

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA LUMINOSA EN LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA LABORATORIO**

**SILVIA JULIANA PRADILLA GODOY  
ALVARO ENRIQUE SALCEDO ARRIETA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA LUMINOSA EN LA PRODUCCIÓN DE  
MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA LABORATORIO**

**SILVIA JULIANA PRADILLA GODOY  
ALVARO ENRIQUE SALCEDO ARRIETA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
Ingeniero Químico**

**Director**

**Ph.D Viatcheslav Kafarov**

**Co-director**

**Biólogo. Andrés Fernando Barajas**

**Lector**

**Prof. José Andrés Pérez**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

*A Dios, por darme la sabiduría y la fuerza para conseguir este sueño.*  
*A mis padres, por su apoyo y confianza en esta travesía llamada universidad.*  
*A la UDS, por si mi casa durante estos años.*  
*Y a todas las personas, que de una u otra manera hicieron parte de mi formación*  
*Personal y profesional.*  
*Silvia Juliana Pradilla Godoy*

*A mi madre y hermanas, por su apoyo y confianza en esta travesía llamada universidad.*  
*A la UDS, por si mi casa durante estos años.*  
*A mis amigos y a todas las personas, que de una u otra manera hicieron parte de mi*  
*formación*  
*Personal y profesional.*  
*Álvaro Salcedo Arrieta*

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores quieren agradecer:

A nuestras madres por su amor y apoyo incondicional en este sueño llamado universidad.

A la Universidad Industrial de Santander, su cuerpo de maestros y todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de nuestro desarrollo profesional y personal.

A nuestros amigos, compañeros de estudio que hicieron parte de esta etapa de formación, crecimiento y vivencias.

Al profesor Viatcheslav Kafarov por su grandiosa colaboración en la culminación de este proyecto, al Biólogo Andrés Fernando Barajas, por su entrega, amistad y ayuda incondicional guiando y orientando nuestro trabajo.

A la escuela de Ingeniería Química y a todas las personas que hacen parte de ella, en especial a Lina Afanador por ser esa personita que nos ayuda y colabora en todos los trámites que hicieron parte de nuestra carrera profesional.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por su aporte económico y al Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), por su colaboración y apoyo en este proyecto Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel; código 2008\_2008D32006-6710.

## TABLA CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION	1
1. MARCO TEORICO	3
1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS	3
1.1.1Crecimiento Microbiano	3
1.1.2 Fotosíntesis	5
1.2 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL CULTIVO	6
1.2.1 Luz	6
1.2.2 Dinámica Celular Dentro del Biorreactor	9
1.3 REQUISITOS DE LUZ Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS	9
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	12
2.1 MATERIALES	13
2.1.1 Inoculo	13
2.1.2 Fotobiorreactor	13
2.1.3 Cultivo de Microalga	13
2.2 CARACTERIZACIÓN	14
2.2.1 Calculo de Peso Seco	14
2.2.2 Medición de la Absorbancia	14
2.2.3 Balance de Biomasa Reactor Discontinuo	15
3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	16
3.1 TIPOS DE LUZ	16
3.2 TIPOS DE CICLOS	19
3.3 COEFICIENTE DE SUMINISTRO DE LUZ	22

4. CONCLUSIONES	24
5. RECOMENDACIONES	25
BIBLIOGRAFIA	26
ANEXOS	30

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Fases de Crecimiento Microbiano	5
Figura 2: Espectro de Absorción de la Clorofila A Y B	6
Figura 3. Ilustración de la Trayectoria de la Luz y de los Ciclos Luz/Oscuridad	10
Figura 4. Efecto de la Intensidad de Luz Sobre el Crecimiento Fotoautotrófico de Células Fotosintéticas.	11
Figura 5. Diagrama de bloques de la metodología experimental	12
Figura 6. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con luz roja A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial.	16
Figura 7. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con luz blanca A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial.	16
Figura 8. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con luz azul A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial.	17
Figura 9. Validación de los modelos de crecimiento exponencial para los tipos de luz	18
Figura 10. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con luz roja ciclo 24-0 A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial; ciclo 18-6 C) Curva de crecimiento, D) Fase de crecimiento exponencial.	19
Figura 11. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> con luz blanca ciclo 24-0 A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial; ciclo 18-6 C) Curva de crecimiento, D) Fase de crecimiento exponencial.	20
Figura 12. Validación de los modelos de crecimiento exponencial para los tipos de ciclos	22

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Modelos de crecimiento de la fase exponencial para tipos de luz (ecuación 2)	17
Tabla 2. Modelos de crecimiento de la fase exponencial para ciclos luz/ oscuridad (ecuación 2)	21

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS	30
ANEXO B. DATOS EXPERIMENTALES	33
ANEXO C. GENERALIDADES DE FOTOBIORREACTORES	41
ANEXO D. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÁMPARAS	46
ANEXO E. COMPOSICIÓN DEL MEDIO BOLD BASAL	48

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DE LA INCIDENCIA LUMINOSA EN LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA LABORATORIO\*

**AUTORES:** Silvia Juliana Pradilla Godoy,  
Alvaro Enrique Salcedo Arrieta \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Microalgas, Influencia de la luz, Crecimiento Microbiano, Ciclos luz/oscuridad, Luz artificial, *Chlorella vulgaris*.

Las aplicaciones productivas y comerciales de las microalgas son tan diversas como numerosas, sus usos van desde la producción de alimentos para consumo humano hasta la producción de hidrógeno con aplicaciones energéticas. Son organismos apenas explorados, que en la actualidad son objeto de intensas investigaciones para la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas susceptibles de ser utilizadas en medicina, biorremediación ambiental o la obtención de biocombustibles.

Aunque es reconocido el potencial de los microorganismos fotosintéticos para la producción de diversos metabolitos y en la biorremediación ambiental, su aplicación práctica ha sido limitada por la dificultad en proporcionar la luz eficientemente al fotobiorreactor, la luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal.

Este estudio presenta la influencia de la luz en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor a escala de laboratorio, analizando ciclos de luz/oscuridad y diversas longitudes de onda en la obtención de biomasa, La experimentación se dividió en dos partes: la variación del tipo de luz (roja, blanca y azul) y los ciclos de luz/oscuridad (12-12, 18-6, 24-0) analizando la cinética del crecimiento y la producción de biomasa mediante la técnica de medición de absorbancia.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible de la Industria y la Energía (CIDES) de la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander en apoyo del Ministerio Nacional de Agricultura y el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) Proyecto, Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel código 2008\_2008D32006-6710.

---

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas Escuela de Ingeniería Química Director Viatcheslav Kafarov.

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF THE LIGHT INCIDENCE IN THE PRODUCTION OF MICROALGAE ON A LABORATORY SCALE PHOTOBIOREACTOR\*

**AUTHORS:** Silvia Juliana Pradilla Godoy,  
Alvaro Enrique Salcedo Arrieta\*\*

**KEYWORDS:** Microalgae, Light influence, microbial growth, light/dark cycles, artificial light, *Chlorella vulgaris*.

Productive and commercial applications of microalgae are as diverse as numerous, it's uses ranging from food for human consumption until the production of hydrogen for energy applications.

Microalgae have been barely explored, which currently are the subject of intense research for obtaining new bioactive substances which may be used in medicine, environmental remediation or biofuels.

While it's recognized the potential of photosynthetic microorganisms for production of various metabolites and environmental bioremediation, practical implementation has been limited by the difficulty in providing efficiently the light to the photobioreactor, light is an important factor in all microalgae culture wich represents the energy source for photosynthesis, and both light intensity, wavelength and photoperiod affect microalgal growth and metabolism.

This study presents the influence of light on growth of *Chlorella vulgaris* in a laboratory-scale photobioreactor, analyzing light/dark cycles and different wavelengths to obtain high biomass yields, The experiment was divided into two parts: the change in the type of light (red, white and blue) and the cycles of light / dark (12-12, 18-6, 24-0) by analyzing the growth kinetics and production of biomass by absorbance measurement technique.

This work was performed in the Research Center for Sustainable Development of Industry and Energy (CIDES) of the Universidad Industrial de Santander supported by the Colombian Agriculture and Rural Development Ministry and the Colombian Petroleum Institute (ICP-ECOPETROL).

Project name: "Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel" code: 2008\_2008D32006-6710.

---

\* Final studies work report.

\*\* Physical-chemistry Engineering Faculty Chemical Engineering School Director Viatcheslav Kafarov

## INTRODUCCION

Aunque es reconocido el potencial de los microorganismos fotosintéticos para la producción de diversos metabolitos y en la biorremediación ambiental, su aplicación práctica ha sido limitada por la dificultad en proporcionar la luz eficientemente al fotobiorreactor. Varias clases de fotobiorreactores que optimizan la relación superficie- volumen iluminado han sido propuestos, pero la mayoría están limitados por el costo, la transferencia de masa, la contaminación, el escalamiento o la combinación de los anteriores [1].

Por otro lado los problemas del calentamiento del planeta debido al uso incrementado de combustibles fósiles y a la rápida deforestación ha resultado de interés el uso de microorganismos fotosintéticos para la fijación de dióxido de carbono atmosférico y la producción de fuentes de energía renovables y sostenibles [1].

La Universidad Industrial de Santander y el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) en apoyo del Ministerio Nacional de Agricultura. Se encuentran investigando diversas formas de mitigación del efecto invernadero y el aprovechamiento de nuevas fuentes de biomasa para la obtención de biocombustibles, dirigiendo su investigación hacia el crecimiento y aprovechamiento de las microalgas con el proyecto Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel, código 2008\_2008D32006-6710.

Una de las principales razones por las cuales los sistemas de cultivo de microorganismos fotosintéticos son poco prácticos, es debido al bajo aprovechamiento de la luz como fuente de energía, ya que esta no puede ser guardada en el medio de cultivo y por lo tanto debe ser proporcionada

constantemente para respaldar el crecimiento celular. Además, la luz no puede penetrar profundamente la densa suspensión celular por causa de la absorción y la dispersión, lo cual hace difícil mantener altas tasas de crecimiento y fijación de CO<sub>2</sub> [2-3], por lo tanto el suministro de energía lumínica y su utilización eficiente han sido el desafío científico y tecnológico más grande en la investigación y desarrollo de cultivos fotosintéticos. Sin embargo, todavía es difícil desarrollar fotobiorreactores a gran escala baratos y eficientes para reemplazar los sistemas de cultivos abiertos [4].

En el actual trabajo se presenta el estudio sobre la influencia de diferentes longitudes de onda y ciclos de exposición luz-oscuridad en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor a escala de laboratorio, teniendo en cuenta los coeficientes de suministro de luz, los espectros de absorción de luz de las microalgas y la irradiación espectral de fuentes de luz; para optimizar el crecimiento del cultivo y escalamiento del fotobiorreactor.

