

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS CELAYA – SALVATIERRA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD E INGENIERÍA

TESIS

“ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROALGAS DE LA REGIÓN
LERMA-BAJÍO BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE
CRECIMIENTO”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: LICENCIADO EN INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA: CABRERA CAPETILLO CHRISTIAN ARIEL

DIRECTOR: DR. CASTILLO BALTAZAR OMAR SURISADAI

CODIRECTOR: DR. PEÑA CABALLERO VICENTE

CELAYA, GTO. OCTUBRE 2018

Estudio de cultivos de microalgas de la región Lerma-Bajío bajo diferentes condiciones de crecimiento

Tesis realizada por **Christian Ariel Cabrera Capetillo**, bajo del Comité Revisor indicando, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

Ingeniero en Biotecnología

COMITÉ REVISOR:

Dr. Omar Surisadai Castillo
Baltazar
Director de Tesis

Dr. Vicente Peña-Caballero
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez
Presidente del Comité Sinodal

Dra. Laura Mejía Teniente
Secretaria del Comité Sinodal

MC. Luz María Landa Zavaleta
Vocal del Comité Sinodal

Celaya Gto., octubre 2018

DEDICATORIA

*“Se lo dedico a mi familia pero sobre todo a
Brenda Capetillo (mí madre), los cuales me
Inspiran para seguir adelante día con día
y me brindan su inigualable cariño”*

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada agradezco al **Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca otorgada para realizar la presente tesis de investigación.

A la **Universidad de Guanajuato**, por permitirme estudiar dentro del programa educativo de Ingeniería en Biotecnología.

Agradezco profundamente a mi director de tesis el **Dr. Omar Surisadai Castillo Baltazar** por no dejarme vencer en ningún instante y llevarme al éxito en cada momento.

A alguien más que mi codirector o coordinador, un atento compañero de carrera que siempre apoyo y ayudo a mí formación como estudiante al **Dr. Vicente Peña Caballero**.

A mis revisores de tesis **Dr. Carlos Hernán Herrera Méndez, Dra. Laura Mejía Teniente y MC. Luz María Landa Zavaleta** por todas las observaciones y atinadas opiniones e ideas para poder concluir con este trabajo.

Este trabajo forma parte del proyecto “Estudio de cultivos mixotróficos y heterotróficos de microalgas en medios alternativos para la producción de biofertilizantes”, dirigido por el Dr. Omar Surisadai Castillo Baltazar, financiado por el fondo SEP-CONACyT en la convocatoria CB-2015 (clave de proyecto: 255717)

RESUMEN

Las microalgas son organismos unicelulares de gran interés industrial. Su importancia radica en la cantidad de productos que de ellas se pueden obtener. Las microalgas se caracterizan por su alta tasa de producción de biomasa, absorción de nutrientes nitrógeno, fósforo y carbono, producción de proteínas, lípidos y metabolitos secundarios en condiciones de estrés, y que en general pueden crecer en diferentes y extremas condiciones climáticas. En la búsqueda de condiciones óptimas de cultivo para la generación de productos de interés industrial, en este trabajo se emplearon consorcios de microalgas aislados de la "Presa de Neutla", de la región Lerma-Bajío (zona central de México), las cuales se mantuvieron en condiciones de laboratorio donde se analizó su crecimiento y consumo de nutrientes. Los consorcios de microalgas se cultivaron en condiciones fotoautotróficas (medio Bold basal modificado con 3 veces la concentración de nitrógeno BBM-3N, 25 °C, aire seco de 0.03 volumen de medio por volumen de aire por minuto vvm, fotoperiodo 16 h luz-8 h oscuridad), heterotróficas (sin iluminación, BBM-3N, fuente orgánica de carbono) y mixotróficas (BBM-3N, 25 °C, aire seco de 0.03 vvm, fotoperiodo 16 h luz-8 h oscuridad, fuente orgánica de carbono). Los parámetros analizados fueron la producción de biomasa, la concentración de clorofila, el consumo de nitrógeno y la producción de lípidos y proteínas. De los datos obtenidos de la etapa experimental, se observó que los consorcios de microalgas pudieron adaptarse y crecieron bajo las 3 condiciones nutricionales y de operación analizadas.

Palabras clave: consorcio, microalgas, adaptación, medio de cultivo, proteínas y lípidos.

SUMMARY

Microalgae are photosynthetic unicellular microorganisms of great industrial interest, because of the wide variety of products that can be obtained from them. In fact, microalgae biomass is considered as an alternative source of high value-added products. Microalgae are characterized by their high rate of biomass production, high nutrient absorption rate (nitrogen, phosphorus and carbon), protein, lipid and secondary metabolites production, and ubiquity. Searching optimal cultivation conditions for the accumulation of products of industrial interest, in this work, a microalgae consortium was isolated from Neutla's dam, Comonfort municipality in Guanajuato, Mexico, and was adapted to growth in controlled conditions. Their growth parameters and consumption of nutrients were analyzed. The microalgae consortium grown under phototrophic conditions (Bold's basal medium with three times the nominal nitrogen concentration BBM-3N, 25°C, dry air of 0.03 medium volume per air volume per minute vvm, photoperiod 16 h light-8 h dark), heterotrophic (dark, BBM-3N, organic carbon source) and mixotrophic (BBM -3N, 25°C, dry air of 0.03 vvm, photoperiod 16 h light-8 h dark, organic carbon source). The analyzed parameters were biomass and chlorophyll concentration, consumption of nitrogen, phosphorous, glucose and production of lipids and proteins. The obtained results from the experimental stage, suggest that microalgae consortium can produce biomass rich in lipids on heterotrophic cultivation, and protein on mixotrophic cultivation.

Keywords: consortium, microalgae, adaptation, culture medium, proteins and lipids.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	i
Índice.....	iii
Índice de tablas	v
Índice de figuras	vi
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Justificación	3
1.2 Hipótesis	4
1.3 Objetivos	5
Capítulo 2 Antecedentes	6
2.1 Origen: Microalgas.....	6
2.2 Composición de la microalga.....	7
2.3 Condiciones de cultivo	7
2.4 Sistemas de cultivo.....	9
2.5 Beneficios y aplicaciones industriales.....	9
Capítulo 3 Metodología.....	11
3.1 Colecta de material biológico.....	11
3.2 Adaptación.....	12
3.3 Identificación morfológica.....	12
3.4 Condiciones experimentales	13
3.5 Parámetros de análisis	16
Capítulo 4 Resultados y Discusión.....	25
4.1 Curvas de calibración	25
4.2 Parámetros analizados	26
4.3 Discusión	37
Capítulo 5 Conclusiones	43

5.1 Alcances y proyección futura de la investigación.....	44
Referencias	45
Anexos	48
Anexo A.....	48
Anexo B.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición típica de algunos tipos de microalgas (Becker, 1994)	7
Tabla 2. Composición del medio BBM (Balsanti y Gualtieri, 2010, p. 209).	13
Tabla 3. Especies de microalgas identificadas morfológicamente presentes en el consorcio estudiado.	14
Tabla 4. Diluciones para la curva de calibración Biomasa vs Absorbancia.	17
Tabla 5. Solución madre para curva de calibración de glucosa.	20
Tabla 6. Digestión, especificaciones según el tipo de muestra. (HACH, 1999). ...	23
Tabla 7. Muestras secas. (HACH, 1999)	24
Tabla 8. Concentración de Lípidos en los tratamientos analizados.	37
Tabla 9. Concentración de Proteínas producida en los tratamientos	37
Tabla 10. Resumen de resultados	40
Tabla 11. Aplicaciones industriales.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reactores: Riceway, Thin Layer y Tubulares.	9
Figura 2. Área natural protegida de la presa de Neutla y sus límites territoriales (Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, 2017).	12
Figura 3. Curva de calibración concentración de biomasa-absorbancia en consorcio de microalgas analizado.	25
Figura 4 Curva de calibración concentración de glucosa-absorbancia.....	26
Figura 5. Cinética de crecimiento para el cultivo fotoautotrófico.....	27
Figura 6. Cinética de crecimiento para el cultivo heterotrófico.	27
Figura 7. Cinética de crecimiento para el cultivo mixotrófico.	28
Figura 8. Concentración total de clorofila en el cultivo fotoautotrófico.	29
Figura 9. Concentración total de clorofila en el cultivo heterotrófico.....	29
Figura 10. Concentración total de clorofila en el cultivo mixotrófico.	30
Figura 11. Concentración de nitrato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo fotoautotrófico.	30
Figura 12. Concentración de nitrato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo heterotrófico.	31
Figura 13. Concentración de nitrato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo mixotrófico.	31
Figura 14. Concentración de fosfato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo fotoautotrófico.	33
Figura 15. Concentración de fosfato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo heterotrófico.	33
Figura 16. Concentración de fosfato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo mixotrófico.....	34
Figura 17. Concentración de glucosa (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo heterotrófico.	35

Figura 18. Concentración de glucosa (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo mixotrófico.	35
Figura 19. Esquema de aprovechamiento de metabolitos (García-Cuadra, et al., 2012).	42

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares que se encuentran suspendidas en los cuerpos acuáticos siendo parte del plancton (Celekli, Özutürk y Kapi, 2014). Están presentes en ambientes salinos y de agua dulce. De las microalgas es posible obtener una diversidad de productos a partir de su biomasa, que en las últimas décadas han despertado el interés en investigación (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Estos microorganismos han sido difícil definir y clasificar, dado que presentan características de procariotas y eucariotas, así como de células vegetales (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). En general las clorofitas o microalgas verdes, son microorganismos fotosintéticos que crecen bajo condiciones fotoautotróficas donde su fuente de carbono es de origen inorgánico (CO_2 disperso en el medio principalmente) y obtienen su energía a través de la absorción de energía luminosa (fotosíntesis) para reducir y oxidar el carbono. Durante este proceso las microalgas sintetizan carbohidratos y liberan oxígeno (Sandoval, Flores, Narváez y López-Villada, 2015). En condiciones naturales estas microalgas crecen en competencia por nutrientes esenciales (Nitrógeno, Fosforo, Carbono, entre otros) con microbiota adaptada también a las mismas condiciones nutricionales. Por otro lado, de acuerdo a su especie, las microalgas tienen la capacidad de crecer bajo condiciones mixotróficas que igual a las fotoautotróficas, realizan fotosíntesis y al mismo tiempo aprovechan carbono orgánico; o heterótroficas, donde la fuente de carbono es solamente de origen orgánico y no realizan fotosíntesis. Otros factores para su crecimiento son las condiciones ambientales, como temperatura, turbidez del medio e intensidad luminosa.

La investigación referente a las microalgas es muy amplia, debido a que se busca aprovechar sus características bioquímicas y fisiológicas para su aplicación en biotecnología ambiental e industrial. Los primeros estudios se enfocaron en la

ficorremediación, que consiste en la eliminación, absorción o biotransformación de contaminantes de ambientes líquidos y gaseosos (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). A esto le siguieron estudios, para la producción de alimento para acuicultura y ganado. Posteriormente surgió el interés en la producción de lípidos para la generación de biocombustibles, sin embargo, esta aplicación no ha prosperado debido a la baja rentabilidad en comparación con el uso de los combustibles fósiles (Patidar, *et al.*, 2015). Actualmente la gran mayoría de las investigaciones se enfocan principalmente en el desarrollo de suplementos alimenticios para el consumo humano, debido a las propiedades nutricionales que puede aportar. Del mismo modo, se estima que el uso de microalgas para la producción de proteínas recombinantes a costos accesibles es una nueva área de investigación (Bernaerts, *et al.*, 2017).

Este trabajo forma parte de un proyecto macro en donde se estudiará el empleo de consorcios de microalgas, adaptadas a la región bajío, en la producción de biomasa aprovechable en la generación de biofertilizante para uso agrícola. Empleando para su cultivo efluentes residuales de la industria de productos lácteos, donde se buscará aprovechar su carga orgánica y su concentración de nutrientes. El consorcio de microalgas empleado en este trabajo fue aislado de la Presa de Neutla, Municipio de Comonfort, Gto, en el bajío mexicano.

De forma concreta en el presente trabajo se analizó un consorcio de microalgas aisladas de un cuerpo de agua de la región, cultivado bajo tres diferentes condiciones nutricionales: fotoautotrófica, heterotrófica y mixotrófica. En este consorcio se analizó la funcionalidad y requerimientos nutricionales, así como la producción de lípidos y proteínas, que permitan evaluar su potencial como fuente de materias primas aprovechables en el desarrollo de biofertilizantes.

1.1 Justificación

La región bajío, es una zona predominantemente agrícola, formando parte del corredor industrial biotecnológico de México. Debido a estas dos actividades económicas productivas resulta de gran interés el desarrollo de insumos sustentables que brinden apoyo a la actividad agrícola como los biofertilizantes. Una alternativa para la obtención de estos insumos es el aprovechamiento del material biológico disponible en la región. En la región bajío existen cuerpos de agua que albergan especies de microalgas que pueden ser la alternativa para la obtención de estos insumos. Por lo tanto, es necesario analizar las condiciones de crecimiento de consorcios de microalgas adaptadas a la región, colectadas de cuerpos de agua y propagadas en condiciones de laboratorio, que puedan tener potencial como materia prima para la elaboración de biofertilizante.

En consecuencia es importante analizar inicialmente las condiciones operacionales y nutricionales que favorezcan el crecimiento y la acumulación de lípidos y/o proteínas que potencialicen a las microalgas como fuentes alternas, atractivas y sustentables para la obtención de biomasa aprovechable en fines biotecnológicos.

1.2 Hipótesis

El consorcio de microalgas en condiciones nutricionales controladas, fotoautotrófico, heterotrófico y mixotrófico favorecen la producción de clorofila, lípidos y/o proteínas haciendo la biomasa potencialmente útil como materia prima para fines biotecnológicos.

1.3 Objetivos

General:

Determinar las condiciones de cultivo fotoautotróficas, heterotróficas y/o mixotróficas en un consorcio de microalgas aislado de un cuerpo de agua de la región Bajío que favorezcan la acumulación de lípidos y proteínas.

Específicos:

Determinar parámetros de crecimiento de las microalgas cultivadas bajo las tres diferentes condiciones nutricionales y de cultivo.

Determinar la producción de proteína y lípidos como indicadores de biomasa potencialmente útil como materia prima para la formulación insumos agrícolas.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Origen: Microalgas

Las microalgas fueron estudiadas por primera vez a mediados del siglo XIX y tomaron popularidad a principios del siglo XX. Los pioneros en el estudio de las microalgas fue Cohn en 1850 que realizó cultivos in situ de *Haemantococcus pluvialis* y Famintzin en 1871 cultivo *Chlorococcum infusionum* y *Protococcus viridis* en un medio inorgánico simple (Borowitzka, 2013). De sus primeras aplicaciones fue el tratamiento de aguas residuales, conocida como ficorremediación (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

Debido a su ubicuidad las microalgas pueden crecer en distintas condiciones y ambientes, la gran mayoría de estas son fotoautotróficas lo que significa que toman la energía luminosa y se desarrollan a partir de materia inorgánica presente en el medio. Algunas especies de microalgas pueden cultivarse en condiciones heterótrofas ya que en ausencia de luz tienen la capacidad de desarrollarse obteniendo el carbono de compuestos orgánicos presentes en su ambiente. Y por último existen microalgas que pueden aprovechar la luz para realizar la fotosíntesis y al mismo tiempo tomar carbono orgánico para su desarrollo, a este tipo se le llama mixotróficas (Moon, *et al.*, 2013). Cada especie de microalga tiene sus condiciones óptimas de crecimiento, de manera que si se va a analizar el crecimiento de un consorcio de microalgas bajo una condición específica, algunas especies se verán más favorecidas que otras (Moon, *et al.*, 2013).

Las microalgas pueden sobrevivir en condiciones aisladas o en colonias en forma de agregados celulares (Çelekli, *et al.*, 2014). Se han encontrado aproximadamente treinta mil especies, que tienen formas esféricas, elípticas, cilíndricas o en espiral. Las microalgas contribuyen de manera activa con el balance del oxígeno en la biósfera ya que representan alrededor del 50 % del oxígeno liberado a través de la fotosíntesis (Perrine, Negi y Sayre, 2012). De igual manera, forman parte de la base

de la cadena alimenticia global, con alrededor del 70 % de la producción total de materia orgánica (Perrine, *et al.*, 2012).

