



# UNIVERSIDAD DE SONORA

## DIVISIÓN DE INGENIERÍA

### POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA: INGENIERÍA QUÍMICA

#### **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MICROALGA VERDE PARA LA FIJACIÓN DE CO<sub>2</sub>**

Que para Obtener el Grado:

**Maestro en Ciencias de la Ingeniería**

Presenta:

**Magly García Ramírez**

Hermosillo, Sonora.

Julio, 2020

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **APROBACION DEL JURADO**

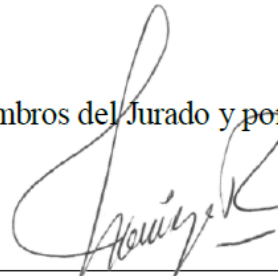
de la tesis presentada por:

**MAGLY GARCÍA RAMÍREZ**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos han encontrado satisfactoria.

30/07/2020

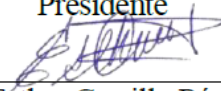
Fecha



Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez  
Presidente

30/07/2020

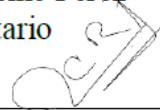
Fecha



Dra. Esther Carrillo Pérez  
Secretario

30/07/2020

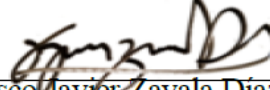
Fecha



Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa  
Vocal

30/07/2020

Fecha



Dr. Francisco Javier Zavala Díaz de la Serna  
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

---

**Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química**

## AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

18 de Julio de 2020.

Por medio de la presente se hace constar que la estudiante **MAGLY GARCIA RAMIREZ**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

**DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCÍA**  
**COORDINADOR POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA:**  
**INGENIERÍA QUÍMICA**

## RESUMEN

Los sistemas de cultivo de microalgas poseen un potencial biotecnológico aplicable en múltiples áreas, donde se puede combinar las diferentes capacidades metabólicas para la generación de bioprocesos económicamente viables y ecológicos.

En este estudio se aislaron y adaptaron microalgas a partir de una muestra de acuario doméstico en un fotobiorreactor tipo airlift de 1L, obteniendo buen crecimiento después de 7 días, observando un cambio de pigmentación y turbidez del medio de cultivo. En un principio se aislaron microalgas del género *Chlorophyta* y *Ochrophyta*, de las cuales solo se preservaron las *Chlorophytas* debido a las condiciones de cultivo no favorecieron el crecimiento de *Ochrophytas*. Mediante la observación de las estructuras microscópicas se concluyó que las microalgas aisladas pertenecen género *Scenedesmus sp.*

Posteriormente se evaluó el efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> alimentado (0%, 5%, 10%, 15% y 20%) sobre la cinética de crecimiento, en un fotobiorreactor tipo airlift (4.5 L) con iluminación y aireación continua (24 h) en un medio de cultivo F/2 de Guillard. A partir de los modelos Gompertz modificado y Logístico se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento. Ambos modelos describieron satisfactoriamente los datos experimentales ( $R^2 \geq 0.96$ ), sin embargo, el modelo Gompertz obtuvo un mejor ajuste ( $R^2 \geq 0.98$ ). Se observó que la alimentación del CO<sub>2</sub> al 15% favorece la producción de biomasa ( $41.6 \text{ gL}^{-1}$ ), con una mayor tasa de fijación de CO<sub>2</sub> ( $7.445 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) y productividad ( $3.96 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ), mientras que la alimentación de CO<sub>2</sub> al 10% favorece la velocidad específica de crecimiento ( $0.025 \text{ h}^{-1}$ ).

Así mismo, se determinó la composición bioquímica de lípidos, carbohidratos, pigmentos y porcentaje de humedad mediante técnicas experimentales estandarizadas. Se destacó el alto contenido de lípidos ( $21.86\% \pm 6.186$ ) y carbohidratos ( $31.09\% \pm 0.653$ ), por lo que indica su posible uso como materia prima en áreas nutricionales, ya que logran alcanzar valores cercanos a los contenidos en cereales y leguminosas.

De acuerdo a los parámetros cinéticos obtenidos indicaron que las microalgas aisladas *Scenedesmus sp.* posee una alta tolerancia a la inyección de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo soportando concentraciones de hasta 20%, sin embargo, se observó que el 15% favorece la producción de biomasa. Además, las condiciones de cultivo utilizadas durante la experimentación favorecieron la producción de lípidos y carbohidratos. Por lo que las microalgas utilizadas muestran una posible aplicación en áreas biotecnológicas, ambientales, energéticas y nutricionales.

## ABSTRACT

Microalgae culture systems have a biotechnological potential application in multiple areas, through different metabolic capacities that could be combined to generate economic and ecological viable bioprocesses.

In this study, microalgae were isolated and adapted from a domestic aquarium in a photobioreactor type airlift of 1 L, obtaining good growth after 7 days, observing a change of pigmentation and turbidity in the culture media. In the beginning, microalgae of *Chlorophyta* and *Ochrophyta* genus were isolated, but only *Chlorophytas* were preserved because cultivation conditions did not favor *Ochrophyta* growth. Observing microscopic structures, we concluded that isolated microalgae belong to the genus *Scenedesmus* sp.

Subsequent that, the effect of CO<sub>2</sub> concentration fed (0%, 5%, 10%, 15% y 20%) on the kinetic of growth was evaluated in a photobioreactor type Airlift (4.5 L) with continuous illumination and aeration (24h), using Guillard's F/2 culture medium. The parameters of the growth kinetics were determined with modified Gompertz and Logistic mathematical models. Both models satisfactorily describe experimental data ( $R^2 \geq 0.96$ ). However, the Gompertz model obtained a better adjustment ( $R^2 \geq 0.98$ ). It was observed that feeding microalgae with CO<sub>2</sub> at 15% increased biomass production (41.6 gL<sup>-1</sup>), with the higher CO<sub>2</sub> fixation rate (7,445 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and productivity (3.96 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), while CO<sub>2</sub> at 10% favors the specific growth rate (0.025 h<sup>-1</sup>).

Likewise, the biochemical composition of lipids, carbohydrates, pigments, and the percentage of humidity was determined using standardized experimental techniques. High lipid (21.86% ± 6.186) and carbohydrates (31.09% ± 0.653) content was highlighted, therefore indicate that it is possible to use as a raw material in nutritional areas, so that achieve close values to the contents in cereals and legumes.

The kinetic parameters obtained indicate that the isolated microalgae *Scenedesmus* sp. has a high tolerance to the injection of CO<sub>2</sub> into the culture medium supporting concentration up to 20%, however, it was observed that 15% favors biomass production. Furthermore, the culture conditions used during the experimentation favored the

production of lipids and carbohydrates. Therefore, the microalgae used shows a possible application in biotechnological, environmental, energy, and nutritional areas.



## Dedicatoria

**“Sólo es imposible si lo crees”**

<Alicia en el país de las maravillas>

Dedico este trabajo primeramente a los seres más importantes en mi vida, mis padres Yasmín García y Noel Bañuelas, por ser mis guías y pilares. Quienes, con trabajo y esfuerzo, así como con consejos, regaños, paciencia y perseverancia han formado la persona que soy. Por creer en mí, por darme siempre su apoyo y confianza, por estar conmigo en cada paso y alentarme en cada meta, pero sobre todo gracias por su amor incondicional.

A mis hermanos Johana y Noel Bañuelas por todo su apoyo y siempre estar a mí lado en cada paso que doy, quienes junto con mis padres son mis pilares. A mí abuelo Jesús Antonio por cada uno de sus consejos y enseñanzas las cuales preservo y llevo conmigo cada día, gracias por inculcarme la importancia del estudio y el trabajo.

También dedico este trabajo a Laura Hernández quien me impulsó y apoyó en esta aventura. Por todo su amor, compañía y paciencia. Gracias por estar conmigo en las buenas y las malas, por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía, por alentarme a dar lo mejor siempre.

<b>RESUMEN .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>XV</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
1.1. Introducción.....	16
1.2. Objetivos.....	17
1.2.1 Objetivo General.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>18</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1. Microalgas .....	18
2.2. Nutrición .....	19
2.3. Fotosíntesis .....	19
2.4. Composición Bioquímica de las Microalgas.....	21
2.5. Cultivos de Microalgas.....	23
2.6. Modo de Operación de un Fotobiorreactor .....	25
2.7. Mecanismo de Fijación de CO <sub>2</sub> por Medio de la Fotosíntesis .....	25
2.8. Reportes de Fijación de CO <sub>2</sub> con Microalgas.....	26
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>29</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
3.1. Estrategia experimental .....	29
3.2. Aislamiento y Adaptación de las Microalgas .....	30
3.3. Caracterización Microscópica.....	32
3.4. Caracterización del Crecimiento en Función del CO <sub>2</sub> .....	33
3.4.1. Operación del FBR Semi-Continuo Tipo Airlift .....	33
3.4.2. Medición de Densidad Óptica.....	33
3.4.3. Determinación de Peso Seco .....	34
3.4.4. Obtención de Parámetros Cinéticos .....	35
3.4.5. Productividad de la Biomasa .....	36
3.4.6. Tasa de Fijación de CO <sub>2</sub> .....	36
3.5. Caracterización de la Composición Proximal de la Biomasa .....	37

3.5.1.	Cosecha de Biomasa Microalgal Total .....	37
3.5.2.	Determinación de Lípidos.....	37
3.5.3.	Determinación de Carbohidratos .....	38
3.5.4.	Determinación de Pigmentos Fotosintéticos.....	41
3.5.5.	Determinación del Porcentaje de Humedad.....	42
<b>CAPÍTULO 4.....</b>		<b>44</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>44</b>
4.1.	<b>Aislamiento y Adaptación de las Microalgas .....</b>	<b>44</b>
4.2.	<b>Caracterización microscópica de las microalgas <i>Chlorophyta</i>.....</b>	<b>46</b>
4.3.	<b>Caracterización de Componentes Bioquímicos.....</b>	<b>48</b>
4.3.1.	Determinación de Lípidos.....	49
4.3.2.	Determinación de Carbohidratos .....	50
4.3.3.	Determinación del Porcentaje de Humedad.....	51
4.3.4.	Determinación de Pigmentos .....	53
4.4.	<b>Caracterización del Crecimiento en Función del CO<sub>2</sub>.....</b>	<b>54</b>
4.5.	<b>Fijación de CO<sub>2</sub> y Productividad .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 5.....</b>		<b>63</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>		<b>63</b>
5.1.	<b>Conclusiones.....</b>	<b>63</b>
5.2.	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 6.....</b>		<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>		<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones del proceso de la fotosíntesis en microalgas.....	21
Figura 2. Estrategia experimental.....	30
Figura 3. Caracterización microscópica por frotis húmedos.....	32
Figura 4. Medición de la densidad óptica. ....	34
Figura 5. Determinación de peso seco .....	35
Figura 6. Curva de calibración de carbohidratos totales. ....	40
Figura 7. Extracción de pigmentos fotosintéticos en microalgas.....	42
Figura 8. Aislamiento de microalgas de acuario doméstico en un FBR de 1.0 L.....	44
Figura 9. Caracterización microscópica de microalgas en fase de aislamiento y adaptación. ....	45
Figura 10. Microalgas de la clase <i>Bacillariophyceae</i> : A) <i>Cymbella sp.</i> B) <i>Encynema sp.</i> C) <i>Navicula sp.</i> D) <i>Gomphonema sp.</i> Microalgas filamentosas ramificadas de la clase <i>Chloropyta</i> : E) <i>Characium sp.</i> y F) <i>Stigeoclonium sp.</i> .....	46
Figura 11. Caracterización microscópica de las microalgas Chlorophytas por comparación morfológica reportadas. A), B) y C) microfotografías de microalgas de muestra caracterizada. D) Fotografía de <i>Scenedesmus quadricauda</i> proporcionada por Swedish Meterological and Hydrological Institute (SMHI). E) <i>Scenedesmus obliquus</i> proporcionada por Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA). F) <i>Scenedesmus dimorphus</i> proporcionada por Algaebase.org.....	48
Figura 12. Pérdida de humedad a través del tiempo en la biomasa de microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	52
Figura 13. Seguimiento de la cinética de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> en FBR tipo airlift 4.5L.....	54
Figura 14. Efecto de la adición de CO <sub>2</sub> sobre la cinética de crecimiento de las microalgas <i>Scenedesmus sp.</i> .....	55
Figura 15. Cinética de crecimiento microalga <i>Scenedesmus sp.</i> control 0% CO <sub>2</sub> .....	56
Figura 16. Cinética de crecimiento microalga <i>Scenedesmus sp.</i> con 5% CO <sub>2</sub> .....	57
Figura 17. Cinética de crecimiento microalga <i>Scenedesmus sp.</i> con 10% CO <sub>2</sub> .....	57

Figura 18. Cinética de crecimiento microalga <i>Scenedesmus sp.</i> con 15% CO <sub>2</sub> .....	58
Figura 19. Cinética de crecimiento microalga <i>Scenedesmus sp.</i> con 20% CO <sub>2</sub> .....	58

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de metabolitos secundarios en microalgas.....	22
Tabla 2. Composición del medio de cultivo F/2 de Guillard. ....	31
Tabla 3. Preparación de la curva de calibración. ....	40
Tabla 4. Composición proximal en microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	48
Tabla 5. Contenido de lípidos en microalgas.....	50
Tabla 6. Parámetros cinéticos de microalgas <i>Scenedesmus sp.</i> con modelos Logístico y modelo Gompertz.....	59
Tabla 7. Concentración y productividad de biomasa y tasa de Fijación de CO <sub>2</sub> de la microalga <i>Scenedesmus sp.</i> ....	61

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a la Universidad de Sonora por la oportunidad brindada y de la misma forma agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado.

Agradezco a mi director de tesis el Doctor Juan Antonio Noriega, por darme la oportunidad de trabajar y aprender a su lado, por cada enseñanza, así como la paciencia y el apoyo dado, gracias por impulsarme y creer en mí.

Gracias mis sinodales: Doctora Esther Carrillo, Doctor José Carlos Rodríguez y Doctor Francisco Javier Zavala por su apoyo y consejos a lo largo de todo el proyecto. También agradezco al coordinador del posgrado el Doctor Abraham Martín por sus consejos y orientación durante mi estancia en el posgrado.

A mis amigos y compañeros del posgrado quienes hicieron más ameno este tiempo brindándome su ayuda y amistad en los momentos de desánimo. Agradezco a cada una de las personas que de una forma directa e indirecta ayudaron a la realización de este trabajo

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Introducción

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos con una amplia adaptación a diversos ambientes. A través de los años se les ha encontrado múltiples usos y aplicaciones en actividades industriales, tecnológicas médicas, alimentarias y energéticas (Garcia et al., 2018).

La composición rica en lípidos, carbohidratos, proteínas, pigmentos, entre otros, con alto valor añadido han incrementado el interés en el estudio de estos microorganismos (Zhao et al., 2014). Sin embargo, la concentración de estos componentes depende de las condiciones de cultivo pero principalmente del género y especie de la microalga empleada (Geadá et al., 2017). Por ejemplo, las microalgas *Chlorella*, *Spirulina* y *Chlamydomonas reinhardtii* poseen un alto contenido de carbohidratos y proteínas. Mientras que microalgas del género *Scenedesmus* contienen alrededor de 16 a 40% de lípidos (Maity et al., 2014).

Estos microorganismos promueven el aumento de la concentración de oxígeno en la atmósfera por medio de la fotosíntesis, por lo que poseen un potencial de uso en áreas ambientales (Madigan MT et al., 2012). Actualmente existen graves problemas ambientales como el cambio climático y calentamiento global derivados del aumento de la concentración del CO<sub>2</sub> en la atmósfera provocados por las diversas actividades antropogénicas (De Moraes and Costa, 2007; Jacob-Lopes et al., 2008; Mora Salguero et al., 2018). Por lo que el cultivo de las microalgas ofrece una alternativa ecológica, económica y sostenible para contrarrestarlos, estos microorganismos poseen un rápido crecimiento, alta adaptabilidad y requieren menor extensión de territorio para su



aplicación, además, se ha reportado que estos microorganismos logran fijar aproximadamente 1.83 kg de CO<sub>2</sub> por kg de biomasa (Jiang et al., 2013; Sforza et al., 2015). En cambio, las plantas superiores logran fijar alrededor de 10 a 30 kg de CO<sub>2</sub>, pero es importante mencionar que dicha tasa se logra alcanzar una vez que el organismo alcanza su máxima fase de crecimiento, por lo que implica un periodo de 10 años aproximadamente. Otra de las problemáticas de las plantas es su baja adaptabilidad y la necesidad de grandes extensiones de superficie (Sforza et al., 2015; Wang et al., 2008)

Aunque el mecanismo de la fotosíntesis en las microalgas es similar al de las plantas superiores, generalmente son convertidores más eficientes de energía solar debido a su estructura celular simple. Es por eso, que en la actualidad los sistemas de cultivo de microalgas son altamente estudiados principalmente por su amplia aplicación en múltiples áreas. Sin embargo, dichos cultivos microalgales a nivel industrial aún no son factibles debido a los altos costos de producción y bajos rendimientos derivados, entre otras cosas, a la falta de entendimiento del metabolismo de estos microorganismos a gran escala, por lo que es importante comprender los diferentes mecanismos metabólicos que llevan a cabo y generar información acerca del crecimiento de las microalgas para optimizar su potencial de aplicación en áreas tanto comerciales como ambientales.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Aislar y caracterizar una cepa de microalga verde para la fijación de CO<sub>2</sub>.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Realizar el aislamiento e identificación de una microalga verde de un acuario.
- Evaluar el rendimiento del crecimiento de la microalga en función de la alimentación de CO<sub>2</sub>.

## CAPÍTULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que prevalecen principalmente en hábitats acuáticos. Presentan una amplia adaptación a diferentes tipos de ambientes con características variables como tipo de agua, pH, temperatura y concentración de O<sub>2</sub> (Barsanti and Gualtieri, 2014). Se caracterizan por poseer una gran variedad de morfologías celulares, metabolismos celulares, ciclos de vida y composición química por lo que componen un grupo muy diverso.

Estos microorganismos se han catalogado como polifiléticos, es decir, no tienen una posición taxonómica formal, sin embargo, se han desarrollado criterios para poder clasificarlas tomando en cuenta principalmente la pigmentación, ciclo de vida y estructura celular (Brennan and Owende, 2010). Las microalgas se han asociado a dos reinos Bacteria y Plantae (Barsanti and Gualtieri, 2014; Madigan MT et al., 2012). Dentro del dominio Bacteria se encuentran las *Cyanobacterias*, las cuales son las principales aportadoras de oxígeno en la atmósfera (Madigan MT et al., 2012). Por otro lado, el reino Plantae está constituido por los filos *Rhodopytas*, *Euglenophyta*, *Glaucophyta*, *Charophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Orchrophyta* y *Chlorophytas*, estas últimas poseen un especial interés debido a que son de fácil acceso y mantenimiento (Barsanti and Gualtieri, 2014; Madigan MT et al., 2012).

Las microalgas presentan una gran variedad de tipos de organización celular, se pueden encontrar como células unicelulares no motiles, sin embargo, algunas poseen flagelos confiriéndoles movilidad. También podemos encontrarlas con organización colonial, donde ciertas especies son móviles, por otro lado, las microalgas no motiles forman cenobios con un número fijo de células. Por último, se encuentran las microalgas filamentosas, las cuales presentan células cilíndricas lineales o ramificadas (Wehr et al.,

2015). Todas estas características son útiles en la diferenciación morfológica de las células microalgales.

## **2.2. Nutrición**

Las microalgas pueden ser autótrofas, heterótrofas y mixotróficas dependiendo de la condición ambiental en la que se encuentren. Los organismos autótrofos utilizan fuentes de luz y carbono inorgánico como el CO<sub>2</sub> para formar energía química y carbono orgánico por medio de la fotosíntesis (Shandilya and Pattarkine, 2019). Estos microorganismos absorben estos nutrientes a través de los cloroplastos convirtiéndolos en ATP (adenosina trifosfato) y O<sub>2</sub> por la oxidación de sustratos como el agua, moléculas que serán utilizadas para producir la energía necesaria para el crecimiento celular (Chew et al., 2018; Geada et al., 2017).

Las microalgas heterotróficas no requieren luz para su crecimiento, sin embargo, esta capacidad solo se encuentra en algunas especies como *Cryptocodinium cohnii* (Geada et al., 2017). Este tipo de microalgas utilizan sustratos de carbono orgánico como glucosa, glicerol o acetato para satisfacer los requerimientos metabólicos necesarios. De acuerdo al uso o no de la luz se denominan fotoheterótrofos o quimioheterótrofos. En el primer caso, utilizan la luz como fuente de energía y como fuente de carbono la materia orgánica en cambio se denominan quimioheterótrofos cuando oxidan los compuestos orgánicos para obtener la energía en lugar de la luz (Brennan and Owende, 2010; Geada et al., 2017; Shandilya and Pattarkine, 2019).

La capacidad de combinar el metabolismo autotrófico y heterotrófico, es denominado mixotrófia. Un gran número de microalgas pueden fotosintetizar y digerir la materia orgánica, esta capacidad facilita el crecimiento celular independiente de la fotosíntesis (Shandilya and Pattarkine, 2019).

## **2.3. Fotosíntesis**

Los organismos fotosintéticos obtienen su energía mediante un proceso llamado fotosíntesis, el cual se realiza en los cloroplastos. Las reacciones de este proceso se llevan a cabo en dos etapas como se muestra en la Figura 1. En la primera etapa

denominada como dependiente de la luz, la energía lumínica es absorbida por los pigmentos como energía electromagnética y convertida a energía química para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del agua. En este proceso se obtiene el agente oxidante  $\text{NADP}^+$ , el cual se reduce a NADPH y se libera  $\text{O}_2$ . Luego la luz es capturada a través de la fosforilación del ADP para obtener moléculas de ATP y ambas moléculas son liberadas al estroma (Mathews and Ahern, 2002; Tebbani et al., 2014).

La segunda etapa de las reacciones de la fotosíntesis se le denomina independiente de la luz y se producen en el estroma del cloroplasto. En esta fase las moléculas de NADPH y ATP producidas en la etapa lumínica, se utilizan para la síntesis de hidratos de carbono a partir de  $\text{CO}_2$  y agua. Durante estas reacciones se captura el  $\text{CO}_2$  y las moléculas de NADPH y ATP a través del ciclo de Calvin Benson, donde primero se fija el  $\text{CO}_2$  por medio de la ribulosa-1, 5- bifosfato (RuBP) para formar hexosas. Esta reacción es catalizada por la enzima ribulosa-1, 5- bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBISCO). Posteriormente en la fase dos, ocurre la regeneración de la RuBP para mantener el funcionamiento del ciclo (Barsanti and Gualtieri, 2014; Mathews and Ahern, 2002; Tebbani et al., 2014). El aparato fotosintético de las microalgas le confiere ciertas características útiles en actividades como la fijación de  $\text{CO}_2$ , tratamiento de aguas residuales y síntesis de lípidos (Cheah et al., 2015).

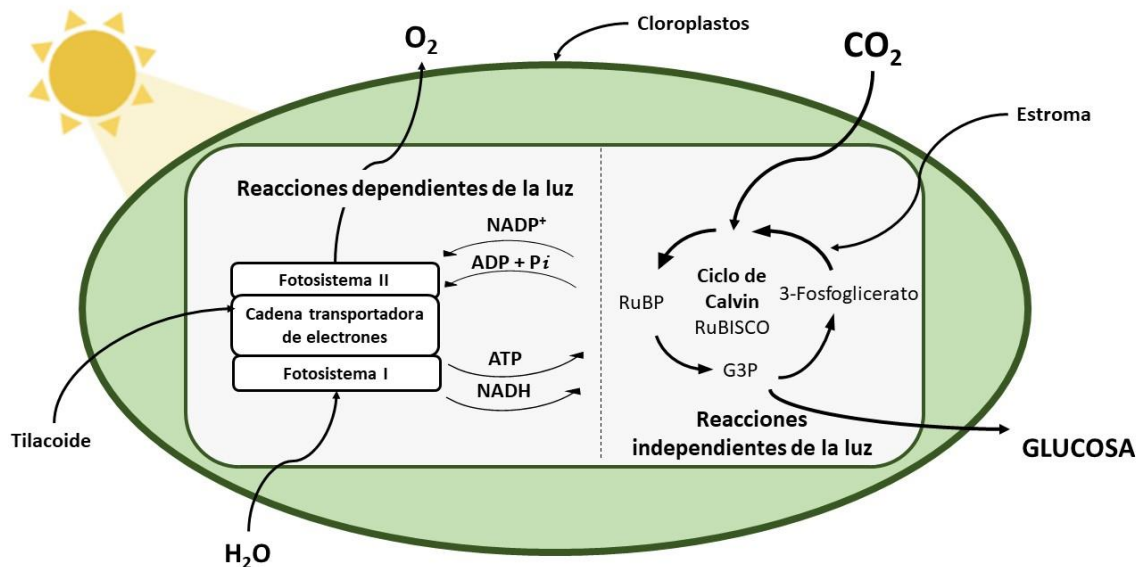


Figura 1. Reacciones del proceso de la fotosíntesis en microalgas

## 2.4. Composición Bioquímica de las Microalgas

La extraordinaria plasticidad metabólica que presentan las microalgas ha generado un interés en los diferentes compuestos bioquímicos tales como pigmentos, lípidos, polisacáridos, proteínas, vitaminas, etc. debido a su alto valor comercial. Estos compuestos forman parte de la biomasa microalgal y tienen como función proteger a la célula del estrés medioambiental (Geadá et al., 2017).

Todos estos compuestos pueden dividirse en tres grupos de acuerdo a su interés: bajo, mediano y alto valor. Se ha reportado el uso de los metabolitos de microalgas en áreas nutricionales, farmacéuticas, energéticas y cosméticas (Khan et al., 2018). Dentro de los metabolitos primarios de mayor interés se encuentran los lípidos utilizados principalmente en la producción de biocombustibles, mientras que los carbohidratos se utilizan en áreas de cosmetología y productos de cuidado de la piel, emulsionantes, industria alimentaria, así como en la medicina ya que algunos polisacáridos sulfatados han sobresalido en aplicaciones médicas. Del mismo modo, las proteínas, péptidos y algunos aminoácidos microalgales tienen un efecto positivo en terapias sobre la salud y mejoramiento a nivel celular o tejidos (Vuppaladadiyam et al., 2018).

Además, la biomasa microalgal posee una amplia gama de metabolitos secundarios como esteroides, ceras, cetonas, hidrocarburos, vitaminas, pigmentos, ficocoloides, carotenoides, lectinas, micosporina y policétidos con gran aplicación y valor en las diferentes industrias (Khan et al., 2018; Vuppaladadiyam et al., 2018). La aplicación y nuevo uso de estos metabolitos puede aumentar la competitividad de la tecnología basada a partir del cultivo de microalgas (Kroumov et al., 2017).

**Tabla 1. Composición de metabolitos secundarios en microalgas**

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Especies de microalga</b>	<b>Composición</b>	<b>Referencia</b>
Polifenoles	<i>Isochysis sp.</i> , <i>Phaeodactylum sp.</i>	3 – 4.5 <sup>a</sup>	(Goiris et al., 2012)
Esfingolípidos	<i>Dinofita</i> , <i>Bacillariofita</i> , <i>Haptofita</i>	0.45 – 53.33 <sup>b</sup>	(Li et al., 2017)
Carotenoides	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Tetraselmis suecica</i>	8.1 – 8.8 <sup>a</sup>	(Vuppaladadiyam et al., 2018)
β - Caroteno	<i>Dunaliella salina</i>	4.4 – 41 <sup>a</sup>	(Vuppaladadiyam et al., 2018)
Astaxantina	<i>Haematococcus</i> . <i>Pluvialis</i> , <i>Scenedesmus</i> <i>sp.</i> , <i>Chlorella sp.</i> , <i>Chlorococcum sp</i>	1.5 – 10 <sup>c</sup>	(Markou and Nerantzis, 2013)
Luteína	<i>Scenedesmus sp.</i> , <i>Chlorella sp.</i> , <i>Muriellopsis sp.</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i>	4.5 – 5.5 <sup>a</sup>	(Markou and Nerantzis, 2013; Vuppaladadiyam et al., 2018)
Vitaminas (C, D y E)	<i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Euglena gracilis</i>	0.8 – 1.6 <sup>c</sup>	(Markou and Nerantzis, 2013)
Polisacáridos	<i>Chlorella sp.</i> , <i>Porphyridium sp.</i> , <i>Rhodella sp.</i> , <i>Botryococcus sp.</i> ,	0.94 – 22.34 <sup>d</sup>	(Markou and Nerantzis, 2013)

	<i>Dunaliella sp.</i> , <i>prokaryotic microalgae</i> , <i>Cyanothece sp.</i>		
Ficocianinas	<i>Anabaena sp.</i> , <i>Nostoc sp.</i> , <i>Phormidium valderianum</i> ,	8.3 – 20 °	(Markou and Nerantzis, 2013)
C - Ficocianinas	<i>Spirulina fusiformis</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>pirulina sp.</i>	9.5 – 46 °	(Markou and Nerantzis, 2013)
Ficobiliproteinas	<i>Spirulina sp.</i>	250 <sup>a</sup>	(Vuppaladadiyam et al., 2018)
a. mg.g <sup>-1</sup> ; b. nmol mg <sup>-1</sup> ; c. % en peso seco; d. gL <sup>-1</sup>			

## 2.5. Cultivos de Microalgas

Diversas especies de microalgas presentan un gran potencial para el cultivo a gran escala, lo que contribuiría al desarrollo de técnicas de producción de biomasa y generación de productos de alto valor con mayor rentabilidad y con menor impacto ambiental. Sin embargo, hasta el momento la información necesaria para realizar escalados a nivel industrial no es suficiente (Khan et al., 2018).

Las microalgas pueden cultivarse por diferentes métodos y condiciones, atendiendo sus necesidades básicas. Dichos requerimientos deben ser una fuente lumínica y una fuente de carbono para llevar a cabo la fotosíntesis, así como el suministro de otros compuestos nutricionales (especie-dependientes) como nitrógeno y fósforo, ya que representan desde el 10 hasta el 20% de la biomasa. Además, se debe considerar el uso de macronutrientes como Na, Mg, Ca y K, micronutrientes y elementos traza tales como Mo, Mn, B, Co, Fe y Zn (Khan et al., 2018). El correcto suministro de estos requerimientos nutricionales favorece al crecimiento óptimo de dichos microorganismos (Khan et al., 2018) .

Los sistemas de cultivo se han clasificado en dos grupos: sistemas abiertos y cerrados, la aplicación de cualquiera de los dos sistemas depende del producto de interés y el

diseño del mismo debe tomar en cuenta las especificaciones del proceso fotosintético, así como facilitar la transferencia del gas-líquido, suministro de iluminación y nutrientes óptima, mantener una facilidad de operación y costos de producción bajos, control en contaminación y temperatura (Arenas et al., 2017).

Dentro de los sistemas de cultivo abiertos la biomasa se encuentra expuesta al medio ambiente, son los más comunes a nivel industrial debido a que implican costos bajos, facilidad de construcción y mayor capacidad de producción en comparación con los sistemas cerrados (Geada et al., 2017; Hernández-Pérez and Labbé, 2014). Además, aprovechan la facilidad de adaptación de las microalgas al medio ambiente proveído y las condiciones climáticas para su cultivo (Arenas et al., 2017; Geada et al., 2017). Los diseños para los sistemas abiertos se clasifican en aguas naturales, estanques artificiales poco profundos, circulares o de canales (raceway) y sistemas de tipo inclinado (Geada et al., 2017), en donde los sistemas raceway son los más comunes. Dentro de las desventajas de los sistemas abiertos se encuentra la limitación de las células a luz, pérdidas por condiciones climatológicas principalmente por evaporación y la contaminación por depredadores y otros organismos, además de la necesidad de grandes extensiones de terreno (Geada et al., 2017).

Por otro lado, los sistemas de cultivo cerrados son aquellos en donde la biomasa se encuentra limitada en menor o ningún contacto con el medio externo disminuyendo la contaminación externa, además presentan un avance tecnológico superior ya que están diseñados para contrarrestar los principales problemas asociados con los sistemas abiertos, como mantener el control en las variables de cultivo como la temperatura y pH (Brennan and Owende, 2010). Este tipo de sistemas utiliza los denominados fotobiorreactores (FBR) los cuales están diseñados para aumentar la producción de biomasa. Los principales diseños de FBR se encuentran los tubulares, planos o en placas, agitados por burbujeo (tipo airlift), en diferente orientación (vertical/horizontal) con agitación por burbujeo y anulares, además de variantes como FBR tubulares con fuente de luz interna (Hernández-Pérez and Labbé, 2014). A pesar de las grandes ventajas que ofrece este tipo de sistemas es necesario optimizar y generar más información ya que su utilización a gran escala no es factible aún.



## **2.6. Modo de Operación de un Fotobiorreactor**

El modo de operación de un FBR consiste en la forma que es inoculado y operado, en base a esto se han clasificado como continuos, discontinuos y semi-continuos.

Los FBR operados de forma continua consiste en mantener de forma constante el volumen en un tiempo indefinido, se agrega medio de cultivo fresco y se extrae el producto a una velocidad constante (Geada et al., 2017). Este tipo de operación es la más utilizada a nivel industrial, ya que posee mayor control sobre las condiciones de cultivo lo que permite obtener una concentración de biomasa a una velocidad fija (Geada et al., 2017; Richmond, 2008).

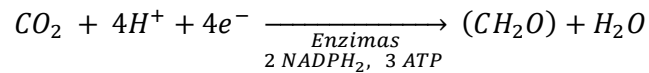
Por otro lado, los FBR discontinuos son aquellos donde la biomasa es cosechada al final y tienen un determinado tiempo de crecimiento. En este tipo de operación el crecimiento es detenido una vez que se alcanza la fase estacionaria. El cultivo discontinuo es utilizado principalmente por la facilidad de operación y manejo, además se caracteriza por mantener cultivos axénicos debido a la poca manipulación. Asimismo favorece la optimización de los parámetros de crecimiento (Geada et al., 2017; Katoh et al., 2015; Richmond, 2008; Santiago and M<sup>a</sup>, 2013).