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

A continuación se presenta una breve reseña de las fases de crecimiento de los microorganismos y la importancia de la fotosíntesis en los procesos fotoautotróficos haciendo énfasis en los pigmentos que influyen en la absorción de la radiación por parte de la microalga *Chorella vulgaris*.

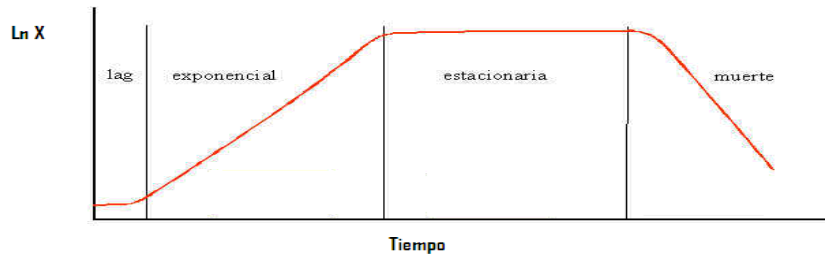
#### 1.1.1 Crecimiento Microbiano

Según G. Richter [7] en termodinámica, el término equilibrio se emplea no sólo para denotar la ausencia de cambio, sino también la ausencia de cualquier tendencia hacia un cambio a escala macroscópica; el estado de equilibrio, no existe en una célula viva pues haría imposible cualquier obtención de energía y la capacidad para producir trabajo celular, por esta razón una célula o bien un organismo trata siempre de alcanzar un equilibrio pero nunca lo logra. En esta forma el sistema viviente está capacitado para obtener energía continuamente, aparentemente los componentes químicos están presentes en concentraciones estacionarias, pero en realidad no existe un equilibrio termodinámico si no un “equilibrio de flujo” caracterizado por entrar las sustancias primitivas con igual velocidad como dejan los productos el sistema. Intercalada está una serie de reacciones parciales, cada una de las cuales utilizan los productos de la anterior y produce de estos el substrato para la reacción siguiente, para la célula o el organismo, el equilibrio se alcanza cuando acaba el suministro de sustancias primitivas lo que significa el fin de la obtención de energía y con este la muerte [7].

En un cultivo discontinuo de microorganismos en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano Figura 1:

- **Fase lag o de adaptación:** Durante esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.
- **Fase exponencial o logarítmica:** En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.
- **Fase estacionaria:** En ella no se incrementa el número de microorganismos. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.
- **Fase de muerte:** Se produce una reducción del número de microorganismos viables del cultivo [5].

**Figura 1: Fases de Crecimiento Microbiano**



Fuente: Quintero R (1981) Ingeniería Bioquímica

### 1.1.2 Fotosíntesis

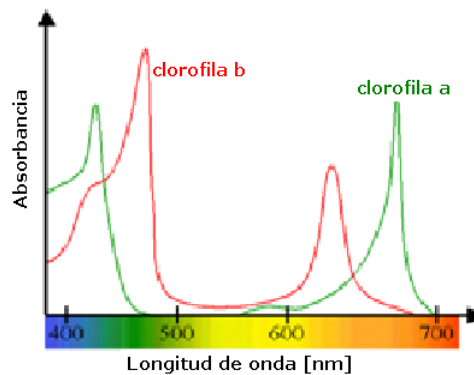
Es el proceso en el cual los fotoautótrofos capturan y convierten la energía de fotones a energía utilizada bioquímicamente, es a través de la fotosíntesis que los fotótrofos obtienen la energía (ATP) y el poder reductor (NADH o NADPH), necesarios para incorporar el  $\text{CO}_2$  y la fabricación de moléculas orgánicas que se requieren para el crecimiento [6].

Las microalgas tienen un tipo de fotosíntesis que envuelve dos fotosistemas (PSI y PSII), usan  $\text{H}_2\text{O}$  como donador de electrón, y evoluciona el oxígeno como un resultado de la fotólisis del agua. Las microalgas son en su mayoría aeróbicas (usan el oxígeno como un receptor de electrones para la metabolismo respiratorio) y autotróficas [6].

Estos microorganismos están equipados con fotorreceptores o pigmentos que utilizan ciertas partes del espectro. La función de los pigmentos reside en la absorción de la radiación con longitudes de onda bien definidas y permiten su utilización para un proceso fotoquímico, las partes de la radiación no absorbidas por el contrario, son fotoquímicamente ineficaces. Los pigmentos existentes determinan cuales regiones del espectro, en principio entran en consideración

para la fotosíntesis. Su eficiencia relativa se deriva del “espectro de acción” o “espectro de efecto”. Este muestra la actividad de la fotosíntesis en relación a la radiación de diferente longitud de onda. En cuanto a *Chorella vulgaris* ella posee clorofila a y b, cuyos dos máximos de absorción indican que la radiación roja y azul son fuertemente absorbidas, al contrario de la radiación verde, la cual es poco o nada absorbida. Ver figura 2 [7].

**Figura 2: Espectro de Absorción de la Clorofila A Y B**



Fuente: Richter G (1972) Fisiología del metabolismo de las plantas

## 1.2 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL CULTIVO

A continuación se describe los factores cruciales que influyen en el crecimiento de un cultivo microbiano haciendo especial énfasis en el factor luz.

### 1.2.1 Luz

La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, Representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal [8].

**a) Intensidad:** Se necesita de una cierta intensidad de luz para que se realice la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa, alcanzándose el nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie, después de lo cual la intensidad se hace limitante, provoca la disminución de la tasa fotosintética y por tanto del crecimiento [8].

**b) Fotoinhibición:** Las intensidades de luz muy elevadas con frecuencia son inhibitorias para el crecimiento microalgal, produciendo fotoinhibición. La fotoinhibición o fotoinactivación puede definirse como el descenso de la capacidad fotosintética a elevadas intensidades de luz, implicando la fotodestrucción de pigmentos fotosintéticos. La fotoinhibición depende de la intensidad y calidad (longitud de onda) de la luz, así como el tiempo de exposición, siendo más pronunciada con exposiciones prolongadas a intensidades altas de luz [8].

**c) Fotoperiodo:** En condiciones normales las microalgas están sometidas a períodos de luz/oscuridad y esta alternativa generalmente se utiliza en su cultivo. Muchos aspectos de la fisiología microalgal fluctúan en un ciclo de 24 horas, esta periodicidad según “Sournia”, 1974 se observa en:

- **División celular:** En muchas especies la mayoría de las células se dividen en un momento determinado del día o de la noche, lo que favorece su sincronización; al parecer la división nocturna ocurre en muchas especies.
- **Capacidad fotosintética:** Con frecuencia se observa que las tasas máximas de fotosíntesis se producen en la mañana y las mínimas en las noches.
- **Absorción de nutrientes:** Las tasas de absorción de N y P son mayores durante el día que durante la noche, lo que refleja la influencia de la luz sobre la absorción.

**d) Longitud de onda:** En cuanto a la calidad de luz se sabe que tiene efectos marcados sobre el crecimiento y varios procesos metabólicos que pueden afectar también a la composición bioquímica. En microalgas se ha establecido que varias enzimas relacionadas con la fotosíntesis están bajo el control de la luz azul; la luz roja también afecta a ciertos aspectos del metabolismo microalgal como ejemplo en el aumento de las reservas de carbohidratos [8].

#### **e) Fuentes de luz**

**Natural:** Tiene la ventaja de no suponer un gasto energético, pero tiene los inconvenientes de que no se puede controlar ni el fotoperiodo ni la intensidad asimismo, se producen variaciones diarias, estacionales, en función del tiempo atmosférico, etc [4].

**Artificial:** La luz artificial tiene espectro de emisión que no es necesariamente idéntica a la luz del sol y la calidad de luz puede afectar al crecimiento, metabolismo, reproducción y morfología de una clase de microalga, por lo que hay que estudiar el espectro más favorable para cada tipo a cultivar [6].

Uno de los factores fundamentales que guían la escogencia de una fuente de luz artificial debería ser la eficiencia en la conversión de energía eléctrica a energía PAR. Esta eficiencia varía considerablemente con el tipo de lámpara; solo de alrededor del 5% en lámparas de halógeno incandescente, de 10 – 15% para tubos fluorescentes y 20 – 25% para lámparas de sodio de alta presión. Solo con lámparas xenón y diodos emisores de luz se consigue una alta eficiencia, 80% [6].

Otro aspecto a considerar es la calidad espectral de la luz emitida, por ejemplo, lámparas de tungsteno tienen un bajo rendimiento en la región azul y por lo tanto no son apropiadas para fotótrofos. Las lámparas de sodio presurizadas son relativamente eficientes en la conversión de energía eléctrica pero emiten una limitada región amarilla-naranja. Pero las lámparas fluorescentes son ampliamente

aceptadas, independiente de su calidad espectral y de su emisión, ya que proveen una irradiancia relativamente uniforme sobre una larga superficie [6, 8].

### **1.2.2 Dinámica Celular Dentro del Biorreactor**

La agitación produce el movimiento del agua, lo que implica una serie de efectos positivos tales como: Asegurar una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, mejora la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas. Una agitación adecuada del cultivo permite un movimiento rápido de las células desde la zona iluminada (zona fótica) a la zona oscura del tanque de cultivo, y la vuelta a la zona iluminada, lo que produce un patrón dinámico de luz-oscuridad para las células individuales. El fenómeno del ensombrecimiento mutuo, el continuo cambio entre las fases de oscuridad y luz, representa uno de los requerimientos básicos para una elevada productividad de biomasa. También evita la formación de zonas de estancamiento lo cual conduciría a la formación de condiciones anaerobias, que tienen como efecto el deterioro celular y la reducción del rendimiento y calidad de la biomasa microalgal [8].

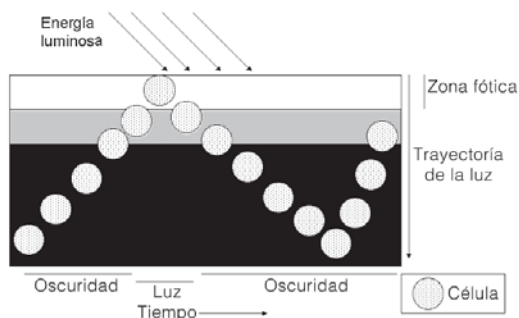
Otros factores que influyen sobre el cultivo son el pH, temperatura, CO<sub>2</sub> y el burbujeo pero no se hablara con detenimiento de estos ya que no fueron objeto de este trabajo.