2.2 Composición de la microalga

La composición en proteínas, lípidos y carbohidratos puede cambiar dependiendo de la especie, las condiciones nutrimentales y de cultivo. En la Tabla 1 se muestra la composición típica para algunas especies de microalgas.

Tabla 1. Composición típica de algunos tipos de microalgas (Becker, 1994).

Microalga	Proteínas %	Carbohidratos %
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64
<i>Dunaliella salina</i>	57	32
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30

2.3 Condiciones de cultivo

Las microalgas se desarrollan en ambientes acuáticos ya sean marinos o de agua dulce (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Cuando son colectadas de sus ambientes naturales y adaptadas a condiciones de laboratorio, se requiere para su óptimo crecimiento y mantenimiento, ciertas necesidades nutricionales y ambientales

(Camacho-Rodríguez, Cerón-García, Fernández-Sevilla y Molina-Grima, 2015), (Barsanti y Gualtieri, 2010, p. 209) entre las que se destacan:

- **Temperatura.** Para tener un buen crecimiento celular se requiere una temperatura estable y constante. Se ha observado que la mayoría de las microalgas pueden cultivarse a temperaturas entre los 15 °C y 35 °C, siendo la temperatura óptima entre 20 °C y 25 °C.
- **pH.** Para la gran mayoría de microalgas se requiere un ambiente neutro o ligeramente alcalino de 7 a 9 de potencial de hidrónes, siendo la condición óptima entre 8.2 y 8.7. Esta condición puede ajustarse utilizando ácidos como el ácido sulfúrico o bases como el hidróxido de sodio.
- **Mezclado.** El mezclado es necesario para mantener homogéneo el medio y garantizar la disponibilidad de los nutrientes en toda la geometría del sistema de cultivo. Una manera de mantener el sistema de cultivo mezclado mediante aireación, además una aireación constante pone disponible el CO₂ ambiental el cual es utilizado para fotosíntesis.
- **Iluminación.** La iluminación es necesaria en la fotosíntesis, en cultivos fotoautotróficos y mixotróficos. Esta debe estar distribuida en toda la superficie. Se considera que para un óptimo crecimiento la intensidad luminosa debe estar entre 2500 a 3000 luxes.
- **El fotoperiodo necesario para el adecuado crecimiento,** este suele estar entre un máximo de 16 h luz-8 de oscuridad o intervalos más utilizados como 14:10 o 12:12, luz y oscuridad respectivamente.
- **Medios de cultivo minerales.** Los requerimientos nutricionales para el buen crecimiento incluyen macronutrientes (como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre, magnesio, hierro, sodio) y micronutrientes (boro, manganeso, zinc, molibdeno, cobre, cobalto). Estos son proporcionados por sales minerales en disolución acuosa. Existe una gran diversidad de medios de cultivo, algunos muy específicos para ciertos tipos de microalgas (medio Zarrouk para cianobacterias, medio para diatomeas) y otros de uso común

para muchas microalgas verdes (medio de cultivo para cianobacterias BG11 (Allen y Stanier, 1967), BBM, f/2, solo por mencionar algunos).

- Carbono orgánico. Sólo bajo ciertas condiciones de cultivo se emplean fuentes de carbono que pueden ser ácidos (cítrico, glutámico, nitrilo acético), vitaminas (H, B1, B12), monosacáridos (glucosa) u otros compuestos que han probado su eficiencia en cultivos mixotróficos (glicerol).

2.4 Sistemas de cultivo.

En laboratorio las microalgas se cultivan en fotobiorreactores o fermentadores (en el caso de cultivos heterotróficos) específicos operados bajo condiciones controladas. Los fotobiorreactores más utilizados son reactores completamente agitados, de placa plana, tubulares, columnas de burbujeo y quimiostato. Estos tienen como principal función la preservación, adaptación y propagación de inóculo (Camacho-Rodríguez, *et al.*, 2015).

A nivel de planta piloto y producción a gran escala se emplean principalmente 3 tipos de reactores, lagunas de alta tasa de oxidación o riceways, biorreactores de película fina o thinlayer y tubulares. Los 2 primeros son reactores abiertos, es decir, que están expuestos a las condiciones ambientales, mientras que los últimos operan en condiciones asépticas y controladas, utilizados principalmente en la producción de inóculo.



Figura 1. Reactores: Riceway, Thin Layer y Tubulares.

2.5 Beneficios y aplicaciones industriales

Desde las primeras investigaciones sobre microalgas, se ha buscado el aprovechamiento de la biomasa para la obtención de productos de alto valor

agregado. Al inicio de la llamada revolución verde y la influencia política de los países desarrollados por el cuidado del medio ambiente, se implementaron programas para el tratamiento de aguas residuales, adsorción de metales pesados, y el uso de energías renovables. En este último punto, los lípidos acumulados en la biomasa son aprovechados para la producción de combustibles mediante la transesterificación (Lai, *et al.*, 2016). Empresas con proyecciones redituables y un perfil más comercial se han enfocado en la obtención de pigmentos de alta calidad para la elaboración de cosméticos (Ariede, *et al.*, 2017). Esto debido a que algunas especies de microalgas tienen la capacidad de acumular carotenoides bajo condiciones de estrés nutricional y elevada intensidad luminosa. Debido a su alto contenido de proteínas y lípidos, las microalgas han sido utilizadas como alimento animal. Inclusive, en los últimos años se ha incrementado el uso de microalgas para el consumo humano, como suplemento alimenticio (ChyiWuang, Khin, Chua y Luo, 2016).

En uso agrícola se ha observado que la biomasa de microalgas contiene un alto contenido de nitrógeno lo que la convierte en un biofertilizante de bajo costo y de potencial aplicación (ChyiWuang, *et al.*, 2016). En investigación médica se han estudiado microalgas de la especie *Chlorella sp* en la obtención de proteínas recombinantes con tratamientos genéticos (Zedler, Mullineaux y Robinson, 2016). Esta es una línea de investigación reciente que tiene expectativas muy altas, además de una rentabilidad favorable ya que son productos de alto valor agregado para consumo humano.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Colecta de material biológico.

En la región cercana al municipio de Celaya, se encuentran las presas de San Miguel Allende, Neutla, San Pedro, Jalpa, la presita, Mandujanos y del Cubo, de entre las cuales se optó por la Presa de Neutla ubicada en Comonfort, Guanajuato, México debido a su cercanía, accesibilidad y dimensión. Las microalgas se encuentran fácilmente en los cuerpos de agua de baja movilidad. En el municipio de Comonfort, Gto., se encuentra ubicada la Presa de Neutla, la cual comprende una superficie de 2012.45 hectáreas, con capacidad máxima de 5 millones de metros cúbicos. La zona presenta un clima cálido con una gran variedad de flora y fauna (Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, 2017). El principal uso de los efluentes de la presa ha sido el riego agrícola y también ha servido como contención en época de lluvias. El Instituto de Ecología del estado de Guanajuato y el comité técnico de área natural protegida y su zona de influencia tienen previsto para el año 2019, hacer de la presa un sitio natural protegido como parque ecoturístico con acceso limitado. Esto se llevará a cabo con programas de manejo y restauración del área natural y el aprovechamiento de los recursos (Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Guanajuato, 2009).

Se realizó la colecta de microalgas de la presa tomando aproximadamente 2L de agua como muestra inicial para el proceso de adaptación y proliferación. En su ambiente natural este consorcio de microalgas ha crecido en aguas lénticas, como lo es la Presa de Neutla, que no tiene un movimiento continuo y la disponibilidad de nutrientes es baja.



Figura 2. Área natural protegida de la presa de Neutla y sus límites territoriales (Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato, 2017).

3.2 Adaptación.

El consorcio de microalgas se mantuvo bajo condiciones controladas durante todo el proceso. Inicialmente se tomaron alícuotas de 100 mL del inóculo inicial y se transfirieron a 400 mL de medio de cultivo BBM-3N rico en sales y minerales (Barsanti y Gualtieri, 2010, p. 209). Para favorecer el crecimiento del consorcio el BBM se modificó adicionando tres veces la parte unitaria de NaNO_3 . En la Tabla 2 se muestra la composición del medio empleado. Las condiciones de crecimiento en el periodo de adaptación del consorcio fueron: temperatura ambiente (25°C), pH inicial (7.0), aireación permanente con 0.03 vvm de aire ambiental, iluminación a 3000 luxes de luz LED y fotoperiodo de 16h luz, 8h oscuridad (Barsanti y Gualtieri, 2010, p. 209).

Durante la adaptación y la experimentación, la aireación fue suministrada mediante bombas, por tubería flexible de silicón transparente. La aireación se mantuvo durante todo el crecimiento para mantener homogéneo el cultivo, dejando disponible los nutrientes y ofreciendo el CO_2 ambiental para los procesos metabólicos.

El proceso de adaptación del consorcio de microalgas llevó al menos tres meses, tiempo durante el cual se realizaban resiembras periódicas cada 15 días.

3.3 Identificación morfológica.

Una vez adaptado el consorcio se pudo identificar morfológicamente algunos géneros y especies de microalgas (Tabla 3). La identificación se realizó por observación en microscopio óptico CarlZeiss, comparando la morfología con

microalgas de la colección de cultivos de la Universidad de Texas (UTEX), la cual es la más extensa a nivel mundial.

Tabla 2. Composición del medio BBM (Barsanti y Gualtieri, 2010, p.209).

Reactivos	Por litro
KH ₂ PO ₄	175 mg
CaCl ₂ *2H ₂ O	25 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	75 mg
NaNO ₃	250 mg
K ₂ HPO ₄	75 mg
NaCl	25 mg
H ₃ BO ₃	11.42 mg
Solución Stock de Microelementos	
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8.82g
MnCl ₂ *4H ₂ O	1.44g
MoO ₃	0.71g
CuSO ₄ *5H ₂ O	1.57g
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0.49g
Solución 1	
Na ₂ EDTA	50g
KOH	3.1g
Solución 2	
FeSO ₄	4.98g
H ₂ SO ₄ (Conc.)	1ml

3.4 Condiciones experimentales

Durante la experimentación se analizaron 3 tipos de crecimiento de acuerdo a su condición nutricional: fotoautotrófico, heterotrófico y mixotrófico. A continuación, se describen cada una de las condiciones mencionadas:

3.4.1 Fotoautotrófico.

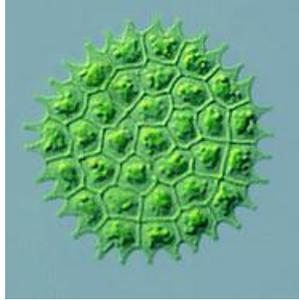
- Medio de cultivo BBM 3N. Reactores agitados en frascos Schott transparentes de 1 L de capacidad, inoculados al 20 % (v/v), con un volumen de trabajo de 500 mL.
- Muestreo diario, se tomaban alícuotas de 18 mL para determinar parámetros de crecimiento y muestreo cada 48 h para consumo de nutrientes.

- Iluminación de 3000 luxes de luz LED en un fotoperiodo de 16 h de luz (de 6 a 22 h) y 8 h de oscuridad 8 (de 22 a 6 h).
- Aireación constante a 0.03 vvm durante todo el periodo experimental. suministrada mediante bombas por tubería flexible de silicón transparente.
- Temperatura constante de 25 °C y un pH inicial de 7.5.

Tabla 3. Especies de microalgas identificadas morfológicamente presentes en el consorcio estudiado.

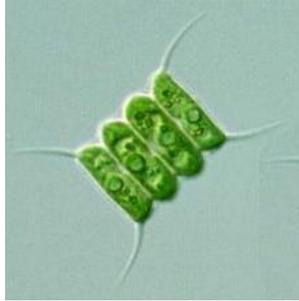
Microalga	Imagen ilustrativa	Descripción
<i>Chlorella sp.</i>		Esferas individuales de 2 a 10 micras de tamaño, de color verde y no presentan flagelo.
<i>Chlamydomonas sp.</i>		Esferas de gran tamaño, flageladas con una mancha ocular grande, su desplazamiento es rápido.
<i>Closteriosis sp</i>		Microalga con forma romboidal, alargadas y no presentan mucha movilidad. En general son verdes pero hay géneros de la misma especie que son pardas.

***Pediastrum
dúplex***



Conjunto de microalgas en forma circular con picos en los extremos los cuales le sirven para la movilidad.

***Scenedesmus
sp***



Microalgas en forma de ovoide que se pueden encontrar como células individuales o en conjunto de hasta 4 células unidas.

Schroederia sp.



Microalga en forma de S de gran movilidad, su estructura funciona como un flajelo.

Spirulina sp.



Conjunto de microalgas que forman un organismo de gran tamaño en forma de espiral, tiene una gran movilidad.

3.4.2 Heterotrófico.

- Medio de cultivo BBM 3N, adicionado con glucosa a una concentración de 15 g/L (Xu, Miao y Wu, 2006). El sistema de reacción empleado en este tipo de crecimiento fueron frascos Schott ámbar de 1 L de capacidad, inoculados al 20 % (v/v), con un volumen de trabajo de 500 mL.

- Muestreo diario, se tomaban alícuotas de 18 mL para determinar parámetros de crecimiento y muestreo cada 48 h para consumo de nutrientes.
- Agitación constante en placas de agitación orbital, a una velocidad de 120 rpm, manteniéndose una temperatura de 25 °C y pH inicial de 7.5.

3.4.3 Mixotrófico.

- Medio de cultivo BBM 3N, adicionado con glucosa a una concentración de 15 g/L (Xu, *et al.*, 2006). El sistema de reacción empleado en este tipo de crecimiento fueron frascos Schott transparentes de 1 L de capacidad, inoculados al 20 % (v/v), con un volumen de trabajo de 500 mL.
- Muestreo diario, se tomaban alícuotas de 18 mL para determinar parámetros de crecimiento y muestreo cada 48 h para consumo de nutrientes.
- Iluminación de 3000 luxes de luz LED en un fotoperiodo de 16 h de luz (de 6 a 22 h) y 8 h de oscuridad 8 (de 22 a 6 h).
- Aireación constante a 0.03 vvm durante todo el periodo experimental. suministrada mediante bombas por tubería flexible de silicón transparente.
- Temperatura constante de 25 °C y un pH inicial de 7.5.

3.5 Parámetros de análisis

Durante todo el periodo de adaptación y experimento se midieron diferentes parámetros para registrar el crecimiento del consorcio bajo las 3 condiciones experimentales analizadas. Se determinó producción de biomasa, concentración de clorofila, concentración de fosfatos, nitratos y carbohidratos en el medio, además del monitoreo del pH. Por otro lado, al finalizar el experimento se determinó el contenido de proteínas y lípidos en la biomasa colectada. El experimento tuvo una duración de 13 días, ya que durante la adaptación del consorcio se observó que las microalgas presentaban su máximo crecimiento entre el día 10 y el día 13.

Cada una de las condiciones de cultivo se analizó por triplicado (fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico), teniendo así un total de 9. El volumen de la alícuota que se tomaba de cada cultivo fue de 18 mL. Este se dividió para la medición de los parámetros de crecimiento y concentración de nutrientes.

- Con el volumen total se realizó la medición del pH.
- Se tomó 1.5 mL para medir la densidad celular mediante espectrofotometría. Posteriormente se empleó en la determinación de nitratos.
- 5 mL se emplearon para la cuantificación de clorofila.
- 10 mL se usaron en la determinación de fosfatos.
- Finalmente 1 mL para la determinación de carbohidratos.

3.5.1 Análisis de correlación concentración de biomasa-absorbancia.

Para realizar la curva de calibración, fue necesario mantener filtros de fibra de vidrio a peso constante. Los filtros son colocados en cajas Petri de vidrio, y estas a su vez colocadas en el horno de secado a 80 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, las cajas se colocaban en un desecador durante 20 minutos. Posteriormente las cajas fueron pesadas y colocadas nuevamente en el horno a la misma temperatura durante 30 minutos, para después volver a ser pesadas. Este procedimiento se repitió hasta que los pesos de las cajas no mostraron ninguna variación.