Durante el cultivo semi-continuo se realizan varias cosechas del producto en diversos periodos principalmente para analizar o dar seguimiento al crecimiento, se debe mantener el volumen añadiendo medio de cultivo (Katoh et al., 2015; Santiago and M<sup>a</sup>, 2013) . En este método requiere de mayor manipulación y mantenimiento, pero provee de condiciones de operación más controladas y cercanas a sus valores óptimos. Sin embargo, se ha reportado que la adicción constante de medio de cultivo puede producir fenómenos de estrés e inducir fases de adaptación prolongadas reduciendo el rendimiento del sistema (Geada et al., 2017; Richmond, 2008; Santiago and M<sup>a</sup>, 2013).

## **2.7. Mecanismo de Fijación de CO<sub>2</sub> por Medio de la Fotosíntesis**

La fotosíntesis se lleva a cabo por medio de dos etapas una dependiente de la luz y otra independiente de la luz. Las reacciones de la fase oscura ocurren en los estromas de los cloroplastos. La fijación del CO<sub>2</sub> sucede durante la fase oscura utilizando el NADPH<sub>2</sub> y

ATP generado durante la fase dependiente de la luz, de forma general esta reacción se expresa como:



La primera reacción de esta etapa requiere de 2 moléculas de NADPH y 3 de ATP para fijar una de CO<sub>2</sub>. Esta reacción requiere de 5.2x10<sup>4</sup> J equivalente a 8 fotones de luz (Richmond, 2008).

En el ciclo de Calvin Benson ocurre la conversión del CO<sub>2</sub> en hidratos de carbono, mediada por 3 fases. En la primera fase denominada como carboxilasa, el CO<sub>2</sub> es aceptado por una molécula de 5 carbonos llamada ribulosa bifosfato (RUBP) en RUBISCO que es complejo enzimático que media las reacciones. La molécula de 6 carbonos resultante se divide en dos moléculas de 3- fosfoglicerato (3 - PG) por lo que el CO<sub>2</sub> ha sido fijado en un intermediario orgánico estable necesario para la siguiente fase. La segunda fase llamada reducción se requieren los intermediarios de alta energía química formados en la fase luminosa que son NADPH y ATP y ocurre por dos reacciones la fosforilación del 3-PG por ATP para formar 1,3-bifosfoglicerato y posteriormente su reducción por NADPH para formar gliceraldehído-2- fosfato, y a esos isómeros se les conoce como triosas fosfatos. Por último, la tercera fase es la regeneración de la ribulosa bifosfato para que esta pueda seguir aceptando moléculas de CO<sub>2</sub>. Esto involucra una serie de reacciones intermedias en las que primero el gliceraldehído 3-fosfato genera ribulosa 5-fosfato que posteriormente se fosforila para regenerar el RUBP mediante una molécula de ATP proveniente de las reacciones luminosas (Barsanti and Gualtieri, 2014; Mathews and Ahern, 2002; Richmond, 2008).

## 2.8. Reportes de Fijación de CO<sub>2</sub> con Microalgas

De acuerdo con el Instituto de Oceanografía de Scripps, los niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera son alarmantes ya que han llegado a alcanzar hasta 415 ppm, consecuencia de las diversas actividades antropogénicas, lo cual repercute en el calentamiento global y efecto invernadero. Según la Organización Meteorológica del Mundo (WMO), menciona que la concentración límite de CO<sub>2</sub> permitida en la atmósfera oscila los 367

ppm. Es por eso que se han implementado diversas técnicas de fijación donde se incluyen métodos físicos, químicos y biológicos, la cual esta última ha despertado un mayor interés (Wang et al., 2008).

La fijación biológica de CO<sub>2</sub> consiste en el uso de organismos con capacidad fotosintética como plantas y microalgas. Este método se ha considerado más factible debido a su bajo costo, mayor beneficio ambiental y la nula generación de contaminantes (Wang et al., 2008). La aplicación de microalgas sugiere ser una alternativa viable ya que pueden utilizarse diferentes fuentes de carbono, por ejemplo, CO<sub>2</sub> atmosférico, emisiones de plantas de energía y procesos industriales y así como carbonatos solubles (Brennan and Owende, 2010). Además, se ha reportado que estos microorganismos poseen mayores beneficios como son mayores tasas de fijación y crecimiento, así como mejor adaptabilidad ambiental, esto en comparación con las plantas terrestres (Klinthong et al., 2015).

Se ha estimado que algunas especies de microalgas pueden llegar a fijar 1.83 toneladas de CO<sub>2</sub> por cada tonelada de biomasa (peso seco) producida (Chisti, 2007). Sin embargo, el rendimiento de fijación a partir de estos microorganismos depende de factores como la especie de la microalga, las condiciones de cultivo como temperatura, pH, luz y disponibilidad de nutrientes (Chisti, 2007; Sandoval Herrera and Rubio Fernández, 2017), diseño y operación del FBR, la concentración de CO<sub>2</sub> y la resistencia a gases tóxicos de combustión (Klinthong et al., 2015).

Los gases emitidos por procesos de combustión contienen alrededor de 10-15% CO<sub>2</sub> y 100-300 ppm NO<sub>x</sub> y 280-320 ppm SO<sub>x</sub>, estos últimos provocan problemas de inhibición en algunas especies de microalgas cuando se utilizan concentraciones elevadas (Jiang et al., 2013). Especies de microalgas como *Chlorella sp.* logran tolerar concentraciones de hasta 300 ppm de NO debido a que este compuesto es absorbido por el medio de cultivo, no obstante, su adicción disminuye la tasa de crecimiento en la mayoría de las microalgas, pero no causa inhibición total (Cheah et al., 2015; Jiang et al., 2013; Klinthong et al., 2015). Por otro lado, en concentraciones de 150 ppm de SO<sub>2</sub> el crecimiento de la microalga se inhibe completamente, ya que este compuesto se hidroliza causando una reducción del pH en el medio de cultivo (Cheah et al., 2015).

El uso de CO<sub>2</sub> en los sistemas de cultivo de microalgas ha mostrado ser una estrategia factible, sin embargo, una adecuada selección de la cepa es de vital importancia ya que posee un efecto significativo en la eficacia y capacidad de este bioproceso (Chisti, 2007; Sandoval Herrera and Rubio Fernández, 2017). Estudios realizados por diversos investigadores muestran que las microalgas con mayor tasa de fijación y adaptabilidad son *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* y *Botryococcus braunii* (Sandoval Herrera and Rubio Fernández, 2017).

Las microalgas *Chlorella* se ha reportado que posee una producción de alrededor de 1.06 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, donde además logran tolerar concentraciones de hasta 40% CO<sub>2</sub> y condiciones de cultivo ácidas (pH 5-5.5) (Cheah et al., 2015), sin embargo, en concentraciones del 10% muestra mayor eficiencia fotosintética (35.51%) (Hu et al., 2016) y en 6.5% CO<sub>2</sub> se reporta una mejor tasa de fijación (2.22 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) (Anjos et al., 2013).

Por otro lado, las microalgas *Scenedesmus* muestran una tolerancia de hasta 80% CO<sub>2</sub>, con una producción de biomasa de 4.51 gL<sup>-1</sup> con 10% CO<sub>2</sub> y 3.82 gL<sup>-1</sup> en 20%, no obstante, la máxima producción de biomasa (5.17 gL<sup>-1</sup>) y fijación de CO<sub>2</sub> (0.889 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) la obtuvieron con suministro del 2% CO<sub>2</sub> (Jiang et al., 2013). Sin embargo, De Morais and Costa, (2007), reportaron que la productividad máxima alcanzada fue de 2.12 gL<sup>-1</sup> con 12% CO<sub>2</sub>. Por lo que se puede deducir que las condiciones de cultivo determinan la eficiencia en la conversión de CO<sub>2</sub> para la producción de biomasa aunque sea la misma especie de microalga (Cheah et al., 2015).

## CAPÍTULO 3

### METODOLOGÍA

#### 3.1. Estrategia experimental

La fase experimental de este proyecto consistió en tres fases. La Figura 2 detalla las etapas de la estrategia experimental descritas a continuación.

*1) Aislamiento, identificación y adaptación de las microalgas en un FBR tipo airlift (1L)*

Durante la primera fase se llevó a cabo el aislamiento de las microalgas a partir de una muestra de agua de acuario doméstico, posteriormente las microalgas aisladas se resembraron con la finalidad de adaptarlas a las condiciones proveídas. La identificación se realizó a partir de técnicas microscópicas, donde se observaron las estructuras microscópicas distintivas de la microalga, se obtuvieron imágenes de las mismas y se procesaron con el software ZEISS, posteriormente se compararon las morfologías encontradas con las reportadas en la base de datos AlgaeBase.

*2) Caracterización del crecimiento en función de la concentración del CO<sub>2</sub>, análisis de la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> y productividad de biomasa.*

La concentración de biomasa se obtuvo por medio de la correlación de los datos de densidad óptica a 560 nm con el peso seco. El análisis del efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> sobre la cinética de crecimiento de las microalgas se llevó a cabo en un FBR tipo airlift con volumen de 4.5L con adición de mezclas de aire con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (0%, 5%, 10%, 15% y 20%), se monitorearon los cultivos desde el inicio hasta la fase de estacionaria del crecimiento, además se determinó la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> y la productividad de biomasa utilizando las ecuaciones reportadas por Basu et al., (2015). Además, se utilizaron dos modelos matemáticos (modelo Gompertz modificado y logístico de crecimiento) para la obtención de los parámetros cinéticos.

### 3) Caracterización proximal de componentes en biomasa

Por último, se procedió a realizar la caracterización proximal de los componentes bioquímicos (lípidos, carbohidratos, pigmentos y porcentaje de humedad) contenidos en la biomasa, utilizando técnicas estandarizadas.

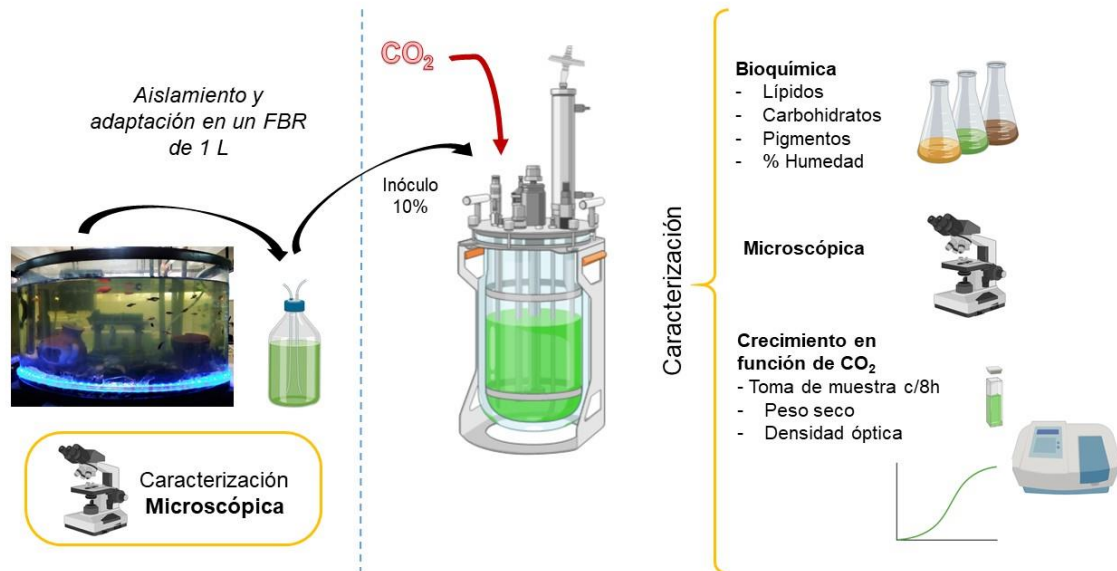


Figura 2. Estrategia experimental

### 3.2. Aislamiento y Adaptación de las Microalgas

Se realizó un aislamiento a partir de una muestra de agua (50 ml) proveniente de un acuario doméstico. Se inocularon en 750 ml de medio de cultivo líquido F/2 de Guillard (Guillard, 1975), su composición se muestra en la tabla 2.

Se utilizó un FBR de vidrio con burbujeo tipo airlift de un volumen de alimentación de 1L. Se mantuvo aireación constante e iluminación por 24 h utilizando 3 lámparas LED de 4.0 W de luz blanca. Se analizó el crecimiento observando los cambios en la densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro UV-3100PC hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, posteriormente se realizó una resiembra bajo las mismas condiciones de cultivo.

**Tabla 2. Composición del medio de cultivo F/2 de Guillard.**

<b>Nutrientes mayores (gL<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>	
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )	75.0
Fosfato de sodio (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	5.0
<b>Silicatos (gL<sup>-1</sup>)<sup>b</sup></b>	
Silicato de sodio (NaSiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O)	25.0
<b>Micronutrientes (gL<sup>-1</sup>)<sup>c</sup></b>	
Sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	0.98
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	2.2
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	1.0
Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	18.0
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	0.63
Cloruro férrico (FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O) <sup>e</sup>	3.15
EDTA disódica (Na <sub>2</sub> EDTA) <sup>f</sup>	4.36
<b>Vitaminas (g/100 ml)<sup>d</sup></b>	
Biotina (B6)	0.1
Cianocobalamina (B12)	0.1
Tiamina (B1)	0.2
<p><b>a, b, c, d.</b> Añadir 1 ml de cada solución por litro de agua destilada  <b>e y f.</b> Disolver todo el reactivo Na<sub>2</sub>EDTA, posteriormente agregar FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O.  Luego agregar los demás compuestos en el orden marcado.</p>	

### 3.3. Caracterización Microscópica

La caracterización estructural microscópica se realizó a partir de frotis húmedos (Figura 3), siguiendo la metodología reportada por Viramontes-Ramos y Portillo-Ruiz, (2010) con modificaciones. Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo en diferentes intervalos de crecimiento, se colocaron sobre un portaobjetos que posteriormente fue cubierto con un cubreobjetos. Para evitar la desecación de las muestras en los frotis se sellaron con esmalte acrílico. Cada frotis preparado adecuadamente se observó en un microscopio óptico Zeiss PrimoStar utilizando los objetivos 10X, 40X, se colocó una gota de aceite de inmersión para el uso del objetivo 100X, se obtuvieron imágenes utilizando la cámara AxioCam ERc5c, procesadas en computadora con el software ZEISS.

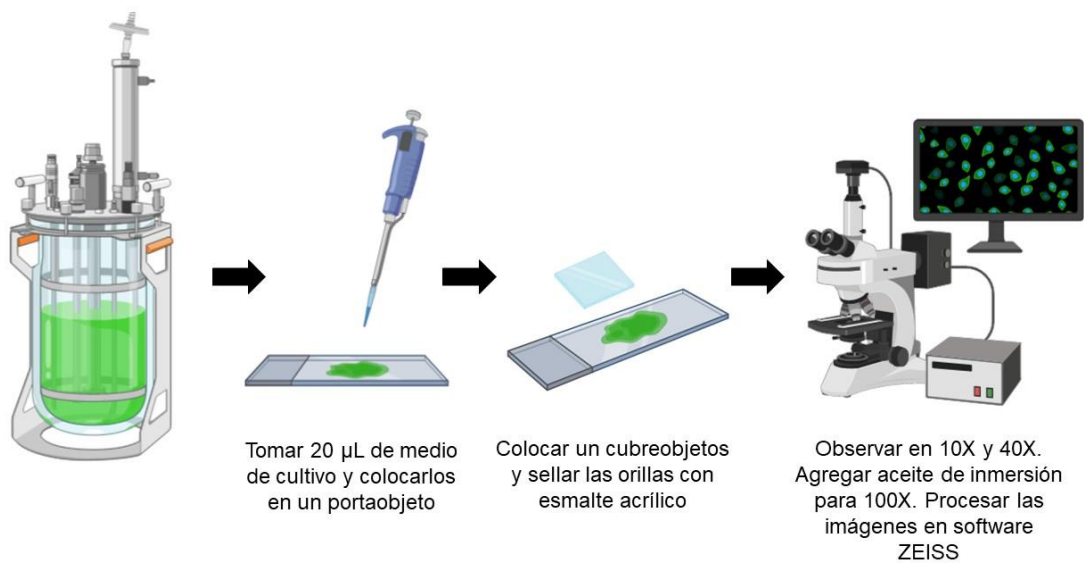


Figura 3. Caracterización microscópica por frotis húmedos



### **3.4. Caracterización del Crecimiento en Función del CO<sub>2</sub>**

#### **3.4.1. Operación del FBR Semi-Continuo Tipo Airlift**

Para el análisis del efecto de la concentración del CO<sub>2</sub> sobre la cinética de crecimiento de las microalgas aisladas y adaptadas, se utilizó un FBR de vidrio con burbujeo de aire tipo airlift, operado en forma semi-continua con un volumen de 4.5 L. Se empleó el medio de cultivo f/2 de Guillard más 5% de inóculo inicial de la muestra de microalgas. La iluminación se mantuvo 24 h por medio de 3 lámparas LED de 4.0W de luz blanca. Mientras que la aireación se preservó de manera constante a un volumen de alimentación de 1 L min<sup>-1</sup> con inyección de diferentes mezclas de aire con CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, donde se consideraron los porcentajes de emisión de gases por procesos de combustión (10-15% CO<sub>2</sub>) (Jiang et al., 2013).