## **1.3 REQUISITOS DE LUZ Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS FOTOAUTOTRÓFICAS**

En todos los sistemas de cultivo, las células más cercanas a la superficie iluminada impiden la penetración de la luz hacia el seno del medio de cultivo y producen un efecto de autosombreado sobre las células más alejadas de la superficie. En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2 mm

más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10-30%) del volumen total del cultivo (Figura 3) [9]. Debido a que el medio de cultivo está en constante movimiento, las células solo son expuestas por breves instantes a la luz, en ciclos que pueden durar desde milisegundos a unas cuantas décimas de segundo. En condiciones reales, el factor que determina la actividad fotosintética es la cantidad de energía disponible para cada célula individual, más que la cantidad de energía luminosa incidente [10]. Los parámetros que pueden considerarse como básicos para describir la disponibilidad de energía bajo una iluminación intermitente son dos, la relación de los periodos luz/oscuridad (L/O) y la frecuencia de los ciclos L/O [14]; estos junto con la intensidad de la luz y la trayectoria de la luz en el reactor, establecen en gran medida el régimen de iluminación, el cual es un indicador de la disponibilidad de luz para una célula individual. Para asegurar la máxima actividad fotosintética y la mejor utilización de la luz incidente, se requiere de un régimen de iluminación óptimo [11].

**Figura 3. Ilustración de la Trayectoria de la Luz y de los Ciclos Luz/Oscuridad**

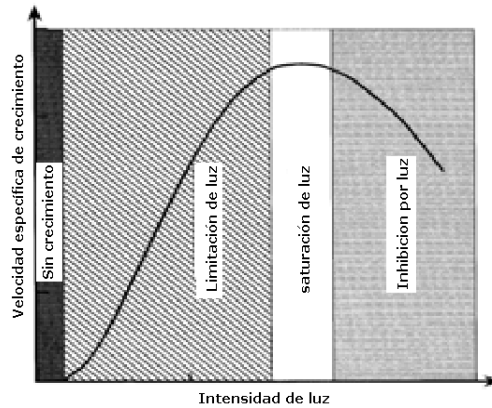


Fuente: Contreras F (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas

Un típico ejemplo de los efectos de la intensidad de la luz sobre el crecimiento es indicado en la Figura 4, donde el rango de las intensidades depende en gran medida al tipo de célula. Por otro lado, en intensidades de luz muy altas, la fotoinhibición se convierte en un problema muy importante [12,13], por lo tanto,

para la productividad máxima, la intensidad de luz de saturación debe ser homogéneamente distribuida en el fotobiorreactor entero, que es poco posible en los sistemas de cultivo prácticos [4].

**Figura 4. Efecto de la Intensidad de Luz Sobre el Crecimiento Fotoautotrófico de Células Fotosintéticas.**

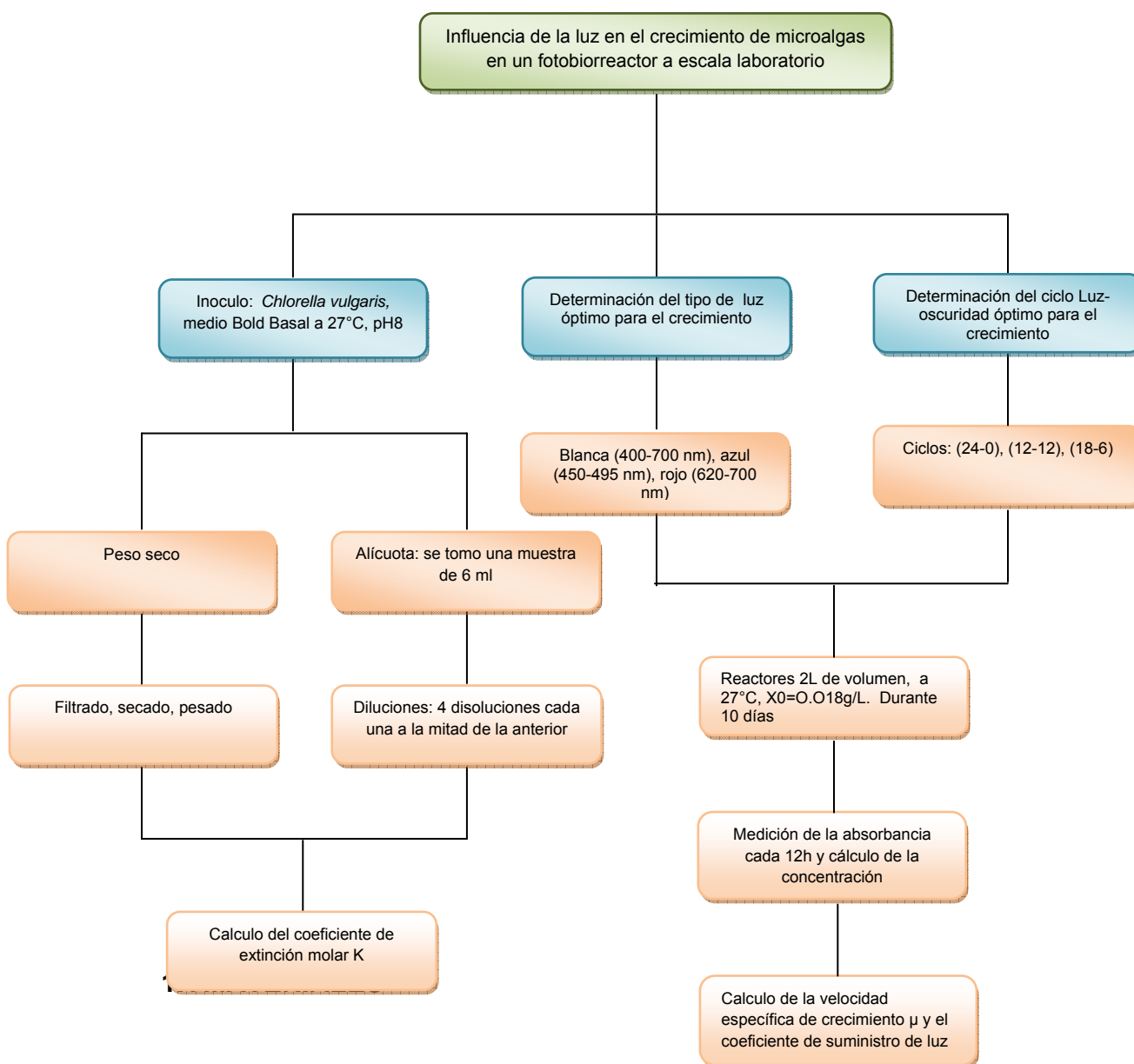


Fuente: Ogbonna, J. C. and Tanaka, H. (2000) Light requirement and photosynthetic cell cultivation- Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors

## 2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta una detallada descripción de los materiales, equipos y metodología empleados durante la experimentación.

Figura 5. Diagrama de bloques de la metodología experimental



## 2.1 MATERIALES

### 2.1.1 Inoculo

Se trabajo con una microalga verde, *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, perteneciente a Phylum Chlorophyta, Orden Chlorellales obtenida de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). La microalga se mantuvo en crecimiento en medio Bold Basal (Anexo E) a 27°C, y pH 8, el cultivo se mantuvo agitado con aireación constante a 2 psi y el equipo utilizado fue un Bioflo 110 (Anexo A, Figura A1).

### 2.1.2 Fotobiorreactor

Se usaron botellas de plástico de 2L ½, para aislar los reactores de la luz exterior se construyeron 3 cajas de 50 x 50 x 50 cm, en cada una de estas se utilizaron 2 lámparas halógenas de 8 W, las cuales se localizaron a una distancia de 15 cm desde la pared del reactor, la aireación del cultivo se hizo con un torrente de aire comprimido.

### 2.1.3 Cultivo de Microalga

Los experimentos se realizaron en reactores de 2 litros de medio Bold Basal, con una concentración inicial celular de 0.018 g/L, temperatura promedio de 27 °C, con aireación a 1,66 psi e intensidad lumínica constante de 550.56 Lux (Anexo A, Figura A2).

**Determinación del tipo de luz óptimo:** Se evaluaron 3 colores (rojo, blanco y azul), bajo un ciclo de 12:12 (luz/oscuridad) durante 10 días.

**Determinación del ciclo de luz óptimo:** Se evaluó el tipo de luz óptimo (luz roja) y la luz blanca, bajo los ciclos 18:6 y 24:0 (luz/oscuridad) durante 10 días.

En los dos experimentos anteriormente mencionados se utilizó la luz blanca como parámetro de comparación por la similitud de su espectro con la luz solar, la cual es utilizada en el escalamiento de fotobiorreactores debido a que no tiene costo alguno y su utilización es ambientalmente amigable [14, 15].

## **2.2 CARACTERIZACIÓN**

### **2.2.1 Calculo de Peso Seco**

Se tomaron 50 ml del inoculo los cuales fueron filtrados al vacío, la biomasa resultante fue secada en una horno (binder 500, Figura A5) durante 24 horas a 105 °C y posteriormente pesada. Dicho peso constituye la concentración inicial de células y la base para el cálculo del coeficiente de extinción molar.

### **2.2.2 Medición de la Absorbancia**

De cada montaje se tomaban muestras de 6 ml cada 12 h con sus replicas y se centrifugaban a 3000 rpm durante 25 min (PowerSpin™ MX; Figura A4), esto se hacía para retirar el medio de cultivo, luego la suspensión (biomasa) era diluida con agua a un volumen de 6 ml con el fin de preparar las muestras que luego serian usadas para la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro (Spectroquant 300 Merck, Figura A3). La concentración de cepa fue determinada según la ley de Beer-Lambert:

$$Abs = KXL \quad (1)$$

Abs: La absorbancia

K: Coeficiente de extinción molar

X: Concentración

L: Distancia que viaja la luz a través de la muestra

El coeficiente de extinción molar se determina realizando una serie de diluciones de la sustancia de interés. Luego se mide la absorbancia de cada muestra a un largo de onda determinado de 500 nm. Los valores de absorbancia son graficados en función de la concentración, el resultado debe ser una línea recta; la pendiente de la línea ( $\Delta y/\Delta x$ ) es el coeficiente de extinción (K) (Anexo B, Figuras B1).

