aun en mal clima |
| Período necesario para alcanzar máxima producción desde el arranque o desde interrupciones | Largo (6-8 semanas)                                       | Relativamente corto (2-4 semanas)                   |
| Concentración de biomasa   | 0.1-0.2 g / L   | 2-8 g / L   |
| Eficiencia de procesos de tratamiento  | Baja, TRH largos  | Alta, TRH cortos                                    |

Tredici (2004)

El diseño de fotobiorreactores involucra varias consideraciones operacionales y estructurales, reacciones cinéticas y aspectos hidrodinámicos tales como fenómenos de transporte, transferencia de masa, velocidad superficial del gas, fracción de gas retenido, adicionalmente, el fotobiorreactor debe tener una buena capacidad de mezclado, para llevar a cabo una distribución homogénea de oxígeno y otros nutrientes dentro del fluido y así de ésta manera evitar zonas muertas, al igual de tener una eficiente transferencia de calor (Chisti, 1989).

A continuación se presenta una breve descripción de algunos de los parámetros antes mencionados:

El coeficiente de transferencia de oxígeno ( $k_La$ ) es un parámetro muy importante, utilizado para comparar la capacidad de transferencia de oxígeno de biorreactores aireados. El  $k_La$  varía con la intensidad de agitación, velocidad de aireación, área interfacial líquido-gas y las propiedades reológicas del medio de cultivo.

Existen diversos métodos para determinar el  $k_La$  como lo son el método de oxidación del sulfito de sodio, método directo, método del coeficiente de producción de oxígeno, entre otros, cada uno con sus ventajas y desventajas.

El método directo se basa principalmente en el balance dinámico de oxígeno en un cultivo por lote y está definido por la siguiente ecuación:

$$(dC_L/dt) = k_La(C^* - C_L) - Q_{O_2}X \quad \dots(1)$$

donde  $Q_{O_2}$  es la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de masa celular ( $m M O_2 g^{-1} h^{-1}$ ). En un biorreactor abiótico, el último término de la ecuación es cero, por lo que integrando se obtiene:

$$\ln(C^* - C_L) = -k_Lat + \text{constante} \quad \dots(2)$$

graficando  $\ln(C^* - C_L)$  vs.  $t$  obtendremos una línea recta, cuya pendiente será el valor de  $k_La$  (Moo-Young, 1985).

El valor de  $k_La_{CO_2}$  es el coeficiente de transferencia de masa referido al  $CO_2$  transferido en el biorreactor. Se determina mediante las siguientes correlaciones:

$$K_La_{CO_2} = k_La[D_{CO_2}/D_{O_2}]^{0.5} \quad (\text{Talbot } et al., 1990) \quad \dots(3)$$

$$[D_{CO_2}/D_{O_2}]^{0.5} = 0.821 \quad (\text{Treybal, 1987}) \quad \dots(4)$$

La velocidad superficial del gas ( $U_G$ ) es considerada una variable de operación dependiente del flujo y la configuración de cada fotobiorreactor; se estima relacionando el flujo de aire inyectado al fotobiorreactor con el área de la sección recta total del mismo (Chisti, 1989).

$$U_G = \text{Flujo de aire} / \text{Area} \quad \dots(5)$$

$$A = \text{Ancho} * \text{Largo} \quad \dots(6)$$

Otra forma de estimar la velocidad superficial es mediante la correlación propuesta por Sánchez-Mirón *et al.* (2000), donde:

$$U_G = \left( \frac{0.837}{k_La} + 1 \right)^{-1.029} \quad \dots(7)$$

lo que nos dará una medida indirecta de los esfuerzos de corte experimentados por la biomasa.

El tiempo de mezclado ( $t_{\text{mezclado}}$ ) en un biorreactor nos dará una medida de la eficiencia en la distribución de los nutrientes y el oxígeno para los microorganismos y está definido como el tiempo necesario para alcanzar un 95 % de homogeneidad en el sistema, de tal modo que se eviten zonas muertas en el biorreactor.

La fracción retenida de gas ó “gas hold-up” ( $\varepsilon_G$ ) está definida como la fracción volumétrica de la fase gas en la dispersión gas-líquido; se evalúa de acuerdo al método de diferencia de volumen propuesto por Chisti (1989):

$$\varepsilon_G = \frac{V_G}{V_G + V_L} \dots(8)$$

donde  $V_G$  y  $V_L$  son los volúmenes de gas y de líquido en el biorreactor respectivamente. Su importancia radica en que mediante este parámetro podemos tener una referencia del tiempo de residencia del gas en el líquido, lo que aunado al tamaño de las burbujas, ejerce un influencia directa sobre el área interfacial gas-líquido disponible para la transferencia de masa (Chisti, 1989).

En resumen, el principal propósito de un fotobiorreactor es suministrar las condiciones ambientales para que el microorganismo lleve a cabo su metabolismo de manera óptima. En biorreactores aerobios el factor crítico limitante a suministrar en el medio es la transferencia de oxígeno. Una velocidad de transporte de oxígeno adecuada debe ser llevada acabo bajo ciertas condiciones de agitación. Otros requerimientos operacionales tales como la esterilización del fotobiorreactor, el consumo de energía y aspectos económicos deben ser considerados en su diseño (Chisti, 1989).

## 2.7. Aplicaciones del cultivo de microalgas

En la década de los años 50 se postuló por primera vez que el empleo de la luz solar y agua marina, para obtener cultivos masivos de microalgas ricas en proteína de alta calidad, podría ser una buena alternativa para obtener alimentos para el ser humano (Becker, 1994). Con el transcurso de los años se pudieron diversificar las áreas donde las microalgas eucariotas (Vilchez *et al.*, 1997) y cianobacterias (Prósperi, 2000; Morales *et al.*, 2002) cultivadas masivamente, tienen un gran potencial biotecnológico para la producción de sustancias que contribuyen al desarrollo en áreas tales como alimentos, cosméticos, farmacéutica, alimentación, agricultura, acuicultura y el medio ambiente (Soeder 1986; Borowitzka 1988; Borowitzka 1992; Sirenko y Pulz 2000; Tsoglin y Gabel, 2000).

Actualmente, tanto las macro como las microalgas tienen un papel importante en la economía mundial con una aportación aproximada de 5 billones de dólares por año (Pulz, 2001). Existen trabajos realizados a nivel mundial que han empleado cianobacterias en procesos biotecnológicos, pero se han hecho exclusivamente

con especies de los géneros *Spirulina* para la obtención de diversos metabolitos y con *Nostoc* y *Anabaena* como biofertilizantes (Richmond, 1987), los cuales mejoran las condiciones del suelo y regulan el crecimiento de las plantas vasculares (Prósperi, 1999).

### **2.7.1. Biofertilizantes**

La mejor descripción de biofertilizantes es la de microorganismos que adicionan, conservan y movilizan los nutrientes de la cosecha en la tierra, lo que induce una dirección eficaz de los nutrientes para obtener una mejor producción de la cosecha. Los microorganismos utilizados como biofertilizantes corresponden a bacterias tales como *Rhizobium*, *Azotobacter*, entre otras; además de algas verde-azules las cuales son un grupo de procariotes considerado como plantas microscópicas fotosintéticas de las cuales tenemos las divisiones Myxophyceae y Cyanophyceae (Goyal, 2002).

Las cianobacterias son procariotes fotosintéticos que juegan un papel vital en el aumento de la fertilidad del suelo donde la baja concentración de nitrógeno frecuentemente restringe el crecimiento de la planta. Un ecosistema de este tipo es el cultivo de arroz, donde la fijación de nitrógeno por las cianobacterias es llevada a cabo de manera eficiente; por lo que a través de los años ha aumentado el interés en entender la factibilidad de usar inóculos de cianobacterias como biofertilizantes, los cuales podrían resultar una mejor opción que el uso de fertilizantes químicos debido al incremento de sus costos y su poca disponibilidad en las etapas críticas en el cultivo de arroz (Boussiba, 2002). La aplicación de algas como biofertilizantes ha mostrando un incremento en los rendimientos de la cosecha de arroz de un 25-30 % (Goyal, 2002).

La capacidad de fijación de nitrógeno de las cianobacterias respalda su amplia utilización como biofertilizantes para la producción de arroz en países tropicales. Los productos obtenidos a partir de la fijación de nitrógeno en cianobacterias, tales como amonio o nitritos son captados en plantas de arroz por exudación o autólisis y la descomposición microbiana (Roger y Kulasooriya, 1980; Venkataraman, 1986; Querijero-Palacpac *et al.*, 1990). Principalmente esta técnica de biofertilización todavía está limitada debido a la incapacidad de producir inóculos de buena calidad aunado a la dificultad para restablecer eficazmente las cepas inoculadas en el campo. Recientemente se han logrado avances en la producción en algunos campos de arroz aislados en reactores de sistema abierto (Fontes *et al.*, 1987; Querijero-Palacpac *et al.*, 1990). En muchos de estos casos el cultivo ha sido mantenido con una densidad celular relativamente baja para obtener un alto rendimiento. La aplicación de esta biomasa (producida en cualquier tipo de sistema abierto) al campo requiere ser procesada, cosechando y secando, lo cual reduce la viabilidad de las células e incrementa el costo de la producción (Watanabe, 1984; Roger *et al.*, 1987).

Una forma de resolver algunos de los problemas antes mencionados, es cultivar las cianobacterias en un reactor que garantice un alto rendimiento cuando el

cultivo tenga una alta densidad celular. En tal caso, se puede considerar una aplicación directa del cultivo de cianobacterias en el campo. Se puede utilizar un reactor cerrado para resolver los problemas de baja productividad causados por las temperaturas subóptimas imperantes en un sistema de cultivo abierto (Richmond *et al.*, 1993). Estos sistemas pueden llegar a ser una fuente confiable para el suministro de los microorganismos deseables y además poseen otras ventajas sobre los sistemas abiertos, tales como la aplicación del cultivo al campo, lo cual reducirá los costos de producción, también pueden mejorar la viabilidad de las células y prevenir diluciones por sedimentación de la biomasa del cultivo en crecimiento, ya que se encuentran en constante agitación (Boussiba, 2002).