Se procedió a realizar diluciones de un cultivo del consorcio de microalgas que estaba en su crecimiento máximo. En la Tabla 4 se muestran las diluciones del cultivo empleadas en la elaboración de la curva de calibración.

Tabla 4. Diluciones para la curva de calibración Biomasa vs Absorbancia.

Dilución	Volumen de cultivo (mL)	Volumen de agua (mL)
10:0	10	0
9:1	9	1
8:2	8	2
7:3	7	3
6:4	6	4
5:5	5	5
4:6	4	6
3:7	3	7
2:8	2	8
1:9	1	9

Se midió la absorbancia a 680 nm en espectrofotómetro usando como blanco agua destilada. Posteriormente las diluciones preparadas (Tabla 4) se filtraron al vacío usando los filtros a peso constante previamente preparados.

La biomasa colectada en cada filtro se secó en el horno a 80 °C y se llevó hasta peso constante. Las curvas de calibración fueron realizadas por duplicado. Los resultados de peso seco y las mediciones de absorbancia fueron correlacionados mediante regresión lineal, obteniéndose de esta manera la curva de calibración.

3.5.2 Cinética de crecimiento

3 mL de cultivo de cada uno de los tratamientos y se midió su absorbancia a 680 nm en el espectrofotómetro HACH DR 3900 usando como blanco agua destilada (Perales-Vargas-Machuca, Arbib y García-Gozalbes, 2015).

3.5.3 Clorofilas Totales

El contenido de clorofila total (Chl-a + Chl-b) se determinó mediante espectrofotometría. Estos dos tipos de clorofilas son los que se encuentran predominantes en las microalgas verdes (Ritchie, 2006). 1.5 mL de muestra en un tubo Ependorf y se centrifugaron a 12000 rpm durante 12 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó 3 veces con agua destilada. En los lavados la pastilla del precipitado se resuspendió con agua destilada y se centrifugó nuevamente a 6000 rpm durante 6 minutos.

Al finalizar los lavados, la biomasa se resuspendió en 0.75 ml de metanol y se maceraban las muestras durante 24 horas a 4 °C. Después de la maceración la solución se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 12 minutos y del sobrenadante recuperando se determinó la absorbancia a 652 nm 665 nm (red de absorción para microalgas utilizando metanol como solvente). La concentración de Chl-a y Chl-b ($\mu\text{g}/\text{mL}$), se analizaron por triplicado. Las ecuaciones 1 y 2 se utilizaron para determinar la clorofila en microalgas usando metanol como solvente (Ritchie, 2006).

$$\text{Chl } a \approx -8.0962x_{A652} + 16.5169x_{A665}(\pm 0.04696 \mu\text{g} * \text{ml}^{-1}) \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Chl } b \approx 27.4405x_{A652} - 12.1688x_{A665}(\pm 0.05776 \mu\text{g} * \text{ml}^{-1}) \quad \text{Ec. (2)}$$

3.5.4 Consumo de Fosfatos

Para la determinación espectrofotométrica de fosfatos se empleó el kit de reactivos PhosVer3 distribuido por HACH, y el método *P. react. RA TNT*, precargado el espectrofotómetro HACH DR3900, que se aplica para concentraciones de fosfatos de alto rango. Este método mide la absorbancia a 420 nm. La descripción de los pasos de esta técnica es la siguiente (técnica modificada por Olguín, (Olguín, Sánchez-Galván, González-Portela, Pérez-Pérez y Hernández, 1989)):

1. Llenar una celda de prueba hasta la marca de 10 mL con la muestra y otra con el blanco (agua destilada).
2. Se adicionan a ambos el reactivo PhosVer3 y se agita vigorosamente.
3. Se deja reposar durante 2 minutos. Si el contenido de la celda se tiñe de azul es indicativo de la presencia de fosfato.
4. Finalmente se limpian las celdas y se mide la concentración de fosfato en mg/L $P-PO_4^{-3}$, de acuerdo al método *P. react. RA TNT* precargado en el espectrofotómetro HACH DR3900.

El consumo de fosfatos se evaluó como % de rendimiento de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Concentración inicial de fosfato} - \text{Concentración de fosfato en tiempo (t)}}{\text{Concentración inicial de fosfato}} \times 100 \text{Ec (3)}$$

3.5.5 Consumo de Nitratos

Para la determinación espectrofotométrica de nitrato se empleó el kit de reactivos NitraVerX distribuido por HACH, y el método *N, Nitrato RA TNT*, precargado el espectrofotómetro HACH DR3900, que se aplica para concentraciones de nitrato de alto rango. Este método mide la absorbancia a 410 nm. La descripción de los pasos de esta técnica es la siguiente (técnica modificada por Olguín, (Olguín, *et al.*, 1989)):

1. Para el blanco se utiliza un tubo del kit que contiene el NitraVerX Reactivo A y se adiciona 1 mL de agua desionizada para el blanco.
2. Para la lectura de las muestras se utiliza un segundo tubo como en el paso 1 y se le adiciona 1 mL de la muestra previamente filtrada.
3. A ambos tubos, del paso 1 y 2 se adiciona un sobre de NitraVerX Reactivo B. Los tubos se agitan 10 veces para un perfecto mezclado.

4. Posteriormente los tubos se dejan reposar durante 5 minutos, si el contenido del tubo se tiñe de amarillo es indicativo de la presencia de nitrato.
5. Finalmente se limpian los tubos y se mide la concentración de nitrato en mg/L NO₃-N, de acuerdo al método *N, Nitrato RA TNT* precargado en el espectrofotómetro HACH DR3900.

El consumo de nitratos se evaluó como % de rendimiento de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Concentración inicial de nitrato} - \text{Concentración de nitrato en tiempo (t)}}{\text{Concentración inicial de nitrato}} \times 100 \text{Ec (4)}$$

3.5.6 Determinación de glucosa

3.5.6.1 Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon 50 mL de una solución acuosa de glucosa anhidra a una concentración de 100 µg/mL. Se realizaron diluciones, mismas que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Solución madre para curva de calibración de glucosa.

Concentración de Glucosa (µg/mL)	Solución Madre (mL)	Agua Destilada (mL)
100	1.00	0.00
80	0.80	0.20
60	0.60	0.40
40	0.40	0.60
20	0.20	0.80
0	0.00	1.00

3.5.6.2 Concentración de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos se realizó en muestra previamente filtrada para descartar la biomasa sólida. De la muestra filtrada se tomaron alícuotas de 1 mL, se les añadió 1 mL de solución de fenol al 5 % y después 5 mL de ácido sulfúrico concentrado GR. Se mezclaron y se dejaron en reposo por 30 minutos. Por último, se midió la absorbancia a 488 nm (Olguín, *et al.*, 1989). Los datos obtenidos se correlacionan con la curva de calibración.

El consumo de glucosa se sevaluó como % de rendimiento de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Concentración inicial de glucosa} - \text{Concentración de glucosa en tiempo (t)}}{\text{Concentración inicial de glucosa}} \times 100 \text{Ec (5)}$$

3.5.7 Determinación de lípidos

Se utilizó el método de Bligh-Dyer (Feng, Li y Zhang, 2011), para calcular la concentración de lípidos en los cultivos de microalgas. Para lo cual se preparó una solución stock de una mezcla de cloroformo: metanol con una relación de 1:2 respectivamente.

1. Tubos de ensaye de 10 mL son colocados en un horno a 60 °C y se llevan a peso constante.
2. A cada tubo se añadió 1 mL de muestra y 3.75 de solución stock y se mezclaron durante 1 minuto.
3. Posteriormente se adicionaron 1.25 mL de cloroformo y se agitaron nuevamente durante 30 segundos.
4. Después se adicionaron 1.25 mL de agua destilada y se agitaron durante 30 segundos.
5. Las muestras se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm, posteriormente se recupera la fase de cloroformo ubicada en la parte inferior y se transfiere a tubos de ensaye a peso constante. Posteriormente el contenido de los tubos se seca en el horno a 60 °C y se llevan nuevamente a peso constante para aplicar la ecuación 6.

$$A(g/100g) = (Vt * P2)/(Va * P1) \quad \text{Ec. (6)}$$

Dónde:

A: Concentración en g/100g (%) de lípidos.

P1: Peso de la muestra.

P2: Peso lípidos secos.

Vt: Volumen total de cloroformo.

Va: Volumen de la alícuota de cloroformo.

3.5.8.- Determinación de Proteínas

Para la determinación de proteínas se aplicó el método de HACH, procedimiento con DR|2010 nitrógeno, Kjeldahl total con el reactivo de Nessler (Olguín, *et al.*, 1989).

1. Método espectrofotométrico a una longitud de onda $\lambda=460$ nm, utilizando el programa Nitrógeno TKN (150 mg/L).
2. En este método se debió utilizar toda la biomasa colectada de los cultivos en forma de biomasa seca, para lo cual se realizó lo siguiente:
 - 2.1 Se depositó todo el cultivo en tubos Falcon de 15 mL.
 - 2.2 El cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el precipitado.
 - 2.3 La biomasa se lavó 3 veces con agua destilada recuperándose por centrifugación como en el punto 2.2.
 - 2.4 La biomasa lavada se secó en el horno durante 24 horas a 80 °C.

3.5.8.1.- Digestión

1. Para la determinación de proteína la biomasa seca se debe digerir como se muestra a continuación. A la par de la digestión de la biomasa seca se debe digerir una cantidad igual de agua desionizada que representará el blanco. Aproximadamente de 0.25-0.5 g, como se muestra en las Tablas 6 y 7 (Instrument Manual HACH, 1999).
 - 1.1. Se transfirió la biomasa seca, previamente pesada, al digestor.
 - 1.2. Se añadió 4 mL de ácido sulfúrico.
 - 1.3. Se eleva la temperatura del digestor hasta 440 °C. En ese momento se coloca el digestor con la muestra en la plancha térmica.
 - 1.4. Se calentó la muestra por 4 minutos, hasta que alcance su punto de ebullición.
 - 1.5. Se añadió gota a gota 10 mL de peróxido de hidrógeno sin dejar secar la muestra.
 - 1.6. Después de que todo el peróxido haya sido añadido, se dejó en ebullición un minuto más.

- 1.7. Se dejó en reposo la muestra hasta una temperatura aproximada de 50 °C.
 - 1.8. La muestra digerida se diluyó hasta 100 mL con agua desionizada.
 - 1.9. Por último, si la muestra presenta turbidez se filtra.
- ➔ Posteriormente se continúa con el método TKN.

Tabla 6. Digestión, especificaciones según el tipo de muestra. (Instrument Manual HACH, 1999).

Muestra	Peso seco (g)	Vol. de ácido (mL)	Tiempo de precalentado (min.)	Vol. de peróxido (mL)
Tejido de Planta	0.25-0.50	4	4	10
Carne y ave	0.5	4	4	10
Fluidos fertilizantes	0.10-0.25	4	4	10
Alimentos y forraje	0.25	4	4	10
Leche	0.25-2.00	4	4	10
Cereal	0.25-0.50	4	4	10
Bebidas	≈ 5.00	4	1	10
Lodo mojado	<2.50	4	3-5	10+5
	<0.50 seco			
Agua residual	0.5	3	Reflujo	10+5
Soluciones de baño	0.30-10 mL	4	4	10
Aceite comestible	0.25-0.50	4-6	4	5+5
iones de resina	0.25	10-15	12	20
Suelo	0.25-0.50	6	4	10-20
Alcohol	0.25-0.50	6	4	20

3.5.8.2.- Determinación de nitrógeno total de Kjeldahl (TKN)

2. Se seleccionó el volumen de análisis apropiado de la muestra digerida (Tabla 6). Se colocó la misma cantidad seleccionada del blanco, ambos en probetas de 25 mL (2 mL de muestra).

3. Se agregó una gota de indicador para TKN a cada probeta. Luego se agregó gota a gota KOH 8.0N a cada probeta hasta que sea visible un color claramente azul.
4. Posteriormente se agregó KOH 1.0N gota a gota mezclando después de cada gota agregada, hasta que aparezca el primer color azul permanente.
5. Se llenó ambas probetas hasta la marca de 20 mL con agua desionizada. Se agregó 3 gotas de estabilizador mineral y mezclar. Después se agregó 3 gotas de agente dispersor de alcohol polivinílico a cada uno y mezclar.
6. Se aforó las probetas hasta 25 mL con agua desionizada. Se adicionó 1 mL de reactivo de Nessler a cada probeta y se mezcló.
7. En el espectrofotómetro HACH DR3900. Se mide la absorbancia en la muestra a una longitud de onda 460 nm.
8. Para el Análisis de los datos se aplica la siguiente ecuación (7):

$$\frac{A*75}{B*C} = \frac{mg}{kg} TKN$$

Ec. 7

Donde:

A= mg/L Lectura del espectrofotómetro.

B= g de la muestra digerida.

C= mL de volumen de análisis.

Tabla 7. Muestras secas. (Instrument Manual HACH, 1999).

Nitrógeno (mg/L)	esperado	Vol. de análisis (mL)
42-2200		10.0
106-5600		5.0
350-18000		2.0
1000-56000		1.0
42000-220000		0.5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Curvas de calibración

Para la utilización de los métodos espectrofotométricos se necesitó una correlación directa entre concentración de biomasa en g/L y la absorbancia a 680 nm. Se seleccionó dicha longitud de onda ya que previamente se realizó un barrido espectrofotométrico en el espectro visible y el cultivo mostró la mayor absorbancia a 680 nm. Siguiendo la metodología descrita en la metodología se obtuvo el ajuste lineal y la ecuación que se muestra en la Figura 3. En este caso se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) > 0.95 , lo que indica la dependencia lineal entre los dos parámetros y que se puede considerar adecuada que la determinación de biomasa por espectrofotometría.

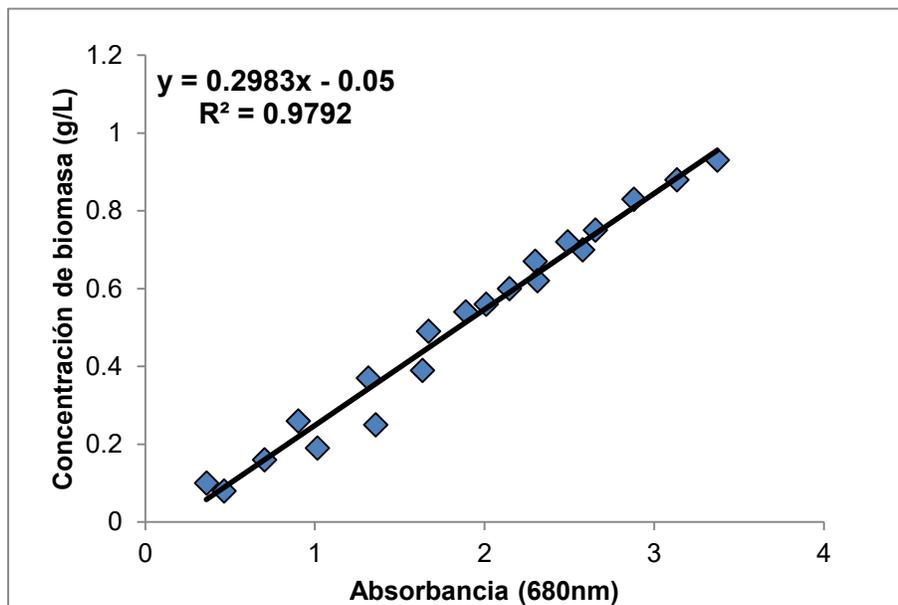


Figura 3. Curva de calibración concentración de biomasa-absorbancia en consorcio de microalgas analizado.

Para la curva de calibración de glucosa, la absorbancia fue medida a 540 nm y la concentración fue registrada en $\mu\text{g/mL}$, se siguió la técnica descrita con anterioridad

y se obtuvo el ajuste lineal y la ecuación correspondiente que se muestra en la Figura 4.

