



**Instituto Politécnico Nacional**



Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

*TESIS*

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Alfonso Manuel Sepúlveda Gálvez

Ingeniero Bioquímico

**Crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores con iluminación controlada**

Dirigida por

Dr. Juan S. Aranda Barradas

Dr. Sergio García Salas

México, D.F., enero de 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 11 horas del día 5 del mes de enero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

"Crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores con iluminación controlada"

Presentada por el alumno:

Sepúlveda Gálvez Alfonso Manuel  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	5	1	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Director(a) de tesis

Dr. Juan S. Aranda Barradas

Dra. Ma. del Carmen Oliver S.

Dr. Agustín Badillo Corona

Director(a) de tesis

Dr. Sergio García Salas

Dr. Luis Fernández Linares

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

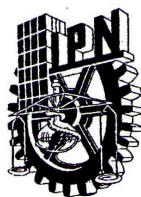
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

Dra. Guadalupe Ramírez Sotelo

SECRETARÍA DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F., el día 12 del mes de enero del año 2012, el que suscribe Alfonso Manuel Sepúlveda Gálvez alumno del Programa de Maestría en Bioprocesos con número de registro B09512, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas y el Dr. Sergio García Salas y cede los derechos del trabajo intitulado "Crecimiento de cianobacterias en fotobiorreactores con iluminación controlada" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [sega\\_asg@hotmail.com](mailto:sega_asg@hotmail.com), [juan.s.aranda@gmail.com](mailto:juan.s.aranda@gmail.com), [sgs2x@yahoo.com.mx](mailto:sgs2x@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Alfonso Manuel Sepúlveda Gálvez

## Declaración de originalidad

“Yo Alfonso Manuel Sepúlveda Gálvez declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”



Alfonso Manuel Sepúlveda Gálvez



Dr. Juan S. Aranda Barradas



Dr. Sergio García Salas

Vo. Bo.

Directores de Tesis

## Resumen

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos capaces de utilizar la luz y el CO<sub>2</sub> presente en el ambiente para generar oxígeno y biomasa como productos principales, además de metabolitos secundarios como carbohidratos y lípidos. En el cultivo de cianobacterias uno de los aspectos más importantes en el diseño del proceso es el suministro de energía lumínica.

En este trabajo se evaluó la influencia de diferentes configuraciones de iluminación en constantes cinéticas, rendimientos y productividades del cultivo de cianobacterias en el fotobiorreactor prototipo

Se especificaron tres fotobiorreactores en forma de columna de burbujeo de dos tubos concéntricos con tres diferentes configuraciones de iluminación: i) lámpara fluorescente que irradiaba sobre el fotobiorreactor desde un solo punto, ii) tira comercial flexible de LEDS colocada en forma de espiral rodeando la parte exterior del tubo externo del fotobiorreactor y iii) tira comercial flexible de LEDS colocada en forma de espiral rodeando la parte interior del tubo interno del fotobiorreactor.

La biomasa generada con la configuración de iluminación de la tira de LEDS externa fue de 112 millones de células mL<sup>-1</sup>, aproximadamente el doble de la biomasa generada con los otros dos sistemas utilizados estas evidencias experimentales sugieren que la cantidad de luz disponible dentro del medio es mayor con el sistema lumínico de LEDS externo debido a las trayectorias de los fotones dentro del fotobiorreactor y que, con base al análisis estadístico realizado, no hay diferencia significativa entre el crecimiento celular con un sistema lumínico de LEDS interno en forma de espiral y una fuente lumínica de fluorescente



## **Abstract**

Cyanobacteria are photosynthetic organisms capable of use light and the CO<sub>2</sub> in the atmosphere to produce oxygen and biomass as the main products in addition to secondary metabolites such as carbohydrates and lipids. In cyanobacteria growth, one of the most important aspects in the design of the process is the supply of light energy.

This study evaluated the influence of different lighting configurations in kinetic constants, yields and productivity of cyanobacteria in the prototype photobioreactor

It specified three photobioreactors as bubble column with three different lighting configurations: i) fluorescent lamp radiating on the photobioreactor from a single point, ii) flexible LED commercial strip placed in a spiral around the photobioreactor outer tube and iii) flexible LED commercial strip placed in a spiral around the inside of the inner tube photobioreactor.

The biomass generated by the configuration of external LED strip was 112 million cells mL<sup>-1</sup>, about twice the biomass generated with the other two systems. These experimental evidences suggest that the amount of light available within the medium is higher with external LED lighting systems due to the paths of photons inside the photobioreactor and that, based on the statistical analysis, there is no significant difference between cell growth with internal LED lighting system of spiral and fluorescent light source

## **Agradecimientos**

A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional por la formación adquirida en el campo de la investigación científica.

Al Dr. Juan Aranda Barradas y Dr. Sergio García Salas por permitirme trabajar con ellos y guiarme con paciencia a lo largo de este tiempo.

Al Comité Tutorial: Dr. Luis Fernández Linares y Dr. Agustín Badillo por el tiempo dedicado a la revisión de la investigación y por las observaciones para contribuir a la mejora de éste documento.

A mi familia y amigos por el apoyo incondicional y paciencia.

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de cuadros .....</b>	<b>xii</b>
<b>Índice de ecuaciones.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Cianobacterias</i> .....	1
1.1.1 Estructura y división celular de las cianobacterias .....	1
1.1.2 Fotosíntesis en cianobacterias .....	4
1.2 <i>Cultivo de cianobacterias</i> .....	5
1.2.1 Suministro de energía lumínica .....	6
1.2.2 Enriquecimiento con CO <sub>2</sub> .....	7
1.2.3 Remoción de Oxígeno .....	8
1.2.4 Suministro de nutrientes.....	9
1.2.5 Mezclado .....	9
1.2.6. Control de temperatura .....	10
1.2.7 Otros factores.....	10
1.3 <i>Tipos de fotobiorreactores</i> .....	11
1.3.1 Fotobiorreactores tubulares.....	11
1.3.2 Fotobiorreactores de superficie plana.....	13
1.3.3 Fotobiorreactores tipo fermentador de tanque agitado.....	13
<b>2. Justificación .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
3.1 <i>Objetivo general</i> .....	16
3.2 <i>Objetivos particulares</i> .....	16
<b>4. Materiales y métodos .....</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Protocolo experimental</i> .....	17
4.2 <i>Cepas y medios de cultivo</i> .....	17
4.3 <i>Descripción de los fotobiorreactores</i> .....	18
4.4 <i>Evaluación del desempeño hidrodinámico de los fotobiorreactores</i> .....	22
4.5 <i>Condiciones de operación para el cultivo celular de Synechocystis sp.</i> .....	23
4.6 <i>Técnicas analíticas</i> .....	24
4.6.1 Determinación de biomasa .....	24
4.6.2 Determinación del área iluminada del fotobiorreactor .....	24
4.6.3 Determinación de densidad celular crítica (CCD).....	26
4.6.4 Determinación de aprovechamiento lumínico.....	27
4.6.5 Determinación de carbohidratos totales .....	27
4.7 <i>Análisis estadístico</i> .....	28



<b>5. Resultados y discusión .....</b>	<b>29</b>
5.1 Evaluación del desempeño hidrodinámico de los fotobiorreactores.....	29
5.2 Cultivo celular de <i>Synechocystis</i> sp. ....	32
5.3 Análisis Cinético .....	40
5.4 Acumulación de carbohidratos .....	47
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>50</b>
<b>7. Referencias .....</b>	<b>51</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>58</b>
Anexo 1. Ajuste de las curvas experimentales con el modelo logístico. ....	58
Anexo 2. Curva de distribución de tiempos de residencia F. ....	60
Anexo 3. Curvas de $\ln(X)$ en función del tiempo .....	61
Anexo 4. Lineweaver-Burk.....	62

## Índice de Figuras

Figura 1. Micrografía electrónica de <i>Microcystis sp.</i> cw-pared celular, t-tilacoides, n-nucleoplasma, cs-carboxisomas, cy- gránulos de cianoficina y ph- gránulos de polihidroxiálkanoato. Escala = 0.5 nm.....	2
Figura 2. La luz es una onda electromagnética transversal organizada en paquetes llamados fotones.....	4
Figura 3. Productos principales de las reacciones de la fotosíntesis oxigénica.....	5
Figura 4. Representación esquemática de diferentes tipos de fotobiorreactores. A) Reactor airlift y columna de burbujeo, B) Reactores tubulares helicoidales, C) Reactores con forma $\alpha$ , D) Reactores tubulares horizontales, E) Reactores de supeficie plana, F) Reactor tipo fermentador de tanque agitado.....	14
Figura 5. Representación esquemática del desarrollo experimental del trabajo de tesis.....	17
Figura 6. Fotografía y diagrama de los fotobiorreactores diseñados.....	18
Figura 7. Difusor de aire y su posición dentro del fotobiorreactor.....	19
Figura 8. Fotobiorreactor con sistema lumínico de lámpara fluorescente (FBR1).....	20
Figura 9. Fotobiorreactor con sistema lumínico de LEDS externo (FBR 2).....	21
Figura 10. Fotobiorreactor con sistema lumínico de LEDS interno (FBR 3).....	22
Figura 11 Representación esquemática de la posición del electrodo de pH y la adición de HCl utilizados en la técnica de adición de pulsos de HCl propuesta por Nielsen y Villadsen (1994) ..	23
Figura 12. Dimensiones que se utilizaron para el cálculo del área iluminada de cada fotobiorreactor.....	26
Figura 13. Concentración de moles $H^+$ con respecto al tiempo con diferentes velocidades de aireación.....	29
Figura 14. Curva de distribución de tiempos de residencia E del fotobiorreactor con diferentes velocidades de aireación.....	30
Figura 15. Tiempo de Residencia medio en función de la velocidad de aireación.....	32
Figura 16. Ejemplos de imágenes tomadas a la cámara de Neubauer para conteo celular. Imágenes de células tomadas en tres tiempos diferentes de la cinética de crecimiento de <i>Synechocystis sp</i> en los días 1, 14 y 25. La muestra de células utilizada para la imagen del FBR2 día 25 fue previamente diluida 1:2.....	33
Figura 17. Cinéticas de crecimiento ajustadas al modelo logístico y luz consumida en función del tiempo.....	34

Figura 18. Curvas de crecimiento ajustadas al modelo logístico. ....	35
Figura 19. Diagrama de las posibles trayectorias de los fotones dentro del fotobiorreactor emitidos desde un solo punto. ....	36
Figura 20 Velocidad específica de crecimiento con respecto al tiempo. ....	41
Figura 21. Variación de luz consumida dentro del fotobiorreactor con respecto al tiempo. ....	42
Figura 22. Ajuste de las curvas de luz consumida. ....	43
Figura 23. Curvas ajustadas de luz consumida con respecto al tiempo. ....	44
Figura 24. Variación de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) con respecto a la intensidad de luz en los tres fotobiorreactores. ....	46
Figura 25. Acumulación de carbohidratos en FBR1 y FBR2 después de inducir un estrés salino con NaCl. ....	49
Figura 26. Ajuste de las curvas experimentales con el modelo logístico. ....	59
Figura 27. Curva de distribución de tiempos de residencia F del fotobiorreactor con diferentes velocidades de aireación. ....	60
Figura 28. Curvas de Ln (X) vs Tiempo. ....	61
Figura 29. Linealización de las curvas del inverso de $\mu$ en función del inverso de la luz consumida por el método de Lineweaver-Burk. ....	62

## Índice de cuadros

Cuadro 1 Resultados de cinéticas de crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp. ....	38
Cuadro 2 <i>Análisis estadístico de los resultados de biomasa producida de las cinéticas de crecimiento.</i> ....	39
Cuadro 3 Comparación de tiempos característicos de las cinéticas y mezclado. ....	39
Cuadro 4 Análisis estadístico de los valores de velocidad específica de crecimiento en los diferentes fotobiorreactores. ....	41
Cuadro 5 Parámetros y $R^2$ de los ajustes de las curvas de luz consumida. ....	43
Cuadro 6 Análisis estadístico de los valores de luz consumida durante el tiempo de cultivo en los diferentes fotobiorreactores. ....	44
Cuadro 7 Valores de los parámetros la ecuación de Monod para los cultivos en los tres diferentes fotobiorreactores. ....	46
Cuadro 8 Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos experimentales de tiempo de mezcla al modelo logístico. ....	58

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento .....	22
Ecuación 2. Tiempo de duplicación .....	22
Ecuación 3. Área Iluminada de FBR 1 y FBR 2 .....	25
Ecuación 4. Área Iluminada de FBR 3. ....	25
Ecuación 5. Densidad Celular Crítica .....	26
Ecuación 6. Modelo Logístico. ....	27

# **1. Introducción**

## **1.1 Cianobacterias**

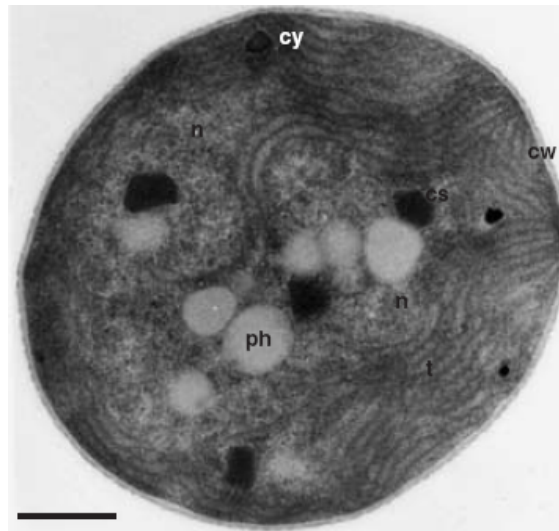
También conocidas como microalgas o bacterias verde-azules, son un filo del reino de las bacterias que comprende a aquellas que son capaces de obtener su energía por medio de la fotosíntesis oxigénica. Son un importante componente en el ciclo marino del nitrógeno y pueden encontrarse en casi cualquier ambiente por ejemplo: océanos, agua fresca, rocas o suelos. Son el único grupo de microorganismos capaces de reducir el nitrógeno y carbono en condiciones aeróbicas (Gault and Marler, 2009, Philips *et al.*, 1989, Rosales *et al.*, 2005).

A causa de sus actividades fotosintéticas son los mayores productores primarios de materia orgánica en ambientes acuáticos. Su potencial biotecnológico ha sido estudiado para la síntesis de bioproductos y sus posibles aplicaciones ambientales (Suh *et al.*, 2006, Peña-Vázquez *et al.*, 2009). Los sistemas algas-bacterias son eficientes en el tratamiento de contaminantes peligrosos, además, la biomasa generada puede ser comercializada (Muñoz and Guieysee, 2006, Parikh and Madamwar, 2006).

Las cianobacterias pueden proveer diferentes biocombustibles renovables. Estos incluyen metano producido por la digestión anaeróbica, biodiesel derivado de lípidos intracelulares y extracelulares, biohidrógeno producido fotobiológicamente, bioetanol derivado de carbohidratos acumulados en citosol. La idea de obtener estos combustibles no es nueva pero ha cobrado relevancia debido al incremento en el precio de los combustibles fósiles (Chisti, 2007, Posten and Schaub, 2009, Lehr and Posten, 2009, Rupprecht, 2009).

### *1.1.1 Estructura y división celular de las cianobacterias*

Los diferentes componentes de un cianobacteria son señalados en la Figura 1 que representa la micrografía electrónica de una célula de *Microcystis sp.*



(Tomaselli, 2004)

Figura 1. Micrografía electrónica de *Microcystis sp.* cw-pared celular, t-tilacoides, n-nucleoplasma, cs-carboxisomas, cy- gránulos de cianoficina y ph- gránulos de polihidroxiálcanoato. Escala = 0.5  $\mu\text{m}$

Una cianobacteria consta de las siguientes partes (Tomaselli, 2004).

#### 1.1.1.1 Pared celular

Las cianobacterias tienen una pared celular de cuatro capas del tipo Gram-negativa. La parte estructural consiste en capas de mureina (peptidoglicano) con una capa de lipopolisacáridos en su exterior. La falta de celulosa en su estructura facilita su uso para consumo humano. La pared celular puede tener pequeños poros y apéndices como fimbrias y pili.

#### 1.1.1.2 Membrana Plasmática

También llamada plasmalemma, se encuentra bajo la pared celular. Es una membrana muy delgada de aproximadamente 8nm de espesor. Una parte de

la membrana plasmática se proyecta hacia el interior del citoplasma y se enrolla varias veces sobre sí misma, además, controla selectivamente la entrada y salida de sustancias en el citoplasma (Stanier, 1992)

#### *1.1.1.3 Arreglo de tilacoides*

Los tilacoides son el sistema de membranas más evidente dentro de las cianobacterias, yacen libres en el citoplasma y contienen los pigmentos necesarios para la fotosíntesis. Los tilacoides parecen sacos aplanados con ficobilisomas sujetos a la superficie protoplasmática en filas espaciadas con regularidad. Los ficobilisomas contienen ficobiliproteínas que son comúnmente usadas como marcadores fluorescentes.

#### *1.1.1.4 Inclusiones celulares*

Las inclusiones celulares más comunes de las cianobacterias son: gránulos de glucógeno, gránulos de cianoficina, carboxisomas, gránulos de polifosfato, gotas lipídicas, vacuolas de gas y ribosomas. Los gránulos de glucógeno yacen entre los tilacoides y sirven como material de reserva en forma de gránulos de cianoficina, polímeros de arginina y ácido aspártico. También están presentes inclusiones poco usuales como gránulos de poli-hidroxitetrato que representan una potencial fuente natural de polímeros biodegradables (Tomaselli, 2004).

#### *1.1.1.5 División celular*

La división celular ocurre mediante fisión binaria con la construcción de la pared de afuera hacia adentro o la invaginación de la membrana citoplasmática y la capa de peptidoglicana sin envolver la capa externa. También puede ocurrir una fisión múltiple llevando a la formación de baeocitos. El DNA de las

cianobacterias no está organizado en cromosomas sino que se encuentra libre en el citoplasma junto con las membranas fotosintéticas.

### 1.1.2 Fotosíntesis en cianobacterias

El término fotosíntesis significa literalmente sintetizar utilizando luz. Es un proceso en el cual los organismos fotosintéticos utilizan la energía lumínica, en forma de pequeños paquetes llamados fotones (Figura 2), para sintetizar compuestos de carbono que no pueden ser formados sin la entrada de energía al sistema (Taiz and Zeiger, 2006).