El interés en la producción de biomasa de microalgas ha ido más allá de su uso como biofertilizante nitrogenado, también constituye un recurso de productos valiosos como ficobiliproteínas, polisacáridos y proteínas para alimentación. Recientemente este grupo de microorganismos ha estado involucrado en la clonación de algunos de sus genes para resolver problemas ambientales, incluida su utilización como agentes de control biológico mediante la clonación de genes deseables para el control de insectos y su aplicación para la biodegradación de agentes contaminantes (Boussiba, 2002).

La producción industrial de fertilizantes químicos nitrogenados es un proceso energéticamente intensivo y hoy en día está basado en el empleo de combustibles fósiles. Los sistemas biológicos capaces de fijar nitrógeno atmosférico contribuyen con un total aproximado de  $175 \times 10^6$  ton de N al año, comparado con sólo  $47 \times 10^6$  ton de N al año aportadas por los fertilizantes químicos nitrogenados, los cuales involucran el funcionamiento de casi 600 complejos industriales distribuidos alrededor del mundo con un costo de US \$ $15 \times 10^9$ , que consumen cerca de  $2 \times 10^6$  barriles de petróleo por día, lo que equivale a  $318 \times 10^6$  L petróleo / d (Goyal, 2002).

## **2.8. Repercusiones ambientales por el uso excesivo de fertilizantes químicos**

En la producción de arroz, la utilización excesiva de fertilizantes nitrogenados sintéticos (urea), puede aumentar la contaminación del agua por nitratos, cuyo consumo permanente puede causar la enfermedad conocida como metahemoglobinemia (falta de oxígeno en la sangre) especialmente en los niños, debido a que cuando se reducen los nitratos a nitritos éstos se combinan con la sangre y forman metahemoglobina, que es incapaz de transportar oxígeno. También los nitritos bajo ciertas condiciones reaccionan con grupos secundarios de aminas para formar compuestos nitrógeno-nitrosos. Estos compuestos han sido señalados como carcinogénicos (Sorensen, 1999).

Adicionalmente el uso excesivo de fertilizantes químicos, aumenta los riesgos provocados por la liberación de óxido nítrico ( $N_2O$ ) en la atmósfera, lo que puede contribuir a la destrucción de la capa de ozono, al aumento de la temperatura atmosférica y a la desestabilización del clima (Suquilanda, 2003).

De manera general, el incremento en el uso de fertilizantes sintéticos no sólo afecta la economía de los productores, sino que también provoca la esterilización de los suelos y el agotamiento de los micro-nutrientes (zinc, hierro, cobre, manganeso, molibdeno y boro), influyendo negativamente en la salud de las plantas, animales y seres humanos (Suquilanda, 2003).

### **3. Justificación**

En la actualidad se utilizan ampliamente los fertilizantes químicos en la producción agrícola, los cuales tienen dos desventajas principales: costo elevado y alto impacto negativo al ambiente; lo que genera la necesidad urgente de implementar alternativas de solución para estos problemas. En el presente trabajo se presenta la opción de producir un biofertilizante a partir de consorcios microbianos fotosintéticos, como alternativa al empleo de fertilizantes químicos.

Adicionalmente, existen pocos reportes de investigación sobre la producción de biofertilizantes basados en la utilización de consorcios microbianos creciendo en fotobiorreactores de cara plana tipo air-lift. Por lo anterior, es necesario realizar investigaciones encaminadas a lograr un mayor entendimiento de los mecanismos de fijación de nitrógeno con consorcios microbianos y su producción en fotobiorreactores de cara plana tipo air-lift, por lo que se presenta el presente proyecto.

### **4. Hipótesis**

La transferencia de masa, las características hidrodinámicas (“gas hold-up” y tiempo de mezclado) y la eficiencia de utilización de  $\text{CO}_2$  en un fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift con recorrido lumínico alto, será superior a los valores mostrados por otras configuraciones de fotobiorreactor como lo son tubulares y de cara plana (“flat-plate”), lo que a su vez generará productividades celulares más altas en el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift que en los otros fotobiorreactores mencionados.

### **5. Objetivos generales**

- Caracterizar un fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift en cuanto a sus propiedades hidrodinámicas y de transferencia de masa.
- Establecer, propagar y seleccionar consorcios microbianos fijadores de nitrógeno en el laboratorio.

#### **5.1. Objetivos específicos**

- Calcular el  $k_L a$  y el  $k_L a_{\text{CO}_2}$ .
- Determinar el tiempo de mezclado.

- Seleccionar consorcios microbianos fijadores de nitrógeno de un campo arrocero del Estado de Morelos, México, a partir de un muestreo realizado en el mismo.

## 6. Alcance

La caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa, se llevará a cabo en un fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift de 52 L de capacidad total con un volumen de operación de 50 L, en un sistema físico (aire-agua), evaluando los parámetros siguientes:  $k_{La}$ ,  $\epsilon_G$ ,  $t_m$  y  $k_{LaCO_2}$ .

El establecimiento, selección y propagación del consorcio microbiano que tenga la mayor capacidad de fijación de  $N_2$  se realizará a nivel laboratorio, posterior al muestreo en un campo arrocero del Estado de Morelos, México.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1. Microorganismos

Se utilizará *Arthrospira* sp. como organismo modelo para la caracterización de transferencia de masa del fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift, posterior a la caracterización en un sistema físico aire-agua del mismo.

Se establecerá un consorcio microbiano fotosintético para su posterior evaluación en el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift, utilizando el medio de cultivo BG-11<sub>0</sub> (Rippka *et al.*, 1979).

### 7.2. Fotobiorreactor

Se utilizará un fotobiorreactor paralelepípedo de cara plana tipo air-lift (Fig. 2) de 52 L de capacidad total con un volumen de operación de 50 L, con la configuración geométrica que se muestra en la Tabla 3.



Figura 2. Fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift

**Tabla 3. Configuración geométrica del fotobiorreactor utilizado**

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Largo   | 67.7 cm                              |
| Ancho   | 14.7 cm                              |
| Altura  | 54.3 cm                              |
| Material                                      | Vidrio, plexiglas y acero inoxidable |
| Espesor del vidrio                            | 0.5 cm                               |
| Espesor del plexiglas                         | 2 cm                                 |
| Diámetro del tubo de alimentación de aire     | 0.5 cm                               |
| Número de orificios para alimentación de aire | 11                                   |
| Diámetro de los orificios                     | 0.2 cm                               |
| Volumen total                                 | 52 L                                 |
| Volumen útil                                  | 50 L                                 |

### 7.2.1. Líquidos y medio de cultivo utilizados en el fotobiorreactor

Se utilizará agua de la llave, para realizar la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift.

Para el crecimiento de *Arthrospira* sp. se utilizará el medio Zarrouk (1966), cuya composición se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4. Composición del medio de cultivo Zarrouk**

| Compuesto                            | g/L      |
|--------------------------------------|----------|
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 16       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.5      |
| NaNO <sub>3</sub>                    | 2.5      |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 1.0      |
| NaCl                                 | 1.0      |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.20     |
| CaCl <sub>2</sub>                    | 0.04     |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.01     |
| EDTA                                 | 0.08     |
| *Solución A <sub>5</sub>             | 1 mL / L |

### \*Solución A<sub>5</sub>

| Compuesto                            | g/L   |
|--------------------------------------|-------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 2.86  |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | 1.81  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.22  |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O | 0.079 |

(Zarrouk, 1966)

### 7.2.2. Crecimiento de *Arthrospira* sp. en el fotobiorreactor

Se evaluará el efecto de los diferentes parámetros hidrodinámicos y de transferencia de masa, sobre el crecimiento de un cultivo de cianobacteria utilizada como modelo. Se plantea el desarrollo experimental de un cultivo de *Arthrospira* sp. durante un periodo de 14 días, para posteriormente determinar el coeficiente de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) en un intervalo de flujos de aire de 10 a 50 L/min empleando el método directo, en presencia del microorganismo y un medio de cultivo específico para su crecimiento. Las condiciones de este experimento se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Condiciones para el crecimiento de *Arthrospira* sp en el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift**

|   |  |
|---|--|
| Microorganismo  | <i>Arthrospira</i> sp. <sup>a</sup>                          |
| Medio de cultivo  | Zarrouk (1966)   |
| Flujo de aire alimentado para el crecimiento del microorganismo | 25 L / min   |
| Parámetros a evaluar  | Peso seco, seguimiento microscópico, $k_{La}$ , $k_{LaCO_2}$ |

NOTAS: <sup>a</sup>cultivo proporcionado por Perales-Vela (LBM2) (2006)

### 7.2.3. Condiciones de operación del fotobiorreactor

Las condiciones de operación del fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift, bajo las cuales se realizará la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa en el sistema físico aire-agua, se muestran en la Tabla 6.

La velocidad superficial del gas ( $U_G$ ) se estimará mediante el método propuesto por Chisti (1989) que relaciona el flujo de aire inyectado al fotobiorreactor con el área de la sección recta total del mismo.

**Tabla 6. Condiciones de operación del fotobiorreactor**

| Flujo de aire (L/min) | vvm | U <sub>G</sub> (m/s) |
|-----------------------|-----|----------------------|
| 5                     | 0.1 | 0.00084              |
| 10                    | 0.2 | 0.0017               |
| 15                    | 0.3 | 0.0025               |
| 20                    | 0.4 | 0.0033               |
| 25                    | 0.5 | 0.0042               |
| 30                    | 0.6 | 0.0050               |
| 35                    | 0.7 | 0.0059               |
| 40                    | 0.8 | 0.0067               |
| 45                    | 0.9 | 0.0075               |
| 50                    | 1.0 | 0.0084               |

#### 7.2.4. Métodos para la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor

La caracterización del fotobiorreactor se llevará a cabo en base a los parámetros indicados en la Tabla 7, los métodos utilizados están descritos en el Anexo 1.