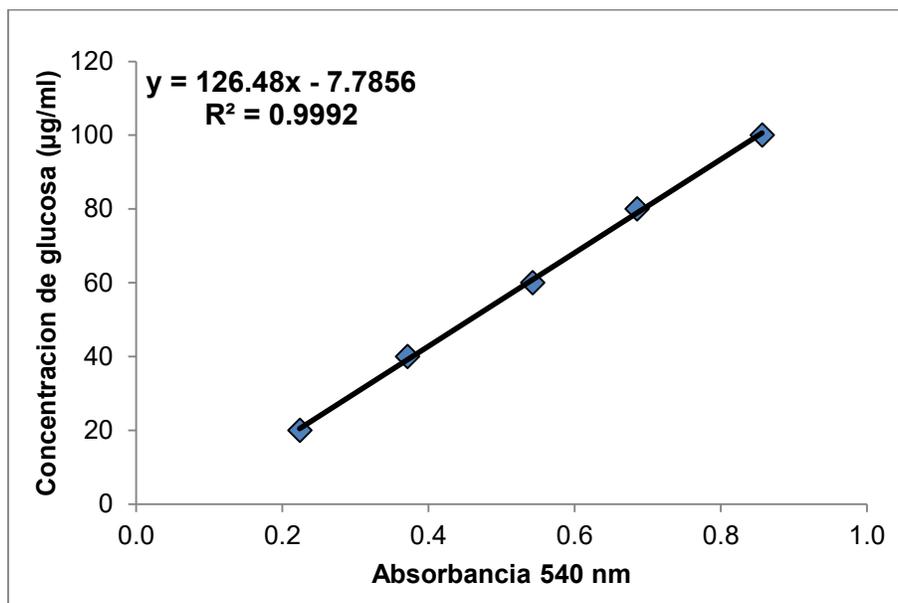


Figura 4: Curva de calibración concentración de glucosa-absorbancia.

Para el caso de la curva de calibración de glucosa se encontró un R^2 superior a 0.99 lo que asegura la certeza en la determinación de la glucosa por este método.

4.2 Parámetros analizados

4.2.1 Cinéticas de crecimiento del consorcio.

Las cinéticas de crecimiento se muestra en la Figura 5 para el cultivo fotoautotrófico, Figura 6 para el cultivo heterotrófico y Figura 7 para el cultivo mixotrófico.

Los valores máximos de biomasa que se obtuvieron fueron: 0.5740 g/L para el fotoautotrófico, 1.9888 g/L en el mixotrófico y 2.0687 g/L. en heterotrófico. El incremento en la producción de biomasa en cultivos heterotróficos y mixotróficos correspondiente a más de 3 veces que en el fotoautotrófico, puede ser atribuida a la capacidad del consorcio en aprovechar la glucosa como fuente de carbono. Además, posiblemente el CO_2 ambiental no fue suficiente para favorecer el crecimiento en los cultivos fotoautotróficos.

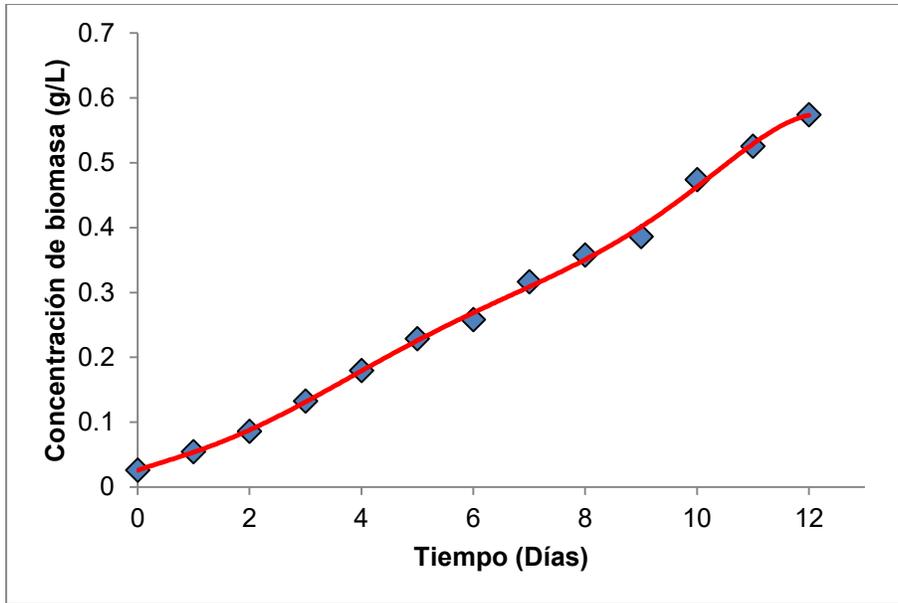


Figura 5. Cinética de crecimiento para el cultivo fotoautotrófico.

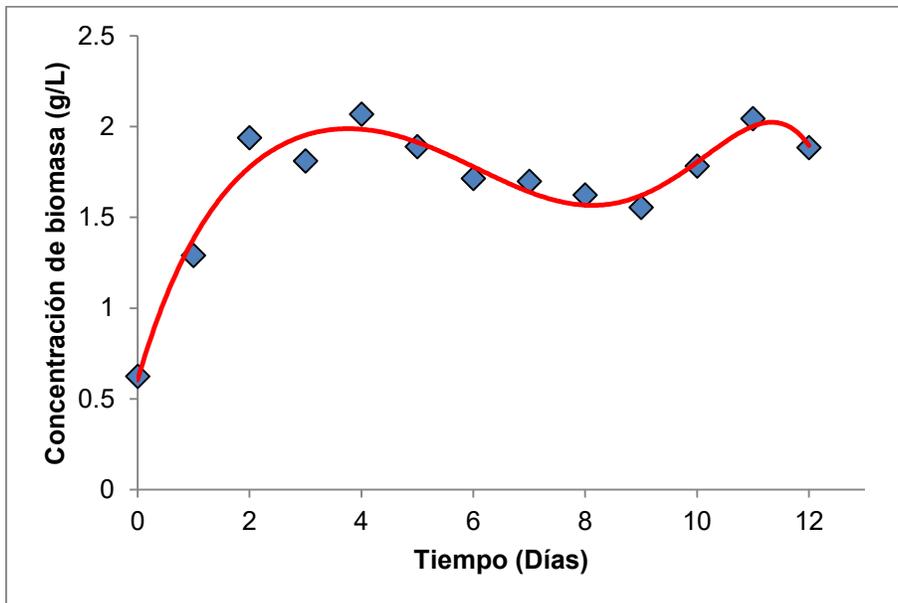


Figura 6. Cinética de crecimiento para el cultivo heterotrófico.

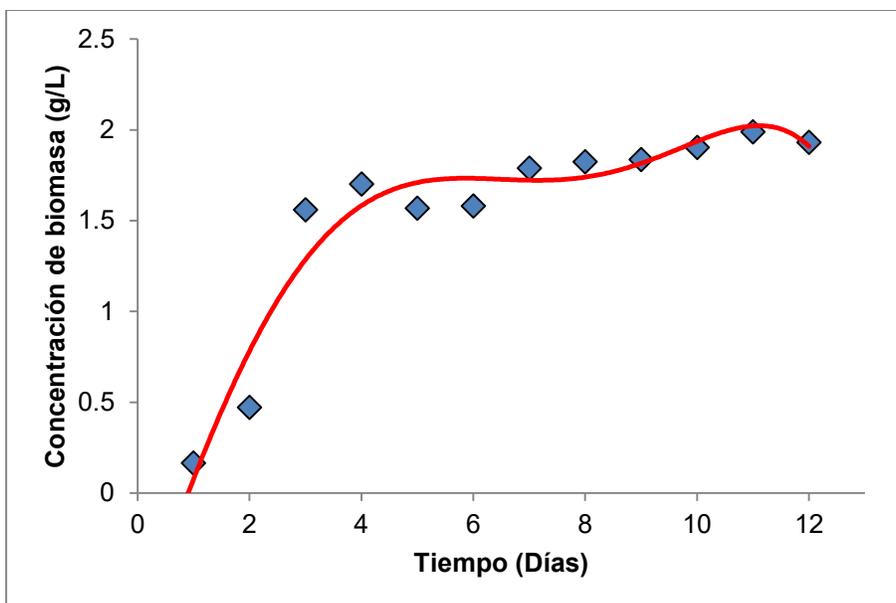


Figura 7. Cinética de crecimiento para el cultivo mixotrófico.

El cultivo fotoautotrófico, por otra parte, presentó un comportamiento lineal creciente, siendo que esto es poco común debido a que el crecimiento esperado en cultivos de microalgas es usualmente logístico con 3 fases claramente bien definidas, fase de adaptación, fase log (exponencial) y fase estacionaria (Moheimani, Borowitzka, Isdepsky y Fon-Sing, 2013).

4.2.2 Concentración total de clorofila.

La concentración total de clorofila (clorofila a y b, para el caso de microalgas verdes) está relacionada con la actividad fotosintética (Ritchie, 2006). El cultivo heterotrófico fue el que presentó la menor concentración de clorofila ($3.3564 \mu\text{g/mL}$, Figura 9), ya que en este cultivo se limitó la actividad fotosintética al mantenerlo en obscuridad total. Los cultivos heterotróficos en algunas especies de microalgas verdes como *G. sulphuraria* se han empleado para la producción de carotenoides y ácidos grasos poli-insaturados ya que bajo estas condiciones la capacidad fotosintética de la microalga disminuye y acumula estos metabolitos como respuesta a esta condición (Velea, Oancea y Fischer, 2017). Por su parte los cultivos fotoautotrófico y mixotrófico mostraron las mayores concentraciones $20.5450 \mu\text{g/mL}$ (Figura 8) y $13.5415 \mu\text{g/mL}$ (Figura 10) respectivamente. El cultivo fotoautotrófico presenta un comportamiento logístico observado ya en otras ocasiones por microalgas verdes y

cianobacterias a diferentes intensidades de luz y longitudes de onda (Chen, *et al.*, 2010). El cultivo mixotrófico, aunque presenta actividad fotosintética, corrobora que el consorcio tiene capacidad de aprovechar fuentes orgánicas e inorgánicas de carbono para su crecimiento (Chen, *et al.* 2010).

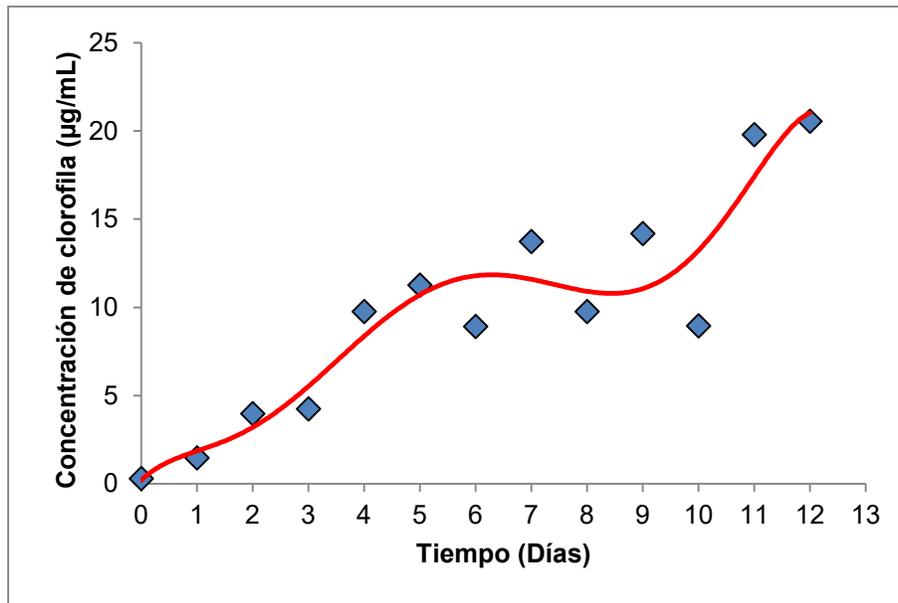


Figura 8: Concentración total de clorofila en el cultivo fotoautotrófico.

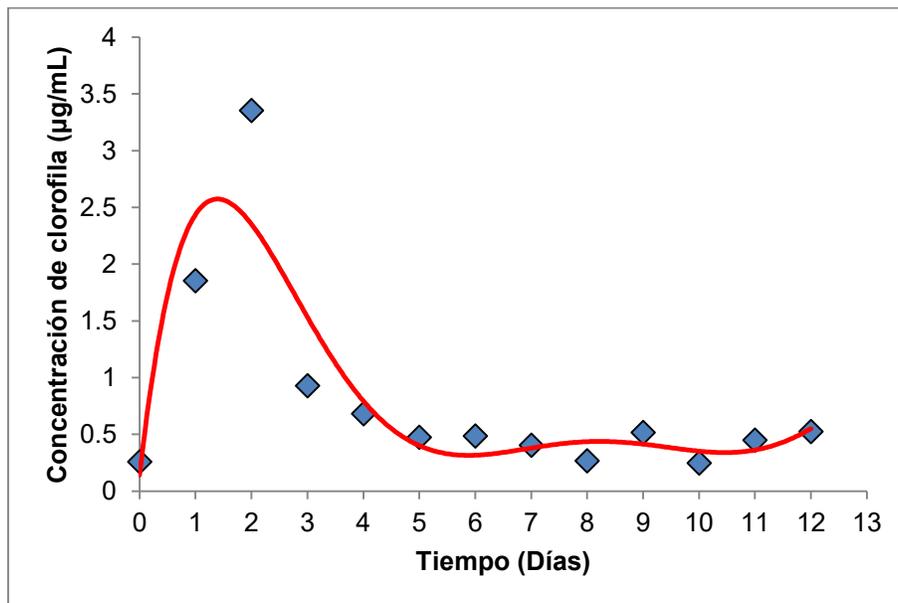


Figura 9. Concentración total de clorofila en el cultivo heterotrófico.

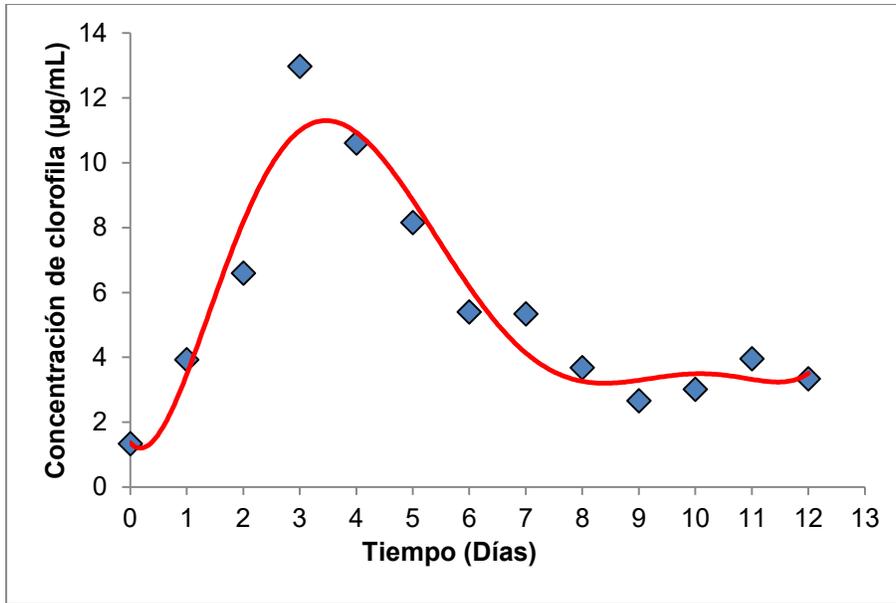


Figura 10. Concentración total de clorofila en el cultivo mixotrófico.

4.2.3 Consumo de Nitrato (N-NO_3^-).

Se muestran la concentración de nitrato y el rendimiento para los tres tipos de cultivos analizados, Figura 11 para el cultivo fotoautotrófico, Figura 12 para el cultivo heterotrófico y Figura 13 para el cultivo mixotrófico.