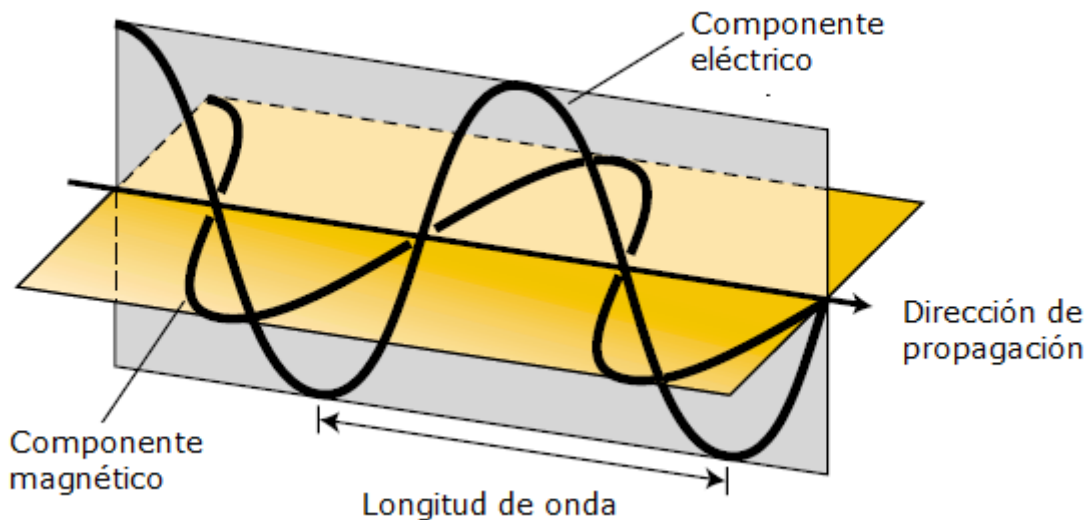


Figura 2. La luz es una onda electromagnética transversal organizada en paquetes llamados fotones.

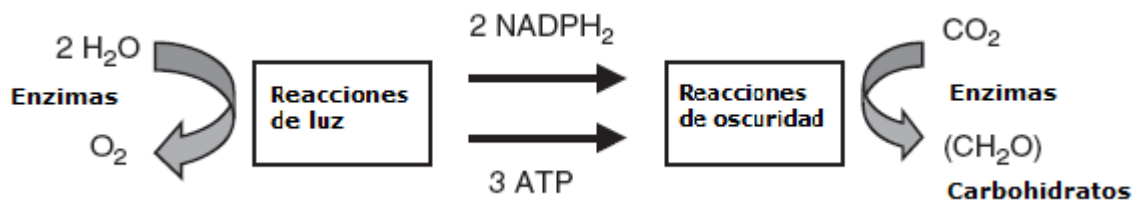
Para realizar la fotosíntesis, las cianobacterias solo son capaces de usar la radiación entre 400 y 700 nm. Esta parte del espectro de luz es llamada "Radiación fotosintéticamente activa" (PAR). Generalmente la intensidad de luz irradiada se expresa en términos de "Densidad de flujo de fotones" (PFD) que es el número de fotones que inciden en una superficie por unidad de tiempo.



La fotosíntesis es altamente dependiente de la PFD (Jannsen, 2002, Guven and Howard, 2006, Tzovenis et al., 2003)

La fotosíntesis oxigénica puede ser expresada como una reacción de oxidoreducción impulsada por la energía lumínica en la que el dióxido de carbono y el agua son convertidos en carbohidratos y oxígeno. Esta conversión se divide en dos fases llamadas reacciones de luz y reacciones de oscuridad (Masojídek et al., 2004).

En las reacciones de luz la energía lumínica es convertida en energía química proveyendo  $\text{NADPH}_2$  y ATP que serán utilizados en las reacciones de oscuridad en la reducción del dióxido de carbono a carbohidratos (Kirk, 2011) (Figura 3).



(Masojídek et al., 2004)

Figura 3. Productos principales de las reacciones de la fotosíntesis oxigénica.

## 1.2 Cultivo de cianobacterias

Al igual que en el cultivo de otros microorganismos, en el cultivo de cianobacterias se deben de tomar en consideración factores tales como: ciclo de vida del microorganismo, velocidad de crecimiento, productividad, estabilidad genética, requerimientos nutrimentales, etc. Para poder relacionar todas estas características con el diseño del fotobiorreactor se debe comenzar por poner especial atención en el microambiente que tendrá el microorganismo en dicho reactor.

Los cultivos de cianobacterias son típicamente fotoautotróficos; sin embargo se presentan alternativas de cultivos en condiciones mixotróficas donde la asimilación oxidativa de los compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub> a través de las reacciones fotosintéticas ocurren simultáneamente (Lee and Erickson, 1987).

De ahí que los factores en los que debemos de poner atención en el diseño del fotobiorreactor son: suministro de luz, transferencia de masa de gases hacia el medio (CO<sub>2</sub>) y desde el medio (O<sub>2</sub>), suministro de nutrientes y remoción de metabolitos secundarios potencialmente dañinos (Lee, 1999) así como control de temperatura, presión y pH.

### *1.2.1 Suministro de energía lumínica*

La productividad total de biomasa en los cultivos de cianobacterias es determinada por la calidad y cantidad de luz irradiada al fotobiorreactor (Zijffers et al., 2008b, Cornet, 2010). La energía lumínica a menudo limita la productividad del fotobiorreactor, es por eso que debe utilizarse con la mayor eficiencia posible (Janssen et al., 1999).

Si la cantidad de luz irradiada es insuficiente, disminuirá considerablemente la velocidad de crecimiento del microorganismo; mientras que si hay un exceso de luz en el medio se producirá la fotoinhibición, fenómeno en el cual los fotosistemas del microorganismo son dañados por la alta intensidad de luz (Hsieh and Wu, 2009).

Para evitar el daño de los sistemas fotosintéticos por el exceso de luz irradiada se diseñan sistemas que distribuyan la luz en una superficie más grande (Torzillo et al., 2003). También se puede disminuir el tamaño de las antenas fotosintéticas de las células con herramientas de biología molecular para reducir la absorción de luz y así permitir mayores rendimientos fotosintéticos (Melis et al., 1999).

Generalmente, la densidad celular y el recorrido de luz son tales que los fotobiorreactores puede dividirse en dos zonas. En la llamada zona fótica, las células son expuestas a la luz necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis, mientras que las células que se encuentran fuera de esta zona reciben poca o casi nada de luz para su metabolismo (Janssen et al., 2000).

El fotoperiodo al que esté sometido el cultivo también es importante en el diseño del proceso dado que la fotosíntesis conlleva reacciones de luz y oscuridad. La duración de los ciclos luz/oscuridad es un criterio fundamental para ser considerado en la producción de biomasa y la absorción del CO<sub>2</sub> (Jacob-Lopes et al., 2009, Meseck et al., 2005)

Hay diferentes fuentes luminosas que se pueden utilizar, algunos ejemplos son: Lámparas de tungsteno o halógeno, lámparas de mercurio, xenón o fluorescentes, diodos emisores de luz (LEDS) y lasers.

Los LEDS tienen algunas ventajas sobre las fuentes lumínicas convencionales: tienen una alta eficiencia de conversión de energía eléctrica a lumínica, no se necesita un sistema de enfriamiento debido a que no generan tanto calor, larga vida útil (Lee and Palsson, 1995). Estas características hacen a los LEDS un recurso adecuado para proveer la energía lumínica dentro del fotobiorreactor (Park and Lee, 2000, Chen et al., 2011, Katsuda et al., 2008).

En el diseño del sistema lumínico hay que considerar la interferencia que se presenta cuando las ondas emitidas por las fuente se traslapan en un punto en el espacio, la intensidad de la onda combinada en ese punto puede ser mayor o menor que la intensidad de cualquiera de las dos ondas. Esta interferencia puede ser constructiva o destructiva (Resnick et al., 1999).

### *1.2.2 Enriquecimiento con CO<sub>2</sub>*

Las cianobacterias utilizan en su metabolismo el CO<sub>2</sub> o bicarbonato disuelto en el medio de cultivo. Aun cuando el medio de cultivo este bien mezclado, la simple difusión del CO<sub>2</sub> del aire en el agua no es suficiente para reemplazar el consumido por los microorganismos.

El cultivo de cianobacterias en fotobiorreactores es limitado generalmente por el CO<sub>2</sub> por lo que se debe suministrar al fotobiorreactor para asegurar el crecimiento, sin embargo generalmente se considera que las concentraciones mayores de 1% tienen un efecto adverso en el crecimiento. Los límites máximos y mínimos de CO<sub>2</sub> necesarios no están bien definidos pero en la práctica se usa comúnmente aireación con 5-15% de CO<sub>2</sub> o incluso CO<sub>2</sub> puro.

En fotobiorreactores cerrados se requiere el suministro continuo de CO<sub>2</sub>, sin embargo el CO<sub>2</sub> comercial suele ser muy caro, por lo que se necesita diseñar un sistema de aspersion y mezclado que permita que las burbujas de gas sean retenidas por suficiente tiempo para que el CO<sub>2</sub> pueda ser absorbido en el medio líquido.

En el diseño del fotobioreactor, uno de los objetivos principales es el desarrollo de métodos eficientes para la alimentación del CO<sub>2</sub>. El sistema mas comunmente utilizado es la alimentación directa del gas en columnas de burbujeo o reactores airlift (Cheng et al., 2006).

También se puede usar bicarbonato de sodio o sales similares como fuente alterna de CO<sub>2</sub>, sin embargo muchas veces el costo es mayor que el del CO<sub>2</sub> por unidad de carbono.

### *1.2.3 Remoción de Oxígeno*

El oxígeno es un producto de la fotosíntesis, sin embargo altas concentraciones de oxígeno disuelto generan inhibición del crecimiento, incluso a concentraciones altas de CO<sub>2</sub>. Muchas especies de cianobacterias no soportan

la exposición de 2-3 horas a niveles de oxígeno mayores a las de saturación del aire (7.5 mg/L a 30°C) .

La remoción de exceso de oxígeno es un problema de transferencia de masa parecido al de suministro de CO<sub>2</sub>, las principales formas de controlar este fenómeno son: disminuir la presión de oxígeno, mayor agitación y altas temperaturas. Una buena solución a este problema es aumentar la turbulencia del medio.

#### *1.2.4 Suministro de nutrientes*

Es muy importante controlar los niveles de nutrientes primarios ya que son un factor importante en el crecimiento de todo ser vivo. Los medios de cultivo utilizados están compuestos de CO<sub>2</sub>, agua y sales minerales.

Los macronutrientes que se consideran esenciales para el crecimiento incluyen carbono, nitrógeno, fósforo, hidrógeno, oxígeno, azufre, calcio, magnesio, sodio, potasio y cloro. Los micronutrientes necesarios en cantidades traza son: hierro, boro, manganeso, cobre, molibdeno, vanadio, cobalto, níquel, silicio y selenio. Algunos micronutrientes requieren de agentes quelantes para poder ser disueltos o minimizar su toxicidad.

#### *1.2.5 Mezclado*

El mezclado es un factor muy importante en el cultivo de cianobacterias, ya que las mantiene en suspensión (Sastre et al., 2007), mejora la eficiencia de la utilización de luz y la transferencia de gas y ayuda en la distribución eficiente de los nutrientes.

Se ha demostrado que el mezclado en cultivos con alta densidad celular puede incrementar el rendimiento de obtención de biomasa con respecto a la energía

lumínica en cultivos con intensidades de luz altas. Esto debido a que el mezclado se traduce en movimiento de las células a través del medio entre zonas de luz y oscuridad evitando la fotoinhibición. (Janssen et al., 1999, Brinley et al., 2011, Richmond et al., 2003, Meireles et al., 2008).

Cuando los requerimientos nutricionales están satisfechos y las otras condiciones ambientales no son limitantes, el mezclado se convierte en el requisito más importante para obtener buenos rendimientos (Suh and Lee, 2003).

#### *1.2.6. Control de temperatura*

El cambio de la temperatura de cultivo influye de manera importante en la productividad total ya que la fotosíntesis y la respiración son reacciones enzimáticas. El intervalo de temperatura óptimo para el crecimiento de cianobacterias es entre 25 y 35 °C (Howard et al., 1996).

En cultivos con altas intensidades de luz y grandes concentraciones de biomasa puede aumentar el hecho de que las cianobacterias conviertan grandes fracciones de luz en calor (Abeliovich and Azov, 1976)

La temperatura puede ser medida y controlada durante la operación del fotobiorreactor. Las algas cultivadas en reactores externos están expuestas a las variaciones de temperatura que se presentan a lo largo del día y durante las diferentes estaciones del año.

#### *1.2.7 Otros factores*

El pH en cultivos de algas autotróficas se incrementa continuamente debido al consumo de carbono en la fotosíntesis. El pH afecta la polaridad de los

compuestos del medio de cultivo así como la disponibilidad de nutrientes como CO<sub>2</sub>, hierro y ácidos orgánicos.

La presión junto con la temperatura y el pH influyen en la solubilidad de los gases lo cual afecta directamente a los rendimientos de crecimiento.

### **1.3 Tipos de fotobiorreactores**

Para que el cultivo de cianobacterias sea eficiente es necesario diseñar fotobiorreactores que transmitan la mayor cantidad posible de luz. Esto puede lograrse con dos estrategias: el uso de bajas densidades celulares y trayectorias de luz grandes o viceversa. En cualquier caso la luz entrante al cultivo es atenuada y una importante fracción del fotobiorreactor se torna lo suficientemente oscura para disminuir la actividad fotosintética (Brinley et al., 2011, Perner-Nochta and Posten, 2007, Pulz and Scheibenbogen, 1998)

Debido a lo anterior, el parámetro central para el diseño de fotobiorreactores es la penetración de la luz en el medio de cultivo, esto implica una relación alta entre la superficie y el volumen del reactor. La eficiencia de un fotobiorreactor es determinada en base a cuatro criterios: captación de luz, transporte de luz, distribución de luz y el uso de la luz (Zijffers et al., 2008a, Ogbonna et al., 1995, Benson et al., 2007)

Se han diseñado fotobiorreactores de diferentes formas que pueden agruparse en tres tipos básicos: tubulares, de superficie plana y tipo tanque agitado. Los tubulares y de superficie plana son las opciones más utilizadas considerando que utilizan luz solar. Este tipo de fotobiorreactores están basados en el principio de aumentar el volumen aireado.

#### *1.3.1 Fotobiorreactores tubulares*

Son los fotobiorreactores más fáciles de escalar incrementando la longitud, el número de tubos y uniendo múltiples unidades por medio de colectores (Borowitzka, 1997). Tienen mayor eficiencia de utilización de luz que los fotobiorreactores de placa plana por la gran superficie reactiva por unidad de espacio ocupado (Tredici and Zittelli, 1998). Dentro de los fotobiorreactores tubulares hay diferentes configuraciones:

#### *1.3.1.1 Tubulares verticales*

Los reactores airlift y las columnas de burbujeo son ejemplos de reactores tubulares verticales (Carvahlo et al., 2006). Generalmente están hechos de tubos de polietileno o de vidrio ya que la transparencia de estos materiales permite el paso de la luz y son de bajo costo. La aireación se realiza por la parte inferior del reactor lo que permite un buen mezclado, suficiente suministro de CO<sub>2</sub> y una buena remoción de O<sub>2</sub>.

#### *1.3.1.2 Tubulares Horizontales*

En este tipo de reactores la transferencia de gas se lleva a cabo en las conexiones de los tubos o en una unidad especial dedicada al intercambio de gas además de que el ángulo que forma con los rayos solares es adecuado para una buena captación. Estos sistemas pueden manejar volúmenes grandes ya que son menos susceptibles a la contaminación. Una desventaja de este tipo de reactores es la gran generación de calor.

#### *1.3.1.3 Tubulares Helicoidales*

El usado más frecuentemente se llama Biocoil, propuesto por Robinson (Robinson et al., 1988). Está compuesto de un set de tubos de polietileno enrollados en un armazón circular abierto, acoplado a una torre de intercambio de gas y a un intercambiador de calor. Una bomba centrífuga hace llegar el



medio de cultivo hasta la torre de intercambio de gas. También se han propuesto reactores helicoidales cónicos.

#### *Reactores con forma $\alpha$*

Esta hecho de tubos de PVC y usa bombas airlift para lograr una trayectoria ascendente/descendente con una gran inyección de CO<sub>2</sub> a lo largo de su trayectoria (Lee et al., 1995)

#### *1.3.2 Fotobioreactores de superficie plana*

Están diseñados para hacer un uso eficiente de la luz solar, sus paneles estar contruidos de tal manera que la relación de área volumen sea grande. Este tipo de fotobiorreactores pueden ser organizados de tal forma que estén orientados hacia el sol, lo cual permite mejor eficiencia en terminos de energia absorbida (Carvahlo et al., 2006, Sierra et al., 2008).

#### *1.3.3 Fotobioreactores tipo fermentador de tanque agitado*

Para poder utilizar este tipo de reactores en el crecimiento de cianobacterias debe adaptarse un sistema de iluminación interna que permita una distribución homogénea de luz. Pueden ser operados en cultivos por lote, continuos o semicontinuos. Pueden mantenerse cultivos axénicos por grandes periodos de tiempo debido a que los parámetros de producción pueden ser controlados completamente.

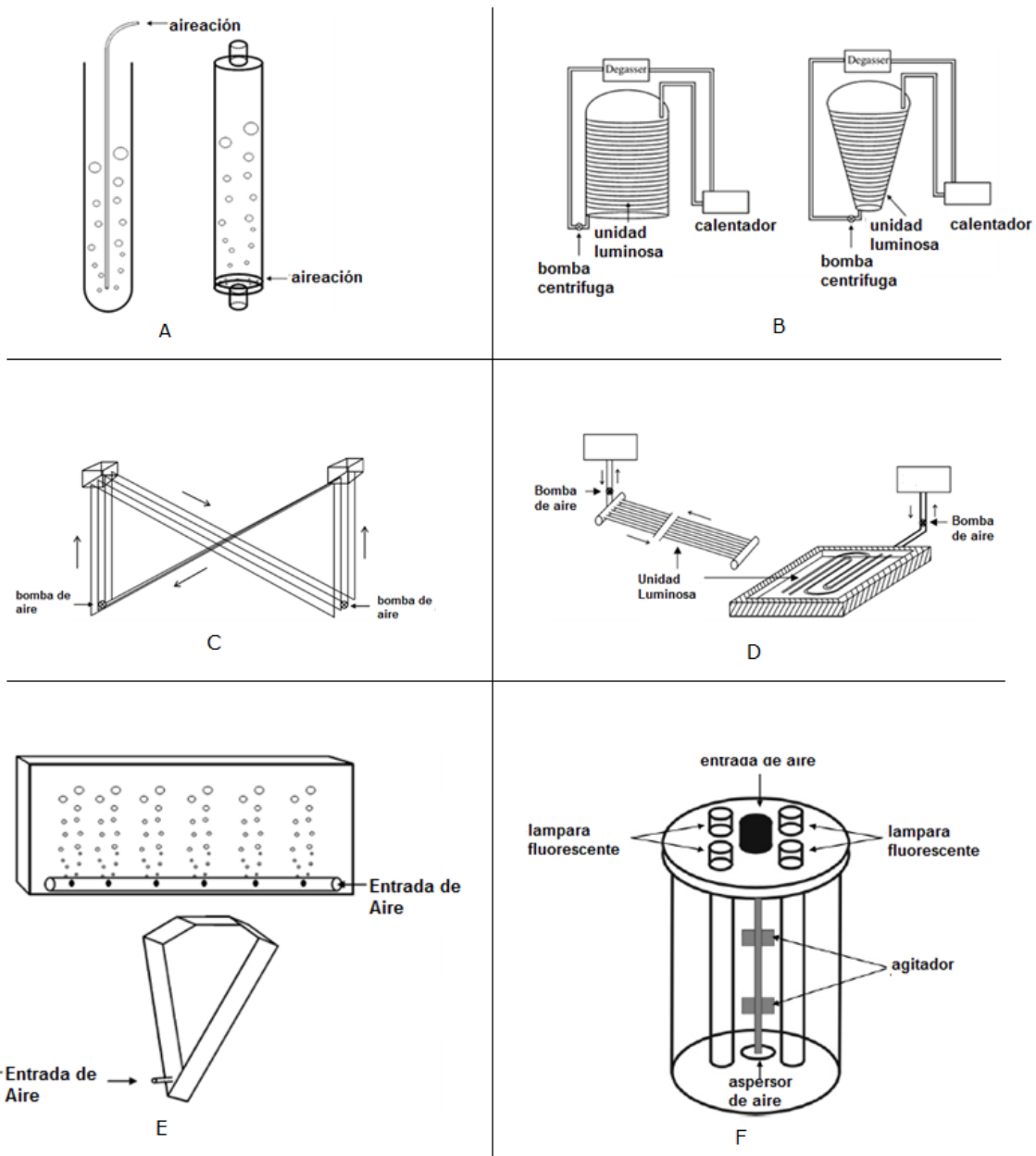


Figura 4. Representación esquemática de diferentes tipos de fotobiorreactores. A) Reactor airlift y columna de burbujeo, B) Reactores tubulares helicoidales, C) Reactores con forma  $\alpha$ , D) Reactores tubulares horizontales, E) Reactores de superficie plana, F) Reactor tipo fermentador de tanque agitado.