**Tabla 7. Parámetros y métodos para la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor**

| Parámetro  | Método   |
|--|--|
| Coeficiente de transferencia de oxígeno (k <sub>L</sub> a)   | Método directo que se basa en la utilización de una sonda de oxígeno que mide la cantidad de oxígeno disuelto en el medio (Moo-Young, 1985).   |
| Coeficiente de transferencia de masa referido al CO <sub>2</sub> transferido en el biorreactor (k <sub>L</sub> a <sub>CO<sub>2</sub></sub> ) | Se determinará mediante las siguientes correlaciones:<br>$K_{LCO_2} = k_{La} [D_{CO_2}/D_{O_2}]^{0.5}$ (Talbot <i>et al.</i> , 1990)<br>$[D_{CO_2}/D_{O_2}]^{0.5} = 0.821$ (Treybal, 1987)   |
| Tiempo de mezclado   | Método del trazador ácido (Camacho-Rubio <i>et al.</i> , 2004).  |
| La fracción retenida de gas ó "gas hold-up" (ε <sub>G</sub> )  | Se evaluará de acuerdo al método de diferencia de volumen propuesto por Chisti (1989):<br>$\varepsilon_G = \frac{V_G}{V_G + V_L}$ donde V <sub>G</sub> y V <sub>L</sub> son los volúmenes de gas y de líquido en el biorreactor respectivamente. |

### 7.2.5. Preparación del fotobiorreactor previo a su operación

Antes de su inoculación, el fotobiorreactor se lavará con jabón neutro y agua estéril caliente, para lograr condiciones asépticas y evitar la proliferación de biomasa ajena al proceso.

El mantenimiento del fotobiorreactor se hará cada mes, lavando cuidadosamente sus paredes para eliminar cualquier adherencia microbiana que pudiera disminuir la eficiencia fotosintética del cultivo debido a una disminución en la disponibilidad de la luz.

### 7.3. Establecimiento, propagación y selección de consorcios microbianos en el laboratorio

#### 7.3.1. Muestreo en un campo arrocero de Alpuyecá, Morelos, México

Se llevará a cabo un muestreo en un campo arrocero del Estado de Morelos México. Se recolectarán muestras representativas de la flora microbiana en 6 puntos diferentes de cada parcela. En cada punto se muestrearán tres secciones diferentes: Tallo (pegado a la tierra), suelo y agua de anegamiento.

Las muestras se colocarán en recipientes de plástico conteniendo medio mineral BG-11<sub>0</sub> (Rippka *et al.*, 1979) estéril y se trasladarán de inmediato al laboratorio para establecer cultivos de 250 mL en el mismo medio de cultivo con un flujo de aire de 1.5 vvm.

Para la propagación de los consorcios microbianos se utilizará el medio mineral BG-11<sub>0</sub> (Rippka *et al.*, 1979) sin fuente de nitrógeno, cuya composición se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo BG-11<sub>0</sub>

| Compuesto   | g/l     | Sol. patrón g/100ml |
|---|---------|---------------------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O | 0.04    | 4.0                 |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O               | 0.075   | 7.5                 |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O               | 0.036   | 3.6                 |
| Ac. Cítrico   | 0.006   | 0.6                 |
| Citrato férrico                                     | 0.006   | 0.6                 |
| EDTA (sal disódica)                                 | 0.001   | 0.1                 |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                     | 0.02    | 2.0                 |
| Sol. Oligoelementos*                                | 1ml/l   |                     |
| Agua desionizada                                    | 1000 ml |                     |

\*Solución de oligoelementos del medio BG-11<sub>0</sub>

| Compuesto   | g/100ml |
|---|---------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 0.286   |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O                 | 0.181   |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                 | 0.0222  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O  | 0.0390  |
| CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                 | 0.0079  |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O | 0.00494 |

(Rippka *et al*, 1979)

### 7.3.2. Evaluación del desempeño biológico de los consorcios microbianos

La evaluación del desempeño biológico de los consorcios microbianos se llevará a cabo como se menciona en la Tabla 9, los métodos están descritos en el Anexo 1. Las pruebas se realizarán una vez por semana.

**Tabla 9. Metodologías analíticas para la evaluación del desempeño biológico de los consorcios microbianos**

| Prueba                                     | Método  |
|--|---|
| Absorbancia total                          | Espectrofotometría a 680 y 750 nm (Kannaiyan <i>et al.</i> , 1997)                                      |
| Peso seco                                  | Tredici <i>et al.</i> , 1991  |
| Actividad de la nitrogenasa                | Ensayo de reducción de acetileno (Venkataraman <i>et al.</i> , 1981)                                    |
| Producción de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | Método del fenato 132 C (APHA, AWWA, WPCF, 1971 )   |
| Determinación de Clorofilas                | Pruebas espectrofotométricas a 480, 510, 665, 666 y 750 nm para clorofilas (Brock <i>et al.</i> , 2003) |

La determinación de la absorbancia total (Kannaiyan *et al.*, 1997) será utilizada como una lectura rápida de estimación del crecimiento celular. El método de peso seco nos dará la concentración de biomasa en un volumen determinado de cultivo (Tredici *et al.*, 1991).

La cuantificación de la actividad de nitrogenasa, es una medida directa de la capacidad de fijación de nitrógeno del consorcio (Venkataraman *et al.*, 1981). El método se basa en el hecho de que la enzima nitrogenasa puede también reducir acetileno a eteno, el cual es cuantificado mediante cromatografía de gases y relacionado con la capacidad de fijación de nitrógeno de la biomasa estudiada, siendo ésta directamente proporcional a la concentración de eteno producido.

La cuantificación de amonio producido por el consorcio, nos dará una medida de su capacidad total para fijar nitrógeno. Esta técnica está basada en la reacción del amonio, fenol e hipoclorito a un pH elevado, formándose un indofenol, dando una coloración azul con una absorbancia máxima a 640 nm (APHA, AWWA, WPCF, 1971).

El escalamiento de los cultivos se hará de acuerdo al cronograma mostrado en la Tabla 10.

**Tabla 10. Cronograma de escalamiento de los cultivos**

| <b>Etapas</b>  | <b>Tiempo (d)</b> | <b>Periodo</b> |
|----------------|-------------------|----------------|
| Cultivo 250 mL | 45                | 1              |
| Cultivo 0.5 L  | 60                | 2              |
| Cultivo 1 L    | 60                | 3              |
| Cultivo 2 L    | 90                | 4              |
| Cultivo 10 L   | 90                | 5              |

## **8. Resultados y Discusión**

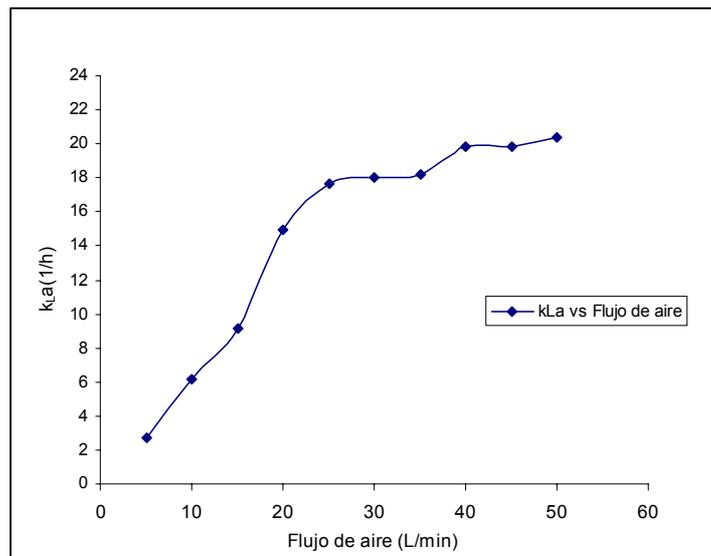
### **8.1. Caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor**

Se determinaron los coeficientes de transferencia de masa  $k_{La}$  y  $k_{LaCO_2}$  en un sistema aire-agua aplicando flujos de aire de 5 a 50 L/min, los resultados se muestran en la Tabla 11 y en las figuras 3 y 4.

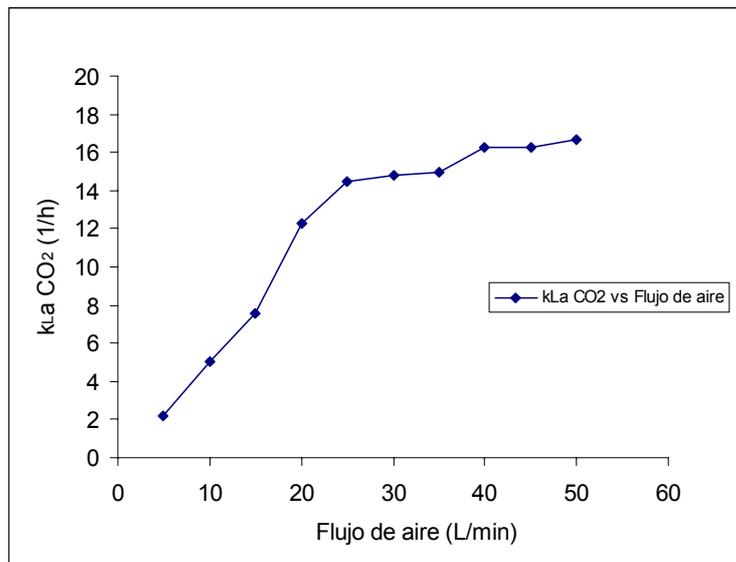
**Tabla 11. Resultados globales de la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa en el fotobiorreactor con un sistema aire-agua**

| Flujo de aire (L/min) | vvm | $k_{La_r}$ (1/h) | $k_{La_d}$ (1/h) | $k_{La}$ (1/h) | $k_{La_{CO_2}}$ (1/h) | $U_G$ (m/s) | $\epsilon_G$ |
|-----------------------|-----|------------------|------------------|----------------|-----------------------|-------------|--------------|
| 5                     | 0.1 | 3.24             | 2.16             | 2.7            | 2.217                 | 0.00084     | 0.009399     |
| 10                    | 0.2 | 7.2              | 5.04             | 6.12           | 5.025                 | 0.0017      | 0.013109     |
| 15                    | 0.3 | 10.08            | 8.28             | 9.18           | 7.537                 | 0.0025      | 0.014953     |
| 20                    | 0.4 | 16.92            | 12.96            | 14.94          | 12.266                | 0.0033      | 0.018622     |
| 25                    | 0.5 | 20.52            | 14.76            | 17.64          | 14.482                | 0.0042      | 0.020446     |
| 30                    | 0.6 | 22.68            | 13.32            | 18             | 14.778                | 0.0050      | 0.022263     |
| 35                    | 0.7 | 21.96            | 14.4             | 18.18          | 14.926                | 0.0059      | 0.025878     |
| 40                    | 0.8 | 21.96            | 17.64            | 19.8           | 16.256                | 0.0067      | 0.027675     |
| 45                    | 0.9 | 20.88            | 18.72            | 19.8           | 16.256                | 0.0075      | 0.029466     |
| 50                    | 1.0 | 21.6             | 19.08            | 20.34          | 16.699                | 0.0084      | 0.03125      |

Flujo de aire: Flujo de aire alimentado al reactor; vvm: Volumen de aire/volumen de medio/min;  $k_{La_r}$ :  $k_{La}$  zona ascendente;  $k_{La_d}$ :  $k_{La}$  zona descendente.