### 2.2.3 Balance de Biomasa Reactor Discontinuo

Después de un corto período de adaptación al nuevo ambiente (fase *lag*) los microorganismos se comienzan a reproducir incrementando su número y su biomasa en forma exponencial. La existencia de alimento en cantidad suficiente proporciona las condiciones adecuadas para una tasa de crecimiento máxima. Si X representa la concentración de biomasa, la producción celular en un reactor discontinuo se puede describir como:

Producción de X = acumulación de X

$$r_x - r_d = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

$r_x = \mu x$  : Tasa de crecimiento de la población celular

$r_d = \alpha x$  : Tasa de desaparición de la población celular

$dx/dt$  : Acumulación de biomasa en el reactor

$\mu$  : Velocidad específica de crecimiento (máxima en la fase exponencial)

$\mu \gg \alpha$  : Condición de diseño

$$(\mu - \alpha)x = \frac{dx}{dt}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

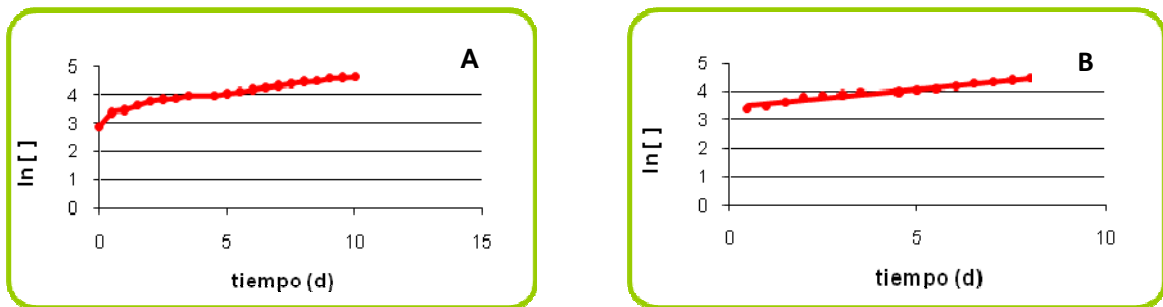
Resolviendo  $\ln x = \ln x_0 + \mu t$  (2)

La ecuación 2 caracteriza la fase exponencial de crecimiento celular.

### 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

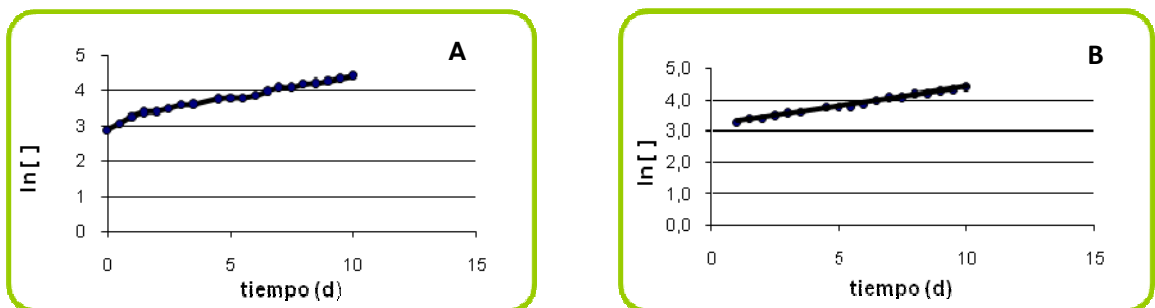
#### 3.1 TIPOS DE LUZ

Figura 6. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz roja A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial.



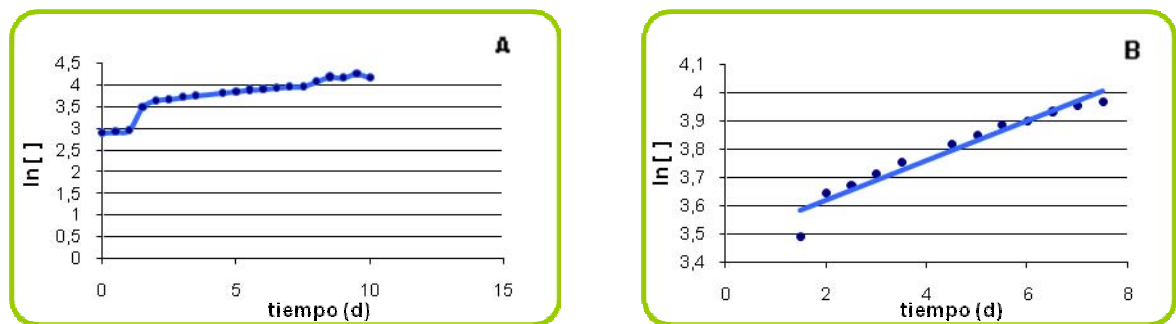
La figura 6A representa el crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo la irradiación de luz roja durante un ciclo 12 h luz-12 h oscuridad, observándose que la fase lag o de adaptación es menor a 12 h; la figura 6B representa la fase de crecimiento exponencial ajustada a un modelo lineal con una velocidad máxima de crecimiento de  $0,1293 \mu d^{-1}$  (tabla 1). Ambas graficas obedecen a los datos presentados en el anexo B (tabla B1).

Figura 7. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz blanca A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial.



La figura 7A representa el crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo la irradiación de luz blanca durante un ciclo 12 h luz-12 h oscuridad, observándose que la fase lag o de adaptación al igual que la luz roja es menor a 12 h; el modelo ajustado para la fase exponencial en la figura 7B arroja una velocidad máxima de crecimiento de  $0,1227 \text{ d}^{-1}$  (tabla 1). Ambas graficas obedecen a los datos presentados en el anexo B (tabla B2).

**Figura 8. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz azul A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial.**



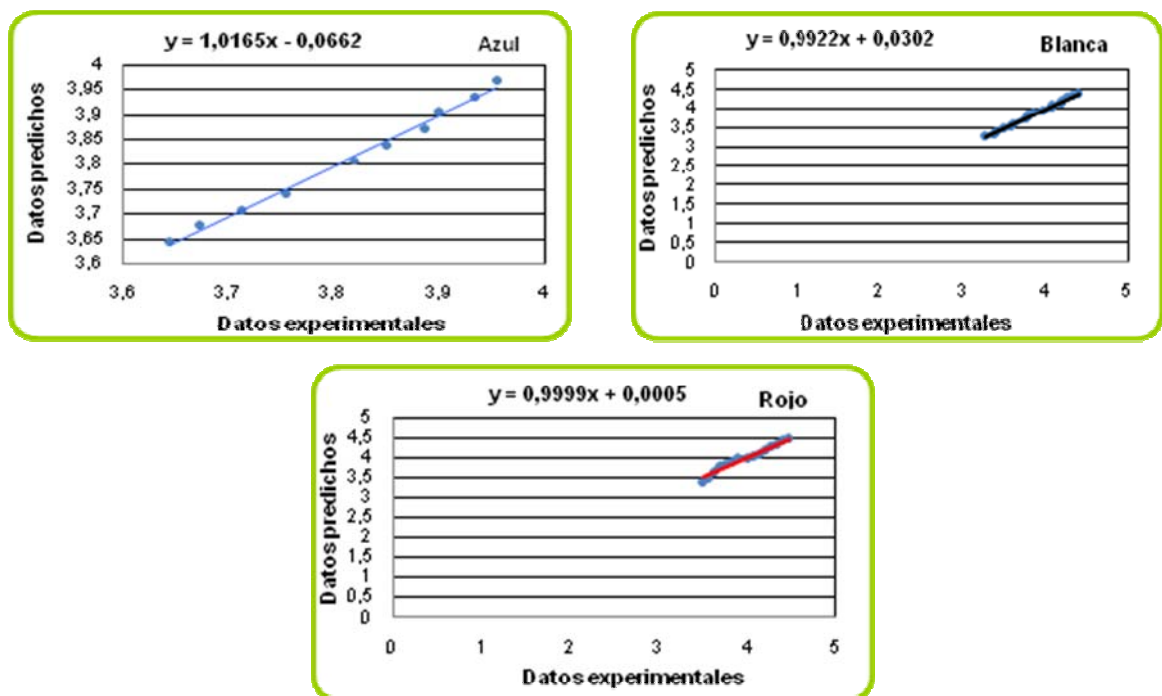
La figura 8A representa el crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo la irradiación de luz azul durante un ciclo 12 h luz-12 h oscuridad, observándose que la fase lag o de adaptación a diferencia de la luz roja y la luz blanca en aproximadamente de 24 h; en cuanto al modelo ajustado para el crecimiento exponencial de la figura 8B la velocidad máxima de crecimiento es de  $0,0653 \text{ d}^{-1}$  disminuyendo aproximadamente a la mitad respecto a los dos casos anteriores (tabla 1). Ambas graficas obedecen a los datos presentados en el anexo B (tabla B3).

**Tabla 1. Modelos de crecimiento de la fase exponencial para tipos de luz (ecuación 2)**

Tipo de luz	modelo $\ln x = \ln x_0 + \mu t$	$\mu \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$R^2$	$X_0 \text{ (mg/L)}$	$X_f \text{ (mg/L)}$
Rojo	$\ln x = 0,1293t + 3,4292$	0,1293	0,9649	18,00	101,89
Blanco	$\ln x = 0,1227t + 3,1752$	0,1227	0,9919	18,00	81,79
Azul	$\ln x = 0,0653t + 3,5119$	0,0653	0,9505	18,00	65,13

Comparando los tres tipos de luz en el crecimiento de la cepa estudiada no se han encontrado diferencias significativas en la cinética de crecimiento ( $\mu$ ) entre la luz blanca y luz roja a diferencia de la luz azul donde la velocidad máxima de crecimiento desciende aproximadamente en un 50% respecto a los otros dos tipos de luz experimentados; sin embargo de acuerdo a los datos reportados (anexo B tablas B1 a B3) hubo un mayor incremento de biomasa con la radiación roja para un mismo tiempo de estudio. Este comportamiento puede explicarse por que el espectro de acción de la clorofila a y b presentes en *Chorella vulgaris* tienen sus máximos de absorción en la radiación roja.

Figura 9. Validación de los modelos de crecimiento exponencial para los tipos de luz

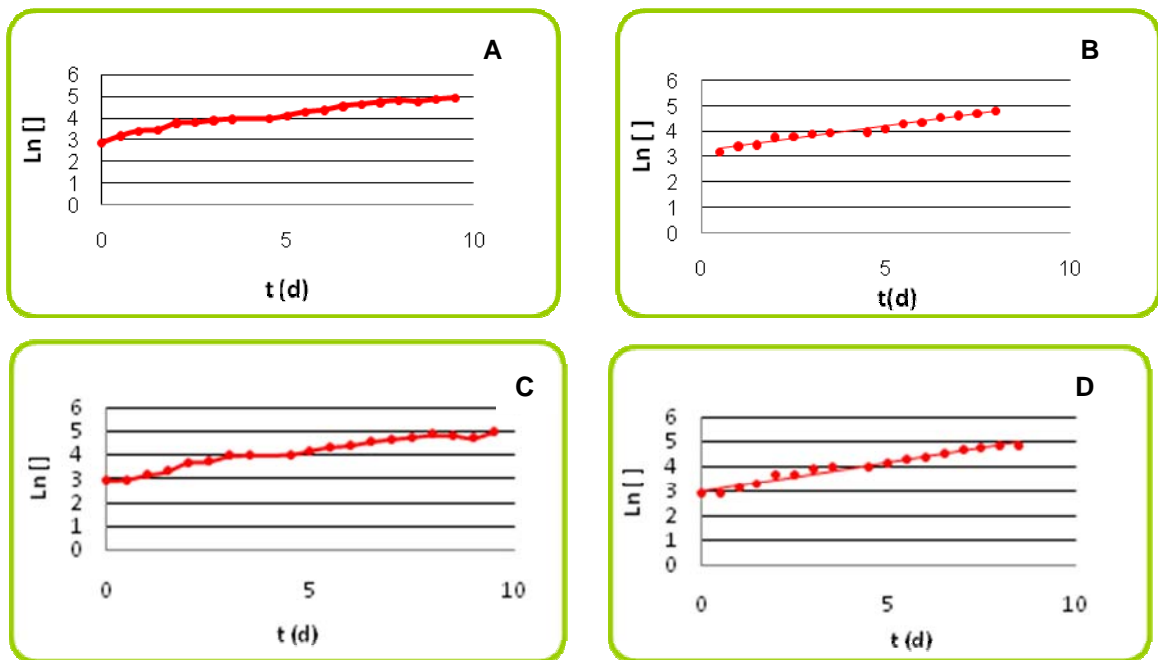


Al graficar los datos obtenidos experimentalmente con los predichos por el modelo se observa una tendencia lineal con pendientes cercanas a 1, lo que indica una buena correlación respecto a los datos medidos, esto es corroborado por el

coeficiente de determinación  $R^2$ , que para los modelos planteados es mayor al 95% (tabla 1).