## **2. Justificación**

El crecimiento celular de microorganismos fotosintéticos es afectado fundamentalmente por el suministro de energía lumínica. Esta debe tener características apropiadas y específicas para el microorganismo cultivado. Aunque la energía irradiada cumpla con las características correctas, se tiene que poner especial atención en que la energía sea suministrada al fotobiorreactor de tal forma que sea aprovechada eficientemente. El conocimiento del influjo de los patrones de iluminación sobre el crecimiento celular de la cianobacteria es fundamental para el planteamiento de procesos eficientes.

## **3. Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de los patrones de iluminación en el crecimiento celular de cianobacterias en un fotobiorreactor en condiciones de cultivo controlados.

### **3.2 Objetivos particulares**

Especificar un fotobiorreactor prototipo con diferentes configuraciones de iluminación.

Comparar el efecto de diferentes configuraciones de iluminación en las constantes cinéticas, rendimientos y productividades del cultivo de cianobacterias en el fotobiorreactor prototipo.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Protocolo experimental

El desarrollo experimental contó con una primera parte en la que se realizó la construcción de los fotobiorreactores y los sistemas lumínicos utilizados, posteriormente, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en cada fotobiorreactor (FBR) (Figura 5).

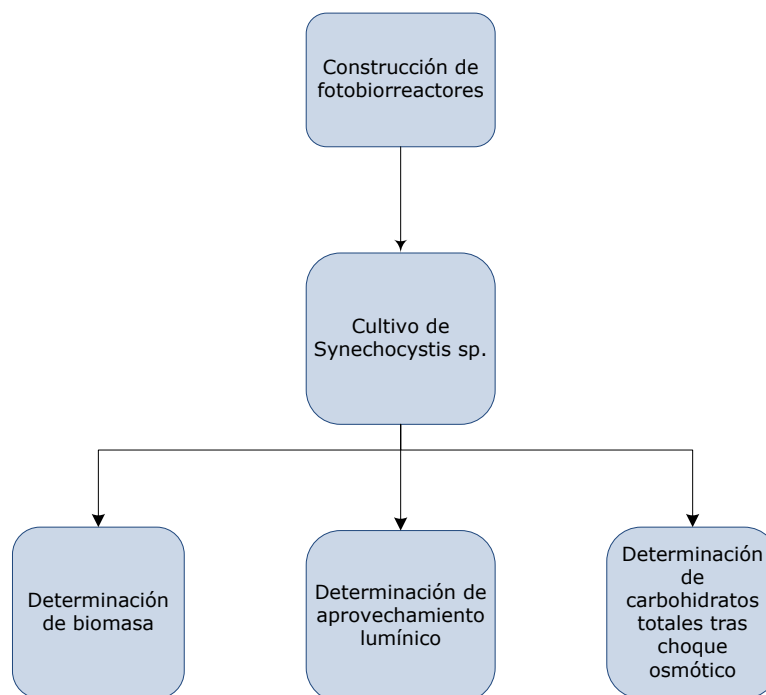


Figura 5. Representación esquemática del desarrollo experimental del trabajo de tesis.

### 4.2 Cepas y medios de cultivo

Para las cinéticas de crecimiento se utilizó una cepa de *Synechocystis sp.* propagada y mantenida en medio BG-11 con la siguiente composición ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  (1.50),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0.040),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.075),  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.036),  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.006), Citrato férrico amónico (0.006), EDTA (0.001),

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.020),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2.860),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.810),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.222),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.390),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.079),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.0494)

### 4.3 Descripción de los fotobiorreactores

Los fotobiorreactores utilizados fueron diseñados en forma de columnas de burbujeo y cada uno consta de dos tubos concéntricos de acrílico cristal de 3 mm de espesor. El radio del tubo externo es de 10.16 cm mientras que el del tubo interno es de 3.81 cm, ambos con una altura de 30 cm dando como resultado un volumen total de 8.3606 L (Figura 6).

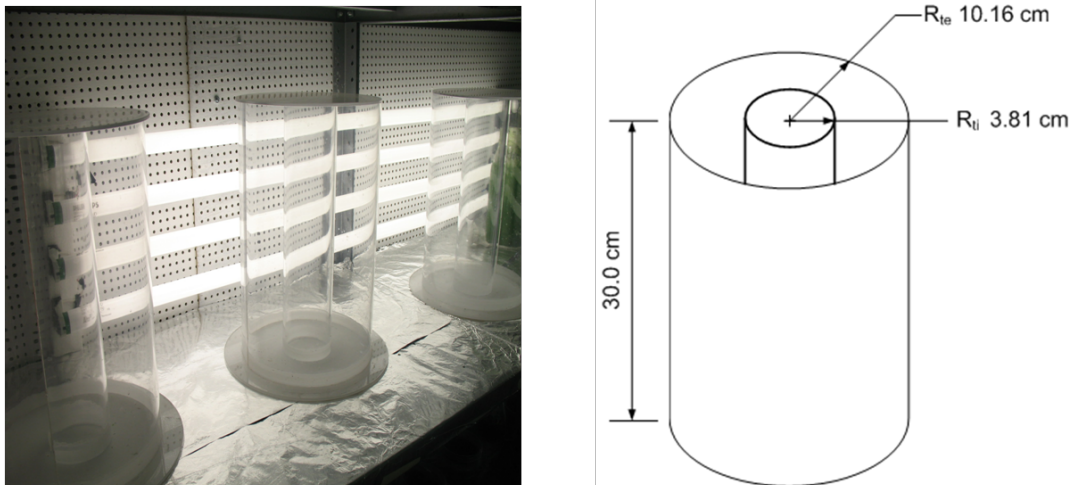


Figura 6. Fotografía y diagrama de los fotobiorreactores diseñados.

El sistema de dispersión de aire consta de anillos de 10 cm de diámetro contruidos de acero inoxidable. Los anillos cuentan con barrenos de 0.16 cm cada 2 cm sobre la cara superior. Estos anillos están localizados entre los tubos concéntricos (Figura 7).

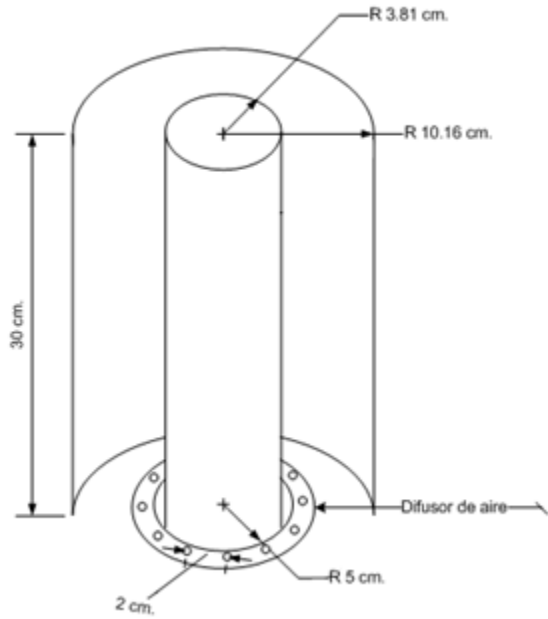


Figura 7. Difusor de aire y su posición dentro del fotobiorreactor.

Para el suministro de energía lumínica se utilizaron tres sistemas. El sistema número uno (**FBR 1**) constó de una lámpara fluorescente de 32 watts (Philips F32T8) posicionada de tal forma que solo irradiaba sobre el fotobiorreactor desde un solo punto (Figura 8).

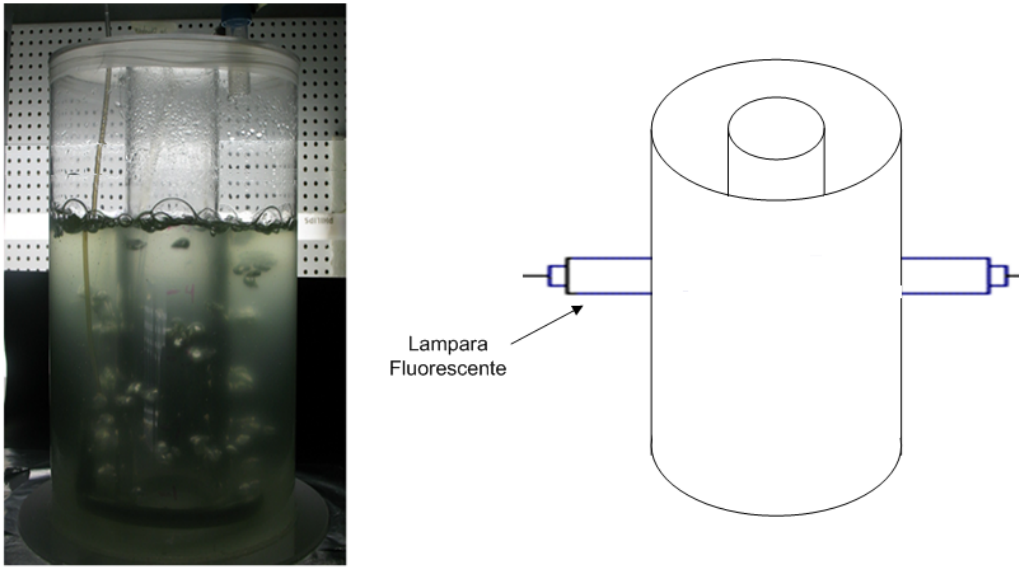


Figura 8. Fotobiorreactor con sistema lumínico de lámpara fluorescente (FBR1).

El sistema número dos (**FBR 2**) constó de una tira comercial flexible de 50 LEDs de 12 V (Mingxue ML-B1213W60-TOP2) colocada en forma de espiral rodeando la parte exterior de tubo externo del fotobiorreactor (Figura 9).



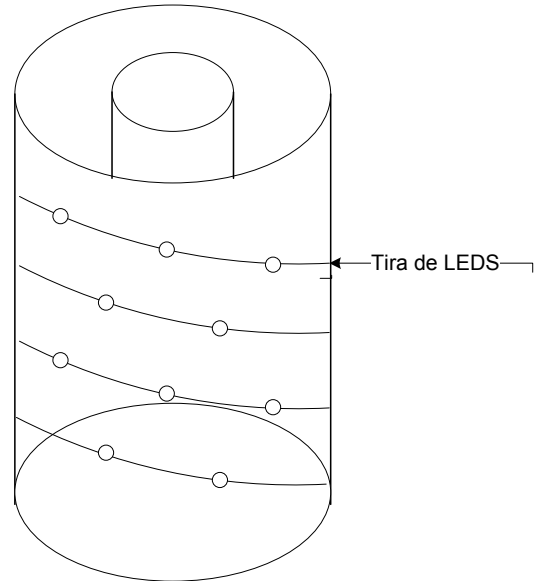


Figura 9. Fotobiorreactor con sistema lumínico de LEDS externo (FBR 2).

El sistema número tres (**FBR 3**) constó de una tira comercial flexible de 50 LEDS de 12 V (Mingxue ML-B1213W60-TOP2) colocada en forma de espiral en la parte interior de tubo interno del fotobiorreactor (Figura 10).

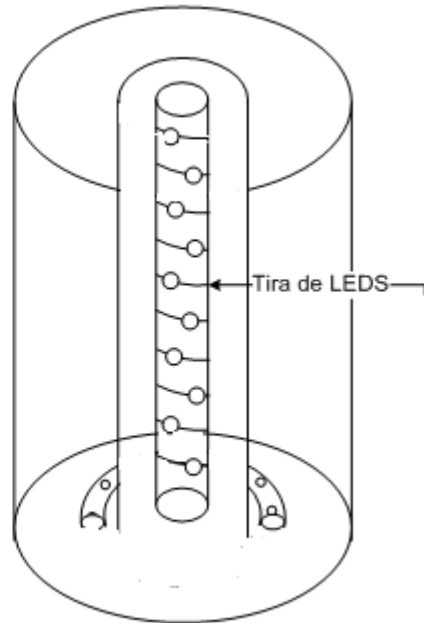
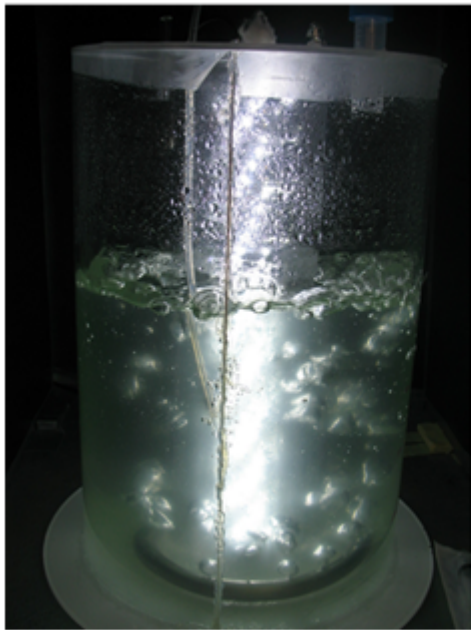


Figura 10. Fotobiorreactor con sistema lumínico de LEDS interno (FBR 3).

#### **4.4 Evaluación del desempeño hidrodinámico de los fotobiorreactores**

Se determinó el tiempo de mezclado de los fotobiorreactores con agua destilada como líquido de prueba. Se utilizó la técnica de adición de pulsos de HCL 6 N ajustando primero el pH a 9.5 con NaOH 6 (Nielsen and Villadsen, 1994). Las velocidades de aireación evaluadas fueron: 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 L  $\text{min}^{-1}$ . El pH se midió cada 0.16 s con un medidor de pH (DEIC, México) conectado a una computadora. El flujo de aire se midió con un rotámetro (Cole Palmer, USA). Los datos experimentales obtenidos fueron ajustados con el modelo logístico para obtener la distribución de tiempo de residencia F, posteriormente se obtuvo la distribución de tiempo de residencia E y el tiempo medio de residencia (Levenspiel, 1987).

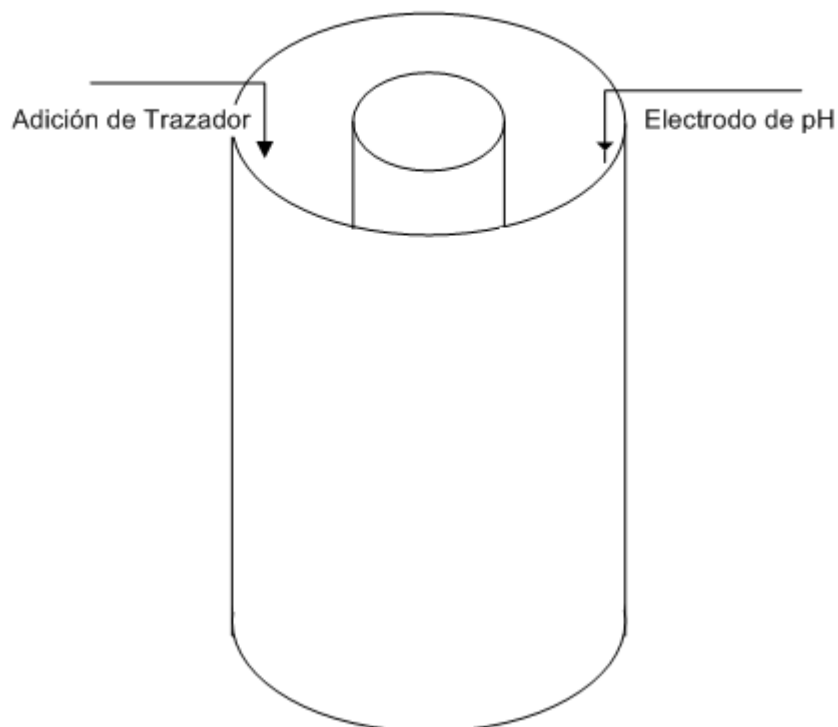


Figura 11 Representación esquemática de la posición del electrodo de pH y la adición de HCl utilizados en la técnica de adición de pulsos de HCl propuesta por Nielsen y Villadsen (1994)

#### **4.5 Condiciones de operación para el cultivo celular de *Synechocystis sp.***

Los cultivos celulares se llevaron a cabo en tres fotobiorreactores con sistemas lumínicos diferentes con medio BG-11 descrito en el apartado 5.1. Cada fotobiorreactor fue inoculado con una concentración de  $100 \text{ cel mL}^{-1}$ . El volumen de operación fue de 5 L y la aireación de  $10 \text{ L min}^{-1}$ . La temperatura fue controlada con sistemas de aire acondicionado a  $21^\circ \text{ C}$  y el fotoperiodo utilizado fue de 12 horas luz por 12 horas de oscuridad. La toma de muestra se realizó una vez por día. Los fotobiorreactores fueron alimentados con medio fresco para mantener el volumen de operación en 5 L.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento con la variación de la concentración celular durante la fase de crecimiento exponencial y el tiempo de duplicación con las ecuaciones uno y dos respectivamente (Imamoglu et al., 2007):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{dt} \quad \text{Ec (1)}$$

donde:

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento (días<sup>-1</sup>).

$X_1, X_2$  = Concentración celular al principio y al final de la fase de crecimiento exponencial respectivamente (células L<sup>-1</sup>).

$dt$  = Duración de la fase de crecimiento exponencial (días).

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ec (2)}$$

Donde:

$Td$  = Tiempo de duplicación (días)

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento (días<sup>-1</sup>).

## 4.6 Técnicas analíticas

### 4.6.1 Determinación de biomasa

La biomasa se determinó por cuenta directa en cámara de Neubauer (Imamoglu et al., 2007) Con una cámara fotográfica se tomaron 4 imágenes por muestra de células que se analizaron con la aplicación cell counter del software Image J (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) dando como resultado el número de células por litro. Posteriormente las gráficas de acumulación de biomasa resultantes se ajustaron con el modelo logístico (Ec 6) y se determinó si existe diferencia significativa por medio de un análisis estadístico.