**Figura 3. Coeficiente de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) contra flujo de aire en un intervalo de 5 a 50 L/min**



**Figura 4. Coeficiente de transferencia de masa referido a CO<sub>2</sub> ( $k_{LaCO_2}$ ) contra flujo de aire en un intervalo de 5 a 50 L/min**

Los valores de las pendientes entre cada dos puntos subsecuentes se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12. Localización del punto de inflexión del coeficiente de transferencia de masa del fotobiorreactor mediante la comparación de las pendientes entre puntos subsecuentes de valores del  $k_{La}$**

| Puntos $x$ | $m$   |
|------------|-------|
| 0-5        | 0.54  |
| 5-10       | 0.684 |
| 10-15      | 0.612 |
| 15-20      | 1.152 |
| 20-25      | 0.54  |
| 25-30      | 0.072 |
| 30-35      | 0.036 |
| 35-40      | 0.324 |
| 40-45      | 0     |
| 45-50      | 0.108 |

Como se puede apreciar, tal como se sugiere en la figura 3, la pendiente entre dos puntos subsecuentes disminuye notablemente (86% aprox.) entre los valores de 25 y 30 con respecto a los intervalos anteriores (Tabla 12), lo que nos indica que la transferencia de masa en el fotobiorreactor en este punto pasa a una fase asintótica en la cual el aumento en el flujo de gas alimentado, no produce una diferencia importante en el proceso de transferencia.

De las figuras 3 y 4 podemos observar que obtenemos una transferencia de masa del 75 al 80 % aproximadamente en el intervalo de flujos de aire de 25 a 30 L/min, sin que se someta a la célula a un estrés innecesario, por lo que se considera un porcentaje aceptable (80%) y óptimo para nuestros fines. Si se deseara obtener un 90 a 100% de transferencia de masa, sería necesario aumentar el flujo de aire de 30 a 50 L/min, siendo un intervalo muy grande que sólo nos permitiría aumentar la transferencia de masa en un 10%.

En la Tabla 13 se presenta una comparación de valores de coeficientes de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) en diferentes fotobiorreactores.

**Tabla 13. Comparación de los coeficientes de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) de diferentes fotobiorreactores**

| Tipo de fotobiorreactor             | %CO <sub>2</sub> (v/v) | U <sub>G</sub> (m/s) | k <sub>La</sub> (h <sup>-1</sup> ) | Referencia                     |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Air-lift de cara plana (flat-plate) | 0.03                   | 0.0050               | 18                                 | Este trabajo                   |
| Vertical tubular                    | 0.7                    | 0.0015               | 12.8                               | Miyamoto <i>et al.</i> , 1988  |
| Vertical flat-plate                 | 5                      | 0.0094               | 8                                  | Zhang <i>et al.</i> , 2002     |
| Vertical flat-plate                 | 10                     | 0.00047              | 4                                  | Zhang <i>et al.</i> , 2002     |
| Horizontal tubular                  | 100                    | 0.234                | 0.36                               | Camacho <i>et al.</i> , 1999   |
| Air-lift de tubo concéntrico        | 0.035                  | 0.55                 | 72                                 | Contreras <i>et al.</i> , 1998 |

El valor de  $k_{La}$  de 18 h<sup>-1</sup> obtenido a un flujo de aire de 30 L/min es superior en un 125 y 250 % a lo reportado por Zhang *et al.* (2002), quienes caracterizaron fotobiorreactores tipo flat-plate de configuración semejante a la utilizada en el presente trabajo, pero con velocidades superficiales de gas de 0.0094 m/s y 0.00047 m/s respectivamente. El valor de  $k_{La}$  obtenido en este trabajo también es superior en un 41% al  $k_{La}$  reportado por Miyamoto *et al.* (1988), quienes utilizaron un fotobiorreactor tubular vertical con una U<sub>G</sub> de 0.0015 m/s y 50 veces mayor al  $k_{La}$  reportado por Camacho *et al.* (1999), quienes caracterizaron un fotobiorreactor horizontal tubular con un valor de velocidad superficial del gas de 0.234 m/s.

Si comparamos el valor del coeficiente de transferencia de masa ( $k_{La}$ ) encontrado en este trabajo con los obtenidos para otros tipos de fotobiorreactores, es importante señalar el porcentaje de  $CO_2$  suministrado a cada reactor, ya que de acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 13, cuando se suministra un 100 % de  $CO_2$  a una suspensión celular, se requiere únicamente un valor de  $k_{La}$  de  $0.36\ h^{-1}$ , que es suficiente para satisfacer los requerimientos de carbono, en contraste, cuando únicamente se utiliza aire, se necesita un valor muy elevado de  $k_{La}$  como el reportado por Contreras *et al.* (1998) igual a  $72\ h^{-1}$ , el cual es requerido para satisfacer la cantidad de carbono necesaria para el crecimiento del microorganismo. El utilizar un valor de  $k_{La}$  tan elevado requiere una alta velocidad de aireación, lo que involucra un alto costo, además de provocar un daño a las células ya que se verían sometidas a un estrés excesivo.

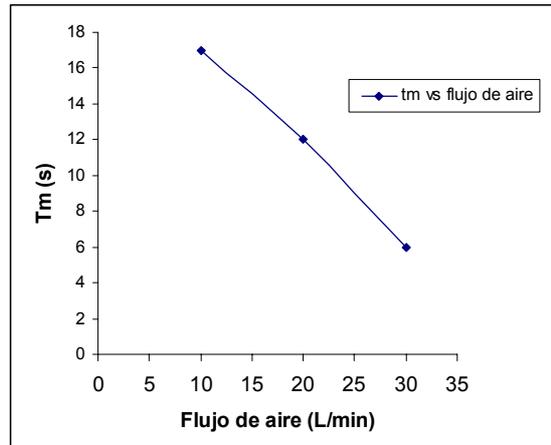
Por lo anterior, podemos decir que a pesar de que el valor de  $k_{La}$  reportado por Contreras *et al.* (1998) para un fotobiorreactor tipo airlift de tubo concéntrico es cuatro veces mayor al nuestro, utilizando una  $U_G$  de 0.55 m/s que resulta aproximadamente 100 veces mayor a la encontrada en el presente trabajo utilizando un flujo de aire de 30 L/min, el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift utilizado en el presente trabajo es mucho mejor, ya que en ambos trabajos se utilizó sólo aire para la determinación del coeficiente de transferencia de masa y en la presente investigación se obtuvo un valor de  $k_{La}$  menor, el cual es capaz de satisfacer los requerimientos de carbono de la cianobacteria sin necesidad de someterla a un estrés excesivo y sin utilizar una velocidad de aireación muy elevada, lo que nos ayudaría a reducir costos de operación y lograr una transferencia de masa eficiente; además de que podemos sugerir que la transferencia de masa en esta configuración de fotobiorreactor, es superior a la reportada en otro tipo de fotobiorreactores.

### 8.1.1. Tiempo de mezclado

La determinación del tiempo de mezclado ( $t_m$ ) se realizó mediante el método del trazador ácido (Camacho-Rubio *et al.*, 2004); con flujos de aire de 10 a 30 L/min, los resultados se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Tiempos de mezclado obtenidos a diferentes flujos de aire en el fotobiorreactor**

| Flujo de aire<br>(L / min) | vvm | $t_m$ (s) |
|----------------------------|-----|-----------|
| 10                         | 0.2 | 17        |
| 20                         | 0.4 | 12        |
| 30                         | 0.6 | 6         |



**Figura 5. Tiempo de mezclado contra flujo de aire**

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 14 y figura 5 podemos observar que existe una clara tendencia lineal negativa referida a que conforme se aumenta el flujo de aire se disminuye el tiempo de mezclado, por lo que a un flujo de 30 L / min en el cual se encontró el valor óptimo de  $k_L a$ , se obtiene un eficiente tiempo de mezclado de 6 segundos lo cual nos garantiza una distribución eficiente de los nutrientes y de oxígeno para los microorganismos al lograrse un 95 % de homogeneidad en el sistema, de tal modo que se evitan zonas muertas en el fotobiorreactor.

### 8.1.2. Resultados del crecimiento de *Arthrospira sp.* en el fotobiorreactor

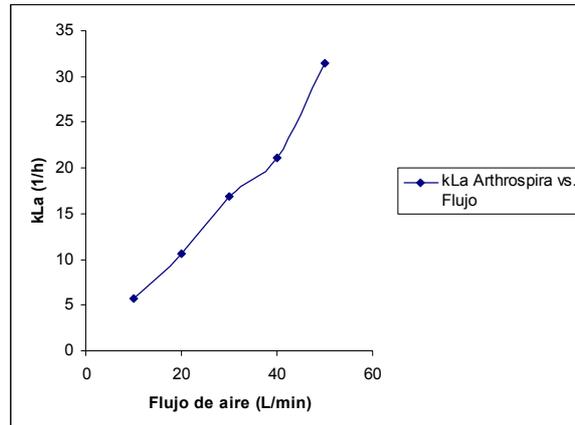
Para el crecimiento de *Arthrospira sp.* en el fotobiorreactor se colocó un inóculo inicial de 40 mg biomasa/ L. Transcurridos los 10 días de estudio se obtuvieron 578 mg biomasa/L, lo que equivale a una productividad de 2.241 mg biomasa /L h.