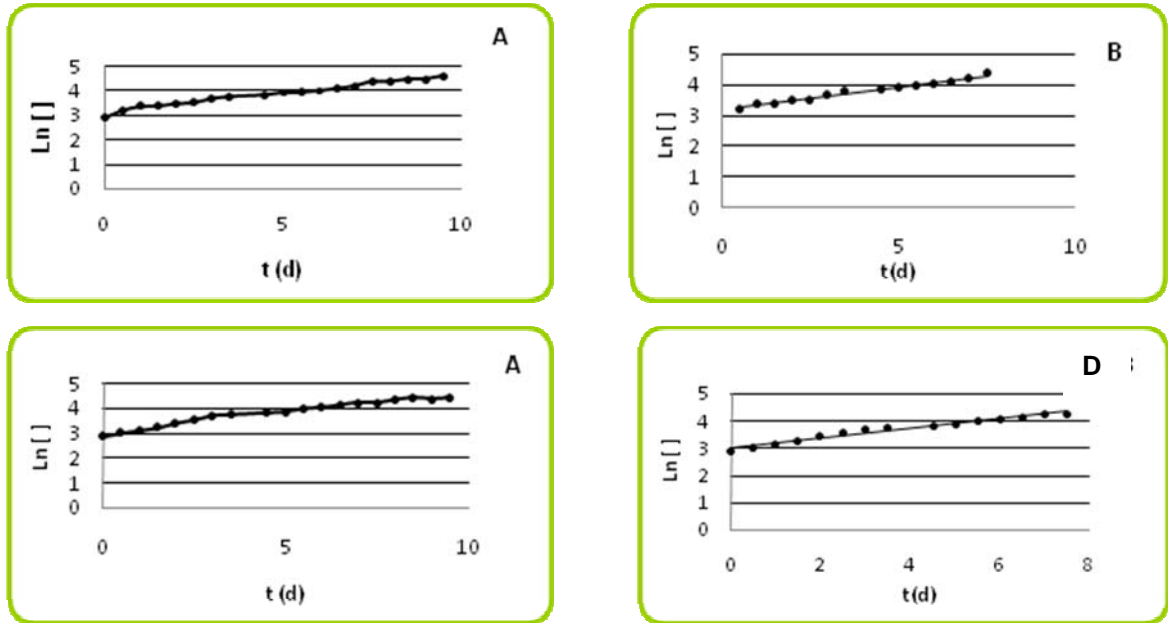
### 3.2 TIPOS DE CICLOS

Figura 10. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz roja ciclo 24-0 A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial; ciclo 18-6 C) Curva de crecimiento, D) Fase de crecimiento exponencial.



La figura 10 muestra un ajuste de los datos de crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz roja para los ciclos 24-0 y 18-6 luz-oscuridad respectivamente (anexo B tablas B6 y B7); observándose que la fase de adaptación es inferior a 12 h para el ciclo 24-0 (grafica A) a diferencia del ciclo 18-6 (grafica C) donde dicha fase es aproximadamente de 12h; en cuanto al modelo planteado en la fase exponencial (tabla 2), se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento de  $0,1980 \text{ d}^{-1}$  para el ciclo 24-0 (grafica B) y de  $0,2325 \text{ d}^{-1}$  para el ciclo 18-6 (grafica D).

Figura 11. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz blanca ciclo 24-0 A) Curva de crecimiento, B) Fase de crecimiento exponencial; ciclo 18-6 C) Curva de crecimiento, D) Fase de crecimiento exponencial.



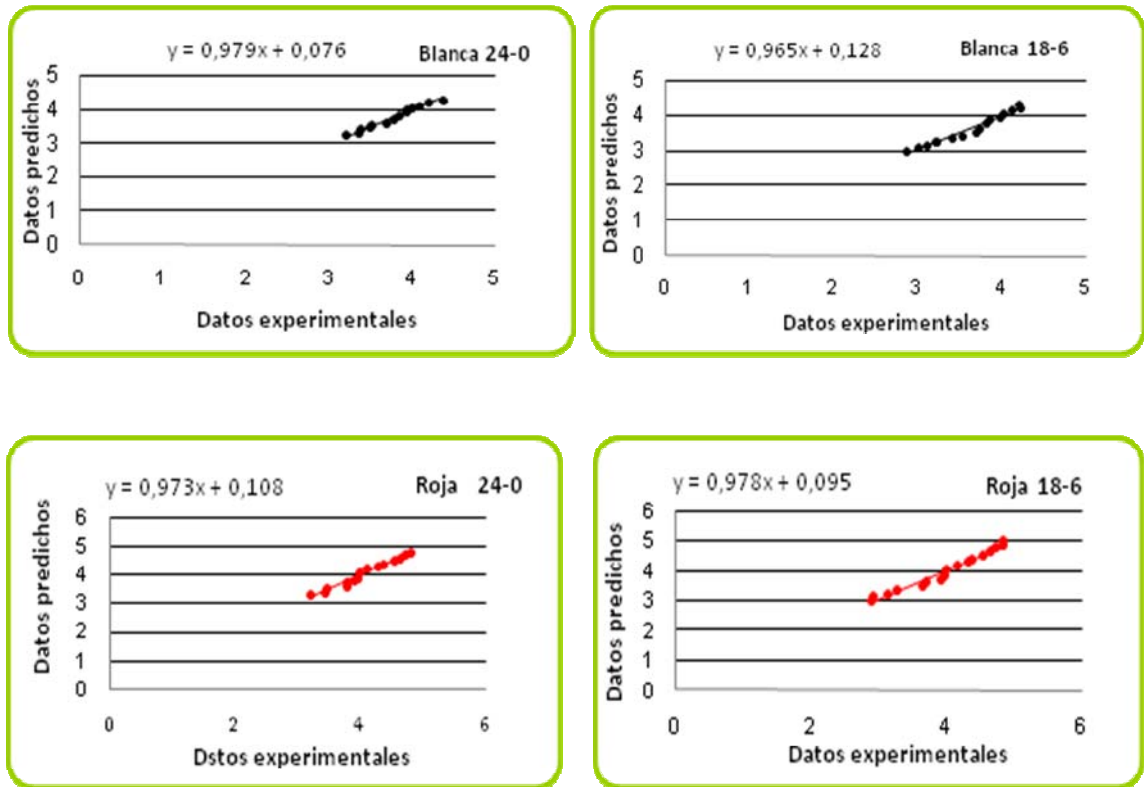
La figura 11 representa gráficamente los datos de crecimiento de *Chlorella vulgaris* con luz blanca para los ciclos 24-0 y 18-6 luz-oscuridad respectivamente (anexo B tablas B4 y B5); observándose que la fase de adaptación es inferior a 12 h para ambos casos (gráfica A y C); en cuanto al modelo planteado en la fase exponencial (tabla 2), se obtuvo una velocidad máxima de crecimiento de  $0,1471d^{-1}$  para el ciclo 24-0 (gráfica B) y de  $0,1775d^{-1}$  para el ciclo 18-6 (gráfica D).

**Tabla 2. Modelos de crecimiento de la fase exponencial para ciclos luz/oscuridad (ecuación 2)**

Ciclos luz-oscuridad	modelo $\ln x = \ln x_0 + \mu t$	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	X <sub>0</sub> (mg/L)	X <sub>f</sub> (mg/L)
Roja 24-0	$\ln x = 0,1980t + 3,2297$	0,198	0,9736	18,00	138,23
Roja 18-6	$\ln x = 0,2325t + 2,9996$	0,2325	0,9684	18,00	140,44
Roja 12-12	$\ln x = 0,1293t + 3,4292$	0,1293	0,9649	18,00	101,89
Blanco 24-0	$\ln x = 0,1471t + 3,1789$	0,1471	0,9797	18,00	100,06
Blanco 18-6	$\ln x = 0,1775t + 3,0111$	0,1775	0,9650	18,00	83,80
Blanco 12-12	$\ln x = 0,1227t + 3,1752$	0,1227	0,9919	18,00	81,79

Comparando los tres ciclos de luz-oscuridad en la producción de *Chlorella vulgaris* se encontraron diferencias significativas en la cinética de crecimiento ( $\mu$ ), observándose que el ciclo 18-6 reporta una velocidad específica de crecimiento superior a los otros dos ciclos estudiados, en cuanto a la biomasa obtenida, no se presenta discrepancia entre los ciclos 24-0 y 18-6 a diferencia del ciclo 12-12 donde la concentración fue menor. En base a los datos obtenidos se concluye que el ciclo 18-6 presenta un mayor rendimiento, permitiendo un balance entre la producción de biomasa y las tasas fotosintéticas evitando así la fotoinhibición y las sobreproducciones de O<sub>2</sub> durante el metabolismo, el cual al disolverse en el sistema puede no liberarse rápidamente inhibiendo la cadena de electrones que actúan en el proceso fotosintético e impidiendo que los cloroplastos se fotoadaptan a largas exposiciones de fotones [14, 15].

Figura 12. Validación de los modelos de crecimiento exponencial para los tipos de ciclos



Al igual que en la validación de los modelos para el tipo de luz, se observa una tendencia lineal con pendientes cercanas a 1, lo que indica una buena correlación de los datos predichos respecto a los datos medidos, lo cual es confirmado por el coeficiente de determinación  $R^2$ , que para los modelos planteados es mayor al 96% (tabla 2).