#### **3.4.2. Medición de Densidad Óptica**

La concentración celular de las muestras experimentales se determinó por medio de la medición de la densidad óptica (DO), debido a que es una medida rápida e inmediata que ofrece mucha información del cultivo. La obtención de la absorbancia se muestra en la Figura 4. Se realizó la calibración del equipo espectrofotómetro UV-3100PC a la longitud de onda 560 nm, se utilizó como blanco agua destilada en celdas de vidrio. Luego se homogenizó la muestra en vortex por 15 segundos, posteriormente se tomaron 3 ml de agua destilada y se colocaron en celdas de vidrio. Después se procedió a realizar la lectura de las muestras y se registraron los datos de absorbancia. Se construyó un gráfico con los datos obtenidos (absorbancia 560nm vs tiempo (h)), para observar los cambios en la densidad óptica y graficar las fases de crecimiento. Este método reportado por Alvarez et al., (2017) con modificaciones.

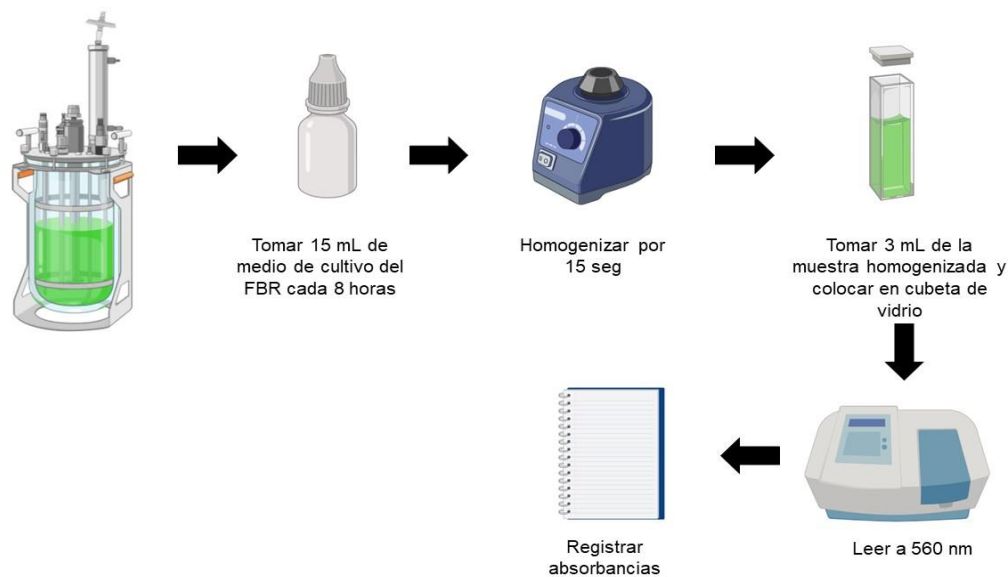


Figura 4. Medición de la densidad óptica.

### 3.4.3. Determinación de Peso Seco

La concentración de biomasa se calculó como el peso seco de los sólidos presentes en la muestra de medio de cultivo microalgal. En la Figura 5, se muestra la técnica estandarizada para la obtención de peso seco utilizando como referencia el método reportado por Arredondo-Vega y Voltolina, (2007) con modificaciones.

Primero, las muestras se homogenizaron en vortex durante 1 min, luego se filtraron al vacío de la muestra (15 ml) a través de una membrana Millipore con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro, previamente secada en estufa a 80°C por 6 horas, atemperado en un desecador y tarada en una balanza analítica. Luego del proceso de filtrado se procedió a pesar las membranas con muestra con el objetivo de obtener el peso húmedo (Ec. (1)). Posteriormente se secaron en estufa a 80°C por 6 horas, después de ese tiempo se dejaron reposar en un desecador hasta enfriar a temperatura ambiente, luego se procedió a pesar.

$$\text{Peso Húmedo } \left(\frac{g}{L}\right) = (\text{Peso membrana con muestra húmeda}) - (\text{Peso membrana seca sin muestra}) \text{ Ec. (1)}$$

El peso seco se determinó por medio de la diferencia entre el cultivo húmedo y seco, utilizando la Ec. (2).

$$\text{Peso Seco } \left(\frac{g}{L}\right) = \left( \frac{\text{Peso membrana seca sin muestra} + (\text{Peso membrana con muestra seca})}{\text{Volumen de muestra (L)}} \right) \quad \text{Ec. (2)}$$

Posteriormente se realizó un análisis de correlación entre las medias de densidad óptica y los valores de pesos seco. Con estos datos se construyeron los gráficos de crecimiento en función del tiempo.



Figura 5. Determinación de peso seco

### 3.4.4. Obtención de Parámetros Cinéticos

Para la obtención de los parámetros cinéticos se utilizaron los modelos matemáticos: modelo Gompertz modificado Ec. (3) y Logístico de crecimiento Ec. (4), donde los datos experimentales se ajustaron por medio de regresión no-lineal a dichos modelos.

$$X = X_{\infty} e^{-X_0 e^{-\mu t}} \quad \text{Ec. (3)}$$

$$X = \frac{X_0 e^{\mu(t-t_{lag})}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu(t-t_{lag})}} \quad Ec. (4)$$

Donde:

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento

$X_0$  = La concentración celular inicial

$X_\infty$  = Concentración celular en la fase estacionaria

$t_{lag}$  = Tiempo de acondicionamiento retraso

$t_d$  = Tiempo de doblado

$R^2$  = Coeficiente de determinación

### 3.4.5. Productividad de la Biomasa

La productividad se define como la estimación de la concentración de biomasa producida con respecto al tiempo, se calcula mediante el uso de la Ec. (5) reportada por Basu et al., (2015).

$$Productividad (gL^{-1}d^{-1}) = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad Ec. (5)$$

Donde:

$\Delta X$  = Variación de la concentración de biomasa

$\Delta t$  = Variación en el tiempo de cultivo

### 3.4.6. Tasa de Fijación de CO<sub>2</sub>

La tasa de fijación de CO<sub>2</sub> se calculó en base a la productividad de biomasa y el contenido de carbono (51.39%) tomando como base la fórmula molecular de biomasa

de microalgas  $\text{CO}_{0.48}\text{H}_{1.83}\text{N}_{0.11}\text{P}_{0.01}$  reportada por Basu et al., (2015). El cálculo se llevó a cabo mediante la Ec. (6).

$$\text{Tasa de fijación de } \text{CO}_2 (\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}) = 1.88 * \text{Productividad} \quad \text{Ec. (6)}$$

Donde:

*Productividad* = Productividad de biomasa ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )

Con 1.88 = Contenido de carbono en biomasa.

### **3.5. Caracterización de la Composición Proximal de la Biomasa**

#### **3.5.1. Cosecha de Biomasa Microalgal Total**

La recolección de la biomasa microalgal depende principalmente de la densidad de la suspensión de la biomasa y de las características de la microalga (Mata et al., 2010). Se le llamó cosecha de biomasa microalgal total a la suma de biomasa obtenida a la finalización de todas las corridas experimentales (0%, 5%, 10%, 15% y 20% de  $\text{CO}_2$ ). El proceso se dividió en dos etapas, en la primera etapa se dejó sedimentar la biomasa por 3 días a temperatura ambiente en un recipiente sellado, posteriormente se decantó el medio de cultivo cuidando no desechar la biomasa concentrada en el fondo. En la segunda etapa se centrifugó la biomasa a 5000 rpm por 10 min, desechando el medio de cultivo y cuidando no desechar la pastilla de biomasa concentrada. La biomasa se almacenó en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$ , utilizando como referencia la técnica de recolección de biomasa reportada por Nayak et al., (2016) con modificaciones.

#### **3.5.2. Determinación de Lípidos**

Se utilizó el método reportado por Bligh and Dyer, (1959) con adaptaciones realizadas por Arredondo-Vega and Voltolina, (2007) para la extracción de lípidos totales de microalgas. Esta técnica consiste en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua donde se extrae la mayoría de lípidos contenidos.

El proceso consistió en colocar 1g de biomasa seca, se adicionó 30 ml de la mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2) más 4 ml de agua, luego se sónico durante 15 min por 3 ciclos en baño de agua, se utilizó el sonicador/baño ultrasónico de 5.6 L marca Branson. Posteriormente se incubó la mezcla por 24 h a 4°C en ausencia de luz. Al finalizar periodo de incubación, se procedió a sonicar por 15 min bajo las condiciones previamente descritas, se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min a 5°C. Se recuperó el extracto en un tubo limpio con pipeta Pasteur y se repitió el proceso con la biomasa sobrante, se adicionaron 15 ml de la mezcla de solventes más 2 ml de agua y se agitó por medio de vortex durante 1 min, se centrifugó bajo las mismas condiciones descritas previamente, se recuperó el extracto en un tubo. Luego, se agregaron 20 ml de solución salina de 0.58% NaCl al tubo con el extracto, se homogenizó en vortex por 1 min, se centrifugó a 4500 rpm durante 10 min a 5°C, se recuperó la fase inferior colocándola en un tercer tubo previamente llevado a peso constante. Se secó la fase clorofórmica: lípidos recuperada en baño maría a 70°C dentro de la campana de extracción, se colocó en desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se pesó el tubo con el contenido. Por último, se realizó la cuantificación de lípidos totales mediante gravimetría como se describe en la Ec. (7).

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} * 100 \quad \text{Ec. (7)}$$

Donde:

$W_3$  = Peso del tubo con lípidos

$W_2$  = Peso del tubo vacío

$W_1$  = Gramos de biomasa

### 3.5.3. Determinación de Carbohidratos

Se determinaron los carbohidratos totales por espectrofotometría de luz visible utilizando el método fenol-ácido sulfúrico reportado por (Dubois et al., 1956). Se realizó una extracción de carbohidratos ácida, donde se utilizó 0.1 g de biomasa seca, en campana de extracción, se agregó 1 ml de fenol al 5% más 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado

por las paredes del tubo de manera lenta, se homogenizó la muestra con varilla de vidrio y se reposó por 5 min. Posteriormente se colocaron en baño de agua fría durante 10 min con la finalidad de enfriar la reacción a temperatura ambiente y medir la absorbancia. Previamente se realizó una curva de calibración utilizando como estándar una solución de 100 mgL<sup>-1</sup> de glucosa anhidra, a partir de esta se preparó un gradiente de concentración de 0 a 100 mgL<sup>-1</sup>, como se muestra en la Tabla 2 y bajo las mismas condiciones que la muestra. Se midió la absorbancia de las muestras a 485 nm en un espectrofotómetro UV-3100PC, se utilizó un blanco preparado con el mismo tratamiento que las muestras, sustituyendo la glucosa anhidra por agua destilada.

El porcentaje de carbohidratos se determinó utilizando la Ec. (8):

$$\text{Carbohidratos (\%)} = \frac{\left[ \frac{[m * Abs_{492}]}{V_m} * V_E \right]}{P_s} * 100 \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde:

$m$  = Valor de la pendiente de la curva de calibración

$Abs_{492}$  = Absorbancia a 492 nm

$V_m$  = Volumen de la muestra (mL)

$V_E$  = Volumen del extracto (mL)

$P_s$  = Peso seco de la muestra (mg)

**Tabla 3. Preparación de la curva de calibración.**

	Concentración Glucosa [ mg/mL]	μL Stock glucosa anhidra [100 mg/mL]	μL Agua destilada
Blanco	0	0	1000
1	10	100	900
2	20	200	800
3	30	300	700
4	50	500	500
5	70	700	300
6	90	900	100
7	100	1000	0

Se construyó un gráfico (Figura 5) con los datos de concentración de glucosa mostrados en la Tabla 2 vs absorbancia, ajustando por mínimos cuadrados a una ecuación lineal obteniendo una  $R^2 = 0.992$  y como ecuación de la recta  $y = 0.012x$ , de donde  $m = 0.012$ .

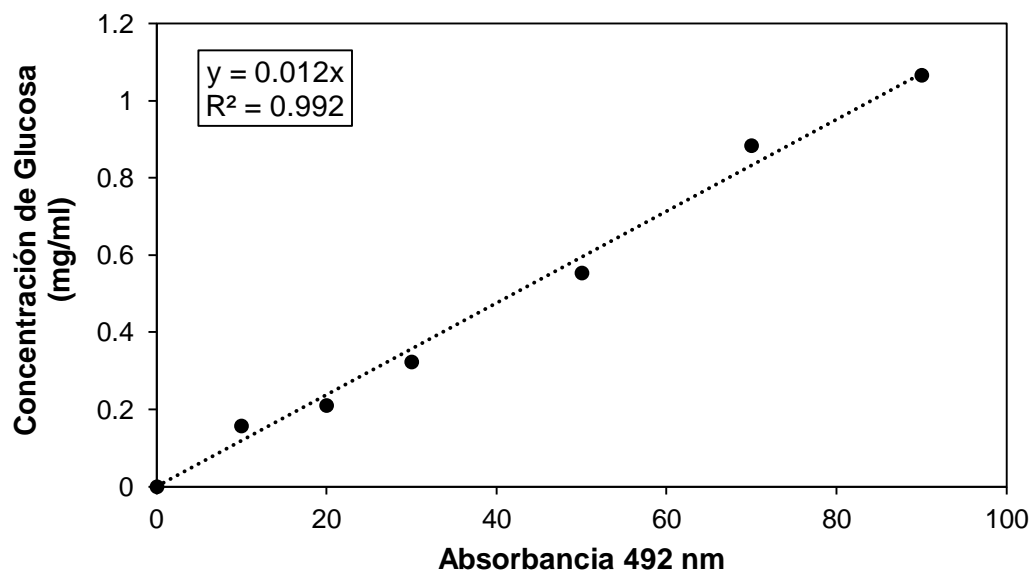


Figura 6. Curva de calibración de carbohidratos totales.



### 3.5.4. Determinación de Pigmentos Fotosintéticos

La extracción de los pigmentos fotosintéticos se realizó mediante la técnica de separación por reparto entre disolventes, el cual permite separar en función de su solubilidad en distintos líquidos inmiscibles (Harris, 2001).

Primero se realizó una extracción por lixiviación, el cual consiste en agregar 10 ml de etanol a 0.05 g de biomasa seca, se taparon los tubos y se calentó en baño maría durante 5 min. Luego se vierte el extracto con pigmentos en otro tubo de ensaye, permitir que se enfríe la solución. Para verificar la obtención total de pigmentos, se agregaron 10 ml de etanol al tubo con la muestra y se calentó nuevamente. Posteriormente se preparó una porción analítica y se procedió a leer la absorbancia a 645 y 665 nm en espectrofotómetro UV-3100PC, realizando una dilución para su análisis.

Durante la segunda parte del método de separación, se colocaron en un embudo de separación 10 ml de hexano y el extracto de pigmentos obtenido en la primera fase. Se agitó la mezcla hasta permitir la separación de dos fases. Posteriormente se añadió agua destilada hasta que la fase inferior quede sin pigmentos descartando esta fase. En la fase sobrante, se agregaron 10 ml de metanol 92% v/v, se agitaron y se reposó hasta que se separaron las dos nuevas fases. Se recuperó la capa metanólica en un tubo de ensaye limpio y rotulado. Posteriormente se añadieron 5 ml de KOH-metanólico al 30% (p/v) a la capa de hexano el cual contenía clorofilas  $\beta$  y xantofilas, se agitó y se permitió que se separen las dos nuevas fases. Se recuperaron ambas fases, la capa inferior con contenido de clorofila  $\alpha$  y la capa superior con carotenos. La capa metanólica recuperada previamente se colocó nuevamente en el embudo de separación, se agregaron 5 ml de KOH-metanólico al 70% (p/v) y 2 ml de agua destilada. Se permitió la separación de dos nuevas fases. Se recuperó la fase inferior con contenido de clorofila  $\beta$  y la fase superior con contenido de xantofila se colocó en diferentes tubos de ensaye previamente rotulados. Se preparó una porción analítica de cada tubo en diferentes celdas de espectrofotómetro. Se midió la absorbancia a la longitud de onda correspondiente para cada componente por separado (665 nm para clorofilas  $\alpha$ , 645 nm para clorofila  $\beta$ , 475 nm para xantofilas y 435 nm para carotenos). Se registraron los valores de cada determinación.

La Figura 7 muestra el proceso de extracción de pigmentos fotosintéticos en microalgas de acuerdo con la metodología reportada por Harris, (2001).