### 4.6.2 Determinación del área iluminada del fotobiorreactor

Se considera como área iluminada del fotobiorreactor a la superficie con la que entran en contacto los fotones irradiados antes de entrar al medio de cultivo, la cual dependerá de la posición de la fuente lumínica.

En el FBR 1, la fuente lumínica irradiaba al fotobiorreactor desde un solo punto, mientras que en el FBR 2, el sistema lumínico se encontraba distribuido en forma de espiral alrededor del tubo exterior. Y en el caso del FBR 3 el sistema lumínico se encuentra en el centro del fotobiorreactor.

Tomando en cuenta la posición de las fuentes lumínicas (Figura 12) se obtuvo el área iluminada de cada fotobiorreactor con las siguientes ecuaciones:

Área Iluminada de FBR 1 y FBR 2

$$A_{\text{FBR 1}} = \pi * r_e * h \quad \text{Ec (3)}$$

Área Iluminada de FBR 3.

$$A_{\text{FBR 3}} = \pi * r_i * h \quad \text{Ec (4)}$$

donde

h= altura del fotobiorreactor (m)

$r_e$ = radio del tubo externo (m).

$r_i$ = radio del tubo interno (m).

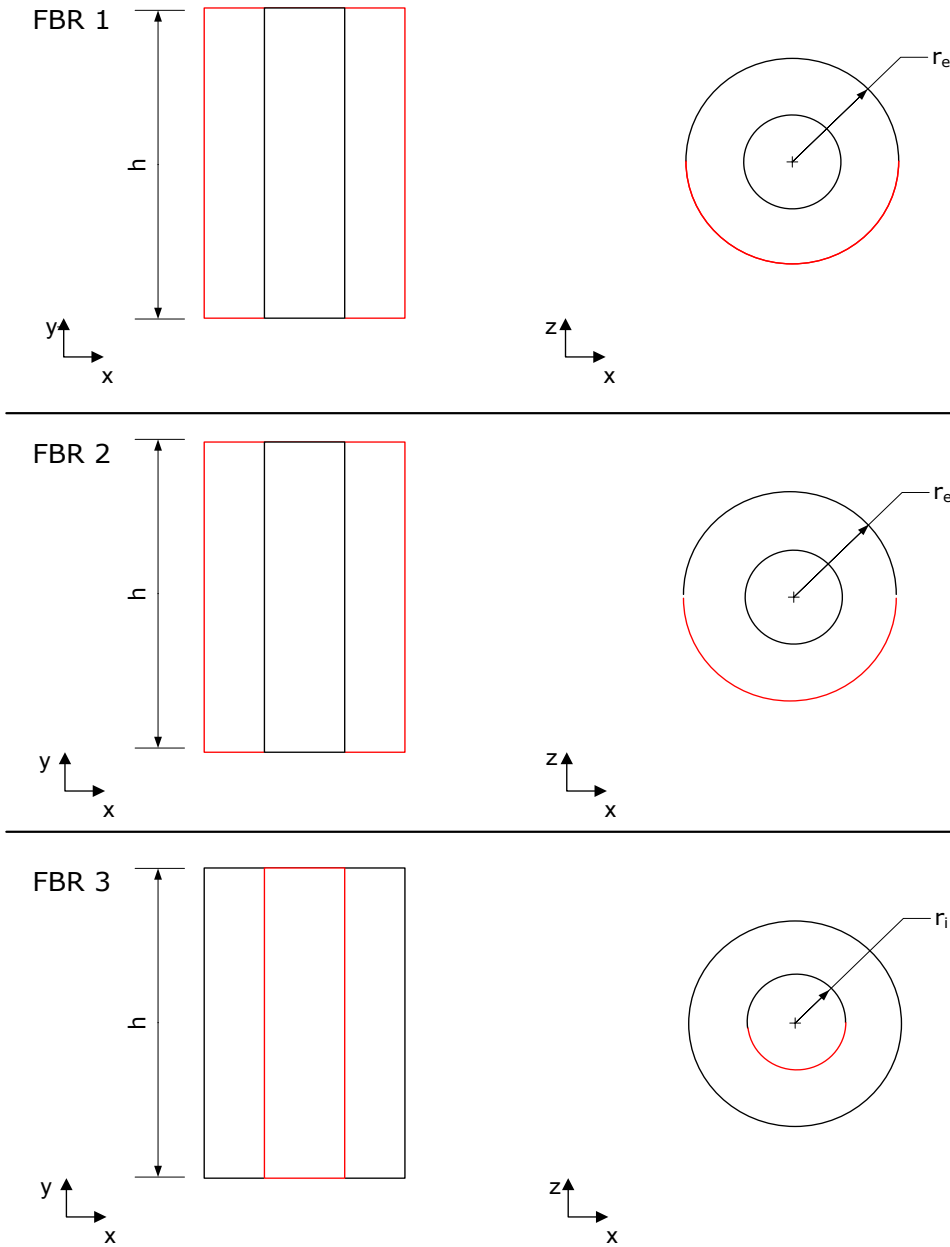


Figura 12. Dimensiones que se utilizaron para el cálculo del área iluminada de cada fotobiorreactor.

#### 4.6.3 Determinación de densidad celular crítica (CCD)

La densidad celular crítica (CCD) se define como la concentración celular en la que la suma del área de proyección de todas las células en el cultivo es igual al superficie iluminada en el fotobiorreactor y se calculó con la ecuacion 5 (Park and Lee, 2001):

$$CCD = \frac{A_i}{\frac{\pi \cdot D_c^2}{4} \cdot V} \quad \text{Ec (5)}$$

donde:

$A_i$  = Área iluminada del fotobiorreactor ( $m^2$ ).

$D_c$  = Diámetro de la célula (m) (Shastri and Morgan, 2005).

$V$  = Volumen de cultivo (L).

#### 4.6.4 Determinación de aprovechamiento lumínico

Se entiende por aprovechamiento lumínico al resultado de la resta de los fotones totales irradiados al reactor y los fotones que logran atravesar el medio y salen hacia el ambiente. Para los reactores FBR1 y FBR 3 el sensor lumínico se sitúa en la parte exterior del fotobiorreactor. Para el caso del FBR 2 el sensor es puesto dentro del tubo interior del fotobiorreactor. En ambos casos se toman lecturas una vez al día a tres alturas diferentes.

#### 4.6.5 Determinación de carbohidratos totales

Se realizó la determinación de carbohidratos totales producidos después de someter al cultivo a un choque salino con una concentración de NaCl de 0.49 M (Reed et al., 1986). Se tomaron muestras cada doce horas por 72 horas. Para la extracción de carbohidratos, las muestras fueron liofilizadas (Kim et al., 2009) y posteriormente resuspendidas con una solución de etanol al 70%. Las muestras se llevaron a sequedad en un estufa a 60 °C y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada. Se realizó la técnica para carbohidratos totales de Fenol-Ácido sulfúrico propuesta por Dubois, et al. (1956) utilizando glucosa como estándar para la curva tipo (Nicolaus et al., 1999).

## 4.7 Análisis estadístico

Las curvas de crecimiento fueron ajustadas con el modelo logístico de crecimiento de forma (Ulloa and Rodríguez, 2010, Kim, 2009):

Ecuación 1. Modelo Logístico.

$$P(t) = \frac{k \cdot P_0 \cdot e^{rt}}{k \cdot P_0 \cdot (e^{rt} - 1)} \quad \text{Ec (6)}$$

donde:

$P(t)$ = Representa a la población existente en el tiempo  $t$  determinado

$k$ = Capacidad de carga del ambiente es decir indica la línea o nivel de saturación del sistema.

$P_0$ =Población inicial que presenta el sistema.

$r$ = Tasa instantánea de crecimiento exponencial.

Los datos ajustados fueron comparadas entre sí con un análisis ANOVA de una vía con el software estadístico Minitab.



## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Evaluación del desempeño hidrodinámico de los fotobiorreactores

Se realizaron pruebas para evaluar el comportamiento hidrodinámico de los fotobiorreactores con la técnica propuesta por (Nielsen and Villadsen, 1994). Se obtuvieron resultados por duplicado con diferentes velocidades de aireación. En la Figura 13 se muestran los valores promedio normalizados para distintas velocidades de aireación en el fotobiorreactor.

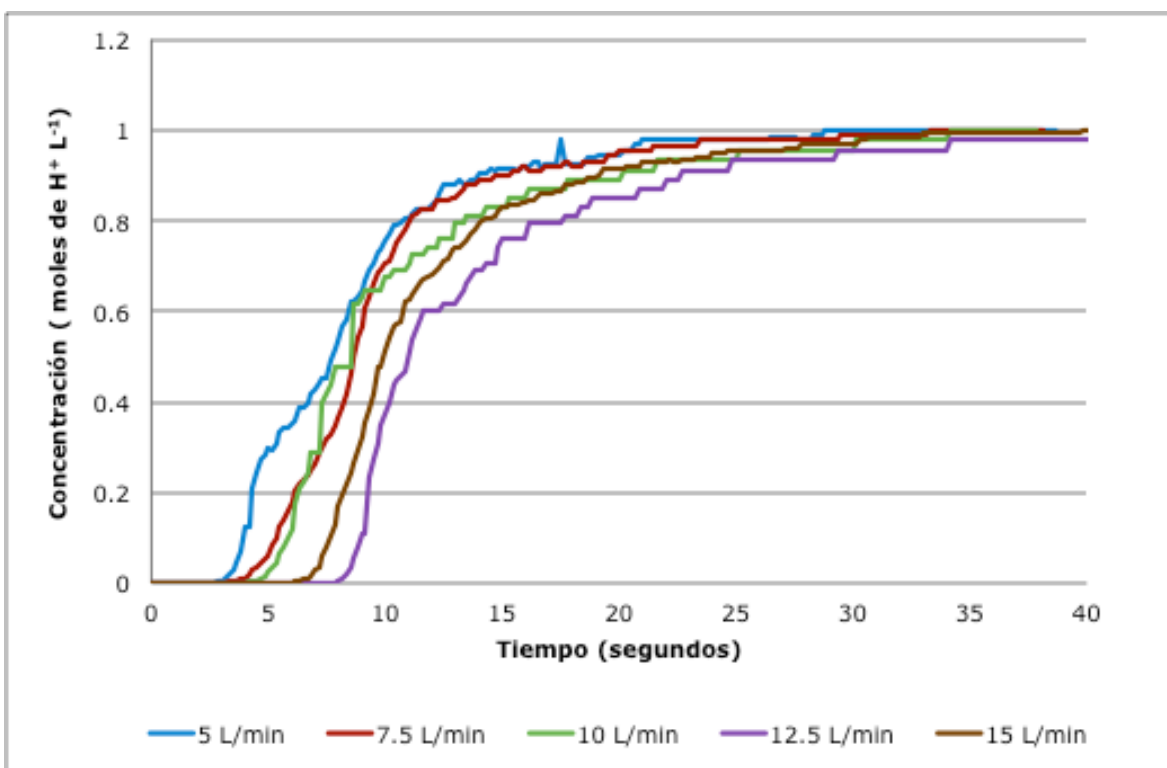


Figura 13. Concentración de moles H<sup>+</sup> con respecto al tiempo con diferentes velocidades de aireación.

En los gráficos resultantes se observan ciertas variaciones que pueden deberse a la interacción de burbujas de aire con el sensor de pH generando fluctuaciones en las mediciones. Es por esto que se realizó el ajuste de cada curva al modelo logístico para el posterior manejo de los datos. Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación logística con el criterio de

estimación paramétrica por mínimos cuadrados, usando el método de Newton para la localización del mínimo, con la función *Solver* de Excel.

Conforme aumenta la velocidad de aireación las curvas resultantes se tornan más rígidas por lo que el error entre la curva ajustada y la curva experimental aumenta (Figura 26, ver anexo), aun así el modelo logístico sí representa el comportamiento experimental ya que la función *solver* reduce al mínimo el error entre la curva experimental y la logística. Al aumentar la velocidad de aireación en el fotobiorreactor se produce el fenómeno de coalescencia con lo cual las burbujas producidas son más grandes e impactan al sensor de pH generando errores en las lecturas experimentales.

Las curvas obtenidas del modelo logístico tienen la forma de la distribución experimental de tiempo de residencia  $F$  (Figura 27, ver anexo) descrita por (Levenspiel, 1987). Utilizando esta curva se obtuvo la curva de distribución de tiempo de residencia  $E$  (Figura 14) y los tiempos de residencia media (Figura 15). Con estos resultados es posible evaluar el comportamiento hidrodinámico del fotobiorreactor.

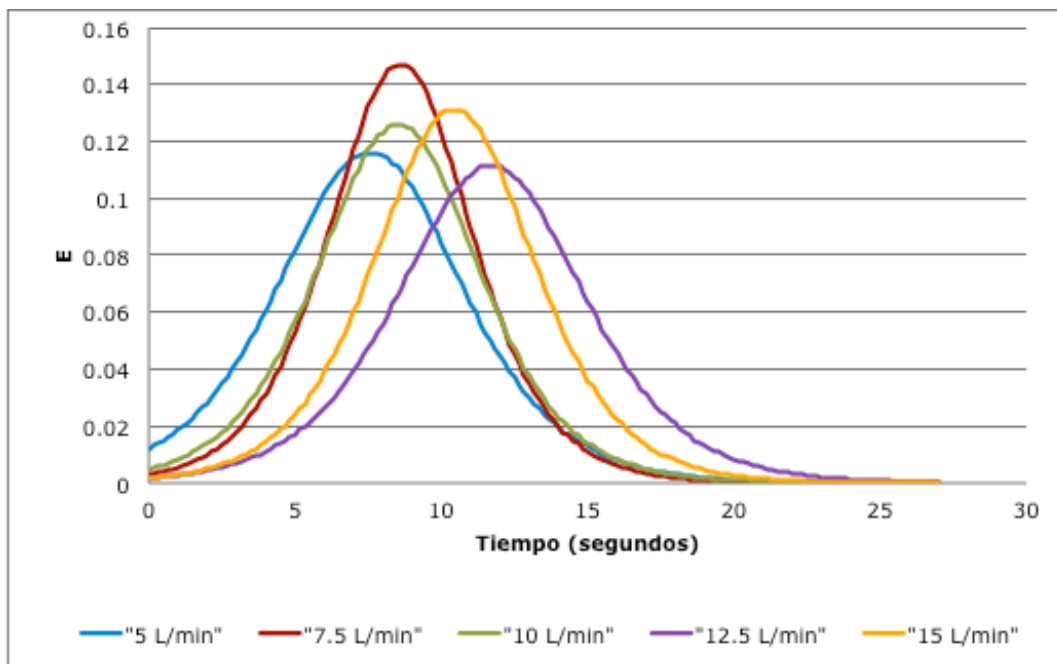


Figura 14. Curva de distribución de tiempos de residencia  $E$  del fotobiorreactor con diferentes velocidades de aireación.

En las distribuciones de tiempo de residencia  $E$  se observa que la diferencia entre los puntos donde la pendiente es cero de las curvas a las velocidades de 7.5 y 10 L min<sup>-1</sup> es muy pequeña (11.602 y 11.524 s), este punto corresponde al tiempo medio de residencia además se nota un valor de varianza menor que en las demás curvas.

Al graficar los tiempos medios de residencia obtenidos a diferentes velocidades de aireación se observa que se presentan dos regímenes. Uno que comprende las velocidades de 12.5 y 15 L min<sup>-1</sup> en donde el tiempo de residencia disminuye en la velocidad de aireación más grande. Este comportamiento concuerda con lo estipulado por la Ley de Stokes donde la velocidad de una esfera atravesando un fluido es directamente proporcional a su radio. Conforme aumenta la velocidad de aireación se produce el fenómeno de coalescencia de una forma más notable, es decir, el radio y la velocidad de las burbujas aumenta, propiciando que el tiempo medio de residencia disminuya.

El otro régimen observado comprende las velocidades evaluadas de 5 a 12.5 L min<sup>-1</sup> en donde conforme aumenta la velocidad de aireación aumenta también el tiempo de residencia medio. Este comportamiento es debido a que a esas velocidades de aireación no hay coalescencia y el tamaño de las burbujas dentro del reactor depende básicamente del diámetro de los orificios y el flujo discontinuo del dispersor.

Con los resultados obtenidos de las distribuciones, se observa que la diferencia entre usar la velocidad de 7.5 y 10 L min<sup>-1</sup> no es muy grande con respecto al mezclado del reactor, aun así, utilizar la velocidad mayor permite mantener en suspensión a las células en cultivos con gran densidad.

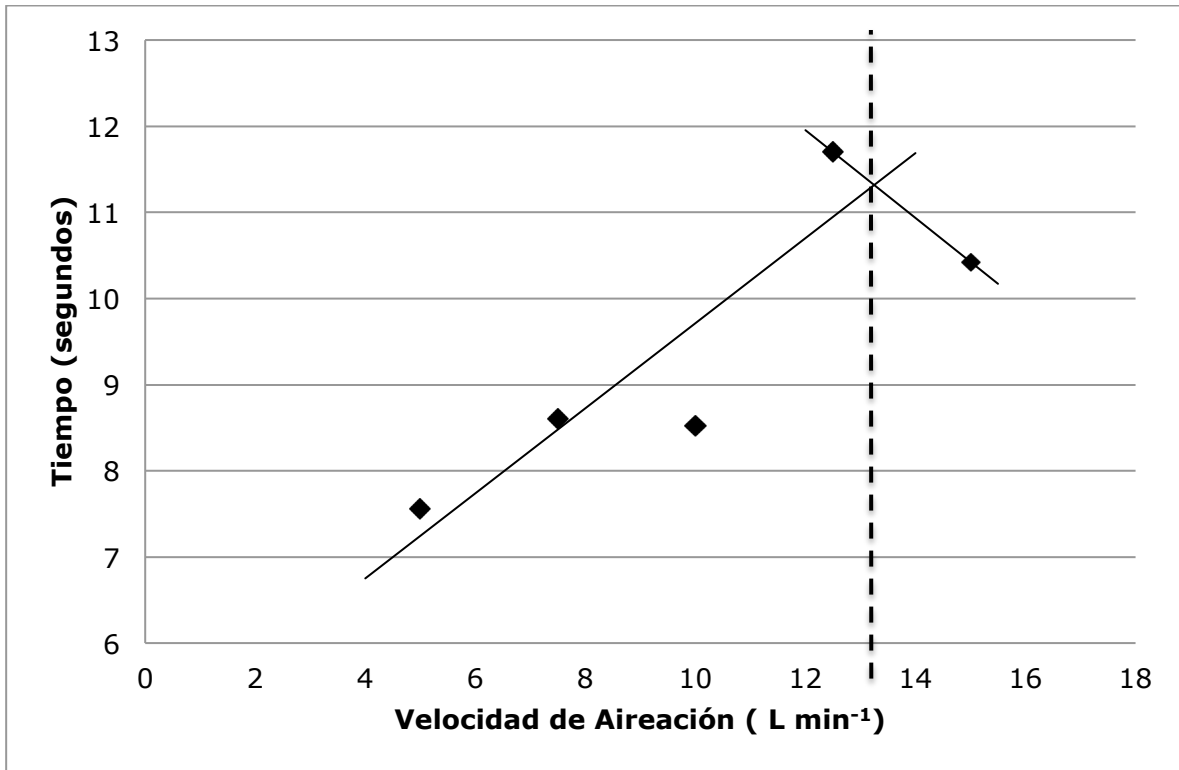


Figura 15. Tiempo de Residencia medio en función de la velocidad de aireación.