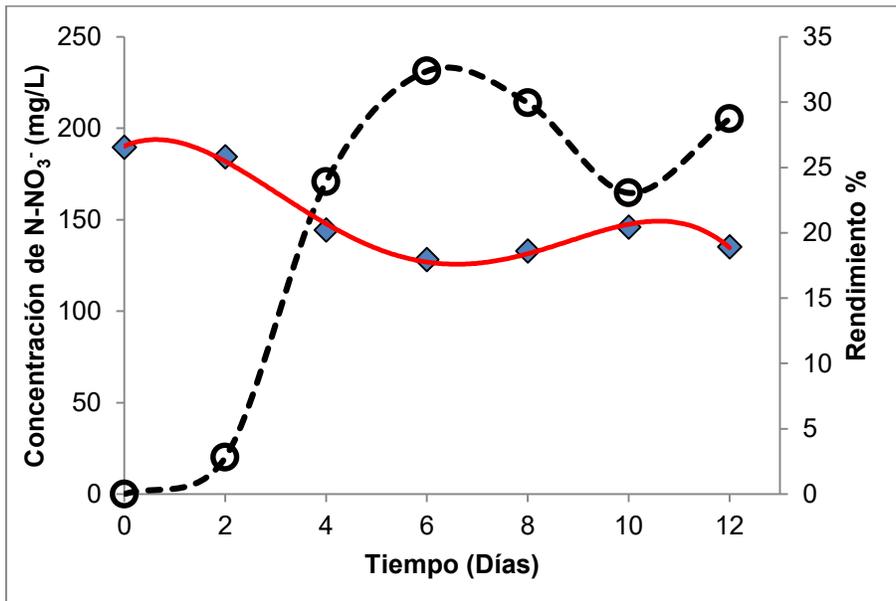


Figura 11. Concentración de nitrato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo fotoautotrófico.

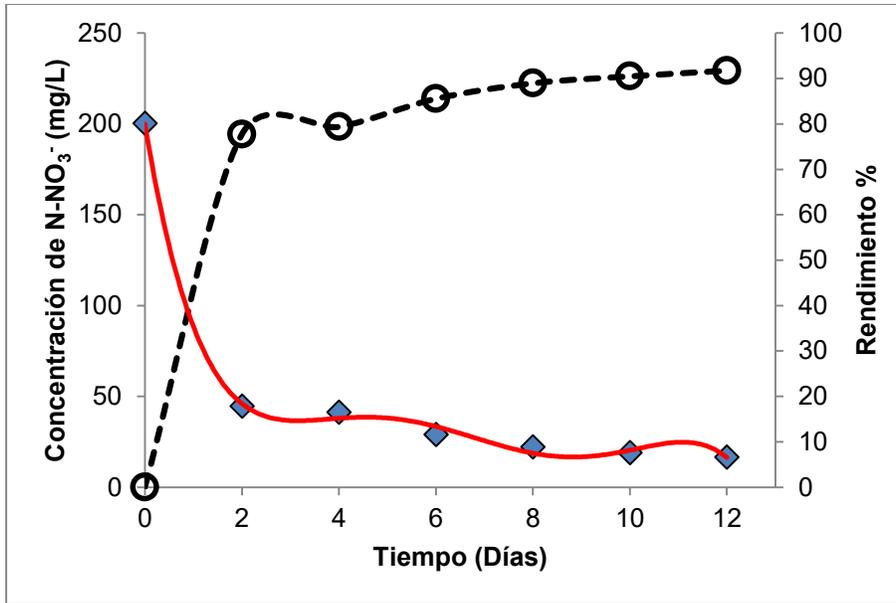


Figura 12. Concentración de nitrato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo heterotrófico.

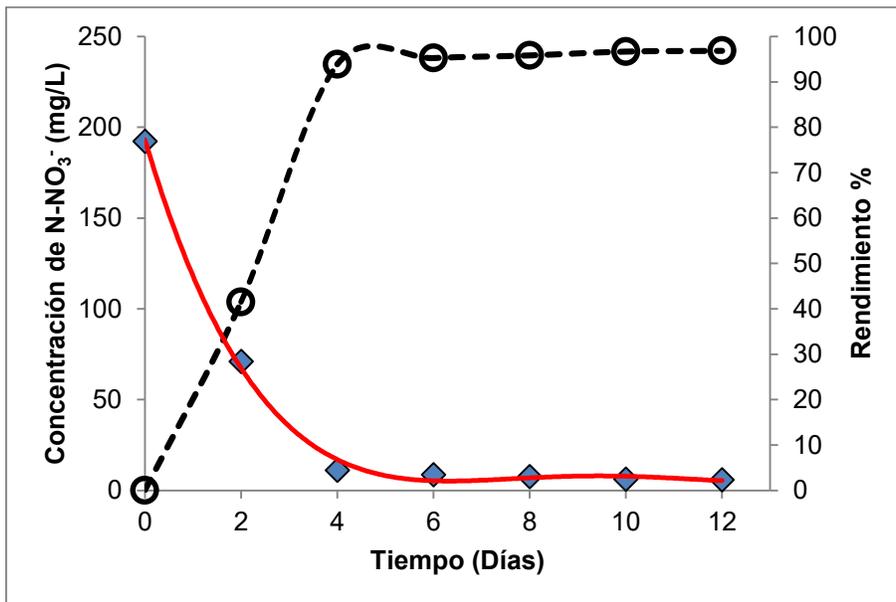


Figura 13: Concentración de nitrato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo mixotrófico.

La concentración inicial de nitrato en todos los cultivos fue aproximadamente de 200 mg/L. Los cultivos que generaron la mayor concentración de biomasa fueron los que tuvieron el mejor aprovechamiento de nitrato. Aunque el mixotrófico tuvo el mayor

rendimiento, 96.85 %, no existió mucha diferencia con el heterotrófico, 91.74 %. Por último, el bajo crecimiento que mostró el cultivo fotoautotrófico se ve reflejado en el bajo consumo de nitrato, con un rendimiento de 28.71 %. El nitrógeno al ser uno de los principales nutrientes de las microalgas, suele ser de rápida asimilación y aprovechamiento (Barsanti y Gualtieri, 2010, p. 199). De modo que bajo condiciones de crecimiento mixotrófico y heterotrófico los rendimientos pueden ser cercanos al 100 % (Olguín, *et al.*, 2015). La mayoría de las microalgas tienen la capacidad de asimilar fuentes amoniacales de nitrógeno, así como nitrato, siendo esta última la que representa mayor gasto energético para las microalgas. Sin embargo, el nitrógeno en forma amoniacal puede perderse en forma gaseosa (NH_3) en los cultivos debido a la agitación, limitando su aprovechamiento (Barsanti y Gualtieri, 2010, p. 209).

4.2.4 Consumo de Fosfato (P-PO_4^{3-}).

El consumo de fosfato y su rendimiento se muestra en la Figura 14, para cultivo fotoautotrófico, Figura 15 para heterotrófico y Figura 16 para mixotrófico.

Los tratamientos, heterotrófico y fotoautotrófico mostraron un consumo bajo de fosfato y su rendimiento no superó el 50 % en ninguno de los casos. El mejor aprovechamiento de fosfato para el crecimiento de las microalgas lo presentó el cultivo mixotrófico con un rendimiento superior al 75 %. Se ha observado en otras investigaciones que en cultivos fotoautotróficos se tienen menores rendimientos que en cultivos mixotróficos (Olguín, *et al.*, 2015). Cabe señalar que la técnica empleada es muy sensible, y cuestiones metodológicas como el uso de detergentes ricos en fosfato para la limpieza del material de laboratorio, puede resultar en falsos positivos en la medición (Instrument Manual HACH, 2017). Por lo tanto, los resultados de la determinación de fosfato se analizarán de manera detallada.

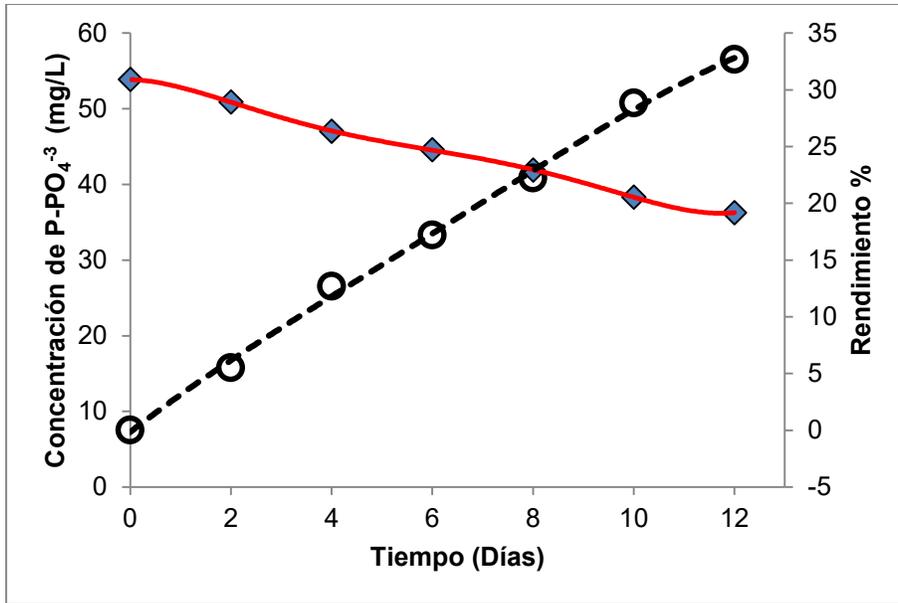


Figura 14. Concentración de fosfato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo fotoautotrófico.

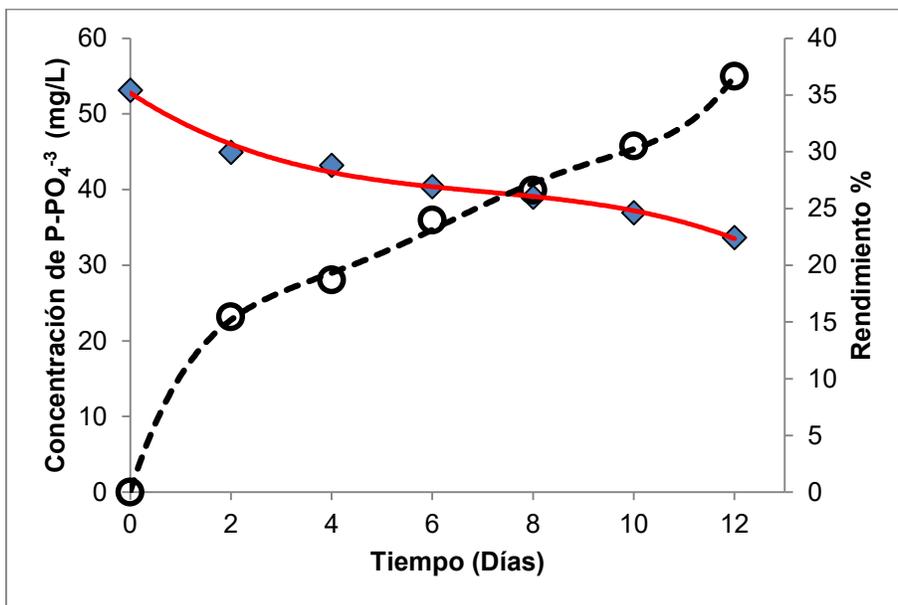


Figura 15: Concentración de fosfato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo heterotrófico.

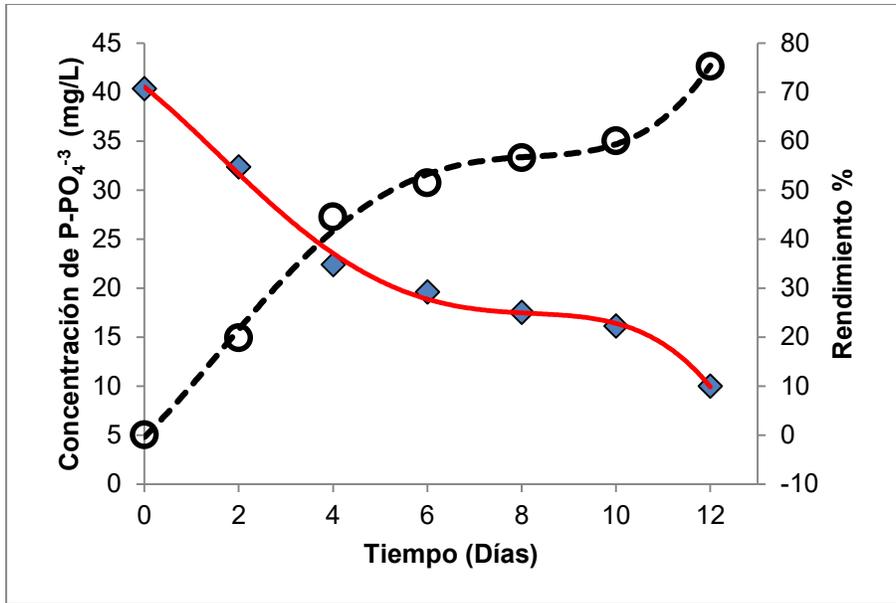


Figura 16. Concentración de fosfato (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo mixotrófico.

4.2.5 Consumo de Glucosa.

El consumo de glucosa y su rendimiento se muestra en la Figura 17, para el cultivo heterotrófico y Figura 18 para el mixotrófico. En los cultivos heterotrófico y mixotrófico se obtuvieron rendimientos de consumo de glucosa de 88.77 % y 94.79 % respectivamente. Esto nuevamente corrobora la capacidad del consorcio en aprovechar la glucosa presente en el medio para su desarrollo.

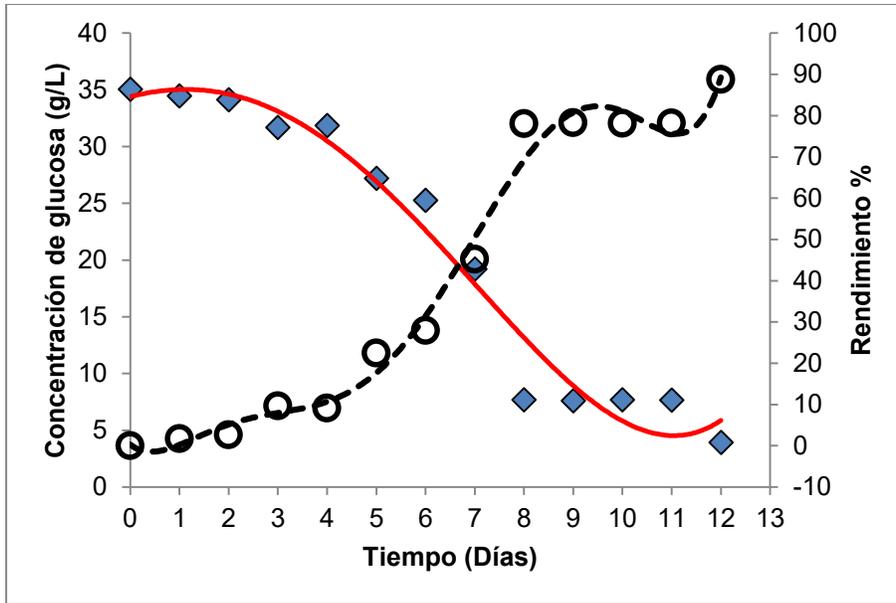


Figura 17. Concentración de glucosa (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo heterotrófico.