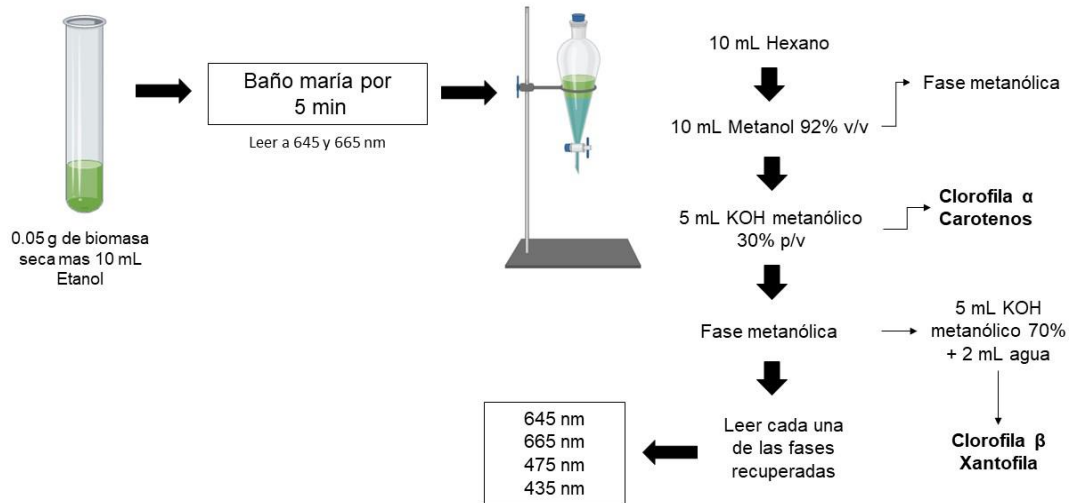


Figura 7. Extracción de pigmentos fotosintéticos en microalgas

Se calculó la concentración de cada componente ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) utilizando las *Ecs.* (9-12).

$$\text{Clorofila } \alpha = 12.7 (Abs_{665}) - 2.69 (Abs_{645}) \quad \text{Ec. (9)}$$

$$\text{Clorofila } \beta = 22.9 (Abs_{645}) - 4.68 (Abs_{665}) \quad \text{Ec. (10)}$$

$$\text{Carotenos} = 255 (Abs_{435}) \quad \text{Ec. (11)}$$

$$\text{Xantofilas} = 212 (Abs_{475}) \quad \text{Ec. (12)}$$

Los valores de la concentración de cada pigmento se reportaron en  $\text{mg g}^{-1}$ .

### 3.5.5. Determinación del Porcentaje de Humedad

Para la determinación del porcentaje de humedad removida, se distribuyeron  $\sim 0.2$  g de biomasa humedad, la cual se distribuyó en un plato de aluminio de peso conocido

(previamente secado a 80°C por 24 h). Posteriormente se pesó la muestra en la charola, luego se colocó en la estufa a 80°C para su secado. Se retiró de la estufa y se colocaron en un desecador para enfriarse y se pesó tan pronto como se alcanzó la temperatura ambiente. Se repitió este paso cada 2 min, registrando el peso hasta alcanzar el equilibrio (Nielson, 2003). El porcentaje se calculó utilizando la Ec. (13), reportándolo como pérdida por secado a 80°C, de acuerdo con Nielson, (2003).

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m} * 100 \quad \text{Ec. (13)}$$

Donde:

$m_1$  = Peso del plato + muestra húmeda

$m_2$  = Peso del plato + muestra seca

$m$  = Peso de la muestra

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Aislamiento y Adaptación de las Microalgas

El aislamiento se llevó a cabo a partir de una muestra de agua proveniente de un acuario en un FBR tipo airlift de 1L bajo las condiciones descritas, observando el crecimiento. Se obtuvo el crecimiento después de 6 días, se observó un cambio de pigmentación en el medio de cultivo y formación de biopelícula verde en las paredes del FBR como se muestra en la Figura 8. Después de haber obtenido el aislamiento se procedió a realizar la adaptación, en donde el crecimiento se logró obtener en 4 días con un aumento de biomasa con respecto al tiempo.



Figura 8. Aislamiento de microalgas de acuario doméstico en un FBR de 1.0 L.

t (

Se observaron las características microscópicas para corroborar la presencia de microalgas. Se identificaron diferentes morfologías microscópicas en las cuales se logró observar células unicelulares con pigmentación verde a café con formas ovoides con puntas apicales y rectangulares con un extremo más angosto. Los organelos se encontraron en dirección hacia la periferia y centro de la célula, con paredes celulares

gruesas. Además, se observaron colonias de microalgas en forma de abanico y microalgas filamentosas ramificadas con pigmentación verde, los organelos ocupan aproximadamente la mitad de la célula. La Figura 9 muestra las diferentes estructuras microscópicas encontradas.

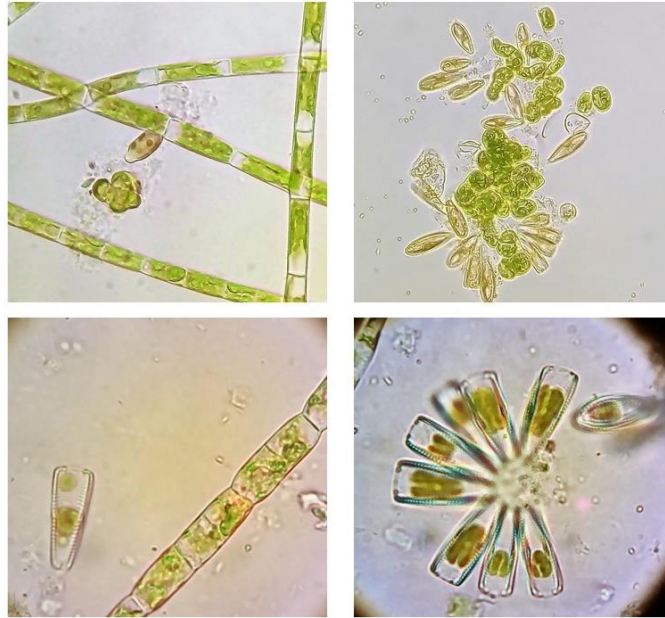


Figura 9. Caracterización microscópica de microalgas en fase de aislamiento y adaptación.

Durante la fase adaptación se identificaron a las microalgas del filo *Chlorophyta* y *Ochrophyta*. Las imágenes obtenidas se compararon en las bases de datos de microalgas [AlgaeBase.org](http://AlgaeBase.org) y [keweenawalgae.mtu.edu](http://keweenawalgae.mtu.edu). La Figura 10 muestra las especies dentro del filo *Ochrophyta*, donde se encontró similitud estructural con las microalgas de la clase *Bacillariophyceae* mejor conocidas como diatomeas, principalmente con las especies *Cymbella sp.* (Figura 10A), *Encynema sp.* (Figura 10B), *Navicula sp.* (Figura 10C), *Gomphonema sp.* (Figura 10D). Además, se relacionó a las microalgas filamentosas ramificadas podrían pertenecer a la clase *Chlorophyta*, especies *Characium sp.* (Figura 10E) y *Stigeoclonium sp.* (Figura 10F). Sin embargo, solo se logró conservar a las microalgas *Chlorophytas*.

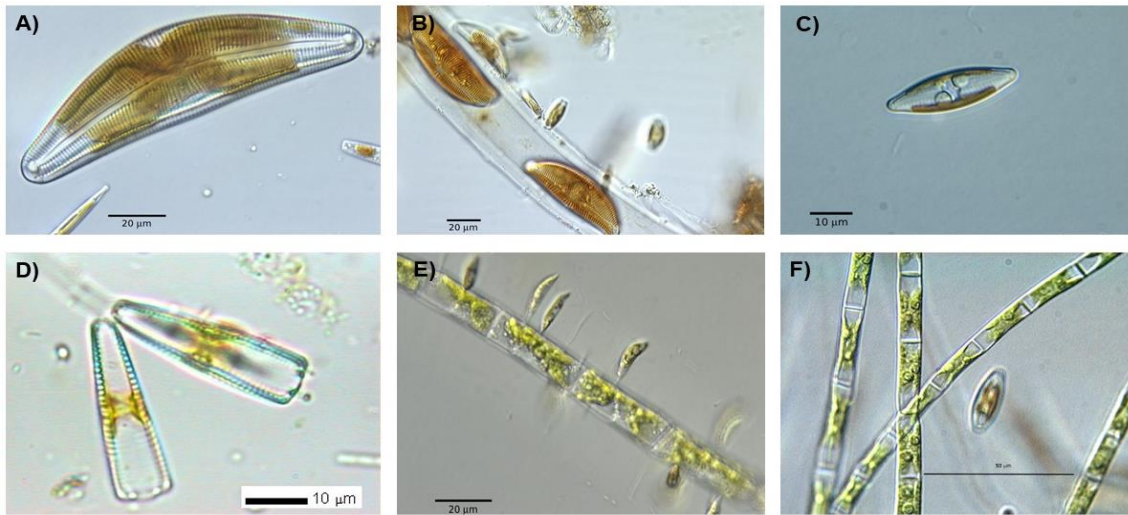


Figura 10. Microalgas de la clase *Bacillariophyceae*: A) *Cymbella* sp. B) *Encynema* sp. C) *Navicula* sp. D) *Gomphonema* sp. Microalgas filamentosas ramificadas de la clase *Chlorophyta*: E) *Characium* sp. y F) *Stigeoclonium* sp.

De acuerdo a Ramos and Ruiz, (2009) las diatomeas son catalogadas como bioindicadores de contaminación orgánica en ambientes acuáticos. Estos organismos para su óptimo crecimiento requieren concentraciones elevadas de silicio, esto les proporciona control en la estacionalidad, además, se ha reportado que en concentraciones bajas la concentración de diatomeas decrece y son remplazadas por otras microalgas.

Por otro lado, estos microorganismos secretan mucilagos para facilitar la colonización de otros microorganismos en el ambiente (Ramos and Ruiz, 2009). Es por ello que la falta de silicio en el medio de cultivo utilizado durante el aislamiento y adaptación justifica la desaparición de las microalgas diatomeas en este estudio.

#### 4.2. Caracterización microscópica de las microalgas *Chlorophyta*

Las microalgas *Chlorophytas* fueron adaptadas en las condiciones descritas para el FBR tipo airlift de 4.5 L. Se observaron en diferentes tiempos para corroborar su adaptación y crecimiento. Se identificaron tres morfologías microscópicas diferentes (Figura 11). La Figura 11A muestra un conjunto de 4 células elipsoidales con centro aplanado y alargado de aproximadamente 0.4  $\mu\text{m}$ , pirenoides circulares en el centro de las células, poseen espinas que se proyectan al exterior. Mientras que la segunda morfología presenta

microalgas unicelulares elipsoidales con pigmentación verde sin presencia de flagelos, tamaño aproximado de 0.015  $\mu\text{m}$ , pirenoide con forma circular al centro y organelos en los extremos de la célula con un espacio central libre, como se muestra en la Figura 11B. Por otro lado, la Figura 11C, muestra células unicelulares con dorso curvo y margen ventral parcialmente recto con un tamaño aproximado de 0.3  $\mu\text{m}$ , flagelos no visibles y presencia de pirenoide ubicado al centro mientras que los organelos distribuidos en las puntas de la célula.

Se compararon las morfologías encontradas en las diferentes bases de datos, se encontró similitud con las microalgas del género *Scenedesmus.sp*, principalmente con las especies *Scenedesmus quadricauda* (Figura 11D), *Scenedesmus obliquus* (Figura 11E) y *Scenedesmus dimorphus* (Figura 11F) respectivamente.

Las microalgas *Scenedesmus sp.* son células unicelulares inmóviles con pigmentación verde, comúnmente se encuentran en cenobios de 4 a 8 células con forma esférica, elipsoidal o fusiforme con presencia de espinas (Gour et al., 2016). La diferenciación dentro de este género es por la presencia, tipo y número de espinas, además de la conformación de la pared celular, también las condiciones ambientales determinan el fenotipo que expresarán (Lürling, 2003).



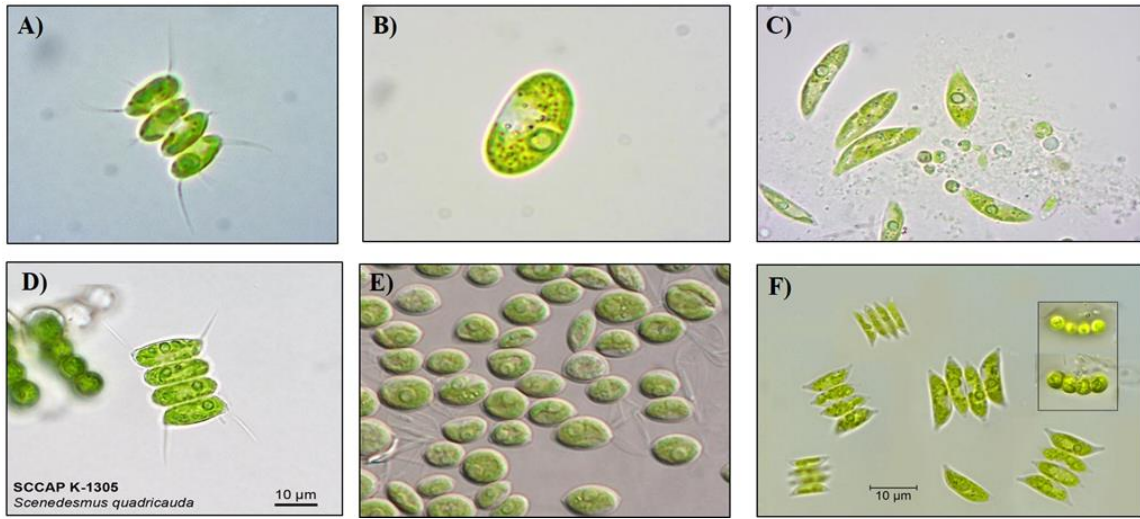


Figura 11. Caracterización microscópica de las microalgas Chlorophytas por comparación morfológica reportadas. A), B) y C) microfotografías de microalgas de muestra caracterizada. D) Fotografía de *Scenedesmus quadricauda* proporcionada por Swedish Meteorological and Hydrological Institute (SMHI). E) *Scenedesmus obliquus* proporcionada por Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA). F) *Scenedesmus dimorphus* proporcionada por Algaebase.org

### 4.3. Caracterización de Componentes Bioquímicos

Dentro de los beneficios que se pueden obtener de los sistemas de cultivo microalgales es la recuperación de productos de valor añadido a partir de la biomasa producida, sin embargo su concentración depende de múltiples factores como temperatura, composición del medio de cultivo e iluminación, entre otros (Kroumov et al., 2017). Se realizó la cuantificación de diferentes componentes bioquímicos como son lípidos, carbohidratos, pigmentos y porcentaje de humedad contenidos en la biomasa recuperada mediante técnicas estandarizadas. La tabla 4 detalla la composición de la microalga *Scenedesmus sp.*

Tabla 4. Composición proximal en microalga *Scenedesmus sp.*

Componente bioquímico	Concentración
Lípidos <sup>a</sup>	21.85%
Carbohidratos <sup>b</sup>	31.09%
Humedad removida <sup>c</sup>	22.73%



Pigmentos fotosintéticos <sup>d</sup>	
• Clorofilas totales	14.301
• Clorofila $\alpha$	10.008
• Clorofila $\beta$	4.293
• Carotenos	16.986
• Xantofilas	0.246

---

**a, b, c.** % en peso seco

**d.** mg/ g en peso seco

---

#### 4.3.1. Determinación de Lípidos

Para la determinación de lípidos se utilizó el método Bligh & Dyer adaptado para biomasa microalgal, se obtuvo una concentración de 21.86% de lípidos en peso seco. En la Tabla 5 se observa la cantidad de lípidos reportadas para las diferentes especies de *Scenedesmus sp.*, por ejemplo, Maity et al., (2014) reportaron que la microalga *Scenedesmus sp.* contiene alrededor de 16 a 40%, sin embargo, se ha demostrado que la concentración lipídica está influenciada por las condiciones de cultivo principalmente por la concentración de nitrógeno, fósforo y potasio.

Por otro lado, Nayak et al., (2016), obtuvieron una concentración de lípidos de 23.1% utilizando aguas residuales domésticas como medio de cultivo, mientras que Ho et al., (2010) aplicó diferentes estrategias para optimizar la concentración de lípidos en *Scenedesmus obliquus* CNW-N, combinando procesos de fijación de CO<sub>2</sub> y producción de biodiesel obtuvieron 38.9% lípidos por peso seco de biomasa y Kent et al., (2015) reportó una concentración de lípidos de 15.07% en la microalga *Scenedesmus sp.* concluyendo su posible uso en el áreas fármaco- alimenticias.

Para la síntesis de lípidos son necesarias las moléculas precursoras acetyl-CoA y piruvato, las cuales son productos de las reacciones producidas durante el ciclo de Calvin-Benson, donde se realiza la fijación de CO<sub>2</sub>, es por ello que se ha estudiado la relación entre la síntesis de lípidos y la fijación de CO<sub>2</sub> (Fernández-Linares et al., 2012). Tomando en cuenta que la síntesis es influenciada por diversos factores abióticos como la concentración de nutrientes principalmente compuestos nitrogenados, pH,

temperatura, cantidad de luz, salinidad, factores operacionales y concentración CO<sub>2</sub> (Peñaranda et al., 2013; Yu et al., 2011), nosotros inferimos que las condiciones proveídas en el cultivo a lo largo de toda la etapa experimental favorecieron la acumulación de lípidos en las células de las microalgas, sugiriendo su posible uso en áreas energéticas y alimenticias.