## 5.2 Cultivo celular de *Synechocystis sp.*

Para evaluar el efecto de las diferentes condiciones de iluminación sobre el crecimiento de *Synechocystis sp* se determinó la biomasa como se describe en la sección 4.5.1. En la Figura 16 se presenta una serie de fotografías correspondientes a cada fotobiorreactor en tres tiempos diferentes.

El seguimiento de la biomasa con la cámara de Neubauer permitió tener una idea de la diferencia de crecimiento celular en cada uno de los reactores. En la figura se aprecia como los tres reactores comienzan con número parecido de células, al día catorce la biomasa presente en el FBR 2 era tal que las muestras obtenidas fueron diluidas (1:2) para disminuir el error del conteo celular. En los reactores uno y tres se aprecia un crecimiento similar.

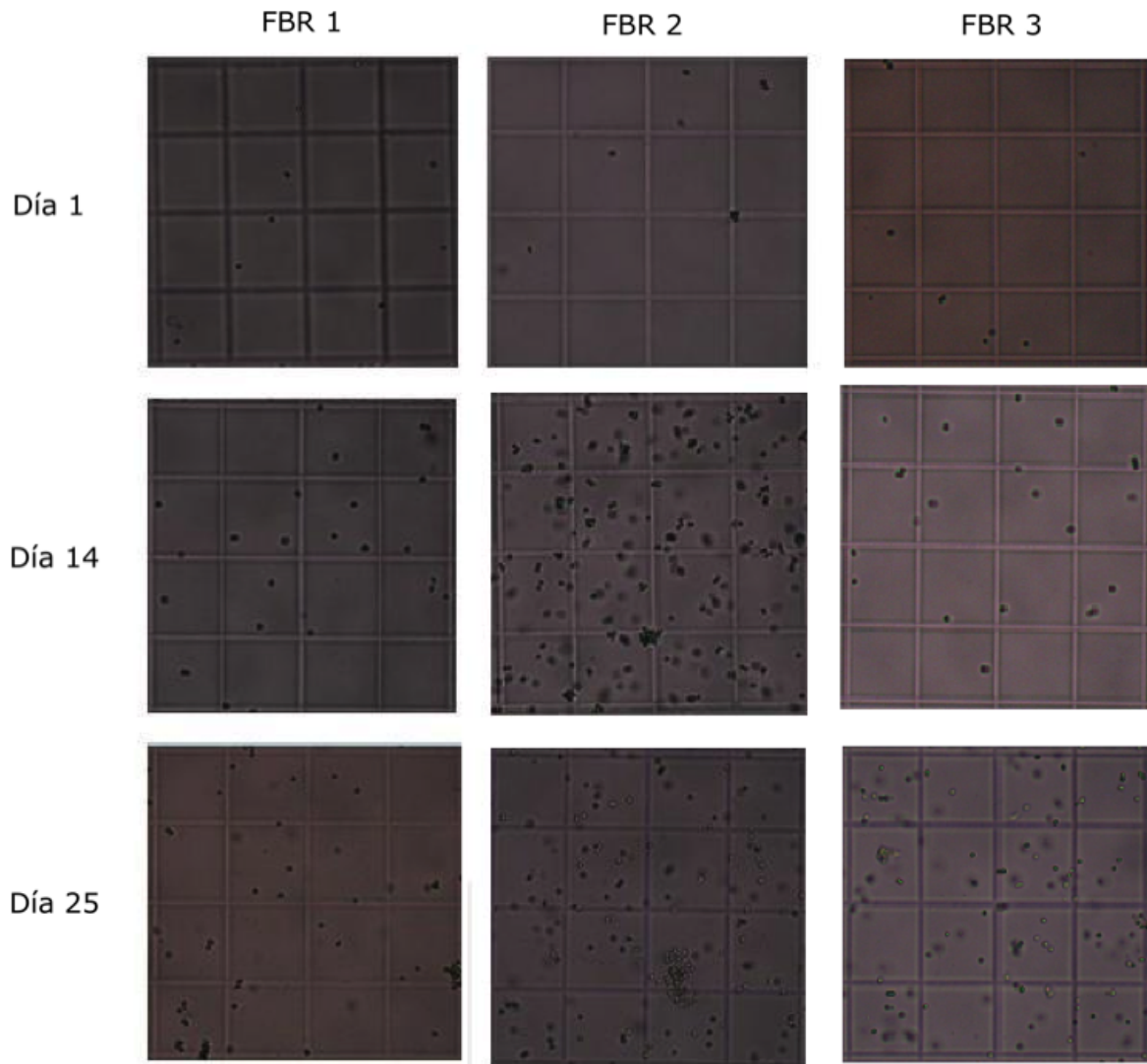


Figura 16. Ejemplos de imágenes tomadas a la cámara de Neubauer para conteo celular. Imágenes de células tomadas en tres tiempos diferentes de la cinética de crecimiento de *Synechocystis sp* en los días 1, 14 y 25. La muestra de células utilizada para la imagen del FBR2 día 25 fue previamente diluida 1:2.

A la par del análisis de imágenes se construyeron curvas de crecimiento con respecto al tiempo. Posteriormente fueron ajustadas con el modelo logístico (Figura 17) para fines de comparación.

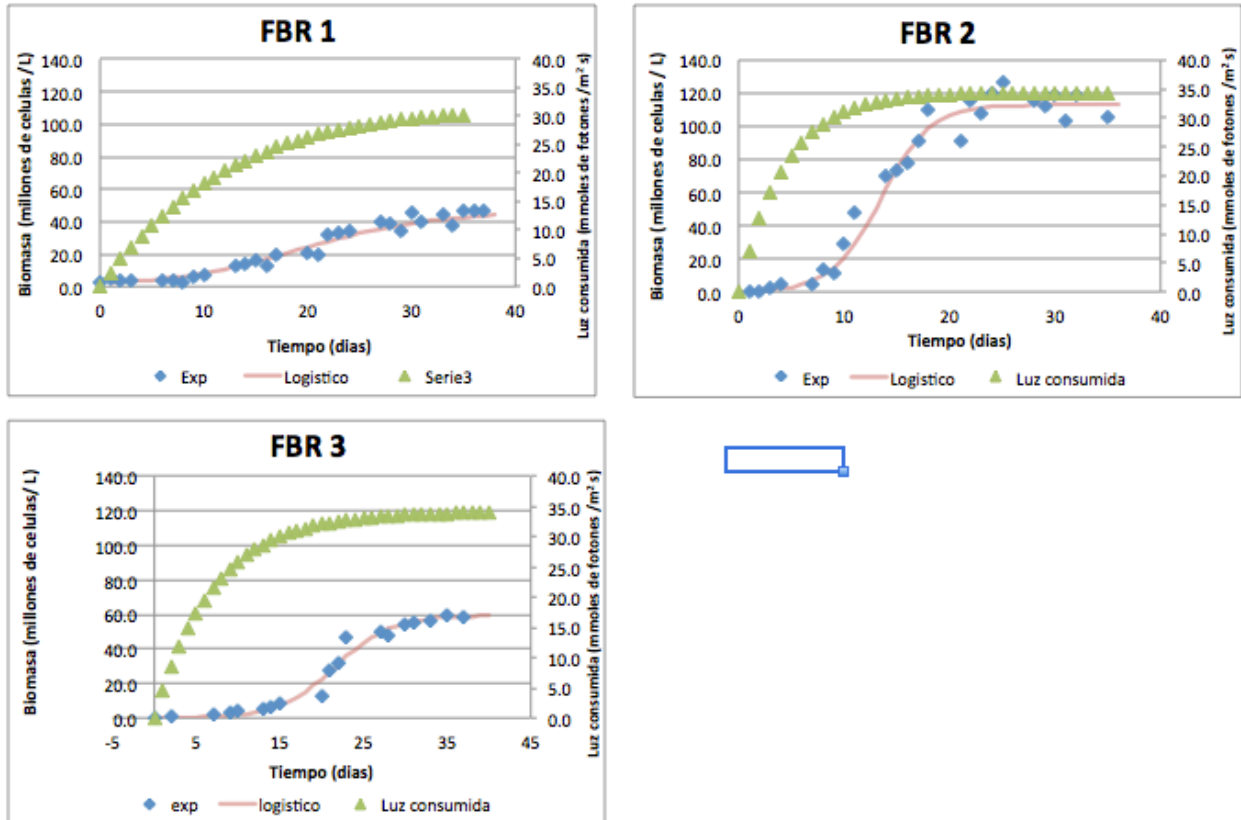


Figura 17. Cinéticas de crecimiento ajustadas al modelo logístico y luz consumida en función del tiempo.

En la Figura 18 se aprecia que la acumulación de biomasa en el reactor con sistema lumínico de LEDS externo (FBR 2) es mayor que en los otros dos fotobiorreactores. El crecimiento de las cianobacterias se ve influido de mayor manera por la fuente de carbono, los nutrientes y la energía lumínica suministrada. En esta serie de experimentos la única diferencia entre los fotobiorreactores fue la forma en que se irradió la energía lumínica, así que que las diferencias en el crecimiento celular pueden ser atribuidas a este cambio.

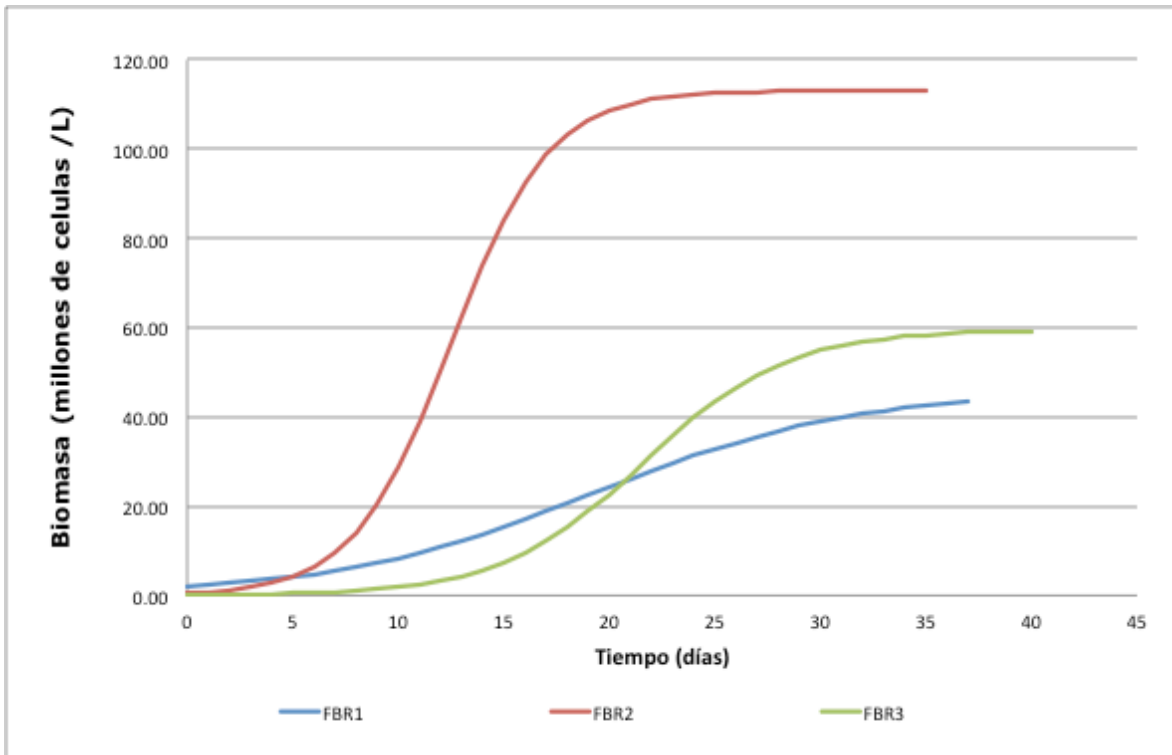


Figura 18. Curvas de crecimiento ajustadas al modelo logístico.

Al tener diferentes formas de irradiación de luz a los fotobiorreactores y con base en los resultados experimentales se infiere que el aprovechamiento lumínico por parte de la biomasa y disponibilidad de fotones es diferente en los tres casos.

Debido a que los sistemas lumínicos están dispuestos alrededor del fotobiorreactor de forma diferente, la trayectoria de los fotones dentro del fotobiorreactor será diferente también. De acuerdo al punto de incidencia de energía lumínica, los fotones pueden tener trayectorias mayores o menores dentro del fotobiorreactor según sea el caso (Figura 19).

En la Figura 19 se aprecia la diferencia entre las posibles trayectorias de los fotones en los diferentes fotobiorreactores. En el reactor iluminado con la lámpara fluorescente (FBR 1) el área iluminada es de  $0.0957 \text{ m}^2$  correspondiente a la parte del tubo externo que está expuesta a la lámpara emisora. Al entrar al medio, hay muchas trayectorias que los fotones pueden

seguir. La trayectoria más larga es recorrer el diámetro total del tubo exterior y la trayectoria más corta la recorren aquellos fotones que solo pasan por las orillas del tubo externo.

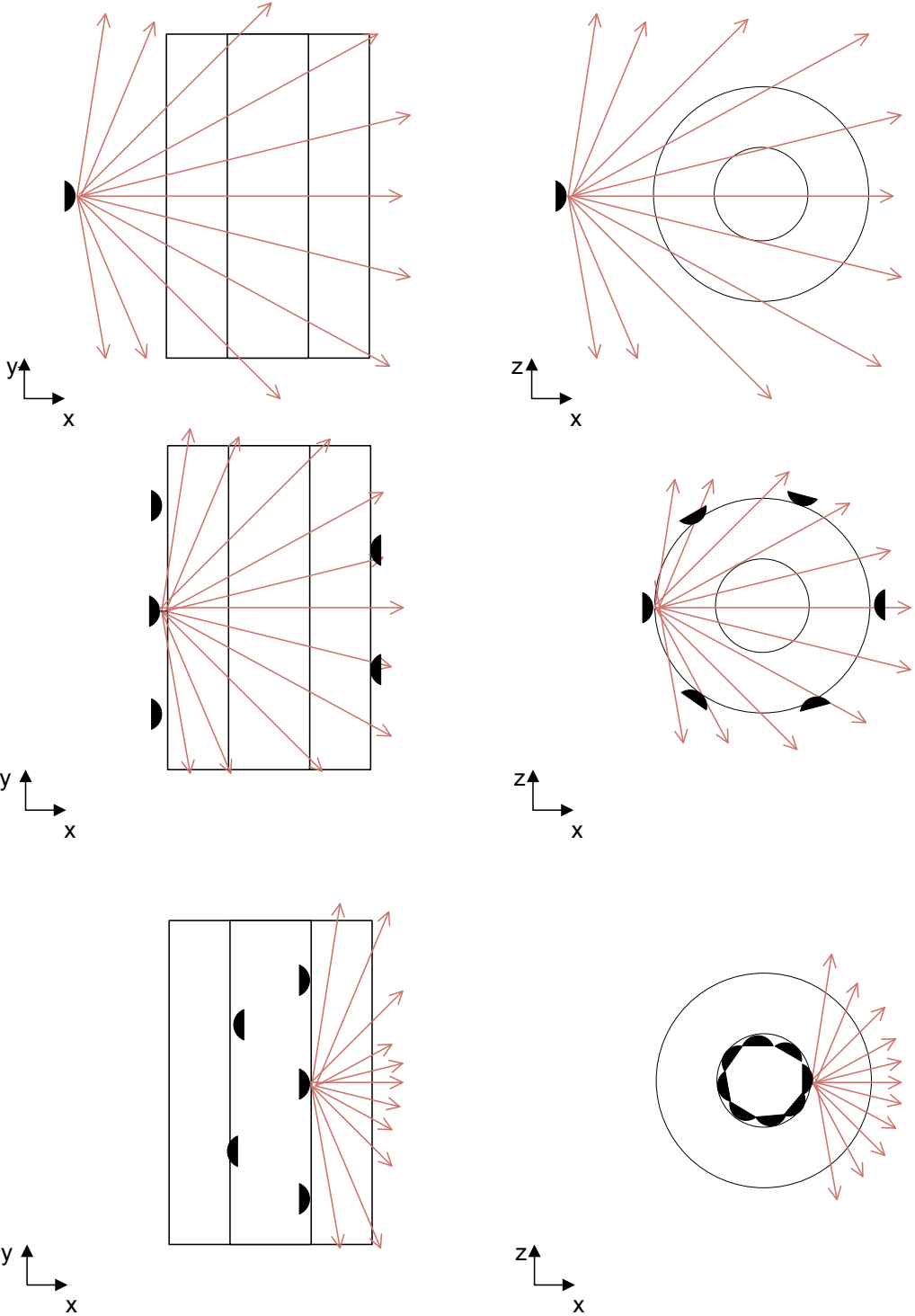


Figura 19. Diagrama de las posibles trayectorias de los fotones dentro del fotobiorreactor emitidos desde un solo punto.



En el reactor iluminado con el sistema de LEDS externos (FBR 2) el área iluminada total es de  $0.1915 \text{ m}^2$  que corresponde al área total del tubo externo. En este caso, las trayectorias más largas de los fotones son iguales que en el caso anterior, pero la cantidad de fotones que siguen esta trayectoria es mayor debido a que los emisores de luz están dispuestos exactamente junto a la pared del reactor, lo cual disminuye la cantidad de fotones que no entran en contacto con el reactor.

Para el caso del reactor iluminado con el sistema de LEDS interno (FBR 3), el área irradiada total es de  $0.07162 \text{ m}^2$  que corresponde al área total de la cara interior del tubo interno y la máxima trayectoria que pueden tener los fotones en el medio es igual a la distancia que hay entre los tubos concéntricos. Debido a la diferencia entre los sistemas lumínicos, en los análisis que toman en cuenta el área de iluminación se toma en cuenta solo la mitad del fotobiorreactor para que el análisis sea representativo para los tres fotobiorreactores. De esta forma el área iluminada considerada del FBR 1 corresponde a la mitad del fotobiorreactor más cercana a la fuente lumínica. Para el caso de FBR 2 y FBR 3, el área iluminada considerada corresponde a la mitad del área del tubo externo e interno respectivamente.

Entre mayor sea la trayectoria posible de los fotones dentro del medio es mayor la posibilidad de que sean absorbidos por las células, esto repercutirá en la biomasa total a pesar de que no todos los fotones absorbidos son utilizados en la fotosíntesis. Al relacionar las trayectorias anteriores con la producción de biomasa se observa que las trayectorias que podrían considerarse las más grandes corresponden al fotobiorreactor que alcanzó también la mayor cantidad de biomasa (FBR 2). Aunque hay diferencia en las trayectorias de los fotones en los fotobiorreactores restantes, no hay diferencia significativa en la cantidad de biomasa obtenida, fenómeno que puede ser explicado por la cantidad de fotones emitidos en el sistema del FBR 1 que no entran en contacto con el sistema.