### 3.3 COEFICIENTE DE SUMINISTRO DE LUZ

El coeficiente de suministro de luz de un fotobiorreactor es definido como el producto de la energía de luz proporcionada por unidad de volumen ( $Et/V$ ), (Anexo C)

$$\frac{Et}{V} = 0.2176 I_0 \frac{SA}{1000V}$$

Para un biorreactor cilíndrico de 2L a una altura de 30 cm tenemos un SA= 0.087 m<sup>2</sup> y una intensidad de luz incidente I<sub>0</sub>= 550.56 Lux= 7.44 μmol/m<sup>2</sup>.s

$$\frac{Et}{V} = 0.2176 (7.440) \frac{0.087}{1000(0.002)}$$

$$\frac{Et}{V} = 0.070$$

Donde, Et = energía de luz total proporcionada (kJ/s), V = el volumen de medio de cultivo (m<sup>3</sup>), I<sub>0</sub>= intensidad de luz incidente (μmol/m<sup>2</sup>.s), SA = el área de la superficie de iluminación (m<sup>2</sup>) [29].

El cálculo del coeficiente de suministro de luz concuerda con lo publicado por Ogbonna et al 1996, mostrando una relación de energía suministrada por unidad de volumen muy baja, convirtiéndose en una de las principales desventajas de fotobiorreactores exteriormente iluminados.

#### 4. CONCLUSIONES

No se encontró diferencias significativas en la cinética de crecimiento ( $\mu$ ), entre la luz blanca y luz roja a diferencia de la luz azul donde la velocidad máxima de crecimiento desciende aproximadamente en un 50%; no obstante hubo un mayor incremento de biomasa con la radiación roja, debido a que el espectro de acción de la clorofila a y b presentes en *Chorella vulgaris* tienen sus máximos de absorción en la radiación roja aumentando la tasa fotosintética y por ende la concentración.

Con base en los datos obtenidos se concluye que el ciclo 18 horas de luz – 6 horas de oscuridad presenta un mayor rendimiento, permitiendo un balance entre la producción de biomasa y las tasas fotosintéticas, representando una velocidad específica de crecimiento superior a los otros dos ciclos de luz estudiados.

El coeficiente de suministro de luz (cantidad de energía suministrada por unidad de volumen) presenta un valor muy bajo, convirtiéndose en una de las principales desventajas de fotobiorreactores exteriormente iluminados que concuerda con lo reportado por Ogbonna et al 1996.

## 5. RECOMENDACIONES

En la utilización de luz solar, se recomienda el uso de lentes y fibras ópticas con los cuales podemos filtrar las longitudes de onda dejando pasar solamente el rango del espectro óptimo para el crecimiento de cada especie microbiana, para el caso *Chorella vulgaris* luz roja.

En el caso *Chorella vulgaris* un sistema de iluminación de luz solar y artificial integrado, donde la luz solar (filtrada) es usada durante el período soleado (12 horas), y la luz artificial (roja) es encendida 6 horas por la noche y con una posibilidad adicional de suministro de luz artificial (roja) en horas nubladas es una buena alternativa para el abastecimiento de luz continua (18 horas) en fotobiorreactores para lograr una máxima producción de microalgas.

Además recomendamos un cultivo autotrófico/heterotrófico cíclico no solo para prevenir la pérdida de biomasa en la noche sino también para conseguir el crecimiento de células continuamente, incluso bajo ciclos de luz/oscuridad.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Kishimoto M, Okakura T, Nagashima H, Minowa T, Yakayama S, Yamaberi K (1994) CO<sub>2</sub> fixation and oil production using microalgae. *J. Ferment. Bioengng.* 78: 479–482.
- [2] Bannister, T. T. (1988) Estimation of absorption coefficient of scattering suspensions using opal glass. *Limnol Oceanogr* 33: 607–615.
- [3] Geider RJ, Osborne BA (1992) *Algal photosynthesis*. Chapman and Hall, New York.
- [4] Ogbonna, J. C. and Tanaka, H. (2000) Light requirement and photosynthetic cell cultivation- Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors *J. Ferment. Bioeng.* 12: 207-218.
- [5] Quintero, R. R. (1981) *Ingeniería Bioquímica*. P 27-54
- [6] Tredici, M. R. (1999). Photobioreactors In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation*. New York: Wiley. P 395–419.
- [7] Richter, G (1972) *Fisiología del metabolismo de las plantas*. P 105-120
- [8] Abalde A, Cid A, Fidalgo P, Torres E, Herrero C (1995) *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Universidad de Da Coruña. 1- 210.

[9] Contreras FC, Peña CJ, Flores CL, Cañizares VR (2003) Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Vol. 28 N° 8 INERCIENCIA.

[10] Lu, C. and Vonshak, A. (1999) Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. *J. Appl. Phycol.* 11: 355-359.

[11] Fernández JM, García JL, García F, Molina E, Al-Dahhan MH, Huping L, Kemoun A (2002) Integration of fluid dynamics, light regime and photosynthetic response in photobioreactors. *1st Cong. Internat. Soc. Appl. Phycol* p. 114.

[12] Tschiersch, H. and Ohmann, E. (1993) Photoinhibition in *Euglena gracilis*: involvement of reactive oxygen species. *Planta* 191: 316–323.

[13] Vonshak A, Chanawongse L, Bunnag B, Tanticharoen M (1996) Light acclimation in three *Spirulina platensis* (cyanobacteria) isolates. *J. appl. Phycol.* 8: 35–40.

[14] Ogbonna J.C. and Tanaka, H. (1996) Night Biomass Loss and Changes in Biochemical Composition of Cells during Light/Dark Cyclic Culture of *Chlorella pyrenoidosa* *J. Ferment. Bioeng.* 6: 558-564.

[15] Lopes J, Gimenes SC, Ferreira LL, Franco T (2008a) Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors *ElSevier*.

[16] Grobbelaar, J. U. (2000) Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* 12: 201-206.

- [17] Pit SJ, Lee YIL, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HM and Basin MJ (1983) A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 33B: 35-58
- [18] ToniBo G, Carlozzi P, Pushparaj B, Montaini E, and Materassi R (1993) A two-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 891-898
- [19] Hoshino K, Hamochi M, Mitsuhashi S, and Tanishita, K (1991) Measurements of oxygen production rate in flowing *Spindina* suspension. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 35: 89-93
- [20] Anderson, D. B. and Eakin, D. E. (1985) A process for the uroduction of polysaccharides from microalgae. *Biotechnol. Symp.* 15: 533-547
- [21] Tredici, MR, Carlozzi P, Zettelli GC, and Materassi R (1991) A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technol.* 38: 153-159
- [22] Mori, K (1985) Photoautotrophic bioreactor using solar rays condensed by fresnel lenses. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 15: 331-345
- [23] Mignot L, Junter GA, and Labbe HF (1989) A new type of immobilized-cell photobioreactor with internal illumination by optical fibers. *Biotechnol. Tech.* 3: 299-304
- [24] Ogawa T, Kozawa H, Terui G (1971) Studies on the growth of *Spirulina platensis* (II) growth kinetics of an autotrophic culture. *J. Ferment. Technol.* 50: 143–149.

- [25] Ogbonna JC, Yada H, Tanaka H (1995c) Light supply coefficient – a new engineering parameter for photobioreactor design. *J. Ferment. Bioengng.* 80: 369–376.
- [26] Rabe AE, Benoit RJ (1962) Mean light intensity – A useful concept in correlating growth rates of dense cultures of microalgae. *Biotechnol. Bioengng.* 4: 377–390.
- [27] Acièn FG, García CF, Sánchez PJ, Fernández JS, Molina GE (1998) A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactor for the microalgal mass culture. *Biotechnol. Bioengng.* 55: 701–714.
- [28] Molina GE, Acièn FG, García CF, Chisti Y (1999) Photobioreactors: Light regime, mass transfer, and scale up. *J. Biotechnol.* 70: 231–247.
- [29] Ogbonna JC, Yada H, Masui H, Tanaka H (1996) A Novel Internally Illuminated Stirred Tank Photobioreactor for Large-Scale Cultivation of Photosynthetic Cells *J. Ferment. Bioeng.* 1: 61-67.

## ANEXOS

### ANEXO A. MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

**Figura A1.** Inoculo de *Chlorella Vulgaris*



Para inocular las cepas se utilizo un Bioflo 110 con volumen de trabajo de 3 L, cuatro módulos con bombas para ácido/base, antiespumante, nutrientes y control de temperatura/agitación y pH/O<sub>2</sub> dos módulos de controladores de mezcla de gases y de nivel (medio/espuma).

**Figura A2.** Montaje del cultivo microbiano



Montaje utilizado para estipular el tipo de luz y el ciclo de luz/oscuridad adecuado en el crecimiento de *Chlorella Vulgaris* en un fotobiorreactor a escala laboratorio.

## EQUIPOS UTILIZADOS

**Figura A3.** Espectrofotómetro



La absorbancia se midió por medio de un espectrofotómetro Spectroquant 300 Merck con un rango de longitud de onda de 190-1100 nm, ancho de banda espectral 4 nm lámpara de destello de xenón y una resolución de absorbancia de 0.001 A.

**Figura A4.** Centrifuga



Para separar la *Chlorella Vulgaris* del medio de cultivo se utilizó una centrifuga PowerSpin™ MX con rotor de 24 tubos de 2 a 10 mL, Velocidad variable de 1000 a 3400 RPM y cámara de muestras de acero inoxidable para fácil limpieza.

**Figura A5. Horno**



El secado de la muestra para el cálculo del peso seco se realizó en un horno Binder 500 a 105 °C, maneja un rango de temperatura de 5 °C por encima de la temperatura ambiente hasta 300 °C, temporizador electrónico 0 – 99.59 h, controlador de microprocesador con display LED y temporizador integrado.

**Figura**

**A6.**

**Luxómetro**



La intensidad de luz se midió con un luxómetro Amprobe LM631A, construido en la curva del espectro CIE para la respuesta exacta del ojo humano y amplia gama de luz de hasta 20.000 fc o lux.