**Tabla 5. Contenido de lípidos en microalgas.**

<b>Especie microalga</b>	<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Lípidos (%)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Scenedesmus sp.</i> DM	Medio de cultivo BG11, incubación (25°C) con inyección 5% CO <sub>2</sub> e iluminación continua en agitador orbital	19.6	(Rodolfi et al., 2009)
<i>Scenedesmus sp.</i> F&M-M19		21.1	
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	Medio de cultivo Detmer's, (28°C) con inyección de 10% CO <sub>2</sub>	38.9	(Ho et al., 2010)
<i>Scenedesmus sp.</i>	Medio de cultivo Basal Bold (25°C) pH 7.5–8.5 por inyección de CO <sub>2</sub> y regímenes de iluminación luz:oscuridad 18:6 h	15.07	(Kent et al., 2015)
<i>Scenedesmus sp.</i>	---	16.0 – 40.0	(Maity et al., 2014)
<i>Scenedesmus sp.</i>	Agua residual doméstica (25°C) con inyección de (0.03%,1%,2.5% 5% y 10%) CO <sub>2</sub>	23.1	(Nayak et al., 2016)

#### **4.3.2. Determinación de Carbohidratos**

A partir de la técnica estandarizada de fenol-ácido sulfúrico, se logró obtener 31.09% de carbohidratos totales contenidos en biomasa seca. Diversos autores mencionan que la concentración de carbohidratos al igual que de lípidos puede variar conforme a las condiciones de cultivo, donde se destaca que la limitación de nutrientes o el cambio de fase de crecimiento tienden a aumentar su concentración. Por ejemplo, Pancha et al., (2015), lograron obtener 35.91% de carbohidratos totales bajo condiciones de estrés

salino con la microalga *Scenedesmus sp.*, y reportan que la productividad de biomasa disminuye bajo esta condición, posiblemente por la síntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular como prolina, glicina, entre otros, destacando además que el choque osmótico provocado por la salinidad aumenta la actividad en la respiración celular y por lo tanto la degradación de otros compuestos de almacenamiento como lípidos. Otro estudio propone el uso de la microalga *Scenedesmus sp.* como suplemento alimenticio debido a la obtención de carbohidratos totales por encima del 27% (Kent et al., 2015), mientras que Patil and Kaliwal, (2017) observaron un incremento gradual de 6.88 a 26.19% en el contenido de carbohidratos en la microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* a medida que la concentración del CO<sub>2</sub> aumentó.

Nuestros resultados son comparables con lo encontrado en estos estudios, a pesar de que no se implementó alguna estrategia de cultivo específica para la producción de carbohidratos, por lo que se puede deducir que bajo el conjunto de las condiciones utilizadas la microalga *Scenedesmus sp.* podría tener un uso similar, ya sea en áreas de nutrición, farmacéutica, entre otras.

#### **4.3.3. Determinación del Porcentaje de Humedad**

Se determinó el porcentaje de humedad contenido en la biomasa de la microalga *Scenedesmus sp.* mediante el secado en estufa a 80°C. Se analizó la pérdida de humedad contenida en la biomasa a través del tiempo. Se obtuvo una humedad inicial del 77.60% y luego de 3 h 43 min se logró obtener un porcentaje de 23.36% aplicando las condiciones descritas para dicha determinación. Se observó que la biomasa perdió más de la mitad de la humedad contenida en 2 minutos 37.23% y se logró la estabilización después de 13 min, como se detalla en la Figura 12.

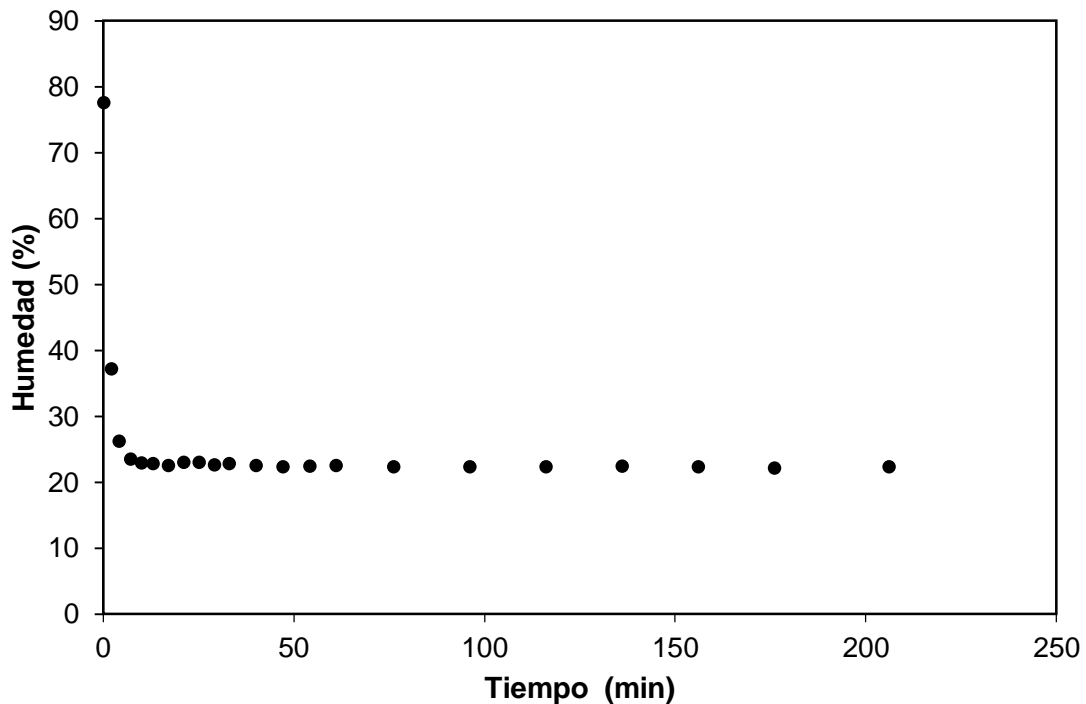


Figura 12. Pérdida de humedad a través del tiempo en la biomasa de microalga *Scenedesmus sp.*

De acuerdo con Kent et al., (2015), reportó un porcentaje de humedad de 0.71% determinado gravimétricamente con el uso de un horno de secado durante 2 h a 100°C. Por otro lado Bagchi et al., (2015) reportaron un protocolo de secado en horno para la recuperación de lípidos de la microalga *Scenedesmus sp.*, tomando variables como temperatura y tiempo de secado, así como el espesor de la muestra, obtuvieron un contenido de humedad del 10% con temperatura de 80°C con un periodo de secado de 8 -10 h con una recuperación de lípidos del 93%.

El proceso de secado de la biomasa recuperada es de vital importancia debido a que se debe preservar la integridad de los componentes, en áreas alimenticias la presencia de agua puede fomentar la actividad microbiológica y el deterioro del producto, en cambio, en áreas energéticas la cantidad de agua obstruye producción generación de biodiesel y además aumenta el costo de producción ya que el proceso de secado puede llegar a ser costoso y requerir gran cantidad de energía y tiempo (Bagchi et al., 2015; Kent et al., 2015). Es por ello que el proceso utilizado en este proyecto requiere la optimización técnica que permita disminuir el porcentaje de humedad para obtener rendimientos

comparables a los reportados, asegurando la integridad de los componentes de interés con la utilización de una temperatura y tiempo adecuados.

#### **4.3.4. Determinación de Pigmentos**

Se realizó la cuantificación de pigmentos en base a la técnica descrita previamente, se observó que la concentración de clorofilas totales de  $14.301 \text{ mg g}^{-1}$ , lo cual  $10.008 \text{ mg g}^{-1}$  corresponde a clorofilas  $\alpha$  y  $4.293 \text{ mg g}^{-1}$  de clorofilas  $\beta$ , además, de una concentración de  $16.986 \text{ mg g}^{-1}$  de carotenos y  $0.248 \text{ mg g}^{-1}$  de xantofilas, utilizando biomasa seca. De acuerdo a los datos obtenidos se puede deducir que las células se encuentran en estrés lumínico debido a que la concentración de carotenoides se encuentra en mayor proporción que las clorofilas. De acuerdo a Fernández Cordero, (2013), menciona que los carotenoides son componentes estructurales de captación de luz, por lo que se acumulan en grandes concentraciones en cuerpos lipídicos fuera de los cloroplastos, después de ser sometidas a condiciones de estrés.

Pancha et al., (2015) reportó el efecto de la salinidad sobre los componentes fotosintéticos, en donde se observó una disminución en la concentración de carotenoides de  $1.36 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$  a  $4.1 \times 10^{-4}$ , de igual modo con clorofilas  $\alpha$  ( $6.45 \times 10^{-3}$  a  $1.14 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ ) y clorofilas  $\beta$  ( $4.08 \times 10^{-3}$  a  $7.0 \times 10^{-4} \text{ mg/ml}$ ) cuando el estrés salino era inducido a 400 mM. Mientras que Patil and Kaliwal, (2017) lograron una máxima concentración de clorofila y carotenoides de  $12.66 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$  y  $6.15 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$  respectivamente con la adicción de 15%  $\text{CO}_2$ , observando un incremento en los pigmentos en comparación con el control  $12.66 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$  y  $4.22 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ . Por otro lado, Kent et al., (2015) lograron alcanzar una concentración de  $19.0 \text{ mg/g}$  de clorofilas totales y  $4.23 \text{ mg/g}$  de carotenoides sobre peso seco. Sin embargo, sea documentado que la irradiancia, así como la disponibilidad de nitrógeno influyen en el contenido de clorofila y carotenoides (Patil and Kaliwal, 2017). Los resultados obtenidos en este trabajo se pueden observar que la microalga aislada posee alto contenido de carotenoides por lo que se encuentra un posible uso en áreas médicas y alimenticias. Sin embargo, es necesario optimizar la técnica de extracción de pigmentos y secado de la biomasa.

#### 4.4. Caracterización del Crecimiento en Función del CO<sub>2</sub>

Se evaluó el efecto de la concentración del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento, dicha caracterización se realizó en un FBR de 4.5 L bajo las condiciones antes descritas. Se observó un cambio en la pigmentación y turbidez del medio de cultivo después de 7 días como se muestra en la Figura 13. Así mismo es notable el aumento de pigmentación a partir de las 72 h. Para la obtener la concentración de biomasa se tomaron muestras en diferentes periodos de tiempo y se analizaron bajo las técnicas descritas.

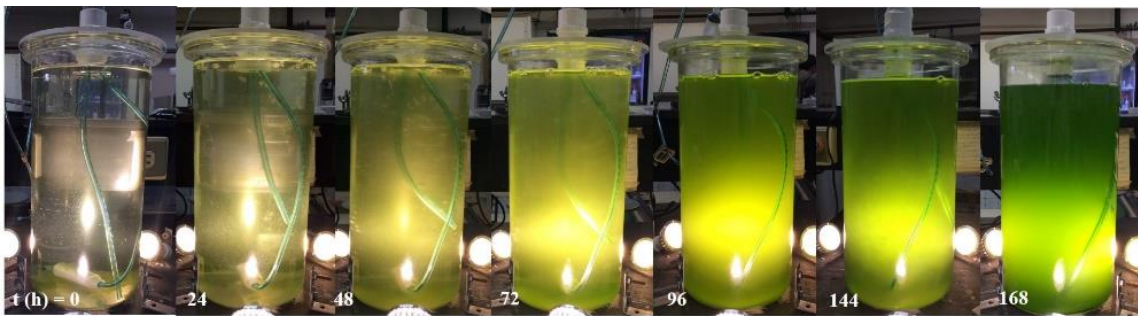


Figura 13. Seguimiento de la cinética de crecimiento de la microalga *Scenedesmus sp.* en FBR tipo airlift 4.5L.

Mediante la correlación de los datos de densidad óptica y peso seco obtenidos en las diferentes cinéticas de crecimiento se logró obtener la concentración de biomasa producida. En la Figura 14, se observa un aumento de la concentración de biomasa con la adicción de CO<sub>2</sub>, alcanzando la máxima concentración de biomasa de 41.58 gL<sup>-1</sup> con 15% CO<sub>2</sub> en 344 h y la mínima concentración de 14.58 gL<sup>-1</sup> sin inyección de CO<sub>2</sub> en 170 h. A su vez, se puede observar que las fases de latencia o adaptación se extienden en presencia de este compuesto, por lo que implica que las células de las microalgas pasan requieren un periodo de adaptación ante el estrés al que se someten. Por lo que se puede inferir que la inyección de CO<sub>2</sub> en los cultivos de microalgas favorece la producción de biomasa sin embargo el tiempo de cultivo se prolonga.

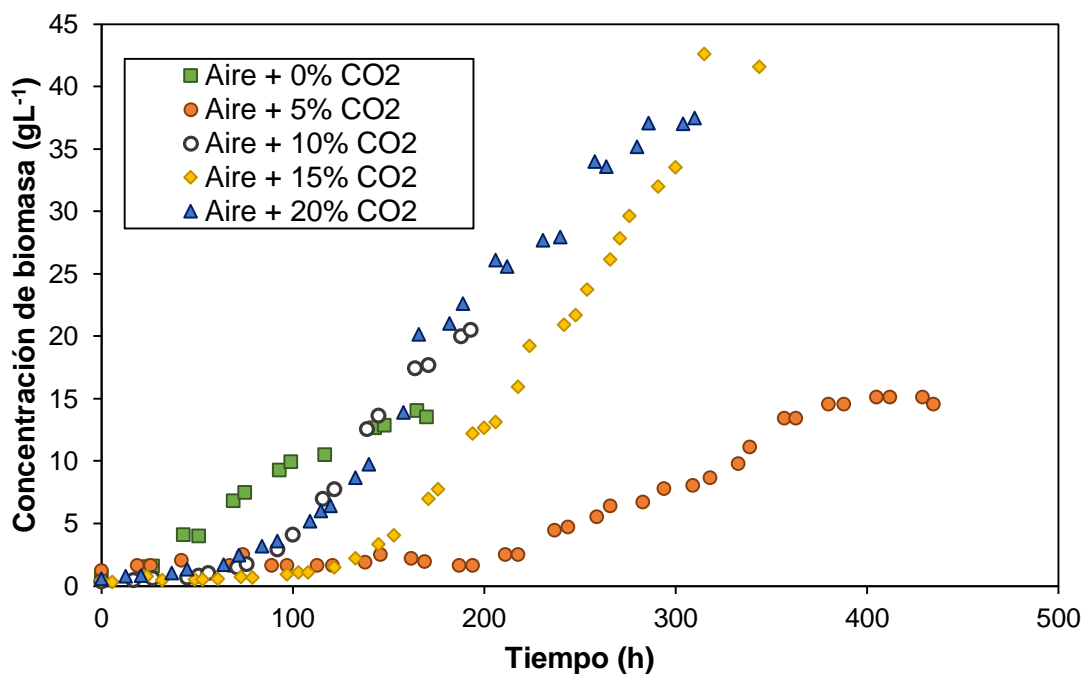


Figura 14. Efecto de la adición de CO<sub>2</sub> sobre la cinética de crecimiento de las microalgas *Scenedesmus sp.*

Los modelos matemáticos ayudan a tener una mayor comprensión de los sistemas biológicos, facilitan el análisis de los datos experimentales mediante la predicción del comportamiento del crecimiento celular mediante los parámetros cinéticos los cuales son útiles en las industrias (Khoo et al., 2019; Lacerda et al., 2011; Lam and Lee, 2013).

Figura 15 se observa que la fase estacionaria se alcanza después de las 170 h en la cinética control (0% CO<sub>2</sub>), con una concentración de biomasa de 14 gL<sup>-1</sup> en cambio con la presencia del CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo aumenta alrededor de 250 a 400 horas (Figuras 16 y 17).

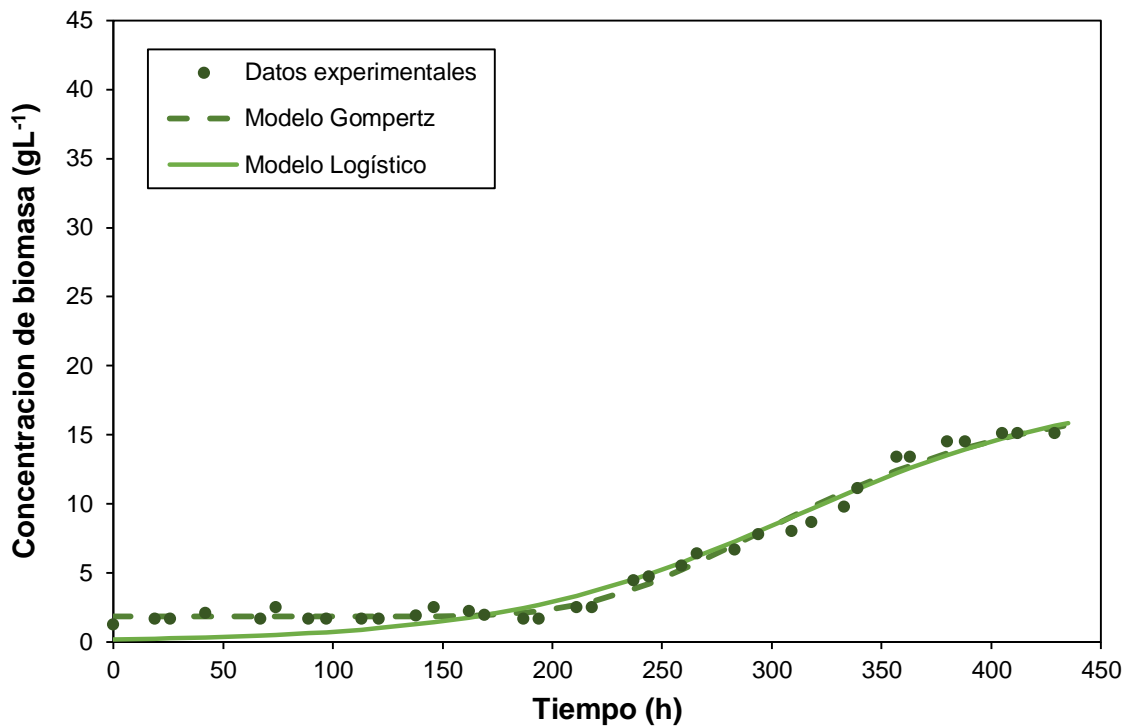


Figura 15. Cinética de crecimiento microalga *Scenedesmus sp.* control 0% CO<sub>2</sub>

La adicción de CO<sub>2</sub> al medio de cultivo prolonga la fase de adaptación, sin embargo, favorece la producción de biomasa. La máxima concentración de biomasa se obtuvo con la adicción del 15% de CO<sub>2</sub> (Figura 18) caso contrario la menor cantidad de biomasa fue con 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 16). Así mismo, el crecimiento de las microalgas mostraron un comportamiento similar en la adaptación y producción de biomasa con el suministro del 10% y 20% como se muestra en las Figuras 17 y 19. Assunção et al., (2017), reportan que para aumentar la tolerancia de las células a la concentración de CO<sub>2</sub> es recomendable una adaptación previa a bajas concentraciones.