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la evaluación de los parámetros ( $k_L a$ ,  $k_L a_{CO_2}$ ) en el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift utilizando *Arthrospira sp.*

**Tabla 15. Resultados de la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa en el fotobiorreactor utilizando *Arthrospira sp.***

| Flujo de aire (L/min) | vvm | $k_L a_r$ (1/h) | $k_L a_d$ (1/h) | $k_L a$ | $k_L a_{CO_2}$ (1/h) | $U_G$ (m/s) |
|-----------------------|-----|-----------------|-----------------|---------|----------------------|-------------|
| 10                    | 0.2 | 7.92            | 3.6             | 5.76    | 4.72896              | 0.0017      |
| 20                    | 0.4 | 12.6            | 8.64            | 10.62   | 8.71902              | 0.0033      |
| 30                    | 0.6 | 17.28           | 16.56           | 16.92   | 13.89132             | 0.005       |
| 40                    | 0.8 | 22.68           | 19.44           | 21.06   | 17.29026             | 0.0067      |
| 50                    | 1   | 34.56           | 28.44           | 31.5    | 25.8615              | 0.0084      |

Flujo de aire: Flujo de aire alimentado al reactor; vvm: Volumen de aire/volumen de medio/min;  $k_L a_r$ :  $k_L a$  zona ascendente;  $k_L a_d$ :  $k_L a$  zona descendente.



**Figura 6. Coeficiente de transferencia de masa ( $k_La$ ) contra flujo de aire en un intervalo de 10 a 50 L/min utilizando *Arthrospira* sp.**

En base a los resultados de crecimiento de *Arthrospira* sp. obtenidos en el fotobiorreactor, se puede calcular la eficiencia de utilización de  $CO_2$  (%) en el mismo, de acuerdo a la siguiente ecuación (Zhang *et al*, 2002):

$$E_{CO_2} = 0.45 \cdot P \cdot (44/12) / V_{CO_2} \cdot 100 \dots(9)$$

Donde 0.45 es el contenido de carbono en las células secas (g carbono / g biomasa), P es la productividad (g biomasa  $L^{-1} h^{-1}$ ), 44 y 12 son los pesos moleculares del dióxido de carbono y carbono, respectivamente, y  $V_{CO_2}$  es la velocidad de aireación del  $CO_2$  suministrado al cultivo en el reactor (g  $CO_2 L^{-1} h^{-1}$ ).

Considerando un suministro de aire al fotobiorreactor de 25 L aire / min, una densidad de  $CO_2$  de 1.814 g/L y que se tiene un 0.03 % de  $CO_2$  en el aire, obtenemos un  $V_{CO_2}$  de 0.0163 g  $CO_2 L^{-1} h^{-1}$ ; considerando lo anterior y una productividad de 0.002241 g biomasa  $L^{-1} h^{-1}$ , de acuerdo a la ecuación 10 obtenemos una eficiencia de utilización de  $CO_2$  del 22.68 %.

La eficiencia de utilización de  $CO_2$  del 22.68% obtenido a un flujo de aire de 0.5 vvm en el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift de 52 L de capacidad total es superior en un 94.5 y 98.61% al reportado por Zhang *et al.* (2002), quienes caracterizaron fotobiorreactores tipo flat-plate de configuración semejante a la utilizada en el presente trabajo (ancho= 1.5 cm, largo=35.4 cm, volumen total= 3 L) con un flujo de aire de 0.005 vvm, pero utilizaron aire enriquecido con un 5 y 10 % de  $CO_2$  respectivamente.

El dato máximo de biomasa obtenida se alcanzó al día 10 de cultivo, por lo que a partir de éste se realizó el cálculo de la productividad.

## 8.2. Establecimiento, propagación y selección de consorcios microbianos en laboratorio

### 8.2.1. Muestreo en un campo arrocero de Alpuyecá, Morelos, México

El muestreo se realizó en Alpuyecá Morelos, en seis puntos diferentes de la parcela (Fig. 7); se recolectaron muestras de suelo, tallo y agua. En las figuras 8, 9, 10 y 11 se muestran las fotografías de algunos de los puntos muestreados.

Las muestras se colocaron por separado en tubos con 20 mL de medio de cultivo libre de nitrógeno BG-11<sub>0</sub> (Rippka *et al.*, 1979) estéril, mantenidos en hielo.

De acuerdo a las características observadas en los puntos de muestreo, como color, cantidad de agua de anegamiento y burbujeo que fue tomado como indicativo de presencia de microorganismos fotosintéticos, se eligieron sólo dos puntos el 3 y 6 para su resiembra en matraces de 250 mL con 200 mL de medio mineral BG-11<sub>0</sub>. Los puntos seleccionados presentaron las siguientes características en campo:

- Temperatura ambiente: 24 °C
- Punto 3: 24 °C, 5 cm nivel agua de anegamiento
- Punto 6: 26 °C, 7 cm nivel agua de anegamiento

Las muestras se colocaron por separado en tubos con 20 mL de medio de cultivo libre de nitrógeno BG-11<sub>0</sub> (Rippka *et al.*, 1979) estéril, mantenidos en hielo.

Para su resiembra se preparó una suspensión en matraces de 250 mL, tomando las siguientes proporciones de las secciones muestreadas en cada uno de los puntos:

- Suspensión de suelo: 3 mL
- Suspensión de tallo: 3 mL
- Agua de anegamiento: 4 mL

Las resiembras en matraces de 250 mL (Periodo 1) de los puntos seleccionados, fueron sometidas a las condiciones mostradas en la Tabla 16.

**Tabla 16. Condiciones iniciales de los cultivos en 250 mL**

| Cultivo        | Volumen (mL) | Flujo de aire (vvm) | Temperatura (°C) |
|----------------|--------------|---------------------|------------------|
| 3              | 250          | 1.5                 | 28               |
| 3 <sub>b</sub> | 250          | 1.5                 | 21               |
| 6              | 250          | 1.5                 | 28               |
| 6 <sub>b</sub> | 250          | 1.5                 | 21               |

3<sub>b</sub>: Punto de muestreo 3 sometido a una temperatura baja; 6<sub>b</sub>: Punto de muestreo 6 sometido a una temperatura baja.



**Figura 7. Campo arrocero de Alpuyecá, Morelos**



**Figura 8. Punto 1 de muestreo**



**Figura 10. Punto 4 de muestreo**



**Figura 9. Punto 3 de muestreo**



**Figura 11. Punto 6 de muestreo**

### **8.2.2. Resultados globales y específicos del desempeño biológico de los cultivos**

En las Tablas 17 y 18 se muestran los resultados globales y específicos del desempeño biológico de los cultivos en dos periodos diferentes.

**Tabla 17. Resultados globales del desempeño biológico de los cultivos en los Periodos 1 y 2**

| Parámetro                                 | Periodo 1       |                   |                   |                   | Periodo 2         |                   |                   |                   |
|---|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|   | 3               | 3 <sub>b</sub>    | 6                 | 6 <sub>b</sub>    | 3                 | 3 <sub>b</sub>    | 6                 | 6 <sub>b</sub>    |
| Peso seco<br>(mg / L)                     | 78.89<br>(4.62) | 142.22<br>(13.68) | 250.83<br>(30.36) | 144.44<br>(11.78) | 594.55<br>(26.02) | 544.24<br>(60.34) | 827.27<br>(88.04) | 441.82<br>(26.32) |
| Chla<br>(mg / L)                          | 2.07<br>(0.31)  | 0.88<br>(0.12)    | 1.00<br>(0.08)    | 0.62<br>(0.08)    | 2.30<br>(0.38)    | 0.76<br>(0.07)    | 4.42<br>(0.36)    | 3.48<br>(0.19)    |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>(µg / mL) | 0.88<br>(0.09)  | 0.48<br>(0.05)    | 0.93<br>(0.06)    | 0.86<br>(0.06)    | 0.13<br>(0.05)    | 0.33<br>(0.03)    | 1.17<br>(0.11)    | 0.69<br>(0.07)    |

Periodo 1: t = 43d, V = 250 mL; Periodo 2: t = 59d, V = 500 mL; ( ): desviación estándar

**Tabla 18. Resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en los Periodos 1 y 2**

| Parámetro  | Periodo 1 |                |     |                | Periodo 2 |                |     |                |
|--|-----------|----------------|-----|----------------|-----------|----------------|-----|----------------|
|  | 3         | 3 <sub>b</sub> | 6   | 6 <sub>b</sub> | 3         | 3 <sub>b</sub> | 6   | 6 <sub>b</sub> |
| 1 x10 <sup>3</sup> Chla (mg / mg peso seco)      | 26.3      | 6.3            | 4.0 | 5.0            | 3.9       | 1.4            | 5.3 | 7.9            |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg / mg peso seco) | 11.1      | 3.4            | 3.7 | 6.9            | 0.4       | 0.6            | 1.8 | 2.5            |

Periodo 1: t = 43d, V = 250 mL; Periodo 2: t = 59d, V = 500 mL

Podemos observar en la Tabla 17 que en el Periodo 1 los resultados fueron muy aleatorios en todos los cultivos, en cuanto a peso seco y amonio el cultivo 6 a temperatura alta arrojó los mejores resultados y clorofila a el cultivo 3 a temperatura alta; pero si observamos la Tabla 18 en cuanto a los resultados del desempeño biológico específico el cultivo 3 a temperatura alta muestra los mejores resultados en este periodo.