Otro punto para tomar en cuenta es la interferencia que presentan los fotones traslapados entre sí (Resnick et al., 1999). Dado que los emisores de luz del sistema lumínico del FBR 3 están en mayor cercanía uno del otro es posible que presenten mayor interferencia destructiva disminuyendo así la cantidad de fotones disponibles dentro del medio de cultivo. Lo mismo aplica para el sistema lumínico del FBR 1 debido a sus características de emisión de fotones.

Un dato teórico que permite la comparación entre la relación de la iluminación y la biomasa es el cálculo de la densidad celular crítica (DCC) (Cuadro 1). Se observa que la DCC del reactor FBR 1 y FBR 2 son iguales. Es el reactor FBR 3 el que muestra una densidad celular menor, esto es algo que se esperaba dado que el área iluminada también es la menor. Los valores de DCC dan una aproximación de la concentración celular en la cual, la suma de las áreas de proyección de todas las células se iguala al área de iluminación del fotobiorreactor. La importancia de este valor radica en que provee la concentración celular en la cual habría un ensombrecimiento total en el fotobiorreactor.

Cuadro 1 Efecto del sistema lumínico del biorreactor en la cinética de crecimiento de *Synechocystis* sp.

Reactor	Inóculo (millones cel L <sup>-1</sup> )	Final de Crec. Exp. (días)	Conc. Max en t (millones cel L <sup>-1</sup> )	$\mu$ (días <sup>-1</sup> ) (fase exponencial)	Td (días) (fase exponencial)	DCC (mil millones cel L <sup>-1</sup> )
<b>FBR 1</b>	0.103	36	43.507	0.084	8.111	7.958
<b>FBR 2</b>	0.103	26	112.992	0.207	3.350	7.958
<b>FBR 3</b>	0.103	37	59.236	0.172	4.023	2.977

Para determinar el fin de la fase de adaptación e inicio de la fase exponencial en cada cultivo, se graficó el Ln(X) en función del tiempo (Figura 28, ver anexo). Las curvas resultantes permiten ver que no hay fase de adaptación. Al

inicio de las curvas de crecimiento (Figura 18) el incremento en la cantidad de biomasa es bajo pero ya se ajusta a un crecimiento exponencial poco notable porque la velocidad de crecimiento del cultivo es reducida, al igual que la cantidad de biomasa presente.

Cuadro 2 Análisis estadístico de los resultados de biomasa producida de las cinéticas de crecimiento.

<b>Comparación</b>	<b>F<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>o</sub></b>
<b>FBR1-FBR2</b>	39.08	Se rechaza
<b>FBR2-FBR3</b>	31.69	Se rechaza
<b>FBR1-FBR3</b>	0.38	Se acepta

$F_{tablas}=7.011$  con  $\alpha=0.01$

$H_o$ = Los tratamientos son iguales

En las curvas de la Figura 28 se puede determinar el punto que corresponde a la desaceleración del crecimiento de biomasa. Al tomar estos puntos como tiempos característicos de la cinética de crecimiento y compararlos con el tiempo característico de mezclado del fotobiorreactor se observa que éstos son mucho más pequeños con lo cual se asegura que el mezclado no interfiere en el crecimiento de la cianobacteria.

Cuadro 3 Comparación de tiempos característicos de las cinéticas de crecimiento y del mezclado.

<b>Fotobiorreactores</b>	<b>Tiempo</b>	
	<b>característico de la cinética de crecimiento (días)</b>	<b>Tiempo característico de mezclado (segundos)</b>
<b>FBR 1</b>	21.07	11.602
<b>FBR 2</b>	13.82	11.602

### 5.3 Análisis Cinético

Con la comparación anterior del comportamiento del crecimiento de biomasa debe notarse que hay una diferencia entre los parámetros cinéticos de cada cultivo.

Un parámetro muy importante es la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Usando la ecuación 1 es posible hacer un seguimiento del cambio de  $\mu$  con respecto al tiempo y con esto saber en qué punto de la cinética se obtendrá el valor máximo ( $\mu_{\max}$ ).

En la Figura 20 se pueden observar los tiempos en los que se llega a las velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) para los tres diferentes reactores.

La  $\mu_{\max}$  alcanzada con mayor prontitud es en el FBR 2 en el día 22. Como era de esperarse debido a la tendencia de las curvas de crecimiento, se puede observar la similitud en el comportamiento de las curvas de FBR1 y BFR3. En los dos reactores se registra la  $\mu_{\max}$  en el día 30.

Al comparar las  $\mu_{\max}$  de los tres fotobiorreactores se observa que es en el FBR2 donde se obtiene el valor más grande de velocidad de crecimiento específica máxima (Cuadro 7). Aunque la diferencia del comportamiento de la velocidad específica de crecimiento durante la cinética de crecimiento no es diferente significativamente .

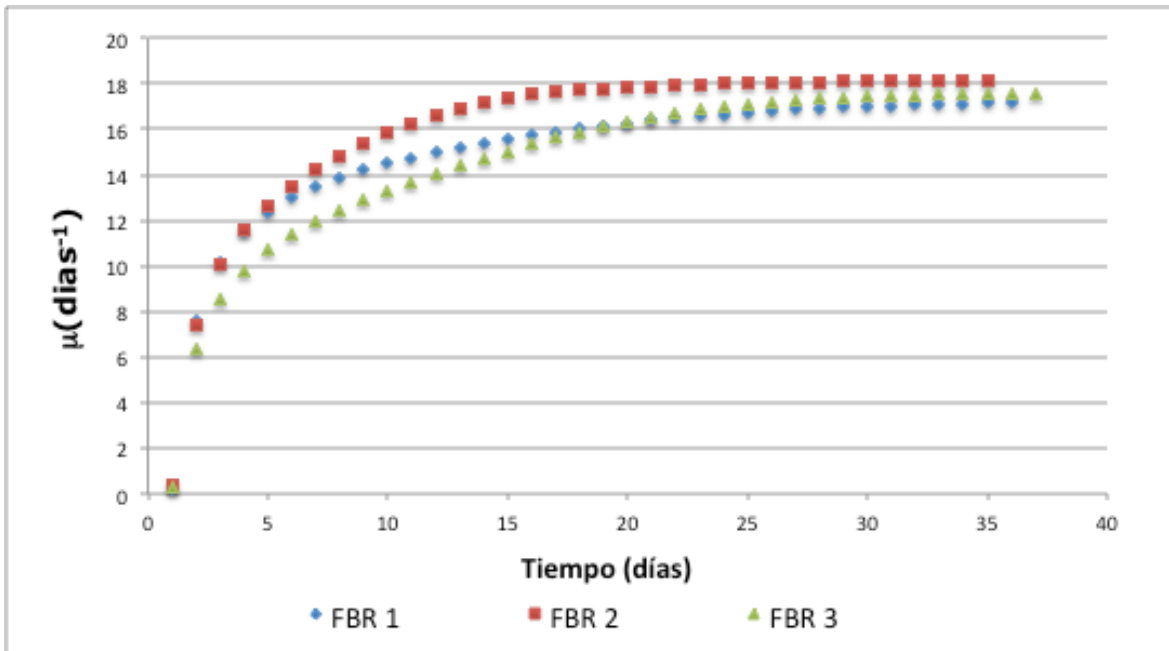


Figura 20 Velocidad específica de crecimiento con respecto al tiempo.

Para el crecimiento de cianobacterias algo muy importante es la administración de luz al medio y garantizar que llegue a todos los puntos del fotobiorreactor. Sin embargo, conforme la cantidad de biomasa aumenta, el medio se colorea cada vez más por la clorofila presente en los microorganismos y la luz encuentra más obstáculos a su paso. Conforme pasa el tiempo es posible medir la luz que es consumida dentro del reactor restando la medición de la luz que logra pasar a través del medio de la cantidad de luz que provee la fuente luminosa.

Cuadro 4 Análisis estadístico de los valores de velocidad específica de crecimiento en los diferentes fotobiorreactores.

<b>Comparación</b>	<b>F<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>o</sub></b>
<b>FBR1-FBR2</b>	1.82	Se acepta
<b>FBR2-FBR3</b>	2.74	Se acepta
<b>FBR1-FBR3</b>	0.16	Se acepta

F<sub>tablas</sub>=7.419 con α=0.01

$$H_0 = \mu_{FBR1} = \mu_{FBR2} = \mu_{FBR3}$$

En la Figura 21 se observa la cantidad de luz consumida en cada fotobiorreactor, dado que la trayectoria de los fotones emitidos hacia el fotobiorreactor puede considerarse un fenómeno estocástico, se aprecia cierta variación en la tendencia de la curva resultante.

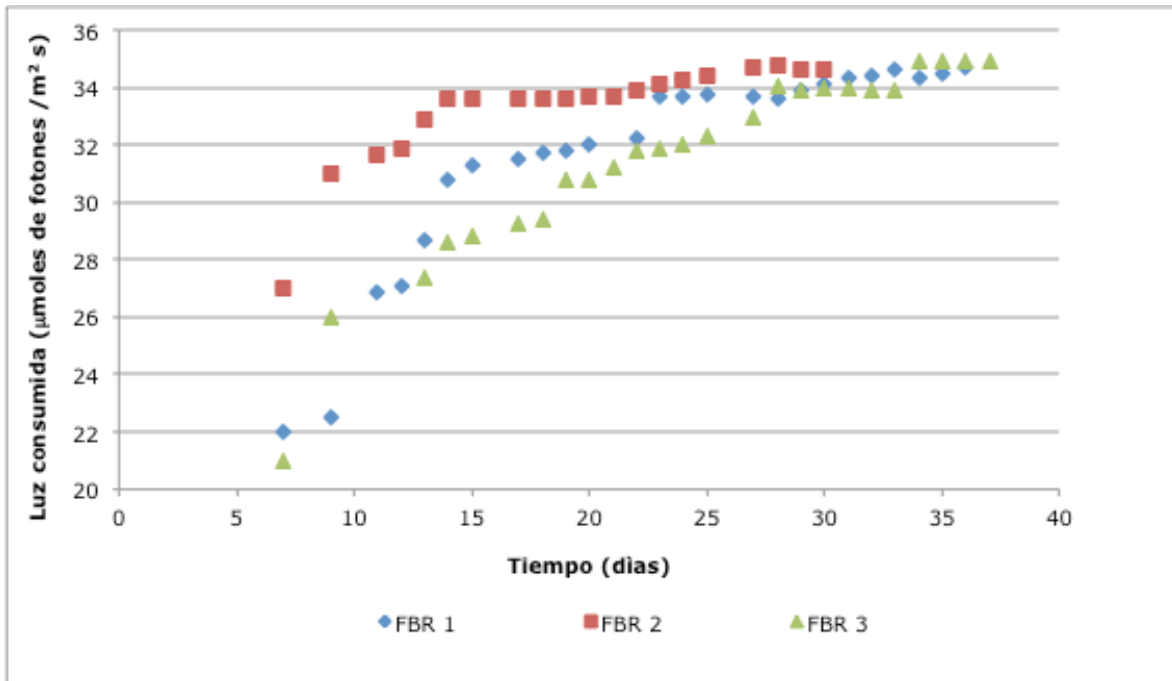


Figura 21. Variación de luz consumida dentro del fotobiorreactor con respecto al tiempo.

Para poder realizar el manejo de estos datos se buscó un modelo con el cual se ajustarán los datos experimentales. Se probaron diferentes modelos en las tres curvas experimentales y se eligió un modelo que convergiera y proporcionara un valor de  $R^2$  alto. El modelo utilizado es del tipo:

$$y = a * (1 - b^x)$$

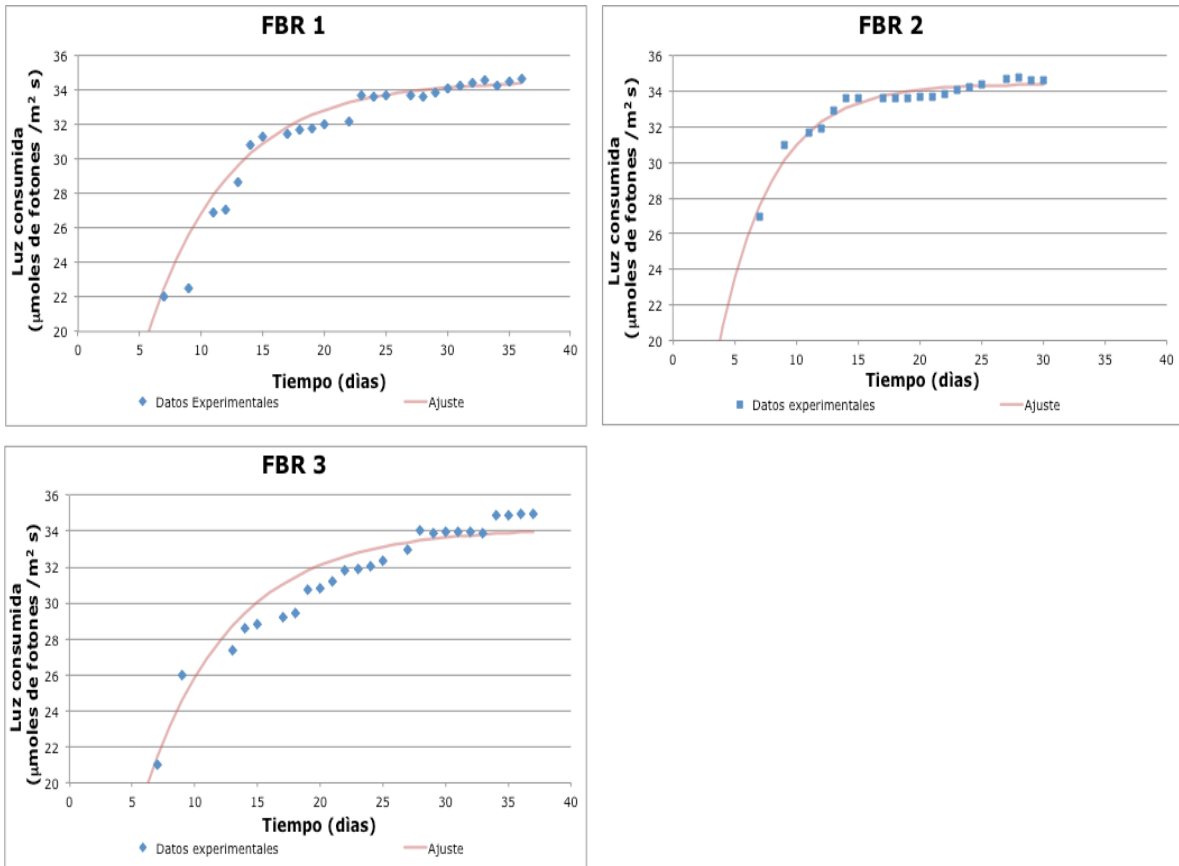


Figura 22. Ajuste de las curvas de luz consumida.

Los valores de las constantes y los valores de  $R^2$  obtenidas además de las figuras del ajuste resultante se pueden apreciar en el Cuadro 5 y Figura 22 respectivamente.

Cuadro 5 Parámetros y  $R^2$  de los ajustes de las curvas de luz consumida.

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>R^2</math></b>
<b>FBR1</b>	34.5394	0.8605	0.9683
<b>FBR2</b>	34.4207	0.7936	0.9535
<b>FBR3</b>	34.1280	0.868	0.9023

Los valores presentados corresponden a la luz consumida, para el caso del FBR 1, en la totalidad del fotobiorreactor, así que se utilizó la ley de Lambert-Beer para calcular los valores correspondientes a la mitad de la trayectoria total.

Al comparar las curvas ajustadas obtenidas de los tres fotobiorreactores (Figura 23) no se encuentra una diferencia significativa en el los valores de luz consumida en cada tiempo del reactor. El hecho de que en el tiempo final el valor de luz consumida tienda a ser el mismo en los tres fotobiorreactores no indica la presencia de la misma cantidad de biomasa. Es interesante destacar que el área de iluminación de los tres fotobiorreactores es diferente por lo que la cantidad de biomasa expuesta a la luz irradiada también es diferente. Se observa que en FBR2 es donde se llega al máximo de luz consumida en menor tiempo, esto debido a que, como se remarcó anteriormente, hay mayor generación de biomasa en este sistema. Las curvas de FBR1 y FBR2 es similar lo cual también corresponde con los valores de biomasa encontrados.

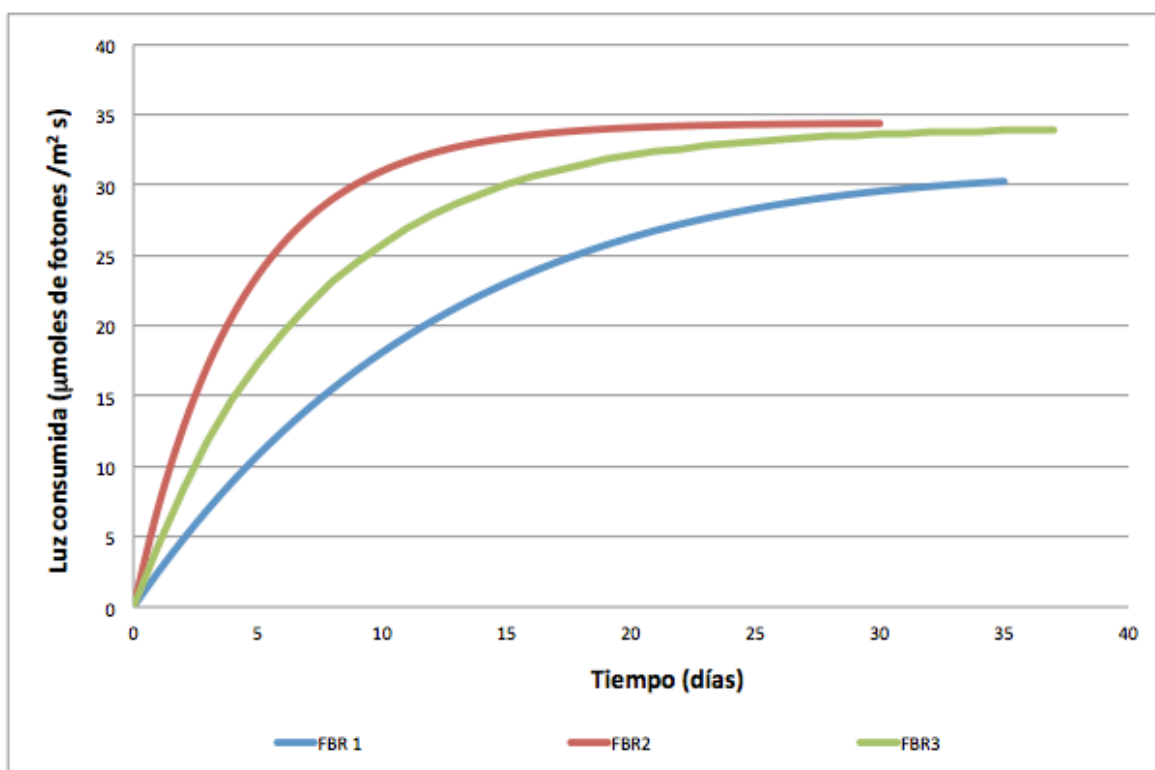


Figura 23. Curvas ajustadas de luz consumida con respecto al tiempo.