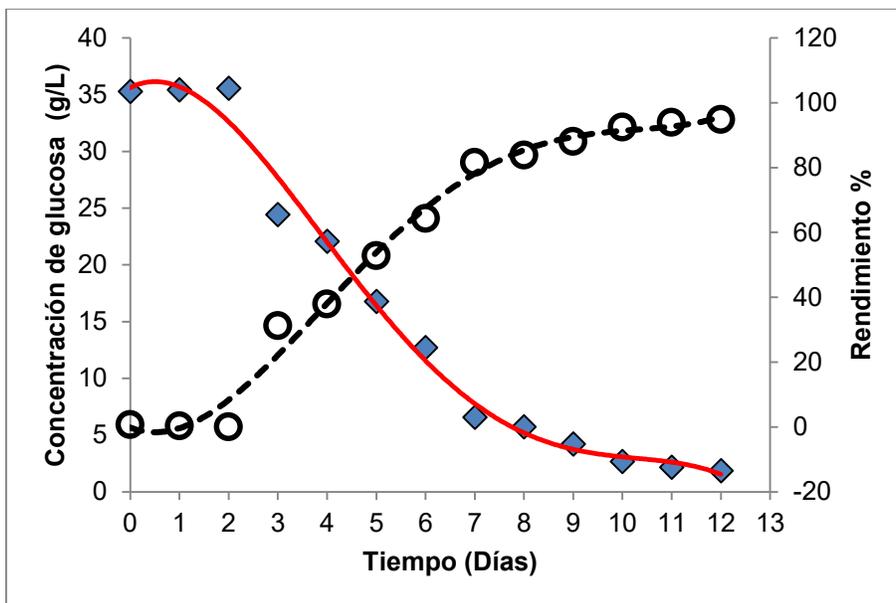


Figura 18. Concentración de glucosa (rombos y línea continua) y rendimiento (círculos y línea discontinua) en el cultivo mixotrófico.

Por otro lado, habrá que recordar que el consorcio proviene de una fuente natural y durante toda su adaptación, nunca se utilizó algún antibiótico para disminuir la población de bacterias presentes en el consorcio. De manera que, la fuente orgánica de carbono también beneficia el crecimiento de las bacterias presentes en ambos

cultivos. Sin embargo, este efecto no fue monitoreado, por no contar con una metodología adecuada para tal efecto. No obstante, de acuerdo a las observaciones periódicas al microscopio que se realizaban a los cultivos (cada 48 horas), era mayor la densidad celular de microalgas que de bacterias por lo que se infiere que el mayor consumo de glucosa se atribuye a las microalgas.

Se ha demostrado que el cultivo mixotrófico que cuenta con actividad fotosintética, consumo de carbono inorgánico y consumo de carbono orgánico, reduce los costos de producción de biomasa y genera crecimiento celular en altas cantidades, la única desventaja de este tratamiento es la baja producción de clorofila comparada con la presente en los cultivos fotoautotróficos (Velea, *et al.*, 2017), (García-Cuadra, Jawiarczyk, González-López, Fernández-Sevilla y Ación, 2012).

4.2.6 Acumulación de Lípidos.

La Tabla 8 muestra la producción de lípidos para los tratamientos analizados. Se observa que el consorcio cultivado de manera heterotrófica es el que acumuló la mayor cantidad de lípidos. La acumulación de lípidos en microalgas está acompañado de una deficiencia nutricional en el medio de cultivo, principalmente de nitrógeno (Chisti, 2007). En el caso del cultivo heterotrófico se observa que alcanza un rendimiento cercano al 90 % al día 8 (Figura 13). Sin embargo, esto no puede considerarse una condición de estrés nutricional como tal. Consideramos que la acumulación de lípidos en este cultivo puede ser un mecanismo de respuesta a la adaptación del consorcio al crecimiento en condición heterotrófica (en ausencia de luz). Ya que era la primera vez que el consorcio era sometido a esta condición nutricional. En el caso de los cultivos fotoautotróficos y mixotróficos no acumularon cantidades considerables de lípidos, posiblemente a que la adaptación en estos medios no ocasionó estrés en las microalgas (Velea, *et al.*, 2017). Cabe señalar que desde la colecta del consorcio, las microalgas se mantuvieron en condición fotoautotrófica, en el mismo medio de cultivo que se utilizó en el experimento.

Tabla 8. Concentración de Lípidos en los tratamientos analizados.

	% Lípidos
Fototrófico	3.7641±1.19
Heterotrófico	40.6621±8.91
Mixotrófico	8.9139±2.79

4.2.6 Producción de Proteínas.

Los resultados de la producción de proteína al final del experimento se muestran en la Tabla 9. Al igual que en el caso de los lípidos, se notan grandes diferencias entre los diferentes tratamientos. Analizando en conjunto los parámetros de lípidos y proteína, los resultados de unos corroboran los otros y viceversa. Es decir, bajo suficiencia de nutrientes y condiciones de cultivo adaptadas a las microalgas, estas acumulan proteína. Caso contrario, estrés nutricional y alteración en las condiciones ambientales, acumulan lípidos. Y en estos resultados se observa claramente estas premisas. El cultivo que más acumuló lípidos es el que menos generó proteína. Y los que generaron proteína, no acumularon lípidos.

Tabla 9. Concentración de Proteínas producida en los tratamientos

	% Proteína
Fototrófico	88.9688
Heterotrófico	36.3942
Mixotrófico	75.1535

4.3 Discusión de resultados

4.3.1 Cinética de crecimiento.

Analizando los parámetros cinéticos de crecimiento, aprovechamiento de nutrientes y productos, se puede validar la viabilidad operacional y la selección de las mejores condiciones experimentales y nutricionales para la obtención de biomasa potencialmente útil para fines específicos. Los parámetros estudiados en esta investigación fueron: crecimiento, concentración total de clorofila, carbohidratos medidos como glucosa en el medio, nitrato, fosfato, lípidos y proteínas. El aprovechamiento de nutrientes, y la producción de biomasa está directamente relacionada con: la composición del medio, tipos de microalgas del consorcio y factores medioambientales (temperatura, pH, incidencia de luz, etc.) (García-Cuadra, *et al.*, 2012). Los componentes principales de la biomasa de microalgas

son comúnmente proteínas (30-60 %), carbohidratos (20-30 %), lípidos (10-30 %). La producción de proteínas se ve favorecida con una alta velocidad de crecimiento celular, mientras que la producción de lípidos se ve favorecida, con una velocidad lenta y deficiencia nutricional (García-Cuadra, *et al.*, 2012).

Las microalgas habitualmente se encuentran en la naturaleza en ambientes acuáticos, realizando fotosíntesis y consumiendo carbono inorgánico (CO₂), es decir en condiciones fotoautotróficas. La concentración de biomasa bajo estas condiciones, en ambientes no eutrofizados, es menor a 8.33 mg/L·día debido a la alta competencia de nutrientes y a la dinámica poblacional (Olguín, Mendoza, González-Portela y Novelo, 2013). Bajo condiciones fotoautotróficas en este trabajo se obtuvo una productividad de 44.15 mg/L·día, y considerando que se trata de un consorcio de microalgas adaptado de cuerpo de agua léntico no eutrofizado, medios de cultivo no estériles y baja concentración de CO₂ disuelto en el medio (Olguín, *et al.*, 2013), se puede considerar aceptable la generación de biomasa. Por su parte, en condiciones heterotróficas y mixotróficas la productividad alcanzada fue 188 y 181 mg/L día respectivamente y una alta densidad celular. La generación de biomasa en estos cultivos estuvo muy relacionada con el aprovechamiento de nitrógeno y glucosa principalmente. No todas las especies de microalgas son capaces de asimilar el carbono orgánico u otras formas inorgánicas como carbonatos (Velea, *et al.*, 2017). Como materia pendiente en este trabajo, queda el análisis poblacional de las microalgas presentes en el consorcio para definir cuáles de ellas se ven favorecidas con la adición de carbono orgánico al medio, o si con la adición de carbono orgánico prevalece el balance microalga-bacteria en el consorcio, como en cultivos fotoautotróficos. Por otro lado, la adición de una fuente orgánica de carbono al medio conlleva un incremento en el costo de producción y esto a un nivel de producción industrial habrá que ser balanceando según el “costo-beneficio”. Para disminuir el costo de la adición de fuentes de carbono orgánicas grado reactivo, existen alternativas sustentables que emplean efluentes residuales con elevada carga orgánica en la formulación de medios de cultivo. Los más utilizados en la actualidad son los efluentes residuales de la digestión anaerobia. Sin embargo, existe una gran complejidad en el manejo de estos efluentes, ya que

presenta una microbiota que puede entrar en competencia con las microalgas, además que estos efluentes incrementan la turbidez y hacen más opaco el cultivo para el paso de la luz, limitando de esta manera la operación fotoautotrófica y mixotrófica. Existen otros efluentes residuales de alta carga orgánica y baja turbidez que se ha observado que pueden ser utilizados como fuente de carbono, como lo son las aguas residuales de la industria de los productos lácteos. La limitante que tiene el uso de este efluente residual radica en que regularmente no contiene las concentraciones necesarias de macroelementos y deben ser enriquecidos con sales minerales para obtener un medio de cultivo adecuado para la obtención de altas tasas de producción de biomasa de microalgas.

En la ciudad de Almería, España, donde se realizó una estancia de investigación (anexo A), hay en operación sistemas de producción de microalga en donde se obtenían concentraciones aproximadas a 6 g/L. (opinión personal) Alcanzar estas concentraciones dependen del tipo de microalga utilizada, las condiciones nutricionales y medioambientales y el sistema de producción. A nivel industrial las mayores densidades celulares se obtienen en reactores “thinlayer”, en donde la tasa fotosintética es elevada ya que el espesor de la película de cultivo permite un paso de luz efectivo (Morale-Amaral, Gómez-Serrano, Acien, Fernández-Sevilla y Molina-Grima, 2015).

4.3.2 Producción de clorofila.

En lo que respecta a la producción de clorofila se observó la mayor concentración en el cultivo fotoautotrófico, 20.545 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual es el reflejo de la elevada actividad fotosintética. Los valores comunes de concentración de clorofila oscilan entre los 20 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ritchie, 2006). Con esto podría inferirse que los tratamientos mixotróficos y heterotróficos no le confirieron las condiciones favorables, para la actividad fotosintética, al consorcio de microalgas analizado. A nivel industrial se ha aprovechado la actividad fotosintética de las microalgas bajo condiciones de estrés nutricional, para inducir en algunos tipos de microalgas, la acumulación de pigmentos (carotenoides) y compuestos de alto valor. Estos compuestos los generan como metabolitos secundarios ante las condiciones

adversas de crecimiento y entre ellos destacan β -caroteno y astaxantina que se utilizan como complementos alimenticios o para la elaboración de cosméticos (Ariede, *et al.*, 2017).

4.3.3 Aprovechamiento de nutrientes.

Los nutrientes analizados en este trabajo, fueron nitrato, fosfato y carbohidratos (medidos como glucosa), en donde el consumo es fundamental para asegurar la total conversión de nutrientes a biomasa y a su vez a componentes de interés biotecnológico, esto se traduce en producción de lípidos, proteínas, pigmentos, nutraceuticos, etc. El tratamiento que mejor consumo de nutrientes tuvo fue el mixotrófico, debido a su alta tasa de crecimiento. El consorcio de microalgas empleado en este trabajo, nunca fue esterilizado ni se adicionó antibióticos que limitaran el crecimiento de bacterias, por lo tanto no se le puede atribuir únicamente a la microalga el aprovechamiento de los nutrientes. Una materia pendiente para el futuro será aplicar alguna técnica que permita discernir el crecimiento diferencial entre microalgas y bacterias. Se presenta un resumen de los resultados obtenidos para los 3 cultivos en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de resultados

Parámetro	Fotoautotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
Biomasa	0.5740 g/L	2.0687 g/L	1.9888 g/L
Clorofila	20.5450 μ g/mL	3.3564 μ g/mL	13.5415 μ g/mL
Rendimiento Nitrato	28.71 %.	91.74 %.	96.85 %
Rendimiento Fosfato	34 %	37 %	78 %
Rendimiento Glucosa	-----	88.77 %	94.79 %
Producción de lípidos	3.7641 \pm 1.19 %	40.6621 \pm 8.91 %	8.9139 \pm 2.79 %
Producción de proteínas	88.9688 %	36.3942 %	75.1535 %

4.3.4 Producción de Lípidos.

El contenido lipídico en microalgas bajo suficiencia nutricional, se estima entre 20 y 30 %, esto depende de la especie de microalgas estudiadas (Chisti, 2007). A nivel industrial los lípidos producidos por la biomasa de microalgas pueden ser utilizados para la generación de biocombustibles mediante la trans-esterificación, como se puede observar en la Figura 18 (García-Cuadra, *et al.*, 2012), (Mubarak, Shaija y Suchithra, 2015). Resultó interesante que el cultivo heterotrófico que presentó una gran generación de biomasa también mostró la mayor generación de lípidos con un 40.6 %. Esto puede ser atribuido a que ante la falta de luz, el cultivo tuvo que adaptar su crecimiento acumulando lípidos debido a ese estrés ambiental. Además, al contar con una fuente carbono orgánica, pudo aprovecharla para su desarrollo y a su vez acumular lípidos. Esto indica que el consorcio de microalgas estudiado tiene características favorables para la generación de lípidos como lo reportado por Chisti en 2007, en donde identifican que, bajo estas condiciones de estrés el contenido lipídico aumenta (Wang, *et al.*, 2015).

4.3.5 Producción de proteínas.

El contenido proteico obtenido de la biomasa de microalgas se utiliza en la industria alimenticia, para la alimentación de ganado, y más recientemente para la generación de alimentos de consumo humano y suplementos alimenticios. También a una menor escala, debido a su bajo valor de mercado, se puede aprovechar el contenido proteico de las microalgas en la producción de biofertilizantes (Renuka, Guldhe, Parsanna, Singh y Bux, 2018). En este trabajo, los cultivos mixotrófico y fotoautotrófico fueron los que mostraron el mayor contenido proteico, más del 80 %. Esto debido a la riqueza de nutrientes en el medio de cultivo y la adaptación que tiene ya el consorcio a desarrollarse en condición fotoautotrófica. En este trabajo se corroboró el balance que se considera aplica para las microalgas. Mayor proteína, menos lípidos; mayores lípidos, menor proteína (Velea, *et al.*, 2017).

Por último, si se valora de manera global con todos los parámetros analizados en este trabajo, el cultivo en condiciones mixotróficas es el que resulta más atractivo

para profundizar en su estudio y mejoramiento para una futura proyección a mayor escala.

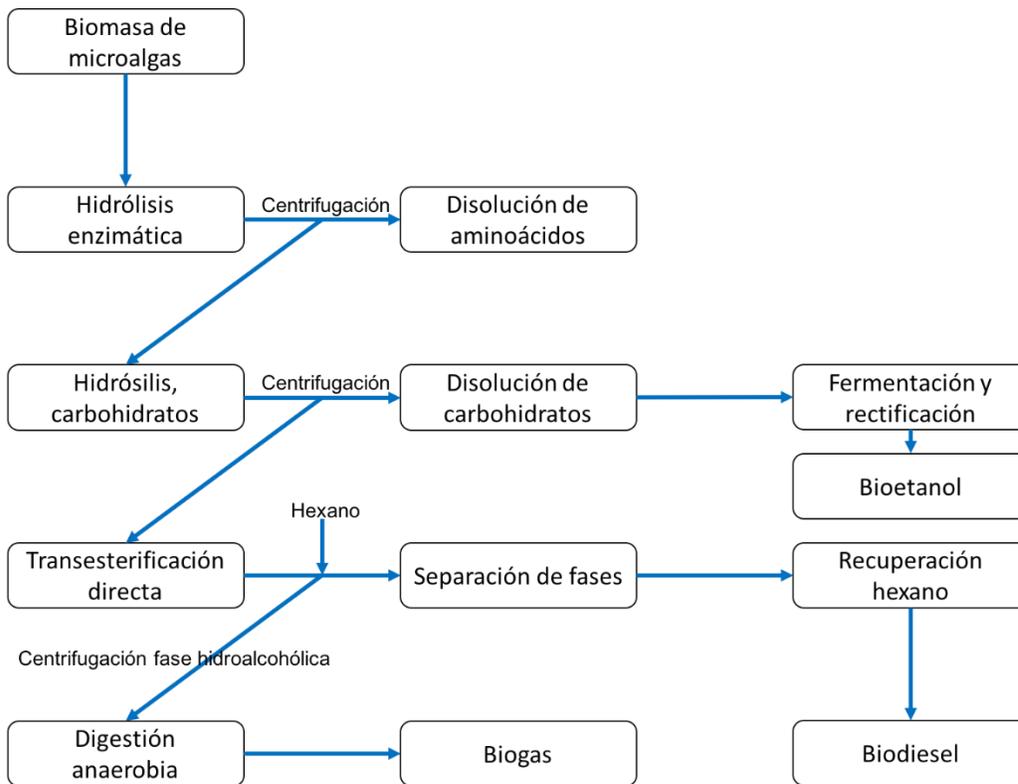


Figura 19. Esquema de aprovechamiento de metabolitos (García-Cuadra, *et al.*, 2012).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

El crecimiento, producción de macromoléculas esenciales (de interés industrial) y aprovechamiento de los nutrientes disponibles de microalgas está relacionado con la composición nutricional del medio de cultivo, factores ambientales y al tipo de microalga al que se refiera. En este trabajo se estudió un consorcio microalgal obtenido de la Presa de Neutla del cual no se existen reportes de estudios al respecto.