En el día 43 del estudio, los cultivos se llevaron a un volumen total de 500 mL, tomando 50 mL de cultivo como inóculo y resuspendiéndolos en 400 mL de medio BG-11<sub>0</sub>, manteniendo la aireación en 1.5 vvm. Respecto a este Periodo 2, los resultados globales muestran al cultivo 6 como el de mejor desempeño en cuanto

a peso seco y producción de amonio (Tabla 17), sin embargo, los resultados de valores específicos muestran al cultivo 6<sub>b</sub> como superior en dos de los tres parámetros señalados (Tabla 18). Cabe señalar que la producción de biomasa en el cultivo 6 fue mayor casi en un 100% respecto al cultivo 6<sub>b</sub> en este Período 2, lo que nos indica que la fijación de nitrógeno podrá ser mayor en 6 que en 6<sub>b</sub> ya que presenta valores relativamente similares de excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> al medio (Tabla 17).

En el día 102 de cultivo se hizo el escalamiento a 1 L de volumen total en matraces con medio BG-11<sub>0</sub> (Periodo 3), tomando 200 mL de inóculo y suspendiéndolos en 700 mL de medio BG-11<sub>0</sub>, manteniendo la aireación en 1.5 vvm.

En las Tablas 19 y 20 se muestran los resultados globales y específicos del desempeño biológico del Periodo 3.

**Tabla 19. Resultados globales del desempeño biológico de los cultivos en el Periodo 3**

| Parámetro                              | Periodo 3          |                    |                   |                    |
|--|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|  | 3                  | 3 <sub>b</sub>     | 6                 | 6 <sub>b</sub>     |
| Cultivo                                |                    |                    |                   |                    |
| Peso seco (mg / L)                     | 382.67<br>(189.42) | 394.67<br>(126.75) | 387.41<br>(42.22) | 323.70<br>(134.08) |
| Chla (mg / L)                          | 0.25<br>(0.19)     | 0.46<br>(0.07)     | 3.76<br>(1.74)    | 3.52<br>(1.54)     |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg / mL) | 0.12<br>(0.03)     | 0.07<br>(0.04)     | 3.51<br>(0.97)    | 2.36<br>(0.86)     |
| Act. nitrogenasa (µg Eteno/mL)         | 0.02               | 0.01               | 4.93              | 2.77               |

Periodo 3: t = 70d, V = 1 L ; ( ): desviación estándar

**Tabla 20. Resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en el Periodo 3**

| Parámetro  | Periodo 3 |                |      |                |
|--|-----------|----------------|------|----------------|
|  | 3         | 3 <sub>b</sub> | 6    | 6 <sub>b</sub> |
| Cultivo  |           |                |      |                |
| 1x10 <sup>3</sup> Chla (mg / mg peso seco)       | 0.7       | 1.2            | 9.7  | 10.9           |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg / mg peso seco) | 0.3       | 0.1            | 9.1  | 7.3            |
| Actividad de nitrogenasa (µg Eteno/mg peso seco) | 0.05      | 0.02           | 12.7 | 8.6            |

Periodo 3: t = 70d, V = 1 L

Es posible apreciar en estas tablas que al parecer no existen diferencias significativas en cuanto a la producción de biomasa seca en todos los cultivos, en cuanto a clorofila *a*, amonio y actividad de nitrogenasa, el cultivo 6 presenta los mejores resultados globales (Tabla 19), sin embargo, existen diferencias importantes en cuanto a los parámetros específicos.

Mientras que los cultivos 3 y 3<sub>b</sub> presentan bajos resultados de contenido de Chl *a* y excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por unidad de biomasa seca (Tabla 20), los cultivos 6 y 6<sub>b</sub> muestran incrementos importantes respecto del periodo 2. En cuanto al contenido de Chl *a*, el cultivo 6 tiene un incremento de 83%, mientras que el cultivo 6<sub>b</sub> presenta un aumento de 38%. Con respecto a la excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, el cultivo 6 muestra un aumento de 405%, y el cultivo 6<sub>b</sub> de 192%.

Para lograr mayor esclarecimiento sobre el desempeño biológico de los cultivos en cuanto al proceso de fijación de nitrógeno, además de que se trata de poblaciones microbianas multiespecie, se procedió a evaluar la actividad de nitrogenasa del consorcio de acuerdo al método de reducción de acetileno propuesto por Venkataraman (1981).

En el Periodo 3 los cultivos 6 y 6<sub>b</sub> mostraron valores de actividad importantes, lo que concuerda con los resultados de excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> discutidos previamente (Tablas 19 y 20).

Por lo anterior y considerando que los resultados obtenidos del cultivo 3 a temperatura baja y alta fueron poco favorables, se decidió escalar sólo los cultivos del punto 6 a temperatura alta y baja. Dicho escalamiento se hizo al día 172 a un volumen útil de 1.9 L en fotobiorreactores con una configuración de columna de burbujas de 2 L de capacidad total (Vega-Estrada *et al.*, 2005), mostradas en las figuras 12 y 13.



**Figura 12. Cultivo 6**



**Figura 13. Cultivo 6<sub>b</sub>**

El escalamiento se realizó colocando 300 mL de suspensión de cultivo en cada biorreactor, aforando a 1.9 L con medio BG-11<sub>0</sub> estéril, con un flujo de aire de 1.9 L / min (1 vvm). Las condiciones anteriores se establecieron en base al modelo de comportamiento  $k_L a$  vs flujo de aire en columnas de burbujas realizado por Acosta-Ramírez (2006) (Tabla 21), en donde se determinó que al flujo de aire estudiado, se presenta el mismo punto de inflexión en la transferencia de masa ( $k_L a$ ) que el obtenido para el fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift previamente evaluado.

**Tabla 21. Resultados de la evaluación del coeficiente de transferencia de masa en las columnas de burbuja de 2 L**

| Flujo de aire (L/ min) | $k_L a$ (s <sup>-1</sup> ) | $k_L a$ (h <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0.5                    | 0.002537                   | 9.1332                     |
| 1                      | 0.003743                   | 13.4748                    |
| 1.5                    | 0.005126                   | 18.4536                    |
| 1.9                    | 0.05853                    | 21.0708                    |
| 2.2                    | 0.006756                   | 24.3216                    |
| 2.4                    | 0.007589                   | 27.3204                    |
| 2.5                    | 0.008169                   | 29.4084                    |
| 2.6                    | 0.008832                   | 31.7952                    |
| 2.9                    | 0.008282                   | 29.8152                    |
| 2.9                    | 0.008624                   | 31.0464                    |
| 3.1                    | 0.009028                   | 31.5008                    |

Acosta-Ramírez (2006)

Los resultados del desempeño del Periodo 4 se muestran en las Tablas 22 y 23.

**Tabla 22. Resultados globales del desempeño biológico de los cultivos en el Periodo 4**

| Parámetro                              | Periodo 4          |                    |
|--|--------------------|--------------------|
|  | 6                  | 6 <sub>b</sub>     |
| Cultivo                                |                    |                    |
| Peso seco (mg / L)                     | 542.50<br>(210.54) | 477.39<br>(213.23) |
| Chla (mg / L)                          | 7.26<br>(4.51)     | 4.13<br>(1.48)     |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg / mL) | 0.75<br>(0.82)     | 1.58<br>(0.68)     |
| Actividad de nitrogenasa (µg Eteno/mL) | 4.69<br>(0.82)     | 7.29<br>(1.03)     |

Periodo 4: V = 1.9 L, t = 60 d; ( ): desviación estándar

**Tabla 23. Resultados del desempeño biológico específico de los cultivos en el Periodo 4**

| Parámetro   | Periodo 4 |                |
|---|-----------|----------------|
|   | 6         | 6 <sub>b</sub> |
| Cultivo   |           |                |
| 1x10 <sup>3</sup> Chla<br>(mg / mg peso seco)       | 13.4      | 8.7            |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>(µg / mg peso seco) | 1.4       | 3.3            |
| Actividad de nitrogenasa<br>(µg Eteno/mg peso seco) | 8.6       | 15.3           |

Periodo 4: V = 1.9 L , t = 60 d

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 22 podemos apreciar un aumento considerable en cuanto a la producción de biomasa en ambos cultivos, sin embargo, la excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por unidad de biomasa (Tabla 23) sufre una disminución importante, lo cual contrasta de manera interesante con el aumento mostrado en la actividad de nitrogenasa en la columna del cultivo 6<sub>b</sub>. Lo anterior podría deberse a que las especies microbianas no fijadoras de nitrógeno presentes en los cultivos, consumen formas químicas de nitrógeno excretadas al medio por las especies microbianas fijadoras de nitrógeno, provocando que la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el medio se vea afectada de manera importante.

Cabe destacar también que aunque el cultivo 6 a temperatura baja presenta los mejores resultados en cuanto a cantidad de amonio excretado y mayor actividad de nitrogenasa, el cultivo 6 a temperatura alta en casi todos los periodos presenta un crecimiento mayor y mucho más rápido comparado con el 6<sub>b</sub>.

### **8.2.3. Observaciones al microscopio óptico como apoyo en la identificación de los géneros presentes en los consorcios microbianos**

Se realizó un seguimiento al microscopio óptico, con la finalidad de tratar de identificar, a partir de sus características morfológicas, los posibles géneros de los microorganismos que conforman el consorcio.

En la Tabla 24 se muestran los posibles géneros de microorganismos identificados en base a la comparación con claves morfológicas en cada uno de los cultivos en los diferentes periodos. De acuerdo a la tabla podemos apreciar que desde el inicio del experimento se pudo detectar la presencia de géneros microbianos fijadores de nitrógeno como *Nostoc*, *Anabaena* y *Rickellia*. A partir del día 67 (Periodo 2) existen al menos 4 géneros que aparecen constantemente en las observaciones: *Nostoc*, *Anabaena*, *Planktothrix* y bacterias.