Cuadro 6 Análisis estadístico de los valores de luz consumida durante el tiempo de cultivo en los diferentes fotobiorreactores



<b>Comparación entre reactores</b>	<b>F<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>o</sub></b>
<b>FBR1-FBR2</b>	1.01	Se acepta
<b>FBR2-FBR3</b>	1.81	Se acepta
<b>FBR1-FBR3</b>	0.10	Se acepta

$F_{tablas} = 7.314$  con  $\alpha = 0.01$

$H_0 = \text{Luz consumida}_{FBR1} = \text{Luz consumida}_{FBR2} = \text{Luz consumida}_{FBR3}$

La luz emitida por la fuente luminosa se puede medir en forma de un flux de fotones (mmoles de fotones / m<sup>2</sup> s). Como se ha mencionado anteriormente un factor importante en la comparación de los sistemas es el área iluminada de cada FBR. Para poder hacer este analisis se realizó una corrección multiplicando los valores obtenidos por el área iluminada correspondiente a cada fotobiorreactor y por el tiempo para obtener sólo la cantidad de fotones.

Se realizó una curva para observar la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la cantidad de fotones. En los tres casos se puede apreciar una curva tipo Monod por lo que podemos usarla para obtener la constante de saturación del modelo.

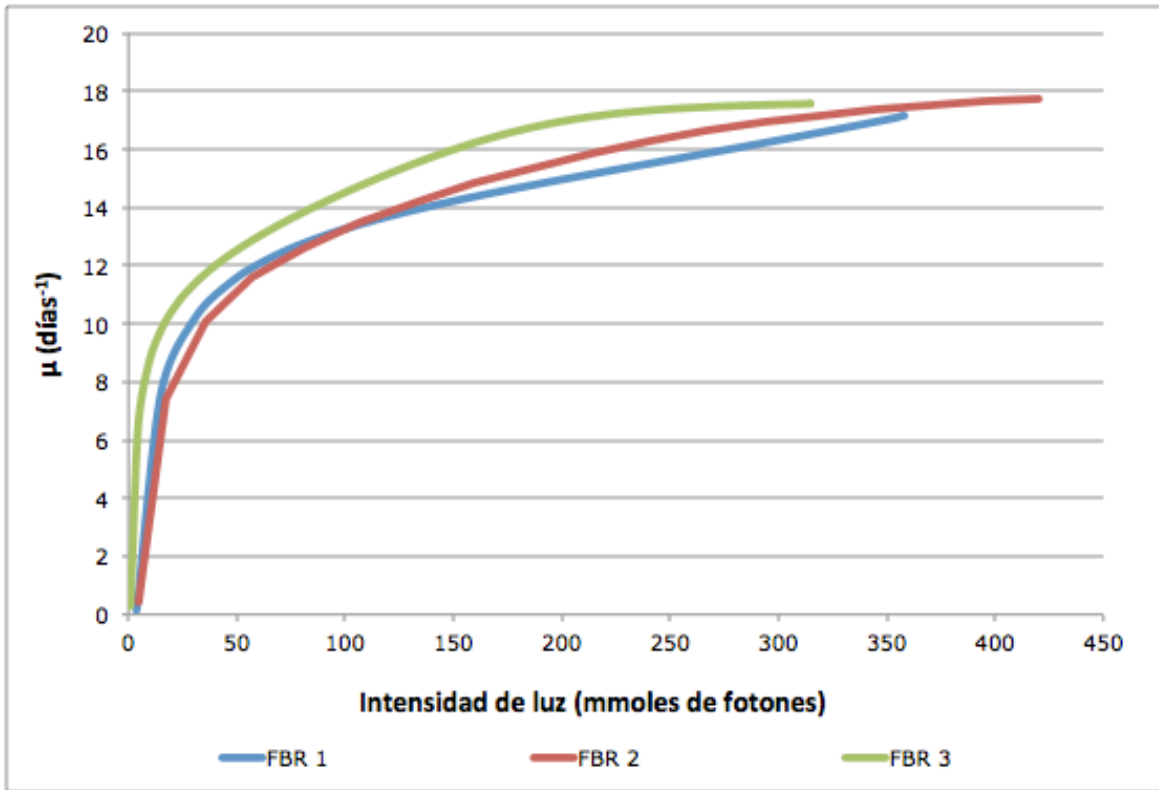


Figura 24. Variación de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) con respecto a la intensidad de luz en los tres fotobiorreactores.

Usando el método de Lineweaver-Burk (ver Anexo) se calcularon los parámetros de la ecuación de Monod que se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7 Valores de los parámetros la ecuación de Monod para los cultivos en los tres diferentes fotobiorreactores.

	$\mu_{\max}$ ( $D^{-1}$ )	$K_s$ ( $\mu$ moles de fotones)
<b>FBR1</b>	16.36	100.09
<b>FBR2</b>	17.85	177.68
<b>FBR3</b>	16.155	129.27

Con los resultados obtenidos nuevamente se observa la similitud del comportamiento cinético de los fotobiorreactores FBR 1 y FBR 3, ya que el valor de  $K_s$  obtenido para los dos fotobiorreactores es similar, mientras que el valor de  $K_s$  del fotobiorreactor restante es aproximadamente tres veces mayor. En cuanto a las velocidades máximas de crecimiento, los valores obtenidos en los tres tratamientos son similares. La diferencia no es considerable dado que se trata de la misma cepa.

El parámetro  $K_s$  está relacionado inversamente con la afinidad del microorganismo por el sustrato. Dado que el valor de  $K_s$  en el FBR 2 es mayor pareciera que en este sistema los microorganismos son menos afines a la energía lumínica. Si esto fuera correcto la cantidad de biomasa producida en este sistema sería menor que en los otros dos. El hecho de que no sea así indica que la producción de biomasa dentro del reactor está gobernada por la disponibilidad de ese sustrato en el medio, disponibilidad que dependerá de la forma en la que sea suministrada la energía lumínica al cultivo.

## **5.4 Acumulación de carbohidratos**

Una vez que los cultivos de biomasa llegaron a su fase estacionaria fueron expuestos a un estrés salino adicionando NaCl al medio para determinar si diferentes sistemas lumínicos tienen algún efecto en la producción de carbohidratos (Reed et al., 1986).

La acumulación de carbohidratos por las cianobacterias después de ser sometidas a un estrés salino es una de las medidas que toman para protegerse del potencial osmótico generado. Esta característica permite a las cianobacterias sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones salinas (Fogg et al., 1973).

El incremento en la concentración salina en el medio produce pérdida de agua de la célula por lo que hay un incremento en la concentración intracelular de

iones (Hagemann and Erdmann, 1997). Es la acumulación de carbohidratos antes mencionada la que permite estabilizar de nuevo a la célula.

Debido a que el análisis estadístico indicó que no existe diferencia entre los resultados de los fotobiorreactores FBR1 y FBR3, se decidió hacer este análisis solo con los dos fotobiorreactores con sistemas lumínicos externos (FBR1 y FBR2).

Después de inducir el estrés se tomó muestra de cada fotobiorreactor cada sesenta minutos durante las primeras seis horas, después de ese lapso se tomaron cada 12 horas. Las muestras se congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  y liofilizaron. Posteriormente se extrajeron los carbohidratos y se determinó la concentración con el método de Fenol-Sulfúrico para carbohidratos totales.

En la Figura 25 se observa un incremento en la concentración de carbohidratos durante las primeras seis horas. A partir de este punto la concentración permanece estable durante todo lo que resta del lapso de toma de muestra.

El comportamiento de la concentración de carbohidratos intracelulares en los dos cultivos es similar y proporcional a la cantidad de biomasa presente en cada fotobiorreactor. El rendimiento de carbohidratos totales obtenidos por número de células para FBR1 es de  $9.522 \cdot 10^{-4}$  mientras que en el FBR2 el rendimiento es de  $10.676 \cdot 10^{-4}$ .

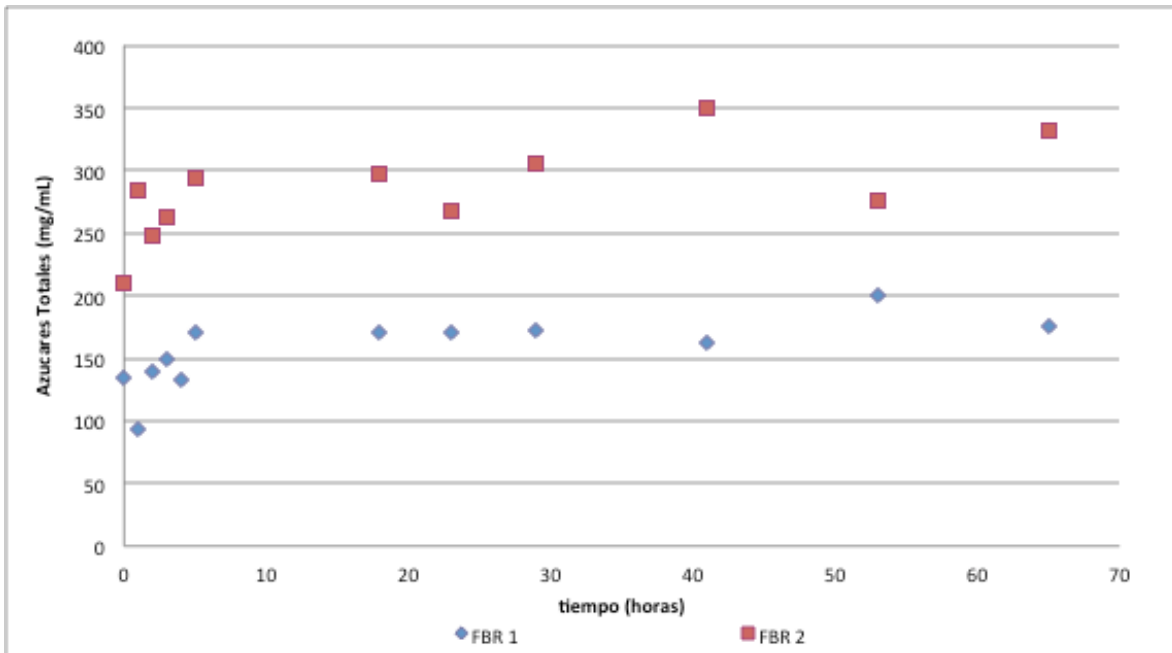


Figura 25. Acumulación de carbohidratos en FBR1 y FBR2 después de inducir un estrés salino con NaCl.

Es durante las primeras horas a partir del estrés salino cuando se observa el incremento en la concentración de carbohidratos totales en el medio. El carbohidrato mayormente producido por la cepa de *Synechocystis* es el glucosilglicerol según lo reportado por (Reed et al., 1984, Warr et al., 1985). También se produce sacarosa, aunque en menor cantidad. Hay una relación de 10:1 entre glucosilglicerol y sacarosa, la cual disminuye durante en las primeras 6 horas después del estrés salino (Desplats et al., 2005). Es debido a esta relación que en los resultados experimentales obtenidos no se aprecia una disminución en la concentración de carbohidratos.

## 6. Conclusiones

- El fotobiorreactor especificado tiene forma de cilindro con volumen total de 8.3606 L con sistemas luminicos tanto internos como externos. El sistema interno consta de una tira de 50 LEDS dispuesta en forma de espiral iluminando desde la parte interna del fotobiorreactor. Los sistemas externos constan de: i) una lámpara fluorescente, ii) tira de 50 LEDS distribuida en forma de espiral alrededor de la parte externa del fotobiorreactor.
- La velocidad especifica de crecimiento maxima fue de 17.85 dias<sup>-1</sup> al usar iluminación externa de 35  $\mu$ moles de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> con un sistema luminico de LEDS en forma de espiral alrededor de la pared externa del fotobiorreactor. La biomasa generada con este sistema lumínico fue de 112.992 millones de células L<sup>-1</sup>, aproximadamente el doble de la biomasa generada con los otros dos sistemas utilizados.
- En base al análisis estadístico (Cuadro 4) no hay diferencia significativa entre el crecimiento celular con un sistema lumínico de LEDS interno en forma de espiral y una fuente lumínica de fluorescente.
- La cantidad de luz disponible dentro del medio es mayor con el sistema lumínico de LEDS externo debido a las trayectorias de los fotones dentro del fotobiorreactor (Figura 19).
- La producción de carbohidratos después de inducir un estrés salino no es afectada por la fuente lumínica sino por la cantidad de biomasa presente. El rendimiento de producción de carbohidratos por numero de células para FBR1 y FBR2 es de  $9.522 \cdot 10^{-4}$  y  $10.676 \cdot 10^{-4}$  g de carbohidratos / numero de células, respectivamente.

## 7. Referencias

- ABELIOVICH, A. & AZOV, Y. 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 801-806.
- BENSON, B. C., GUTIERREZ-WING, M. T. & RUSCH, K. A. 2007. The development of a mechanistic model to investigate the impacts of the light dynamics on algal productivity in a Hydraulically Integrated Serial Turbidostat Algal Reactor (HISTAR). *Aquacultural Engineering*, 36, 198-211.
- BOROWITZKA, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9, 393-401.
- BRINLEY, C., ACIÉN, F. G. & FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M. 2011. Analysis of light regime in continuous light distributions in photobioreactors. *Bioresource Technology*, 102, 3138-3148.
- CARVAHLO, A. P., MEIRELES, L. A. & MALCATA, F. X. 2006. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress*, 22, 1490-1506.
- CHEN, C.-Y., YEH, K.-L., AISYAH, R., LEE, D.-J. & CHANG, J.-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102, 71-81.
- CHENG, L., ZHANG, L., CHEN, H. & GAO, C. 2006. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 50, 324-329.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- CORNET, J.-F. 2010. Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically-lightened photobioreactors using the constructal approach. *Chemical Engineering Science*, 65, 985-998.
- DESPLATS, P., FOLCO, E. & SALERNO, G. L. 2005. Sucrose may play an additional role to that of an osmolyte in *Synechocystis* sp. PCC 6803 salt-shocked cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 133-138.

- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- FOGG, G. E., STEWART, P. F. & WALSBY, A. E. 1973. *The blue-green algae*, London, Academic Press.
- GAULT, P. M. & MARLER, H. J. (eds.) 2009. *Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications*, New York: Nova Science Publishers, Inc.
- GUVEN, B. & HOWARD, A. 2006. Modelling the growth and movement of cyanobacteria in river systems. *Science of the Total Environment*, 368, 898-908.
- HAGEMANN, M. & ERDMANN, N. 1997. Environmental stresses. In: RAI, A. K. (ed.) *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*. New Delhi: Springer Verlag.
- HOWARD, A., IRISH, A. E. & REYNOLDS, C. S. 1996. A new simulation of cyanobacterial underwater movement *Journal of Plankton Research*, 18, 1375-1385.
- HSIEH, C.-H. & WU, W.-T. 2009. A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 46, 300-305.
- IMAMOGLU, E., SUKAN, F. V. & DALAY, M. C. 2007. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International journal of natural and engineering sciences*, 1, 5-9.
- JACOB-LOPES, E., GIMENES, C. H., FERREIRA, L. M. C. & TEIXEIRA, T. 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, 48, 306-310.
- JANSEN, M. 2002. *Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield*, Wageningen, The Netherlands, Wageningen Universitet
- JANSEN, M., JANSEN, M., DE WINTER, M., TRAMPER, J., MUR, L. R., SNEL, J. & WIJFFELS, R. H. 2000. Efficiency of light utilization of



*Clamydomonas reinhardtii* under medium duration light/dark cycles.  
*Journal of Biotechnology*, 78, 123-127

- JANSSEN, M., KUIJPERS, T. C., VELDHOEN, B., TERNBACH, M. B., TRAMPER, J., MUR, L. R. & WIJFFELS, R. H. 1999. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13-87 s. *Journal of Biotechnology*, 70, 323-333.
- KATSUDA, T., SHIRAISHI, H., ISHIZU, N., RANJBAR, R. & KATOH, S. 2008. Effect of Light Intensity and Frequency of Flashing Light from Blue Light Emitting Diodes on Astaxanthin Production by *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 216-220.
- KIM, I. S., NGUYEN, G. H., KIM, S., LEE, J. & YU, H.-W. 2009. Evaluation of methods for cyanobacterial cell lysis and toxin (Microcystin-LR) extraction using chromatographic and mass spectrometric analyses. *Environmental engineering research*, 14, 250-254.
- KIM, M. 2009. Two-stage logistic regression model. *Expert Systems with Applications*, 36, 6727-6734.
- KIRK, J. T. O. 2011. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, New York, Cambridge University Press.
- LEE, C.-G. 1999. Calculation of light penetration depth in photobioreactors. *Biotechnonology and bioprocess engineering*, 4, 78-81.
- LEE, C.-G. & PALSSON, B. 1995. Light Emitting Diode-Based Algal Photobioreactor with External Gas Exchange. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 257-263.
- LEE, H. Y. & ERICKSON, L. E. 1987. Theoretical and experimental yields for photoautotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 476-481.
- LEE, Y.-K., DING, S.-Y., LOW, C.-S., CHANG, Y.-C., FORDAY, W. L. & CHEW, P.-C. 1995. Design and performance of an R-type tubular photobioreactor for mass cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 7, 47-51.

- LEHR, F. & POSTEN, C. 2009. Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 280-285.
- LEVENSPIEL, O. 1987. *Chemical reaction engineering*, New York.
- MASOJÍDEK, J., KOBLÍZEK, M. & TORZILLO, G. 2004. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 1 ed.: Blackwell Publishing Ltd.
- MEIRELES, L. A., GUEDES, A. C., BARBOSA, C. R., AZEVEDO, J. L., CUNHA, J. P. & MALCATA, F. X. 2008. On-line control of light intensity in a microalgal bioreactor using a novel automatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 554-559.
- MELIS, A., NEIDHARDT, J. & BENEMANN, J. R. 1999. *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna size exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Biomedical and life sciences*, 10, 515-525.
- MESECK, S. L., ALIX, J. H. & WIKFORS, G. H. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*, 246, 393-404.
- MUÑOZ, R. & GUIEYSEE, B. 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, 40, 2799-2815.
- NICOLAUS, B., PANICO, A., LAMA, L., ROMANO, I., MANCA, M. C., GIULIO, A. D. & GAMBACORTA, A. 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*, 52, 639-647.
- NIELSEN, J. & VILLADSEN, J. 1994. *Bioreaction engineering principles*, New York, Plenum Press.
- OGBONNA, J. C., YADA, H. & TANAKA, H. 1995. Light Supply Coefficient: A New Engineering Parameter for Photobioreactor Design. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 369-376.
- PARIKH, A. & MADAMWAR, D. 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 97, 1822-1827.