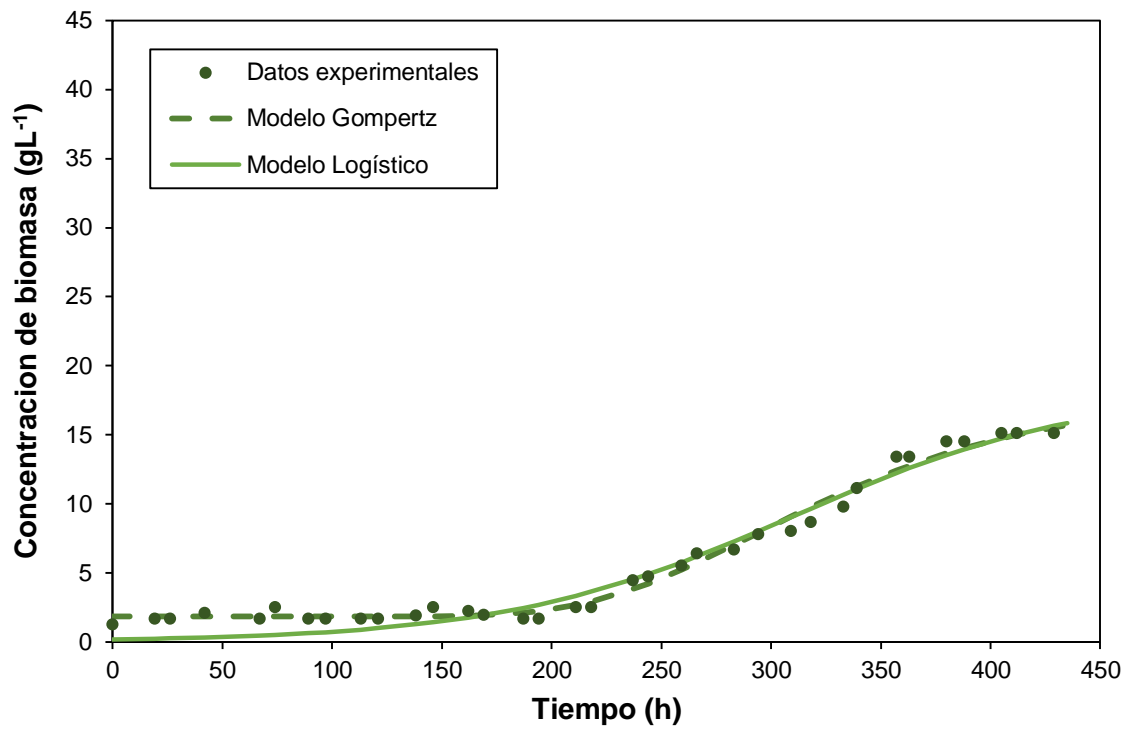


Figura 16. Cinética de crecimiento microalga *Scenedesmus sp.* con 5% CO<sub>2</sub>

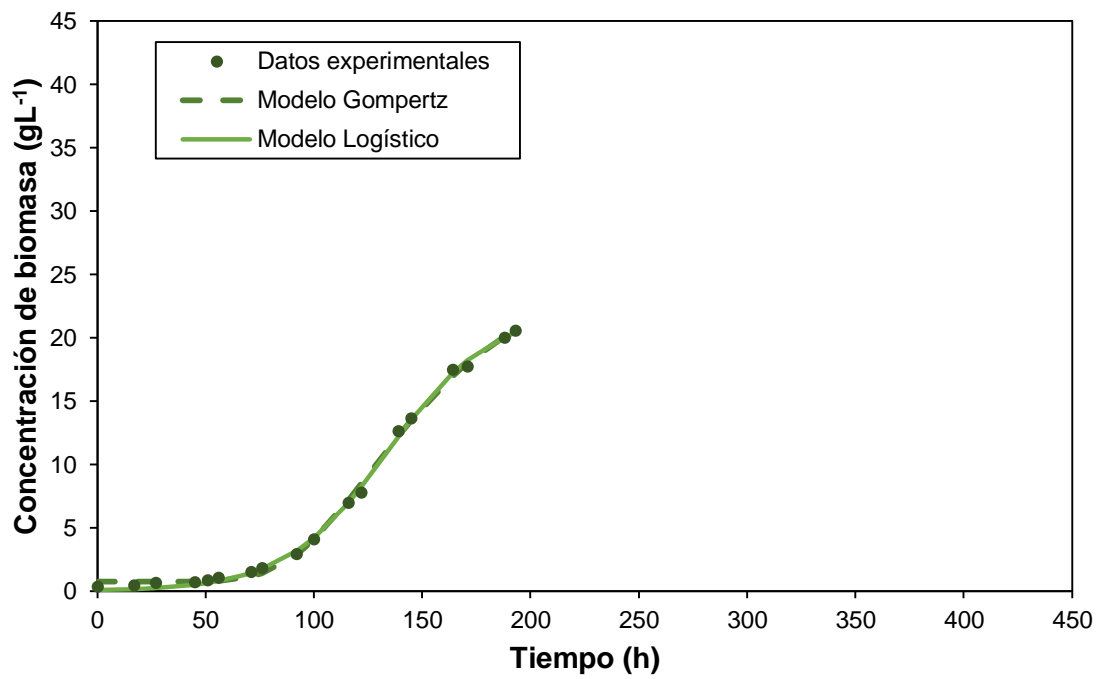


Figura 17. Cinética de crecimiento microalga *Scenedesmus sp.* con 10% CO<sub>2</sub>.

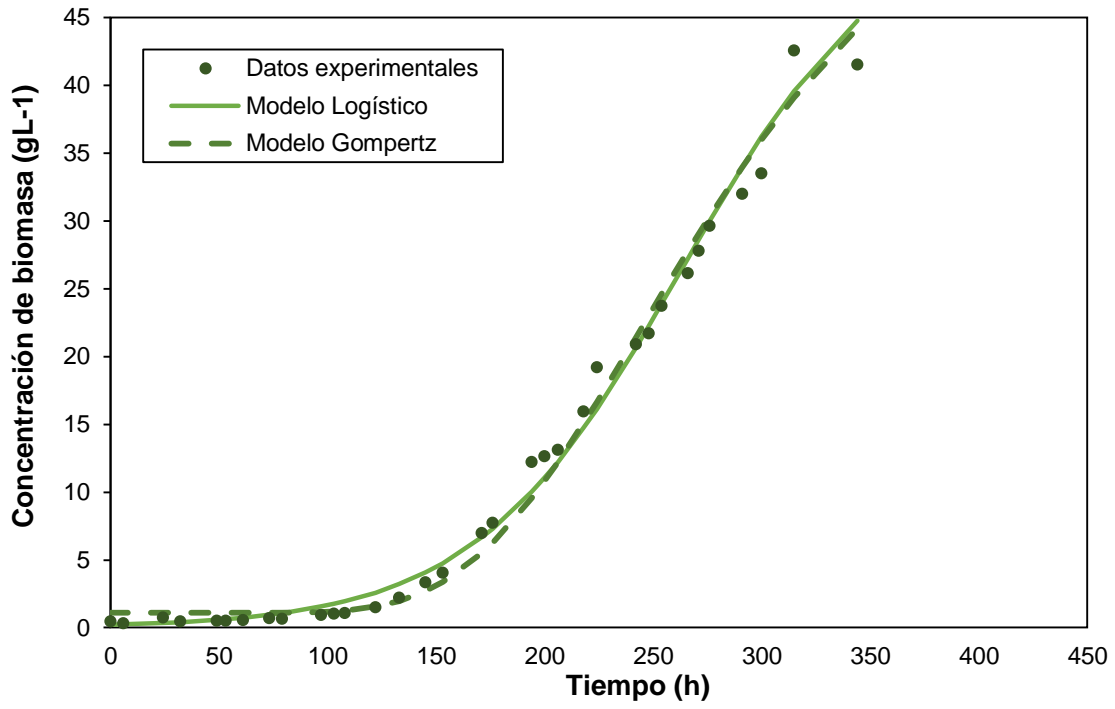


Figura 18. Cinética de crecimiento microalga *Scenedesmus sp.* con 15% CO<sub>2</sub>

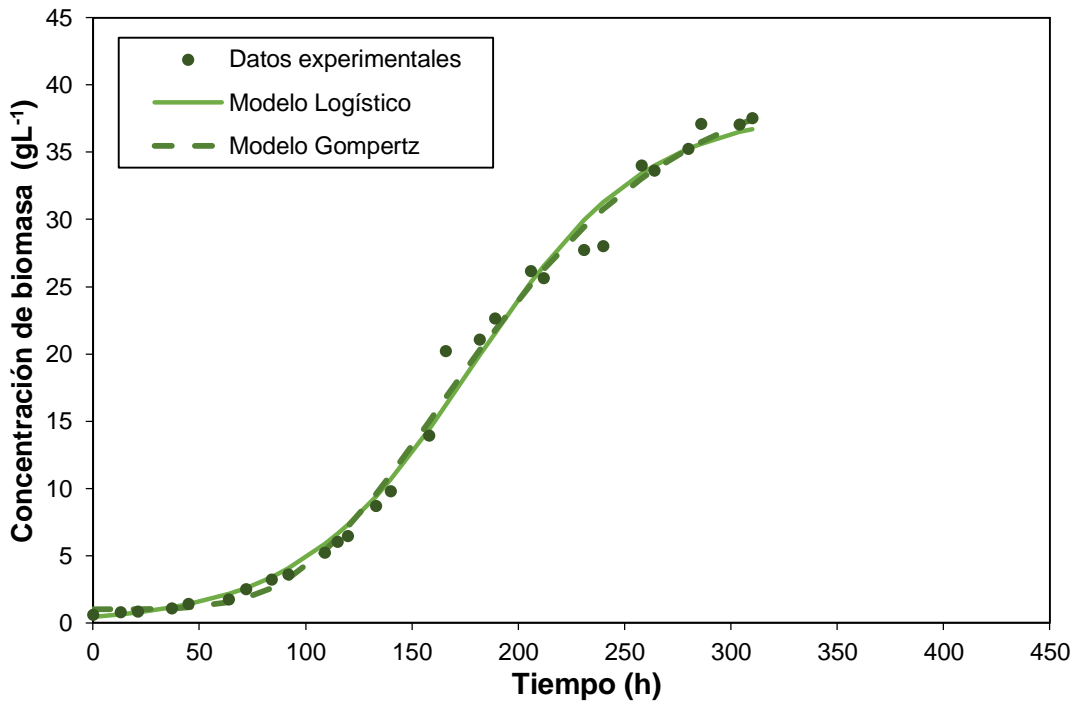


Figura 19. Cinética de crecimiento microalga *Scenedesmus sp.* con 20% CO<sub>2</sub>

La Tabla 6 muestra los valores de los parámetros cinéticos obtenidos con los modelos Logístico y Gompertz modificado. Se observó que los modelos describen satisfactoriamente los datos experimentales mostrando un buen ajuste ( $R^2 \geq 0.96$ ), manteniendo una conducta similar al de las microalgas. De acuerdo a la Tabla 6, la mejor tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) se presentó con 10% de  $\text{CO}_2$  ( $0.025 \text{ h}^{-1}$ ) y disminuyó con 5% de  $\text{CO}_2$  ( $0.013 \text{ h}^{-1}$ ). En cambio, el mayor tiempo de doblado ( $t_d$ ) se obtuvo con 5% de  $\text{CO}_2$  con 51.82 h y la menor con 10% de  $\text{CO}_2$  con 27.27 h. Por lo que el suministro de  $\text{CO}_2$  tiene efecto sobre la velocidad específica de crecimiento y tiempo de doblado, esto debido a la adaptación celular de la microalga ante este compuesto y además de factores externos en el cultivo pudieron favorecer dicho parámetro.

**Tabla 6. Parámetros cinéticos de microalgas *Scenedesmus sp.* con modelos Logístico y modelo Gompertz.**

Parámetro	Modelo	Concentración de $\text{CO}_2$ en aire (%)				
		0	5	10	15	20
$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Logístico	0.034	0.015	0.042	0.021	0.025
	Gompertz	0.022	0.013	0.025	0.013	0.015
$X_0$ ( $\text{gL}^{-1}$ )	Logístico	1.337	4.954	0.871	0.980	0.992
	Gompertz	0.900	1.829	0.758	1.085	1.021
$X_\infty$ ( $\text{gL}^{-1}$ )	Logístico	14.430	18.280	22.143	53.000	38.162
	Gompertz	14.500	16.093	23.981	57.000	40.621
$t_{\text{lag}}$ (h)	Logístico	9.941	245.051	58.586	74.271	31.162
	Gompertz	20.746	217.505	87.511	166.277	95.868
$t_d$ (h)	Logístico	20.331	45.949	19.655	33.007	28.172
	Gompertz	32.015	51.820	27.375	54.152	46.180
$R^2$	Logístico	0.9903	0.9673	0.9986	0.9916	0.9920
	Gompertz	0.9930	0.9883	0.9984	0.9900	0.9938

$\mu$ , es la velocidad específica de crecimiento;  $X_0$ , es la concentración celular inicial;  $X_\infty$ , es la concentración celular en la fase estacionaria;  $t_{\text{lag}}$ , tiempo de latencia o aclimatación,  $t_d$ , es el tiempo de doblado;  $R^2$ , es el coeficiente de determinación.

Los modelos consideran la fase de acondicionamiento ( $t_{lag}$ ), el cual se interpreta como el tiempo necesario en que la célula o población microbiana se adapta a las condiciones proveídas (Tjørve and Tjørve, 2017). En la tabla 6, se puede observar que la máxima  $t_{lag}$  fue de 217.50 h con 5%  $CO_2$  y la menor de 20.74 h con respecto a la cinética control (0%  $CO_2$ ), se obtuvieron rangos de alrededor de 100 horas en las demás cinéticas con concentraciones de  $CO_2$  variables (10, 15, 20%  $CO_2$ ), sin embargo, en estas últimas presentan una mayor producción de biomasa.