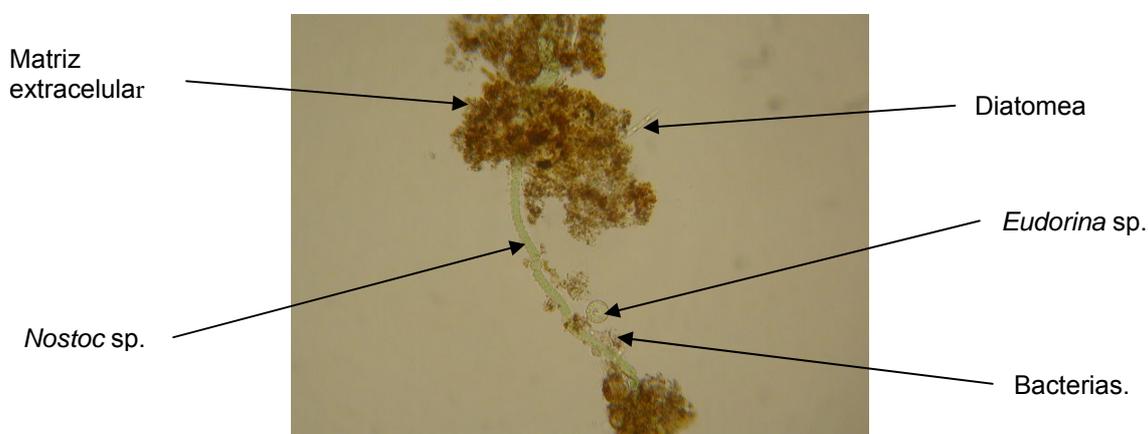
**Tabla 24. Géneros de microorganismos presentes en los cultivos en los diferentes periodos de estudio**

| Cultivo Día | 3   | 3 <sub>b</sub>  | 6  | 6 <sub>b</sub>  |
|-------------|---|---|--|---|
| 12          | N.D.  | N.D.  | Diatomeas,<br><i>Eudorina</i> sp.  | Diatomeas, <i>Nostoc</i> sp.  |
| 25          | N.D.  | <i>Synechocystis</i> sp.,<br><i>Scenedesmus</i> sp.,<br><i>Cyanosarcina</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Eudorina</i> sp.,<br>protozoos | N.D.   | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Mycrocystis</i> sp.,<br><i>Rickelia intracelularis</i> ,<br><i>Eubacterium</i> ,<br>Diatomeas,<br>Bacterias                      |
| 29          | <i>Oscillatoria</i> sp.   | N.D.  | <i>Nostoc</i> sp.,<br>Diatomeas,<br>Bacterias  | N.D.  |
| 42          | N.D.  | <i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias   | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Eudorina</i> sp.,<br><i>Synechocystis</i> sp.,<br>Bacterias   | <i>Anabaena</i> sp.,<br>Diatomeas,<br>Bacterias   |
| 67          | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias                         | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias   | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Cyanosarcina</i> sp.,<br>Bacterias  | <i>Anabaena</i> sp.,<br>Protozoos,<br>Bacterias   |
| 95          | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias                         | <i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias   | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br><i>Oscillatoria</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br>Bacterias  | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Synechocystis</i> sp.,<br><i>Eudorina</i> sp.,<br>Bacterias  |
| 117         | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br><i>Eudorina</i> sp.,<br>Bacterias | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias   | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br>Bacterias  | <i>Anabaena</i> sp.,<br>Bacterias,<br>Protozoos   |
| 145         | <i>Nostoc</i> sp.<br>Bacterias<br><i>Anabaena</i> sp.                           | <i>Nostoc</i> sp.<br><i>Mycrocystis</i> sp.<br>Bacterias  | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Nostoc</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br>Diatomeas<br>Bacterias  | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br>Bacterias,<br>Protozoos<br>Ameboides   |
| 186         | N.D.  | N.D.  | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br><i>Oscillatoria</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Synechocystis</i> sp.,<br><i>Monoraphidium</i> sp.,<br>Bacterias | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Synechocystis</i> sp.,<br><i>Mycrocystis</i> sp.,<br>Bacterias<br>Protozoos |
| 209         | N.D.  | N.D.  | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Oscillatoria</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Monoraphidium</i> sp.,<br>Bacterias   | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Mycrocystis</i> sp.,<br>Bacterias   |

|            |      |      | Ameboides  | Protozoos<br>Ameboides  |
|------------|------|------|--|---|
| <b>221</b> | N.D. | N.D. | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Monoraphidium</i> sp.,<br>Bacterias                           | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Mycrocystis</i> sp.,<br><i>Synechocystis</i> sp.,<br>Bacterias<br>Protozoos<br>Ameboides              |
| <b>253</b> | N.D. | N.D. | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Monoraphidium</i> sp.,<br>Diatomeas<br>Bacterias<br>Protozoos | <i>Anabaena</i> sp.,<br><i>Rivularia</i> sp.,<br><i>Planktothrix</i> sp.,<br><i>Mycrocystis</i> sp.,<br><i>Synechocystis</i> sp.,<br>Diatomeas<br>Bacterias<br>Protozoos<br>Ameboides |

Período 1: Días 12,25,29,42; Período 2: Días 67,95; Período 3: Días 117,145; Período 4: Días 186,209,221,253; N.D.: no determinados

En el día 19 de cultivo, se pudo apreciar la aparición de una matriz extracelular rodeando las estructuras de las cianobacterias (Figura 14), con posibles estructuras bacterianas adheridas en su superficie., la cual desde entonces permanece en los cultivos 6<sub>a</sub> y 6<sub>b</sub> principalmente, aunque pudo observarse su presencia en el cultivo 3<sub>b</sub>, la cual desapareció a partir del periodo 3. De Philippis y Vincenzini (1998) mencionan que una de las principales funciones atribuida a la cápsula o exomatriz en cianobacterias es la de servir como protección contra desecación o depredadores, por lo que podemos sugerir que se presenta un efecto de protección debido a la matriz extracelular en nuestros cultivos, lo que provoca una mayor resistencia contra los disturbios del ambiente, que a su vez le ayuda a los consorcios para obtener un mejor desempeño biológico.



**Figura 14. Cultivo 6<sub>b</sub> día 25 (400x)**

## 9. Conclusiones

- El fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift presenta un valor del coeficiente de transferencia de masa superior (1.4-50 veces) a otras configuraciones de fotobiorreactores reportadas en la literatura.
- Se obtuvo un  $k_L a$  de  $18 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de mezclado de 6 s a un flujo de aire de 30 L/min.
- El valor de  $k_L a$  encontrado se considera el más óptimo ya que no se somete a un estrés innecesario a la célula y se obtiene una eficiente transferencia de masa de aproximadamente un 80%.
- A partir del muestreo de un campo arrocero fue posible establecer un consorcio capaz de fijar nitrógeno.
- El consorcio formado a partir del muestreo del punto 6 y sometido a temperatura baja presenta los mejores resultados para una fijación eficiente de nitrógeno.
- La capacidad de fijación de nitrógeno que presenta el consorcio en un fotobiorreactor de 2 L de capacidad, indica que posee las propiedades óptimas para su posterior utilización como biofertilizante.
- El consorcio a partir del día 67 (Período 2) de estudio presento al menos 3 géneros que aparecen constantemente en las observaciones: *Nostoc*, *Anabaena*, *Planktothrix* además de bacterias.

## 10. Cronograma de actividades

| Mes \ Actividad  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Revisión de la literatura  | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X  | X  | X  |
| Determinación de regímenes de flujo                                | X |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Cálculo de $k_{La}$  | X | X | X |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Cálculo de $k_{LaCO_2}$  |   | X | X | X |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Determinación del tiempo de mezclado                               |   |   | X | X | X |   |   |   |   |    |    |    |
| Correlación de $K_{La}$ , $K_{LaCO_2}$ y t mezclado                |   |   |   |   | X | X |   |   |   |    |    |    |
| Muestreo en campo arrocero   |   |   |   | X | X | X |   |   |   |    |    |    |
| Establecimiento, selección y propagación de consorcios microbianos |   |   |   |   |   |   | X | X | X | X  | X  |    |
| Escritura de informes, artículos y reporte final                   | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X  | X  | X  |

## 11. Referencias

- Acosta** Ramírez D. (2006). Determinación del coeficiente de transferencia de masa en columnas de burbuja. Reporte de estancia. CINVESTAV. Dpto. Biotecnología y Bioingeniería. Lab.21 Biotecnología de Microalgas.
- APHA**, AWWA, WPCF (1971). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 13<sup>th</sup> Edition. Washington, D.C.
- Barbosa** M.J., Janssen M., Nienke H., Tramper J., Wijfels R.H. (2003) Microalgae Cultivation in Air-Lift Reactors : Modeling Biomass Yield and Growth Rate as a Function of Mixing Frequency. *Biotech. Bioeng.* **82**(2): 170-179.
- Becker** EW (1994) Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press. Reino Unido. 293 pp.
- Boussiba**, S. (2002). Nitrogen Fixing Cyanobacteria and its Potential Applications. En: Kannaiyan, S. (Ed.) *Biotechnology of Biofertilizers*. Narosa Publishing House, New Delhi, India. pp. 259-268.
- Borowitzka** MA, Borowitzka LJ (Ed) (1988) Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brock** T. D. (1993). Microbiología. 6<sup>a</sup> ed. Prentice Hall Hispanoamericana S. A., México. pp 770-773.
- Brock** J. T., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003). Biology of the microorganisms. PPH (Ed). NY.
- Camacho** Rubio F, Acien Fernandez FG, Sanchez Perez JA, Gaecia Camacho F, Molina Grima E (1999). Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol Bioeng* **62**: 71-86.
- Camacho** Rubio F., Sánchez-Mirón A., Cerón-García M.C., García-Camacho F., Molina-Grima E., Chisti Y. (2004). Mixing in bubble columns: a new approach for characterizing dispersion coefficients. *Chem. Eng. Science* **59**:4369-4376.
- Chisti** M. Y. (1989). Airlift Bioreactors. Elsevier Science Publishing Ltd. Essex UK. 345 pp.
- Contreras** A, Garcia F, Molina E, Merchuk JC (1998). Interaction between CO<sub>2</sub>-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stresses on the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **60**:317-325.
- De Philippis** R., Vincenzini M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 151-175.
- Fontes** A.G., Vargas M.A., Moreno J., Guerrero M.G., Losada M. (1987). Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass*, **13**: 33-43.
- Goyal** S.K. (2002). A profile on Algal Biofertilizer. En: Kannaiyan, S. (Ed.) *Biotechnology of Biofertilizers*. Narosa Publishing House, New Delhi, India. pp. 250-258.
- Grobbelar** JU (2000). Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* **12**: 201-206.
- Gudin** C, Chaumont D (1983). Solar biotechnology study and development of tubular solar receptors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. En: Palz W, Pirrwitz D (Ed.) *Proceedings of the Workshop and EC Contractor's Meeting in Capri*. Reidel. Dordrecht, Holanda. pp. 184-193.
- Guerrero** M. G. (1985). Assimilatory nitrate reduction. En: Techniques in Bioproducity and Photosynthesis. J. Coombs, D. O. Hall (Ed.), Pergamon Press, Oxford, pp165-172.
- Janssen** M., Tramper J., Mur L.R., Wijfels R.H. (2003). Enclosed Outdoor Photobioreactors: Light Regime, Photosynthetic Efficiency, Scale-Up, and Future Prospects. *Biotech. Bioeng.* **81**(2): 193-210.
- Kannaiyan** S., Aruna S.J., Merina P.K. S., Hall D.O. (1997). Immobilized Cyanobacteria as a Biofertilizer for Rice Crops. *J. Appl. Phycol.* **9**: 167-174.