- PARK, K.-H. & LEE, C.-G. 2000. Optimization of algal photobioreactors using flashing lights. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 5, 186-190.
- PARK, K.-H. & LEE, C.-G. 2001. Effectiveness of flashing light for increasing photosynthetic efficiency of microalgal cultures over a critical cell density. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 6, 189-193.
- PEÑA-VÁZQUEZ, E., MANEIRO, E., PÉREZ-CONDE, C. N., MORENO-BONDI, M. C. & COSTAS, E. 2009. Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3538-3543.
- PERNER-NOCHTA, I. & POSTEN, C. 2007. Simulations of light intensity variation in photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 131, 276-285.
- PHILIPS, E. J., ZEMAN, C. & HANSEN, P. 1989. Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechococcus sp.* (Cyanophyta). *Journal of Applied Phycology*, 1, 137-145.
- POSTEN, C. & SCHAUB, G. 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—A process view. *Journal of Biotechnology*, 142, 64-69.
- PULZ, O. & SCHEIBENBOGEN, K. 1998. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 59, 123-152.
- REED, R. H., RICHARDSON, D. L., WARR, S. R. C. & STEWART, W. D. P. 1984. Carbohydrate Accumulation and Osmotic Stress in Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 130, 1-4.
- REED, R. H., WARR, S. R. C., KERBY, N. W. & STEWART, W. D. P. 1986. Osmotic shock-induced release of low molecular weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 101-104.
- RESNICK, R., HALLIDAY, D. & KRANE, K. S. 1999. *Física* Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V.
- RICHMOND, A., CHEN-WU, Z. & ZARMI, Y. 2003. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the

- optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. *Biomolecular Engineering*, 20, 229-236.
- ROBINSON, L. F., MORRISON, A. W. & BAMFORTH, M. R. 1988. *Improvements relating to biosynthesis*. Great Britain patent application 87308216.8.
- ROSALES, N., ORTEGA, J., MORA, R. & MORALES, E. 2005. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus sp.* *Ciencias Marinas*, 31, 349-355.
- RUPPRECHT, J. 2009. From systems biology to fuel—*Chlamydomonas reinhardtii* as a model for a systems biology approach to improve biohydrogen production. *Journal of Biochnology*, 142, 10-20.
- SASTRE, R. R., CSÖGÖR, Z., PERNER-NOCHTA, I., FLECK-SCHNEIDER, P. & POSTEN, C. 2007. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors—A conceptual approach. *Journal of Biotechnology*, 132, 127-133.
- SHASTRI, A. A. & MORGAN, J. A. 2005. Flux Balance Analysis of Photoautotrophic Metabolism. *Biotechnology Progress*, 21, 1617-1626.
- SIERRA, E., ACIÉN, F. G., FERNÁNDEZ, J. M., GARCÍA, J. L., GONZÁLEZ, C. & MOLINA, E. 2008. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138, 136-147.
- STANIER, R. Y. 1992. *Microbiología*, Barcelona, Reverté, S. A.
- SUH, I. S., JOO, H.-N. & LEE, C.-G. 2006. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Journal of Biotechnology*, 125, 540-546.
- SUH, I. S. & LEE, C. G. 2003. Photobiorreactor Engineering: Design and Performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8, 313-321.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2006. Photosynthesis: the light reactions. *Plant Physiology*. 4 ed.: Sinauer Associates, Inc.
- TOMASELLI, L. 2004. The microalgal cell. *In: RICHMOND, A. (ed.) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 1 ed.: Blackwell Publishing Ltd.

- TORZILLO, G., PUSHPARAJ, B., MASOJIDEK, J. & VONSHAK, A. 2003. Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 8, 338-348.
- TREDICI, M. R. & ZITTELLI, G. C. 1998. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 57, 187-197.
- TZOVENIS, I., PAUW, N. D. & SORGELOOS, P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*, 216.
- ULLOA, J. T. & RODRÍGUEZ, J. A. 2010. El modelo logístico: Una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. *Revista electronica de veterinaria*, 11.
- WARR, S. R. C., REED, R. H. & STEWART, W. D. P. 1985. Carbohydrate accumulation in osmotically stressed cyanobacteria (blue-green algae): Interactions of temperature and salinity. *New Phytologist*, 100, 285-292.
- ZIJFFERS, J.-W. F., JANSSEN, M., TRAMPER, J. & WIJFFELS, R. H. 2008a. Design process of an area-efficient photobioreactor. *Marine Biotechnology*, 10, 404-415.
- ZIJFFERS, J. W. F., SALIM, S., JANSSEN, M., TRAMPER, J. & WIJFFELS, R. H. 2008b. Capturing sunlight into a photobioreactor: Ray tracing simulation of the propagation of light from capture to distribution into the reactor. *Chemical Engineering Journal*, 145, 316-327.

## 8. Anexos

### Anexo 1. Ajuste de las curvas experimentales con el modelo logístico.

En el Cuadro 8 se presentan los valores de los parámetros obtenidos con este procedimiento.

Cuadro 8 Parámetros obtenidos para el ajuste de los datos experimentales de tiempo de mezcla al modelo logístico.

Parámetro	Velocidad de Aireación (L min <sup>-1</sup> )				
	5	7.5	10	12.5	15
<b>K</b>	0.973	0.963	0.929	0.943	0.957
<b>P<sub>0</sub></b>	0.00618	0.000792	0.00179	0.000910	0.000599
<b>R</b>	0.478	0.612	0.542	0.472	0.549

Se realizaron las gráficas con los parámetros obtenidos y se superpusieron a las graficas experimentales para comprobar la similitud entre las curvas Figura 26.

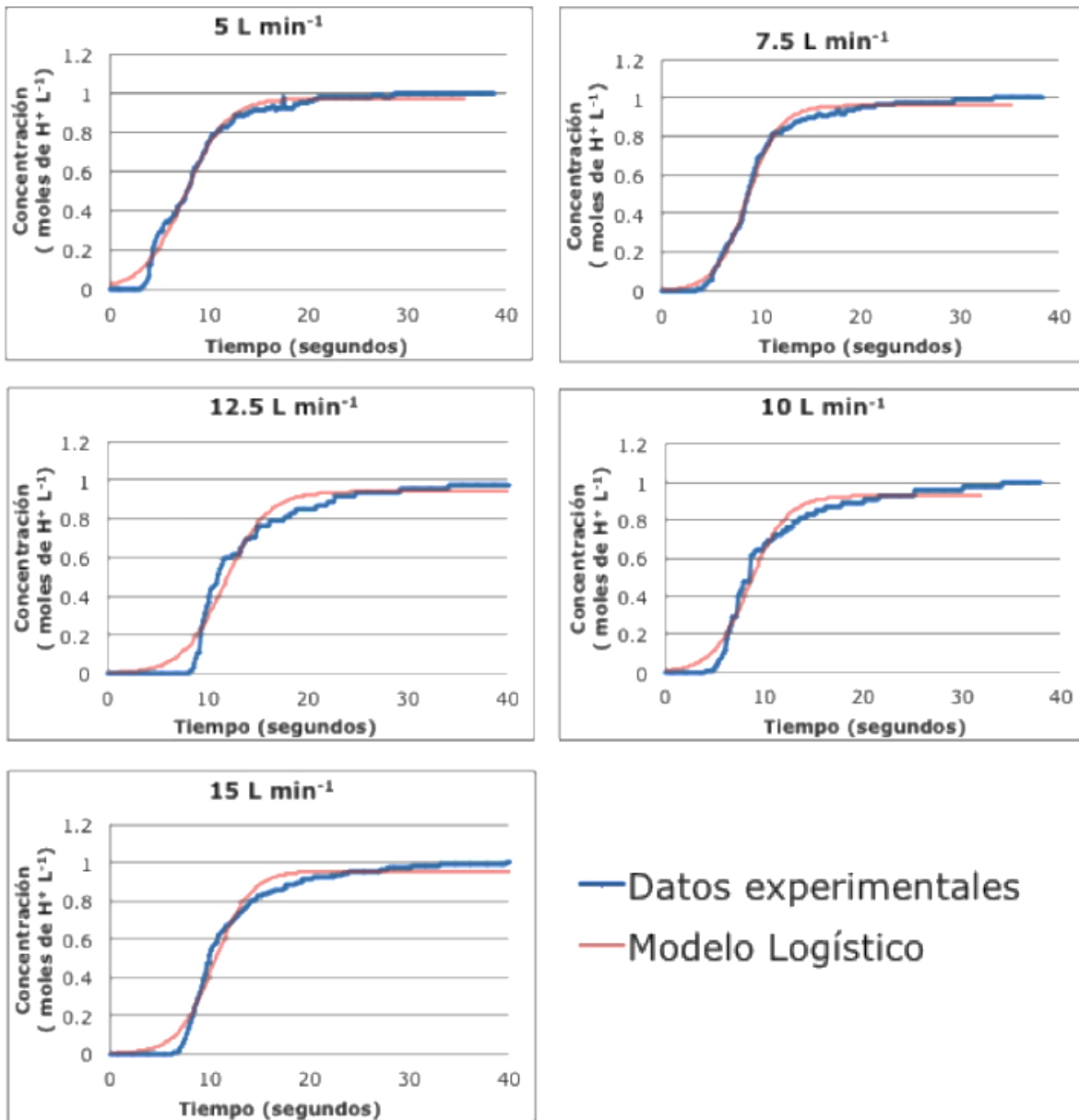


Figura 26. Ajuste de las curvas experimentales con el modelo logístico

## Anexo 2. Curva de distribución de tiempos de residencia F.

En las distribuciones de tiempo de residencia F se observa que las curvas correspondientes a las velocidades de aireación de 7.5 y 10 L min<sup>-1</sup> son similares. Conforme aumenta la velocidad de aireación las curvas tardan mas en llegar a su valor de saturación, exceptuando la velocidad de 12.5 Lmin<sup>-1</sup>.

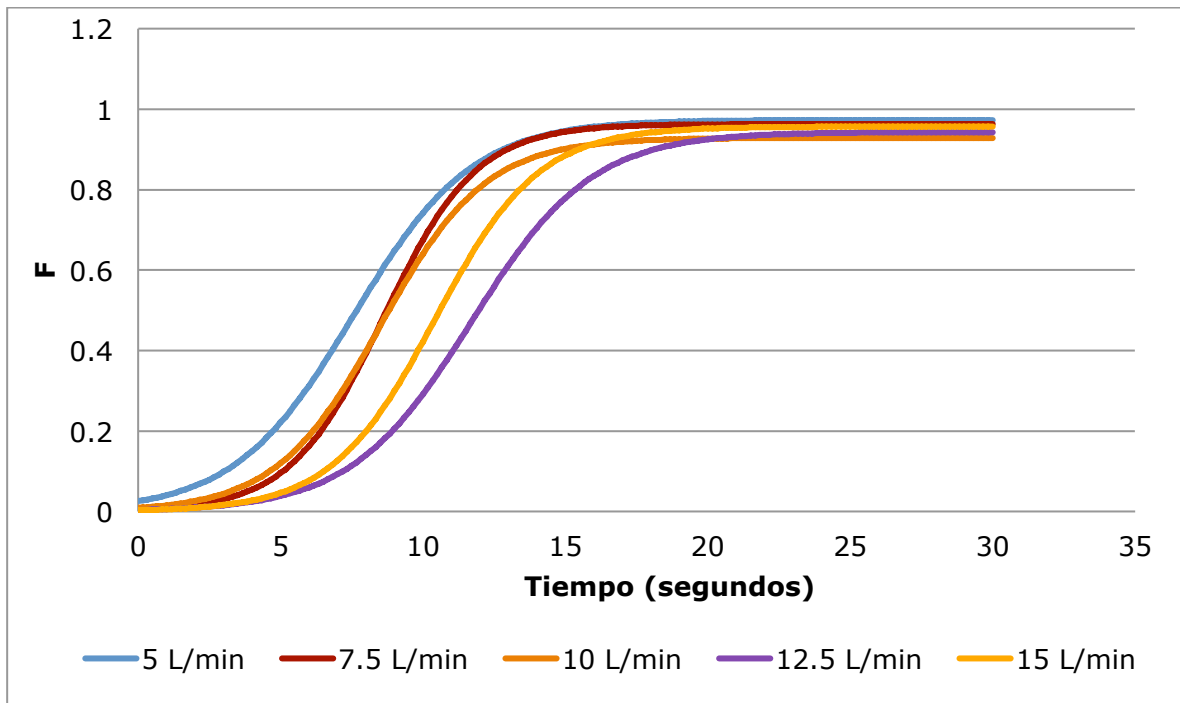


Figura 27. Curva de distribución de tiempos de residencia F del fotobiorreactor con diferentes velocidades de aireación.



### Anexo 3. Curvas de Ln(X) en función del tiempo

Se graficó el Ln(X) en función del tiempo. Las características de la curva permiten que se tracen dos líneas rectas de tendencia en ella. El punto de intersección de las curvas corresponde al punto donde comienza la desaceleración del crecimiento de biomasa.

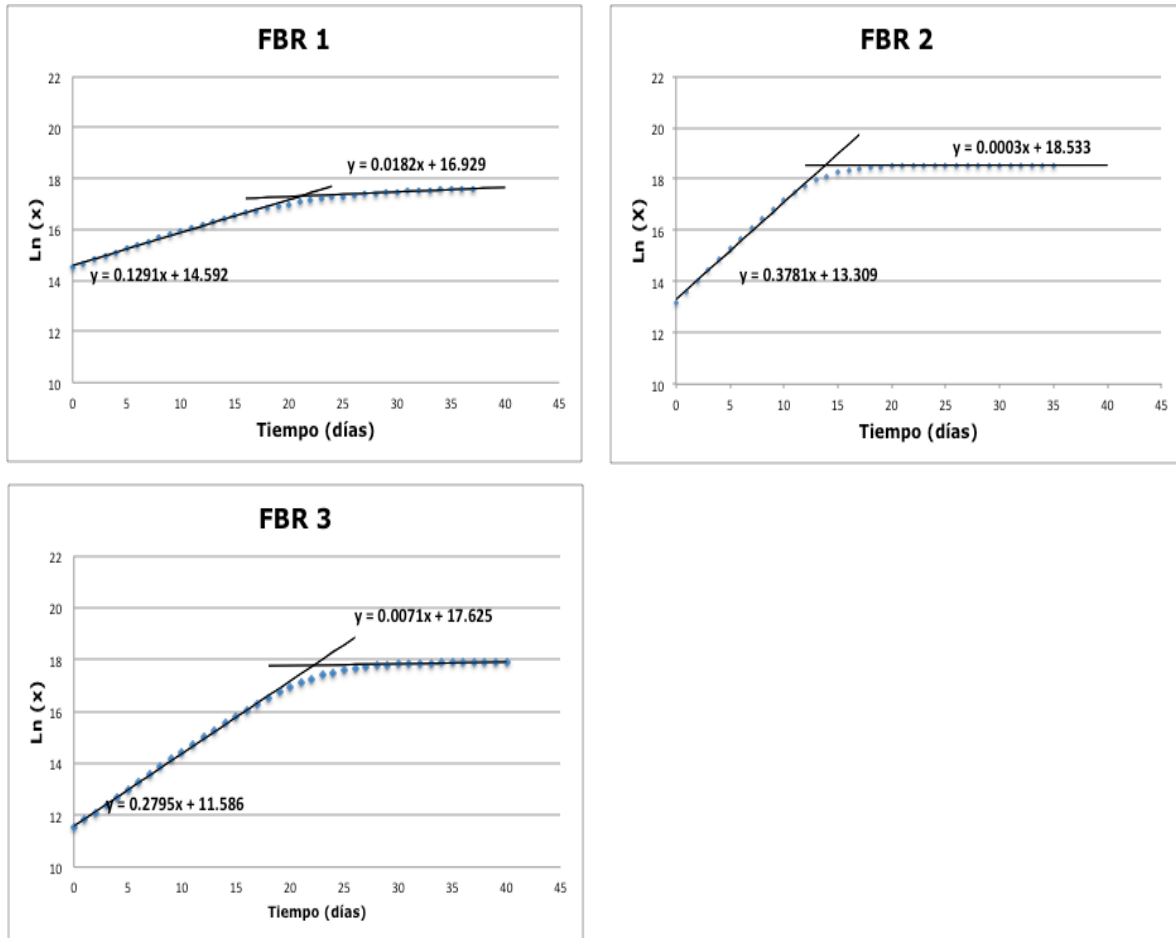


Figura 28. Curvas de Ln (X) vs Tiempo.

## Anexo 4. Lineweaver-Burk

Se utilizó el método de linealización de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros de la ecuación de Monod ( $\mu_{\max}$  y  $K_s$ ) a la cual se ajustan los valores de velocidad de crecimiento en función de luz consumida.

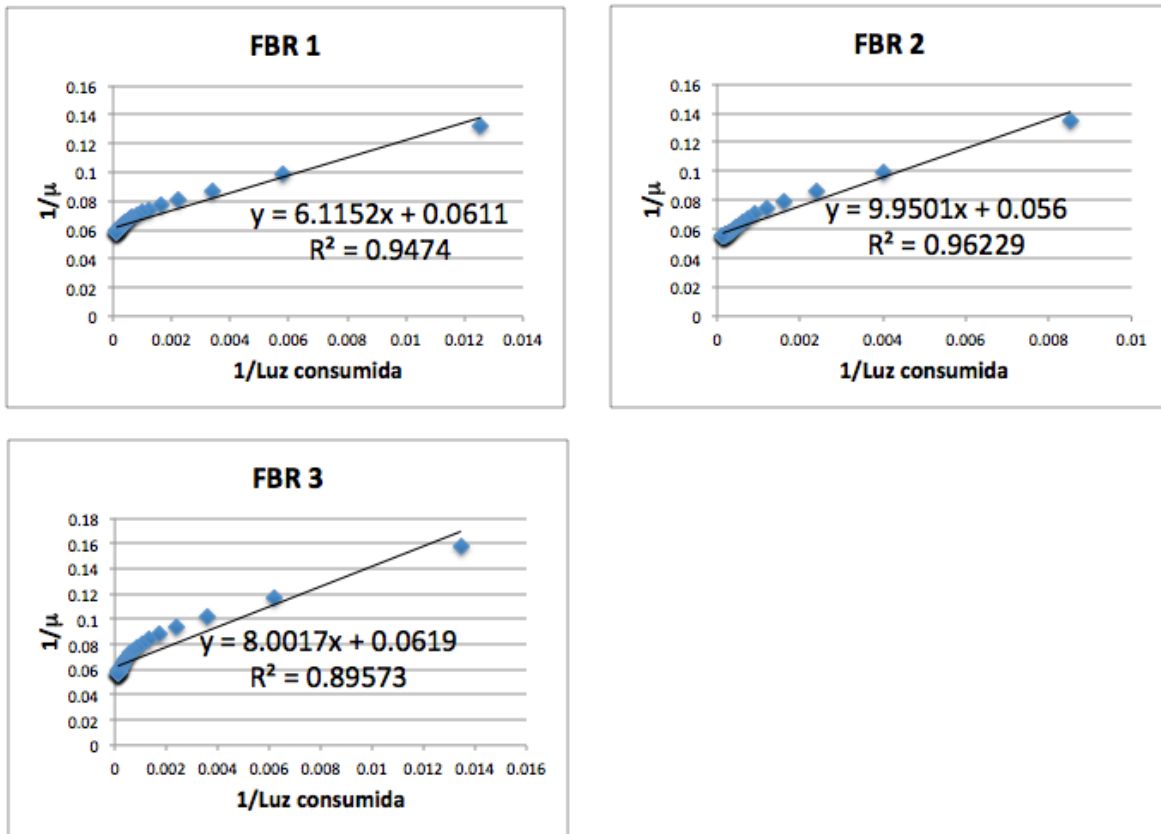


Figura 29. Linealización de las curvas del inverso de  $\mu$  en función del inverso de la luz consumida por el método de Lineweaver-Burk.