## ANEXO B. DATOS EXPERIMENTALES

**Tabla B1:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (luz roja)

Tiempo (d)	Abs	X(mg/L)	ln(X)
0	....	18	2,89037176
0,5	0,305	29,5582709	3,3863636
1	0,3315	32,2827724	3,47453373
1,5	0,384	37,6803697	3,62913926
2	0,445	43,9518637	3,78309503
2,5	0,473	46,8305823	3,84653646
3	0,4865	48,2185359	3,87574351
3,5	0,53	52,6908308	3,96444145
4,5	0,535	53,2048877	3,97415027
5	0,5715	56,9575029	4,04230543
5,5	0,602	60,0932499	4,09589752
6	0,658	65,850687	4,18738986
6,5	0,711	71,29969	4,26689198
7	0,7535	75,6691736	4,32637086
7,5	0,807	81,1695822	4,39654057
8	0,864	87,0298307	4,46625094
8,5	0,872	87,8523217	4,47565724
9	0,9675	97,6708083	4,58160272
9,5	0,988	99,7784415	4,60295214
10	1,0085	101,886075	4,62385527

**Tabla B2:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (luz blanca)

<b>Tiempo (d)</b>	<b>Abs</b>	<b>X(mg/L)</b>	<b>ln(X)</b>
0	...	18,0000000	2,89037176
0,5	0,2285	21,6932006	3,07699887
1	0,2725	26,2169012	3,26640429
1,5	0,3050	29,5582709	3,3863636
2	0,3095	30,0209221	3,40189454
2,5	0,3370	32,848235	3,49189801
3	0,3665	35,8811706	3,58021266
3,5	0,3750	36,7550673	3,6042761
4,5	0,4370	43,1293727	3,76420427
5	0,4450	43,9518637	3,78309503
5,5	0,4475	44,2088922	3,78892595
6	0,4740	46,9333936	3,84872944
6,5	0,5370	53,4105104	3,97800755
7	0,5985	59,7334101	4,0898915
7,5	0,6010	59,9904385	4,09418519
8	0,6595	66,0049041	4,18972904
8,5	0,6695	67,0330179	4,2051853
9	0,7105	71,2482843	4,26617074
9,5	0,7625	76,5944759	4,33852496
10	0,8130	81,7864505	4,40411159

**Tabla B3:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (luz azul)

<b>Tiempo (d)</b>	<b>Abs</b>	<b>X(mg/L)</b>	<b>ln(X)</b>
0	....	18	2,89037176
0,5	0,1955	18,3004251	2,90692429
1	0,2040	19,1743218	2,95357198
1,5	0,3360	32,7454236	3,48876322
2	0,3890	38,1944266	3,6426896
2,5	0,4000	39,3253517	3,67186939
3	0,4155	40,9189281	3,71159275
3,5	0,4325	42,6667215	3,75341926
4,5	0,4605	45,5454401	3,81871051
5	0,4745	46,9847993	3,84982413
5,5	0,4915	48,7325927	3,88634806
6	0,4975	49,349461	3,89892684
6,5	0,5145	51,0972544	3,93373077
7	0,5250	52,1767739	3,95463745
7,5	0,5315	52,8450478	3,96736401
8	0,5895	58,8081077	4,07427973
8,5	0,6560	65,6450643	4,18426242
9	0,6450	64,5141391	4,16688441
9,5	0,7040	70,5800104	4,25674697
10	0,6510	65,1310074	4,17640074

**Tabla B4:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (ciclo 24-0 luz blanca)

Tiempo(d)	Abs	X(mg/L)	ln x
0	....	18	2,890371758
0,5	0,445	24,5615142	3,201180754
1	0,514	28,93585699	3,365081552
1,5	0,521	29,35646688	3,379512859
2	0,572	32,553102	3,482872664
2,5	0,588	33,60462671	3,514663757
3	0,684	39,66140904	3,680378651
3,5	0,740	43,17350158	3,765226918
4,5	0,791	46,41219769	3,837562306
5	0,860	50,7444795	3,926802834
5,5	0,869	51,29127234	3,937520608
6	0,919	54,46687697	3,997592755
6,5	1,003	59,76656151	4,090446333
7	1,103	66,05467928	4,190482873
7,5	1,310	79,13564669	4,371163427
8	1,318	79,61934805	4,377257129
8,5	1,450	87,96845426	4,476978276
9	1,460	88,59936909	4,484124737
9,5	1,642	100,0609884	4,605779884

**Tabla B5:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (ciclo 18-6 luz blanca)

Tiempo(d)	Abs	X(mg/L)	ln x
0	.....	18	2,890371758
0,5	0,384	20,71293375	3,030758324
1	0,418	22,87907466	3,130222722
1,5	0,459	25,44479495	3,236511202
2	0,540	30,53417455	3,418846533
2,5	0,606	34,7402734	3,547899631
3	0,709	41,23869611	3,719377042
3,5	0,735	42,85804416	3,757893356
4,5	0,787	46,13880126	3,831654272
5	0,823	48,41009464	3,879708359
5,5	0,919	54,44584648	3,997206565
6	0,960	57,03259727	4,043622986
6,5	1,057	63,15247108	4,145551978
7	1,160	69,67192429	4,243797429
7,5	1,148	68,893796	4,23256613
8	1,283	77,41114616	4,349130777
8,5	1,389	84,14090431	4,432492826
9	1,324	80,03995794	4,382525984
9,5	1,384	83,8044164	4,428485708

**Tabla B6:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (ciclo 24-0 luz roja)

Tiempo(d)	Abs	X(mg/L)	ln x
0	....	18	2,890371758
0,5	0,448	24,72975815	3,208007302
1	0,546	30,91272345	3,431167861
1,5	0,568	32,32176656	3,475740891
2	0,754	44,03575184	3,785001846
2,5	0,767	44,85594111	3,803456046
3	0,845	49,77707676	3,907554572
3,5	0,893	52,80546793	3,966614745
4,5	0,912	54,0042061	3,989061934
5	1,033	61,68033649	4,121965185
5,5	1,221	73,54153523	4,297850352
6	1,311	79,19873817	4,371960367
6,5	1,573	95,70767613	4,561298506
7	1,702	103,8464774	4,64291363
7,5	1,867	114,256572	4,738446551
8	2,016	123,6782334	4,817683301
8,5	1,918	117,4742376	4,766219055
9	2,117	130,0294427	4,867760907
9,5	2,247	138,2313354	4,928928625

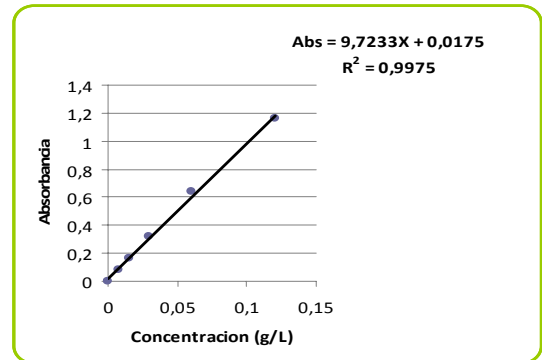
**Tabla B7:** Variación de la absorbancia y la concentración con el tiempo (ciclo 18-6 luz roja)

Tiempo(d)	Abs	X(mg/L)	ln x
0	....	18	2,890371758
0,5	0,352	18,69400631	2,928202954
1	0,418	22,87907466	3,130222722
1,5	0,473	26,32807571	3,270635887
2	0,665	38,42060988	3,648594031
2,5	0,689	39,97686646	3,688300948
3	0,853	50,28180862	3,917643354
3,5	0,895	52,93165089	3,969001476
4,5	0,918	54,40378549	3,996433738
5	1,066	63,74132492	4,154833095
5,5	1,242	74,82439537	4,315143973
6	1,319	79,70347003	4,378313124
6,5	1,544	93,92008412	4,542444252
7	1,712	104,4984227	4,649171978
7,5	1,848	113,0788644	4,72808549
8	2,031	124,6246057	4,825306064
8,5	2,019	123,8464774	4,819042713
9	1,792	109,5457413	4,696342191
9,5	2,282	140,4395373	4,944777057

**Tabla B8.** Variación de la absorbancia con la concentración del Inoculo

X(g/l)	Abs
0	0
0,12	1,164
0,06	0,639
0,03	0,32
0,015	0,165
0,0075	0,081

**Figura B1.** Calculo del coeficiente de extinción molar



La pendiente de la gráfica de absorbancia vs concentración nos indica el valor del coeficiente de extinción molar (ecuación 1).

## **ANEXO C. GENERALIDADES DE FOTOBIORREACTORES**

### **TIPOS DE FOTOBIORREACTORES**

Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos [16], los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera.

Actualmente los sistemas abiertos son usados para casi toda la producción de algas comerciales. Sin embargo, es difícil obtener altos niveles de productividad en sistemas abiertos, debido a la variación diurna y estacional tanto en la temperatura como en la intensidad de luz. La explotación eficaz del potencial comercial de algas por consiguiente, requiere del desarrollo eficiente y rentable de los fotobiorreactores. Con respecto a esto, los fotobiorreactores cerrados, en los que el control completo de las condiciones de cultivo es posible, son preferidos a los sistemas de cultivo abiertos.

Varios fotobiorreactores cerrados han sido propuestos para el cultivo de microalgas, entre estos se encuentran el vertical o tubular horizontal [17, 18], serpentino helicoidal [19] y tipo de paneles inclinado o horizontal [20, 21]. El criterio de diseño principal en estos fotobiorreactores es suministrar la luz eficientemente maximizando el radio de iluminación superficie-volumen.

La utilización de la energía solar para la producción masiva de microalgas requiere de fotobiorreactores con amplias zonas de iluminación, como lo son open ponds, reactores tubulares inclinados u horizontales o paneles. Sin embargo con el

avance en la tecnología solar, el uso eficiente de esta energía es posible aun en fotobiorreactores con pequeñas zonas expuestas a la luz [18, 20, 21]. Sin embargo, un método apropiado para recoger la energía solar y distribuir la luz dentro del fotobiorreactor es el uso de fibras ópticas [22, 23], pero estas son actualmente muy costosas y poseen problemas técnicos esto hace difícil el uso de ellas eficientemente en fotobiorreactores.

## **VALORACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LUZ DENTRO DE FOTOBIORREACTORES**

**Coefficiente de suministro de luz del fotobiorreactor:** El coeficiente de suministro de luz de un fotobiorreactor es una función del tamaño de cada unidad y la intensidad de luz. Es técnicamente más fácil cambiar la intensidad de luz que el tamaño de la unidad. Dependiendo del alcance requerido del coeficiente de suministro de luz, el tamaño de cada unidad es arreglado, y cambiando la intensidad de luz (usando una fuente de luz con la intensidad de luz controlable), el reactor puede ser usado para varios procesos. De este modo, el coeficiente de suministro de luz del fotobiorreactor puede ser cambiado incluso durante el cultivo, manteniéndolo bajo en la etapa inicial cuando la concentración de célula todavía es baja, y incrementándolo cuando el cultivo avanza.

El coeficiente de suministro de luz de un fotobiorreactor es definido como el producto de la energía de luz proporcionada por unidad de volumen ( $E_t/V$ ), se calcula con la siguiente ecuación 3:

$$\frac{E_t}{V} = 0.2176 I_0 \frac{5A}{1000V} \quad (3)$$

Donde,  $E_t$  = energía de luz total proporcionada (kJ/s),  $V$  = el volumen de caldo de cultivo ( $m^3$ ),  $I_0$  = intensidad de luz incidente ( $\mu\text{mol}/m^2 \cdot s$ ),  $SA$  = el área de la superficie de iluminación ( $m^2$ ) [29].