- Miyamoto K.**, Wable O., Benemann J.R. (1988). Vertical tubular reactor for microalgae cultivation. *Biotechnol. Lett.* **10**: 703-708.
- Moo-Young M.** (1985). *Comprehensive Biotechnology*. Vol .2, 1st Ed. Pergamon Press Oxford, U.K.
- Morales E.**, Rodríguez M, García D, Loreto C., Marco E. (2002) Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>. *Interciencia*. **27**: 373-378.
- Pulz O.** (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:287-293.
- Pirt SL,** Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HH., Bazin M.J. (1983) A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: Design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **33B**: 35-38.
- Prósperi C.H.** (1999). Las algas tóxicas y su efecto sobre el ambiente. Serie Verde. Cuadernos de Divulgación de la Universidad Libre del Ambiente (ULA). ULA (Ed), Córdoba, 1-8p. Disponible en [www.funam.org.ar](http://www.funam.org.ar)
- Prósperi C.H.** (2000) Cyanobacteria in human affairs. *Interciencia* **25**: 303-306.
- Querijero-Palacpac N.M.,** Milagrosa M., Boussiba S. (1990). Mass cultivation of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Gloeotrichia natans*, indigenous to rice-fields. *J.Appl.Phycol.*, **2**: 319-325.
- Richmond A.** (1987). The challenge confronting industrial microagriculture: high photosynthetic efficiency in large-scale reactors. *Hydrobiology*. **151/152**: 117-121.
- Richmond A.,** Boussiba S., Vonshak A., Kopel R. (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *J.Appl.Phycol.*, **5**: 327-332 .
- Rippka R.,** Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**:1-61.
- Roger P.A.,** Kulasooriya (1980). Blue-Green Algae and Rice. The Internacional Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.pp. 1-36.
- Roger P.A.,** Santiago-Ardales S., Reddy P.M., Watanable I. (1987). The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. *Biol. Fert. Soils*, **5**: 98-105.
- Sánchez-Mirón A.,** García-Camacho F., Contreras-Gómez A., Molina-Grima E., Chisti, Y. (2000). Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture. *AIChE J.* **46**(9):1872-1887.
- Sirenko L.,** Pulz O. (2000). Influence of algae on physiological and biochemical processes in plants. Abstracts of the 4th European workshop on biotechnology of microalgae. Bergholz-Rehbrücke, Germany.
- Soeder C.J.** (1986) An historical outline of applied algology. En: Richmond A (ed) Handbook of microalgal mass culture. CRC, Boca Raton, Fla., pp 25.
- Sorensen J.N.** (1999). Nitrogen effects on vegetable crops production and chemical composition. *Acta Horticulturae*, **506**: 161-165.
- Talbot P.,** Lencki R.W., Nouie J. (1990). Carbon dioxide absorption characterization of a bioreactor for biomass production of *Phormidium bohneri*: comparative study of three types of diffuser. *J. Appl. Phycol.* **2**: 341-350.
- Suquilanda V. M.** (2003). Manejo integrado de plagas en el cultivo de arroz. Organización Mundial de la Salud, proyecto manejo adecuado de plaguicidas, 39pp.
- Thajuddin N.,** Subramanian G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.*. **89**(1): 47-57.
- Torzillo G,** Pushparaj B, Bocci F, Balloni W, Materassi R., Florenzano G. (1986) Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass*. **11**: 61-64.

- Tredici** M.R., Carlozzi P., Chini-Zitelli G., Materassi R. (1991). A Vertical Alveolar Panel (VAP) for Outdoor Mass Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria. *Biores. Technol.* **38**: 153-159.
- Tredici** M.R. (2004). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. En: Richmond, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. Oxford. pp. 178-214.
- Treybal** R.E. (1987). Operaciones de transferencia de masa. McGraw-Hill ed., Mexico, 858 pp.
- Tsoglin** L., Gabel B. (2000) The technology of production of biomass labeled with stable isotopes. Abstracts of the 4<sup>th</sup> European workshop on biotechnology of microalgae. Bergholz-Rehrbrücke, Germany.
- Vega-Estrada** J., Montes Horcasitas C., Dominguez Bocanegra R., Cañizares Villanueva O. (2005). *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 31–35
- Venkataraman** G.S. (1981). Blue-Green Algae for Rice Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 1981 (RAS/75/004).
- Venkataraman** L.V. (1986). Blue-green algae as biofertilizers. En: *Handbook of microalgal Mass Culture*.(ed) A.Richmond, CRC Press, Boca Raton, FL., pp.455-471.
- Vilchez** C, Garbayo I, Lobato M.V., Vega J.M. (1997). Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 562-572.
- Watanabe** I. (1984). Use of symbiotic and free-living blue-green algae in rice culture. *Outlook Agric.*, **13**: 166-72 .
- Zarrouk** K.C. (1966). Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* . Theses, University of Paris, France. En : Domínguez-Bocanegra, A.R. (1991). Crecimiento de *Spirulina maxima* en residuales porcinos naturales digeridos aeróbicamente. Tesis profesional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN México. 28 pp.
- Zhang** K., Kurano N., Miyachi S. (2002). Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **25**: 97-101.

## ANEXO I

### METODOLOGIAS UTILIZADAS

#### I. Evaluación hidrodinámica y de transferencia de masa del fotobiorreactor

##### Determinación de $K_{La}$ (Método dinámico). Moo-Young (1985).

Procedimiento:

- Se gasea el biorreactor con  $N_2$  para eliminar el  $O_2$  presente en el interior del reactor hasta alcanzar una concentración de oxígeno disuelto cercana a cero
- Se cierra la inyección de  $N_2$  y se inicia la aireación con flujo constante; en este momento se toma como el tiempo 0 y se comienza el monitoreo de oxígeno disuelto con la sonda de oxígeno a diferentes tiempos
- El monitoreo se detiene al alcanzar  $C^*$  (saturación)
- Se grafica  $\ln(C^* - C_L)$  vs  $t$  calculando así el valor de  $k_{La}$  mediante la pendiente de la gráfica

##### Determinación del tiempo de mezclado (Método del trazador ácido). Camacho-Rubio *et al.* (2004).

Procedimiento:

- Establecer un flujo de aire
- Airear el fotobiorreactor por 20 min.
- Colocar un medidor de pH en el centro de la zona descendente del fotobiorreactor
- Adicionar una solución de NaOH 12 M hasta alcanzar un pH de 4.5
- Alcanzado el pH anterior, adicionar inmediatamente 25 mL de HCl al 35% en el centro de la superficie de dispersión
- Al momento de adicionar el HCl tomar lecturas cada 5 s del pH hasta que el valor se mantenga estable
- Graficar pH contra tiempo
- Realizar los pasos anteriores probando diferentes flujos de aire
- Graficar tiempo de mezclado contra flujo de aire para observar la tendencia

#### II. Metodologías de evaluación de los cultivos

##### Determinación de crecimiento por absorbancia total. Kannaiyan *et al.* (1997).

Procedimiento

- Tomar 5mL de la suspensión microbiana a cuantificar
- Medir en espectrofotómetro su absorbancia a 750nm
- Graficar Absorbancia vs. Biomasa (en base a peso seco) para correlacionar el crecimiento

### **Determinación de peso seco. Tredici *et al.* (1991).**

Procedimiento:

- Se toma un volumen de 15 mL de suspensión de cultivo
- Se colectan las células mediante filtración
- La membrana con células se coloca a peso constante a 105°C por 24 h
- Calcular el peso seco de la biomasa, reportando como mg biomasa / mL

### **Actividad de nitrogenasa mediante ensayo de reducción de acetileno. Venkataraman *et al.* (1981).**

Procedimiento:

- Se lleva a cabo en viales de 25 mL de capacidad
- Colocar 10 mL de suspensión del consorcio
- Se reemplazan 1.5 mL de la atmósfera interior por 1.5 mL de acetileno
- Se incuba por 24 h con iluminación de 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
- Se analiza la fase gaseosa en cromatógrafo de gases en busca de eteno

### **Determinación de amonio y amonio disuelto. APHA, AWWA, WPCF (1971).**

Procedimiento:

Preparar las siguientes soluciones:

- 1.-Acido Hipocloroso: A 40 mL de agua destilada adicionar 10 mL de un colorante comercial al 5%. Ajustar pH a 6.5-7 con HCl
- 2.-Sulfato manganoso (0.003 M): Disolver 50 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada
- 3.-Fenato: Disolver 2.5 g NaOH y 10g de fenol( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ) en 100 mL de agua ammonia-free

A 10 mL de la muestra adicionar:

- 0.05 mL de la solución de sulfato manganoso
- 0.5 mL de la solución de ácido hipocloroso
- 0.6 mL de la solución de fenato
- Esperar 10 min. para la formación de color
- Leer en el espectrofotometro a 630 nm