El consorcio analizado se adaptó a las 3 diferentes condiciones nutricionales y operacionales estudiadas, mostrando resultados importantes en cuanto al aprovechamiento de nutrientes, producción de biomasa y generación de productos de interés (proteínas y lípidos). Esto corrobora afirmativamente la hipótesis planteada para esta investigación.

Es de gran importancia identificar el potencial uso que se le puede dar a las microalgas a nivel industrial, para así seleccionar la mejor condición de cultivo que promueva la producción, económicamente viable y ambientalmente sustentable, de los compuestos de interés. En base a los resultados de este trabajo se realizó un análisis sobre las potenciales áreas de aplicación para cada uno de los cultivos analizados (Tabla 11).

El parámetro que consideramos de mayor relevancia bajo las condiciones iniciales nutricionales y ambientales que se establecieron, es la producción de proteínas que hacen atractivo al consorcio para alimentación animal y en la formulación de biofertilizantes.

Tabla 11. Aplicaciones industriales.

Área	Mixotrófico	Heterotrófico	Fototrófico	Aplicación
Biorremediación	SI	----	----	Eliminación de contaminantes
Bioenergía	----	SI	----	Biocombustibles
Agricultura	SI	----	SI	Biofertilizantes
Acuicultura	SI	SI	SI	Alimento para peces
Ganadería	SI	----	SI	Alimento para ganado
Alimentación	SI	----	SI	Suplementos alimenticios
Pigmentos	----	----	SI	Cosméticos
Medicina	SI	----	SI	Proteínas Recombinantes

5.1 Alcances y proyección futura de la investigación.

El desarrollo de este trabajo de tesis ha sobrepasado las metas establecidas para el mismo. Ya que los resultados de este proyecto han derivado en la presentación de trabajos en 2 congresos internacionales, una estancia académica en la Universidad de Almería con el grupo de investigación del Dr. Fco. Gabriel Acién (un referente mundial en la investigación en microalgas) (ver Anexo A). Además, debido a la riqueza de los resultados, como proyección a corto plazo se tiene el diseño y validación de un modelo fenomenológico de tres estados y el diseño de estimadores y controladores para los sistemas aquí analizados. En el Anexo B se muestra un pequeño avance sobre el diseño y validación del modelo de 2 y 3 estados para el caso del cultivo mixotrófico.

REFERENCIAS

- Allen M.M. y Stanier R.Y. (1967). Selective Isolation of Blue-green Algae from Water and Soil. Department of Bacteriology and Immunology, University of California, Berkeley, California, US.
- Ariede M.B., Candido T.M., Jacome A.L.M, Velasco M.V.R., Carvalho J.C.M. y Baby A.R. (2017). Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Research* 25, 483–487.
- Barsanti L. y Gualtieri P. (2010). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis group, 199-220.
- Barsanti L. y Gualtieri P. (2010). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis group, 209-250.
- Becker, E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, U.K.
- Bernaerts T.M.M., Panozzo A., Doumen V., Foubert I., Gheysenb L., Goiris K., Moldenaers P., Hendrickx M.E. y Loey A.M.V. (2017). Microalgal biomass as a (multi) functional ingredient in food products: Rheological properties of microalgal suspensions as affected by mechanical and thermal processing. *Algal Research* 25, 452–463.
- Borowitzka M.A. (2013). Energy from Microalgae: A Short History, en Borowitzka M.A. y Moheimani N. R., *Algae for Biofuels and Energy*, Springer, New York, 1-15.
- Camacho-Rodríguez J., Cerón-García M.C., Fernández-Sevilla J.M. y Molina-Grima E. (2015). The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture. *Algal Research* 11, 63–73.
- Çelekli A., Öztürk B. y Kapı M. (2014). Relationship between phytoplankton composition and environmental variables in an artificial pond. *Algal Research* 5, 37–41.
- Chen, H.B, Wu J.Y., Wang C.F., Fu C.C., Shieh C.J., Chen C.I, Wang C.Y. y Liu Y.C. (2010). Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes, *Biochem Eng J.* 52-56.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 25, 294-306.
- ChyiWuang S., Khin M.C., Chua P.Q.D. y Luo Y.D. (2016). Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. *Algal Research* 15, 59–64.
- Digesdahl® Digestion Apparatus Models 23130-20, -21. Instrument Manual. HACH. (1999).
- Feng Y., Li C. y Zhang D. (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour Technol* 102, 101-105.

- García-Cuadra F., Jawiarczyk N., González-López C.V., Fernández-Sevilla J.M. y Acién F.G. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Latinoamerica Biotechnology Ambiental Algal* 3, 147-161.
- Hernández-Pérez A. y Labbé J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Biología Marina y Oceanografía* 49, 157-173.
- Instituto de ecología del estado de Guanajuato. (2017). Acta de Instalación del comité técnico del área natural protegida "Presa de Neutla" y su zona de influencia.
- Lai Y.S., McCaw A., Ontiveros-Valencia A., Shi Y., Parameswaran P. y Rittmann B.E. (2016). Multiple synergistic benefits of selective fermentation of *Scenedesmus* biomass for fuel recovery via wet-biomass extraction. *Algal Research* 17, 253–260.
- Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A y Fon-Sing S. (2013). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In Borowitzka M.A. & Moheimani N.R. (Ed), *Algae for biofuels and energy*. Dordrecht: Springer 5; 265–284
- Moon M., Kim C., Park W., Yoo G., Choi Y. y Yang J. (2013). Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 2, 352–357.
- Morale-Amaral M.M., Gómez-Serrano C., Acien F.G., Fernández-Sevilla J.M. y Molina-Grima E. (2015). Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source, *Algal Research* 12, 99-108.
- Mubarak M., Shaija A. y Suchithra T.V. (2015). A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research* 7, 117–123.
- Olguín E.J., Castillo O.S., Mendoza A., Tapia K., González-Portela E.R., y Hernández-Landa V.J. (2015). Dual purpose system that treats anaerobic effluents from pig waste and produce *Neochloris oleoabundans* as lipid rich biomass, *New Biotechno*, 32, 387-395
- Olguín E. J., Mendoza A., González-Portela R.E. y Novelo E. (2013). Population dynamics in mixed cultures of *Neochloris oleoabundans* and native microalgae from water of a polluted river and isolation of a diatom consortium for the production of lipid rich biomass, *New Biotechnol* 30, 705-715.
- Olguín E.J., Sánchez-Galván G., González-Portela E., Pérez-Pérez T.J. y Hernández E. (1989). Manual de Técnicas de Laboratorio de la Unidad de Biotecnología Ambiental. Instituto de Ecología, INECOL.
- Patidar S.K., Mishra S.K., Bhattacharya S., Ghosh T., Paliwal C., Goel S. y Mishra S. (2015). Naturally floating microalgal mat for in situ bioremediation and potential for biofuel production. *Algal Research* 9, 275–282.

- Perales-Vargas-Machuca J.A., Arbib Z y García-Gozalbes C.C. (2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias del Agua* 1, 49-68.
- Periódico oficial del gobierno del estado de Guanajuato. (2009). *Ecología del estado*. p. 188.
- Perrine Z., Negi S. y Sayre R.T. (2012). Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. *Algal Research* 1, 134–142.
- Phosphorus, Reactive (Orthophosphate)-PhosVer 3 (Ascorbic Acid) Method 8048, Powder Pillows or AccuVac® Ampuls. . Instrument Manual. HACH. (2017).
- Renuka N., Guldhe A., Prasanna R., Singh P. y Bux F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges, *Biotechnol Adv.* 36, 1255-1273.
- Ritchie R.J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 89, 27–41.
- Sandoval R.M.A., Flores E.M.F., Narváez C.R.A. y López-Villada J. (2015). Phototrophic culture of *Chlorella* sp. using charcoal ash as an inorganic nutrient source. *Algal Research* 11, 368–374.
- Velea S., Oancea F. y Fischer F. (2017). Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation. En Gonzalez-Fernandez C. y Muñoz R. (Ed.) *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, Elsevier, 45-65
- Wang R., Xue S., Zhang D, Zhang Q., Wen S., Kong D., Yan C. y Cong W. (2015). Construction and characteristics of artificial consortia of *Scenedesmus obliquus*-bacteria for *S. obliquus* growth and lipid production. *Algal Research* 12, 436–445.
- Xu H., Miao X y Wu Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* 126, 499–507.
- Zedler J.A.Z, Mullineaux C.W. y Robinson C. (2016). Efficient targeting of recombinant proteins to the thylakoid lumen in *Chlamydomonas reinhardtii* using a bacterial Tat signal peptide. *Algal Research* 19, 57–62.

Anexo A

Parte del presente trabajo fue presentado en poster en el congreso internacional de microalgas “Algae Biomass summit 2017” (ABO), celebrado en la ciudad de Salt Lake City, Utah, USA. Del 28 de octubre al 2 de noviembre de 2017. A continuación se muestra el poster expuesto y la constancia de participación.

PHOTOAUTOTROPHIC AND HETEROTROPHIC MICROALGAE CULTIVATION OF LERMA-BAJIO REGION. EXPERIMENTAL AND NUMERICAL ANALYSIS

Omar S. Castillo^a, Vicenta Peña-Caballero, C. Ariel Capelillo, Stefanie Acosta, J. Rubén Rodríguez and Luz María Landa
 Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Campus Celaya-Salvatierra
 oscar.castillo@ugto.mx

INTRODUCTION

Microalgae biomass is considered as an alternative high value products source. Microalgae are featured by their high biomass productivity, their ubiquity and high rate of nutrients uptake (N, P and C) under many cultivation conditions. Searching optimal culture conditions for the accumulation of high value products, it's an interesting issue into the study of adapted microalgae, to a specific geographical site. In this work, microalgae consortia collected from "Presa de Neutla" (20°42'45.1"N 100°52'20.3"W), in the Lerma-Bajío region (central zone from Mexico), were cultured under controlled conditions. Numerical analysis of parameters evaluated will help us to develop phenomenological models and controllers for the scaling and optimization of biomass yield.

RESULTS

Photoautotrophic

Heterotrophic

Mixotrophic

Red lines are the results of mathematical modelation or simulation and black squares, experimental data. Monod model not fitted properly the experimental data due to the experimentation was in batch operation. The total chlorophyll content is correlated to biomass concentration just in photoautotrophic cultures as previous works reported [3].

MATERIALS AND METHODS

Main microalgae genera identify at the consortia collected were: *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Schroederia* sp., *Chlamydomonas* sp., and *Ankistrodesmus* sp. Microalgae consortia were cultured in 1 L CSTR reactors under controlled environment during 12 days, and at three nutritional conditions: photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic.

Photoautotrophic	Heterotrophic	Mixotrophic
Synthetic medium BBM, 25°C, 0.03 vvm dry air, 16 h light-8 h dark, 40 μmol photon m ⁻² s ⁻¹	Synthetic medium BBM, 25°C, dark, 120 rpm, glucose as carbon source (30 g L ⁻¹)	The same that photoautotrophic + glucose (30 g L ⁻¹)

Microalgae consortia collected from "Presa de Neutla" and CSTR used during the experimentation.

Analyzed parameters were: biomass and chlorophyll concentration, nitrogen, phosphate and glucose consumption, and lipid production. Numerical analysis was performed with Matlab® and Origin®

Specific growth rate was evaluated using a non linear estimator based on an observer [1].

Chlorophyll concentration was analyzed according its behavior.

Monod model was used to analyze biomass production and substrate consumption [2].

CONCLUSIONS

- Determination of specific growth rate, using a nonlinear estimator is an alternative to get reliable results.
- For the correct application of models to microalgae cultivation in batch operation and heterotrophic and mixotrophic cultures, adjustment are required to models as Monod or Droop.
- Chlorophyll content in heterotrophic and mixotrophic cultivation is not correlated to biomass, due to microalgae draw on organic carbon source for they growth.

REFERENCES

1. Bastin G. and D. Dochain. 1990. On-line estimation and adaptive control of bioreactors. Elsevier, Amsterdam
 2. Zhou X., et al., 2015. *J Renew Sustain Energy* 7-012701
 3. Chen N.B., et al., 2010. *Biochem Eng J*, 53:52-56

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to CONACYT and DAJP-UG for the financial support to carry out this work. Project 255717 CIB SEP-CONACYT.

48



ALGAE BIOMASS SUMMIT 2017
SALT LAKE CITY • OCTOBER 29 – NOVEMBER 1



To Whom It May Concern:

I attest that **Omar Castillo Baltazar and Christian Ariel Cabrera Castillo** attended the 11th Annual Algae Biomass Summit in Salt Lake City, Utah held Monday, October 29 through Wednesday, November 1, 2017 at the Grand America Hotel and participated in the Summit Poster Session with the poster "Photoautotrophic and heterotrophic microalgae cultivation of Lerma-Bajío region. Experimental and numerical analysis for a controller design" authored by Omar S. Castillo, Vicente Peita-Caballero, C. Ariel Capetillo, Stefanie Acosta, J. Rubion Rodriguez, Luz Maria Landa Departamento de Ingeniería Agroindustrial, DCSI, Universidad de Guanajuato.



Barb Scheevel
Administrative Coordinator



Office: (507) 765-2134
Toll Free: (877) 531-5512
E: bscheevel@algaebiomass.org
W: www.algaebiomass.org

Trabajos alternos dentro del proyecto de CONACyT Ciencia Básica a cargo del Dr. Omar S. Castillo, que no formaron parte de esta tesis, en los que realicé la parte experimental fueron presentados en foros internacionales como el congreso AlgaEurope 2017, celebrado en Berlín, Alemania, del 5 al 7 de diciembre de 2017. A continuación se muestra el poster expuesto y la constancia de participación.

Fed-batch microalgae consortia cultivation from Lerma-Bajío central región Mexico. Growth and chlorophyll modeling, perspective for optimization and control

Omar S. Castillo¹, Christian A. Capetillo, Vicente Peña-Caballero, Luz María Landa and J. Rubén Rodríguez
 Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Campus Celaya-Salvatierra
 ✉ omar.castillo@ugto.mx



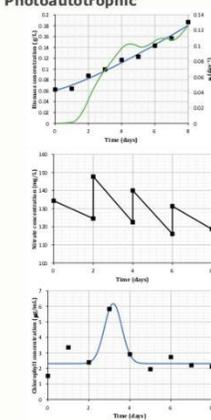

INTRODUCTION

Microalgae are featured by their high biomass productivity, their ubiquity and high rate of nutrients uptake (N, P and C) under many cultivation conditions. Searching optimal culture conditions for the accumulation of high value products, it's an interesting issue into the study of adapted microalgae. Fed-batch microalgae cultivation is useful to get high cell density maximizing biomass yield. In this work, microalgae consortia collected from "Presa San Miguel" at San Miguel Allende (20°52'27.1"N 100°48'37.0"W), in the Lerma-Bajío region (central zone from Guanajuato Mexico), were cultured under controlled conditions. The aim of this work was evaluated a phenomenological model that can help us to develop controllers for the scaling and optimization of biomass yield.