**Intensidad de luz incidente:** La intensidad de luz incidente ha sido ampliamente usada para describir el suministro de luz a fotobiorreactores [24]. Sin embargo, esto es útil solamente en concentraciones de célula muy bajas y con un sendero de luz muy angosto (paneles muy finos o fotobiorreactores tubulares angostos). Por lo tanto, los modelos matemáticos basados en la intensidad de luz incidente usualmente suponen que todas las células reciben la misma intensidad de luz, que no es verdadero en fotobiorreactores a gran escala que contienen concentraciones de células generalmente bastante altas [25].

**Intensidad de luz media:** La intensidad de luz media [26] es una mejor indicación de las condiciones de luz dentro del fotobiorreactor que la intensidad de luz incidente. El concepto de la intensidad de luz media yace sobre la suposición de que, cuándo la dinámica del cultivo es tal que el tiempo de residencia de cada célula en cada ubicación es muy breve, funciona como si estuviese experimentando una intensidad de luz constante, que es igual al promedio de las intensidades de luz locales (la integración de luz completa). La intensidad de luz media ( $\bar{I}$ ) puede ser calculada de la ecuación (4), dónde,  $I$  es la intensidad de luz en una distancia  $l$  desde la superficie de iluminación,  $IS$  es la superficie de la iluminación mientras  $BS$  es la superficie opuesta del fotobiorreactor.

$$\bar{I} = \frac{\int_{IS}^{BS} I dl}{\int_{IS}^{BS} dl} \quad (4)$$

Modelos más exactos para calcular la intensidad de luz media en fotobiorreactores tubulares al aire libre han sido reportados [27, 28]. Suponiendo que la intensidad

de luz es más baja que la intensidad inhibitoria, la relación entre la tasa de crecimiento específica en un punto dado ( $\mu$ ) con la intensidad de luz local  $I(l)$  puede ser descrita por una ecuación de tipo Monod como se muestra en la ecuación (5).

$$\mu = \frac{\mu_m I(l)}{K_L + I(l)} \quad (5)$$

Aquí,  $\mu$  es la tasa de crecimiento específico,  $\mu_m$  es la tasa de crecimiento específica máxima,  $I(l)$  es la intensidad de luz en un punto  $l$ , mientras que  $K_L$  es la constante de saturación de luz.

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_m \bar{I}}{K_L + \bar{I}} \quad (6)$$

$$\bar{\mu} = \int_{I_S}^{B_S} \mu = \frac{\mu_m}{L} \int_{I_S}^{B_S} \frac{I(l)}{K_L + I(l)} dl \quad (7)$$

Aquí,  $L$  es la profundidad del reactor. Para un fotobiorreactor homogéneamente iluminado, las ecuaciones (6) y (7) producirían los mismos resultados. Sin embargo, en fotobiorreactores prácticos, la intensidad de luz no es homogénea y las ecuaciones (6) y (7) producirían resultados muy diferentes dependiendo de la magnitud de la variación entre las intensidades de luz locales. Cuando la fotoinhibición y las zonas oscuras dentro del fotobiorreactor son relativamente pequeñas, una buena mezcla puede ser usada para reducir el tiempo de residencia de cada célula en estas condiciones. En tal caso, dependiendo del tipo de célula, puede haber integración de luz completa con el propósito de que los pronósticos de las ecuaciones (6) y (7) puedan estar muy cerca. Sin embargo, cuando las zonas de oscuridad y de fotoinhibición son muy grandes, la sola dinámica inestable del cultivo no puede causar la integración de luz completa y las ecuaciones (6) y (7) resultaran muy diferentes sin importar como sea mezclado el

cultivo. Sin considerar la condición de luz dentro del fotobiorreactor, la ecuación (7) puede ser usada para el pronóstico exacto de la tasa de crecimiento, pero la ecuación (6) puede ser usada solamente cuando la luz es distribuida homogéneamente o cuando las zonas de oscuridad y fotoinhibición son tan angostas que mezclar puede ser usado para conseguir la integración de luz completa.

La confiabilidad de la intensidad de luz media como un índice de las condiciones de luz dentro de fotobiorreactores de varios tamaños ha sido investigada [25]. Aunque usando fotobiorreactores del mismo tamaño, las relaciones entre las tasas de crecimiento lineal y las intensidades de luz media eran lineales, no existe ninguna correlación entre estos cuando se usaron fotobiorreactores de varios tamaños. Por lo tanto, la utilidad de las intensidades de luz media como un índice de condición de luz dentro de fotobiorreactores es muy limitado. Incluso si las intensidades de luz local son pronosticadas con exactitud, la validez de la intensidad de luz media depende de la magnitud de la variación en las intensidades de luz local y el tiempo de residencia actual de cada célula en cada zona.

El proceso fotosintético es fotoquímico en la naturaleza y con base en la ley de la equivalencia fotoquímica de Einstein, las tasas de la fotosíntesis (y por lo tanto, las tasas de crecimiento de célula) deben ser proporcionales a la tasa de absorción de energía de luz por las células. Durante la fase de crecimiento lineal, la concentración de célula es bastante alta la cual depende de la profundidad del fotobiorreactor, casi toda la energía de luz proporcionada es absorbida por las células en crecimiento. La energía de luz total proporcionada por unidad de volumen del fotobiorreactor ( $E_t V^{-1}$ ) por consiguiente, sería una mejor medida del rendimiento del fotobiorreactor que la intensidad de luz incidente o las intensidades de luz media [4].

## ANEXO D. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÁMPARAS

Figura D1. Espectro de luz azul

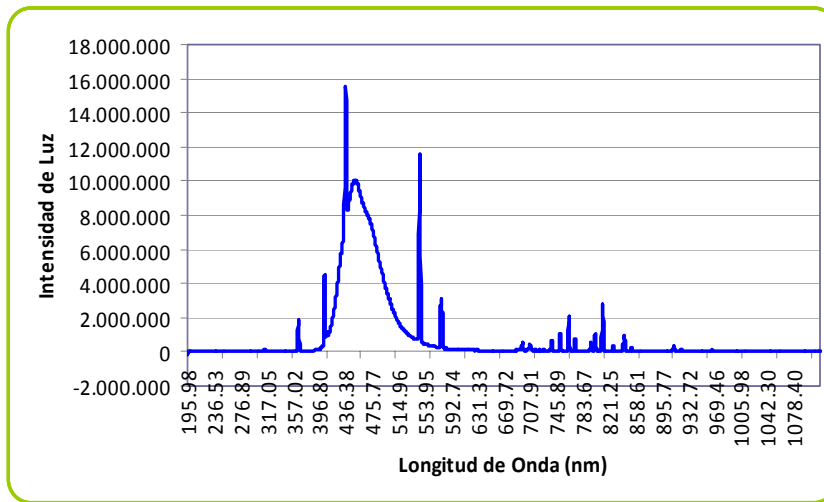
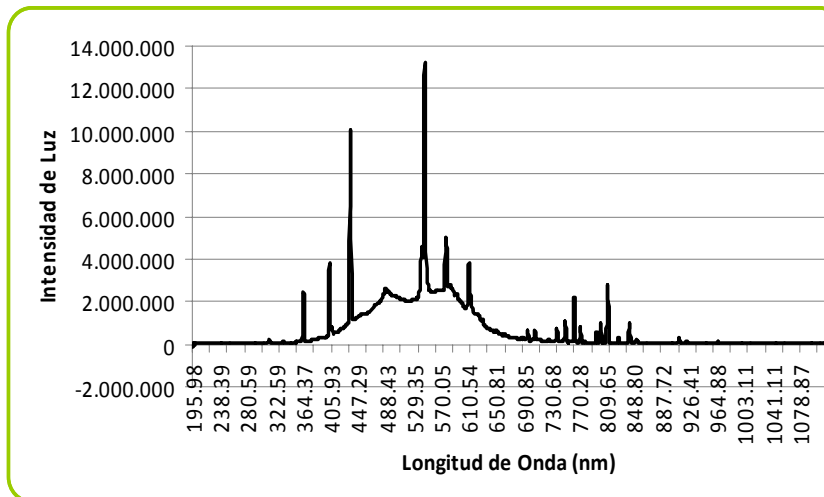
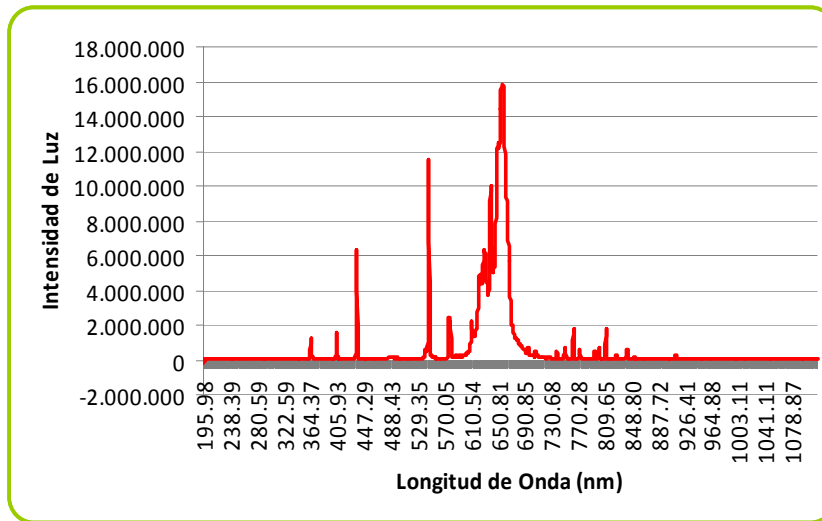


Figura D2. Espectro de luz Blanca



**Figura D3.** Espectro de luz Roja



## ANEXO E. COMPOSICIÓN DEL MEDIO BOLD BASAL

<b>Soluciones Stock</b>	<b>Para 400 ml</b>
<b>(1).</b> NaNO <sub>3</sub>	10.0 g
<b>(2).</b> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.0 g
<b>(3).</b> NaCl	1.0 g
<b>(4).</b> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0 g
<b>(5).</b> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.0 g
<b>(6).</b> CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0 g

<b>Soluciones Stock</b>	<b>Para un Litro</b>
<b>(7).</b> Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse): ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.44 g
MoO <sub>3</sub>	0.71 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.57 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.49 g
<b>(8).</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42 g
<b>(9).</b> EDTA	50.0 g
KOH	31.0 g
<b>(10).</b> FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.98 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	1.0 ml

<b>Medio</b>	<b>Para un Litro</b>
Soluciones Stock 1 - 6	10 ml cada una
Soluciones Stock 7 - 10	1 ml cada una