Se ha reportado que las microalgas del género *Senedesmus sp.* poseen una buena producción de biomasa y además logran adaptarse a altas concentraciones de  $CO_2$  (Makareviciene et al., 2011). En condiciones similares de cultivo y con la misma especie de microalga, Nayak et al., (2016), obtuvieron una concentración de biomasa de 0.089, 1.26 y 1.4  $gL^{-1}$  y una tasa específica de crecimiento de 0.018, 0.0204 y 0.02  $h^{-1}$  adicionando 0, 5 y 10% de  $CO_2$ . Otro estudio realizado en un FBR en columna con *Scenedesmus dimorphus* utilizando como medio cultivo BG11 modificado obtuvieron 4.52  $gL^{-1}$  de biomasa con 10%  $CO_2$  y con inyección del 20% alcanzaron 3.82  $gL^{-1}$ , sin embargo, la máxima concentración de biomasa (5.17  $gL^{-1}$ ) la obtuvieron con 2%  $CO_2$  (Jiang et al., 2013). Sin embargo, los datos en este estudio difieren con los reportados, ya que las condiciones de cultivo como la operación y tipo de FBR, así como el medio de cultivo utilizado. De acuerdo con Pacheco et al., (2015), menciona que el tipo de FBR tiene un efecto en la producción de biomasa, en donde los FBR en columna poseen limitaciones principalmente en la transferencia de gas, por otro lado, los FBR airlift favorecen la transferencia de calor y masa a través de un cultivo homogéneo. No obstante, las condiciones aplicadas en este estudio favorecieron la producción de biomasa. Es importante considerar que el uso de concentraciones elevadas de  $CO_2$  puede llegar a producir un efecto inhibitorio pero la ausencia o limitada adición de este compuesto puede llegar a limitar el crecimiento de la microalga, por lo tanto la concentración óptima varía de una especie a otra (Vélez Tamayo, 2014)

#### **4.5. Fijación de $CO_2$ y Productividad**

Se evaluó la capacidad de fijación de  $CO_2$  de la microalga aislada bajo diferentes concentraciones de  $CO_2$ . La Tabla 7 muestra los valores obtenidos de productividad y

tasas de fijación en las diferentes cinéticas de crecimiento, se obtuvo una productividad máxima de  $3.96 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  con el suministro del 15% de  $\text{CO}_2$  y una mínima de  $0.6335 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  con 5%  $\text{CO}_2$ . De acuerdo con (Assunção et al., 2017), reportaron una productividad de  $0.25 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  utilizando 15% de  $\text{CO}_2$  con la microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada en medio Bristol's y en un FBR en columna de burbujeo. Mientras que (Nayak et al., 2016) con *Scenedesmus sp.* alcanzaron una productividad máxima de  $0.196 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  con 2.5%  $\text{CO}_2$  y con 5% de  $\text{CO}_2$  obtuvieron  $0.180 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Por otro lado (Jiang et al., 2013) reportó  $0.362 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  usando 15%  $\text{CO}_2$  en un FBR con operación continua. Por lo tanto, el factor operativo de los FBR juega un rol importante en la productividad de biomasa en sistemas de cultivo. La velocidad de mezcla así como una adecuada adicción de  $\text{CO}_2$  facilita la transferencia de masa y una mezcla de con bajo esfuerzo cortante aumentando la productividad del cultivo (Choi et al., 2019; Klinthong et al., 2015; Rodríguez-Mata et al., 2019). Otro factor importante para la productividad de biomasa en sistemas de cultivo es la iluminación, ya que cuando es deficiente afecta directamente a la conversión de la energía en biomasa, provocando el fenómeno de fotoinhibición (Choi et al., 2019; González-López et al., 2011).

**Tabla 7. Concentración y productividad de biomasa y tasa de Fijación de  $\text{CO}_2$  de la microalga *Scenedesmus sp.***

% $\text{CO}_2$	Concentración de biomasa ( $\text{gL}^{-1}$ )	Productividad ( $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ )	Tasa de Fijación de $\text{CO}_2$ ( $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ )
0	13.588	2.594	4.877
5	14.563	0.635	1.193
10	20.548	2.776	5.219
15	41.584	3.960	7.445
20	37.512	3.281	6.169

Se obtuvo una tasa de fijación máxima de  $7.445 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$  con 15% de  $\text{CO}_2$  mientras que con 5% se obtuvo la menor tasa con  $1.193 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ , lo que indica que la microalga aislada en este estudio tiene una tolerancia de hasta 15%  $\text{CO}_2$ , ya que como se observa en la Tabla 7 los valores de la tasa de fijación, así como la concentración y productividad de

la biomasa disminuyen cuando se suministró más de 15% de CO<sub>2</sub>. De acuerdo con (Nayak et al., 2016), reportaron una tasa máxima de fijación de 0.368 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> con 2.5% CO<sub>2</sub> y mencionan que este valor disminuye cuando se adicionó 10% CO<sub>2</sub> (0.306 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>), por otro lado Ho et al., (2010a) obtuvo una tasa de fijación de 0.549 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> con 10% CO<sub>2</sub> utilizando la microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. Otro estudio demostró que la microalga *S. obliquus* posee una tolerancia al CO<sub>2</sub> de hasta 10%, obteniendo una tasa de fijación de 0.53 gL<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y observaron que este valor disminuye al incrementar la concentración del CO<sub>2</sub> al 15% (Assunção et al., 2017). Se ha documentado que concentraciones mayores al 20% de CO<sub>2</sub> en cultivos de microalgas reduce la eficiencia de fijación debido a la reducción del tiempo de retención y la solubilidad del CO<sub>2</sub> (Choi et al., 2019).

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

Se logró aislar y adaptar una cepa de microalgas verdes a partir de una muestra de agua de acuario doméstico en un FBR tipo airlift. Por medio de la caracterización microscópica se concluyó que la microalga aislada pertenece al filo *Chlorophytas*, género *Scenedesmus sp.*

La determinación de los componentes bioquímicos analizados muestra el potencial de utilización de la microalga *Scenedesmus sp.* en diversas áreas industriales, destacando su contenido de lípidos 21.86% y carbohidratos 31.09%. Estos datos mostraron que las condiciones de cultivo proporcionadas favorecieron la producción de dichos componentes.

Se comprobó el crecimiento mediante la obtención de parámetros cinéticos utilizando los modelos matemáticos descritos donde se observó que los datos teóricos describen el comportamiento del crecimiento de manera satisfactoria ajustándose a los datos experimentales de las microalgas, sin embargo, el modelo Gompertz mostró un mejor ajuste con una  $R^2 \geq 0,98$ .

Se comprobó que la concentración del  $\text{CO}_2$  tiene un efecto sobre el crecimiento de las microalgas *Scenedesmus sp.* Se observó que la adicción del 10% de  $\text{CO}_2$  favorece la tasa de crecimiento específico ( $\mu = 0.025 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que con 15% de  $\text{CO}_2$  se logró la mayor concentración de biomasa ( $41.58 \text{ gL}^{-1}$ ) y una productividad de  $3.96 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ , además de la mejor tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  ( $7.445 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ ).

Las microalgas *Scenedesmus sp.* poseen una alta tolerancia a la inyección de  $\text{CO}_2$  en el medio de cultivo, soportando concentraciones de hasta 20%  $\text{CO}_2$ , sin embargo, se observó que el suministro del 15% favorece al crecimiento y producción de biomasa, por

lo que presenta un potencial de aplicación a nivel industrial donde se integren procesos de fijación de CO<sub>2</sub>.

## 5.2. Recomendaciones

Tomando como referencia los valores obtenidos en este trabajo se recomienda:

- 1) Evaluar la capacidad de biodepuración de nitratos, nitritos y fosfatos de la microalga *Scenedesmus* sp. bajo diferentes condiciones de cultivo.
- 2) Analizar la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo a través del uso de instrumentación y técnicas que lo permita.
- 3) Realizar la caracterización completa de la hidrodinámica y grado de la mezcla del FBR tipo airlift, ya que dichos datos podrían favorecer en la optimización del sistema de cultivo.
- 4) Se sugiere analizar el efecto de la iluminación y componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento de la microalga,
- 5) Estudiar el efecto de la operación y tipo de FBR sobre la cinética de crecimiento y productividad de la microalga *Scenedesmus* sp.
- 6) Analizar el efecto de las variables de iluminación, medio de cultivo y tipo de FBR sobre la concentración de los componentes bioquímicos.



## CAPÍTULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, L.F.N., Pérez, E.C., Elías, J.A.L., López, J.M.V., Rodríguez, J.A.N., 2017. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Chaetoceros muelleri* EN UN FOTOBIOREACTOR. *Biocencia* 19, 14–18.
- Anjos, M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Dragone, G., 2013. Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 139, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032>
- Arenas, E., Rodriguez Palacio, M., Juantorena, A., Fernando, S., Sebastian, P., 2017. Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges. *International Journal of Energy Research* 41, 761–789.
- Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D., 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, SC, La Paz, BCS, México 97.
- Assunção, J., Batista, A.P., Manoel, J., Silva, T.L. da, Marques, P., Reis, A., Gouveia, L., 2017. CO<sub>2</sub> utilization in the production of biomass and biocompounds by three different microalgae. *Engineering in Life Sciences* 17, 1126–1135. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700075>
- Bagchi, S.K., Rao, P.S., Mallick, N., 2015. Development of an oven drying protocol to improve biodiesel production for an indigenous chlorophycean microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 180, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.092>
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2014. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Basu, S., Sarma Roy, A., Ghoshal, A.K., Mohanty, K., 2015. Operational strategies for maximizing CO<sub>2</sub> utilization efficiency by the novel microalga *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in lab scale photobioreactor. *Algal Research* 12, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.010>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911–917.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews* 14, 557–577.
- Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2015. Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. *Bioresource technology* 184, 190–201.
- Chew, K.W., Chia, S.R., Show, P.L., Yap, Y.J., Ling, T.C., Chang, J.-S., 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae

- cultivation: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 91, 332–344.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Choi, H.I., Hwang, S.-W., Sim, S.J., 2019. Comprehensive approach to improving life-cycle CO<sub>2</sub> reduction efficiency of microalgal biorefineries: A review. *Bioresource technology* 121879.
- De Morais, M.G., Costa, J.A.V., 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology* 129, 439–445.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. t, Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28, 350–356.
- Fernández Cordero, B., 2013. Producción de carotenoides por microalgas y caracterización de la ruta carotenogénica en *Chlorella zofingiensis*.
- Fernández-Linares, L.C., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., Badillo-Corona, J.A., 2012. Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai* 101–116. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.10.lf>
- Garcia, E.S., Ruiz, C.A.S., Tilaye, T., Eppink, M.H., Wijffels, R.H., van den Berg, C., 2018. Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two phase system. *Separation and Purification Technology* 204, 56–65.
- Geada, P., Vasconcelos, V., Vicente, A., Fernandes, B., 2017. Microalgal biomass cultivation, in: *Algal Green Chemistry*. Elsevier, pp. 257–284.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L., 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology* 24, 1477–1486.
- González-López, C.V., Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina, E., 2011. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub>. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 2, 93–106.
- Gour, R.S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R.S., Kant, A., 2016. Characterization and Screening of Native *Scenedesmus* sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155321>
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates, in: Smith, W.L., Chanley, M.H. (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport*. Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)
- Harris, D.C., 2001. *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.
- Hernández-Pérez, A., Labbé, J.I., 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía* 49, 157–173.
- Ho, S.-H., Chen, W.-M., Chang, J.-S., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. *Bioresource technology* 101, 8725–8730.
- Hu, X., Zhou, J., Liu, G., Gui, B., 2016. Selection of microalgae for high CO<sub>2</sub> fixation efficiency and lipid accumulation from ten *Chlorella* strains using municipal wastewater. *Journal of Environmental Sciences* 46, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.08.030>

- Jacob-Lopes, E., Cacia Ferreira Lacerda, L.M., Franco, T.T., 2008. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 40, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.013>
- Jiang, Y., Zhang, W., Wang, J., Chen, Y., Shen, S., Liu, T., 2013. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 128, 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.119>
- Katoh, S., Horiuchi, J., Yoshida, F., 2015. *Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists*. John Wiley & Sons.
- Kent, M., Welladsen, H.M., Mangott, A., Li, Y., 2015. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PloS one* 10.
- Khan, M.I., Shin, J.H., Kim, J.D., 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories* 17, 36.
- Khoo, C.G., Lam, M.K., Lee, K.T., 2019. Chapter 1 - Microscale and Macroscale Modeling of Microalgae Cultivation in Photobioreactor: A Review and Perspective, in: Hosseini, M. (Ed.), *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts*, Woodhead Publishing Series in Energy. Woodhead Publishing, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817937-6.00001-1>
- Klinthong, W., Yang, Y.-H., Huang, C.-H., Tan, C.-S., 2015. A Review: Microalgae and Their Applications in CO<sub>2</sub> Capture and Renewable Energy. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>
- Kroumov, A.D., Scheufele, F.B., Trigueros, D.E.G., Modenes, A.N., Zaharieva, M., Najdenski, H., 2017. Chapter 11 - Modeling and Technoeconomic Analysis of Algae for Bioenergy and Coproducts, in: Rastogi, R.P., Madamwar, D., Pandey, A. (Eds.), *Algal Green Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 201–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00011-4>
- Lacerda, L.M.C.F., Queiroz, M.I., Furlan, L.T., Lauro, M.J., Modenesi, K., Jacob-Lopes, E., Franco, T.T., 2011. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO<sub>2</sub> biofixation: Predictive modeling and simulation. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 78, 679–686. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2011.07.003>
- Lam, M.K., Lee, K.T., 2013. Effect of carbon source towards the growth of *Chlorella vulgaris* for CO<sub>2</sub> bio-mitigation and biodiesel production. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 14, 169–176.
- Li, Y., Lou, Y., Mu, T., Ke, A., Ran, Z., Xu, J., Chen, J., Zhou, C., Yan, X., Xu, Q., 2017. Sphingolipids in marine microalgae: Development and application of a mass spectrometric method for global structural characterization of ceramides and glycosphingolipids in three major phyla. *Analytica chimica acta* 986, 82–94.
- Lüring, M., 2003. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 39, 85–101. <https://doi.org/10.1051/limn/2003014>
- Madigan MT, Martinko, J.M, Sthal, D.A, Clark, D.P, 2012. *Brock: Biology of Microorganism.*, Thirteenth Edition. ed. Pearson.
- Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.-Y., Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and

- wastewater treatment: Present and future perspectives—A mini review. *Energy* 78, 104–113.
- Makareviciene, P. dr V., Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., Kasperovičienė, J., 2011. Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management* 57, 21–27.
- Markou, G., Nerantzis, E., 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology advances* 31, 1532–1542.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, Nidia.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mathews, C.K., Ahern, K.G., 2002. *Bioquímica*. Pearson Education.
- Mora Salguero, D.A., Fernández-Niño, M., Serrano-Bermúdez, L.M., Páez Melo, D.O., Winck, F.V., Caldana, C., González Barrios, A.F., 2018. Development of a *Chlamydomonas reinhardtii* metabolic network dynamic model to describe distinct phenotypes occurring at different CO<sub>2</sub> levels. *PeerJ* 6, e5528. <https://doi.org/10.7717/peerj.5528>
- Nayak, M., Karemore, A., Sen, R., 2016. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO<sub>2</sub> biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research* 16, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.020>
- Nielson, S.S., 2003. *Food analysis laboratory manual*. Chips Ltd., USA.
- Pacheco, M.M., Hoeltz, M., Moraes, M.S., Schneider, R.C., 2015. Microalgae: cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 50, 585–601.
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S.K., Ghosh, A., Mishra, S., 2015. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology* 189, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>
- Patil, L., Kaliwal, B., 2017. Effect of CO<sub>2</sub> Concentration on Growth and Biochemical Composition of Newly Isolated Indigenous Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07. *Appl Biochem Biotechnol* 182, 335–348. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2330-2>
- Peñaranda, M.T.A., Roldán, A.D.J.M., Villanueva, R.O.C., 2013. Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana* 18, 43–68.
- Ramos, S.V., Ruiz, M.C.P., 2009. *Atlas para la identificación de algas y protozoos de vida libre*. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Richmond, A., 2008. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 102, 100–112.
- Rodríguez-Mata, A.E., Flores-Colunga, G., Rangel-Peraza, J.G., Lizardi-Jiménez, M.A., Amabilis-Sosa, L.E., 2019. ESTIMATION OF STATES IN PHOTOSYNTHETIC SYSTEMS VIA CHAINED OBSERVERS: DESIGN FOR A TERTIARY WASTEWATER TREATMENT BY USING *Spirulina maxima* ON

- PHOTOBIOREACTOR. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 18, 273–287. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/Rodriguez>
- Sandoval Herrera, J., Rubio Fernández, D., 2017. Uso potencial de microalgas para mitigar los efectos de las emisiones de dióxido de carbono. *Revista de Investigación* 10, 153–164. <https://doi.org/10.29097/2011-639X.88>
- Santiago, E., M<sup>a</sup>, R., 2013. Planta de producción de microalgas con fines energéticos.
- Sforza, E., Urbani, S., Bertucco, A., 2015. Evaluation of maintenance energy requirements in the cultivation of *Scenedesmus obliquus*: effect of light intensity and regime. *Journal of applied phycology* 27, 1453–1462.
- Shandilya, K.K., Pattarkine, V.M., 2019. Using Microalgae for Treating Wastewater, in: *Advances in Feedstock Conversion Technologies for Alternative Fuels and Bioproducts*. Elsevier, pp. 119–136.
- Tebbani, S., Filali, R., Lopes, F., Dumur, D., Pareau, D., 2014. CO<sub>2</sub> Biofixation by Microalgae: Modeling, estimation and control. John Wiley & Sons.
- Tjørve, K.M.C., Tjørve, E., 2017. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>
- Vélez Tamayo, M.J., 2014. Estudio sobre el modelado y control de las condiciones óptimas de cultivo de microalgas en fotobiorreactores para producción de biodiésel.
- Viramontes-Ramos, D., Portillo-Ruiz, 2010. MICROORGANISMOS Autor (es): Viramontes Ramos, Sabina; Portillo Ruíz, Martha Editorial: Departamento Editorial de la UACH Colección: Textos universitarios No. 56 ISBN: 978-607-7691-45-7 Formato: Rústica Año: 2010 Número de páginas: 274 pp. Departamento Editorial de la UACH colección: Textos universitarios.
- Vuppaladadiyam, A.K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., Zhao, M., 2018. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 12, 304–324.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kocielek, J.P., 2015. *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Elsevier.
- Yu, W.-L., Ansari, W., Schoepp, N.G., Hannon, M.J., Mayfield, S.P., Burkart, M.D., 2011. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial cell factories* 10, 91.
- Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Qiu, D., Schideman, L., Chai, X., Zhao, Y., 2014. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production. *Bioresource technology* 156, 322–328.