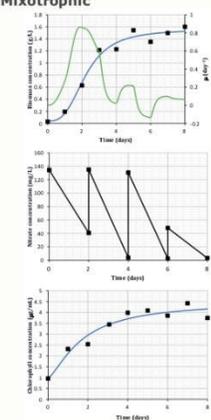


RESULTS

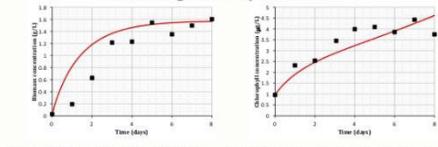
Photoautotrophic



Mixotrophic



Modelling Mixotrophic culture



Blue lines are the fitting to logistic or gaussian behavior, according each case. Green ones specific growth rate and red ones the results of logistic modelation. Black squares, experimental data. Logistic model can be used to analyze mixotrophic cultivation; however, total chlorophyll content is correlated with many growth parameters and the biomass concentration is not necessarily proportional to chlorophyll.

MATERIALS AND METHODS

Main microalgae genera identified at the consortia collected were: *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Schroederia* sp., and *Chlamydomonas* sp. Microalgae consortia were cultured in 1 L CSTR reactors under controlled environment during 8 days, and at photoautotrophic and mixotrophic nutritional conditions. The CSTR were operated at fed-batch mode, adding nitrogen each 48 h to recover the initial nutritional condition and the initial volume.

Photoautotrophic Synthetic medium BBM, 25°C, 0.03 vvm dry air, 16 h light-8 h dark, 40 μmol photon m ⁻² s ⁻¹	Mixotrophic The same that photoautotrophic + glucose (15 g L ⁻¹)
--	--



Microalgae consortia collected from "Presa San Miguel" and CSTR used during the experimentation.

Analyzed parameters were: biomass and chlorophyll concentration, and nitrogen consumption. Numerical analysis was performed with Matlab® and Origin®

Specific growth rate was evaluated using a non linear estimator based on an observator [1].

Chlorophyll and biomass concentration was analyzed according its behavior:

Gaussian and Logistic

$$\dot{x}_1 = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x_1}{x_0}\right)^p} x_1$$

$$\dot{x}_2 = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x_2}{x_0}\right)^p} x_1$$

Logistic model used to analyze biomass and chlorophyll concentration [2, 3].

CONCLUSIONS

- Determination of specific growth rate, using a nonlinear estimator is an alternative to get reliable results.
- The logistic phenomenological model used at this work, represents an attractive approach to analyze microalgae cultivation at fed-batch operation mode.
- Development and validation of robust models that can correlate different parameters in microalgae cultivation are the fundamentation for the control and optimization of these production systems.

REFERENCES

1. Bastin G. and D. Dochain. 1990. On-line estimation and adaptative control of bioreactors. Elsevier, Amsterdam
2. Zhou X., et al., 2015. *J Renew Sustain Energy* 7-012701
3. Chen H.B., et al., 2010. *Biochem Eng J*, 53:52-56

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to CONACYT and Rectory of CCS-UG for the financial support to carry out this work. Project 255717 CIB SEP-CONACYT.



Omar S. Castillo



Vicente Peña-Caballero

Certificate of Attendance

This is to testify that

Omar S. Castillo

Has attended and presented a poster entitled
Fed-batch microalgae consortia cultivation from Lerma-Bajío central region Mexico. Growth and chlorophyll modeling, perspective for optimization and control

AlgaEurope Conference 2017

December 5 - 7, 2017

Date: 07 - 12 - 2017
Place: Berlin, Germany

Isa Putman,
AlgaEurope 2017 Organizing Committee Member

I. Putman



Benelux



Parte del presente trabajo se realizó una colaboración internacional científica en la Universidad de Almería, ciudad de Almería, España. En el centro de investigación IFAPA dentro del proyecto SABANA, la cual es una planta piloto de estudio y producción de microalgas a gran escala. Ahí participé con el Dr. Gabriel Acién en el Mantenimiento, Producción y Análisis de diferentes cultivos de microalgas. La estancia duro del 5 al 22 de julio del año 2018. A continuación se presenta la constancia de participación.



Asunto: Certificado de estancia de investigación

En Almería, España, 27 de Julio de 2018,

Por la presente yo, Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández, investigador del grupo "Biotecnología de Microalgas Marinas (BIO173)" de la Universidad de Almería, con DNI 08912410W, certifico que los alumnos abajo mencionados han realizado satisfactoriamente una estancia de investigación en colaboración con nuestro grupo de investigación, en las instalaciones disponibles de la Planta Piloto del proyecto SABANA en el centro de investigación IFAPA. Dicha estancia ha tenido lugar del 9 al 20 de Julio de 2018, y se ha centrado en el análisis y mantenimiento de biorreactores con distintas muestras de microalgas. Durante dicho trabajo los alumnos han adquirido las capacidades y competencias necesarias para realizar este tipo de análisis.

CERTIFICADO a nombre de:

C. Cabrera Capetillo Christian Ariel, Pasaporte: G25257306
C. Acosta Ferreira Stefanie, Pasaporte: G24271929



Francisco Gabriel Acién Fernández
Investigador del Grupo "Biotecnología de microalgas marinas"
Departamento de Ingeniería
Área de Ingeniería Química
Universidad de Almería

Anexo B

Modelo Matemático

En un contexto de diseño, escalamiento, estimación y control en bioprocesos, la disponibilidad de un modelo matemático (modelo fenomenológico) para abstraer el bioproceso, es un requisito necesario para el diseño ingenieril. Esto es debido a que se pueden realizar con el modelo estudios numéricos para simular en condiciones de interés económico, de seguridad y ambientales, estimar variables de difícil medición a partir de variables de respuesta. Además, para regular variables del bioproceso. En la práctica el desarrollo de modelos fenomenológicos (modelos deterministas), se pueden obtener desarrollando balances de materia y/o energía en el sistema de estudio. En general después de aplicar los balances correspondientes se obtienen un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias o parciales.

Para el caso particular de modelado del cultivo del consorcio de microalgas se consideró en este anexo el cultivo mixotrófico en del biorreactor operando en modo discontinuo o lote (batch).

Desarrollo del modelo

Para modelar la dinámica del consorcio de microalgas en el biorreactor se hicieron las siguientes consideraciones a fin de simplificar el desarrollo del modelo para el cultivo mixitrófico.

- C1:** El biorreactor se consideró mezclado aproximadamente homogéneo.
- C2:** Concentración másica (ρ) es constante en todo el volumen de reacción (V_r)
- C3:** Como consecuencia de C2, se considera que la concentración de cada especie C_i en el bio-reactor es la misma en todo el volumen de reacción.
- C4:** Se considera la temperatura (T) y el potencial de iones hidronio (pH) constante en el volumen de reacción.
- C5:** La cinética de crecimiento celular es de tipo no estructurada.
- C6:** La generación de biomasa ($r_{C_x}(\cdot) = \left(\frac{dC_x}{dt}\right)_{\text{crecimiento}}$) está en función de la concentración de biomasa (C_x), es decir. $r_{C_x}(C_x)$.
- C7:** Si modelo matemático para $r_{C_x}(C_x)$ se define con la ecuación logística

Después de aplicar un balance de materia en modo de operación en discontinuo sobre el bioreactor para un proceso de producción de microalgas implica

$$\left. \begin{aligned} \frac{dC_X}{dt} &= \psi \left(1 - \frac{C_X}{\lambda} \right) C_X \\ \frac{dC_{Cl}}{dt} &= \delta \left(1 - \frac{C_{Cl}}{\eta} \right) C_X \end{aligned} \right\} (B1)$$

Donde C_X y C_{Cl} son las concentraciones de biomasa (g/L) y clorofila ($\mu\text{g/mL}$), λ y μ son constantes positivas, que tienen el sentido del valor asintótico de la concentración de células y clorofila, respectivamente, (g biomasa /L) y (μg clorofila /L) sujetas a $0 \leq C_X(0) < \lambda$ y $0 \leq C_{Cl}(0) < \eta$, y ψ y δ constante que se relacionan con la producción de biomasa.

Los parámetros estimados por regresión no lineal y las condiciones iniciales del modelo en la Ec. (1) se presentan en la Tabla B1.

En las Figuras B1, se muestra la respuesta del modelo matemático (líneas continuas) contra los datos experimentales (marcadores) para un cultivo mixotrófico de microalgas considerando biomasa y clorofila. Los residuos entre los datos experimentales y el modelo se muestran en la Figura B2.

Tabla B1. Parámetros estimados por regresión no lineal para el modelo en la Ec. (B1).

Parámetro	Valor	Unidades
ψ	1.2950	-
δ	1.5434	-
Y	0.56	g biomasa/ μg clorofila
λ	9.6482	
μ	4.0033	
	Condición inicial	
$C_X(0)$	0.02745	g/L
$C_{Cl}(0)$	0.95938	$\mu\text{g/mL}$

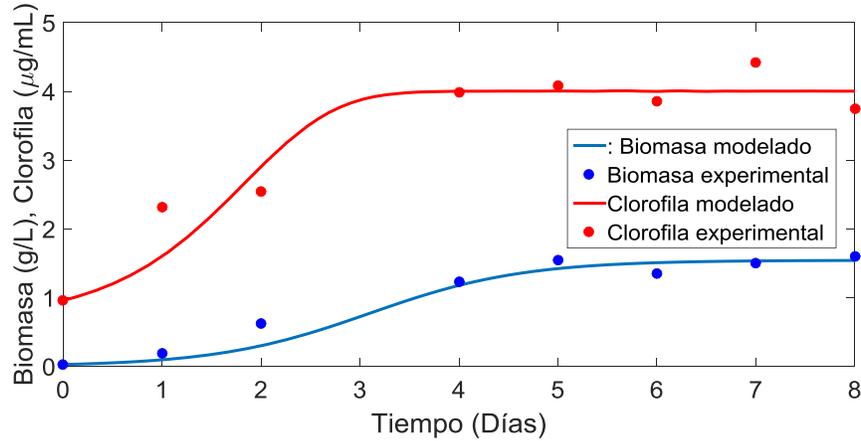


Figura B1: Modelado del cultivo mixotrófico, considerando dos estados biomasa y clorofila.

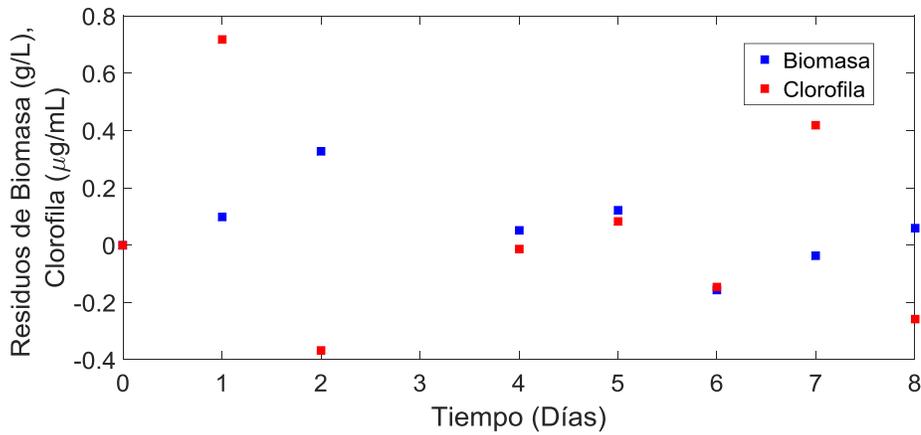


Figura B2: Modelado del cultivo mixotrófico, residuales de biomasa y clorofila. Para el caso de un cultivo en mixotrófico considerando tres estados Biomasa, clorofila y substrato el modelo matemático es

$$\left. \begin{aligned} \frac{dC_X}{dt} &= \psi \left(1 - \frac{C_X}{\lambda} \right) C_X \\ \frac{dC_{Cl}}{dt} &= \delta \left(1 - \frac{C_{Cl}}{\eta} \right) C_X \\ \frac{dC_S}{dt} &= \beta \left(1 - \frac{C_S}{\alpha} \right) C_X \end{aligned} \right\} (B2)$$

Donde C_S es la concentración de glucosa, α es una constante positiva, nuevamente relacionada con el sentido del valor asintótico de la concentración de glucosa (g /L) sujeta a $0 \leq C_S(0) < \alpha$ y α es una constante que se relacionan con la producción de biomasa.

En las Figuras B3 y B4 se presenta la respuesta del modelo en la Ec. (B2) y los residuos entre el modelo y los datos experimentales respectivamente.

Finalmente, se puede continuar incorporando más balances de materia para otras especies de importancia para caracterizar el sistema biológico del consorcio de microalgas, por ejemplo, nitratos, esto aumentará el número de variables y parámetros en el modelo matemático. Naturalmente, el trabajo para estimar los parámetros para modelar el sistema exige estudios numéricos. Por lo que el trabajo numérico sobre la base de los datos experimentales será realizar un estudio de análisis dinámico del sistema bajo estudio para simular, estimar y controlar variables del proceso.

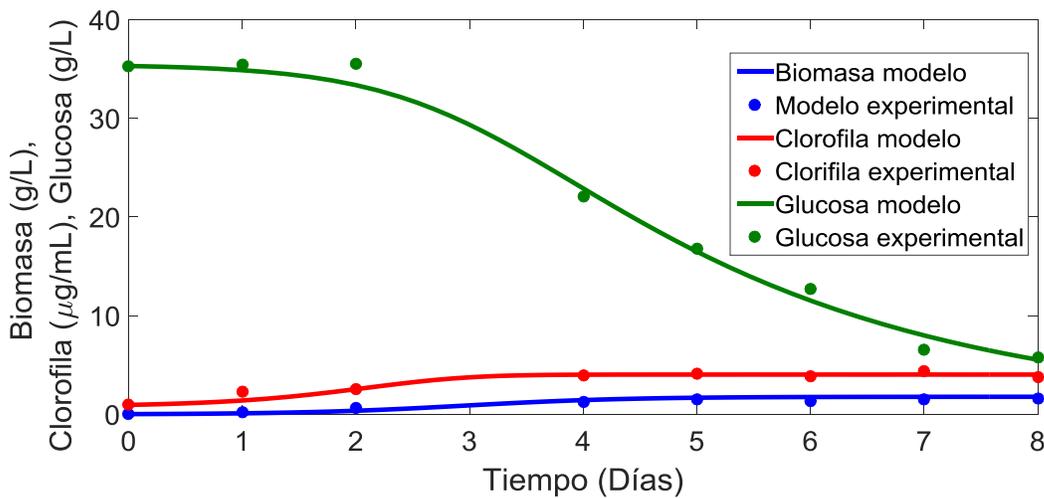


Figura B3: Modelado del cultivo mixotrófico, considerando tres estados biomasa, clorofila y glucosa.

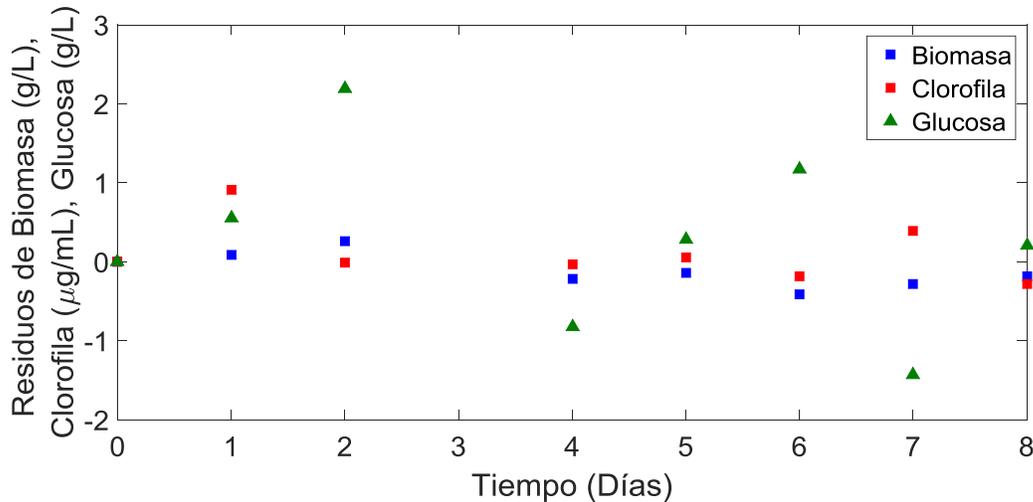


Figura B4: Modelado del cultivo mixotrófico, residuales de biomasa, clorofila y glucosa.